

Rolle der Androgen- und Östrogenregulation in der  
Pathogenese der experimentellen Autoimmun-Orchitis der Ratte

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

vorgelegt von  
Vera Theresa Wilke  
aus Neustadt an der Waldnaab

Gießen, 2021

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

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt  
Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: Donnerstag, 05.08.2021

Meiner großartigen Familie,  
meinen wunderbaren Freunden,  
meinem vierbeinigen Weggefährten.



# Inhaltsangabe

|                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Inhaltsangabe .....</b>                                             | <b>I</b>    |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                     | <b>V</b>    |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                     | <b>VII</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                       | <b>VIII</b> |
| <br>                                                                   |             |
| <b>1      Einleitung.....</b>                                          | <b>1</b>    |
| 1.1    Aufbau und Gliederung des Hodens.....                           | 1           |
| 1.1.1    Embryonale Entwicklung des Hodens .....                       | 1           |
| 1.1.2    Makroskopische Anatomie des Hodens .....                      | 1           |
| 1.1.3    Mikroskopische Anatomie des Hodens.....                       | 2           |
| 1.1.3.1    Tubuli seminiferi contorti .....                            | 2           |
| 1.1.3.2    Tubuläre Zelltypen.....                                     | 2           |
| 1.1.3.2.1    Sertoli-Zellen .....                                      | 2           |
| 1.1.3.2.2    Peritubulärzellen .....                                   | 3           |
| 1.1.3.3    Interstitielle Zelltypen.....                               | 3           |
| 1.1.3.3.1    Leydig-Zellen.....                                        | 3           |
| 1.1.3.3.2    Immunzellen des Hodens .....                              | 4           |
| 1.2    Hormonelle Regulation und Funktionen des Hodens .....           | 6           |
| 1.2.1    Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.....                    | 6           |
| 1.2.2    Synthese und Regulation von Androgenen und Östrogenen .....   | 8           |
| 1.2.2.1    Wirkung der Sexualhormone am Hoden .....                    | 10          |
| 1.2.2.1.1    Androgene.....                                            | 10          |
| 1.2.2.1.2    Östrogene .....                                           | 10          |
| 1.2.2.1.2.1    Östrogensynthese .....                                  | 10          |
| 1.2.2.1.2.2    Östrogenwirkungen.....                                  | 11          |
| 1.2.2.1.2.3    Testikuläre Östrogenrezeptoren .....                    | 17          |
| 1.2.2.1.2.4    Testikuläre Östrogenwirkungen.....                      | 20          |
| 1.2.2.1.2.5    Östrogenrezeptorexpression in Immunzellen.....          | 22          |
| 1.2.2.1.2.6    Aromatase- und Östrogenrezeptor-Knock out-Modelle ..... | 23          |
| 1.3    Immunprivileg des Hodens.....                                   | 25          |

|          |                                                                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.1    | Blut-Hoden-Schranke.....                                                                           | 26        |
| 1.3.2    | Testikuläres Immunsystem und Meiotic Germ Cell Antigens.....                                       | 26        |
| 1.3.3    | Immunmodulierende Wirkung des Testosterons und Androgenrezeptor-<br>Expression in Immunzellen..... | 28        |
| 1.4      | Hodenentzündungen als Ursache männlicher Infertilität .....                                        | 29        |
| 1.4.1    | Epidemiologie und Ätiopathogenese der männlichen Infertilität .....                                | 29        |
| 1.4.2    | Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Orchitis.....                                          | 30        |
| 1.4.3    | Histopathologie der Orchitis und experimentellen Autoimmun-Orchitis.....                           | 31        |
| 1.4.4    | Funktionelle und hormonelle Veränderungen bei der experimentellen<br>Autoimmun-Orchitis .....      | 32        |
| 1.5      | Immunmodulierende Wirkung der Sexualhormone .....                                                  | 33        |
| 1.5.1    | Wirkung der Östrogene und Androgene auf das Immunsystem .....                                      | 33        |
| 1.5.2    | Bedeutung der Sexualhormone für den Immundimorphismus .....                                        | 36        |
| 1.6      | Zielsetzung der Arbeit .....                                                                       | 38        |
| <b>2</b> | <b>Materialien und Methoden .....</b>                                                              | <b>39</b> |
| 2.1      | Materialien.....                                                                                   | 39        |
| 2.1.1    | Chemikalien .....                                                                                  | 39        |
| 2.1.2    | Reagenzien für die Polymerase-Kettenreaktion.....                                                  | 39        |
| 2.1.3    | Kits .....                                                                                         | 40        |
| 2.1.4    | Puffer und Lösungen.....                                                                           | 40        |
| 2.1.5    | Geräte, Equipment und Software .....                                                               | 41        |
| 2.1.6    | Reagenzien und Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....                                       | 42        |
| 2.1.7    | Primer.....                                                                                        | 43        |
| 2.1.8    | Versuchstiere.....                                                                                 | 44        |
| 2.2      | Methoden .....                                                                                     | 44        |
| 2.2.1    | Experimentelles Design .....                                                                       | 44        |
| 2.2.2    | Induktion der experimentellen Autoimmun-Orchitis.....                                              | 44        |
| 2.2.3    | Gewebeentnahme .....                                                                               | 45        |
| 2.2.4    | Gewebeschnitte und Immunfluoreszenz .....                                                          | 45        |
| 2.2.5    | Fluoreszenzmikroskopie .....                                                                       | 47        |
| 2.2.6    | RNA-Isolierung.....                                                                                | 47        |
| 2.2.7    | Messung der RNA-Konzentration .....                                                                | 47        |
| 2.2.8    | RNA-Aufbereitung.....                                                                              | 48        |

|          |                                                                                                                                   |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.9    | Reverse Transkription .....                                                                                                       | 48        |
| 2.2.10   | Polymerase-Kettenreaktion .....                                                                                                   | 49        |
| 2.2.11   | Gelelektrophorese .....                                                                                                           | 50        |
| 2.2.12   | Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....                                                                | 51        |
| 2.2.13   | Statistische Analyse .....                                                                                                        | 53        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                                                            | <b>54</b> |
| 3.1      | Histopathologie des Rattenhodens nach EAO-Induktion .....                                                                         | 54        |
| 3.2      | Immunfluoreszenzfärbungen für AR, ER und ARO im Hoden von EAO-,<br>Adjuvans- und Kontrollratten .....                             | 55        |
| 3.2.1    | Testikuläre AR-Expression .....                                                                                                   | 55        |
| 3.2.1.1  | AR-Expression in SZ, LZ und PTZ .....                                                                                             | 55        |
| 3.2.1.2  | Keine sichere AR-Expression in testikulären Leukozyten .....                                                                      | 57        |
| 3.2.2    | Testikuläre ER $\alpha$ -Expression .....                                                                                         | 59        |
| 3.2.2.1  | ER $\alpha$ -Expression bei EAO-, Adjuvans- und Kontrollratten .....                                                              | 59        |
| 3.2.2.2  | Interstitielle ER $\alpha$ -Expression überwiegend in LZ .....                                                                    | 61        |
| 3.2.2.3  | Tubuläre ER $\alpha$ -Expression in SZ und Spermatogonien.....                                                                    | 63        |
| 3.2.3    | Testikuläre ER $\beta$ -Expression .....                                                                                          | 65        |
| 3.2.4    | Testikuläre ARO-Expression .....                                                                                                  | 67        |
| 3.2.5    | Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-Färbungen .....                                                                              | 69        |
| 3.3      | Quantitative mRNA-Expressionsanalyse für AR, ER $\alpha$ , LHR, ARO, SF-1 und<br>StAR bei EAO-, Adjuvans- und Kontrollratten..... | 70        |
| 3.3.1    | Erfolgreiche Isolierung und reverse Transkription der testikulären RNA.....                                                       | 70        |
| 3.3.2    | Konstante testikuläre mRNA-Expression von SF-1 und StAR bei EAO-Ratten                                                            | 73        |
| 3.3.3    | Konstante testikuläre AR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten .....                                                                     | 75        |
| 3.3.4    | Reduzierte testikuläre ER $\alpha$ -mRNA-Expression bei EAO-Ratten.....                                                           | 76        |
| 3.3.5    | Reduzierte testikuläre LHR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten.....                                                                    | 77        |
| 3.3.6    | Zusammenfassung der quantitativen mRNA-Expressionsanalyse .....                                                                   | 78        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                                            | <b>79</b> |
| 4.1      | Histopathologische Befunde und Immunfluoreszenz-Färbungen der testikulären<br>Hormonrezeptoren bei EAO .....                      | 79        |
| 4.2      | Quantitative mRNA-Expression der testikulären Hormonrezeptoren bei EAO.                                                           | 83        |
| 4.3      | Lokale Effekte der EAO auf die testikuläre Steroidogenese .....                                                                   | 84        |
| 4.4      | Systemische Effekte der EAO auf die Androgen- und Östrogenregulation .....                                                        | 88        |

|          |                                                                                                                    |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5      | Auswirkungen der bei EAO veränderten Androgen- und Östrogenregulation auf die testikuläre Entzündungsreaktion..... | 92         |
| 4.6      | Limitationen des experimentellen Vorgehens .....                                                                   | 95         |
| 4.7      | Methodische Optimierungsansätze und Perspektive .....                                                              | 97         |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                                       | <b>99</b>  |
| <b>6</b> | <b>Summary .....</b>                                                                                               | <b>101</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                  | <b>103</b> |
| <b>8</b> | <b>Anhang.....</b>                                                                                                 | <b>128</b> |
| 8.1      | Publikationsverzeichnis .....                                                                                      | 128        |
| 8.2      | Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation.....                                                                    | 129        |
| 8.3      | Danksagung .....                                                                                                   | 130        |

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung   | Bedeutung                                         |
|-------------|---------------------------------------------------|
| A. dest.    | destilliertes Wasser                              |
| AR          | Androgenrezeptor                                  |
| ARO         | Aromatase                                         |
| bp          | Basenpaar                                         |
| BSA         | bovines Serumalbumin                              |
| cAMP        | zyklisches Adenosinmonophosphat                   |
| CD          | Cluster of Differentiation                        |
| cDNA        | komplementäre Desoxyribonukleinsäure              |
| c-fos       | zelluläres Protoonkogen c-Fos                     |
| c-Jun       | zelluläres Protoonkogen c-Jun                     |
| CYP         | Cytochrom P                                       |
| DAPI        | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                      |
| DEPC        | Diethylpyrocarbonat                               |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid                                  |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure                            |
| DNase       | Desoxyribonuklease                                |
| dNTPs       | 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat                 |
| EO          | experimentelle Autoimmun-Orchitis                 |
| EDTA        | Ethylendiamintetraacetat                          |
| EGF-R       | Epidermal Growth Factor Rezeptor                  |
| ER          | Östrogenrezeptor                                  |
| ER $\alpha$ | Östrogenrezeptor alpha                            |
| ER $\beta$  | Östrogenrezeptor beta                             |
| ERK         | Extracellular Signal regulated Kinases            |
| EtBr        | Ethidiumbromid                                    |
| EtOH        | Ethanol                                           |
| EvI         | Endothelium Vasodilator stimulated Phosphoprotein |
| FSH         | follikelstimulierendes Hormon                     |
| GnRH        | Gonadotropin releasing Hormone                    |
| GP          | G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor            |

| <b>Abkürzung</b> | <b>Bedeutung</b>                                  |
|------------------|---------------------------------------------------|
| HR               | Hormonrezeptor                                    |
| HSP              | Heat Shock Protein                                |
| IF               | Immunfluoreszenz                                  |
| Ig               | Immunglobulin                                     |
| IFN              | Interferon                                        |
| kb               | Kilobasen                                         |
| KO               | knock out                                         |
| LH               | luteinisierendes Hormon                           |
| LHR              | LH-Rezeptor                                       |
| LZ               | Leydig-Zellen                                     |
| MGCA             | Meiotic Germ Cell Antigen                         |
| M-MLV RT         | Maus Moloney-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase |
| mRNA             | messenger Ribonukleinsäure                        |
| NaCl             | Natriumchlorid                                    |
| NF- $\kappa$ b   | nukleärer Transkriptionsfaktor- $\kappa$ b        |
| PBS              | phosphatgepufferte Salzlösung                     |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion                         |
| PTZ              | Peritubulärzellen                                 |
| qRT-PCR          | quantitative Reverse Transkriptase PCR            |
| RNA              | Ribonukleinsäure                                  |
| RNase            | Ribonuklease                                      |
| rpm              | rounds per minute                                 |
| RT               | Raumtemperatur                                    |
| RT-PCR           | Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion   |
| SF-1             | Steroidogenic Factor 1                            |
| Src              | Sarcom-Tyrosinkinase                              |
| StAR             | Steroidogenic acute regulatory Protein            |
| SZ               | Sertoli-Zellen                                    |
| TAE              | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                           |
| TGF              | Transforming Growth Factor                        |
| TNF              | Tumor Necrosis Factor                             |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1. Zelltypen der Hodenkompartimente .....                                    | 5  |
| Abb. 2. Hormonelle Regulation der testikulären Funktionen.....                    | 7  |
| Abb. 3. Enzyme und Stoffwechselwege der Steroidhormonbiosynthese.....             | 9  |
| Abb. 4. Klassische intrazelluläre Steroidhormonsignalübertragung .....            | 14 |
| Abb. 5. Vergleich der klassischen und nicht-klassischen Östrogen-Signalwege ..... | 16 |
| Abb. 6. Relative Expression von ARO, AR und ER im adulten Rattenhoden.....        | 19 |
| Abb. 7. EAO-Induktionsschema.....                                                 | 45 |
| Abb. 8. Histopathologische Veränderungen in EAO-Rattenhoden.....                  | 54 |
| Abb. 9. Testikuläre AR-Expression in LZ, SZ und PTZ.....                          | 56 |
| Abb. 10. Kein sicherer AR-Nachweis in testikulären Leukozyten.....                | 58 |
| Abb. 11. Expression von ER $\alpha$ in interstitiellen und tubulären Zellen ..... | 61 |
| Abb. 12. Vorwiegende Expression von ER $\alpha$ in LZ .....                       | 62 |
| Abb. 13. ER $\alpha$ -Expression in SZ und Keimzellen .....                       | 64 |
| Abb. 14. Abundante ER $\beta$ -Färbung im Rattenhoden .....                       | 66 |
| Abb. 15. Unspezifische Bindung des ARO-Primärantikörpers.....                     | 68 |
| Abb. 16. Erfolgreiche Entfernung der genomischen DNA aus der RNA-Probe.....       | 71 |
| Abb. 17. Erfolgreiche reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA .....      | 72 |
| Abb. 18. Konstante testikuläre mRNA-Expression von SF-1 bei EAO-Ratten.....       | 73 |
| Abb. 19. Konstante testikuläre mRNA-Expression von StAR bei EAO-Ratten.....       | 74 |
| Abb. 20. Konstante testikuläre AR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten.....             | 75 |
| Abb. 21. Reduzierte testikuläre ER $\alpha$ -mRNA-Expression bei EAO-Ratten ..... | 76 |
| Abb. 22. Reduzierte testikuläre LHR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten .....          | 77 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1. Antikörper, IgG-Kontrollen und Blockierungslösungen der IF-Färbungen.....                               | 42 |
| Tab. 2. Primerpaare der Standard-PCR und qRT-PCR .....                                                          | 43 |
| Tab. 3. Reaktionsansatz für den Verdau der genomischen DNA.....                                                 | 48 |
| Tab. 4. Reverse Transkription Master Mix.....                                                                   | 49 |
| Tab. 5. Ablauf der RT-PCR.....                                                                                  | 49 |
| Tab. 6. Mastermix PCR .....                                                                                     | 50 |
| Tab. 7. Programme des PCR Thermozyklers .....                                                                   | 50 |
| Tab. 8. qRT-PCR Mastermix zur Quantifikation von HPRT, LHR, StAR, SF-1, ARO.....                                | 52 |
| Tab. 9. qRT-PCR Mastermix zur Quantifikation von 18S rRNA, AR, ER $\alpha$ und ER $\beta$ ...                   | 52 |
| Tab. 10. qRT-PCR-Zyklus-Einstellung für BioRad iCycler iQ5 .....                                                | 52 |
| Tab. 11. Zusammenfassung der IF-Ergebnisse für ER $\alpha$ , ER $\beta$ und AR bei unbehandelten<br>Ratten..... | 69 |
| Tab. 12. Zusammenfassung der qRT-PCR-Analyse .....                                                              | 78 |
| Tab. 13. ER $\alpha$ -Lokalisation im adulten Rattenhoden .....                                                 | 79 |
| Tab. 14. ER $\beta$ -Lokalisation im adulten Rattenhoden .....                                                  | 80 |
| Tab. 15. ARO-Lokalisation im adulten Rattenhoden.....                                                           | 81 |

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aufbau und Gliederung des Hodens**

### **1.1.1 Embryonale Entwicklung des Hodens**

Das männliche Reproduktionsorgan gliedert sich in einen äußeren und einen inneren Anteil. Das äußere Genitale entwickelt sich aus dem Sinus urogenitalis und umfasst Penis, Urethra masculina und Skrotum. Die inneren Geschlechtsorgane entstehen aus den Urkeimzellen der Keimdrüsenanlage und dem Wolff-Gang und umfassen die paarig angelegten Hoden, die paarigen Nebenhoden, Ductus deferentes, Glandulae bulbo-urethrales und vesiculosae sowie die Prostata (Aumüller et al. 2014). Die Urkeimzellen wandern in die Genitalleiste ein und siedeln sich entlang von mesenchymalen Epithelsträngen – gebildet aus Vorläuferzellen der Sertoli-Zellen (SZ) – in so genannten Keimsträngen an (Lüllmann-Rauch 2015). Dort differenzieren sie zu Vorläufern der Keimzellen und bilden die Anlage der Hodenstränge, die sich später zu Hodenkanälchen entwickeln. Die Differenzierung des männlichen Reproduktionsorgans wird angeregt durch eine vorübergehende autonome Androgenproduktion fetaler Leydig-Zellen (LZ) (Griswold und Behringer 2009). Im Laufe der Fetalzeit deszendieren die Hoden entlang des Processus vaginalis peritonei durch den Leistenkanal nach extraabdominal in das Skrotum, wobei sie den Samenstrang, die Arteriae testiculares und den Plexus pampiniformis mit sich ziehen (Wensing 1988; Fliegel et al. 2011).

### **1.1.2 Makroskopische Anatomie des Hodens**

Die paarig angelegten Hoden umfassen beim Menschen ein Volumen von ca. 20 ml (Aumüller et al. 2014). Sie sind jeweils von einer festen Bindegewebskapsel, der Tunica albuginea, umgeben. Ihnen liegen dorsomedial und -kranial die Nebenhoden an. Hoden und Nebenhoden sind gemeinsam von der Tunica vaginalis testis überzogen. Diese bildet das Epiorchium, das als viszerale Blatt mit der Tunica albuginea verwachsen ist und am Mediastinum testis in das Periorchium als parietale Blatt umschlägt. Am Mediastinum treten die blutversorgenden Gefäße in Form der Arteriae testiculares dextra und sinistra sowie Venae testiculares dextra und sinistra, die Lymphgefäße und die versorgenden Nerven in den Hoden ein bzw. aus. Als weitere Hüllstrukturen folgen die Fasciae spermaticae interna und externa, die gemeinsam mit dem Musculus cremaster, der Tunica dartos und der Skrotalhaut die Hüllen des Skrotums bilden (Aumüller et al. 2014; Nieschlag et al. 2010).

### **1.1.3 Mikroskopische Anatomie des Hodens**

Der Hoden wird beim Menschen durch bindegewebige Septen (Septulae testis) in 250-300 Lobuli untergliedert (Holstein, Schulze, und Davidoff 2003). Die Septulae testis ziehen von der Tunica albuginea in die Tiefe des Hodens und bilden Leitstrukturen für Blutgefäße, Lymphgefäße und Nervenfasern. Innerhalb der Lobuli testis liegen die Tubuli seminiferi contorti (tubuläres Kompartiment), welche durch die Basalmembran vom Interstitium testis (interstitielles Kompartiment) getrennt werden (Nieschlag et al. 2010) (vgl. Abb. 1 für eine schematische Darstellung der Kompartimente mit ihren Zelltypen).

#### **1.1.3.1 Tubuli seminiferi contorti**

Die Lobuli testis enthalten jeweils ein bis drei Tubuli seminiferi contorti; mit einer Gesamtzahl von 600 Tubuli umfassen sie 60-80% des Hodenvolumens. Die Tubuli seminiferi contorti werden von einer Basalmembran, der Lamina propria mit Kollagenfasern und den Peritubulärzellen (PTZ) umgeben (Nieschlag et al. 2010). Die Tubuli bilden das Keimzellepithel, welches den Ort der Spermatogenese darstellt. Das Keimzellepithel umfasst die SZ und die Keimzellen. Die Keimzellen zeigen von basal nach luminal aufsteigende Reifungsgrade. Die ausdifferenzierten Keimzellen werden in das Lumen der Tubuli abgegeben und durch Kontraktionen der PTZ über die Tubuli recti und das Rete testis zum Nebenhoden transportiert (Aumüller et al. 2014; de Kretser et al. 1998).

#### **1.1.3.2 Tubuläre Zelltypen**

##### **1.1.3.2.1 Sertoli-Zellen**

Die Sertoli-Zellen (SZ) bilden das Stützepithel der Tubuli seminiferi und erstrecken sich mit ihrem Zytoplasma von der Basalmembran des Keimepithels bis zum tubulären Lumen. Sie schaffen ein spezielles Mikromilieu zur Keimzelldifferenzierung und unterstützen als so genannte Ammenzellen die Spermatogenese (Holstein, Schulze, und Davidoff 2003). Durch intensive gegenseitige Interaktion und ektoplasmatische Strukturen koordinieren die SZ die Anlagerung, Ausrichtung und speziesabhängige Anzahl der Spermatozoen (Zhengwei et al. 1998; 1998b). Beim Menschen handelt es sich beispielsweise um vier, bei der Ratte um zehn Spermatozoen je SZ (Weinbauer et al. 2010). Sie sorgen durch die Phagozytose von Residualkörperchen und abgestorbenen Keimzellen sowie durch die Produktion des Plasminogen-Aktivators, welcher zur Erneuerung der Basalmembran wichtig ist, für den Erhalt der tubulären Strukturen (Aumüller et al. 2014).

Mit steter Sekretion tubulärer Flüssigkeit gewährleisten die SZ die Durchlässigkeit des Lumens für den Transport der Spermien. Indem die SZ basal durch Tight Junctions verknüpft sind und Zonulae occludentes bilden, untergliedern sie die Tubuli in ein basales und ein adluminales Kompartiment und bilden die physiologische Blut-Hoden-Schranke, welche den Körperkreislauf und das postmitotische Keimepithel separiert (Nieschlag et al. 2010).

#### **1.1.3.2.2 Peritubulärzellen**

Die Peritubulärzellen (PTZ) sind spezialisierte Myofibroblasten, welche sich zirkulär von außen an die Basalmembran der Tubuli anlagern. Im menschlichen Hoden liegen die Zellen mehrschichtig, im Nagerhoden einschichtig vor. Die PTZ produzieren zum Erhalt der Basalmembran stabilisierende Bindegewebsfasern, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die PTZ gewährleisten außerdem durch spontane propulsive Kontraktionen den Weitertransport der anfangs noch unbeweglichen Spermatozoen (Holstein, Schulze, und Davidoff 2003) und werden dabei durch Endotheline, Prostaglandine, Androgene und Einflüsse der SZ reguliert (Nieschlag et al. 2010). Außerdem bilden sie den Plasminogen-Inhibitor als Gegenspieler des Plasminogen-Aktivators der SZ und dienen dadurch der Homöostase der Basalmembran (Aumüller et al. 2014).

#### **1.1.3.3 Interstitielle Zelltypen**

##### **1.1.3.3.1 Leydig-Zellen**

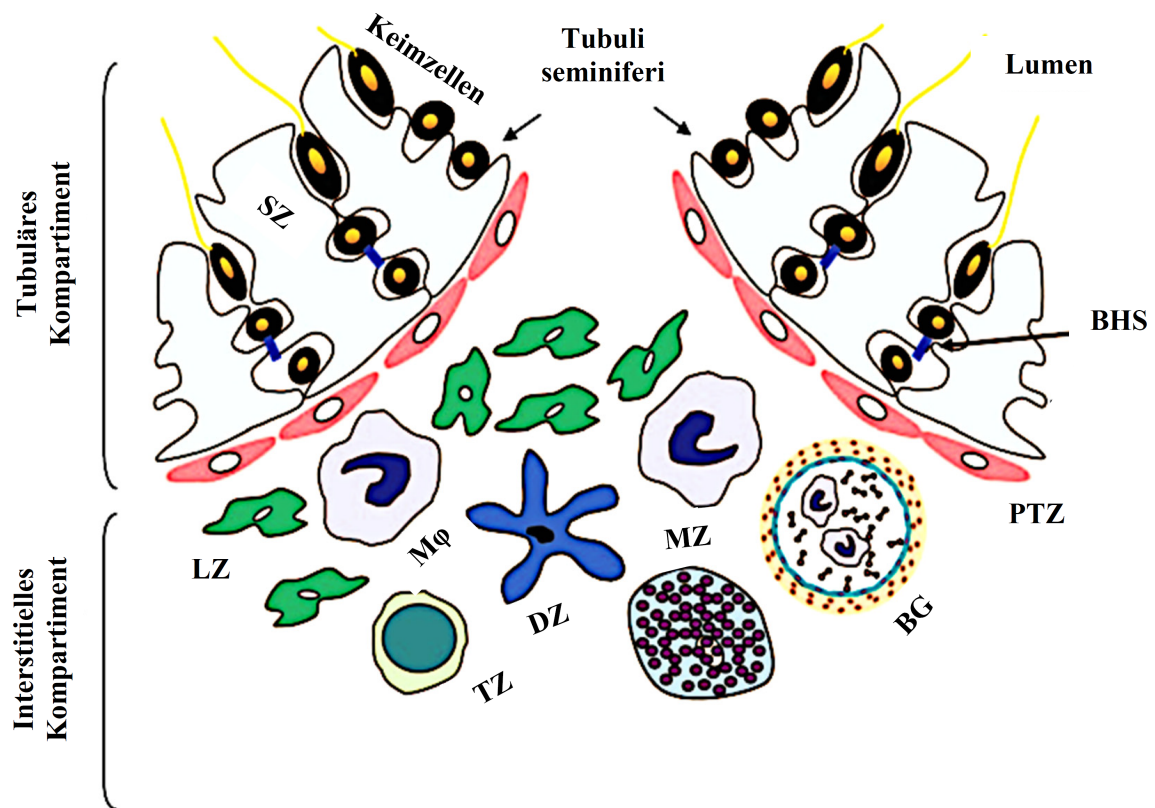
Im Interstitium befinden sich zwischen den Tubuli seminiferi contorti die Leydig-Zellen (LZ), welche für rund 95% der körpereigenen Androgensynthese verantwortlich sind (Rival et al. 2006). Ihr Zytoplasma ist mit Lipidtröpfchen, glattem endoplasmatischem Retikulum sowie tubulären Mitochondrien angereichert, wie es für steroidhormonproduzierende Zellen typisch ist. Die LZ beeinflussen die regionale Durchblutung und Spermatogenese durch endokrine und parakrine Wirkungen der Androgensynthese sowie durch parakrine Wirkungen der Neuropeptid-Sekretion (Ge, Chen, und Hardy 2009). Die LZ unterliegen der Regulation durch Gonadotropine der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Abb. 2) und parakrinen Einflüssen der testikulären Makrophagen durch pro-inflammatorische Zytokine, Sauerstoffradikale und Prostaglandine (Hales 2007).

#### **1.1.3.3.2 Immunzellen des Hodens**

Im Interstitium finden sich darüber hinaus Immunzellen – sowohl im gesunden als auch im entzündeten Hodengewebe. Hierbei handelt es sich überwiegend um Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und Lymphozyten (Abb. 1) (Meinhardt und Fijak 2006; Fijak et al. 2018).

Die wichtigsten und zahlreichsten Immunzellen des testikulären Interstitiums sind die Makrophagen. Physiologischerweise beträgt das Verhältnis von Makrophagen zu LZ rund 1:5 (Hutson 2006a). Testikuläre Makrophagen weisen organspezifische Eigenschaften auf, insofern sie eine enge morphologische und funktionelle Bindung mit LZ über Zell-Zell-Interdigitationen eingehen und Einfluss auf deren Differenzierung und Androgenproduktion nehmen (Hedger und Hales 2006; Hutson 2006a). Im Rattenhoden können CD68<sup>+</sup>- und CD168<sup>+</sup>-Subtypen der Makrophagen unterschieden werden (Hedger und Meinhardt 2003), wobei gerade den CD168<sup>+</sup>- Makrophagen immunregulatorische Funktionen und damit eine wichtige Rolle für das testikuläre Immunprivileg zugeschrieben werden (Meinhardt und Fijak 2006). Makrophagen interagieren über Zytokine auch mit anderen somatischen testikulären Zellen (Hales, Diemer, und Hales 1999; Hedger und Meinhardt 2003).

Bei den Lymphozyten des Hodeninterstitiums handelt es sich um T-Zellen, wobei CD8<sup>+</sup>-Zellen anteilmäßig gegenüber CD4<sup>+</sup>- und regulatorischen T-Zellen sowie vereinzelt natürlichen Killerzellen überwiegen (Lustig et al. 1993; Meinhardt und Fijak 2006). Die regulatorischen T-Zellen werden von Mastzellen mittels Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -Produktion stimuliert (Lu et al. 2006). Die Anzahl der Mastzellen nimmt bei Hodenentzündungen stark zu, was mit einem höheren Risiko für Infertilität verbunden zu sein scheint (Hussein et al. 2005). Dendritische Zellen nehmen ebenfalls quantitativ bei Hodenentzündungen zu und spielen als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung (Rival et al. 2006).



**Abb. 1. Zelltypen der Hodenkompartimente**

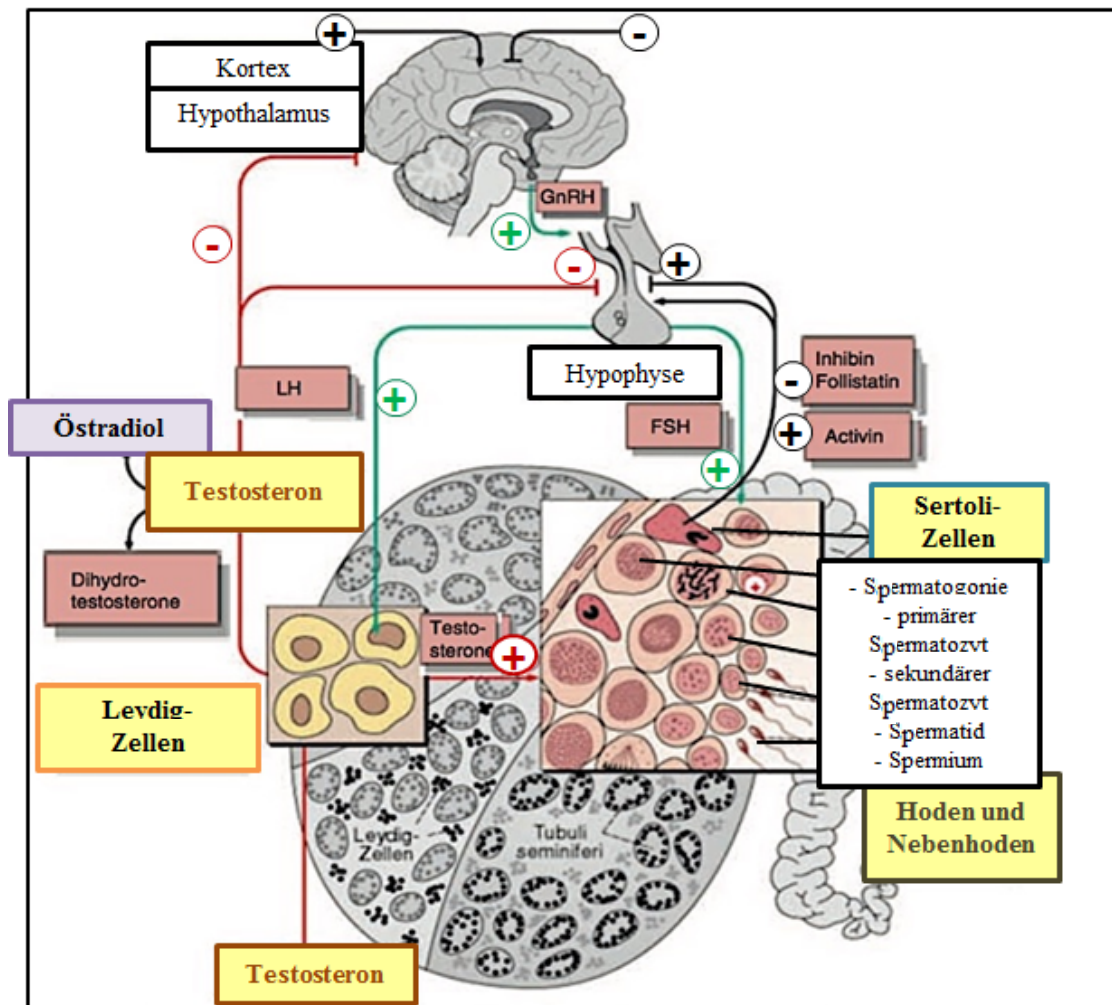
Das tubuläre Kompartiment enthält die Tubuli seminiferi, umgeben von Peritubulärzellen (PTZ). Die Sertoli-Zellen (SZ) bilden basal die Blut-Hoden-Schranke (BHS) und versorgen die zwischen ihnen liegenden Keimzellen. Von basal nach luminal nimmt der Reifegrad der Keimzellen zu. Das interstitielle Kompartiment enthält unter anderem gruppiert liegende Leydig-Zellen (LZ), vereinzelte Makrophagen (Mφ), dendritische Zellen (DZ), Mastzellen (MZ), T-Zellen (TZ) und Blutgefäße (BG) (überarbeitet von: Meinhardt und Fijak 2006).

## **1.2 Hormonelle Regulation und Funktionen des Hodens**

### **1.2.1 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse**

Spermatogenese und Steroidogenese sind die Hauptfunktionen des Hodens. Ihre Regulation erfolgt durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Abb. 2), durch ein Zusammenspiel stimulierender und inhibierender Faktoren sowie durch lokale Zellinteraktionen (Carreau und Hess, 2010). Die Spermatogenese wird zudem durch auto- und parakrine Mediatoren reguliert (Holstein, Schulze, und Davidoff 2003).

Vom Hypothalamus wird das Gonadotropin releasing Hormone (GnRH) ausgeschüttet, das gonadotrope Zellen der Adenohypophyse zur Synthese des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) anregt (de Kretser et al. 1998). Testikuläre Faktoren wiederum, wie Testosteron, Inhibin und Follistatin, supprimieren die LH- und FSH-Sekretion (Jin und Yang 2014). FSH stimuliert über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, wie den FSH-Rezeptor, die Entwicklung, Proliferation und Aktivität der SZ (Plant et al. 2005); LH hingegen stimuliert über den LH-Rezeptor (LHR) die Steroidogenese in den LZ (Lanciotti et al. 2018). Somit fördern sowohl FSH als auch LH (indirekt) die Spermatogenese. FSH stimuliert SZ zudem zur Cadherin-Synthese für die Ausbildung von Keimzellen-SZ-Kontakten (de Kretser et al. 1998) sowie zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und androgenbindendem Protein. Letzteres bindet Testosteron bzw. Dihydrotestosteron und transportiert die Steroidhormone luminal in den Nebenhoden, wodurch auch dort stabile Hormonspiegel und ideale Reifungsbedingungen für die Spermatozoen erzeugt werden. SZ können die FSH-Produktion der Adenohypophyse durch Sekretion von Inhibin und Follistatin supprimieren oder durch die Abgabe von Aktivin stimulieren (Nieschlag et al. 2010). LH wirkt auf LZ sowohl trophisch als auch stimulierend auf die Androgen-Produktion (de Kretser et al. 1998).



**Abb. 2. Hormonelle Regulation der testikulären Funktionen**

Das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH) sind die Schlüsselhormone in der Regulation der Hodenfunktion. Unter hypothalamischer Kontrolle wird das Gonadotropin-freisetzende Hormon (GnRH) synthetisiert und sezerniert. Die Leydig-Zellen im testikulären Interstitium synthetisieren und sezernieren Testosteron unter der Kontrolle von LH. Testosteron stimuliert über die Sertoli-Zellen indirekt die Reifung der Keimzellen in den Tubuli seminiferi. FSH wirkt trophisch auf die Sertoli-Zellen. Testosteron inhibiert durch negatives Feedback die Sekretion der Gonadotropine und des GnRH. Die Sertoli-Zellen können die FSH-Produktion durch Inhibin B und Follistatin supprimieren oder durch Aktivin stimulieren (überarbeitet von: Nieschlag et al., 2008).

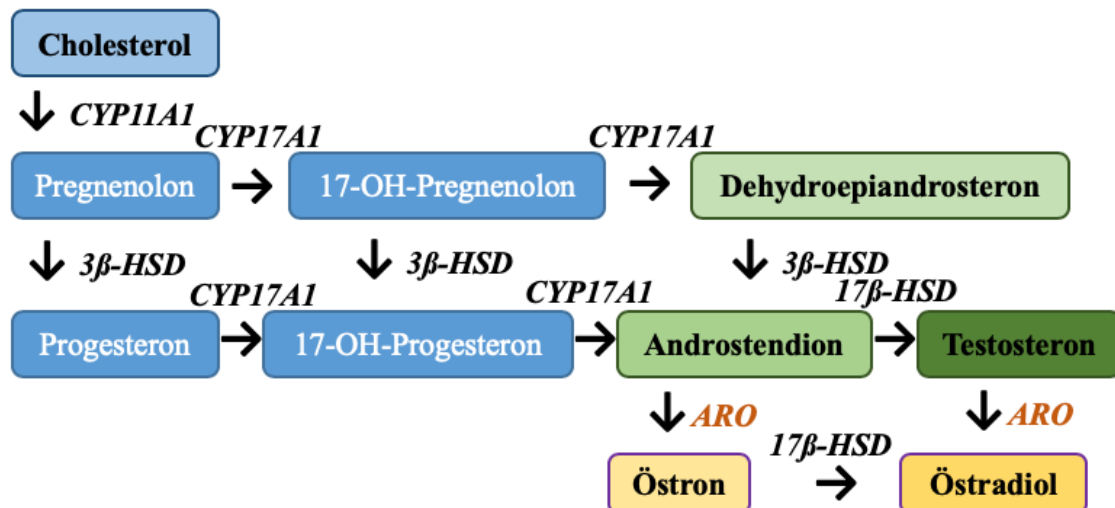
### 1.2.2 Synthese und Regulation von Androgenen und Östrogenen

Im Rahmen der Steroidogenese entstehen aus der Ausgangssubstanz Cholesterin in kontinuierlicher *de novo* Synthese die Steroidhormone, welche Glukokortikoide, Mineralokortikoide, sowie – in der Reihenfolge ihrer Synthese – Gestagene, Androgene und Östrogene umfassen. Letztere drei sind essenziell für die Funktion der Keimdrüsen (Ambruster, Berhold, und Blaeschke 2015; de Kretser et al. 1998) (Abb. 3).

Die Regulation der LZ-Aktivität und damit des Androgenspiegels im Blut unterliegt, wie oben ausgeführt, der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. LH aktiviert in den LZ über Bindung an den LHR die Cholesterolester-Hydrolase, die das in Lipidtröpfchen gespeicherte Cholesterol freisetzt (Nieschlag et al. 2010). Das lipophile Cholesterol wird anschließend in die Mitochondrien transportiert. Der LH-stimulierte Transport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran erfolgt durch das Steroidogenic acute regulatory Protein (StAR) (Clark et al. 1994), ein mitochondriales Phosphoprotein. StAR wird in testikulären, adrenalen, glialen und dermalen Steroid-produzierenden Zellen exprimiert. Testikulär wird StAR vor allem in LZ exprimiert, sodass es bei Genexpressionsanalysen als LZ-Funktionsmarker dienen kann (Manna et al. 2016). Keimzellen exprimieren StAR nicht, SZ nur in geringem Maße (Pollack et al. 1997). Durch Einflussnahme auf die StAR-Genexpression kann indirekt die Aktivität der Steroidogenese reguliert werden. Neben LH verändern modulierende Wachstumsfaktoren (zum Teil von Makrophagen sezerniert) die intrazellulären cAMP/PKA-Level (zyklisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A) und regulieren damit die Phosphorylierung von StAR. Durch anschließende Oxidationsschritte wird die Seitenkette des Cholesterols verkürzt (Huckstorf 2013) (vgl. Abb. 3). Den irreversiblen Reaktionsschritt vom Androgen zum Östrogen vollzieht das Enzym Aromatase (ARO) (Ambruster, Berhold, und Blaeschke 2015; Huckstorf 2013). Das ARO-Gen weist in der Promotorregion eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor 1 (SF-1) auf (Carreau et al. 1999; Lynch et al. 1993).

SF-1 gilt als übergeordneter Regulator der Steroidogenese. SF-1 adressiert multiple Promotorregionen von Genen der CYP 450-Steroidhydroxylasen, des StAR und LHR, und wirkt sowohl zentral an Hypothalamus und Hypophyse als auch peripher an Nebennierenrinde und Gonaden (Parker und Schimmer 1997; Halvorson, Kaiser, und Chin 1996). Indem SF-1 im fetalen Rattenhoden die Testosteronproduktion in LZ und die Anti-Müller-Hormon-Synthese in SZ stimuliert, trägt es entscheidend zur sexuellen Differenzierung bei (Parker und Schimmer 1997). SF-1 stellt damit im männlichen

Genitaltrakt ein Schlüsselmolekül des endokrinen Systems dar (Parker et al. 2002). Im adulten Rattenhoden ist die SF-1-Expression auf die LZ beschränkt und kann daher ebenfalls bei Genexpressionsanalysen als LZ-Funktionsmarker herangezogen werden (Ikeda et al. 1993; Morohashi et al. 1994). SF-1 nimmt über die Regulation der StAR-Expression Einfluss auf die Steroidogenese, während wiederum StAR indirekt durch die Produktion von Hydroxysterolen die Synthese von SF-1 stimuliert (Pollack et al. 1997).



**Abb. 3. Enzyme und Stoffwechselwege der Steroidhormonbiosynthese**

In der Steroidhormonbiosynthese erfolgt die Oxidation der Lipidseitenkette vom Cholesterin zum Testosteron bzw. zum Östradiol. Cholesterin wird durch das Schlüsselenzym der Steroidhormonsynthese, die Cytochrom Peroxidase 11A1 (CYP11A1), in Pregnenolon umgewandelt, das durch die CYP17A1-Hydroxylase über 17-OH-Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) oder direkt durch die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (3β-HSD) zu Progesteron lysiert wird. 17-OH-Progesteron entsteht durch 3β-HSD aus 17-OH-Pregnenolon oder durch CYP17A1 aus Progesteron. CYP17A1 prozessiert 17-OH-Pregnenolon zu DHEA, bzw. 17-OH-Progesteron zu Androstendion, das durch 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase (17β-HSD) zu Testosteron prozessiert wird. Beide Substrate werden irreversibel durch die Aromatase (ARO) in Östron bzw. Östradiol umgewandelt (Ambruster, Berhold, und Blaesche 2015; Huckstorf 2013; Parker und Schimmer 1997). CYP = Cytochrom Peroxidase; OH = Hydroxylgruppe.

### **1.2.2.1 Wirkung der Sexualhormone am Hoden**

#### **1.2.2.1.1 Androgene**

Die Androgensynthese des Mannes erfolgt vorübergehend während der Embryonalphase zur Differenzierung des männlichen Genitals und schließlich anhaltend ab Beginn der Pubertät zur Entwicklung eines männlichen Phänotyps, eines anabolen Stoffwechsels und der Spermatogenese (Huckstorf 2013). Die Androgensynthese geschieht zu 95% in den LZ und geringfügig in der Zona reticularis der Nebennierenrinde (Ambruster, Berhold, und Blaesche 2015; Huckstorf 2013). Täglich entstehen in den Hoden etwa 6-7 mg Testosteron. Die Androgene zirkulieren an Transportproteine gebunden im Blut und haben eine Halbwertszeit von etwa 12 Minuten (Nieschlag et al. 2010). Die testikuläre Testosteronkonzentration entspricht einem Vielfachen des Bedarfs – Einbußen auf 60% der Konzentration bleiben ohne Einschränkungen der Spermatogenese (Sharpe, Donachie, und Cooper 1988). Die Hauptaufgabe des Testosterons beim Mann liegt in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese. Testosteron stimuliert parakrin die SZ zur Förderung der Spermatogenese (Chang et al. 2004) und die PTZ zum Spermientransport (C. Zhang et al. 2006). Autokrin stimuliert Testosteron wiederum die eigene Synthese in den LZ (Xu et al. 2007).

Die Androgenwirkung wird durch den Androgenrezeptor (AR) vermittelt, dessen Expression alters- und gewebeabhängig ist. Testikulär wird der AR vorwiegend in LZ, SZ und PTZ exprimiert, in geringem Maße außerdem in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen; für Keimzellen hingegen ist keine AR-Expression beschrieben (Abb. 6) (Vornberger et al. 1994; Van Rooijen et al. 1995; Smith und Walker 2014). Das AR-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und enkodiert zwei Isoformen (Nieschlag et al. 2010). Die höchste Affinität besteht – aufgeführt in absteigender Reihenfolge – für  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron, Testosteron, Östradiol und Progesteron. Die Aktivität des AR kann durch Phosphorylierung bzw. durch die Proteinkinase C oder cAMP beeinflusst werden. Androgene modulieren die Protein- und auch mRNA-Expression des AR (Weinbauer, Niehaus, und Nieschlag 2004).

#### **1.2.2.1.2 Östrogene**

##### **1.2.2.1.2.1 Östrogensynthese**

Die irreversible Umwandlung von Testosteron zu Östrogen (Aromatisierung) erfolgt durch das Enzym Aromatase (ARO), welches sich aus zwei Proteinen zusammensetzt:

(1) die Cytochrom P450 ARO (CYP 450), ein Glykoprotein, welches das Steroidhormon bindet und modifiziert; (2) die Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Cytochrom P450-Reduktase, ein ubiquitär exprimiertes Flavoprotein, das den Elektronentransfer zur CYP 450 katalysiert (Carreau et al. 1999).

Die Östrogenproduktion des Mannes (66-147 pmol/Tag) erfolgt überwiegend im Fett- und Muskelgewebe (rund 80%), aber auch im Hoden (rund 20%) (Rochira et al. 2013). Entsprechend liegen im Hodengewebe hohe lokale Östrogenkonzentrationen vor. So beträgt die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol in der Flüssigkeit des Rete testis rund 250 pg/ml, hingegen 2-25 pg/ml im Serum männlicher Ratten und zyklusabhängig 30-90 pg/ml im Serum weiblicher Ratten (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017; Free und Jaffe 1979).

Wirbeltiere exprimieren ARO ubiquitär beinahe in allen Gewebetypen, so auch der Mensch. Allerdings bestehen ARO-Expressionsunterschiede unter anderem hinsichtlich Spezies, Alter und Zelltyp. Testikulär wurde beim Mann die stärkste Expression in LZ nachgewiesen, in geringerem Maße auch in SZ und Keimzellen (Carreau et al. 2011). Bezüglich der testikulären Enzymaktivität unterscheiden sich Nager und Mensch: Beim Menschen bleibt die Östrogenproduktion auf SZ und LZ beschränkt, wohingegen den Keimzellen des adulten Nagers 60% der Östrogensynthese zugeschrieben werden (Carreau et al. 1999; 2011; Rochira et al. 2013). Im männlichen Reproduktionstrakt der Ratte sind in der Fetalperiode die SZ der Hauptexpressionsort der ARO. Adulte Tiere exprimieren ARO in LZ und Keimzellen und zeigen eine gesteigerte Enzymaktivität. In Nagerspermien wurde ARO bisher nicht nachgewiesen (Carreau et al. 1999; Rochira et al. 2013).

#### **1.2.2.1.2.2 Östrogenwirkungen**

Östrogene sind dank ihrer Lipophilie in der Lage, passiv durch die Plasmamembran zu gelangen, an intrazelluläre Rezeptoren zu binden und eine Zellantwort anzustoßen. Zusätzlich zur passiven Diffusion wurde die Hormonaufnahme durch Endozytose von proteingebundenen Hormonen beschrieben, vermittelt durch den Low Density Lipoprotein (LDL) Rezeptor Megalin (A. Hammes et al. 2005), welche eine zelltypspezifische Aufnahme ermöglicht. Bei den Östrogenrezeptoren (ERs) unterscheidet man intrazelluläre, ligandengesteuerte, so genannte „klassische“ Östrogenrezeptoren und membranständige, so genannte „nicht-klassische“ Östrogenrezeptoren (Hirata et al. 2003). Bei der Östrogenwirkung unterscheidet man entsprechend „klassische“ Wirkungs-

wege (über die intrazellulären Östrogenrezeptoren, ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) und „nicht-klassische“ Wirkungswege (über membranständige Östrogenrezeptoren, wie G-Protein-Rezeptor (GPER)). Im Hoden sind Östrogenrezeptoren sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen vertreten (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017). Nach der Aktivierung durch Östrogene können Östrogenrezeptoren auch nicht-genomische Signalwege an der Membran einleiten (Lucas et al. 2008; Fietz et al. 2014), allerdings wird das testikuläre Vorkommen derartiger Signalwege weiterhin untersucht (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017).

ER $\alpha$  und ER $\beta$  binden Östrogene mit annähernd gleicher Affinität und nutzen das gleiche hormonresponsive Element (HRE), führen jedoch zu teilweise unterschiedlichen oder sogar gegensätzlichen Effekten. Diese unterschiedlichen Effekte beruhen unter anderem auf Unterschieden in der Verteilung und Expression der Östrogenrezeptoren in Zell- und Gewebetypen, der Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren, ihren Spleiß-isoformen, den ausgelösten Signalwegen, Interaktionen mit Co-Aktivatoren/Repressoren in den Geweben, der Transaktivierung und gewebespezifischen Milieus (Khan und Ansar 2016).

Der nicht-klassische Rezeptor GPER zählt zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist ein 7-Transmembranprotein, das auch in Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum vorkommt. Durch GPER werden konzentrationsabhängig und zellspezifisch schnell wirksame nicht-genomische Signalwege für Östrogen vermittelt (Sharma, Mauvais-Jarvis, und Prossnitz 2018; Filardo et al. 2007).

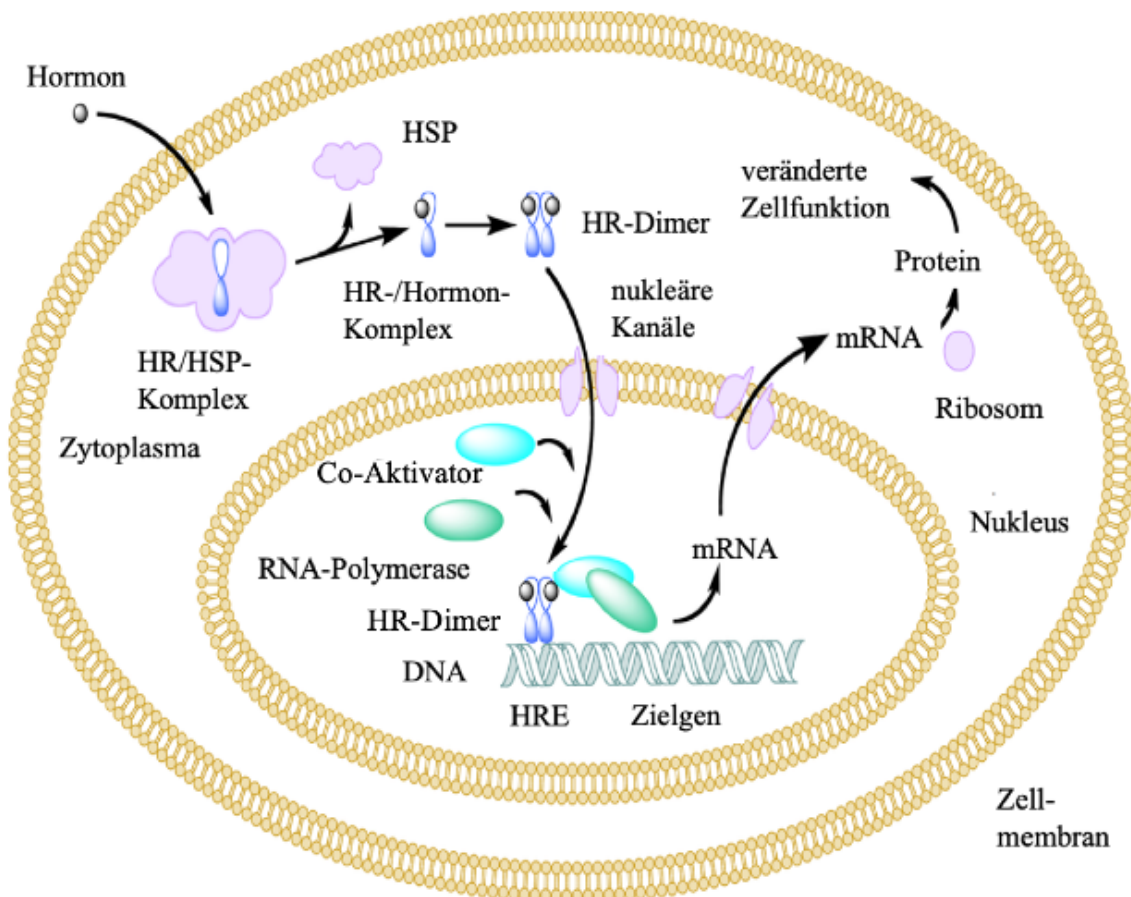
#### **1.2.2.1.2.2.1 Klassische genomische Signalwege**

Die Sexualhormone wirken über unterschiedliche Signalkaskaden: Der „klassische“ Signalweg (Abb. 4) verläuft über intrazelluläre ligandengesteuerte Steroidhormonrezeptoren, wie AR und Östrogenrezeptoren, und modifiziert die Genexpression des Zielgens (Ambruster, Berhold, und Blaeschke 2015; Huckstorf 2013). Eine zelluläre Antwort im klassischen Signalweg erfolgt mit einer Latenz von 45 Minuten (Shang, Myers, und Brown 2002).

Die inaktiven Hormonrezeptoren (HRs) befinden sich im Zytosol, vorliegend als Homodimere und gebunden an Hitzeschockproteine (HSP). Diese HRs bestehen aus einer hypervariablen N-terminalen Region, welche die Aktivierung der Transkription vermittelt, einer konservierten zentralen DNA-Bindungsdomäne und einer Ligandenbindenden C-terminalen Region (Ambruster, Berhold, und Blaeschke 2015; Luconi,

Forti, und Baldi 2002; Nilsson et al. 2001). Die Bindung des Hormons an klassische HRs führt zu ihrer Konformationsänderung und Dissoziation von den HSP. Die Hormon-Rezeptor-Komplexe bilden Dimere (HR-Dimere). Diese Dimere können Homodimere (an Beispiel der Östrogenrezeptoren: ER $\alpha\alpha$ , ER $\beta\beta$ ) oder Heterodimere (z. B. ER $\alpha\beta$ ) sein (Cowley et al. 1997), diffundieren in den Zellkern und binden in der Promotorregion eines Zielgenes an das hormonresponsive Element. Co-Aktivatoren und Co-Repressoren interagieren mit den Rezeptoren und modulieren ihre Transkriptionsaktivität (vergleiche Abb. 4, Ahmed et al., 1985). HRs beeinflussen die Genexpression auch indirekt über die Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie den nukleären Transkriptionsfaktor-kb (NF-kb), das Stimulating Protein-1 oder das Activating Protein-1 (Marino, Galluzzo, und Ascenzi 2006).

Die Modulation der Zielgene ist dabei unter anderem abhängig von der Zusammensetzung der HR-Dimere und der Hormonaffinität der HR-Subtypen. So hat beispielsweise bei der Maus der ER $\beta$ 2-Subtyp eine 30-fach niedrigere Affinität zu Östrogen als die übrigen ER $\beta$ -Subtypen und kann durch Bildung von Heterodimeren mit ER $\alpha$  oder ER $\beta$ 1 die Genexpression inhibieren (B. Lu et al. 2000). Bislang ist unklar, inwiefern die ER-Varianten gleichzeitig exprimiert werden, interagieren und in Abhängigkeit vom Keimzellstadium verschiedene Expressionsniveaus zeigen (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017).



#### Abb. 4. Klassische intrazelluläre Steroidhormonsignalübertragung

Die inaktiven Hormonrezeptoren (HR) liegen in Assoziation mit Hitzeschockproteinen (HSP) im Zytoplasma vor. Nach Bindung des Steroidhormons lagern sich die HR intranukleär an das hormonresponsive Element (HRE) des Zielgens an, wodurch die Genexpression moduliert wird (Ambruster, Berhold, und Blaescke 2015).

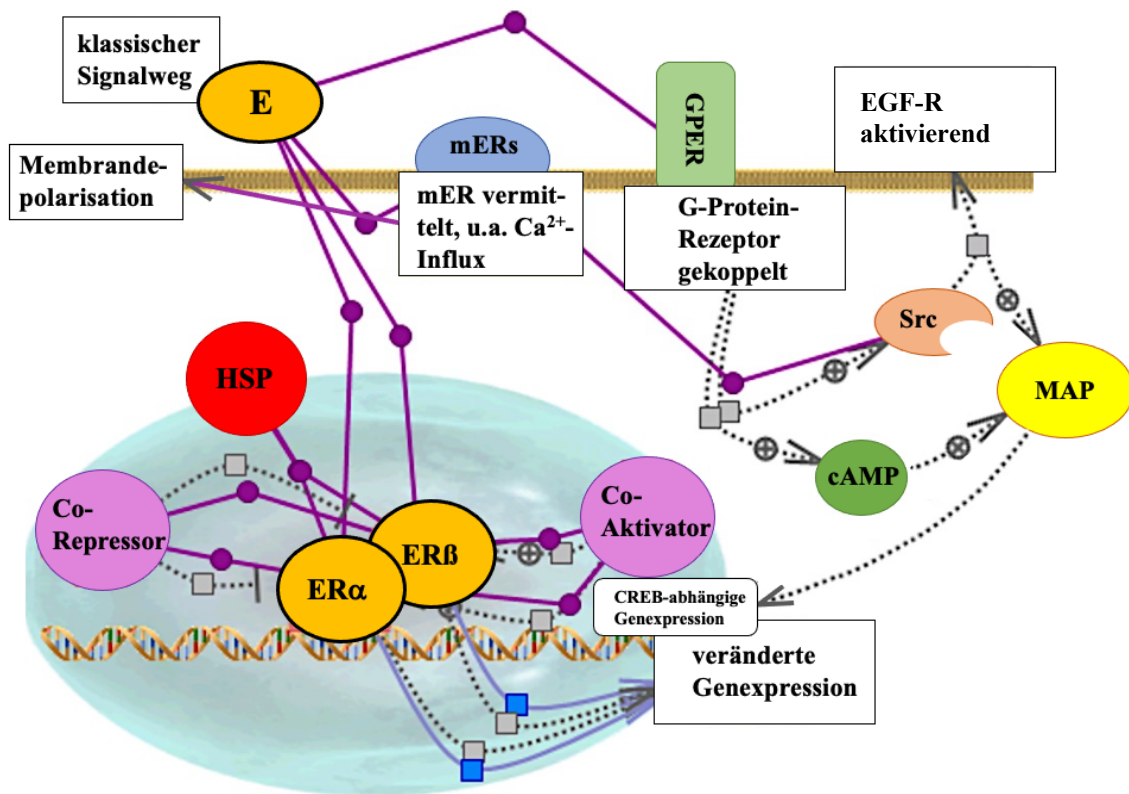
(überarbeitet von: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/how-hormones-work/>, abgerufen am 04.03.2019)

#### 1.2.2.1.2.2.2 Nicht-klassische Signalwege

Bei so genannten „nicht-klassischen“ Signalwegen handelt es sich um schnelle Zellantworten auf Östrogene innerhalb von Sekunden bis Minuten, die durch eine Aktivierung von membranständigen GPER oder membranassoziierten Östrogenrezeptoren durch Östrogen ausgelöst werden (Abb. 5). Durch diese Rezeptoraktivierung wiederum werden Proteinkinasen, die second messenger Produktion oder die Durchlässigkeit von Ionenkanälen moduliert (Hammes und Levin 2007). Die GPERs besitzen eine hydrophobe Komponente, die als Transmembrandomäne funktioniert, und vermitteln den größten Anteil der nicht-klassischen Signalwege (Ho und Liao 2002). Obwohl die Transmembrandomäne und damit eine Verankerungsmöglichkeit in der Membran bei den klassischen Östrogenrezeptoren fehlen, wurde auch ihre Präsenz in der Membran nachgewiesen; ihr Anteil beträgt für ER $\alpha$  sogar 5-10% (A. Hammes et al. 2005; Hess und Cooke 2018).

Das Steroidhormon aktiviert beim nicht-klassischen Kinase-vermittelten Signalweg über membranständige HRs die Sarcom-Tyrosinkinase (Src). Diese phosphoryliert und aktiviert wiederum den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R), der eine Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP)-Kaskade induziert (Fix et al. 2004; Cheng, Watkins, und Walker 2007). Alternativ erfolgt, wie von Fietz et al. (2014) für Östrogene beschrieben, eine durch das Sexualhormon initiierte GPER-gekoppelte Signalwirkung, die eine Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt. Hierdurch kommt es wiederum über die Src zur Initiierung der MAP-Kinasen-Kaskade. Hieraus folgt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors cAMP Response Element Binding Protein (CREB) mit Induktion der CREB-vermittelten Genexpression (Cheng, Watkins, und Walker 2007; Fix et al. 2004).

Ebenfalls binnen kürzester Zeit entfalten die Sexualhormone ihre Wirkung durch membranständige HRs über den nicht-klassischen Ca<sup>2+</sup>-Influx-Signalweg. Durch Hemmung Adenosintriphosphat (ATP)-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle mit konsekutiv erhöhtem Membranpotential steigt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, was wiederum bis zur Membrandepolarisation führen kann (Z. Guo et al. 2002; Benten et al. 1999).



**Abb. 5. Vergleich der klassischen und nicht-klassischen Östrogen-Signalwege**

Östrogene entfalten ihre Wirkung über klassische Signalwege (links dargestellt, vergleiche auch Abb. 4) und nicht-klassische Signalwege (rechts dargestellt). cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CREB: cAMP Response Element Binding Protein, E: Östrogen, EGF-R: Epidermal Growth Factor Rezeptor, GPER: G-Protein-Rezeptor, HSP: Hitzeschockprotein, MAP: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, mER: membrangebundene Östrogenrezeptoren, Src: Sarcom-Tyrosinkinase (Fietz et al. 2014; A. Hammes et al. 2005).

Gepunktete Linie = indirekte Wirkungsweise; durchgezogene Linie = direkte Wirkungsweise.  
(überarbeitet von: [https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?processType=view&species=Rat&acc\\_id=PW:0000507](https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?processType=view&species=Rat&acc_id=PW:0000507), abgerufen am 02.02.2019).

#### 1.2.2.1.2.3 Testikuläre Östrogenrezeptoren

Den publizierten Daten zufolge konnten Östrogenrezeptoren in allen testikulären Zelltypen nachgewiesen werden (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017). Diese Daten variieren stark zwischen den untersuchten Spezies und durchgeführten Studien (Fietz et al. 2014), was laut Dostalova et al. (2017) unter anderem auf die Expression von ER-Isoformen, unterschiedliche Methoden oder Nachweisantikörper zurückzuführen ist. Insbesondere die geringe Spezifität mancher Antikörper wird hierbei als problematisch angeführt (Segner, Verborg-van Kemenade, und Chadzinska 2017). Die Expressionsniveaus von ER $\alpha$  und ER $\beta$ , wie auch von ARO, hängen zudem von Alter, Zelltyp und Keimzellstadium ab (Bois et al. 2010). Abb. 6 zeigt die Lokalisation der mRNA- und Proteinexpression von AR, Östrogenrezeptoren und ARO im adulten Rattenhoden.

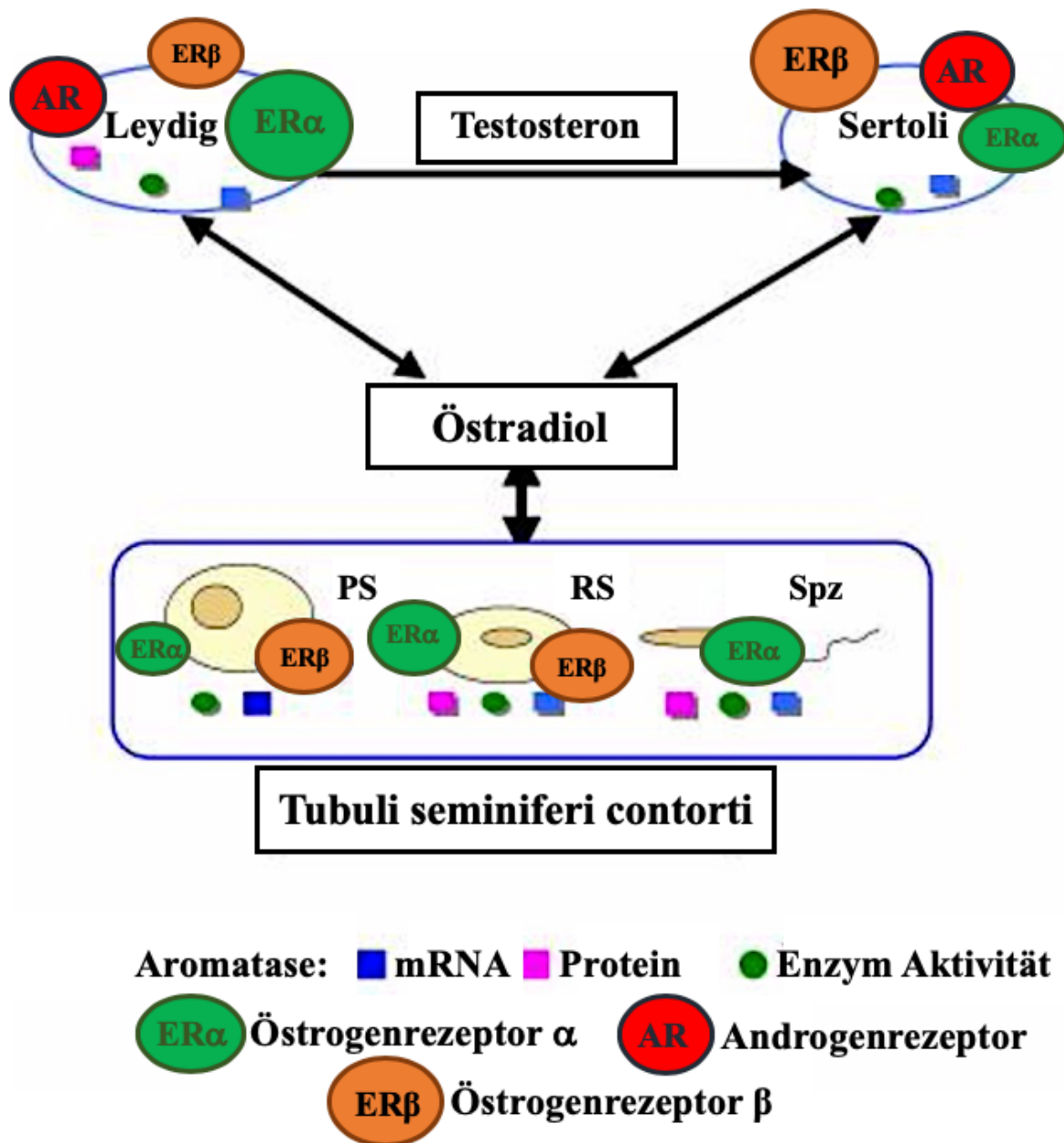
Insgesamt sind testikulär im adulten Nager mehr Östrogenrezeptoren exprimiert als im juvenilen, mit Ausnahme der SZ. Ihre ER $\alpha$ -Expression nimmt mit dem Alter ab, ihre ER $\beta$ -Expression hingegen zu. Der Wechsel von der ER $\alpha$ - hin zur ER $\beta$ -Expression in den SZ während der frühen Entwicklungsphase erlaubt, dass initial durch Östrogene über ER $\alpha$  die Zellproliferation anhand der EGF-R/MAP-Signalkaskade von unausgereiften SZ moduliert und beim adulten Tier dann über ER $\beta$  anhand des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/CREB-Signalwegs die Zelldifferenzierung bewirkt wird (Lucas, Lazari, und Porto 2014; Royer et al. 2012).

Auch der GPER wurde beim Nager im Zytoplasma von Keimzellen und SZ beschrieben (Chimento, Sirianni, Delalande, et al. 2010; Lucas et al. 2011), beim Menschen erfolgte der Nachweis in LZ und SZ (Fietz et al. 2014). Obwohl *in vitro* Studien eine Rolle von GPER bei der Proliferation von Spermatogonien und der Apoptose von Spermatozyten und SZ nahelegten, zeigten sich männliche GPER-knock out (KO)-Mäuse gonadal normal entwickelt und fertil (Prossnitz und Hathaway 2015). Eine Assoziation der GPER-Expression mit Alter und Zelltyp (wie für die klassischen ERs) konnte für GPERs bislang nicht gezeigt werden (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017).

Während AR nur in somatischen Zellen des Hodens zu finden ist (Fijak et al. 2018), ist die Datenlage zur Lokalisation der Östrogenrezeptoren im männlichen Genitaltrakt bislang uneinheitlich, was nicht nur auf Speziesunterschieden, sondern auch auf unterschiedlichen Nachweismethoden beruhen könnte (Fietz et al. 2014). In der adulten Ratte wird ER $\alpha$  in LZ, runden und pachytänen Spermatischen (Bois et al. 2010), sowie in

den ableitenden Samenwegen im Rete testis exprimiert (Hess 2003). ER $\alpha$  hat seine höchste Expression in den proximalen Ductuli efferentes (Carreau et al. 2011). Dort wird Östrogenen eine wichtige Rolle hinsichtlich der tubulären Wasserretention und des anterograden Sekretflusses zugeschrieben (Hess und Cooke 2018). ER $\beta$  wurde in LZ, SZ, sowie Spermatogonien, runden und pachytänen Spermatiden beschrieben (van Pelt et al. 1999). Im Nebenhoden wurden ER $\alpha$  und ER $\beta$  nachgewiesen, wohingegen in der Prostata ER $\beta$  die Hauptexpressionsvariante darstellt (Sar und Welsch 2001).

Für Nager liegen widersprüchliche Daten zur ER-Expression in Spermien vor. Während Carreau et al. (2003) in Rattenspermien den Nachweis von Östrogenrezeptoren allgemein und Lucas et al. (2008) den Nachweis einer ER $\alpha$  Expression erbrachten, gelang dies in vorangehenden und nachfolgenden Studien nicht (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017). Eine Expression von Östrogenrezeptoren in humanen Spermien, überwiegend anhand von ER $\beta$ , wurde bereits 1981 von Cheng et al. untersucht, hierbei wurde überwiegend eine Expression im Mittelteil der Spermien nachgewiesen. Positive Nachweise einer ER-Expression in Spermatozoen erfolgten erst Jahre später (Durkee, Mueller, und Zinaman 1998).



**Abb. 6. Relative Expression von ARO, AR und ER im adulten Rattenhoden**

Östrogenrezeptoren (ERs) werden in den Leydig-Zellen (LZ), den Sertoli-Zellen (SZ), den pachytänen (PS) und runden Spermatozyten (RS) sowie den Spermatozoen (Spz) exprimiert. Hierbei wird Subtyp ERα überwiegend in LZ exprimiert, Subtyp ERβ überwiegend in SZ. AR wird in den somatischen testikulären Zellen, hier dargestellt SZ und LZ, exprimiert. Eine Aromatase (ARO)-Expression wurde mittels Western Blot und qRT-PCR in LZ, SZ, PS, RS und Spz nachgewiesen. Es konnte in allen Zellen ein Nachweis der ARO-mRNA (blau) und ARO-Enzymaktivität (grün) erfolgen, in SZ und pachytänen Spermatozyten erfolgte bis dato kein Protein-Nachweis (rosa). Die Größe der Symbole visualisiert das relative Expressionsausmaß an der jeweiligen Lokalisation (Carreau und Hess, 2010; Carreau et al., 2003, 2011; Cooke et al., 2017; Dostalova et al., 2017; Fietz et al., 2014; Smith und Walker, 2014; Lucas et al. 2008); (Abbildung überarbeitet von: Carreau et al., 2003).

#### 1.2.2.1.2.4 Testikuläre Östrogenwirkungen

Die Regulation der Östrogenkonzentration ist für eine normale Spermatogenese notwendig, wie *in vivo* Studien demonstrierten, da sowohl zu hohe als auch fehlende Östrogenspiegel zu einer Unterbrechung der Spermienproduktion führen können (Fisher et al. 1998; Balasinor et al. 2010). Zudem spielen Östrogene eine Rolle in der Organentwicklung des Hodens, im Flüssigkeitshaushalt des Nebenhodens und im Transport der Spermien durch die ableitenden Samenwege (O'Donnell et al. 2001). Betrachtet man die testikuläre Östrogenwirkung anhand von ER- und Aromatase-KO-Modellen oder Patienten mit ER- oder ARO-Gendefekten, so wurden entsprechende Störungen der Keimzellentwicklung, Spermatogenese, und Spermienmotilität beschrieben (E. Smith et al. 1994). Angesichts des Wechselspiels zwischen Gonadotropinen und Sexualhormonen könnten diese Wirkungen teilweise direkter und indirekter Natur sein (Hess 2003).

Die Wirkung von Östrogenen auf das Keimepithel ist vielgestaltig. Für Spermatogonien zeigten *in vitro* Studien eine Wirkung von ER $\alpha$  in der Wachstumssignalkaskade EGF-R/ERK/c-fos, welche die Zellproliferation anregt (Sirianni et al. 2008). Bei Inkubation von Keimepithel unter serum- und hormonfreien Bedingungen kam es zu einer Keimzellapoptose, welche durch Hinzugabe physiologischer Östrogenlevel unterbrochen werden konnte (Pentikäinen et al. 2000). Hingegen bewirkte die direkte Inkubation von Keimzellen in Östrogen-angereicherten Medien bei pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden die Apoptose, am ehesten ausgelöst durch Einleitung der EGF-R/ERK/c-Jun „Stress“-Signalkaskade über ER $\alpha$  oder GPER (Chimento, Sirianni, Delalande, et al. 2010; Chimento, Sirianni, Bois, et al. 2010). Eine gesteigerte ER $\alpha$  Wirkung störte insbesondere die Entwicklung von runden zu elongierten Spermatiden (Dumasia et al. 2015). Zudem wurde unter Östrogensubstitution eine gestörte Kernkondensation bei den Spermien mit konsekutiv herabgesetzter Fertilität beschrieben (Kaushik et al. 2010).

Die Östrogenrezeptortypen scheinen beim Nager teils gegensätzliche Wirkungen am Keimepithel zu entfalten. So wurde beispielsweise in Spermatiden eine ER $\alpha$ -abhängige Einleitung der EGF-R/ERK-Signalkaskade mit konsekutiver Apoptose beschrieben, wohingegen dieselbe Signalkaskade bei Einleitung durch ER $\beta$  die Apoptose zu verhindern scheint (Chimento, Sirianni, Bois, et al. 2010). Für das jeweilige Einschlagen der beschriebenen, teilweise gegensätzlichen, anti- und pro-apoptotischen Effekte der Östrogene am Keimepithel scheinen spezie-, rezeptortyp- und dosisabhängige Faktoren

verantwortlich zu sein (Hess und Cooke 2018). Die Wirkung von Östrogenen am Hoden hängt zudem von der Verfügbarkeit von ER-Co-Regulatoren ab. Beispielsweise beeinflussen Steroid Receptor Co-Activator 1-3 durch eine Verminderung der Expression von Ena-Vasodilator stimulated Phosphoprotein das Aktin-Remodelling während der Spermiation (Kumar et al. 2017).

Über das Keimepithel hinausgehend scheint sich bei Nagern eine vermehrte Östrogenaktivität am Hoden schädlich auszuwirken. Unphysiologisch hohe Östrogenspiegel führten zu dosisabhängigen testikulären Expressionsveränderungen bei Genen mit einer Estrogen responsive Element Promotorsequenz (Balasinor et al. 2010): hierbei handelte sich um Gene des Androgenmetabolismus, des Zytoskeletts, des intrazellulären Transports, der Endozytosemechanismen und der Keimzellapoptose (Balasinor et al. 2010). Eine Überstimulation von ER $\alpha$  und ER $\beta$  in männlichen Ratten durch Substitution von ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -Agonisten bewirkte eine verminderte Fertilität im Sinne einer Verringerung der Wurfgröße und Spermienanzahl sowie einer erhöhten Abortrate bei Paarung mit gesunden weiblichen Ratten (Dumasia et al. 2015).

Die herabgesetzte Fertilität bei Östrogenüberaktivität kann einerseits auf lokale Östrogenwirkungen und andererseits auf eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zurückgeführt werden. Neben lokalen testikulären Effekten bewirkte eine Östrogensubstitution bei männlichen Nagern auch eine Reduktion der Hormonkonzentrationen für LH, FSH und Testosteron (Gill-Sharma et al. 2001; Goyal et al. 2001). Eine gesteigerte ER $\alpha$  Wirkung bewirkte ebenfalls reduzierte FSH- und LH-Level (Dumasia et al. 2015). Eine wichtige Rolle für ER $\alpha$  liegt somit darin, den negativen Feedbackmechanismus für die Gonadotropine zu vermitteln. Die Haupt-ER-Isoform in der Hypophyse ist entsprechend ER $\alpha$  (Mitchner, Garlick, und Ben-Jonathan 1998). Die niedrige Testosteronkonzentration bei Östrogenüberaktivität kann neben dem fehlenden LH-Effekt auch auf einer lokalen Wirkung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf die LZ beruhen (Akingbemi et al. 2003), insbesondere da ER $\alpha$  die Aktivität der ARO steigert (Villablanca et al. 2013).

Bestimmte (eher niedrigere) Östrogenkonzentrationen wirken sich jedoch insbesondere bei adulten Nagetieren positiv aus: Im Rahmen von Alterungsprozessen sind die Plasmaspiegel von Östrogen wie auch Testosteron erniedrigt und es kommt zu einer niedrigeren Spermienproduktion, niedrigeren AR-, ER- und ARO-Expression sowie niedrigeren

antioxidativen Enzymwirkung, wobei eine Östrogensubstitution in niedrigen Dosen diese Zustände teilweise normalisiert (Hamden et al. 2008).

#### **1.2.2.1.2.5 Östrogenrezeptorexpression in Immunzellen**

Die Datenlage zur ER-Expression in Immunzellen ist überschaubar, sowohl hinsichtlich der mRNA- als auch der Protein-Expression, obwohl beinahe alle Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems ER $\alpha$  und ER $\beta$  exprimieren (Kovats 2015; Phiel et al. 2005).

Im angeborenen Immunsystem wurde das Vorkommen von ER auf den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks beschrieben (Carreras et al. 2008), welche die Vorläuferzellen aller Immunzellen darstellen, sowie auf natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Monozyten, wie im Folgenden jeweils näher beschrieben; für Granulozyten liegen hingegen aktuell keine sicheren Daten hinsichtlich der Östrogenrezeptorexpression vor (Kovats 2015).

Hämatopoetische Stammzellen zeigen beim Menschen eine Expression für ER $\alpha$  und ER $\beta$ , bei der Maus zeigen sich Nachweise für ER $\alpha$  (Igarashi et al. 2001), wie mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) untersucht. Natürliche Killerzellen zeigen eine hohe Expressionsrate für ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowohl beim Menschen als auch bei der Maus (Curran et al. 2001), wie immunzytochemische Untersuchungen zeigten.

In dendritischen Zellen zeigt sich über die Lebensspanne und je nach Aktivität eine Veränderung der ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -Expression. Ihre Vorläuferzellen weisen höhere ER-Werte auf als ausdifferenzierte Zellen (Escribese et al. 2008). Inaktive dendritische Zellen exprimieren ER $\alpha$  (Seillet et al. 2012), aktivierte dendritische Zellen im Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis weisen auch eine ER $\beta$ -Expression auf (Du et al. 2011).

Monozyten weisen eine ER $\alpha$ -Expression auf, wenngleich sie gegenüber den anderen menschlichen Immunzellen die niedrigste ER $\alpha$ -RNA-Expression zeigen (Mor et al. 2003); bei der Maus liegen bis dato keine sicheren ER-Expressionsnachweise vor (Kovats 2015). Beim Menschen gibt es Unterschiede in der ER-Expression in Monozyten hinsichtlich Alter, Geschlecht und Hormonstatus. Bei Frauen vor der Menopause wurden niedrigere ER $\alpha$ -RNA-Werte in Monozyten nachgewiesen als bei Frauen nach der

Menopause oder Männern. Höhere Östrogenspiegel können somit mit einer niedrigen ER $\alpha$ -Expression einhergehen (Phiel et al. 2005).

Makrophagen zeigen in Mäusen eine ER $\alpha$ -Expression und nur eine geringfügige ER $\beta$ -Expression (Lambert et al. 2004). Makrophagen exprimieren zudem Spleißvarianten von ER $\alpha$  (Murphy et al. 2009). Diese Isoformen der Östrogenrezeptoren sind bei den Immunzellen insgesamt häufig, was die Variabilität der Östrogen-vermittelten Wirkungsweisen erklärt und in Abhängigkeit vom auslösenden Zelltyp unterschiedliche Immunantworten bewirkt (Khan und Ansar 2016).

Im angeborenen Immunsystem der Maus zeigen die Zellen somit zusammengefasst überwiegend eine ER $\alpha$ - und eine eher geringfügige ER $\beta$ -Expression.

Auch im adaptiven Immunsystem zeigen die Immunzellen eher eine überwiegende Expression von ER $\alpha$ , jedoch ohne nennenswerte Expressionsunterschiede zwischen Mann und Frau oder zwischen prä- und postmenopausalen Frauen (Kovats 2015): T-Zellen zeigen bei Mensch und Maus hohe Expressionsraten für ER $\alpha$ , ein Nachweis für ER $\beta$  hingegen ist zwar bei menschlichen T-Zellen, nicht aber bei Mäusen beschrieben (Lélu et al. 2011). So zeigen beim Menschen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine hohe bis mittlere Expressionsrate für ER $\alpha$  und ER $\beta$ , bei der Maus zeigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sich nur für ER $\alpha$  positiv, während die Expression bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen unbekannt ist (Kovats 2015). B-Zellen zeigen von allen Immunzellen die höchsten Expressionsraten für ER $\alpha$  und ER $\beta$ , sowohl beim Menschen als auch bei der Maus, wobei eine überwiegende ER $\beta$ -Expression beschrieben wurde (Phiel et al. 2005).

#### **1.2.2.1.2.6 Aromatase- und Östrogenrezeptor-Knock out-Modelle**

Die essentielle Bedeutung von Östrogenen für die männliche Fertilität wurde durch knock out (KO)-Mausmodelle belegt: Die Auswirkungen einer fehlenden Östrogen*produktion* wurden anhand von Aromatase-KO-Mausmodellen untersucht, die Auswirkungen einer verminderten Östrogen*wirkung* anhand von ER $\alpha$ KO-, ER $\beta$ KO- und ER $\alpha\beta$ KO-Mausmodellen (Rochira et al. 2013), wie im Folgenden dargestellt.

Bei Aromatase-KO-Mausmodellen besteht ein absoluter Östrogenmangel bei normalen Gonadotropin- und Androgenspiegeln (Robertson et al. 1999). Die männlichen Tiere zeigen sich initial fertil, im Laufe des ersten Lebensjahres kommt es jedoch zu einer zunehmend gestörten Spermatogenese (Robertson et al. 1999). Die Störungen der Spermatogenese wurden vorwiegend im Spermatidenstadium beobachtet, wohingegen

keine Beeinträchtigung der Keimzellvorläuferzellen oder SZ gesehen wurde. Dies belegt die Bedeutung der Östrogene für die Spermatidendifferenzierung und Spermiation (Dumasia et al. 2015). Die anti-apoptotische Wirkung der Östrogene, unter anderem vermittelt durch das Protoonkogen c-fos, gilt für die Differenzierung und das Überleben der Keimzellen als essenziell (Carreau et al. 1999; 2011; Rochira et al. 2013). Neben der beeinträchtigten Spermatogenese finden sich bei Aromatase-KO-Mausmodellen histologische Veränderungen in Form einer veränderten Tubulusstruktur und einer LZ-Hyperplasie (Carreau et al. 1999; 2011; Rochira et al. 2013) sowie ein verändertes Sexualverhalten (Dumasia et al. 2015). Analog zum Tiermodell zeigen Menschen mit ARO-Defizienz ebenfalls eine Hodenatrophie, Oligospermie und reduzierte Spermienmotilität (Rochira und Carani 2009).

Bei ER $\alpha$ KO-Mausmodellen besteht ebenfalls eine Infertilität der männlichen Tiere (Dudek und Picard 2008). Zwar verläuft die Entwicklung des männlichen Reproduktionstraktes im Frühstadium zunächst normal, jedoch weisen die Tiere bereits wenige Tage postnatal Störungen des Keimepithels auf (Rochira et al. 2013). Ihre Infertilität resultiert aus einer gestörten Flüssigkeitsresorption im Bereich des Rete testis und des proximalen Nebenhodens, welche ab der zehnten Lebenswoche zu einem zunehmenden Flüssigkeitsrückstau in den Hoden mit konsekutiven Druckschäden und Keimzelluntergang führt (Eddy et al. 1996). Diese Flüssigkeitstransportstörung findet sich bei den zuvor dargestellten Aromatase-KO-Mäusen hingegen nicht, was nach Untersuchungen an estrogen non-responsive ER $\alpha$  knock-in (ENERKI) Mausmodellen auf Liganden-unabhängige ER $\alpha$ -Wirkungen zurückgeführt wird (Sinkevicius et al. 2009). Für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese scheint die Expression von ER $\alpha$  in den somatischen Zellen des Hodens wichtig, die Expression in den Keimzellen selbst hingegen nachrangig zu sein. So zeigen transplantierte Keimzellen aus dem Keimepithel von ER $\alpha$ KO-Mäusen eine normale Ausdifferenzierung, wenn sie in Hodengewebe von Wildtypmäusen eingebracht werden (Mahato et al. 2001). Weiterhin zeigen ER $\alpha$ KO-Mausspermien eine verminderte Anzahl und Beweglichkeit und können *in vitro* eine Eizelle nicht befruchten (Eddy et al. 1996). Zurückgeführt wird dies teils auf eine abnorme Flagellumotilität, teils auf eine spontane Akrosomenreaktion (Joseph et al. 2010). Beim Menschen kann eine ER $\alpha$ -Fehlfunktion eine verminderte Anzahl und Überlebensrate der Spermien oder sogar komplette Infertilität bewirken (E. Smith et al. 1994).

Bei ER $\beta$ KO-Mausmodellen bestehen – anders als bei ER $\alpha$ KO-Mausmodellen – überwiegend eine intakte Fertilität und nur gering ausgeprägte testikuläre Parenchymveränderungen (Dupont et al. 2000; Rochira et al. 2013). Dies ist bemerkenswert, da ER $\beta$  speziesübergreifend der häufigste ER sowohl im fetalen als auch adultem Hodengewebe ist (Carreau et al. 2011; Cavaco et al. 2009). Bei adulten ER $\beta$ KO-Mäusen zeigten sich histologisch eine leicht erhöhte Spermatogonien- und LZ-Anzahl, die jedoch keine Auswirkung auf die Spermienanzahl bzw. Testosteronproduktion hatten (Gould, Hurst, und Nicholson 2007). Im unreifen Hodengewebe von ER $\beta$ KO-Ratten zeigt sich ebenso eine höhere Anzahl von Spermatogonien, aber eine normale Anzahl von LZ. Diese bereits im unreifen Hodengewebe erhöhte Spermatogonienanzahl könnte auf einer fehlerhaften ER $\beta$ -Wirkung im Laufe der fetalen und neonatalen Entwicklung beruhen (Delbès et al. 2004). Dass die Spermienanzahl im reifen Hoden nicht erhöht war, wurde durch die konstante SZ-Anzahl erklärt, welche als eigentliche Limitation für die Ausbildung und Ausreifung der Keimzellen gilt (Nieschlag et al. 2010). Einschränkend für die Interpretation der ER $\beta$ KO-Modelle ist zu berücksichtigen, dass mehrere Spleißvarianten von ER $\beta$  mit teils gegensätzlicher Funktion bekannt sind (Rochira et al. 2013). Wie wichtig die Berücksichtigung der ER $\beta$ -Unterformen ist, verdeutlicht ein ER $\beta$ KO-Mausmodell, welches als gänzlich frei von ER $\beta$ -Transkripten gilt (Antal et al. 2008). Bei diesem Modell zeigt sich anders als bei den zuvor genannten ER $\beta$ KO-Mausmodellen eine Infertilität der männlichen Tiere, trotz normaler Hodenhistologie und nur gering verändertem Sexualverhalten. Analog zu den meisten ER $\beta$ KO-Tiermodellen ist auch beim Menschen eine kongenitale ER $\beta$ -Defizienz nicht mit einer relevanten Beeinträchtigung der Fertilität oder Hodenfunktion verbunden (Krege et al. 1998).

### **1.3 Immunprivileg des Hodens**

Der Hoden zählt, wie die vordere Augenkammer, die Plazenta oder das Gehirn, zu den sogenannten immunprivilegierten Organen. Das bedeutet, dass in diese Organe Fremdgewebe eingebracht werden kann, ohne dass es zu einer akuten Transplantatabstoßungsreaktion kommt (Fijak, Bhushan, und Meinhardt 2010; Nasr et al. 2005).

Die Entwicklung der systemischen immunologischen Selbsttoleranz ist vor der Pubertät abgeschlossen. Da die Spermatogenese jedoch erst mit Einsetzen der Pubertät beginnt, bedeutet dies mit Hinblick auf die männlichen Keimzellen, dass keimzellspezifische Antigene nicht mehr bei der Elimination autoreaktiver T-Lymphozyten im kindlichen Thymus berücksichtigt werden. Bei der Differenzierung von Spermatogonien zu

Spermatiden werden neuartige Oberflächenstrukturen exprimiert, welche außerhalb des Hodens durch das Immunsystem als fremd eingestuft und angegriffen werden (Meinhardt und Fijak 2006). Das Immunprivileg des Hodens ist somit notwendig, um überschießende (auto-)immune Reaktionen gegen die Antigenstrukturen der Keimzellen und Spermatiden zu vermeiden, insbesondere angesichts der hohen Proliferationsrate der Keimzellen. Das Immunprivileg des Hodens umfasst mehrere Komponenten, die im Folgenden dargestellt werden: die Blut-Hoden-Schranke, das Vorkommen zahlreicher regulatorischer Immunzellen im Hodengewebe, sowie das lokal immunsupprimierend wirkende Zytokin- und Hormonmilieu (Fijak et al. 2018; Zhao et al. 2014).

### **1.3.1 Blut-Hoden-Schranke**

Die Blut-Hoden-Schranke trennt die männlichen Keimzellen mit ihren spezifischen Oberflächenantigenen von den Immunzellen des Körpers, indem sie eine mechanische Barriere zwischen dem basalen und dem adluminalen Kompartiment des Keimepithels ausbildet (Fijak et al. 2018). Strukturell wird die Blut-Hoden-Schranke von SZ durch Tight Junctions, Desmosomen und weitere Adhäsionskontakte gebildet; zum vollständigen Schluss der Zell-Zell-Kontakte kommt es mit dem Auftreten der ersten meiotischen Keimzellen in der Pubertät (Nieschlag et al. 2010). Das basale Kompartiment des Keimepithels entspricht in seiner plasmatischen Zusammensetzung dem Blutmilieu, von dem es nur durch die semipermeable Basallamina der anliegenden PTZ getrennt wird (Pelletier und Byers 1992). Im adluminalen Kompartiment hingegen wird durch die Blut-Hoden-Schranke ein für die Spermatogenese optimales Mikromilieu aufrecht erhalten (Lüllmann-Rauch 2015).

Zunächst galt die Hypothese, dass die Blut-Hoden-Schranke allein durch die mechanische Trennung vom adaptiven Immunsystem einen Großteil des immunologischen Schutzes der haploiden Keimzellen leisten würde (Dym und Fawcett 1970). So wurden bei gestörter Integrität der Tight Junctions konsekutiver Keimzellverlust und Infertilität beobachtet (Meinhardt und Fijak 2006).

### **1.3.2 Testikuläres Immunsystem und Meiotic Germ Cell Antigens**

Weitere Beobachtungen sprechen dafür, dass die Blut-Hoden-Schranke als mechanische Barriere allein für das Immunprivileg des Hodens nicht ausreichend ist, sondern dass

weitere Mechanismen für die Toleranz der Keimzellantigene notwendig sind und die testikulären Immunprozesse von den systemischen abweichen (Zhao et al. 2014):

(a) Es gibt Besonderheiten bezüglich der residenten testikulären Immunzellen, die starke tolerogene Verhaltensweisen aufweisen. Durch die einzigartige Zellkomposition der Immunzellen bestehen bei testikulären Immunreaktionen im Vergleich zu Infektionen bei nicht-immunprivilegierten Organen vergleichsweise hohe Konzentrationen anti-inflammatorischer Mediatoren (Nieschlag et al. 2010). So liegt beispielsweise eine prozentual hohe Präsenz immunregulatorischer T-Zellen wie regulatorischer und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor, die eine gemäßigte Immunantwort vermitteln (Jacobo et al. 2011; B. Klein et al. 2016; Duan et al. 2011). Von den antigenpräsentierenden Zellen zeigen sich auch die dendritischen Zellen stark tolerogen und weisen eine nur geringe Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auf (Rival et al. 2007). Insbesondere der Phänotyp der testikulären Makrophagen, der testikulär häufigste Vertreter von Immunzellen bei Mensch und Nager (Bhushan und Meinhardt 2017), weist entzündungshemmende Eigenschaften auf: Es handelt sich vorwiegend um den regulatorischen CD168<sup>+</sup>-Makrophagen-Subtyp mit hohen Produktionsraten des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Wang et al. 2017); auch bei Entzündungen des Hodens behalten die testikulären Makrophagen vergleichsweise hohe Sekretionsraten für IL-10 aufrecht und weisen niedrigere Produktionsraten pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und Stickstoffmonoxid (NO) auf (O'Bryan et al. 2000; Bhushan et al. 2015; Winnall, Muir, und Hedger 2011).

(b) Die testikulären Makrophagen haben eine enge Interaktion über Zell-Zell-Interdigitationen mit den LZ und beeinflussen deren Entwicklung und Funktion, wodurch immunologische und testikuläre Prozesse miteinander verknüpft werden (Fijak, Bhushan, und Meinhardt 2010; Hedger und Hales 2006; Hutson 2006). Ebenso haben LZ stimulierende Effekte auf Makrophagen, deren Anzahl bei LZ-Verlusten ebenfalls reduziert ist (Meinhardt und Fijak 2006). Die übrigen somatischen Zellen des Hodens sind über die Expression immunregulatorischer Faktoren, wie beispielsweise Aktivin A bei den SZ und PTZ, auch in das testikuläre Immunprivileg miteinbezogen und greifen durch Minderung der pro- und Steigerung der anti-inflammatorischen Mediatoren in die Immunantwort ein (Fijak et al. 2018). Aus der Summe der genannten Mechanismen resultiert eine gemäßigte Abwehrreaktion, die aber noch immunologisch effektiv ist (Meinhardt und Schuppe 2003).

(c) Autologe Antigene der männlichen Keimzellen wurden auch außerhalb der Blut-Hoden-Schranke nachgewiesen, insbesondere wurde ein intrazellulärer Transport von derartigen Antigenen durch SZ vom adluminalen zum basalen Kompartiment beobachtet (Tung et al. 2017). Diese autologen Antigene gelangen über phagozytierte Residualkörperchen von SZ regelmäßig ins Interstitium und halten nach neuen Erkenntnissen zusammen mit den regulatorischen T-Helferzellen die systemische Toleranz gegenüber den neu gebildeten Spermien aufrecht (Tung et al. 2017). Die Antigene werden unter dem Begriff Meiotic Germ Cell Antigens (MGCA) subsummiert, die wiederum in „non-sequestered“ (NS-MGCA) und „sequestered“ (S-MGCA) mit jeweils unterschiedlichen tolerogenen Eigenschaften unterteilt werden (Tung et al. 2017). Sie können aber durch Auslösen einer Autoimmunreaktion die Spermatogenese und Kapazitation negativ beeinträchtigen und wurden zu 5-12% bei infertilen Männern nachgewiesen (Turek und Lipshultz 1994).

### **1.3.3 Immunmodulierende Wirkung des Testosterons und Androgenrezeptor-Expression in Immunzellen**

Als weitere zentrale Komponente des Immunprivilegs des Hodens wurde die Wirkung von Testosteron identifiziert, sowohl hinsichtlich der Entwicklung als auch der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs (Meinhardt und Fijak 2006). So bewirkt eine *in vitro* Stimulation von Immunzellen mit Testosteron eine Reduktion ihrer pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion und eine verstärkte Expression anti-inflammatorischer Mediatoren (Liva und Voskuhl 2001; Hatakeyama et al. 2002). Eine Suppression der endogenen Testosteronproduktion durch Östrogen-Substitution bewirkte in Transplantationsstudien an Ratten eine Abstoßungsreaktion von in den Hoden eingebrachten Transplantaten (Head und Billingham 1985). Die Supplementierung von Testosteron zeigte bei Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematoses und der rheumatoiden Arthritis, positive Effekte auf die Krankheitsschwere (Bizzaro et al. 1987; Cutulo et al. 2004).

Insbesondere bei der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) wurde nach Testosteronsubstitution eine geringere Krankheitsausprägung beobachtet (Fijak et al. 2011). Dass die Testosteronkonzentrationen im gesunden Hoden um ein Vielfaches höher sind, als für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese nötig ist (Jarow et al. 2005), wurde als weiterer Hinweis auf einen Beitrag des Testosterons zum testikulären Immunprivileg gewertet.

Der anti-inflammatorische Wirkmechanismus von Testosteron ist noch nicht abschließend verstanden (Fijak et al. 2011). Bezüglich der AR-vermittelten Testosteronwirkung wurde eine AR-Expression in Granulozyten-Vorstufen (Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten), reifen neutrophilen Granulozyten (Mantalaris et al. 2001), Monozyten und Makrophagen (Ashcroft und Mills 2002), sowie Mastzellen nachgewiesen (Lai, Lai, Zeng, Chuang, et al. 2012; Chen et al. 2010). Eine AR-Expression im Thymus und Thymozyten wurde uneinheitlich als negativ (McCruden und Stimson 1984) oder positiv beschrieben (Viselli et al. 1995; Kovacs und Olsen 1987). In peripheren T-Zellen wurde entweder keine (Olsen und Kovacs 2001) oder nur eine schwache AR-Expression (Bebo et al. 1999) festgestellt. Der AR wird sowohl in B-Zell-Vorläuferzellen als auch reifen B-Zellen exprimiert (Mantalaris et al. 2001). Testikuläre dendritische Zellen weisen unter Androgeneinfluss ein hohes Maß an Tolerogenität auf (Rival et al. 2006; Fijak et al. 2018). Einschränkend ist anzumerken, dass die hier berichteten Expressionsdaten überwiegend auf Immunfluoreszenz-Untersuchungen basieren.

Da der AR nicht in allen Immunzellen (stark) exprimiert wird, nimmt man darüber hinaus nicht-genomische und/oder indirekte immunsupprimierende Wirkungsweisen der Androgene durch Zytokin-Modulation an (Benten et al. 1999; Fijak, Bhushan, und Meinhardt 2010).

Testosteron entfaltet seine immunmodulierende Wirkung einerseits durch die Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-1 und TNF $\alpha$ , andererseits durch die Steigerung anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 oder TGF- $\beta$  (Corcoran et al. 2010). So bewirkt eine Inkubation von T-Zellen mit Testosteron unter anderem einen Anstieg der Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 (Fijak et al. 2015). Androgene aktivieren zudem die Transformation von T-Zellen in regulatorische T-Zellen, beispielsweise durch Bindung des AR an den Foxp3-Promotor, einen der Haupttranskriptionsfaktoren der regulatorischen T-Zellen (Walecki et al. 2015).

## **1.4 Hodenentzündungen als Ursache männlicher Infertilität**

### **1.4.1 Epidemiologie und Ätiopathogenese der männlichen Infertilität**

Infertilität oder reduzierte Fertilität betreffen etwa 8-12% der Paare weltweit (Kumar und Singh 2015), wobei in rund 50% Fertilitätsstörungen des Mannes vorliegen und 20% der männlichen Fertilitätsstörungen als schwerwiegend beschrieben werden (Mascarenhas et al. 2012; Punab et al. 2017). Die Ursachen der Infertilität beim Mann sind vielfältig. Sie können in genetische Faktoren, prä-testikuläre Faktoren (z. B. Endokrinopathien mit

Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse), testikuläre Faktoren (z. B. Varikozele, Fehlanlage, Kryptorchismus, Gonadotoxinexposition, Infektion) und post-testikuläre Faktoren (Obstruktion, immunologische Infertilität, Ejakulationsstörungen, erektile Dysfunktion) unterteilt werden (Ammar, Sidhu, und Wilkins 2012). In rund 30% der Fälle bleibt die Ursache der männlichen Infertilität unklar (Nieschlag et al. 2010).

#### **1.4.2 Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Orchitis**

Eine Orchitis ist definiert als lokale Entzündung der Hoden, die mit Leukozyteninvasion, Tubulusschädigung und Abnahme des Hodenvolumens verbunden ist (Schuppe und Bergmann 2013). Anhand Orchidektomie-Material wurde ihre Inzidenz in früheren Untersuchungen auf 1,5/100.000 beziffert (Mikuz 1978), die tatsächliche Inzidenz liegt vermutlich höher. Etwa 13-15% der männlichen Fertilitätsstörungen entstehen infolge von Infektionen oder Inflammationen im Reproduktionsorgan, gelegentlich durch eine isolierte Orchitis, häufiger durch eine kombinierte Epididymo-Orchitis (Schuppe et al. 2017; Nieschlag et al. 2010).

Bei der isolierten Orchitis handelt es sich beim Menschen vornehmlich um virale Infektionen, z. B. durch hämatogen streuende Mumps- oder Coxsackie-Viren (Schuppe et al. 2008). Testikuläre Begleitinfektionen treten bei Urethritis, Zystitis, Nephritis, Prostatitis oder Epididymitis auf, unter anderem durch im Urogenitaltrakt aufsteigende Bakterien, wie Gonokokken, *Escherichia coli* oder Chlamydien (Pilatz et al. 2016; Schuppe et al. 2008). Parasitäre Infektionen, Pilz-Infektionen oder Infektionen durch seltene bakterielle Erreger (wie Brucellose, Syphilis oder Tuberkulose) spielen in Europa eine untergeordnete Rolle. Auch können nicht-infektiöse Ursachen wie Malignome, Noxen oder Traumata zu einer Orchitis führen (Schuppe und Meinhardt 2005).

Anhand ihres Verlaufs werden Orchitiden in akute, subakute und chronische Formen unterteilt. Akute Infektionen werden durch Schmerzen oder Fieber auffällig (Jungwirth et al. 2018). Auch bei leitliniengerechter, antibiotischer und anti-inflammatorischer Therapie reduziert sich bei 50% der behandelten Patienten die Spermienanzahl im langfristigen Verlauf (Lu et al. 2013). Gerade subakute oder chronische Krankheitsverläufe (über drei Monate) können aufgrund der fehlenden Begleitsymptomatik unbemerkt zu langfristigen Fertilitätsstörungen führen (Nickel et al. 2002). Diagnostisch kann bei einer Epididymo-Orchitis aufgrund der Beeinträchtigung der Spermienzahl und -qualität ein Spermogramm herangezogen werden (Haidl und Weidner 2002; Jungwirth et al. 2018). Die subakute oder chronische Orchitis wird häufig erst durch eine testikuläre Biopsie im

Rahmen einer Fertilitätsdiagnostik detektiert (Schuppe et al. 2008). Die WHO empfiehlt daher bei Männern mit eingeschränkter Spermienqualität eine Ausweitung der Diagnostik (Schuppe et al. 2017).

Im Unterschied zur Orchitis können bei einer Autoimmun-Orchitis keine infektiösen Ursachen (mehr) identifiziert werden. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen wird auch die Autoimmun-Orchitis von Umweltfaktoren und/oder genetischen Komponenten beeinflusst, zusätzlich sind endogene und endokrine Immunmodulatoren an ihrer Entwicklung beteiligt (Ahmed, Penhale, und Talal 1985; Silva et al. 2014).

#### **1.4.3 Histopathologie der Orchitis und experimentellen Autoimmun-Orchitis**

Biopsien sind bei der akuten bakteriellen Orchitis und Epididymitis aufgrund der Gefahr der Infektionsverschleppung kontraindiziert (Jungwirth et al. 2018; Schuppe et al. 2017). Dementsprechend liegen wenige valide Daten zu histopathologischen Veränderungen in der akuten und postinfektiösen Phase der Orchitis vor (Pilatz et al. 2016). Die Histopathologie der Orchitis wurde daher anhand von Tiermodellen der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) erforscht, welche sich vor allem den erregerbedingten Epididymo-Orchitiden ähnlich zeigen (Meinhardt und Schuppe 2003).

Die EAO ist eine interstitielle Entzündungsreaktion des Hodens, welche durch intraperitoneale Applikation von syngemem Hodenhomogenat induziert wird und zu Tubulusdegeneration, Hodenatrophie und Infertilität führen kann (Fijak et al. 2011; Meinhardt und Fijak 2006). Frühe histologische Veränderungen betreffen die Tubuli seminiferi recti, das Rete testis und die Ductuli efferentes (Meinhardt und Schuppe 2003; Kohno et al. 1983). Die histologischen Veränderungen umfassen die Invasion von Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen (Schuppe und Bergmann 2013), letztere bilden Zellnester in enger Beziehung zu LZ und fusionieren teilweise zu mehrkernigen Riesenzellen (Fijak et al. 2018). Hierdurch entstehende Granulationen können den Abtransport von Flüssigkeit und Spermatozoen in den Hodenkanälchen beeinträchtigen, was zu einem Flüssigkeitsrückstau und zur Dilatation der vorgeschalteten Tubuli führen kann (Meinhardt und Schuppe 2003). Bei schwerer Ausprägung der Orchitis kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in die Tubuli (Perez et al. 2012), zum kompletten Verlust des Keimepithels (Schuppe et al. 2008) mit der Endausprägung eines „Sertoli-Cell-only-Syndroms“ und Verlust der Spermatogenese, sowie zur Fibrosierung des Stützgewebes (Lustig et al. 1993; Suescun, Calandra, und

Lustig 1994). Im chronischen Stadium nehmen Hodenvolumen und -gewicht infolge der Organschäden ab (Nicolas, Muir, et al. 2017).

#### **1.4.4 Funktionelle und hormonelle Veränderungen bei der experimentellen**

##### **Autoimmun-Orchitis**

Im Rahmen der EAO kann neben dem Keimzellverlust eine dauerhafte Beeinträchtigung der LZ-Funktion auftreten, sei es direkt durch mechanische oder indirekt durch zelluläre oder zytokinvermittelte Entzündungsprozesse. Die Beeinträchtigungen der Steroidogenese in den LZ mit konsekutiv veränderten Testosteronspiegeln beeinflussen wiederum die Spermatogenese negativ (Haidl und Weidner 2002). Entgegen der vermeintlich intuitiven Annahme, dass Entzündungen zur Reduktion der LZ-Anzahl und Reduktion der Steroidhormonsynthese durch die LZ führen würden, beobachtete man im Tiermodell der EAO im Vergleich zu den Kontrolltieren eine LZ-Hyperplasie (Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Außerdem beobachteten Suescun et al. (1994) und später Fijak et al. (2011) eine erhöhte testikuläre Testosteronkonzentration und damit Steroidogenese, die bei normwertigen LH-Konzentrationen im Serum auf lokale Regulationsmechanismen im Rahmen der EAO zurückgeführt wurden. Offen blieb die Frage, ob die erhöhte testikuläre Testosteronkonzentration allein durch die numerische LZ-Erhöhung erklärt ist oder auch eine gesteigerte LZ-Funktion vorliegt. Angesichts der Tatsache, dass LZ von EAO-Rattenhoden *in vitro* sowohl basal als auch unter Stimulation mit humanem Choriongonadotropin eine gesteigerte Produktionsrate aufwiesen, wurde zusätzlich eine stimulierende Wirkung für sezernierte Stoffe der Immunzellen auf die LZ gefolgert (Suescun, Calandra, und Lustig 1994).

Anders als die erhöht gemessenen *lokalen* testikulären Konzentrationen waren die *systemisch* gemessenen Testosteronspiegel im Blut bei EAO-Tieren entweder unverändert bis leicht erniedrigt (Suescun, Calandra, und Lustig 1994) oder signifikant reduziert (Fijak et al. 2011). Dies wurde auf eine gesteigerte Clearance des Testosterons, bzw. eine inflammatorisch bedingte Durchblutungsstörung mit vermindertem Blutfluss und damit geringerer Diffusion des Testosterons in den Blutkreislauf zurückgeführt (Suescun, Calandra, und Lustig 1994).

Während in den EAO-Tieren im Vergleich zu den Kontrollbedingungen LH unverändert (Suescun, Calandra, und Lustig 1994) oder nur leicht erhöht gemessen wurde (Fijak et al. 2011), zeigte sich FSH im Serum zwei- bis dreifach erhöht. Es konnte jedoch mittels der subkutanen Testosteronsubstitution gezeigt werden, dass bei EAO-Ratten ein intakter

Feedbackmechanismus von Testosteron auf die Gonadotropin-Sekretion vorlag, da sowohl die LH- als auch FSH-Sekretion in der Hypophyse durch Testosteronsubstitution unterdrückt werden konnten (Fijak et al. 2011).

## **1.5 Immunmodulierende Wirkung der Sexualhormone**

### **1.5.1 Wirkung der Östrogene und Androgene auf das Immunsystem**

Sexualhormone beeinflussen die Zellproliferation, -differenzierung und -reifung im Knochenmark sowie die Zellaktivität und Zytokin-Expression der Leukozyten (Aruna, Harmandeep, und Gurpreet 2014). Die Östrogenwirkungen auf das Immunsystem sind zell- und dosisspezifisch, eine abschließende Unterscheidung in klassische und nicht klassische Wirkungsweisen erfolgte bislang nicht (Khan und Ansar 2016). Niedrige Östrogenspiegel begünstigen die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (wie IL-1, IL-6, Interferon [IFN]  $\gamma$  und TNF $\alpha$ ), hohe Östrogenspiegel hingegen supprimieren ihre Produktion. Zugleich induzieren Östrogene auch anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10 und TGF $\beta$ ) (S. Klein und Flanagan 2016). Analog (zu den Östrogenen) suppressieren auch Androgene die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und begünstigen die Expression anti-inflammatorischer Zytokine. Die resultierenden Wirkungen der Östrogene und Androgene auf die jeweilige Immunzelle sind somit vielfältig, jedoch zielgerichtet und hoch spezialisiert (Straub 2007).

Der Einfluss von Östrogenen auf das Immunsystem beginnt mit der Modulation der Differenzierung der *hämatopoetischen Stammzellen* im Knochenmark, welche Östrogenrezeptoren, aber keinen AR exprimieren (Smithson et al. 1998). Bei Frauen zeigen die hämatopoetischen Stammzellen ER $\alpha$ -vermittelt – insbesondere in der Schwangerschaft – eine höhere Teilungsfrequenz als bei Männern (Nakada et al. 2014).

Obwohl für *Granulozyten* keine sichere Östrogenrezeptorexpression gezeigt wurde, erhöht eine Östrogensubstitution ihre Anzahl und führt zu einer Verhaltensänderung mit gesteigerter Degranulation, Elastase-Freisetzung und Chemotaxis, verstärktem Infiltrationsverhalten sowie vermehrter Produktion von Myeloperoxidase und Zytokinen (Yu et al. 2007). Eine Expression des AR hingegen wurde für neutrophile Granulozyten nachgewiesen (Mantalaris et al. 2001). Ein Androgenmangel führt in ARKO-Mäusen und kastrierten Mäusen zu einer quantitativen Reduktion der Neutrophilen und konsekutiv verminderter Zytokinproduktion von IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  (Chuang et al. 2009; McDonnell und Livingston 1994). Androgene stimulieren die Neutrophilen-

differenzierung über den Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF)-Signalweg (Chuang et al. 2009), bewirken wie Östrogene eine höhere Neutrophilen-Zahl, vermindern aber die extrazelluläre Kinase- und Leukotrien-Freisetzung der Granulozyten und damit das Signalverhalten zur Rekrutierung weiterer Immunzellen (Pergola et al. 2008).

*Natürliche Killerzellen* zeigen unter Östrogeneinfluss *in vitro* eine gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion und erhöhte Zytotoxizität, reduzieren aber zugleich ihre Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche, wodurch überschießende Reaktionen verhindert werden (Nakaya, Tachibana, und Yamada 2006; Hao et al. 2007). Eine *in vitro* Exposition mit Androgenen führte bei Mäusen zu einer verringerten Aktivität der natürlichen Killerzellen (Hou und Zheng 1988).

Die Vorläufer *dendritischer Zellen* weisen während ihrer Differenzierung hohe ER-Expressionsraten auf (Escribese et al. 2008) und werden v. a. über ER $\alpha$  reguliert (Paharkova-Vatchkova, Maldonado, und Kovats 2004). Dieser induziert unter anderem den GM-CSF-Signalweg und führt zu einer gesteigerten Zellaktivität in Form einer vermehrten Antigenpräsentation, T-Zellaktivierung, Toll-like-Rezeptor (TLR) 7- und TLR9-Expression sowie IFN-Produktion (Bachy, Williams, und Ibrahim 2008; Seillet et al. 2012). In dieser gesteigerten IFN $\gamma$ -Produktion wird eine Hauptursache der höheren IFN $\gamma$ -Level bei Frauen im Vergleich zu Männern gesehen (Panchanathan, Liu, und Choubey 2013; Klein und Flanagan 2016). Hohe Östrogenspiegel während der Schwangerschaft führen zu einem tolerogenen Phänotyp der dendritischen Zellen, um eine Abstoßung des Embryos zu verhindern. Impfungen mit diesen tolerogenen dendritischen Zellen schützen im Mausmodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis vor der Entstehung der Autoimmunreaktion (Papenfuss et al. 2011). Dendritische Zellen können (wie auch Makrophagen) nach Aktivierung ihre ER-Expression hoch- oder herunterregulieren und damit ihre ER-Sensitivität verändern (Holm et al. 2010). Werden dendritische Zellen durch IFN $\gamma$  stimuliert, steigern sie ihre ER-Expression, wodurch eine sich gegenseitig verstärkende Wirkungsschleife zwischen Östrogenen und Interferonen entsteht (Panchanathan et al. 2010). Unter Androgeneinfluss weisen testikuläre dendritische Zellen ebenfalls eine erhöhte Tolerogenität auf und tragen essenziell zum Immunprivileg des Hodens bei (Rival et al. 2006; Fijak et al. 2018).

Bei *Makrophagen* und *Monozyten* des Menschen führen niedrige Östrogenkonzentrationen zu einer Induktion der IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$ -Zytokin-Produktion sowie gesteigertem Phagozytose- und Sekretionsverhalten, hohe Östrogenkonzentrationen

unterdrücken ebenjene Prozesse (Hsieh et al. 2009; Bachy, Williams, und Ibrahim 2008). Makrophagen exprimieren unter Östrogenexposition vermehrt TLR4, welcher zur Antigenerkennung und Zellrekrutierung in Abwehrreaktionen beiträgt (S. Klein und Flanagan 2016). Diese Oberflächenexpression von TLR4 auf Makrophagen ist unter Androgeneinfluss sowohl *in vivo* als auch *in vitro* reduziert. Eine Orchidektomie führt bei Mäusen zu einer erhöhten Anfälligkeit für das sogenannte endotoxische Schocksyndrom, welche eine Makrophagenüberreaktion darstellt (Rettew, Huet-Hudson, und Marriott 2008); hingegen wurde in ARKO-Mäusen ein vermindertes Makrophagenrecruitment bei Verletzungen beobachtet (Gilliver et al. 2006). Unter Androgenexposition zeigen Makrophagen eine verminderte TNF $\alpha$  und NO-Synthese (D'Agustino et al. 1999).

Eine ER-Expression ist Voraussetzung für die Entwicklung *lymphoider Organe* wie Thymus und Milz. So wirken Östrogene in Thymozyten anti-apoptotisch (Lindberg et al. 2002), Mäuse mit fehlender ER $\alpha$ -Expression weisen entsprechend hypoplastische Anlagen für Thymus und Milz sowie teils unreife T-Zellen auf (Erlandsson et al. 2001). Androgenen wird angesichts der bei Eintritt des Manns in die Adoleszenz abnehmenden T-Zellproduktion im Thymus (Flores et al. 1999) und der bei kastrierten Mäusen und ARKO-Mäusen beobachteten Thymushyperplasie eine wichtige Rolle in der Homöostase der Thymozyten-Selektion und -Proliferation zugeschrieben (Olsen und Kovacs 2001; Heng et al. 2005; Gubbels Bupp und Jorgensen 2018).

Östrogene modulieren dosisabhängig sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Priyanka et al. 2013). Niedrige Östrogenkonzentrationen lösen pro-inflammatorische Th1-Zellantworten mit einer gesteigerten IFN $\gamma$ -Produktion aus, hohe Östrogenkonzentrationen führen zu gemäßigten Th2-Zell-vermittelten Immunreaktionen (Straub 2007). Androgene hingegen supprimieren die Produktion von IFN $\gamma$  und IL-2 und stimulieren die Th2-Zellantwort sowie IL-10 und TGF $\beta$ -Produktion (Gubbels Bupp und Jorgensen 2018; Lai, Lai, Zeng, Chuang, et al. 2012). Das CD8<sup>+</sup> Zellvorkommen wird von Östrogen induziert, von Androgenen insgesamt in Anzahl und Aktivität supprimiert, aber sowohl Östrogene als auch Androgene stimulieren die Differenzierung in regulatorische T-Zellen (Klein und Flanagan 2016). Über ER $\alpha$  fördern Östrogene regulatorische T-Helferzellen in ihrer Proliferation, indem sie diese zur Produktion von unter anderem FoxP3 anregen, wodurch eine gemäßigtere Immunantwort bewirkt wird (Polanczyk et al. 2005; Tai et al. 2007). Eine Modulation der Stimulation regulatorischer T-Helferzellen über FoxP3 konnte auch für Testosteron gezeigt werden (Walecki et al. 2015).

Für *B-Zellen* sind Östrogenwirkungen auf Zelldifferenzierung (unter anderem über den GM-CSF-Signalweg), -aktivität und -funktion beschrieben (Verthelyi und Ahmed 1998; Carreras et al. 2008; Kincade et al. 2000). ER $\alpha$  scheint eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität zu spielen, ER $\beta$  wird hierbei hingegen als eher nachrangig eingeordnet (Hill et al. 2011). Unter Östrogeneinfluss zeigen B-Zellen nämlich eine gesteigerte Immunglobulinsynthese und Zellaktivität, die mit einer stärkeren Antikörper-vermittelten Immunabwehr einhergeht (Klein und Flanagan 2016). Entsprechend sind die Zahlen der Antikörper-sezernierenden Zellen und die Antikörperlevel kurz vor der Ovulation am höchsten (Lü et al. 2002). Östrogene können in B-Zellen auch einen Klassenwechsel der Immunglobulinsynthese induzieren (Pauklin et al. 2009). Androgene üben dagegen bei B-Zellen einen negativen Einfluss auf Differenzierung, Proliferation und Antikörperproduktion aus, passend hierzu zeigen kastrierte und ARKO-Mäuse eine gesteigerte Lymphopoese und niedrigere B-Zell-Apoptoserate (Altuwajri et al. 2009; Fitzpatrick et al. 1991). Hierdurch entsteht vermutlich ein höherer Anteil autoreaktiver B-Zellen, entsprechend weisen ARKO-Mäuse beispielsweise mehr anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper auf (Altuwajri et al. 2009). Männer mit systemischem Lupus erythematoses und zugleich vorliegendem Hypogonadismus konnten – vermutlich aufgrund dieses Pathomechanismus – erfolgreich durch eine Androgensubstitution therapiert werden (Lai et al. 2012; Olsen und Kovacs 1995).

### **1.5.2 Bedeutung der Sexualhormone für den Immundimorphismus**

Eine immunmodulierende Wirkung von Androgenen und Östrogenen ist, wie in den vorangehenden Abschnitten dargestellt, hinreichend belegt. Zusammen mit genetischen Faktoren (z. B. auf dem X-Chromosom lokalisierte immunrelevante Gene, wie FoxP3 und TLR7), mikrobiellen und epigenetischen Faktoren führen die immunmodulierenden Wirkungen der Sexualhormone zum Phänomen des Immundimorphismus (Jaillon, Berthenet, und Garlanda 2019). Artenübergreifend unterscheiden sich männliche und weibliche Exemplare einer Spezies in ihren Immunantworten bei infektiösen und auto-immunen inflammatorischen Erkrankungen (S. Klein und Flanagan 2016). Gegenüber Männern weisen Frauen eine stärker ausgeprägte zelluläre und humorale Immunreaktion auf. Sie zeigen durch eine höhere Anzahl und Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen (Weinstein, Ran, und Segal 1984; Gubbels Bupp 2015), eine stärker ausgeprägte Phagozytose- und Zellyse-Kapazität der Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen (Spitzer 1999; Abdullah et al. 2012), und durch höhere

Interferonspiegel und TLR-Expression eine aggressivere zelluläre Immunantwort als Männer (Laffont et al. 2014; Griesbeck et al. 2015). Zudem zeigt der weibliche Organismus höhere Antikörperlevel bei größerer B-Zellaktivität (Butterworth, McClellan, und Allansmith 1967), ein größeres  $CD4^+/CD8^+$  Verhältnis und eine höhere Anzahl aktivierter T-Zellen, insbesondere pro-inflammatorischer Th1-Helferzellen (S. Klein und Flanagan 2016).

Diese Immunitätsunterschiede sind im adulten Immunsystem ausgeprägter als im unreifen (Kelly et al. 2018) und ergeben relevante Unterschiede in der Prävalenz und Inzidenz von Infektions-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen zwischen den Geschlechtern: (a) Infektionserkrankungen (viral, bakteriell, parasitär oder durch Pilze bedingt) sind bei Männern häufiger und in ihrem Verlauf schwerwiegender (vom Steeg und Klein 2016), wohingegen Impfungen (Masern, humane Papillomaviren, Hepatitis B, Influenza) bei Frauen zu besseren Impftitern als bei Männern führen (Hannah, Bajic, und Klein 2008; Giefing-Kröll et al. 2015); (b) Männer haben ein zweifach höheres Risiko als Frauen, an einem Tumorleiden zu versterben; in klinisch-immunologischen Tumorthherapie-Studien zeigen Frauen teils ein besseres Therapieansprechen nach Immunisierung mit Tumorantigenen (Capone et al. 2018); (c) Frauen zeigen dagegen durch ihr aggressiveres Immunsystem eine erhöhte Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen (Airas 2015; Liva und Voskuhl 2001), so treten in den Vereinigten Staaten 80% der Autoimmunerkrankungen (wie Sjögren-Syndrom, systemischer Lupus erythematodes, Sklerodermie, Myasthenia gravis, rheumatoide Arthritis, Typ-1-Diabetes und multiple Sklerose) bei Frauen auf (Klein und Flanagan 2016).

Die immunmodulatorischen Effekte der Östrogene bei Autoimmunerkrankungen unterscheiden sich dabei teilweise deutlich, unter anderem in Abhängigkeit vom führenden Pathomechanismus: (a) Bei der multiplen Sklerose, welche klassischerweise als führend *T-Zell-vermittelte* Autoimmunerkrankung betrachtet wird, führen autoreaktive  $CD4^+$  T-Zellen im zentralen Nervensystem zu einem Neuronenuntergang (Harbo, Gold, und Tintoré 2013). Zwar sind Frauen häufiger betroffen, Östrogene reduzieren jedoch  $ER\alpha$ -vermittelt pro-inflammatorische Zytokine wie  $TNF\alpha$  und zeigen sich so neuroprotektiv (Bove et al. 2012; Spence et al. 2013); der Krankheitsverlauf der multiplen Sklerose zeigt sich beim Mann entsprechend häufig wesentlich schwerwiegender als bei der Frau (Kovats 2015). Eine Östrogensubstitution führte im Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis zu einem gesteigerten Anteil an regulatorischen T-Helferzellen und induzierte in autoreaktiven T-Zelltypen die Apoptose

(Pettersson et al. 2004), sodass die Autoimmunreaktion abgeschwächt wurde. (b) Der systemische Lupus erythematoses ist eine *B-Zell-vermittelte* Autoimmunerkrankung (Khan und Ansar 2016), welche ebenfalls deutlicher häufiger bei Frauen auftritt (Yacoub 2004). Östrogene gelten beim systemischen Lupus erythematoses im Gegensatz zur multiplen Sklerose als schädlich (Straub 2007), was unter anderem auf eine ER $\alpha$ -vermittelte B-Zellaktivierung (Feng et al. 2010) und eine erhöhte humorale Zellantwort zurückgeführt wurde (Kanda und Tamaki 1999).

Im Tiermodell der EAO zeigen sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen führend bei der Induktion der Entzündungsreaktion (Mahi-Brown, Yule, und Tung 1987), in der inflammatorischen Phase bestehen ein erhöhtes CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Verhältnis und eine erhöhte Zytokinexpression (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) (Guazzone et al. 2009; Nicolas, Michel, et al. 2017). B-Zellen wurden ebenfalls nachgewiesen und spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktion, nicht jedoch in ihrer Initiierung (Fijak et al. 2018). Es bleibt zu klären, ob Östrogene und Androgene eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Autoimmunreaktion der EAO einnehmen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, zeigen Androgene und Östrogene eine immunmodulatorische Wirkung im Krankheitsverlauf der EAO. Insbesondere könnte Testosteron eine protektive Wirkung auf den EAO Krankheitsverlauf haben, denn eine Substitution der bei EAO reduzierten systemischen Konzentrationen von Testosteron scheint den Erkrankungsverlauf zu inhibieren. Bislang ist jedoch ungeklärt, weshalb bei EAO die *systemischen* Testosteron-Konzentrationen reduziert sind, während die *lokalen* Testosteron-Konzentrationen und die lokale Testosteronproduktion im Hodengewebe regelrecht sind. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Testosteron im Rahmen der EAO einer vermehrten Konversion zu Östrogenen unterworfen ist. Eine derartige vermehrte Konversion von Testosteron zu Östrogenen bei EAO sollte insbesondere mit messbaren Veränderungen der lokalen Expression der Androgen- und Östrogenrezeptoren sowie der an der Testosteronkonversion beteiligten Enzyme verbunden sein. Deshalb werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Veränderungen der Expression von Androgen-, Östrogen- und LH-Rezeptoren sowie des Enzyms ARO bei EAO anhand des Modellsystems der EAO der Ratte untersucht, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die erhobenen Expressionsniveaus werden mit Hinblick auf Androgen- und Östrogenregulation in der Pathogenese der EAO diskutiert.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

| Art                                                | Hersteller                            |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Aceton reinst                                      | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Agarose                                            | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland    |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                           | AppliChem, Darmstadt, Deutschland     |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                            | Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| Ethanol                                            | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Glycerin                                           | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Isofluran                                          | Baxter, Unterschleißheim, Deutschland |
| Isopropanol                                        | Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| Magnesiumchlorid                                   | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Methanol                                           | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Natriumchlorid                                     | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Kaliumchlorid                                      | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Osmiumtetroxid (O.C.T.) 99%                        | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Paraformaldehyd                                    | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Triton X-100                                       | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Tween-20® = Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat | Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| Vectashield Trägermedium mit DAPI                  | Vector, Burlingame, USA               |
| Xylencyanol FF                                     | Sigma, Steinheim, Deutschland         |

#### 2.1.2 Reagenzien für die Polymerase-Kettenreaktion

| Art                                    | Hersteller                          |
|----------------------------------------|-------------------------------------|
| Ampuwa® RNase freies Wasser            | Fresenius, Bad Homburg, Deutschland |
| DNA Marker (100bp)                     | Promega, Mannheim, Deutschland      |
| DNase I®, RNase frei                   | Qiagen, Hilden, Deutschland         |
| DNA Probenpuffer, 10x                  | Promega, Mannheim, Deutschland      |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) | Promega, Mannheim, Deutschland      |
| Ethidiumbromid                         | Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Magnesiumchloridlösung                 | Promega, Mannheim, Deutschland      |

|                                                                |                                |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Oligo dT Primer                                                | Promega, Mannheim, Deutschland |
| QuantiTect SYBR® Green PCR Kit                                 | Qiagen, Hilden, Deutschland    |
| RNase Inhibitor                                                | Promega, Mannheim, Deutschland |
| RNasin                                                         | Promega, Mannheim, Deutschland |
| RNase-freies H <sub>2</sub> O                                  | Promega, Mannheim, Deutschland |
| RQ1® RNase-freie DNase                                         | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Taq® DNA Polymerase                                            | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Taq® DNA Polymerase 10x Puffer                                 | Promega, Mannheim, Deutschland |

### 2.1.3 Kits

| Art                                      | Hersteller                    |
|------------------------------------------|-------------------------------|
| RNase-freies DNase Set                   | Qiagen, Hilden, Deutschland   |
| RNeasy® Mini Kit                         | Qiagen, Hilden, Deutschland   |
| RT2 SYBR® Green qRT-PCR Mastermix        | Qiagen, Hilden, Deutschland   |
| PeqGold® Cycle Pure Kit                  | PeqLab, Erlagen, Deutschland  |
| Serumfreier Maus-auf-Ratte-Detektionskit | Dianova, Hamburg, Deutschland |

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

| PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) | 10x (pH = 7,4)                       |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 80 g                                | NaCl                                 |
| 2 g                                 | KCl                                  |
| 14,2 g                              | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     |
| 2,4 g                               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
|                                     | Aqua dest. bis auf 1000 ml auffüllen |
| Paraformaldehyd 4% (PFA) (w/v)      |                                      |
| 4 g                                 | PFA                                  |
| 100 ml                              | PBS                                  |
| 1 ml                                | NaOH                                 |
| Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) 50x   |                                      |
| 242 g                               | Tris                                 |
| 57,1 ml                             | Essigsäure                           |
| 100 ml                              | 0,5 M EDTA (pH = 8)                  |
|                                     | Aqua dest.                           |

|                                |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|
| <b>6x DNA Probenpuffer</b>     |                             |
| 30% v/v                        | Glycerol                    |
| 0,25% w/v                      | Xylencyanol FF              |
|                                | Aqua dest.                  |
| <b>Triton X-100 0,5% (v/v)</b> |                             |
| 25 µl                          | Triton                      |
| 50 ml                          | PBS                         |
| <b>100 bp DNA-Marker</b>       |                             |
| 5 µl                           | 100 bp DNA Marker (Promega) |
| 1,6 µl                         | 6x DNA-Probenpuffer         |
| 3,4 µl                         | Aqua dest.                  |

### 2.1.5 Geräte, Equipment und Software

| <b>Art</b>                              | <b>Hersteller</b>                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| DAKO Limitierungsstift                  | Dako, Hamburg, Deutschland              |
| Deckgläser (24 x 60 mm)                 | Langenbrinck, Teningen, Deutschland     |
| E143 Power Supply                       | Consort nv, Turnhout, Belgien           |
| E831 Power Supply                       | Consort nv, Turnhout, Belgien           |
| Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging | Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland      |
| Gelelektrophoresezubehör                | PeqLab, Erlangen, Deutschland           |
| Gel Jet Imager, Intas GDS Software 3.28 | INTAS, Göttingen, Deutschland           |
| GraphPad Prism 7                        | GraphPad Software, La Jolla, USA        |
| Heizblock DB-2A                         | Techne, Cambridge, UK                   |
| Laborzentrifuge 400R                    | Heraeus, Hanau, Deutschland             |
| Magnetrührer 3001 K                     | Heidolph Instruments, Schwabach         |
| Microtommesser                          | Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland |
| MIKROM HM560 Cryo-Star Kryostat         | Microm, Walldorf, Deutschland           |
| Mikrowelle                              | Samsung, Schwalbach, Deutschland        |
| Mini-Rocker Shaker MR-1                 | PeqLab, Erlangen, Deutschland           |
| Minishaker/Vortexer MS 2                | IKA, Staufen, Deutschland               |
| Minizentrifuge Galaxy                   | VWR International                       |
| Mixer Mill® MM3000                      | Retsch, Haan, Deutschland               |
| NanoDrop® ND 2000                       | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA  |
| Objektträger (25 x 75 x 1mm)            | Langenbrinck, Teningen, Deutschland     |
| PCR Thermozykler                        | Biozyme, Oldendorf, Deutschland         |

|                                         |                                    |
|-----------------------------------------|------------------------------------|
| PCR Maschine Primus 96                  | PeqLab, Erlangen, Deutschland      |
| Precellys-Stahl-Kit® 2,8mm, Stahlkugeln | PeqLab, Erlangen, Deutschland      |
| qPCR BioRad iCycler iQ5                 | BioRad, München, Deutschland       |
| RCT basic Magnetprüher                  | IKA, Staufen, Deutschland          |
| Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes         | Eppendorf, Hamburg, Deutschland    |
| Research plus Pipetten                  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland    |
| SPB 53 Waage                            | Scaltec, Göttingen, Deutschland    |
| Tischzentrifuge Biofuge Fresco®         | Heraeus, Hanau, Deutschland        |
| Gel-Dokumentationssystem                | INTAS, Göttingen, Deutschland      |
| Zeiss Axio Vision Software 4.7.1        | Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland |

## 2.1.6 Reagenzien und Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

**Tab. 1. Antikörper, IgG-Kontrollen und Blockierungslösungen der IF-Färbungen**

| Primärantikörper                           | Katalog-nummer | Dilution | Blockierung                       | Hersteller/Referenz                                     |
|--------------------------------------------|----------------|----------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| polyklonal, Kaninchen anti-AR, IgG         | sc-816         | 1:700    | 5% BSA (v/v)                      | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| monoklonal, Maus anti-ER, IgG              | NCL-L-ER-6F11  | 1:100    | serumfreier Blocker               | Novocastra, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland     |
| polyklonal, Huhn anti-ERβ, IgG             | ERβ 503        | 1:200    | 5% BSA und 10% (v/v) Ziegen Serum | Fietz et al. 2014                                       |
| polyklonal, Kaninchen anti-ARO, IgG        | ab18995        | 1:300    | 5% BSA und 10% (v/v) Ziegen Serum | Abcam, Cambridge, UK                                    |
| polyklonal, Kaninchen anti-CYP 450scc, IgG | ab1244         | 1:500    | serumfreier Blocker               | CHEMICON, Temecula, USA                                 |
| polyklonal, Ziege anti-Vimentin, IgG       | sc-7557        | 1:100    | serumfreier Blocker               | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |

| Sekundärantikörper                         | Katalognummer | Verdünnung | Hersteller                    |
|--------------------------------------------|---------------|------------|-------------------------------|
| anti-Maus IgG, FITC                        | MF11-S        | 1:500      | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| polyklonal, Esel anti-Kaninchen, IgG, Cy3  | AP182C        | 1:1000     | Chemicon, Hampshire, UK       |
| polyklonal, Ziege anti-Huhn, IgG, Cy3      | 703-165-155   | 1:500      | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| polyklonal, Ziege anti-Kaninchen, IgG, Cy5 | A-11078       | 1:500      | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| Esel anti-Ziege, IgG, Cy3                  | AP180C        | 1:1000     | Merck Chemicals GmbH          |

| <b>IgG-Kontrollen</b> | <b>Katalognummer</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b>                                       |
|-----------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
| Maus IgG              | sc-2025              | 1:100             | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| Kaninchen IgG         | sc-2027              | 1:300             | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| Huhn IgG              | sc-2718              | 1:100             | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| Blockierungspeptid    | sc-816 P             | 1:100             | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |

| <b>Blockierungslösung</b> | <b>Katalognummer</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b>                  |
|---------------------------|----------------------|-------------------|------------------------------------|
| Ziegerserum               | X0907                | 10% in PBS (v/v)  | Dako, Hamburg, Deutschland         |
| Rinderserumalbumin (BSA)  | 15561020             | 5% in PBS (v/v)   | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| serumfreier Blocker       | MF11-S               | unverdünnt        | Dianova, Hamburg, Deutschland      |

### 2.1.7 Primer

**Tab. 2. Primerpaare der Standard-PCR und qRT-PCR**

| <b>Gen</b>     | <b>Primer-Bezeichnung/-Sequenz<br/>5' – 3'</b>               | <b>Annealing<br/>Tempera-<br/>tur</b> | <b>GenBank<br/>Accession No.</b> | <b>Produkt-<br/>länge</b> |
|----------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 18S rRNA       | Rn_Rnr1_1_SG QuantiTect Primer Assay                         | 55,0 °C                               | M11188                           | 103 bp                    |
| AR             | Rn_AR_2_SG QuantiTect Primer Assay                           | 55,0 °C                               | NM_012502                        | 135 bp                    |
| ER $\alpha$    | Rn_Esr1_1_SG QuantiTect Primer Assay                         | 60,0 °C                               | NM_012689                        | 83 bp                     |
| ER $\beta$     | Rn_Esr2_1_SG QuantiTect Primer Assay                         | 55,0 °C                               | NM_012754                        | 119 bp                    |
| ARO            | f: CGTCATGTTGCTTCTCATCG<br>r: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT           | 55,0 °C                               | M33986                           | 150 bp                    |
| $\beta$ -Aktin | f: ATGGTGGGTATGGGTCAGAA<br>r: GGGTCATCTTTTCACGGTTG           | 55,0 °C                               | NM_0031144.2                     | 232 bp                    |
| HPRT           | f: TCTGTCATGTCGACCCCTCAG<br>r: CCTTTTCCAAATCTTCAGCA          | 55,0 °C                               | NM_012583                        | 109 bp                    |
| LHR            | f: CTGCGCCTTCAGGAATTTGCC<br>r: ATCATAATCCCAGCCACTGAGTTCATTCT | 57,8 °C                               | NM_012978                        | 161 bp                    |
| SF-1           | f: TGTGCGTGCTGATCGAATG<br>r: GGCCCGAATCTGTGCTTTC             | 56,3 °C                               | NM_001191099                     | 100 bp                    |
| StAR           | f: CTGCTAGACCAGCCCATGGAC<br>r: TGATTTCCCTTGACATTTGGGTTCC     | 60,0 °C                               | NM_031558                        | 91 bp                     |

f: forward; r: reverse; bp: Basenpaare.

Dieser Primerauswahl waren Etablierungsversuche anderer Primer mit unzureichendem Amplifikationsnachweis mittels PCR und qRT-PCR vorausgegangen.

### **2.1.8 Versuchstiere**

Für das EAO Tiermodell wurden männliche Wistar-Kyoto Inzuchtratten (Charles River Laboratorien, Deutschland) mit 180-220 g Lebendgewicht eingesetzt. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (RP Gießen Az: GI 20/23 - Nr. 33/2008) und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie der EU-Richtlinien zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Experimentelles Design**

Die Auswirkungen der EAO auf die Östrogen- und Testosteron-Regulation wurden anhand des etablierten EAO Modells der Ratte untersucht (Doncel, Di Paola, und Lustig 1989; Fijak et al. 2005). Hierzu wurden drei experimentelle Bedingungen verglichen: (1) Bei Ratten wurde eine EAO durch Immunisierung mit syngenen Hodenhomogenat und Applikation von Adjuvantien induziert. Als Kontrollbedingungen dienten (2) gleichaltrige Adjuvans-Ratten, bei denen die gleichen Adjuvantien, jedoch kein Hodenhomogenat appliziert wurde, und (3) gleichaltrige unbehandelte Ratten, bei denen weder Hodenhomogenat noch Adjuvantien appliziert wurden.

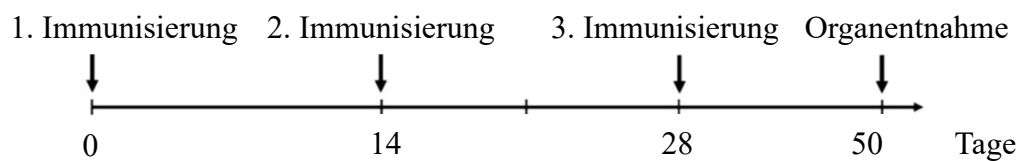
### **2.2.2 Induktion der experimentellen Autoimmun-Orchitis**

Zur Induktion der EAO wurden männliche Wistar-Kyoto Ratten mit syngenen Hodenhomogenat immunisiert (Fijak et al. 2011). Das Hodenhomogenat wurde gewonnen, indem die Hoden dekapsuliert und bei 4 °C 1:1 mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl) homogenisiert wurden. Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Pharmacia, Deutschland) und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Bayer, Deutschland) im Alter von 10 Wochen anästhesiert.

Die Immunisierung erfolgte dreimal im Abstand von jeweils 14 Tagen mit 0,4 ml Hodenhomogenat subkutan, das zuvor mit dem kompletten Freund-Adjuvans (CFA, Sigma-Aldrich, USA) 1:1 versetzt worden war (Aslani et al. 2015; Fijak et al. 2011). Zur Intensivierung der Immunreaktion wurden bei den ersten beiden Immunisierungen begleitend  $10^{10}$  inaktivierte *Bordetella pertussis* Bakterien (DSM strain 4952, Deutschland) in die Schwanzvene injiziert, bei der dritten Immunisierung wurden zum gleichen

Zweck  $5 \times 10^9$  inaktivierte *Bordetella pertussis* intraperitoneal appliziert (Fijak et al. 2005).

Die Adjuvans-Ratten erhielten anstelle des Hodenhomogenats lediglich NaCl in Freund-Adjuvans Lösung injiziert. Die unbehandelten Ratten erhielten keinerlei Substanzapplikation. Alle Ratten wurden 50 bis 80 Tage nach Beginn des Experiments getötet. Die entnommenen Hoden wurden gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Aslani et al. 2015; Fijak et al. 2011; 2005). Der zeitliche Ablauf ist in Abb. 7 zusammengefasst:



**Abb. 7. EAO-Induktionsschema**

Nach der dreimaligen Immunisierung im Abstand von je 14 Tagen wurden die Organe nach 50 bis 80 Tagen entnommen.

### 2.2.3 Gewebeentnahme

Nach Euthanasie mittels Isofluran wurden der Bauch- und Geschlechtsbereich desinfiziert und mit sterilem Sezierbesteck die Bauchhöhle geöffnet. Beide Hoden wurden kranial aus dem Skrotum gezogen und Fettgewebe entfernt. Das Probenmaterial wurde in Isopentan eingelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich entweder für Gefrierschnitte und RNA-Isolierung sofort weiterverwendet oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

### 2.2.4 Gewebeschnitte und Immunfluoreszenz

Zur Detektion von AR, ER und der ARO in den Rattenhoden wurden Immunfluoreszenzfärbungen (IF) der Gefrierschnitte durchgeführt. Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Rattenhoden wurden hierfür in  $8\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten, die Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen und luftgetrocknet. Die Fixierung erfolgte je über 10 min für die Rezeptorfärbungen von AR und ER mit 100%igem Isopropanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , für die ARO-Färbung mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA). Die anschließende Permeabilisierung wurde mit 0,5%igem Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal je 5 min in PBS mit 0,05% Tween20 gewaschen.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für den AR-Antikörper (sc-816) mit 5% BSA. Für den ER $\alpha$ -Antikörper (NCL-L-ER-6F11) und dessen Doppelfärbungen mit den Antikörpern gegen CYP 450 (ab1244) und Vimentin (sc-7557) wurde serumfreier Blocker (Dianova, Deutschland) verwendet. Bei den Antikörpern gegen ER $\beta$  (ER $\beta$  503) und ARO (ab18995) erfolgte die Blockierung mit einer Kombination aus 5% BSA und 10% Ziegen Serum. Die Blockierungslösungen wurden jeweils für 1 h bei RT aufgebracht (siehe auch Tab. 1).

Anschließend wurde der Primärantikörper in PBS (ER $\alpha$ ), in 2,5% BSA (AR) oder in 1% Ziegen Serum (ER $\beta$ , ARO) auf die Gewebeschnitte pipettiert und bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden am nächsten Tag dreimal mit PBS mit 0,05% Tween20 gewaschen und 1 h mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Färbung nach dem letzten Waschvorgang mit Vectashield Mounting Medium (Vector, USA) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Bei jeder Färbung erfolgte pro Objektträger die mindestens zweifache Untersuchung von je drei Gewebsschnitten je Ratte, wobei mindestens drei Tiere je experimenteller Bedingung herangezogen und gegen- und miteinander verglichen wurden.

Als Kontrolle erfolgte routinemäßig eine Negativkontrolle, in der lediglich der Sekundärantikörper aufgetragen wurde, zusätzlich wurden anstelle des Primärantikörpers jeweils unspezifische IgG-Kontrollen verwendet, um Kreuzreaktionen zwischen Gewebe und Erstantikörper auszuschließen. Für den AR erfolgte als weitere Negativkontrolle eine Peptidneutralisation. Hierfür wurde der AR-Primärantikörper vor Durchführung der IF mit der siebenfachen Stoffmenge eines Peptids, das dem Bindungs epitop des Primärantikörpers entspricht, über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurde die IF nach obigem Protokoll parallel einmal für AR und einmal mit der AR-Peptid-Lösung durchgeführt, anschließend wurden die Färbungen verglichen. Diejenigen positiven Signale, die in der AR-Färbung vorhanden waren, aber in der AR-Peptid-Färbung fehlten, wurden als spezifisch gewertet. Bei stark ausgeprägten Färbungen erfolgte zum Ausschluss gewebeeigener Fluoreszenz zudem eine Autofluoreszenz-Kontrolle, bei der die Probe mit keinem Antikörper, sondern nur mit der DAPI-Kernfärbung versetzt wurde.

### **2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Dokumentation und qualitative Auswertung der Färbungen erfolgte mittels Mikroskopie und Fotodokumentation (Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2, Zeiss, Deutschland, mit installierter Zeiss Axio Vision Software 4.8).

### **2.2.6 RNA-Isolierung**

RNA-Isolierungen wurden unter sterilen Bedingungen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Für die Gewebelyse wurden 20-30 mg Rattenhodengewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit zwei bis drei Stahlkugeln (Precellys-Stahl-Kit 2,8mm, PeqLab, Deutschland) und RLT Lysispuffer (350 µl bis 20 mg bzw. 600 µl für 20-30 mg Hodengewebe), der zuvor mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt worden war, in der Kugelmühle (Mixer Mill 3000, Retsch, Deutschland) für 2 min bei 3000 rpm homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit 70% Ethanol gemischt. Diese Lösung wurde auf eine RNeasy Mini Spin Säule transferiert, 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Daraufhin wurden 350 µl RW1 Waschpuffer auf die RNeasy Säule gegeben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Für den Verdau genomischer DNA wurden 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase I (Qiagen, Deutschland) auf die Membran gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde erst mit 350 µl RW1 Waschpuffer und anschließend zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und dazwischen jeweils 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert.

Die RNA wurde in 30-50 µl RNase-freiem Wasser (70 °C) gelöst, das etwa 10 min auf der Säule inkubierte, und im Anschluss 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Nach der spektrophotometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

### **2.2.7 Messung der RNA-Konzentration**

Um die Konzentration der gewonnenen RNA zu ermitteln, wurde eine spektrophotometrische Messung von 1 µl der isolierten RNA mittels NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Die Qualität der RNA wurde mittels des Extinktions-Absorptionsverhältnisses bei 260 nm versus 280 nm ermittelt. Verunreinig-

ungen wie Proteine und Phenole absorbieren stark bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden nur Proben mit 260/280-Verhältnissen von 1,8-2,1 herangezogen.

### 2.2.8 RNA-Aufbereitung

Falls anhand einer Kontroll-Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit  $\beta$ -Aktin, welches ein ubiquitär exprimiertes Zytoskelettprotein darstellt, Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA detektiert wurden, erfolgte eine Aufbereitung mittels zusätzlichem DNase-Verdau. Hierfür wurden je 4  $\mu$ g RNA mit 1  $\mu$ l RQ1 RNase-freiem DNase 10x Reaktionspuffer (Promega, Deutschland) und 4 U RNA RQ1 RNase-freier DNase (Promega, Deutschland) zusammengegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entsprechend Tab. 3 mit Nuklease-freiem Wasser zu einem Volumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNase wurde durch die Zugabe von 1  $\mu$ l RQ1 DNase Stop Solution und einer zehnminütigen Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

**Tab. 3. Reaktionsansatz für den Verdau der genomischen DNA**

| Reagenzien für DNase-Verdau               | Volumen                 |
|-------------------------------------------|-------------------------|
| RNA                                       | 4 $\mu$ g (1-8 $\mu$ l) |
| RQ1 RNase-freie DNase 10x Reaktionspuffer | 1 $\mu$ l               |
| RQ1 RNase-freie DNase                     | 4 U                     |
| RNase-freies Wasser ad                    | 10 $\mu$ l              |

Anschließend wurden die Proben auf Eis gegeben und mit dem PeqGold Cycle Pure Kit (PeqLab, Deutschland) dem Herstellerprotokoll folgend aufgereinigt. Dafür wurden 100  $\mu$ l MCP Buffer zu 10  $\mu$ l PCR-Ansatz gegeben. Die Lösung wurde auf die PerfectBind MicroSpin DNA Säule pipettiert und 2 min bei 8000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen, die RNA mit 20  $\mu$ l DNA/RNA Elutionspuffer eluiert und 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert.

### 2.2.9 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde durch die Maus Moloney-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 1,5  $\mu$ g RNA und 1,5  $\mu$ l Oligo dT Primer zusammen mit RNase-freiem Wasser zu Endvolumina von 24  $\mu$ l auf Eis zusammengegeben. Der RNA-Mix wurde

anschließend 10 min lang bei 70 °C zur Denaturierung prä-inkubiert und anschließend wiederum auf Eis gegeben.

Währenddessen wurde der RT-PCR-Mix vorbereitet, bestehend aus 8 µl RT Puffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl RNasin und 5 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O, der zusammen mit dem RNA-Ansatz von 24 µl ein Endvolumen von 40 µl ergab (Tab. 4).

**Tab. 4. Reverse Transkription Master Mix**

| <b>Material</b>               | <b>Volumen</b> |
|-------------------------------|----------------|
| RT Puffer 5x                  | 8 µl           |
| dNTP 10mM                     | 2 µl           |
| RNasin                        | 1 µl           |
| RNase-freies H <sub>2</sub> O | 5 µl           |
| Endvolumen                    | 16 µl          |

Der RNA-Mix wurde für 2 min auf 42 °C vorgewärmt und mit dem jeweiligen RT-PCR-Ansatz zusammenpipettiert. Dem 40 µl-Ansatz wurde schließlich 1 µl M-MLV RT zugegeben und anschließend die RNA 1 h 15 min bei 42 °C zur cDNA transkribiert. Die Reaktion wurde durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 70 °C beendet. Die erfolgreiche Generierung der cDNA wurde anhand einer positiven PCR-Amplifikation für β-Aktin bestätigt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt. Tab. 5 fasst den Reaktionsablauf zusammen.

**Tab. 5. Ablauf der RT-PCR**

| <b>Ziel</b>                                                                 | <b>Temperatur</b> | <b>Zeit</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|
| RNA Denaturierung                                                           | 70 °C             | 10 min      |
| Für die Zugabe des RT-PCR Mastermix wurden die RNA-Proben auf Eis gelagert. |                   |             |
| Reverse Transkription                                                       | 42 °C             | 75 min      |
| Enzyminaktivierung                                                          | 72 °C             | 15 min      |

### **2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäuren durch das Enzym DNA-Polymerase gemeinsam mit ausgewählten Primern, die sich an komplementäre Stellen des DNA-Strangs anlagern.

Um die spezifischen DNA-Sequenzen von AR, ERα, ERβ, ARO, LHR, SF-1 und StAR zu vervielfältigen, erfolgte eine PCR mit jeweils spezifischen Oligonukleotid-Primern (Tab. 2). Die cDNA-Probe wurde mit dem PCR Master Mix zusammenpipettiert, der sich

aus Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), Polymerase und destilliertem Wasser zusammensetzt (Tab. 6), und in einer PCR-Maschine amplifiziert (Tab. 7).

**Tab. 6. Mastermix PCR**

| Material                  | Volumen      |
|---------------------------|--------------|
| cDNA Probe                | 1 µl         |
| GoTaq® 5x Reaktionspuffer | 5 µl         |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM   | 2 µl         |
| dNTPs 10 mM               | 0,5 µl       |
| Primer 3' 5 pmol          | 0,5 µl       |
| Primer 5' 5 pmol          | 0,5 µl       |
| GoTaq® Polymerase         | 0,25 µl      |
| Aqua dest.                | 15,25 µl     |
| <b>Total</b>              | <b>25 µl</b> |

**Tab. 7. Programme des PCR Thermozyklers**

| Programm                                      | β-Aktin<br>18S rRNA<br>HPRT | SF-1    | ERα<br>StAR | LHR     | AR<br>ARO<br>ERβ | Zyklusanzahl                |        |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|---------|-------------|---------|------------------|-----------------------------|--------|
|                                               |                             |         |             |         |                  | β-Aktin<br>18S rRNA<br>HPRT | andere |
| initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min    |                             |         |             |         |                  |                             |        |
| Denaturierung                                 | 95 °C für 15 sec            |         |             |         |                  | } 25                        | } 35   |
| Hybridisierung<br>für 20 sec                  | 55,0 °C                     | 56,3 °C | 60,0 °C     | 57,8 °C | 55,0 °C          |                             |        |
| Elongation                                    | 72 °C für 1 min             |         |             |         |                  |                             |        |
| abschließende Elongation bei 72 °C für 10 min |                             |         |             |         |                  |                             |        |
| Lagerungstemperatur bis Entnahme von 10 °C    |                             |         |             |         |                  |                             |        |

### 2.2.11 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die durch die PCR hergestellten Amplifikationsprodukte ihrer Größe nach aufgetrennt und beurteilt. Zur Herstellung des Gels wurde eine abgemessene Menge an Agarose hierfür in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gegeben und mittels wiederholtem Aufkochen für 1 min in der Mikrowelle bei 500 W gelöst. Dabei wurden je nach Produktgröße des Amplikons Gel-Konzentrationen zwischen 1,2-1,5% mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:6 zusammen mit 6x DNA Probenpuffer in einer Gesamtmenge von 25 µl in die Geltaschen aufgetragen. Abhängig von der Amplikongröße wurden entweder 100 bp oder 1 kb Größenmarker (Promega, Deutschland) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei

einer Spannung von 100-130 V separiert. Die Banden der Produkte wurden mittels eines Geldokumentationssystems fotografiert und gespeichert.

#### **2.2.12 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Das Verfahren der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) erlaubt, wie das übliche PCR-Verfahren, die Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes, darüber hinaus jedoch auch eine quantitative Aussage über dessen Expression in den zu untersuchenden Gewebe- oder Zellarten. Indem die vervielfältigten DNA-Produkte durch fluoreszierende Farbstoffe, wie z. B. SYBR Green, markiert werden, kann ihre Expression durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden. Anhand der Genexpression von house keeping genes (HKGs) können diese Expressionsdaten normalisiert werden (Pfaffl und Riedmaier 2011). Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit in den drei experimentellen Bedingungen die HKGs Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und 18S ribosomale RNA (rRNA) eingesetzt, sowie SF-1 und StAR als Schlüsselenzyme der Steroidogenese zur Abschätzung der Leydig-Zellfunktion herangezogen. Für die Primer ARO, ER $\alpha$  und AR (siehe Tab. 2) wurde die Amplifikationseffizienz ermittelt. Hierbei ergab sich eine qRT-PCR-Effizienz von 96% für ER $\alpha$ , 93% für AR und 117% für ARO. Die qRT-PCR wurde unter der Einhaltung der MIQE Guidelines mit dem SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Deutschland), dessen Zusammensetzungen in Tabellen 8 und 9 abgebildet sind, in Kombination mit dem iCycler iQ5 (BioRad, Deutschland) durchgeführt (Bustin et al. 2009; Pfaffl und Riedmaier 2011). Tabelle 10 stellt die qRT-PCR-Zyklus-Programmierung dar.

**Tab. 8. qRT-PCR Mastermix zur Quantifikation von HPRT, LHR, StAR, SF-1, ARO**

| Reagenzien           | Volumen      |
|----------------------|--------------|
| cDNA                 | 1 µl         |
| SYBR Green Mastermix | 12,5 µl      |
| Forward Primer       | 0,5 µl       |
| Reverse Primer       | 0,5 µl       |
| Aqua dest.           | 10,5 µl      |
| <b>Total</b>         | <b>25 µl</b> |

**Tab. 9. qRT-PCR Mastermix zur Quantifikation von 18S rRNA, AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$**

| Reagenzien            | Volumen      |
|-----------------------|--------------|
| cDNA                  | 1 µl         |
| SYBR Green Mastermix  | 12,5 µl      |
| 10x QuantiTect Primer | 2,5 µl       |
| Aqua dest.            | 9 µl         |
| <b>Total</b>          | <b>25 µl</b> |

**Tab. 10. qRT-PCR-Zyklus-Einstellung für BioRad iCycler iQ5**

| Zyklen | Temperatur            | Ziel                   | Zeit   |
|--------|-----------------------|------------------------|--------|
| 1      | 95 °C                 | Initiale Denaturierung | 15 min |
| .      | 94 °C                 | Denaturierung          | 15 sec |
| 45     | 55–60 °C <sup>1</sup> | Anlagerung             | 30 sec |
| .      | 72 °C                 | Elongation             | 30 sec |

<sup>1</sup> für die primerspezifische Anlagerungstemperatur vergleiche Tab. 2

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte für jede cDNA-Probe als Duplikat, um einen Mittelwert für die Auswertung zu bilden und die Schmelzkurven vergleichen zu können. Zudem wurde bei jedem Durchlauf eine Negativkontrolle des Mastermix ohne Zugabe der cDNA verwendet, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die sogenannte  $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet (Pfaffl 2004). Da die exakte cDNA-Menge nicht bekannt ist, wird die Expression des Zielgens anhand der HKG Expression normalisiert. So können Varianzen der Expressionsunterschiede aufgrund von Gewebs- oder Matrixeffekten, unterschiedlichen RNA-Extraktionseffizienzen oder fehlerhaften Probenbehandlungen minimiert werden. Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen kommt es durch die Anreicherung der DNA-Kopien zu einem definierten Anstieg der Fluoreszenz; diese Zykluszahl nennt man threshold cycle (Ct).

Um die DNA-Anreicherung des Zielgens anhand der DNA-Anreicherung des Referenzgens zu normalisieren, wurde für jede Probe die Differenz des Ct-Werts des Zielgens und des Ct-Werts des Referenzgens gebildet (bei der Normalisierung mit HKGs wurde als Ct-Wert des Referenzgens der Mittelwert der Ct-Werte von 18S rRNA und HPRT verwendet):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HKG}}$$

Um die so normierte DNA-Anreicherung des Zielgens einer experimentellen Bedingung in Bezug zu einer Kontrollbedingung zu setzen, wurde die Differenz des experimentellen  $\Delta Ct$ -Werts ( $\Delta Ct_s$ ) und dem  $\Delta Ct$ -Wert der zugehörigen unbehandelten Kontrollgruppe ( $\Delta Ct_c$ ) gebildet.

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_s - \Delta Ct_c$$

Um schließlich den relativen Expressionsunterschied einer Probe zu berechnen, der auf das Referenzgen normalisiert und auf eine Kontrollgruppe bezogen wurde, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Relative Expression des Zielgens} = 2^{(-\Delta \Delta Ct)}$$

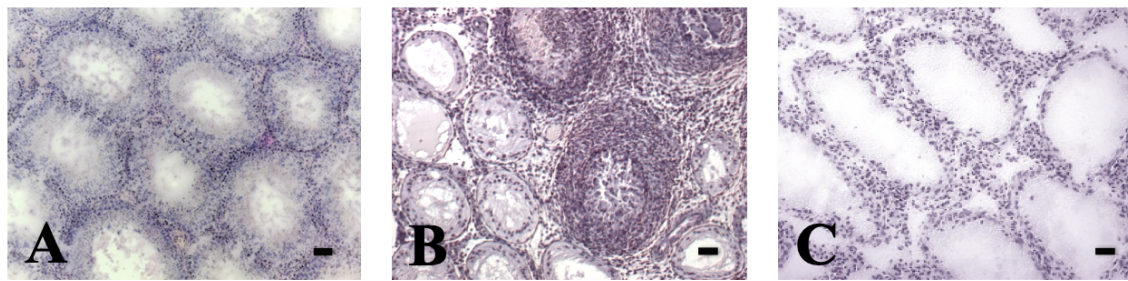
### 2.2.13 Statistische Analyse

Die Berechnungen und Auswertungen erfolgten in Microsoft Excel 2016. Die quantitativen Daten der Expressionsniveaus wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) und Tukey-korrigierten post hoc Tests auf Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen (EAO-Ratten, Adjuvans-Ratten und unbehandelte Ratten) getestet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Histopathologie des Rattenhodens nach EAO-Induktion

Die erfolgreiche Induktion der EAO bei denjenigen Versuchstieren, die dem EAO-Induktionsschema unterworfen wurden (EAO-Ratten), wurde histologisch anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen gesichert. Das Hodengewebe der EAO-Ratten zeigte eine interstitielle Leukozyteninvasion mit teilweiser granulomatöser Anordnung, eine Tubulusatrophie mit Keimzellverlust bis hin zum „Sertoli-Cell-only-Syndrom“ und eine Fibrosierung (Abb. 8), also typische Charakteristika einer EAO (Fijak et al. 2011). Hingegen fanden sich bei gleichaltrigen Kontrolltieren, also den unbehandelten Ratten und Adjuvans-Ratten, keine entzündlichen Veränderungen des Hodengewebes (Abb. 8).



**Abb. 8. Histopathologische Veränderungen in EAO-Rattenhoden**

Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Hodengewebes von unbehandelten Ratten (A) und EAO-Ratten (B, C). Das Hodengewebe der EAO-Ratten zeigt die typischen Charakteristika mit Leukozyteninvasion, Tubulusatrophie und Keimzellverlust (B), sowie im chronischen Stadium Fibrosierung (C). Skalierungsleiste: 5  $\mu$ m. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dres. Ferial Aslani und Monika Fijak zur Verfügung gestellt.

### **3.2 Immunfluoreszenzfärbungen für AR, ER und ARO im Hoden von EAO-, Adjuvans- und Kontrollratten**

Die Expression der Schlüsselproteine der Androgen- und Östrogenregulation im Hodengewebe (AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$  und ARO) in den drei experimentellen Bedingungen (EAO-Ratten, Adjuvans-Ratten, unbehandelte Ratten) wurde auf zwei Ebenen untersucht: In einem ersten Schritt wurde ihre *qualitative* Expression auf der Proteinebene mittels Immunfluoreszenz (IF) an Gewebeschnitten untersucht (Abschnitt 3.2), hierbei wurde unter anderem die histologische und zelluläre Lokalisation der Proteine beurteilt. In einem zweiten Schritt wurde die *quantitative* Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR beurteilt (Abschnitt 3.3), hierbei wurde auch die Expression weiterer Faktoren, wie LHR und die LZ-Marker StAR und SF-1, in die Analyse miteinbezogen.

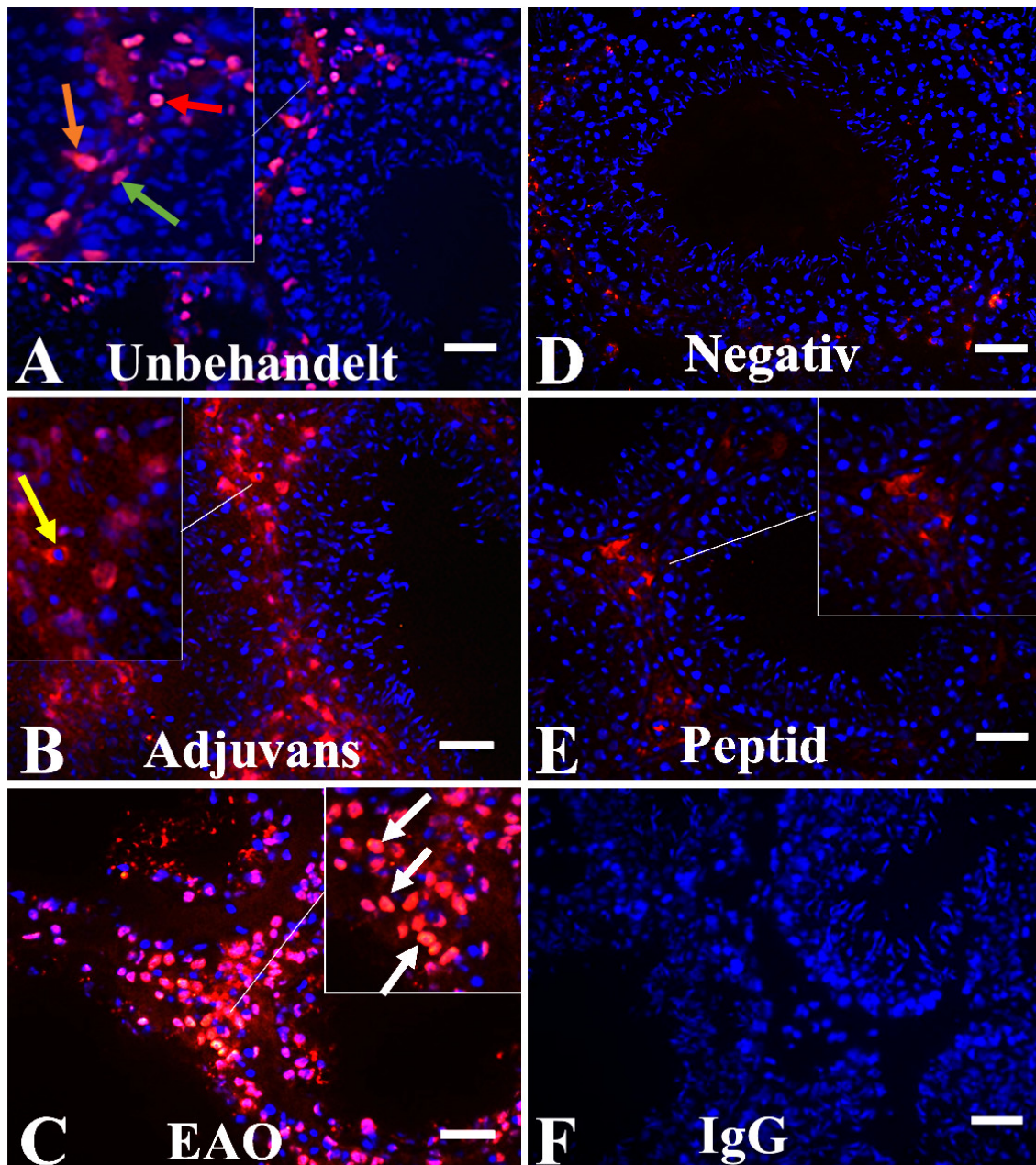
#### **3.2.1 Testikuläre AR-Expression**

##### **3.2.1.1 AR-Expression in SZ, LZ und PTZ**

Die initiale Sensitivitäts- und Spezifitätstestung des eingesetzten anti-AR-Primärantikörpers ergab ein AR-spezifisches Signal bei Färbung mit dem Primärantikörper (Abb. 9 A), jedoch nicht bei der Peptidkontrolle (Abb. 9 E), bei der IgG-Kontrolle (Abb. 9 F) und bei der Negativkontrolle (Abb. 9 D).

Mittels IF nachgewiesen wurde die Expression des AR bei unbehandelten Ratten in rundlichen Zellen des interstitiellen Kompartiments, in basal gelegenen Zellen des tubulären Kompartiments und in flachen, den Tubuli seminiferi anliegenden Zellen (Abb. 9). Diese Zelltypen entsprechen – angesichts ihrer Lokalisation und Konfiguration, jedoch vorbehaltlich der nicht erfolgten Doppelfärbungen mit Zellmarkern – LZ, SZ und PTZ. In den genannten Zelltypen wurde eine AR-Expression sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch nachgewiesen (Abb. 9). Die AR-Expression war im Interstitium ausgeprägter als im Keimepithel. Somit bestätigten die vorliegenden IF-Färbungen die vormals beschriebene Lokalisation des AR im Hodengewebe (Smith und Walker, 2014). Der Nachweis der AR-Expression in LZ, SZ und PTZ gelang analog bei EAO-Ratten und Adjuvans-Ratten.

Im Vergleich der experimentellen Bedingungen zeigte sich, dass bei EAO-Ratten die interstitielle und nukleäre Betonung der AR-Expression intensiver ausgeprägt war als bei unbehandelten Ratten und Adjuvans-Kontrollen.

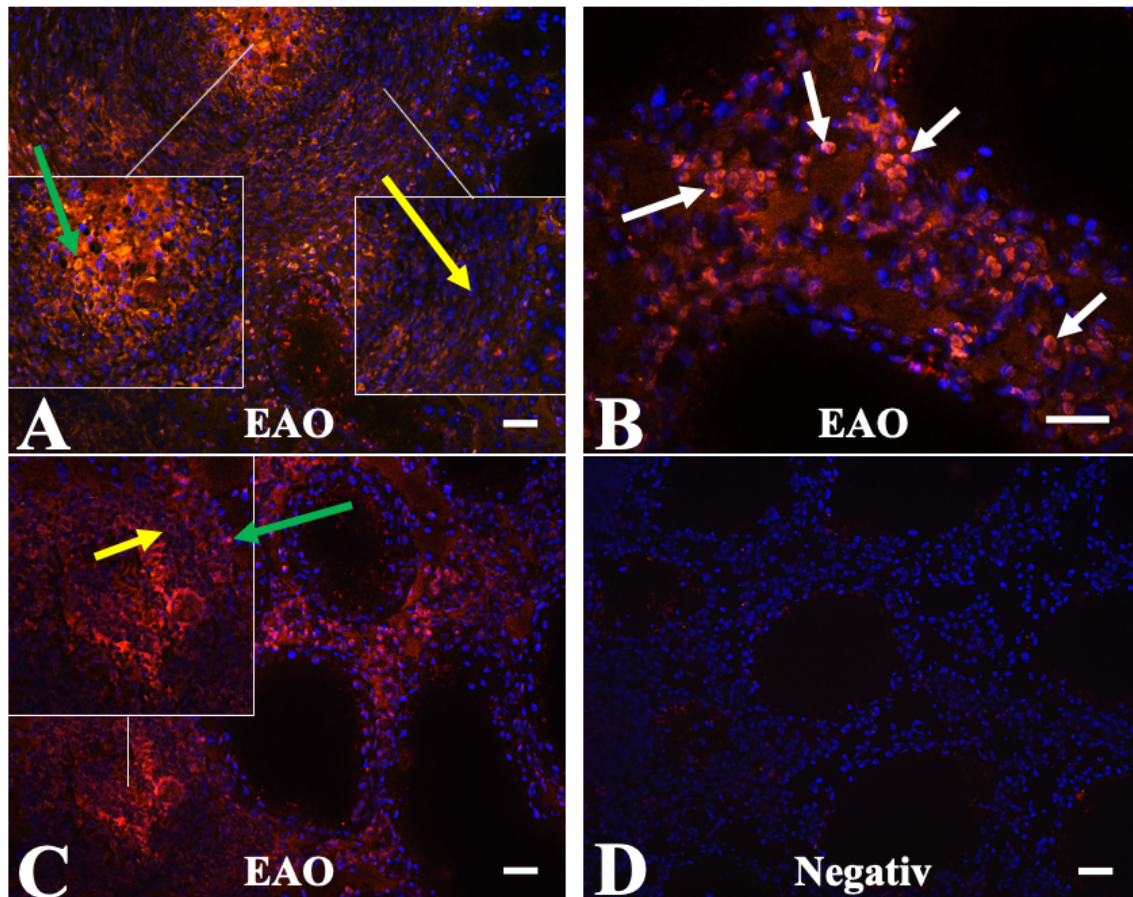


**Abb. 9. Testikuläre AR-Expression in LZ, SZ und PTZ**

Testikuläre Lokalisation der AR-Expression (rot) in unbehandelten Ratten (A), Adjuvans-Ratten (B) und EAO-Ratten (C), dargestellt anhand repräsentativer IF-Färbungen. Der Nachweis einer AR-Expression erfolgte in SZ (oranger Pfeil), PTZ (grüner Pfeil), LZ (roter Pfeil), sowohl nukleär (weißer Pfeil) als auch zytosolisch (gelber Pfeil) lokalisiert. Negativ- (D), Peptid- (E) und IgG-Kontrollen (F) ohne spezifisches AR-Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50 µm.

### **3.2.1.2 Keine sichere AR-Expression in testikulären Leukozyten**

Weiterhin wurde eine mögliche AR-Expression in testikulären Leukozyten bei EAO geprüft. EAO-Ratten der vorliegenden Arbeit zeigten wiederkehrend typische Leukozyten-Zellnester, welche bei der Bildung von Granulationsgewebe im Rahmen der EAO entstehen und in der Literatur beschrieben sind (vgl. Abschnitt 3.1). In diesen Zellnestern konnte eine AR-Expression nicht sicher nachgewiesen werden (Abb. 10 A, C). Nur vereinzelte oder randständige Zellen dieser Zellnester zeigten ein AR-Signal, welches jedoch im Vergleich zu AR-positiven Zellen des Interstitiums schwächer ausgeprägt war (Abb. 10 B). Abzugrenzen von den beschriebenen Leukozyten-Zellnestern sind interstitielle Zellhäufungen mit AR-positiven Zellen, welche am ehesten LZ entsprechen und das AR-Signal intensiv und nukleär betont zeigen, sowie unspezifische lokale Betonungen der Hintergrundfärbung. Somit ergaben die vorliegenden AR-IF-Färbungen insgesamt keine Belege für eine relevante leukozytäre AR-Expression im Rahmen der EAO.



**Abb. 10. Kein sicherer AR-Nachweis in testikulären Leukozyten**

Repräsentative IF-Darstellung der AR-Lokalisation (rot) bei EAO-Ratten (A-C). Das AR-Signal zeigte sich interstitiell und nukleär lokalisiert (B, weiße Pfeile). Die Leukozyten-Zellnester der EAO-Ratten (A, C) zeigten vorwiegend kein AR-spezifisches Signal (gelbe Pfeile), abgesehen von vereinzelten Zellen (grüne Pfeile). Negativkontrolle (D) ohne AR-spezifisches Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu\text{m}$ .

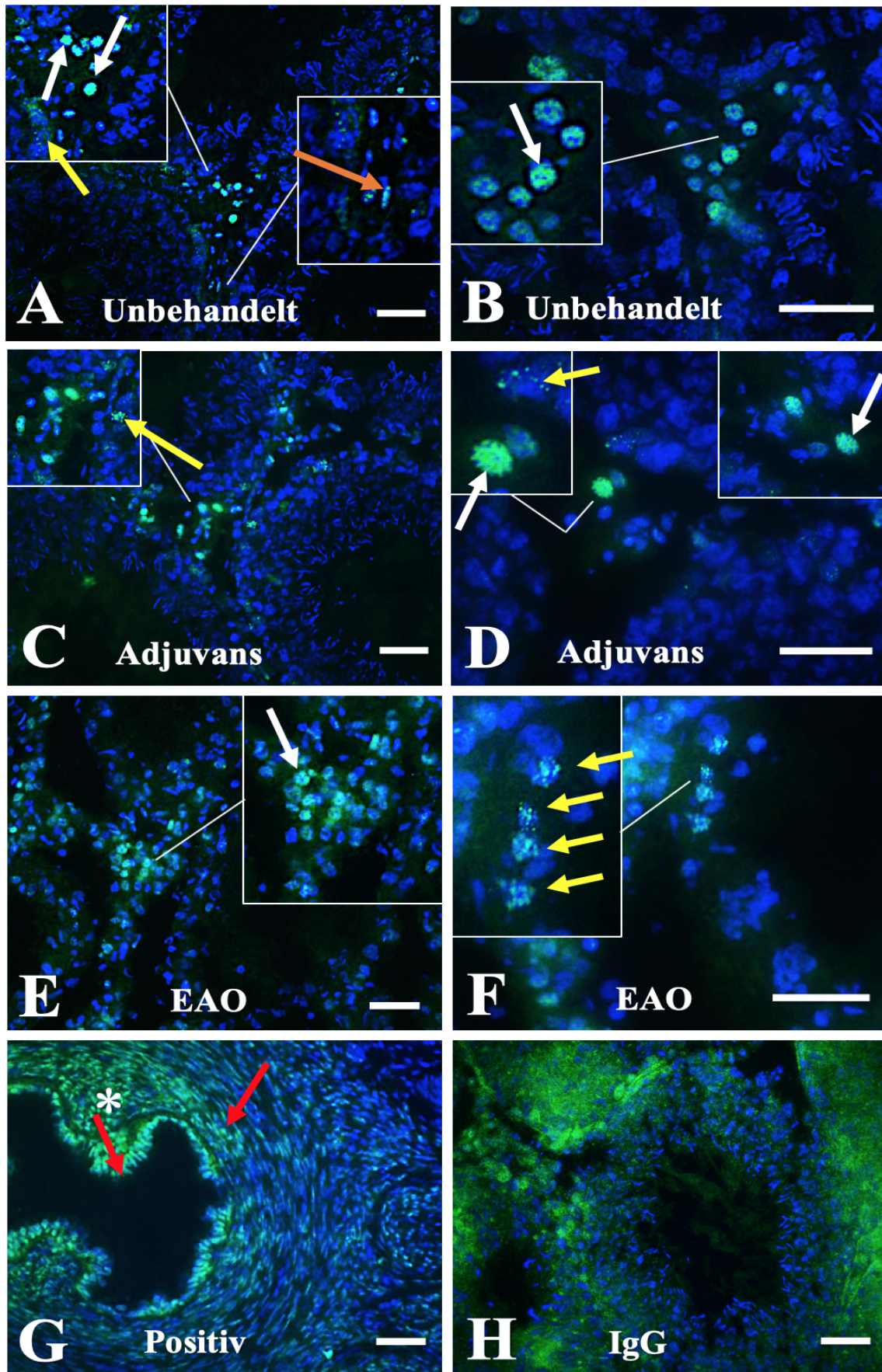
### 3.2.2 Testikuläre ER $\alpha$ -Expression

#### 3.2.2.1 ER $\alpha$ -Expression bei EAO-, Adjuvans- und Kontrollratten

Bei der IF-Färbung für ER $\alpha$  diente als Positivkontrolle ein Gefrierschnitt des Uterus einer gesunden weiblichen Wistar-Kyoto Ratte, dort wurde erwartungsgemäß eine ER $\alpha$ -Expression in endo- und myometrischen Zellen nachgewiesen (Abb. 11 G, rote Pfeile) (Pelletier, Labrie, und Labrie 2000). Die IgG-Kontrolle zeigte ein starkes, jedoch unspezifisches Hintergrundsignal (Abb. 11 H).

Der Nachweis einer ER $\alpha$ -Expression im Hodengewebe gelang vorwiegend in interstitiell gelegenen Zellen, aber in geringerem Ausmaß auch in tubulären Zellen, jeweils in nukleärer Lokalisation (Abb. 11). Die ER $\alpha$ -exprimierenden interstitiellen Zellen entsprechen überwiegend LZ (Abb. 11 A, B, D, E; weiße Pfeile), was durch eine Doppelfärbung mit CYP 450scc-Antikörpern belegt wurde (vgl. Abschnitt 3.2.2.2 und Abb. 12). ER $\alpha$ -positiv, wenngleich in geringerer Intensität, waren weiterhin PTZ, welche sich als schmale, den Tubuli seminiferi anliegende Zellen darstellen (Abb. 11 A oranger Pfeil), und basal in den Tubuli seminiferi gelegene Zellen (Abb. 11 A, C, D, F; gelbe Pfeile). Bei Letzteren handelt es sich, auch nach Differenzierung der Zelltypen durch eine Doppelfärbung mit Vimentin-Antikörpern, sowohl um SZ als auch um Spermatogonien und frühe post-meiotische Keimzellen (vgl. Abschnitt 3.2.2.3 und Abb. 13).

Somit wurde eine testikuläre ER $\alpha$ -Expression bei LZ, PTZ, SZ, Spermatogonien und frühen post-meiotischen Keimzellen nachgewiesen, nicht jedoch in höheren Reifestufen der Keimzellen. Dieser Befund stimmt – abgesehen vom fehlenden ER $\alpha$ -Nachweis in höheren Reifestufen der Keimzellen – mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation der ER $\alpha$ -Expression überein (Carreau et al. 2011; Rochira et al. 2013; Cavaco et al. 2009). Bei EAO-Ratten unterschied sich die Anzahl der ER $\alpha$ -positiven Zellen nicht von den Kontrollbedingungen (Abb. 11 E, F). Insbesondere führte die bei EAO-Ratten beobachtete Leukozyteninvasion nicht zu einer höheren Anzahl von interstitiellen ER $\alpha$ -positiven Zellen (vgl. Abschnitt 3.2.2.2). Der bei EAO-Ratten beobachtete Keimzellverlust im tubulären Kompartiment war mit einer Abnahme der ER $\alpha$ -positiven Zellen verbunden (vgl. Abschnitt 3.2.2.3). Das ER $\alpha$ -Signal bei EAO-Ratten war jedoch weniger intensiv und distinkt als bei unbehandelten Ratten und Adjuvans-Kontrollen (Abb. 11 A-D), diese Beobachtung könnte auf der insgesamt höheren interstitiellen Zelldichte des entzündlich veränderten Hodengewebes beruhen.



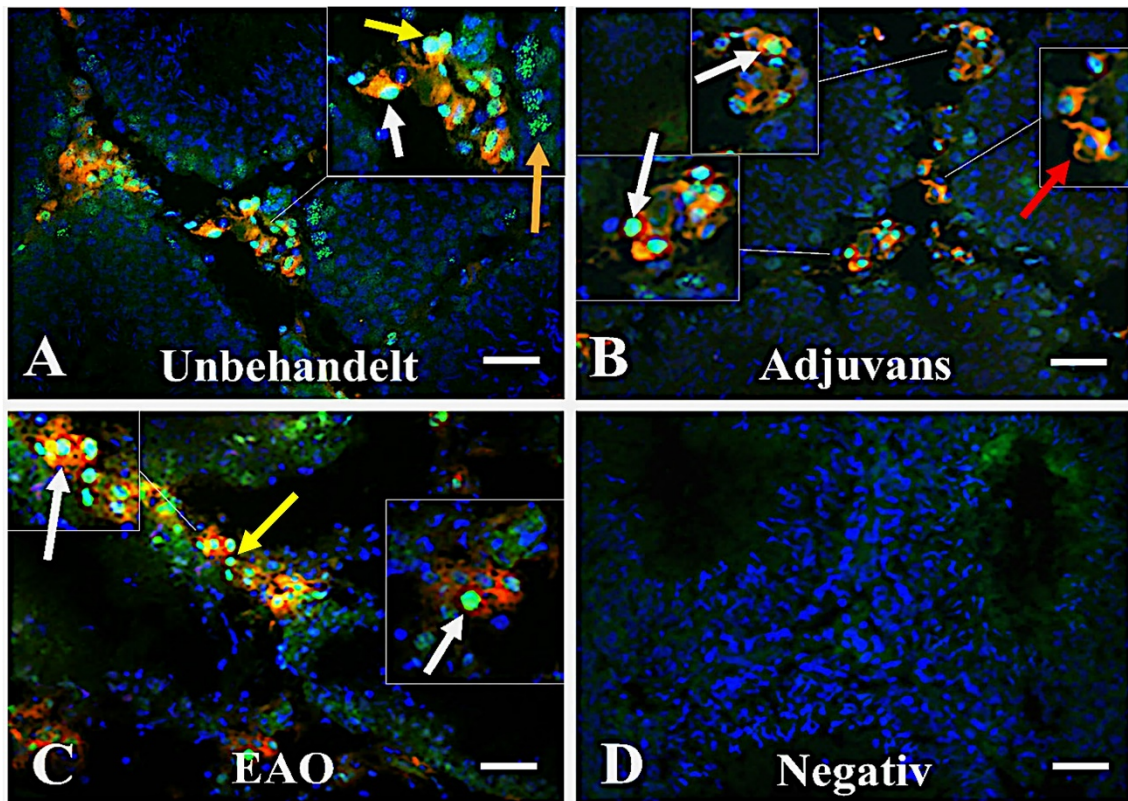
### **Abb. 11. Expression von ER $\alpha$ in interstitiellen und tubulären Zellen**

Repräsentative IF-Darstellung der testikulären ER $\alpha$ -Lokalisation (grün) bei unbehandelten Ratten (A, B), Adjuvans-Kontrollen (C, D) und EAO-Ratten (E, F). Stark ER $\alpha$ -positiv waren die Zellkerne der LZ (weiße Pfeile, vgl. Abb. 12), schwach ER $\alpha$ -positiv die Zellkerne der PTZ (A, oranger Pfeil). Es erfolgte der Nachweis einer inhomogenen, nukleären Färbung für ER $\alpha$  in basalen Zellkernen der Tubuli seminiferi (gelbe Pfeile; vgl. Abb. 13). Rattenuterusgewebe als Positivkontrolle (G) zeigte eine ausgeprägte ER $\alpha$ -Expression im lumennahen Endometrium (roter Pfeil mit Stern) und in myometrischen Zellen (roter Pfeil). Die IgG-Negativkontrolle (H) zeigte eine unspezifische Hintergrundfärbung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu$ m.

#### **3.2.2.2 Interstitielle ER $\alpha$ -Expression überwiegend in LZ**

Eine weitere Differenzierung der interstitiell gelegenen ER $\alpha$ -exprimierenden Zellen wurde angestrebt, da es sich bei diesen Zellen sowohl um LZ als auch um Leukozyten handeln könnte, insbesondere da eine ER $\alpha$ -Expression in Leukozyten beschrieben wurde (Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017).

Zur Differenzierung der interstitiell gelegenen ER $\alpha$ -positiven Zellen erfolgte daher eine IF-Doppelfärbung mit ER $\alpha$ - und CYP 450scc-Antikörpern als LZ-Marker (King et al. 2002; Roby et al. 1991). Ein Signal für CYP 450scc konnte in allen experimentellen Bedingungen detektiert werden (Abb. 12). Die ER $\alpha$ -positiven Zellen des Interstitiums zeigten sich überwiegend auch CYP 450scc-positiv, exprimierten also den LZ-Marker. Hingegen fanden sich im Interstitium nur vereinzelte ER $\alpha$ -positive und gleichzeitig CYP 450scc-negative Zellen (Abb. 12, gelbe Pfeile). Diese Zellen könnten tatsächlich testikulären Immunzellen entsprechen. Zwischen den experimentellen Bedingungen ergab sich allerdings kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit der ER $\alpha$ -positiven CYP 450scc-negativen Zellen, was aufgrund der Leukozytenzunahme bei EAO-Ratten gegen eine ausgeprägte ER $\alpha$ -Expression in Immunzellen spricht. Das Überwiegen der zweifachen Positivität der interstitiellen Zellen für ER $\alpha$  und dem LZ-Marker CYP 450scc zeigte somit, dass ER $\alpha$  im Rattenhoden vorwiegend in LZ exprimiert wird (Abb. 12).



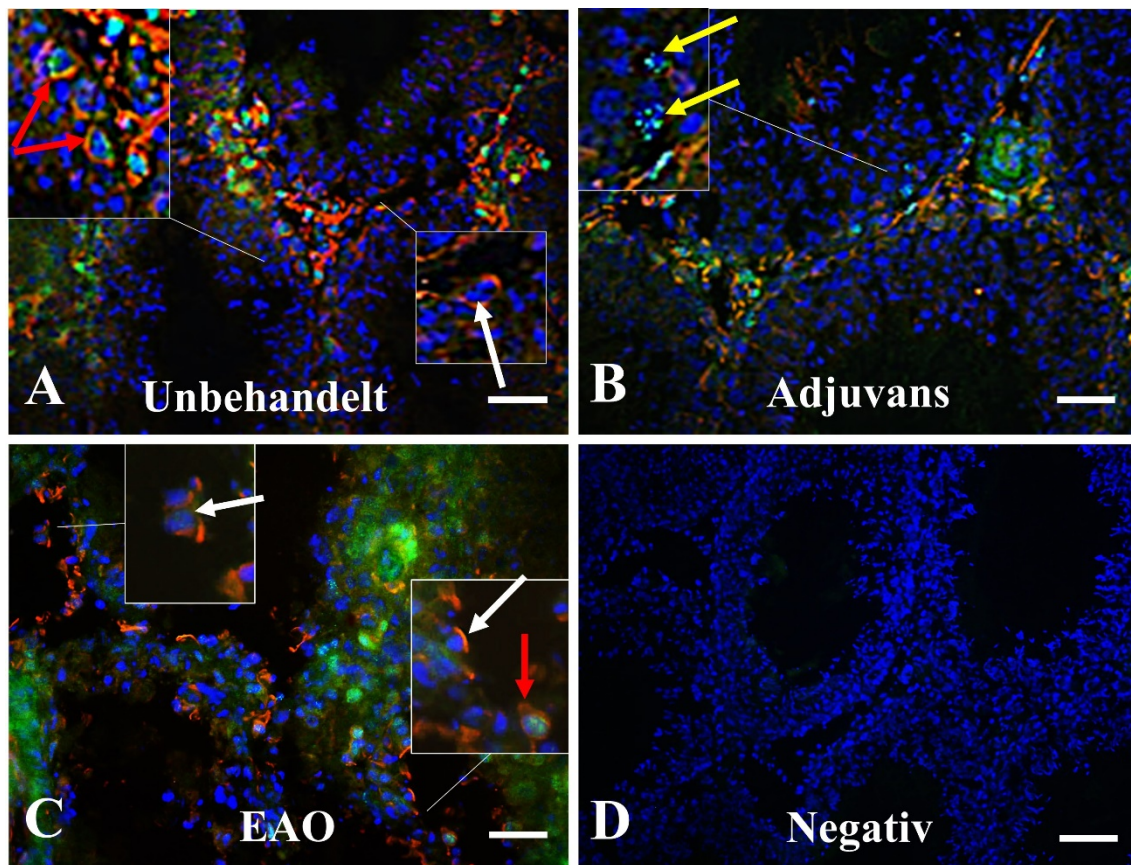
**Abb. 12. Vorwiegende Expression von ER $\alpha$  in LZ**

Repräsentative Doppelfärbung für ER $\alpha$  (grün) und CYP 450scc (orange) im Hodengewebe von unbehandelten Ratten (A), Adjuvans-Kontrollen (B) und EAO-Ratten (C). CYP 450scc-positive Zellen zeigten sich überwiegend ER $\alpha$ -positiv (weiße Pfeile), selten ER $\alpha$ -negativ (roter Pfeil). Es fanden sich einzelne ER $\alpha$ -positive, CYP 450scc-negative interstitielle Zellen (gelbe Pfeile) und ein gepunktetes ER $\alpha$ -Signal in basalen Zellkernen der Tubuli seminiferi (oranger Pfeil, A). Negativkontrolle (D) ohne spezifisches ER $\alpha$ - oder CYP 450scc-Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu$ m.

### **3.2.2.3 Tubuläre ER $\alpha$ -Expression in SZ und Spermatogonien**

Die basal gelegenen ER $\alpha$ -positiven tubulären Zellen könnten angesichts ihrer Lokalisation grundsätzlich Keimzellen oder SZ entsprechen. Zu ihrer Differenzierung erfolgte eine Doppelfärbung mit Anfärbung des SZ-Markers Vimentin (Abb. 13) (Hemendinger et al. 2002). Hierbei fanden sich sowohl Vimentin-positive ER $\alpha$ -positive Zellen, welche SZ entsprechen (Abb. 13, weiße Pfeile), als auch Vimentin-negative ER $\alpha$ -positive Zellen, welche aufgrund ihrer basalen Lokalisation am ehesten Spermatogonien entsprechen (Abb. 13, gelbe Pfeile). Hingegen wies die Kerngegenfärbung mit punktförmigem ER $\alpha$ -Signal auf post-meiotische Keimzellen hin. In weiter apikal gelegenen Keimepithelzellen zeigte sich jedoch kein ER $\alpha$ -Signal, sodass sich keine Hinweise auf eine ER $\alpha$ -Expression in höheren Reifestufen der Keimzellen ergaben.

Bei EAO-Ratten waren übereinstimmend mit dem beobachteten Keimzellverlust die Vimentin-negativen ER $\alpha$ -positiven Zellen seltener zu finden. In allen drei experimentellen Bedingungen war das ER $\alpha$ -Signal der tubulären Zellen insgesamt schwächer und diffuser ausprägt als bei den interstitiellen Zellen.



**Abb. 13. ER $\alpha$ -Expression in SZ und Keimzellen**

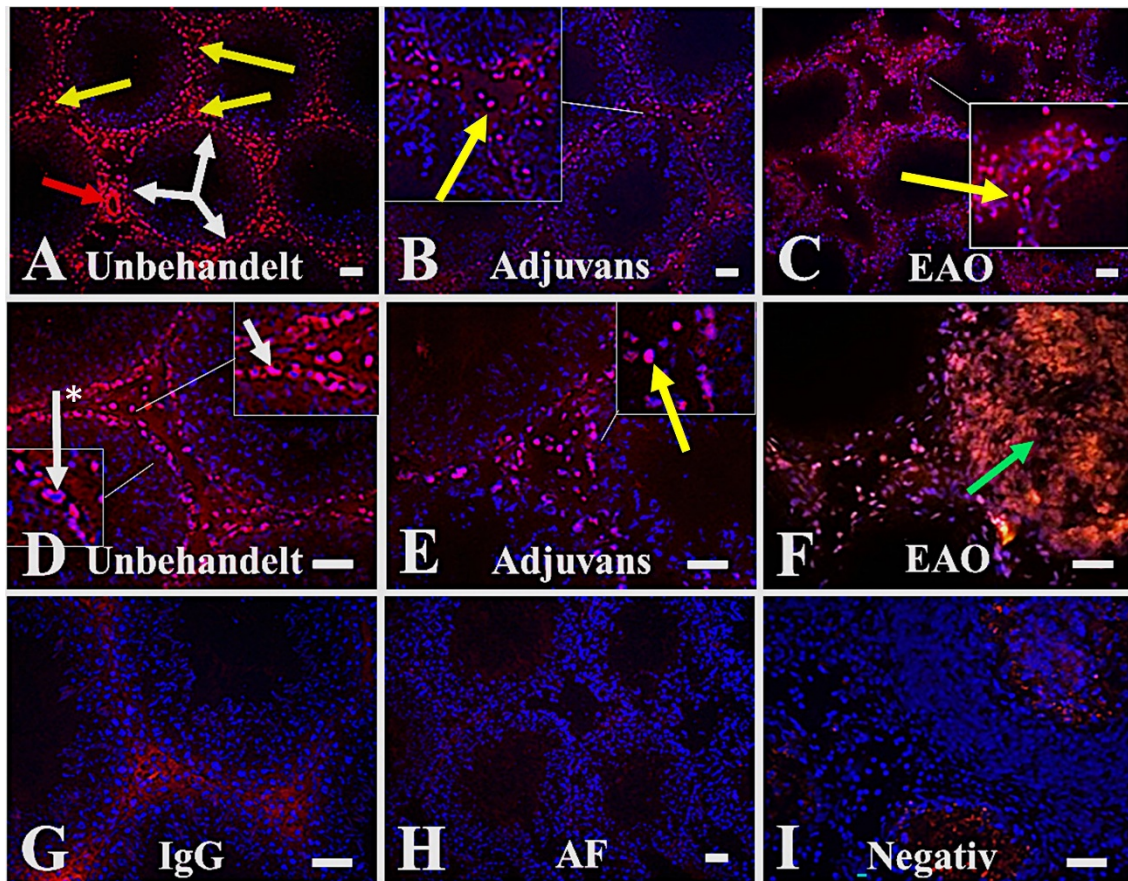
Repräsentative Doppelfärbung für ER $\alpha$  (grün) und Vimentin (orange) im Hodengewebe von unbehandelten Ratten (A), Adjuvans-Kontrollen (B) und EAO-Ratten (C). Vimentin-positive Zellen zeigten sich sowohl schwach ER $\alpha$ -positiv (rote Pfeile) als auch ER $\alpha$ -negativ (weiße Pfeile). In den Tubuli seminiferi lokalisierte, Vimentin-negative, jedoch ER $\alpha$ -positive Zellen (gelbe Pfeile, B) fanden sich vorwiegend bei unbehandelten Ratten und Adjuvans-Kontrollen. Negativkontrolle (D) ohne spezifisches ER $\alpha$ - oder Vimentin-Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu$ m.

### 3.2.3 Testikuläre ER $\beta$ -Expression

Die Kontrollen mit IgG-, Negativ- und Autofluoreszenz-Kontrollen belegten eine spezifische Färbung des ER $\beta$  mit dem eingesetzten Antikörper (Abb. 14 G, H, I).

Eine ER $\beta$ -Expression wurde in allen drei experimentellen Bedingungen besonders in den Zellkernen des Interstitiums (Abb. 14 A, B, C; gelbe Pfeile), weniger stark auch im Zytosol und den Zellkernen der basalen Keimepithelzellen nachgewiesen (Abb. 14 A, D; weiße Pfeile). Daneben fand sich eine ER $\beta$ -Expression in den Endothelzellen der interstitiellen Blutgefäße (Abb. 14 A, roter Pfeil). Insgesamt zeigten beinahe alle testikulären Zelltypen mit Ausnahme der apikal gelegenen Keimzellen eine ER $\beta$ -Expression.

Bei den EAO-Ratten zeigten die Leukozyten-Zellnester eine ausgeprägte ER $\beta$ -Expression (Abb. 14 F). Das ER $\beta$ -Signal war bei EAO-Ratten gegenüber unbehandelten Ratten abgeschwächt und weniger distinkt, eine Signalabschwächung in geringem Maße fand sich jedoch auch bei Adjuvans-Kontrollen (Abb. 14).



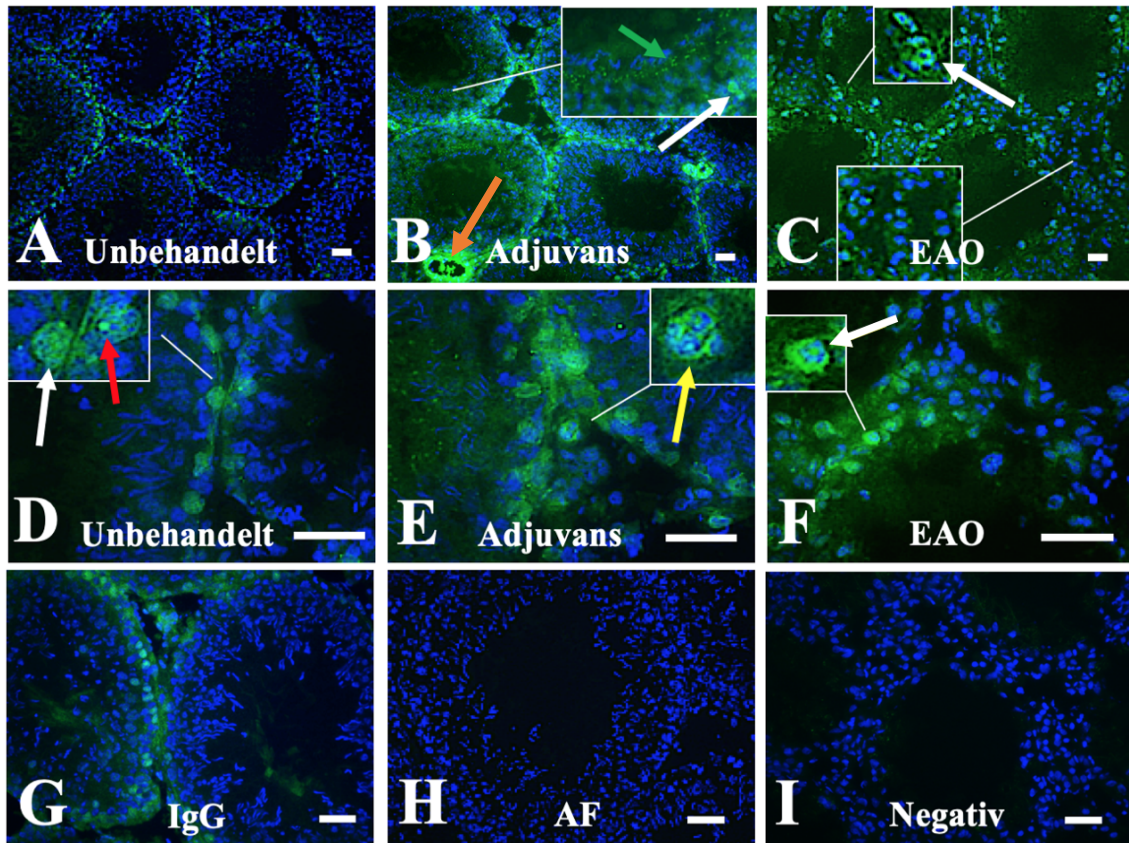
**Abb. 14. Abundante ER $\beta$ -Färbung im Rattenhoden**

Repräsentative IF-Darstellung der testikulären ER $\beta$ -Lokalisation (rot) in unbehandelten Ratten (A, D), Adjuvans-Kontrollen (B, E) und EAO-Ratten (C, F). ER $\beta$ -Signale fanden sich überwiegend interstitiell und nukleär (gelbe Pfeile), geringer in basalen Keimepithelzellen (weiße Pfeile) und vereinzelt zytosolisch (D, weißer Pfeil mit Stern). Zudem fand sich ein starkes ER $\beta$ -Signal in Endothelzellen (A, roter Pfeil) und bei EAO-Ratten in Leukozyten-Zellnestern (F, grüner Pfeil). IgG-Kontrolle mit unspezifischer Hintergrundfärbung (G). Autofluoreszenz- (AF, H) und Negativkontrolle (I) ohne spezifisches ER $\beta$ -Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu$ m.

### **3.2.4 Testikuläre ARO-Expression**

Der eingesetzte ARO-Antikörper ergab regelrechte Autofluoreszenz- und Negativkontrollen (Abb. 15 H, I), jedoch ein positives Signal in der IgG-Kontrolle (Abb. 15 G), welches den Bindungsstellen des Primärantikörpers entsprach. Eine unspezifische Bindung des eingesetzten ARO-Primärantikörpers ist deshalb anzunehmen.

Vorbehaltlich der fehlenden Antikörperspezifität wurde ein positives ARO-Signal vorwiegend in den basalen Keimepithelzellen und in vereinzelten Zellen des Interstitiums gezeigt, dieses Signal fand sich in allen drei experimentellen Bedingungen (Abb. 15 A-F). Ein positives ARO-Signal zeigte sich außerdem in Endothelzellen der interstitiellen Blutgefäße (Abb. 15 B, oranger Pfeil). Auch intraluminal zeigte sich ein ARO-Signal, welches angesichts seiner Lokalisation und Konfiguration den Köpfen später elongierter Spermatiden entsprechen könnte (Abb. 15 B, grüner Pfeil). Angesichts der fehlenden Spezifität der ARO-IF-Färbungen wurde auf einen expliziten Vergleich der experimentellen Bedingungen verzichtet.



**Abb. 15. Unspezifische Bindung des ARO-Primärantikörpers**

Repräsentative IF-Darstellung der testikulären ARO-Lokalisation (grün) in unbehandelten Ratten (A, D), Adjuvans-Kontrollen (B, E) und EAO-Ratten (C, F). Ein positives, nukleäres ARO-Signal fand sich in basalen Keimepithelzellen (weiße Pfeile), dort teilweise auch in den Nukleoli (roter Pfeil), und vereinzelt in interstitiellen Zellen (E, gelber Pfeil). Intraluminal waren ARO-positive, späte elongierte Spermatiden zu sehen (B, grüner Pfeil). Auch Endothelzellen zeigten sich ARO-positiv (B, oranger Pfeil). Die IgG-Kontrolle (G) zeigte ein positives Signal, das den Bindungsstellen des Primärantikörpers entsprach. Autofluoreszenz- (AF, H) und Negativkontrolle (I) ohne ARO-spezifisches Signal. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.5 Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-Färbungen

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis der AR-, ER $\alpha$ -, und ER $\beta$ -Expression mittels IF bei EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten (Tab. 11 für eine Zusammenfassung des Hormonrezeptorprofils anhand der unbehandelten Ratten).

Eine AR-Expression fand sich in LZ, SZ und PTZ. Eine ER $\alpha$ -Expression wurde in LZ, PTZ, SZ, Spermatogonien und frühen post-meiotischen Keimzellen nachgewiesen, nicht jedoch in höheren Reifestufen der Keimzellen. ER $\beta$  zeigte eine ubiquitäre Expression in Zellen des Interstitiums und teilweise des Keimepithels, sowie bei EAO-Ratten in Ansammlungen von Leukozyten. Eine ARO-Expression fand sich vorwiegend in tubulären Zellen und in geringer Ausprägung auch in interstitiellen Zellen, jedoch wurden diese Ergebnisse aufgrund der positiven IgG-Kontrolle als Ausdruck einer fehlenden ARO-Spezifität des Primärantikörpers gewertet.

Im Vergleich der experimentellen Bedingungen zeigte sich bei EAO-Ratten eine reduzierte Anzahl der Vimentin-negativen ER $\alpha$ -positiven tubulären Zellen sowie ein allgemein schwächer und weniger distinkt ausgeprägtes ER $\alpha$ -Signal gegenüber den Kontrollgruppen. Für die AR- und ER $\beta$ -Expression waren keine qualitativen Unterschiede zwischen EAO-Ratten und den Kontrollgruppen festzustellen.

**Tab. 11. Zusammenfassung der IF-Ergebnisse für ER $\alpha$ , ER $\beta$  und AR bei unbehandelten Ratten**

+ = positiv, ++ = stark positiv, – = negativ, +/- = positive und negative Zellen, ++/- = überwiegend positive, teilweise auch negative Zellen. Befunde für ARO angesichts unspezifischer Antikörperbindung nicht aufgeführt.

| Zellart               | AR   | ER $\alpha$ | ER $\alpha$<br>in CYP 450scc-<br>positiven Zellen | ER $\alpha$<br>in Vimentin-<br>positiven Zellen | ER $\beta$ |
|-----------------------|------|-------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|
| interstitielle Zellen | ++/- | ++/-        | ++/-                                              |                                                 | ++         |
| LZ                    | +    | +           | ++/-                                              |                                                 | ++         |
| tubuläre Zellen       | +/-  | +/-         |                                                   | +/-                                             | ++/-       |
| SZ                    | +    | +/-         |                                                   | +/-                                             | ++/-       |
| basale Keimzellen     | –    | +/-         |                                                   | +/-                                             | +          |
| apikale Keimzellen    | –    | –           |                                                   | –                                               | +          |

### **3.3 Quantitative mRNA-Expressionsanalyse für AR, ER $\alpha$ , LHR, ARO, SF-1 und StAR bei EAO-, Adjuvans- und Kontrollratten**

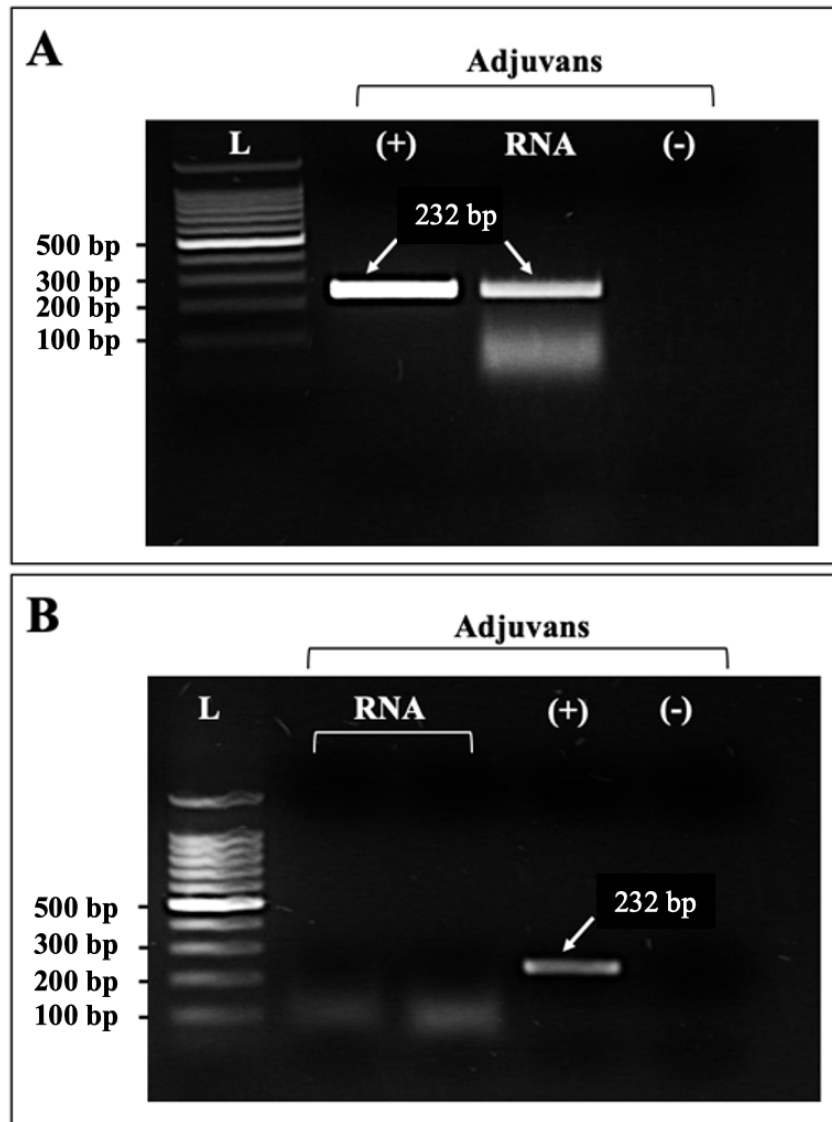
Nachdem im ersten Schritt die Expression der Schlüsselproteine der Androgen- und Östrogen-Regulation auf der Proteinebene qualitativ mittels IF an Gewebeschnitten untersucht wurde, folgte in einem zweiten Schritt die quantitative Untersuchung ihrer Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR aus Gewebelysaten. Hierbei wurde die Expression nicht nur für AR, ER $\alpha$  und ARO, sondern auch für LHR, SF-1 und StAR als LZ-Marker untersucht. Die Expressionsniveaus der zusätzlich erhobenen Marker erlaubten eine Einschätzung der LZ-Funktion im Gewebelysat der Rattenhoden. Die erhobenen Expressionsniveaus wurden zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Kontrollen verglichen.

Auf eine quantitative Expressionsanalyse von ER $\beta$  wurde verzichtet, da die IF-Färbung ein abundantes ER $\beta$ -Signal erbrachte, da die Primer-Etablierung bereits bei normalem Rattenhodengewebe ein instabiles Signal aufwies und da in der Literatur ER $\beta$  gegenüber ER $\alpha$  funktionell eine nachrangige Bedeutung zukommt. Auch auf die Darstellung der quantitativen ARO-Expressionsanalyse wurde verzichtet, da trotz ausreichender Amplifikationseffizienz (117%) kein stabiles ARO-Signal in den experimentellen Bedingungen erhalten werden konnte.

#### **3.3.1 Erfolgreiche Isolierung und reverse Transkription der testikulären RNA**

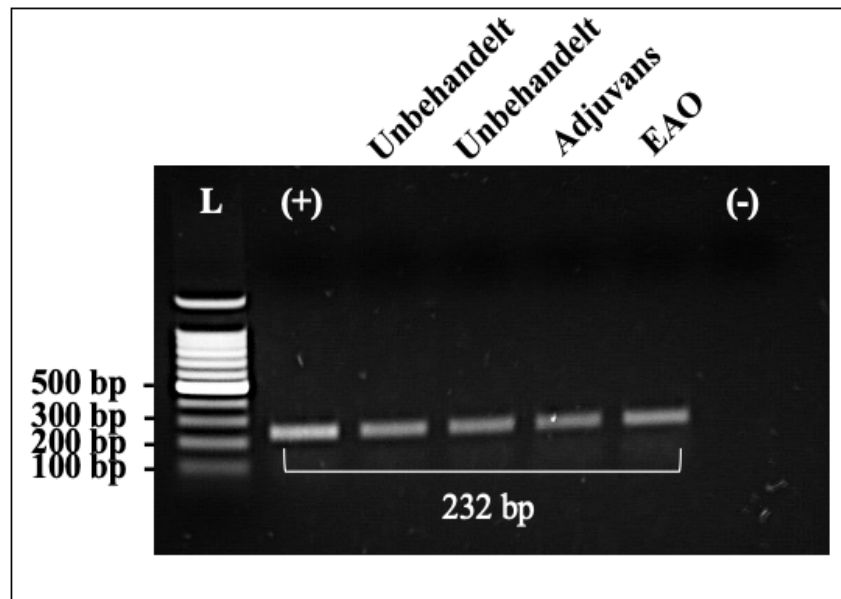
DNA-Verunreinigungen der isolierten RNA wurden mittels einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Primern nachgewiesen. Aufgrund positiver Banden für  $\beta$ -Aktin in der isolierten RNA-Probe (Abb. 16 A) wurde dem RNA-Isolationsprotokoll standardisiert ein zweiter Verdau der noch vorhandenen DNA mit DNase und eine Aufreinigung mit dem PegGold Cycle Pure Kit angeschlossen. Danach war mittels  $\beta$ -Aktin-PCR keine DNA-Verunreinigung mehr nachweisbar (Abb. 16 B).

Anschließend wurde eine reverse Transkription der isolierten RNA durchgeführt. Die erfolgreiche Synthese von cDNA wurde in Abb. 17 durch die PCR-Produkte für  $\beta$ -Aktin (232 bp) bestätigt.



**Abb. 16. Erfolgreiche Entfernung der genomischen DNA aus der RNA-Probe**

Nachweis einer schwach positiven Bande für  $\beta$ -Aktin (232 bp) in der testikulären RNA-Probe einer Adjuvans-Ratte vor Durchführung eines zweiten DNase-Verdaus (A). Kein Nachweis einer  $\beta$ -Aktin-Bande nach Durchführung eines zweiten DNase-Verdaus (B). (+): Positivkontrolle mit testikulärer cDNA einer normalen Ratte; (-): Negativkontrolle; bp: Basenpaare; L: DNA-Leiter.

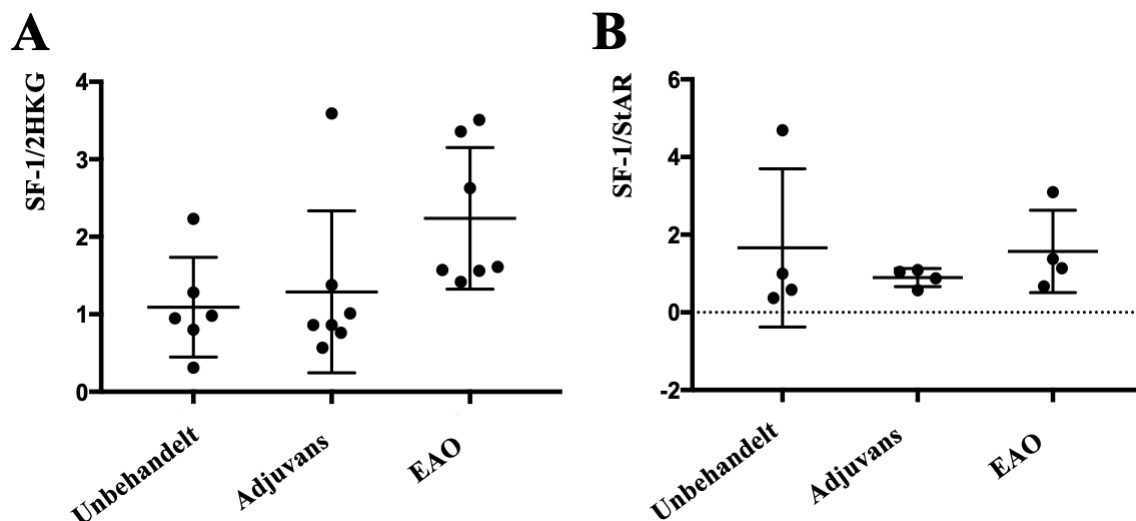


**Abb. 17. Erfolgreiche reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA**

Eine reverse Transkription wurde mit testikulären RNA-Proben aus unbehandelten Ratten, Adjuvans-Kontrollen und EAO-Ratten durchgeführt und mit positiven Banden für  $\beta$ -Aktin (232 bp) bestätigt. (+): Positivkontrolle mit cDNA aus normalem Rattenhoden; (-): Negativkontrolle; bp: Basenpaare; L: DNA-Leiter.

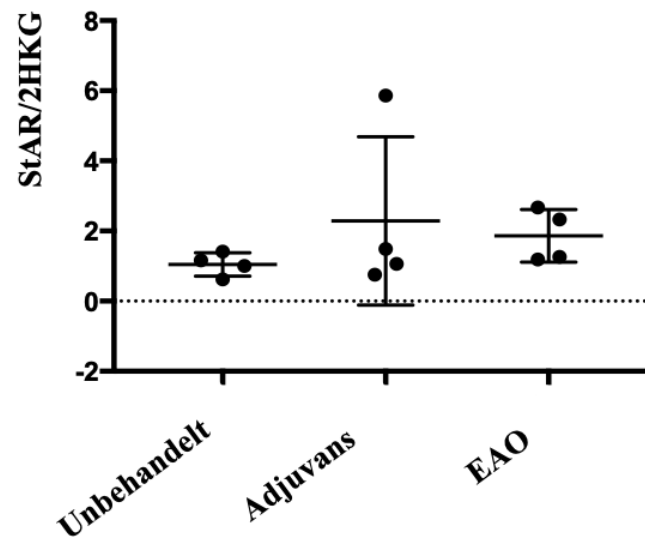
### 3.3.2 Konstante testikuläre mRNA-Expression von SF-1 und StAR bei EAO-Ratten

Die Gene SF-1 und StAR gelten als Master-Transkriptionsfaktor (Parker und Schimmer 1997; Morohashi et al. 1994; Ikeda et al. 1993) bzw. Marker-Gen (Pollack et al. 1997) der testikulären Steroidogenese, ihr testikulärer Hauptexpressionsort sind die LZ (vgl. Abschnitt 1.2.2). Weder für SF-1 noch für StAR ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Tieren (SF-1:  $F(2, 17) = 2.63$ ,  $p > 0.05$ , StAR:  $F(2, 9) = 0.74$ ,  $p > 0.05$ ) (Abb. 18 A bzw. Abb. 19). Auch das mit StAR normalisierte Expressionsniveau von SF-1 unterschied sich nicht zwischen den experimentellen Bedingungen ( $F(2, 9) = 0.38$ ,  $p > 0.05$ ) (Abb. 18 B). Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine systematisch veränderte Expression der beiden LZ-Marker oder eine systematisch eingeschränkte LZ-Funktion im entzündeten Hodengewebe. Das Expressionsniveau von SF-1 wurde im Folgenden als Bezugsgröße der LZ-Funktion im Gewebelysat der Rattenhoden für die Normalisierung der AR-, ER- und LHR-Expression herangezogen.



**Abb. 18. Konstante testikuläre mRNA-Expression von SF-1 bei EAO-Ratten**

Die mRNA-Expression von SF-1 im Hodengewebe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten nach Normalisierung mit zwei house keeping genes (2HKG) (A) bzw. mit dem LZ-Funktionsmarker StAR (B). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

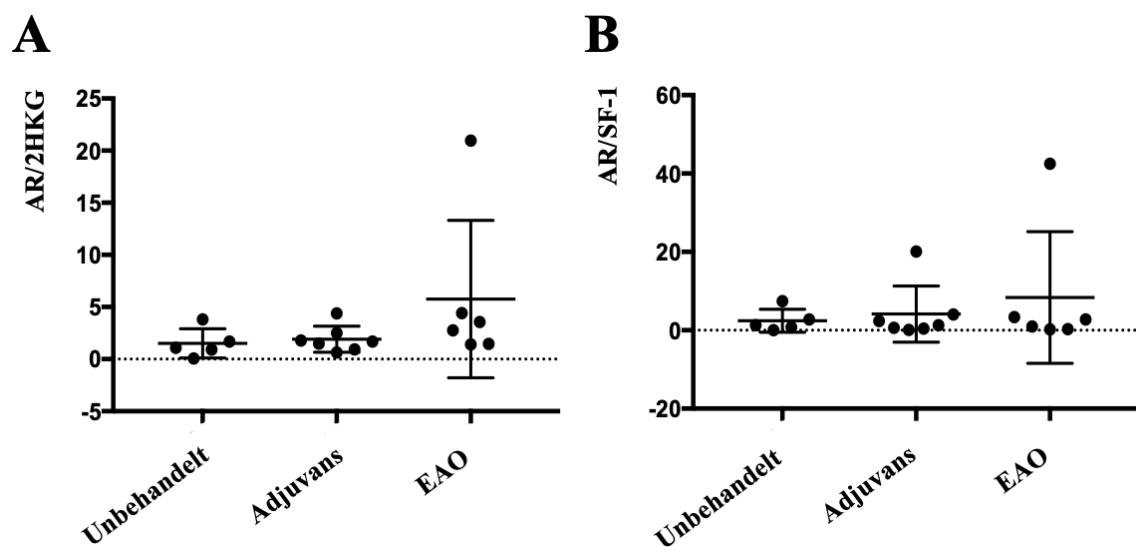


**Abb. 19. Konstante testikuläre mRNA-Expression von StAR bei EAO-Ratten**

Die mRNA-Expression von StAR im Hodengewebe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten nach Normalisierung mit zwei house keeping genes (2HKG). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.3.3 Konstante testikuläre AR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten

Die AR-Expression zeigte auf mRNA-Ebene keinen signifikanten Unterschied zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten ( $F(2, 15) = 1.56, p > 0.05$ ) (Abb. 20 A). Auch nach Normalisierung mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1 ergab sich kein signifikanter Unterschied der AR-Expression zwischen den drei experimentellen Bedingungen ( $F(2, 15) = 0.45, p > 0.05$ ) (Abb. 20 B). Insgesamt ergaben sich somit keine Belege für eine quantitative Änderung der AR-Expression bei EAO, weder bezogen auf das Hodengewebe noch bezogen auf die mittels SF-1 geschätzte LZ-Funktion.



**Abb. 20. Konstante testikuläre AR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten**

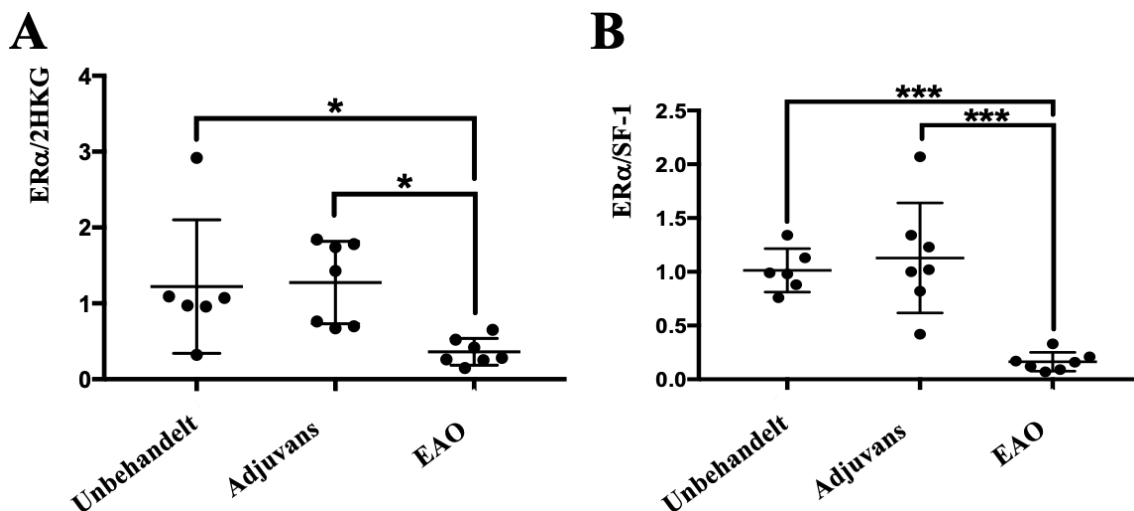
Die mRNA-Expression von AR im Hodengewebe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen EAO-Ratten, Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten nach Normalisierung mit zwei house keeping genes (2HKC) (A) bzw. mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1 (B). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.3.4 Reduzierte testikuläre ER $\alpha$ -mRNA-Expression bei EAO-Ratten

Die ER $\alpha$ -Expression zeigte auf mRNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen ( $F(2, 17) = 5.25$ ,  $p = 0.017$ ) (Abb. 21 A). Insbesondere war die ER $\alpha$ -Expression bei EAO-Ratten gegenüber unbehandelten Ratten ( $p = 0.043$ ) und gegenüber Adjuvans-Kontrollen signifikant reduziert ( $p = 0.025$ , jeweils korrigiert für multiples Testen).

Auch nach Normalisierung der ER $\alpha$ -Expression mit SF-1 fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen ( $F(2, 17) = 17.87$ ,  $p < 0.0001$ ) (Abb. 21 B), insbesondere eine signifikante Reduktion bei EAO-Ratten gegenüber unbehandelten Ratten ( $p = 0.0006$ ) und Adjuvans-Kontrollen ( $p = 0.0001$ , jeweils korrigiert für multiples Testen). Somit zeigte sich bei EAO eine reduzierte ER $\alpha$ -Expression nicht nur allgemein im gesamten Hodengewebe, sondern auch in LZ, gemessen an der mittels SF-1 geschätzten LZ-Funktion.

Bei den Adjuvans-Kontrollen war keine Reduktion der ER $\alpha$ -Expression gegenüber den unbehandelten Ratten zu beobachten, weder bezogen auf das gesamte Hodengewebe noch bezogen auf die geschätzte LZ-Funktion (jeweils  $p > 0.05$ ), sodass die beobachtete ER $\alpha$ -Reduktion bei EAO einen EAO-spezifischen Effekt darzustellen scheint.



**Abb. 21. Reduzierte testikuläre ER $\alpha$ -mRNA-Expression bei EAO-Ratten**

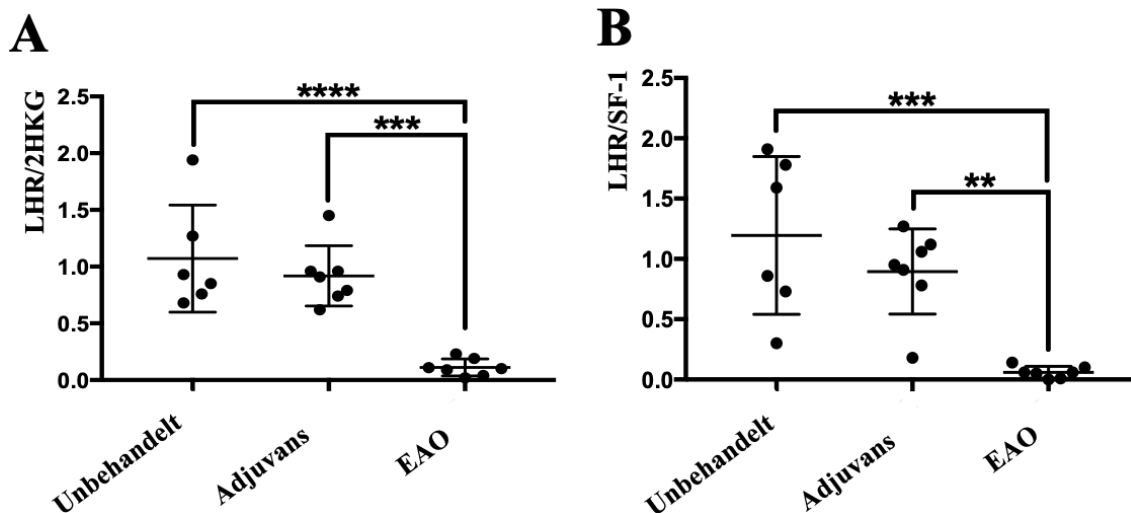
Die testikuläre mRNA-Expression von ER $\alpha$  bei EAO-Ratten zeigte sich signifikant vermindert gegenüber Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten nach Normalisierung mit zwei house keeping genes (2HKG) (A) bzw. mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1 (B). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.3.5 Reduzierte testikuläre LHR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten

Aufgrund des möglichen Einflusses von LH auf die testikuläre Steroidproduktion erfolgte eine Analyse der mRNA-Expression von LHR im Rattenhoden der unbehandelten Ratten, Adjuvans-Kontrollen und der EAO-Ratten (Abb. 22 A).

Die LHR-Expression zeigte auf mRNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen ( $F(2, 17) = 19.38, p < 0.0001$ ) (Abb. 22 A). Insbesondere war die LHR-Expression bei EAO-Ratten gegenüber unbehandelten Ratten ( $p < 0.0001$ ) und gegenüber Adjuvans-Kontrollen signifikant reduziert ( $p = 0.0003$ , jeweils korrigiert für multiples Testen). Auch nach Normalisierung mit SF-1 bestand ein signifikanter Gruppenunterschied ( $F(2, 17) = 13.50, p = 0.0003$ ) (Abb. 22 B), insbesondere eine signifikante Reduktion der LHR-Expression bei EAO-Ratten gegenüber unbehandelten Ratten ( $p = 0.0003$ ) und Adjuvans-Kontrollen ( $p = 0.004$ , jeweils korrigiert für multiples Testen).

Adjuvans-Kontrollen zeigten keine signifikante Reduktion der LHR-Expression gegenüber unbehandelten Ratten, weder bezogen auf das gesamte Hodengewebe noch bezogen auf die geschätzte LZ-Funktion (jeweils  $p > 0.05$ ), sodass auch die beobachtete LHR-Reduktion bei EAO-Ratten einen EAO-spezifischen Effekt darzustellen scheint.



**Abb. 22. Reduzierte testikuläre LHR-mRNA-Expression bei EAO-Ratten**

Die testikuläre mRNA-Expression von LHR bei EAO-Ratten zeigte sich signifikant vermindert gegenüber Adjuvans-Kontrollen und unbehandelten Ratten nach Normalisierung mit zwei house keeping genes (2HKG) (A) bzw. mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1 (B). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.3.6 Zusammenfassung der quantitativen mRNA-Expressionsanalyse

Die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR ergab eine signifikante Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression bei EAO, während das Expressionsniveau von AR, SF-1 und StAR unverändert blieb (Tab. 12). Die Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression bestätigte sich jeweils auch nach Normalisierung mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1. Hierbei schien die Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression bei EAO-Ratten ein EAO-spezifischer Effekt zu sein, da bei Adjuvans-Kontrollen eine derartige Reduktion nicht zu beobachten war.

**Tab. 12. Zusammenfassung der qRT-PCR-Analyse**

Dargestellt sind die Veränderungen bei EAO-Ratten bzw. Adjuvans-Kontrollen jeweils gegenüber unbehandelten Ratten. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

| Gen                          | Veränderung bei EAO                |                                        | Veränderung bei Adjuvans-Kontrollen |                                        |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
|                              | bezogen auf Hoden-gewebe insgesamt | normalisiert anhand LZ-Funktionsmarker | bezogen auf Hoden-gewebe insgesamt  | normalisiert anhand LZ-Funktionsmarker |
| <b>SF-1</b>                  | unverändert                        | unverändert                            | unverändert                         | unverändert                            |
| <b>StAR</b>                  | unverändert                        | unverändert                            | unverändert                         | unverändert                            |
| <b>AR</b>                    | unverändert                        | unverändert                            | unverändert                         | unverändert                            |
| <b>ER<math>\alpha</math></b> | reduziert *                        | reduziert ***                          | unverändert                         | unverändert                            |
| <b>LHR</b>                   | reduziert ****                     | reduziert ***                          | unverändert                         | unverändert                            |

## 4 Diskussion

### 4.1 Histopathologische Befunde und Immunfluoreszenz-Färbungen der testikulären Hormonrezeptoren bei EAO

Der testikuläre Expressionsnachweis der Hormonrezeptoren AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  mittels IF-Färbung gelang in der vorliegenden Arbeit sowohl im Hodengewebe der Kontrollbedingungen als auch im entzündlich veränderten Gewebe der EAO-Ratten. Eine AR-Expression fand sich in LZ, SZ und PTZ, was frühere Beobachtungen bestätigte (Vornberger et al. 1994; Van Roijen et al. 1995; L. Smith und Walker 2014). Eine ER $\alpha$ -Expression wurde in LZ, PTZ, SZ, Spermatogonien und frühen post-meiotischen Keimzellen nachgewiesen, nicht jedoch in höheren Reifestufen der Keimzellen. Auch diese Befunde stimmen, abgesehen vom fehlenden ER $\alpha$ -Nachweis in höheren Reifestufen der Keimzellen, mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation der ER $\alpha$ -Expression überein (Rochira et al. 2013; Cavaco et al. 2009; Carreau et al. 2002; Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017; Lucas et al. 2008; Pelletier, Labrie, und Labrie 2000) (Tab. 13). Eine ER $\beta$ -Expression zeigte sich ubiquitär in Zellen des Interstitiums und teilweise auch des Keimepithels, diese Befunde bestätigen ebenfalls die vorbeschriebenen Expressionslokalisationen (Carreau et al. 2011; Moulton 2018; Rochira et al. 2013; Cavaco et al. 2009; van Pelt et al. 1999; Lucas et al. 2008) (Tab. 14). Die testikuläre Expression der Hormonrezeptoren AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurde somit mittels IF-Färbung in typischer Lokalisation nachgewiesen.

#### Tab. 13. ER $\alpha$ -Lokalisation im adulten Rattenhoden

Zusammenfassung der publizierten Daten zur Lokalisation der ER $\alpha$ -Expression mittels IF im adulten Rattenhoden im Vergleich zu den Erhebungen der vorliegenden Arbeit. Aufgrund der beschriebenen differenziellen ER $\alpha$ -Expression des Keimepithels wurde zwischen basalen und apikalen Keimzellen unterschieden. + = positiv, – = negativ, +/- = überwiegend positiv, -/+ = überwiegend negativ.

| ER $\alpha$            | LZ  | SZ  | Spermatogonien<br>(basale Keimzellen) | Spermatozyten,<br>Spermatiden<br>(apikale Keimzellen) | applizierte<br>Antikörper |
|------------------------|-----|-----|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|
| Lucas et al., 2008     | +   | +   | –                                     | -/+                                                   | MC-20, H-184<br>(SCBT)    |
| Carreau et al., 2002   | +/- | –   | –                                     | -/+                                                   | keine Angabe              |
| Pelletier et al., 2000 | +   | –   | –                                     | +/-                                                   | MC-20 (SCBT)              |
| Wilke, 2021            | +   | +/- | +/-                                   | –                                                     | NCL-L-ER-6F11             |

**Tab. 14. ERβ-Lokalisation im adulten Rattenhoden**

Zusammenfassung der publizierten Daten zur Lokalisation der ERβ-Expression mittels IF im adulten Rattenhoden im Vergleich zu den Erhebungen der vorliegenden Arbeit. Aufgrund der beschriebenen differenziellen ERβ-Expression des Keimepithels wurde zwischen basalen und apikalen Keimzellen unterschieden. + = positiv, – = negativ, +/- = überwiegend positiv, -/+ = überwiegend negativ.

| <b>ERβ</b>             | <b>LZ</b> | <b>SZ</b> | <b>Spermatogonien<br/>(basale Keimzellen)</b> | <b>Spermatozyten,<br/>Spermatiden<br/>(apikale Keimzellen)</b> | <b>applizierte<br/>Antikörper</b>                |
|------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Pelletier et al., 2000 | –         | +         | –                                             | –                                                              | 06-629 (Upstate Biotechnology)                   |
| Saunders et al., 1998  | –         | +         | +                                             | +/-                                                            | 196-213 aa of rat ERβ (Saunders 1997)            |
| Carreau et al., 2002   | +/-       | +         | –                                             | +/-                                                            | keine Angabe                                     |
| van Pelt et al., 1999  | –         | +         | +                                             | +/-                                                            | polyklonaler anti-ERβ Huhn-Antikörper (Homebrew) |
| Wilke, 2021            | +         | +/-       | +                                             | –                                                              | ERβ 503                                          |

Für das Enzym ARO hingegen gelang in der vorliegenden Arbeit kein spezifischer testikulärer Expressionsnachweis mittels IF-Färbung. Die Lokalisation des ARO-Signals entsprach in allen experimentellen Bedingungen der Kontroll-IgG-Färbung, was auf eine unspezifische Bindung des verfügbaren ARO-Primärantikörpers hindeutete. Zusätzlich deckt sich die beobachtete Lokalisation des ARO-Signals, welches sich überwiegend in basalen tubulären Zellen fand, die aufgrund ihres Vorkommens in der EAO-Gruppe und des dortigen Keimzellverlusts am ehesten SZ entsprachen, nicht mit den in der Literatur berichteten Lokalisationen: Bislang wurden Keimzellen und LZ als testikuläre Hauptexpressionsorte der ARO beschrieben (Carreau et al. 1999; 2003; 2011; Rochira et al. 2013) (Tab. 15). Mangels eines spezifischen ARO-IF-Signals konnte damit kein valider Vergleich der ARO-Expression zwischen entzündetem Hodengewebe und den Kontrollbedingungen erfolgen.

**Tab. 15. ARO-Lokalisation im adulten Rattenhoden**

Zusammenfassung der publizierten Daten zur ARO-Expression im adulten Rattenhoden, erhoben mittels qRT-PCR, Western Blot und IF, und Vergleich mit den IF-Befunden der vorliegenden Arbeit. + = positiv, – = negativ, +/- = überwiegend positiv, -/+ = überwiegend negativ, ++ = starke Expression, IF = IF-Daten der vorliegenden Arbeit.

| ARO                       | Immunlokalisation                                    |              | Proteinexpression                                    | mRNA-Expression                                      |
|---------------------------|------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Zelltyp                   | Carreau et al. 1999; 2003; 2011; Rochira et al. 2013 | IF           | Carreau et al. 1999; 2003; 2011; Rochira et al. 2013 | Carreau et al. 1999; 2003; 2011; Rochira et al. 2013 |
| interstitielle Zellen     | ++                                                   | +            | ++                                                   | ++                                                   |
| LZ                        | ++                                                   | keine Angabe | ++                                                   | ++                                                   |
| SZ                        | –                                                    | ++           | +                                                    | -/+                                                  |
| Keimzellen                |                                                      |              |                                                      |                                                      |
| - Spermatogonien          | +                                                    | –            | +                                                    | +                                                    |
| - pachytäne Spermatozyten | +                                                    | –            | +                                                    | +/-                                                  |
| - runde Spermatisden      | ++                                                   | –            | ++                                                   | +                                                    |
| - elongierte Spermatisde  | keine Angabe                                         | +            | ++                                                   | –                                                    |
| Ductuli efferentes        | keine Angabe                                         |              | keine Angabe                                         | +                                                    |

Die erfolgreiche EAO-Induktion im untersuchten Rattenhodengewebe wurde histologisch anhand einer interstitiellen Leukozyteninvasion, eines bereits fortgeschrittenen Keimzellverlusts und einer Fibrosierung des interstitiellen Kompartiments nachgewiesen (Fijak et al. 2011). Bei den EAO-Ratten bestand somit eine Veränderung der Zellzusammensetzung des Hodengewebes (Nicolas 2017; Fijak et al. 2018), die beim Vergleich der erhobenen Hormonrezeptorexpression zwischen EAO- und Kontrollgewebe zu berücksichtigen ist. Hierbei ist bemerkenswert, dass die veränderte Zellzusammensetzung des verwendeten EAO-Gewebes, soweit ohne quantitative Auswertung der Histologie zu beurteilen, keine LZ-Hyperplasie umfasste, wie teilweise in früheren Studien beschrieben wurde (Suescun, Calandra, und Lustig 1994).

Im Vergleich der EAO-Ratten mit den Kontrollgruppen ergab die IF-Färbung der Hormonrezeptoren bei den EAO-Ratten ein verändertes tubuläres ER $\alpha$ -Signal in Form einer reduzierten Anzahl der Vimentin-negativen ER $\alpha$ -positiven tubulären Zellen, sowie eine allgemein schwächere und weniger distinkte Ausprägung des ER $\alpha$ -Signals. Für die AR- und ER $\beta$ -Expression waren hingegen keine sicheren qualitativen Unterschiede zwischen EAO-Ratten und den Kontrollgruppen festzustellen. Die wesentliche Änderung des Hormonrezeptor-Expressionsnachweises bei EAO-Ratten gegenüber Kontrollen bestand zusammenfassend also in einer Reduktion Vimentin-negativer ER $\alpha$ -positiver

tubulärer Zellen, welche aufgrund ihrer basalen Lokalisation und der durchgeführten Doppelfärbungen am ehesten Spermatogonien entsprachen. Das veränderte tubuläre ER $\alpha$ -Signal bei EAO war somit durch den EAO-assoziierten Keimzellverlust erklärt. Ob eine darüberhinausgehende Reduktion der ER $\alpha$ -Expression in den verbleibenden Keimzellen, SZ oder insbesondere den LZ als ER $\alpha$ -Hauptexpressionsort im Sinne einer Zellfunktionsänderung vorlag, kann anhand der vorliegenden histologischen Befunde nicht abschließend entschieden werden.

Die Expression der Hormonrezeptoren AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurde zudem in den EAO-typischen interstitiell lokalisierten Leukozyten-Zellnestern untersucht, um erste Hinweise auf eine mögliche Wirkung von Androgenen und Östrogenen auf den testikulären Entzündungsprozess zu erhalten. Vorbehaltlich einer fehlenden spezifischen Leukozyten-Immunhistologie zeigten die Leukozyten-Zellnester bei EAO-Ratten eine ausgeprägte ER $\beta$ -Expression, jedoch keine Hinweise auf eine ausgeprägte AR- oder ER $\alpha$ -Expression. Bisherige Untersuchungen zur Hormonrezeptorexpression in Immunzellen zeigten eine Expression der drei Rezeptortypen AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf Leukozyten (Kovats 2015; S. Klein und Flanagan 2016), wobei spezifische Untersuchungen zur Rezeptorexpression in Immunzellen bei EAO nicht vorliegen. Für T-Zellen und Makrophagen, welche als die zentralen Immunzelltypen in der Pathogenese der EAO gelten (Fijak et al. 2018), wurden AR- und ER $\alpha$ -Expressionen beschrieben (Lai, Lai, Zeng, und Chuang 2012; Mantalaris et al. 2001; Dostalova, Zatecka, und Dvorakova-Hortova 2017; Aruna, Harmandeep, und Gurpreet 2014; Pierdominici et al. 2010). Hingegen wurde die ER $\beta$ -Expression in Makrophagen als geringfügig beschrieben und in T-Zellen bei Nagern bislang nicht nachgewiesen (Lambert et al. 2004; L  lu et al. 2011; Kovats 2015). Somit steht die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ausgeprägte ER $\beta$ -Expression in den Leukozyten-Zellnestern des EAO-Gewebes, vorbehaltlich der fehlenden Doppelfärbung und einer spezifischen Zellzuordnung, nicht im Einklang mit den Literaturbefunden. ER $\beta$  stellt zwar spezie  bergreifend eine der Hauptvarianten der Östrogenrezeptoren dar (Carreau et al. 2011; Cavaco et al. 2009), männliche ER $\beta$ KO Mäuse sind jedoch fertil, entwickeln sich normal und zeigen nur gering ausgeprägte Veränderungen des testikulären Parenchyms und insbesondere ein physiologisch reagierendes Immunsystem (Dupont et al. 2000; Rochira et al. 2013; Cunningham und Gilkeson 2011), sodass ER $\beta$  gegenüber ER $\alpha$  aktuell weiterhin eine nachrangige Rolle in der Immunmodulation zugewiesen wird (Kovats 2015; Hill et al. 2011).

## 4.2 Quantitative mRNA-Expression der testikulären Hormonrezeptoren bei EAO

Eine Quantifizierung des mRNA-Expressionsniveaus der testikulären Hormonrezeptoren mittels qRT-PCR gelang in der vorliegenden Arbeit für AR, ER $\alpha$  und LHR. Hingegen ergab sich für ER $\beta$  und ARO kein hinreichend stabiles Signal in der qRT-PCR, welches eine reliable Quantifizierung ihrer Expression erlauben würde. Bei EAO-Ratten fand sich im Vergleich zu unbehandelten Ratten eine signifikante Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression, während das AR-Expressionsniveau und das Expressionsniveau der LZ-Funktionsmarker SF-1 und StAR (Manna et al. 2016; Parker und Schimmer 1997) unverändert blieben. Hierbei schien die Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression ein EAO-spezifischer Effekt zu sein, da eine derartige Reduktion bei den Adjuvans-Kontrollen nicht auftrat, welche ebenfalls eine systemische Inflammation, aber keine spezifische testikuläre Entzündungsreaktion durchliefen.

Bei der Interpretation der mRNA-Expressionsniveaus, welche aus testikulären Gewebeshomogenaten – und nicht aus isolierten Zelltypen – bestimmt wurden, sind beim Vergleich von EAO-Ratten und Kontrolltieren Veränderungen der Zellzusammensetzung des entzündlich veränderten Gewebes bei EAO zu berücksichtigen (Fijak et al. 2018; Nicolas 2017; Guazzone et al. 2009). Das unveränderte AR-Expressionsniveau ist damit vereinbar, dass die Anzahl der LZ als testikulärer Hauptexpressionsort des AR (Rival et al. 2006) in der vorliegenden Arbeit bei EAO-Ratten in der histologischen Beurteilung nicht verändert war; auch nach Normalisierung des AR-Expressionsniveaus anhand des LZ-Funktionsmarkers SF-1 war kein Unterschied zwischen EAO-Ratten und Kontrolltieren festzustellen. Somit ergaben sich keine direkten Hinweise auf eine quantitative Expressionsänderung des AR bei EAO-Ratten.

Das reduzierte Expressionsniveau von ER $\alpha$  bei EAO-Ratten ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass der EAO-typische Keimzellverlust (Schuppe und Meinhardt 2005) eine Reduktion der Anzahl der ER $\alpha$ -exprimierenden Zellen bedeutet (Carreau et al. 2011; Rochira et al. 2013), wie mittels IF-Färbung nachgewiesen wurde. Ob *zusätzlich* zum Keimzellverlust eine Abnahme des ER $\alpha$ -Expressionsniveaus in LZ zum reduzierten ER $\alpha$ -Expressionsniveau beitrug – ob also ein Regulationsprozess des ER $\alpha$ -Expressionsniveaus im Rahmen der Inflammation vorlag – kann mittels der verwandten Methoden, insbesondere mangels Expressionsdaten auf Einzelzellebene, nicht abschließend entschieden werden.

Hingegen ist das reduzierte LHR-Expressionsniveau nicht durch den EAO-bedingten Keimzellverlust zu erklären, da die testikulären Keimzellen nicht in relevantem Maße

LHR exprimieren (Coonce et al. 2009). Das reduzierte LHR-Expressionsniveau im Gewebehomogenat ist auch deshalb nicht allein durch eine veränderte Zellzusammensetzung des entzündlichen Gewebes zu erklären, da die Anzahl der LZ als testikulärer Hauptexpressionsort des LHR (Lanciotti et al. 2018) in der vorliegenden Arbeit bei EAO-Ratten histologisch nicht verändert erschien und die Anzahl der LZ in vorangehenden Arbeiten sogar als erhöht beschrieben wurde (Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Auch nach Normalisierung des LHR-Expressionsniveaus mit dem LZ-Funktionsmarker SF-1 blieb eine signifikante Reduktion für LHR bei EAO-Ratten gegenüber Kontrollratten bestehen. Somit deutet das reduzierte LHR-Expressionsniveau im Gewebehomogenat auf eine reduzierte LHR-Expression in LZ im Rahmen der EAO als Ausdruck einer zellulär veränderten LHR-Regulation, falls zukünftige Versuche und zelltypspezifische Expressionsmessungen das Ergebnis replizieren können. LHR wird neben der führenden Expression auf LZ auch auf Leukozyten exprimiert, insbesondere auf testikulären Makrophagen (Aubry et al. 2000; Dixit et al. 2003). Angesichts der Invasion von Leukozyten in entzündetes Hodengewebe ist die beobachtete LHR-Verringerung bei EAO jedoch nicht durch eine leukozytäre LHR-Expressionsänderung zu erklären.

#### **4.3 Lokale Effekte der EAO auf die testikuläre Steroidogenese**

Physiologischerweise gelten LZ als Hauptexpressionsort des LHR (Coonce et al. 2009); eine Aktivierung des LHR durch LH bewirkt an den LZ eine Stimulation der Steroidogenese (Ascoli, Fanelli, und Segaloff 2002) und auch eine Stimulation der ARO-Aktivität (Armbruster, Berghold, und Blaeschke 2015; Fijak et al. 2011; Nieschlag et al. 2008). Die zellulären Wirkungen des LHR an LZ werden dabei unter anderem über cAMP-, Phospholipase C und Inositolphosphat-Signalwege vermittelt (Fanelli, Themmen, und Puett 2001; Ascoli, Fanelli, und Segaloff 2002). Entsprechend der physiologischen LHR-Wirkungen würde die beobachtete Reduktion der LHR-Expression in LZ bei EAO eine Reduktion der Androgensynthese durch eine reduzierte LH-Stimulierbarkeit der LZ bewirken. Somit wäre die beobachtete Reduktion der LHR-Expression aufgrund einer konsekutiv geringeren Testosteronsynthese gut mit den bei EAO beschriebenen reduzierten *systemischen* Testosteronkonzentrationen vereinbar (Fijak et al. 2011; Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Nicht direkt vereinbar ist die LHR-Reduktion jedoch mit den bei EAO-Ratten als erhöht (Suescun, Calandra, und Lustig 1994) bzw. als normwertig (Fijak et al. 2011) beschriebenen *testikulären* Testosteronspiegeln. Angesichts der stimulierenden Wirkung von LH auf die ARO-Aktivität (Armbruster,

Berhold, und Blaeschke 2015; Nieschlag et al. 2008; Arend und Dayer 1990; Evans et al. 1987) und damit auf die Konversion des Testosterons zu Östrogenen könnte die LHR-Reduktion bei EAO möglicherweise zusätzlich eine verminderte ARO-Aktivität bewirken und somit zu einer geringeren lokalen Testosteronkonversion und konsekutiv höheren lokalen Testosteronspiegeln führen. Mangels eines spezifischen ARO-Nachweises in der Immunhistochemie und mangels einer Quantifizierung der ARO-mRNA-Expression in qRT-PCR bleibt allerdings offen, ob die beobachtete LHR-Reduktion bei EAO-Ratten tatsächlich mit einer reduzierten ARO-Expression einherging. Die reduzierte testikuläre LHR-Expression ist nach dem Stand der Literatur nicht die Folge einer zentralen Störung der LH-Regulation. So wurden bei EAO-Ratten die LH-Konzentrationen (ebenso wie die FSH-Konzentrationen) als normwertig bzw. erhöht beschrieben (Suescun, Calandra, und Lustig 1994; Fijak et al. 2011) und ein intaktes negatives Feedback von Testosteron auf die LH-Sekretion (ebenso wie die FSH-Sekretion) nachgewiesen. Letzteres geschah durch den experimentellen Nachweis einer regulären LH- sowie FSH-Suppression durch Testosteron-Substitution bei EAO-Ratten (Fijak et al. 2011; Suescun, Calandra, und Lustig 1994; Kaur, Thompson, und Dufour 2014). Die reduzierte testikuläre LHR-Expression in der vorliegenden Arbeit und die beschriebene reduzierte Serumtestosteronkonzentration bei EAO entsprechen somit überwiegend einem primären Hypogonadismus als Ausdruck einer Organ- oder Zellfunktionsstörung des entzündeten Hodens (Eskandari, Webster, und Sternberg 2003; Straub et al. 2013).

Die beobachtete reduzierte LHR-Expression bei EAO ist ein Teilaspekt einer weitergehenden LZ-Funktionsstörung bei EAO. Die möglichen Ursachen dieser LZ-Funktionsstörung bei EAO, wie im Folgenden diskutiert, umfassen eine gestörte LZ-Stimulation durch lokale Gewebefaktoren, eine gestörte Interaktion der LZ mit testikulären Makrophagen und Auswirkungen der veränderten pro- und anti-inflammatorischen Zytokin-Konzentrationen.

Neben der Regulation der LZ-Funktion durch LH sowie durch auto- und parakrine Mechanismen beeinflussen auch die testikulären Keimzellen und SZ die LZ-Funktion, insbesondere hinsichtlich der Steroidogenese (Coonce et al. 2009; Nieschlag et al. 2010; Sambroni et al. 2013; Fijak et al. 2018). So zeigten LZ eine erhöhte Testosteronproduktionsrate (sowohl LH-abhängig als auch LH-unabhängig), wenn sie *in vitro* mit interstitieller Flüssigkeit aus Rattenhoden mit unterbrochener Spermatogenese inkubiert wurden (Murai et al. 1992; Papadopoulos 1991; Verhoeven und Cailleau 1985). Ähnliche

Effekte konnten *in vivo* bei tubulären Schäden gezeigt werden (Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Somit könnten Veränderungen der lokalen Gewebefaktoren bei EAO-Ratten mit gestörter Spermatogenese oder Tubulusschädigung zu einer Störung der LZ-Funktion beitragen (Schuppe et al. 2017; Fijak et al. 2011; Sharpe 1990).

Testikuläre Makrophagen modulieren durch Mediatoren und direkte Zell-Zell-Kontakte die Aktivität und Testosteronproduktion der LZ (Hutson 2006b) und spielen zugleich eine zentrale Rolle in der Pathogenese der EAO (Fijak et al. 2018). Wenn LZ *in vitro* mit Sekreten testikulärer Makrophagen kultiviert wurden, konnte eine Zunahme ihrer Testosteronsynthese beobachtet werden (Yee und Hutson 1985). Im Sekret der testikulären Makrophagen findet sich 25-Hydroxycholesterol, welches auch im Rattenhodengewebe nachgewiesen wurde (Lukyanenko et al. 2000; Lukyanenko, Chen, und Hutson 2001) und eine Testosteronvorstufe darstellt (Hutson 2006b). Anders als bei der StAR-abhängigen Testosteronsynthese benötigt 25-Hydroxycholesterol für die Metabolisierung zu Testosteron kein mitochondriales Transportprotein (Stocco et al. 2005). Es wird vermutet, dass die Aufrechterhaltung einer suffizienten Steroidogenese in StAR-KO-Mäusen auf diese alternative Testosteronsynthese zurückzuführen ist (Hutson 2006b; Lukyanenko, Chen, und Hutson 2002). Entsprechend wurden in Makrophagen-depletierten Hoden bei fehlender 25-Hydroxycholesterol-Bereitstellung signifikant niedrigere Testosteronwerte trotz scheinbar normaler LZ-Funktion detektiert (Brigham et al. 1997). Somit ist es vorstellbar, dass im Rahmen der EAO eine gestörte Interaktion testikulärer Makrophagen mit LZ eine Beeinträchtigung der Steroidogenese in LZ bewirkt.

Neben der beschriebenen Stimulation der Steroidogenese können Makrophagen diese auch inhibieren (Wu et al. 2016), beispielsweise durch Mediatoren wie NO oder IL-1 (Hales 2002). Gerade im Falle testikulärer Inflammation rücken nicht-klassische Signalwege wie Zytokin-vermittelte Mechanismen in den Vordergrund (Hedger und Meinhardt 2003). Derartige Mechanismen wurden bei testikulären Immunreaktionen als ein wesentlicher Faktor der Organdysfunktion beschrieben, hierbei wurden Mediatoren wie IL-1, IL-6, TGF, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  als pathogen eingeordnet (O'Bryan et al. 2005; Weissman et al. 2005). Physiologischerweise haben andere testikuläre Zytokine, wie Macrophage Migration inhibitory Factor (MIF) oder Stem Cell Factor (SCF), eine regulatorische parakrine Wirkung unter anderem auf LZ und Spermatogenese (Hedger und Meinhardt 2003). In Phasen der Rekonstitution nach testikulären Inflammationen wurde außerdem für anti-inflammatorische Zytokine (wie Transforming Growth Factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) und Wachstumsfaktoren (wie Epidermal Growth Factor, EGF) eine

stimulierende Wirkung auf Starterenzyme der Steroidogenese gezeigt (wie z. B. auf StAR) (Arend und Dayer 1990; Evans et al. 1987).

Pro-inflammatorische Zytokine (wie z. B. IL-1, IL-6, TGF, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) herrschen hingegen unter inflammatorischen Bedingungen vor (Hedger und Meinhardt 2003) und beeinträchtigen Steroidogenese und Spermatogenese (Guazzone et al. 2009). LZ exprimieren Bindungsstellen für eben jene genannten pro-inflammatorischen Zytokine (Mauduit et al. 1991; Kanzaki und Morris 1998) und werden, auch durch ihre exponierte Lage außerhalb der Blut-Hoden-Schranke, durch diese Zytokine beeinflusst (Hales, Diemer, und Hales 1999). Pro-inflammatorische Zytokine können in LZ *in vitro* und *in vivo* auf allen Ebenen die Steroidogenese inhibieren (Herrmann, Schölmerich, und Straub 2002), indem sie unter anderem in LZ eine Herabregulation von Starterenzymen wie StAR und Cytochrom P450scc induzieren (Leisegang, Bouic, und Henkel 2016). Pro-inflammatorische Zytokine inhibieren zudem die Enzyme 17- $\alpha$ -Hydroxylase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, sowie die Bildung von Dehydroepiandrosteron, welches dann als Vorstufe der Sexualhormone fehlt, und tragen so bei systemischen Inflammationen zu niedrigen Spiegeln der Sexualhormone bei (Hennebold und Daynes 1994; Schmidt et al. 2000). Die genannten Faktoren könnten grundsätzlich die LHR-Regulation bei EAO modifizieren, wenngleich eine solche Regulation weiterhin experimentell zu untersuchen bleibt.

Der auftretende Keimzellverlust im Rahmen der EAO und die niedrige testikuläre ER $\alpha$ -Expression könnten sich zudem gegenseitig verstärken: (1) ER $\alpha$  wirkt in Keimzellen anti-apoptotisch (Matthews und Gustafsson 2003; Sirianni et al. 2008; Pentikäinen et al. 2000; Villablanca et al. 2013); eine niedrige ER $\alpha$ -Expression im Rahmen der EAO könnte den Keimzelluntergang verschärfen. (2) ER $\alpha$  ist essenziell für einen intakten Flüssigkeits- und Spermientransport; Fehlfunktionen können über einen Flüssigkeitsrückstau zu zusätzlichen Keimepithelschädigungen führen (Eddy et al. 1996; Perez et al. 2012; Schuppe et al. 2008). Passend hierzu zeigen ER $\alpha$ KO Mäuse eine Oligospermie und verminderte Spermienmotilität (Eddy et al. 1996). Somit scheinen niedrige ER $\alpha$ -Expressionsniveaus einen Keimzellverlust zu begünstigen, der wiederum niedrigere ER $\alpha$ -Expressionsniveaus begünstigen würde.

#### **4.4 Systemische Effekte der EAO auf die Androgen- und Östrogenregulation**

Nicht allein lokale testikuläre Entzündungen, sondern auch systemische Entzündungen beeinträchtigen die männliche Fertilität (Segner, Verburg-van Kemenade, und Chadzinska 2017). So korrelieren erhöhte systemische Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine beim metabolischem Syndrom negativ mit der männlichen Fertilität (Fan et al. 2018). Neben einer reduzierten Fertilität wurde für Männer mit metabolischem Syndrom in Verbindung mit einer chronischen systemischen Inflammation auch ein hypogonadotroper, also sekundärer Hypogonadismus beschrieben (Leisegang, Henkel, und Agarwal 2019). Gleichmaßen zeigten Rattenmodelle mit diätinduzierter Adipositas, wiederum in Assoziation mit erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 und IL-6, einen testikulären Keimzellverlust (Yildirim et al. 2019). Auch chronische autoimmune Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose oder systemischer Lupus erythematoses, weisen häufig einen hypogonadotropen Hypogonadismus mit konsekutiver Hodendysfunktion bis hin zur Infertilität auf (Straub et al. 2013). Bei der rheumatoiden Arthritis als chronisch entzündlicher Erkrankung bestehen zudem zwar im Allgemeinen niedrige Serumtestosteronwerte, jedoch zeigt Testosteron seine niedrigsten Spiegel insbesondere bei Krankheitsschüben mit vermehrter Inflammation und höheren Zytokinspiegeln (Kanik et al. 2000).

Entzündungsassoziierte Zytokine beeinflussen also nicht nur die Steroidogenese im Hodengewebe, wie bereits erörtert, sondern auch die zentrale Regulation der Sexualhormone über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Hales 2002). Hypothalamus und Hypophyse weisen Bindungsstellen für pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ , auf (Pérez, Bottasoa, und Savino 2009), welche eine Beeinflussung der Hormonregulation durch systemische Entzündungsprozesse erlauben. Auch können entzündliche systemische Zytokin-Konstellationen eine hypothalamische Entzündungsreaktion bewirken (Lumeng und Saltiel 2011; Kamimura et al. 2019). Pro-inflammatorische Zytokin-Konstellationen können somit, zumindest teilweise über die genannten Mechanismen, die Freisetzung von GnRH und Gonadotropinen supprimieren (Turnbull und Rivier 1999; Thaler et al. 2012) und einen (additiven) hypogonadotropen Hypogonadismus bewirken (Thaler et al. 2012).

Die bei EAO-Ratten reduzierten Serumtestosteronspiegel sollten, falls der hypothalamisch-hypophysäre Feedbackmechanismus bei EAO intakt ist, im Hypothalamus eine verstärkte GnRH-Sekretion und konsekutiv in der Hypophyse eine vermehrte LH-Aus-

schüttung bewirken (Segner, Verborg-van Kemenade, und Chadzinska 2017). Bei EAO-Ratten wurden die LH-Konzentrationen als normwertig beschrieben (Suescun, Calandra, und Lustig 1994) und ein intaktes negatives Feedback von Testosteron auf die LH-Sekretion nachgewiesen (Fijak et al. 2011). Somit ist bei EAO zumindest nicht ausschließlich von einem hypogonadotropen Hypogonadismus auszugehen. Hierzu passend fand sich bei EAO-Ratten auch eine Erhöhung der FSH-Konzentrationen (Kaur, Thompson, und Dufour 2014; Fijak et al. 2011). Eine Störung der hypophysären Gonadotropin-Ausschüttung könnte auch durch möglicherweise (parallel zu den reduzierten Testosteron-Spiegeln) erhöhte Spiegel von Östrogenen entstehen (Koller et al. 2004) – hierüber liegen jedoch bislang keine eindeutigen Kenntnisse vor. Derartige erhöhte Östrogen-Spiegel würden nicht nur einen Abfall der Testosteron-Spiegel, sondern auch einen Abfall der LH- und FSH-Spiegel bewirken (Gill-Sharma et al. 2001; Goyal et al. 2001), was jedoch bei EAO, wie bereits genannt, nicht zu beobachten war.

Angesichts der bei EAO nicht reduzierten Gonadotropin-Konzentrationen, der intakten hypothalamisch-hypophysären Feedbackschleife und der erniedrigten Serumtestosteronkonzentrationen (Fijak et al. 2011; Suescun, Calandra, und Lustig 1994) kann einerseits ein rein sekundärer, hypogonadotroper Hypogonadismus bei EAO nicht belegt werden. Andererseits kann angesichts der lokal normwertigen bis erhöhten Testosteronkonzentrationen (Fijak et al. 2011; Suescun, Calandra, und Lustig 1994) und der in der vorliegenden Arbeit unveränderten SF-1- und StAR-Expression bei EAO, die für eine intakte LZ-Funktion spricht, auch ein rein primärer Hypogonadismus nicht gefolgert werden. Vielmehr deuten die Befunde auf eine *kombinierte* Störung, also auf Dysfunktionen auf zentraler und peripherer Ebene der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. So könnten im Rahmen einer kombinierten Störung mit primärem und sekundärem Hypogonadismus die Gonadotropine (niedrig) normal sein, obwohl erniedrigte Sexualhormonserumspiegel vorliegen. Eine derartige kombinierte hormonelle Störung wird als *Disproportion Principle* bezeichnet und wurde wiederholt bei systemischen Inflammationen beschrieben (Eskandari, Webster, und Sternberg 2003; Rivier, Rivier, und Vale 1986; Rivest und Rivier 1993; Straub et al. 2013; Moulton 2018). Angesichts der in der vorliegenden Arbeit reduzierten LHR-Expression bei EAO-Ratten ist jedoch, unabhängig von der zentralen Stimulation, davon auszugehen, dass ein primärer Hypogonadismus in Form einer verminderten Stimulierbarkeit der LZ durch Gonadotropine eine zentrale Komponente des Hypogonadismus bei EAO darstellt.

Bei entzündlichen Geschehen wird zusätzlich die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zuungunsten der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse induziert (Rivier und Rivest 1991; Foster et al. 2003). Insbesondere bei Critical Illness Diseases (CID), wie lebensbedrohlichen Zuständen durch Verbrennungen, Infektionen oder Traumen, werden hypothalamisch die GnRH-Sekretion supprimiert und die Sekretion des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) gesteigert, woraus reduzierte Gonadotropin-Spiegel und erhöhte ACTH-Spiegel resultieren. Hierdurch wird die Produktion von Androgenen in der Nebennierenrinde zugunsten von Glukokortikoiden verschoben (van den Berghe et al. 2001). Zwar erfolgt die Androgensynthese überwiegend testikulär, jedoch ist derjenige Anteil der Nebenniere an der Androgensynthese nicht zu vernachlässigen, der durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achsen-Aktivierung im Rahmen von CID zugunsten der Glukokortikoid-Synthese reduziert wird (Segner, Verburg-van Kemenade, und Chadzinska 2017; Müller 2007). Tatsächlich nehmen die Testosteronlevel bei CID teilweise so stark ab, dass es zu einer vorübergehenden Infertilität kommt (Spratt 2001). Eine Reduktion der adrenalen Testosteron-Synthese bei EAO könnte somit zumindest ein additiver Faktor in der Pathogenese der peripher reduzierten Testosteronwerte bei noch normalen lokalen Testosteronspiegeln sein.

Ein weiterer Aspekt bei lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen ist, dass es mechanisch (durch Leukozyteninvasion, Fibrose, Abszessbildungen) oder inflammatorisch bedingt durch Zytokinwirkung, beispielsweise bei Zentralisation des Kreislaufes oder durch lokale Regulationsmechanismen, zu Störungen der peripheren und damit auch testikulären Organdurchblutung kommen kann (Arena et al. 2017; Herwig et al. 2004; Meinhardt und Schuppe 2003). Hierdurch könnte eine verminderte Diffusion des Testosterons in den Blutkreislauf resultieren, was erniedrigte Serumtestosteronwerte und höhere lokale Testosteronspiegel ergeben würde (Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Entzündliche Erkrankungen sind zudem mit einer Aktivierung des Fettgewebes einschließlich einer dort gesteigerten peripheren ARO-Aktivität verbunden (Lumeng und Saltiel 2011). Aufgrund der vermehrten Konversion von Androgenen zu Östrogenen oder weniger wirksamen Androgenderivaten wird diese inflammatorische Stoffwechselveränderung als *Androgenverlust-Syndrom* bezeichnet (Castagnetta et al. 2003; Weidler et al. 2005; Straub et al. 2013). Tatsächlich wurde bei systemischen Infektionen und Autoimmunprozessen, wie systemischem Lupus erythematodes oder rheumatoider Arthritis, eine Steigerung der Konversion von Androgenen in Östrogene beschrieben (Castagnetta

et al. 2003). Die pro-inflammatorischen Zytokine, wie IL-6, IL-1 und der  $\text{TNF}\alpha$ , induzieren unter anderem in Adipozyten die ARO-Aktivität und steigern so die Metabolisierung von Androgenen zu Östrogenen (Herrmann, Schölmerich, und Straub 2002). Zytokin-abhängige ARO-Induktionen mit abfallenden Testosteronwerten wurden zuvor bereits bei bakteriellen Infektionen wie der Tuberkulose beschrieben (Wilder 1996).

Systemische Inflammationen können somit auf mehreren Wegen eine Reduktion der Serumkonzentration des Testosterons bewirken: Pro-inflammatorische Zytokine inhibieren bei systemischen Inflammationen die testikuläre Androgensynthese (im Sinne einer Kombination aus oben genannten Aspekten hinsichtlich eines primären und sekundären Hypogonadismus); zusätzlich stimulieren sie in *peripheren* Geweben die Androgenkonversion zu Östrogenen oder weniger wirksamen Androgenderivaten; hinzu kommt eine reduzierte Androgenproduktion in den Nebennieren. Die genannten Mechanismen sind für die EAO der Ratte, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, zwar jeweils nicht im Einzelnen belegt, jedoch aufgrund der mit der EAO assoziierten systemischen Entzündungsreaktion vorstellbar.

Veränderungen der *testikulären* ARO-Aktivität könnten einen Beitrag zur Diskrepanz zwischen den im *peripheren* Blut reduzierten Testosteronkonzentrationen gegenüber den normalen *testikulären* Testosteronkonzentrationen bei EAO leisten, wenngleich die vorliegende Arbeit diese Diskrepanz mangels einer quantitativen Erfassung der testikulären ARO-Expression nicht abschließend erklären kann. Die testikuläre ARO-Enzymaktivität wurde beim Nager überwiegend in Keimzellen und nachrangig in LZ und auch SZ beschrieben (Guazzone et al. 2009). Aufgrund des Keimzellverlusts bei EAO würde nun ein wesentlicher Anteil der ARO-exprimierenden Zellen fehlen, woraus eine geringere Metabolisierung von Androgenen zu Östrogenen folgen würde. Außerdem scheint die ARO-Induktion testikulär und peripher nicht gleichsinnig reguliert zu sein. So wird in LZ – im Gegensatz zu peripheren Adipozyten – keine ARO-Induktion durch Wachstumshormone und Zytokine auslöst (Arend und Dayer 1990; Evans et al. 1987). Die normalen lokalen testikulären Testosteronkonzentrationen bei EAO wären dann möglicherweise die Konsequenz einer geringeren testikulären ARO-Aktivität mit geringerer Androgenkonversion, sodass bei EAO scheinbar normale testikuläre Testosteronspiegel gemessen würden, obwohl die Synthese des Testosterons insgesamt zu niedrig bliebe, um normale Blutkonzentrationen zu erzielen.

#### **4.5 Auswirkungen der bei EAO veränderten Androgen- und Östrogenregulation auf die testikuläre Entzündungsreaktion**

Als wesentliche Veränderungen der Sexualhormone bei EAO konnten somit bislang lokal unveränderte bis erhöhte Testosteron- und systemisch reduzierte Testosteronkonzentrationen nachgewiesen werden. Für Östrogene liegen bei der EAO keine gesicherten Daten vor, jedoch gelten ihre Konzentrationen bei vielen systemischen Inflammationen als verändert und die vorliegende Arbeit weist durch die verminderte ER $\alpha$ -Expression in den LZ auf eine verminderte hormonelle Wirksamkeit hin, ohne Rückschlüsse auf die lokalen oder Serumkonzentrationen zuzulassen.

Die Expression der Hormonrezeptoren AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurde in den EAO-typischen interstitiell lokalisierten Leukozyten-Zellnestern untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Wirkung von Androgenen und Östrogenen auf den testikulären Entzündungsprozess zu erhalten. Vorbehaltlich einer fehlenden spezifischen Leukozyten-Immunhistologie zeigten die Leukozyten-Zellnester bei EAO-Ratten eine ausgeprägte ER $\beta$ -Expression, jedoch keine Hinweise auf eine ausgeprägte AR- oder ER $\alpha$ -Expression.

Bisherige Untersuchungen zur Hormonrezeptorexpression in Immunzellen zeigten eine Expression der drei Rezeptortypen AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$  in Leukozyten (Kovats 2015; S. Klein und Flanagan 2016; Murphy et al. 2009; Pierdominici et al. 2010). Hingegen wurde die ER $\beta$ -Expression in Makrophagen als geringfügig angegeben und in T-Zellen bei Nagern bislang nicht nachgewiesen (Lambert et al. 2004; L  lu et al. 2011; Kovats 2015). Somit steht die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ausgeprägte ER $\beta$ -Expression in den Leukozyten-Zellnestern des EAO-Gewebes, vorbehaltlich einer spezifischen Zellzuordnung, nicht im Einklang mit den Literaturbefunden. Spezifische Untersuchungen zur Rezeptorexpression, insbesondere für Östrogenrezeptoren, bei EAO liegen nicht vor, jedoch ist der Nachweis von Sexualhormonrezeptoren auf EAO-vermittelnden Leukozyten zumindest ein weiterer Hinweis darauf, dass Androgene/  strogene eine modulierende Wirkung auf den Entzündungsprozess der EAO haben können – wenngleich festzuhalten ist, dass die vorliegende Arbeit diese Modulation nicht weitergehend experimentell untersuchte, da bei EAO-Ratten weder das Hormonniveau noch das Rezeptorexpressionsniveau bei EAO-Ratten experimentell manipuliert wurden.

Die testikulären Immunzellen weisen, wie oben ausgeführt, einige Besonderheiten auf: Als wichtigste Vertreter unter physiologischen Bedingungen gelten Makrophagen und T-Zellen, weitere testikuläre Immunzellen umfassen dendritische Zellen, Monozyten und Mastzellen. Da in allen diesen Immunzellen ein Nachweis von Steroidhormonrezeptoren

erfolgte (für eine ausführliche Darstellung vergleiche 1.2.2.1.2.5), ist ein Einfluss der Steroidhormone auch auf die testikulären Leukozyten wahrscheinlich. Insbesondere für Makrophagen und T-Zellen, welche als die zentralen Immunzelltypen in der Pathogenese der EAO gelten (Schuppe et al. 2008; Fijak et al. 2005; 2018), wurden AR- und ER $\alpha$ -Expressionen beschrieben. Östrogene stimulieren oder reduzieren in Makrophagen konzentrationsabhängig die Zytokinproduktion, Antigenerkennung und das Phagozytoseverhalten (Hsieh et al. 2009; Bachy, Williams, und Ibrahim 2008; S. Klein und Flanagan 2016; Khan und Ansar 2016), während für Androgene eine Stimulation des Makrophagenrecruitments sowie eine Reduktion der Zytokinproduktion beschrieben sind (Gilliver et al. 2006; D'Agustino et al. 1999; Jaillon, Berthenet, und Garlanda 2019). Bezogen auf die EAO ist die lokale Östrogenkonzentration nicht bekannt, weshalb Rückschlüsse auf die meist *konzentrationsabhängige* Wirkungsentfaltung spekulativ bleiben. Falls die lokalen Östrogenkonzentrationen *niedrig* sein sollten, was angesichts der lokal als erhöht gemessenen Testosteronkonzentrationen, des niedrig exprimierten LHR als fehlenden Stimulus zur Östrogenproduktion, des Keimzellverlusts mit einhergehendem Verlust von in der Literatur beschriebenen ARO-exprimierenden Zellen und des niedrigen ER $\alpha$ -Expressionsniveaus wahrscheinlich erscheint, würde dies laut Literatur in Makrophagen zu einer *Induktion* der IL-1, IL-6 und TNF-Zytokin-Produktion sowie gesteigertem Phagozytose- und Sekretionsverhalten führen (Hsieh et al. 2009; Bachy, Williams, und Ibrahim 2008; S. Klein und Flanagan 2016).

T-Zellen werden bereits während ihrer Differenzierung in den lymphoiden Organen von Östrogenen (Lindberg et al. 2002; Erlandsson et al. 2001) und Androgenen beeinflusst (Flores et al. 1999; Olsen und Kovacs 2001; Heng et al. 2005; Gubbels Bupp und Jorgensen 2018). Es wurde für Östrogene eine anti-apoptotische Wirkung in Lymphozyten nahegelegt (Selvaraj et al. 2005; Douin-Echinard et al. 2011), die zugleich die Ausdifferenzierung autoreaktiver Lymphozyten und damit Ausbildung von Autoimmunerkrankungen begünstigt (Lindberg et al. 2002; Liva und Voskuhl 2001). So zeigt der weibliche Organismus entsprechend eine höhere CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Ratio und eine höhere Anzahl aktivierter T-Zellen, insbesondere pro-inflammatorischer Th1-Helferzellen (S. Klein und Flanagan 2016). Bei T-Lymphozyten liegt laut Literatur ebenfalls eine dosisabhängige Komponente der Östrogenwirkung vor: Niedrige Östrogenkonzentrationen führen zu pro-inflammatorischen Th1-Zellantworten mit einer gesteigerten IFN $\gamma$ -Produktion (Straub 2007). Hohe Östrogenspiegel gehen mit einer Stimulation der Differenzierung und Proliferation regulatorischer T-Zellen einher (S. Klein und Flanagan

2016; Polanczyk et al. 2005; Tai et al. 2007). Außerdem gelang durch eine Östrogensubstitution eine Abschwächung der Autoimmunreaktion im Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis, die als T-Zell-vermittelt gilt (Pettersson et al. 2004). Androgene hingegen supprimieren die Zytokinproduktion, fördern die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen und supprimieren pro-inflammatorische Th1-Zellen (Gubbels Bupp und Jorgensen 2018; Lai, Lai, Zeng, und Chuang 2012; Klein und Flanagan 2016; Walecki et al. 2015; Benten et al. 2004). Gerade letztere hormonelle Immunmodulation zeigt weitreichende Konsequenzen. Da Th1-Zellen als essenziell für die Erkennung entarteter körpereigener Zellen gelten, führt man auf ihre Suppression die höhere Inzidenz maligner Erkrankungen beim männlichen Geschlecht zurück (Trigunaite, Dimo, und Jorgensen 2015).

Interessanterweise zeigen sich im EAO-Tiermodell gerade  $CD4^+$  T-Zellen, also pro-inflammatorische Th1-Zellen, führend bei der Induktion der Entzündungsreaktion (Mahi-Brown, Yule, und Tung 1987). Es bestehen in der inflammatorischen Phase eine erhöhte  $CD4^+/CD8^+$  Ratio und gesteigerte Zytokinexpression (Guazzone et al. 2009; Nicolas, Michel, et al. 2017). Entsprechend der oben aufgeführten Überlegungen wäre in der Annahme *niedriger* lokaler Östrogenspiegel im Rahmen der EAO somit eine *Verschärfung* der inflammatorischen Konstellation mit erhöhter  $CD4^+/CD8^+$  Ratio und gesteigerter Zytokinexpression vorstellbar. Hinsichtlich der Induktion von  $CD4^+$  T-Zellen durch niedrige Östrogenspiegel könnten Östrogene eine wichtige Rolle gerade im Anfangsstadium der EAO einnehmen. Derartige *niedrige* Östrogenlevel könnten eine Komponente der gestörten Homöostase des testikulären Immunprivilegs sein.

Für Androgene konnte gezeigt werden, dass eine niedrig-dosierte Testosteronsubstitution in EAO-Ratten die Ausbildung einer manifesten Orchitis in den Tieren auf 17% reduzieren konnte (verglichen mit 80% ohne Substitution), während eine hochdosierte Testosteronsubstitution einen geringeren Effekt zeigte (Reduktion auf 33%) (Fijak et al. 2011). Zurückgeführt wurde diese protektive Testosteronwirkung unter anderem auf die anti-inflammatorische Wirkung des Testosterons, insbesondere auf die FoxP3-vermittelte Förderung der regulatorischen T-Zellproliferation (Walecki et al. 2015; Fijak et al. 2015). Experimentelle Manipulationen der Östrogenlevel in der EAO wurden noch nicht durchgeführt, wären jedoch interessant, insofern auch für Östrogene eine Wirkung auf den Transkriptionsfaktor FoxP3 beschrieben wurde (Nie et al. 2015).

Wenngleich in der vorliegenden Arbeit eine abschließende Bewertung der Hormonrezeptoren-Expression in EAO-vermittelnden Leukozyten nicht möglich ist, lässt

der Nachweis einer Expression von Androgen-/Östrogen-Hormonrezeptoren auf EAO-vermittelnden Leukozyten eine modulierende Wirkung von Androgenen und Östrogenen auf die Pathogenese der EAO zumindest grundsätzlich möglich erscheinen.

#### **4.6 Limitationen des experimentellen Vorgehens**

Die Auswirkungen der EAO auf die testikuläre Androgen- und Östrogenregulation wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der Expression der zugehörigen *Hormonrezeptoren* des testikulären Gewebes untersucht. Wenngleich dieses Vorgehen nicht ungewöhnlich ist (Klein und Flanagan 2016; Kovats 2015; Pelletier, Labrie, und Labrie 2000; Dumasia et al. 2015), erlaubt das Expressionsniveau der Hormonrezeptoren direkte Aussagen weder über die systemische oder lokale *Hormonkonzentration* noch über die tatsächliche *Hormonwirkung* an den Zielzellen (Jaillon, Berthenet, und Garlanda 2019). Eine direkte Quantifizierung der Hormonkonzentration, insbesondere im entnommenen Gewebe, ist für Steroidhormone trotz technischer Fortschritte weiterhin herausfordernd (Wudy et al. 2018). Das Expressionsniveau der klassischen Androgen- und Östrogenrezeptoren, wie AR, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, erlaubt außerdem keine Aussagen über diejenigen Hormonwirkungen, welche über andere Rezeptortypen des jeweiligen Hormons und nicht-klassische Signalwege vermittelt werden (Dumasia et al. 2015).

Das testikuläre mRNA-Expressionsniveau der untersuchten Hormonrezeptoren wurde anhand von *Gewebehomogenaten* bestimmt, sodass keine *zelltypspezifischen* Aussagen über das Expressionsniveau möglich sind. So könnten Veränderungen der mRNA-Expression bei EAO aus einem veränderten Expressionsniveau derjenigen Zelltypen, welche das untersuchte Gen exprimieren, und/oder aus einer veränderten Zellzusammensetzung des entzündeten Gewebes resultieren (z. B. veränderte Zellularität bei EAO durch Leukozyteninvasion, Keimzellverlust, oder möglicherweise auch LZ-Hyperplasie) (Fijak, Bhushan, und Meinhardt 2010; Schuppe und Meinhardt 2005; Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Zur Einordnung der erhobenen mRNA-Expressionsniveaus, insbesondere der reduzierten ER $\alpha$ - und LHR-Expression, wurden ergänzende Untersuchungen berücksichtigt, wie der histologische Nachweis eines Verlusts ER $\alpha$ -positiver Keimzellen bzw. der fehlende histologische Nachweis eines LZ-Verlusts. Zur Einordnung der reduzierten LHR-Expression erfolgte außerdem eine Normalisierung des LHR-mRNA-Expressionsniveaus anhand des bei EAO-Ratten konstant exprimierten LZ-Funktionsmarkers SF-1, welche das reduzierte LHR-Expressionsniveau bestätigte. Jedoch gilt auch

für LZ-Funktionsmarker, dass ihr Expressionsniveau im Gewebehomogenat abhängig von der Zellularität (konkret: LZ-Zellzahl) und dem Expressionsniveau innerhalb der LZ ist, sodass eine bei EAO laut Literatur mögliche LZ-Hyperplasie eine reduzierte Expression der LZ-Funktionsmarker innerhalb der LZ verbergen könnte (Manna et al. 2016; Suescun, Calandra, und Lustig 1994). Somit erlaubt die Normalisierung des Gewebeexpressionsniveaus anhand von LZ-Funktionsmarkern, wie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen, zwar eine nähere Einordnung der LHR-Expressionsreduktion, kann eine Expressionsmessung auf Einzelzellniveau dennoch nicht ersetzen (z. B. mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung).

Während eine Quantifizierung des testikulären mRNA-Expressionsniveaus für AR, ER $\alpha$  und LHR gelang, ergab sich für ER $\beta$  und ARO jeweils *kein* hinreichend stabiles qRT-PCR-Signal trotz Etablierungsversuchen mit verschiedenen Primern, um eine reliable Quantifizierung des Expressionsniveaus vorzunehmen. Mögliche Erklärungsansätze hierfür bestehen in den sehr niedrigen RNA-Konzentrationen für Östrogenrezeptoren und ARO im Hodengewebe (Cavaco et al. 2009; Carreau et al. 1999) und der möglichen weiteren Reduktion der RNA-Konzentrationen durch den DNase-Verdau, welcher zur Reduktion der genomischen DNA methodisch notwendig war (Taylor et al. 2010).

Limitationen ergaben sich auch in der IF-Färbung des ARO-Proteins. Der eingesetzte ARO-Antikörper ergab zwar regelrechte Autofluoreszenz- und Negativkontrollen, jedoch auch ein positives Signal in der IgG-Kontrolle, welches den Bindungsstellen des Primärantikörpers entsprach. Eine unspezifische Bindung des eingesetzten ARO-Primärantikörpers ist deshalb anzunehmen.

Die Expression der testikulären Hormonrezeptoren bei EAO wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich *punktuell* zu einzelnen Zeitpunkten untersucht (50 bzw. 80 Tage nach EAO-Induktion), welche ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit bereits deutlichem Keimzellverlust widerspiegeln, nicht aber longitudinal zu mehreren Zeitpunkten in der Entwicklung der EAO. Somit konnten Veränderungen der Rezeptorexpression in frühen Krankheitsstadien, in welchen möglicherweise andere Entzündungsaktivitäten und Androgen-/Östrogenkonzentrationen bestehen, sowie mögliche dynamische Veränderungen der Rezeptorexpression nicht abgebildet werden.

#### 4.7 Methodische Optimierungsansätze und Perspektive

Um eine präzisere Zuordnung der Hormonrezeptor-Expression zu testikulären *Zelltypen* vornehmen zu können, sollten zukünftige Untersuchungen die Immunfluoreszenz-basierte Färbung der Hormonrezeptoren mit weiteren zellspezifischen Färbungen kombinieren (Doppelfärbungen), insbesondere für LZ und SZ. Derartige zellspezifische Färbungen in Verbindung mit quantitativen Auswertungsmethoden (z.B. quantitative Morphometrie, Durchflusszytometrie) würden es erlauben, Veränderungen der Zellularität des entzündeten Hodengewebes (z. B. durch Leukozyteninvasion, Keimzellverlust, oder eventuell auch LZ-Hyperplasie) zu erfassen und in Beziehung zu Veränderungen der Hormonrezeptor-Expression zu setzen. Solche Doppelfärbungen sollten nicht nur tubuläre und interstitielle Zelltypen, sondern auch invadierende Leukozyten abbilden und subtypisieren, um so Hinweise auf die Hormonrezeptor-Expression der Leukozyten zu erhalten. Um zelltypspezifische Veränderungen der Hormonrezeptor-Expression in einer *quantitativen* Weise zu erfassen, wären zusätzlich Expressionsmessungen auf Einzelzellebene notwendig, wie z. B. RNA-Einzelzellsequenzierungen (J. Guo et al. 2018; Sohni et al. 2019).

Um Veränderungen der Androgen-/Östrogen-Regulation bei EAO in das hormonelle Gesamtsystem der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse einzuordnen, sollten die Messungen der Androgen-/Östrogen-Rezeptorexpression, welche in der vorliegenden Arbeit erfolgten, um Messungen der Expression von nicht-klassischen Hormonrezeptoren (z. B. GPER als zusätzlicher Östrogen-Rezeptor) und der Gonadotropin-Rezeptorexpression (z. B. FSH-Rezeptor) erweitert werden. Zu einer möglichen immunmodulatorischen Wirkung von Gonadotropinen, insbesondere am Hodengewebe, ist bislang wenig bekannt (Hutson 1992; Geierhaas et al. 1991; Ojeifo et al. 1990). Jedoch exprimieren Immunzellen Bindungsstellen für LH und FSH, Lymphozyten zeigen unter LH-/FSH-Einfluss gesteigerte Proliferationsraten und Zytokin-Expressionsniveaus (Carbone et al. 2010; Dixit et al. 2003) und FSH stimuliert die Makrophagen-Aktivität (K. Zhang et al. 2019).

Idealerweise würden nicht nur Expressionsniveaus der *Hormonrezeptoren*, sondern auch die tatsächlichen systemischen und lokalen *Hormonkonzentrationen* quantifiziert, wenngleich die direkte Quantifizierung von Steroidhormonen weiterhin methodisch schwierig ist, unter anderem aufgrund kurzer Halbwertszeiten, zirkadianer Konzentrationsschwankungen und hoher struktureller Ähnlichkeiten der Steroidderivate (Wudy 2018; Jaillon, Berthenet, und Garlanda 2019). Zusätzlich sollten die Untersuchungen der

Hormonrezeptor-Expressionsniveaus und Hormonkonzentrationen nicht auf späte Krankheitsstadien limitiert bleiben, sondern bereits frühere Krankheitsstadien und nach Möglichkeit mehrere Zeitpunkte abdecken, um so mögliche dynamische Veränderungen der Hormonregulation im EAO-Verlauf offenzulegen.

Zur Beantwortung der Frage, ob die reduzierten systemischen Testosteronkonzentrationen bei EAO aus einer vermehrten testikulären Konversion von Androgenen zu Östrogenen resultieren, wird ein wichtiger Schritt sein, das testikuläre Expressionsniveau der ARO zu quantifizieren, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit bislang nicht gelungen. Für diesen Schritt scheinen weitere methodische Optimierungen der ARO-Antikörper und ARO-spezifischen PCR-Primer sowie Anpassungen der Aufbereitung der Gewebekomponenten (unter anderem Optimierung des DNase-Verdau) notwendig zu sein, um dann eine Quantifizierung des ARO-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bzw. auf Proteinebene mittels Western Blot vorzunehmen. Analoge Optimierungen erscheinen auch für die Quantifizierung des Expressionsniveaus von ER $\beta$  notwendig.

Während der Fokus der vorliegenden Arbeit darauf lag, die Konsequenzen der EAO auf die Regulation der testikulären Androgen- und Östrogen-Hormonrezeptoren zu untersuchen, so sind die Konsequenzen der EAO-assoziierten hormonellen Veränderungen auf den Entzündungsprozess ebenfalls weitergehend zu untersuchen. Eine Testosteronsubstitution scheint schützend auf den EAO-Verlauf zu wirken (Fijak et al. 2011; Walecki et al. 2015). Jedoch ist bislang nicht untersucht, ob eine experimentelle Manipulation des Expressionsniveaus der Androgen-/Östrogenrezeptoren den Entzündungsprozess der EAO modulieren würde. Diese Frage könnte anhand des Verlaufs und der Schwere der EAO bei Hormonrezeptor-knock out Tiermodellen untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Androgene und Östrogene scheinen immunmodulatorisch auf den Krankheitsverlauf der experimentellen Autoimmunorchitis (EAO) zu wirken. Insbesondere für Testosteron wurde eine protektive Wirkung nachgewiesen, denn eine Substitution von Testosteron, dessen Blutkonzentrationen bei EAO-Ratten reduziert sind, inhibierte die Krankheitsaktivität. Bislang ist jedoch ungeklärt, ob bei EAO entzündungsbedingte Veränderungen der testikulären Expression der Sexualhormonrezeptoren auftreten, welche ihrerseits die testikuläre Organfunktion und Entzündung beeinflussen könnten. Frühere Untersuchungen zeigten zudem eine Diskrepanz zwischen reduzierten systemischen Testosteronkonzentrationen und normwertigen lokalen Testosteronkonzentrationen bei EAO. Dabei ist ungeklärt, ob Testosteron im Rahmen der EAO einer vermehrten lokalen Konversion zu Östrogenen unterworfen ist.

Die testikuläre Expression des Androgenrezeptors (AR), der Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) sowie des Enzyms Aromatase (ARO) wurde bei Ratten mit EAO im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten und Adjuvans-Kontrollen untersucht. Hierzu wurden die Proteinexpression und -lokalisation mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung von testikulären Gewebeschnitten und die mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) von Gewebekomogenaten bestimmt. Zudem wurden die mRNA-Expressionsniveaus des luteinisierenden Hormonrezeptors (LHR) und der Leydig-Zell-Funktionsmarker Steroidogenic Factor 1 (SF-1) und Steroidogenic acute regulatory Protein (StAR) erhoben.

Mittels IF nachgewiesen wurde eine AR-Expression in Leydig-Zellen (LZ), Sertoli-Zellen (SZ) und peritubulären Zellen (PTZ), eine ER $\alpha$ -Expression in LZ, SZ, PTZ, Spermatogonien und frühen post-meiotischen Keimzellen, sowie eine ER $\beta$ -Expression ubiquitär in Zellen des Interstitiums und teilweise des Keimepithels. EAO-Ratten zeigten verglichen mit Kontrollen eine Reduktion des tubulären ER $\alpha$ -Signals, zu erklären durch den EAO-bedingten Keimzellverlust, und einen Expressionsnachweis von ER $\beta$  in den EAO-spezifischen Leukozytenzellnestern, ansonsten jedoch keine qualitativen Expressionsunterschiede für AR und ER $\beta$ . Die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR ergab eine signifikante Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression bei EAO-Ratten, während das Expressionsniveau des AR und der LZ-Funktionsmarker SF-1 und StAR unverändert blieb. Die Reduktion der ER $\alpha$ - und LHR-Expression bestätigte sich jeweils nach Normalisierung mit dem LZ-Funktionsmarker

SF-1. Für ARO gelangen weder die spezifische Färbung mittels IF noch die reliable Quantifizierung mittels qRT-PCR.

Während die Reduktion der ER $\alpha$ -Expression vorwiegend auf den EAO-bedingten Keimzellverlust zurückzuführen war, resultierte die reduzierte LHR-Expression bei EAO nicht aus einem LZ-Verlust, sondern deutete auf eine veränderte LZ-Funktion hin. Eine reduzierte Stimulierbarkeit der LZ durch das luteinisierende Hormon könnte eine Komponente der reduzierten systemischen Testosteronkonzentrationen bei EAO sein. Weitere Untersuchungen, insbesondere der ARO-Expression, sind notwendig, um eine eventuell vermehrte lokale Konversion von Testosteron zu Östrogenen bei EAO zu beurteilen. Zukünftige Arbeiten sollten quantitative Analysen der Proteinexpression für AR, Östrogenrezeptoren, LHR und ARO anstreben, idealerweise differenziert nach Zelltyp, und die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Expressionsniveaus der Sexualhormonrezeptoren mit einer direkten Messung lokaler und systemischer Östrogenkonzentrationen bei EAO Ratten validieren.

## 6 Summary

Androgens and oestrogens appear to exert immunomodulatory effects on the disease course of experimental autoimmune orchitis (EAO). Protective effects have been demonstrated particularly for testosterone, the blood levels of which are reduced in EAO rats, as substitution of testosterone inhibited disease activity. However, it has not yet been established whether inflammation-related alterations of the testicular expression of sex hormone receptors occur in EAO, which might in turn influence testicular organ function and inflammation. Previous studies moreover showed a discrepancy between reduced systemic levels of testosterone and normal local levels of testosterone in EAO. Hereby, it remains to be established whether testosterone underlies an increased local conversion to oestrogens in EAO.

Testicular expression of the androgen receptor (AR), the oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and the enzyme aromatase (ARO) were assessed in rats with EAO in comparison with untreated control rats and adjuvant controls. Protein expression and localisation were determined in testicular tissue sections by immunofluorescence (IF) staining, while mRNA expression levels were determined in tissue homogenates by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Additionally, mRNA expression levels of the luteinising hormone receptor (LHR) and the Leydig cell function markers steroidogenic factor 1 (SF-1) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) were quantified.

IF staining demonstrated AR-expression in Leydig cells (LZ), Sertoli cells (SZ) and peritubular cells (PTZ), ER $\alpha$ -expression in LZ, SZ, PTZ, spermatogonia and early post-meiotic germ cells, as well as ER $\beta$ -expression in all interstitial cells and partially in cells of the germinal epithelium. In comparison with controls, EAO rats exhibited a reduction of the tubular ER $\alpha$ -signal, explained by the EAO-related germ cell loss, and expression of ER $\beta$  in the EAO-specific leucocyte nests, but otherwise no qualitative differences of AR- and ER $\beta$ -expression. Quantitative assessment of mRNA expression levels by qRT-PCR demonstrated significant reduction of ER $\alpha$ - and LHR-expression in EAO rats, while expression levels of AR and the LZ function markers SF-1 and StAR remained unchanged. The reduced expression levels of both ER $\alpha$  and LHR were each confirmed after normalisation with the LZ function marker SF-1. Specific staining and reliable qRT-PCR quantification were not successful for the enzyme ARO.

While the reduced ER $\alpha$ -expression can be explained by the EAO-related germ cell loss, the reduced LHR-expression in EAO animals did not result from LZ loss, but rather indicated altered LZ function. Reduced stimulability of LZ by the luteinising hormone might contribute to the reduced systemic testosterone levels observed in EAO. Further studies, particularly of ARO-expression, are needed to assess a potentially increased local conversion of testosterone to oestrogens in EAO. Future research might aim at quantitative analyses of the protein expression levels of AR, oestrogen receptors, LHR and ARO, ideally differentiated by cell type, and validate the expression levels of sex hormone receptors attained in the present work by direct measurement of local and systemic oestrogen levels in EAO rats.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdullah, M, PS Chai, MY Chong, ER Tohit, R Ramasamy, CP Pei, und S Vidyadaran. 2012. 'Gender Effect on in Vitro Lymphocyte Subset Levels of Healthy Individuals'. *Cellular Immunology* 272 (2): 214–19. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.10.009>.
- Ahmed, SA, WJ Penhale, und N Talal. 1985. 'Sex Hormones, Immune Responses, and Autoimmune Diseases'. *The American Journal of Pathology* 121 (3): 531–51.
- Airas, L. 2015. 'Hormonal and Gender-Related Immune Changes in Multiple Sclerosis'. *Acta Neurologica Scandinavica* 132 (199): 62–70. <https://doi.org/10.1111/ane.12433>.
- Akingbemi, B, R Ge, C Rosenfeld, L Newton, D Hardy, J Catterall, D Lubahn, KS Korach, und M Hardy. 2003. 'Estrogen Receptor- $\alpha$  Gene Deficiency Enhances Androgen Biosynthesis in the Mouse Leydig Cell'. *Endocrinology* 144 (1): 84–93. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220292>.
- Altuwaijri, S, KH Chuang, KP Lai, JJ Lai, HY Lin, FM Young, A Bottaro, et al. 2009. 'Susceptibility to Autoimmunity and B Cell Resistance to Apoptosis in Mice Lacking Androgen Receptor in B Cells'. *Molecular Endocrinology* 23 (4): 444–453. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0106>.
- Ambruster, M, S Berhold, und F Blaesche. 2015. *Biochemie Des Menschen*. Edited by Florian Horn. 6. Stuttgart: Thieme.
- Ammar, T, S Sidhu, und CJ Wilkins. 2012. 'Male Infertility: The Role of Imaging in Diagnosis and Management'. *British Journal of Radiology* 85: 59–68. <https://doi.org/10.1259/bjr/31818161>.
- Antal, MC, A Krust, P Chambon, und M Mark. 2008. 'Sterility and Absence of Histopathological Defects in Nonreproductive Organs of a Mouse ER $\beta$ -Null Mutant'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2433–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712029105>.
- Arena, S, R Iacona, P Antonuccio, T Russo, V Salvo, E Gitto, P Impellizzeri, und C Romeo. 2017. 'Medical Perspective in Testicular Ischemia-Reperfusion Injury'. *Experimental and Therapeutic Medicine* 13 (5): 2115–22. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4289>.
- Arend, WP, und JM Dayer. 1990. 'Cytokines and Cytokine Inhibitors or Antagonists in Rheumatoid Arthritis'. *Arthritis Ans Rheumatism* 33 (3): 305–15. <https://doi.org/10.1002/art.1780330302>.
- 'ARO and ER in Adult Male Rat Gonad'. n.d. Aromatase Expression and Role of Estrogens in Male Gonad: A Review. Accessed 1 June 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC155680/>.
- Aruna, B, KS Harmandeep, und K Gurpreet. 2014. 'Sex Hormones and Immune Dimorphism'. *The Scientific World Journal* 2014: 1–8.
- Ascoli, M, F Fanelli, und DL Segaloff. 2002. 'The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, a 2002 Perspective'. *Endocrine Reviews* 23 (2): 141–74. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0462>.
- Ashcroft, GS, und SJ Mills. 2002. 'Androgen Receptor-Mediated Inhibition of Cutaneous Wound Healing'. *Journal of Clinical Investigation* 110 (5): 615–24. <https://doi.org/10.1172/JCI15704>.
- Aslani, F, HC Schuppe, B Sudhanshu, V.A. Guazzone, E Wahle, G. Lochnit, L Lustig, A. Meinhardt, und M. Fijak. 2015. 'Targeting High Mobility Group Box Protein I Ameliorates Testicular Inflammation in Experimental Autoimmune Orchitis'. *Human*

- Reproduction* 30 (2): 417–31. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu320>.
- Aubry, F, C Habasque, AP Satie, B Jegou, und M Samson. 2000. ‘Expression and Regulation of the CC-Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-I in Rat Testicular Cells in Primary Culture’. *Biology of Reproduction* 62 (5): 1427–35. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1427>.
- Aumüller, G., G Aust, A Doll, J Engele, J Kirsch, S Mense, D Reißig, et al. 2014. *Duale Reihe - Anatomie*. 3. Stuttgart: Thieme.
- Bachy, V, DJ Williams, und Ibrahim. 2008. ‘Altered Dendritic Cell Function in Normal Pregnancy’. *Journal of Reproductive Immunology* 78 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.09.004>.
- Balasinor, NH, R D’Souza, P Nanaware, S Idicula-Thomas, N Kedia-Mokashi, Z He, und M Dym. 2010. ‘Effect of High Intratesticular Estrogen on Global Gene Expression and Testicular Cell Number in Rats’. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 (72). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-72>.
- Bebo, BF Jr., JC Schuster, AA Vandenbark, und H Offner. 1999. ‘Androgens Alter the Cytokine Profile and Reduce Encephalitogenicity of Myelin-Reactive T Cells’. *Journal of Immunology* 162 (1): 35–40.
- Benten, WP, Z Guo, J Krücken, und F Wunderlich. 2004. ‘Rapid Effects of Androgens in Macrophages’. *Steroids* 69 (8–9): 585–90. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2004.05.007>.
- Benten, WP, M Lieberherr, O Stamm, C Wrehlke, Z Guo, und F Wunderlich. 1999. ‘Testosterone Signaling through Internizable Surface Receptors in Androgen Receptor-Free Macrophages’. *Molecular Biology of the Cell* 10 (10): 3113–23. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3113>.
- Berghe, G van den, P Wouters, F Weekers, C Verwaest, F Bruyninckx, M Schetz, D Vlasselaers, P Ferdinande, P Lauwers, und R Bouillon. 2001. ‘Intensive Insulin Therapy in the Critically Ill Patients’. *New England Journal of Medicine* 345 (19): 1359–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011300>.
- Bhushan, S, und A Meinhardt. 2017. ‘The Macrophages in Testis Function’. *Journal of Reproductive Immunology* 119: 107–12. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.06.008>.
- Bhushan, S, S Tchatalbachev, Y Lu, S Fröhlich, M Fijak, V Vijayan, T Chakraborty, und A Meinhardt. 2015. ‘Differential Activation of Inflammatory Pathways in Testicular Macrophages Provides a Rationale for Their Subdued Inflammatory Capacity’. *Journal of Immunology* 194 (11): 5455–5464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401132>.
- Bizzaro, A, G Valentini, G Di Martino, A DaPonte, A De Bellis, und G Iacono. 1987. ‘Influence of Testosterone Therapy on Clinical and Immunological Features of Autoimmune Diseases Associated with Klinefelter’s Syndrome’. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64 (1): 32–36. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-32>.
- Bois, C, C Delalande, M Nurmio, M Parvinen, L Zanatta, J Toppari, und S Carreau. 2010. ‘Age- and Cell-Related Gene Expression of Aromatase and Estrogen Receptors in the Rat Testis’. *Journal of Molecular Endocrinology* 45 (3): 147–159. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0041>.
- Bove, RM, B Healy, A Augustine, A Musallam, T Gholipour, und T Chitnis. 2012. ‘Effect of Gender on Late-Onset Multiple Sclerosis’. *Multiple Sclerosis Journal* 18 (10): 1472–79. <https://doi.org/10.1177/1352458512438236>.
- Brigham, DE, G Little, YO Lukyanenko, und JC Hutson. 1997. ‘Effects of Clodronate-

- Containing Liposomes on Testicular Macrophages and Leydig Cells in Vitro'. *Journal of Endocrinology* 155 (1): 87–92. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1550087>.
- Bustin, SA, V Benes, J Garson, J Hellems, J Huggett, M Kubista, R Mueller, et al. 2009. 'The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments'. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Butterworth, M, B McClellan, and M Allansmith. 1967. 'Influence of Sex in Immunoglobulin Levels'. *Nature* 214: 1224–25. <https://doi.org/10.1038/2141224a0>.
- Capone, I, P Marchetti, PA Ascierto, W Malorni, and L Gabriele. 2018. 'Sexual Dimorphism of Immune Responses: A New Perspective in Cancer Immunotherapy'. *Frontiers in Immunology* 9 (552). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00552>.
- Carbone, F, C Procaccini, V De Rossa, C Alviggi, G De Placido, S Longobardi, and G Matarese. 2010. 'Divergent Immunomodulatory Effects of Recombinant and Urinary-Derived FSH, LH, and HCG on Human CD4+ T Cells'. *Journal of Reproductive Immunology* 85 (2): 172–79. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.02.009>.
- Carreau, S, C Bois, L Zanatta, FRMB Silva, H Bouraima-Lelong, and C Delalande. 2011. 'Estrogen Signaling in Testicular Cells'. *Life Sciences* 89 (15–16): 584–87. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.004>.
- Carreau, S, and RA Hess. 2010. 'Oestrogens and Spermatogenesis'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 1517–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0235>.
- Carreau, S, S Lambard, C Delalande, D Denis-Galeraud, B Bilinska, and S Bourguiba. 2003. 'Aromatase Expression and Role of Estrogens in Male Gonad: A Review'. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 (35): 1–6. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-35>.
- Carreau, S, S Bourguiba, S Lambard, I Galeraud-Denis, C Genissel, and J Levallet. 2002. 'Molecular and Cellular Endocrinology Reproductive System: Aromatase and Estrogens'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 193 (1–2): 137–43. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00107-7).
- Carreau, S, G Genissel, B Bilinska, and J Levallet. 1999. 'Sources of Oestrogen in the Testis and Reproductive Tract of the Male'. *International Journal of Andrology* 22 (4): 211–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1999.00172.x>.
- Carreras, E, S Turner, V Paharkova-Vatchkova, A Mao, C Dascher, and S Kovats. 2008. 'Estradiol Acts Directly on Bone Marrow Myeloid Progenitors to Differentially Regulate GM-CSF or Flt3 Ligand-Mediated Dendritic Cell Differentiation'. *Journal of Immunology* 180 (2): 727–38. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.727>.
- Castagnetta, LA, G Carruba, OM Granata, R Stefano, M Miele, and M Schmidt. 2003. 'Increased Estrogen Formation and Estrogen to Androgen Ratio in the Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis'. *Journal of Rheumatology* 30 (12): 2597–2605.
- Cavaco, JEB, SS Laurentino, A Barros, M Sousa, and S Socorro. 2009. 'Estrogen Receptors Alpha and Beta in Human Testis: Both Isoforms Are Expressed'. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 55 (4): 137–44. <https://doi.org/10.3109/19396360902855733>.
- Chang, C, YT Chen, SD Yeh, Q Xu, RS Wang, F Guillou, H Lardy, and S Yeh. 2004. 'Infertility with Defective Spermatogenesis and Hypotestosteronemia in Male Mice Lacking the Androgen Receptor in Sertoli Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (18): 6876–6881.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0307306101>.
- Chen, W, I Beck, W Schober, K Brockow, R Effner, JT Buters, H Behrendt, und J Ring. 2010. 'Human Mast Cells Express Androgen Receptors but Treatment with Testosterone Exerts No Influence on IgE-Independent Mast Cell Degranulation Elicited by Neuromuscular Blocking Agents'. *Experimental Dermatology* 19 (3): 302–4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00969.x>.
- Cheng, J, SC Watkins, und WH Walker. 2007. 'Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Src Kinase and the Epidermal Growth Factor Receptor in Sertoli Cells'. *Endocrinology* 148 (5): 2066–2074. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1465>.
- Chimento, A, R Sirianni, C Bois, C Delalande, S Ando, M Maggiolini, S Aquila, S Carreau, und V Pezzi. 2010. 'Gper and ESRs Are Expressed in Rat Round Spermatids and Mediate Oestrogen-Dependent Rapid Pathways Modulating Expression of Cyclin B1 and Bax'. *International Journal of Andrology* 34 (5): 420–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x>.
- Chimento, A, R Sirianni, C Delalande, D Silandre, C Bois, S Ando, M Maggiolini, S Carreau, und V Pezzi. 2010. '17 $\beta$ -Estradiol Activates Rapid Signaling Pathways Involved in Rat Pachytene Spermatocytes Apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ '. *Molecular and Cellular Endocrinology* 320 (1–2): 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.035>.
- Chuang, KH, S Altuwaijri, G Li, JJ Lai, CY Chu, KP Lai, HY Lin, et al. 2009. 'Neutropenia with Impaired Host Defense against Microbial Infection in Mice Lacking Androgen Receptor'. *Journal of Experimental Medicine* 206 (5): 1181–1199. <https://doi.org/10.1084/jem.20082521>.
- Clark, BJ, J Wells, SR King, und DM Stocco. 1994. 'The Purification, Cloning, and Expressioonf a Novel Luteinizing Hormone-Induced Mitochondrial Protein in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 28314–22.
- Cooke, PS, MK Nanjapp, C Ko, GS Prins, und RA Hess. 2017. 'Estrogens in Male Physiology'. *Physiological Reviews* 97 (3): 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>.
- Coonce, MM, AC Rabideau, S McGee, K Smith, und P Narayan. 2009. 'Impact of a Constitutively Active Luteinizing Hormone Receptor on Testicular Gene Expression and Postnatal Leydig Cell Development'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 298 (1–2): 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.016>.
- Corcoran, MP, M Meydani, AH Lichtenstein, EJ Schaefer, und S Lamon-fava. 2010. 'Sex Hormone Modulation of Proinflammatory Cytokine and CRP Expression in Macrophages from Older Men and Postmenopausal Women.' *Journal of Endocrinology* 206 (2): 217–224. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0057>.
- Cowley, SM, S Hoare, S Mosselman, und MG Parker. 1997. 'Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Form Heterodimers on DNA'. *Journal of Biological Chemistry* 272 (32): 19858–19862. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19858>.
- Cunningham, M, und G Gilkeson. 2011. 'Estrogen Receptors in Immunity and Autoimmunity'. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 40: 66–73. <https://doi.org/10.1007/s12016-010-8203-5>.
- Curran, EM, LJ Berghaus, NJ Verneti, AJ Saporita, DB Lubahn, und DM Estes. 2001. 'Natural Killer Cells Express Estrogen Receptor- $\alpha$  and Estrogen Receptor- $\beta$  and Can Respond to Estrogen Via a Non-Estrogen Receptor- $\alpha$ -Mediated Pathway'. *Cellular Immunology* 214 (1): 12–20. <https://doi.org/10.1006/cimm.2002.1886>.

- Cutulo, SR, A Sulli, S Capellino, B Villagio, P Montagna, und B Serio. 2004. 'Sex Hormones Influence on the Immune System: Basic and Clinical Aspects in Autoimmunity.' *Lupus* 13 (9): 635–638.
- D'Agustino, P, S Milano, C Barbera, G Di Bella, M La Rosa, V Ferlazzo, R Farruggio, et al. 1999. 'Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophages'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 876 (1): 426–429. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07667.x>.
- Delbès, G, C Levacher, C Pairault, C Racine, C Duquenne, A Krust, und R Habert. 2004. 'Estrogen Receptor Beta-Mediated Inhibition of Male Germ Cell Line Development in Mice by Endogenous Estrogens during Perinatal Life'. *Endocrinology* 145 (7): 3395–3403. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1479>.
- Dixit, VD, R Sridaran, MA Edmonson, D Taub, und WE Thompson. 2003. 'Gonadotropin-Releasing Hormone Attenuates Pregnancy-Associated Thymus Involution and Modulates the Expression of Antiproliferative Gene Product Prohibitin'. *Endocrinology* 144 (4): 1496–1505. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220955>.
- Doncel, GF, JA Di Paola, und L Lustig. 1989. 'Sequential Study of the Histopathology and Cellular and Humoral Immune Response during the Development of an Autoimmune Orchitis in Wistar Rats'. *American Journal of Reproductive Immunology* 20 (2): 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1989.tb00638.x>.
- Dostalova, P, E Zatecka, und K Dvorakova-Hortova. 2017. 'Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction'. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5): 904. <https://doi.org/10.3390/ijms18050904>.
- Douin-Echinard, V, B Calippe, A Billon-Gallès, C Fontaine, F Lenfant, F Tremollères, F Bayard, JVC Guéry, JF Arnal, und P Gourdy. 2011. 'Estradiol Administration Controls Eosinophilia through Estrogen Receptor-Alpha Activation during Acute Peritoneal Inflammation'. *Journal of Leukocyte Biology* 90 (1): 145–54. <https://doi.org/10.1189/jlb.0210073>.
- Du, S, F Sandoval, P Trinh, E Umeda, und RR Voskuhl. 2011. 'Estrogen Receptor-β Ligand Treatment Modulates Dendritic Cells in the Target Organ during Autoimmune Demyelinating Disease'. *European Journal of Immunology* 41 (1): 140–50. <https://doi.org/10.1002/eji.201040796>.
- Duan, YG, CF Yu, N Novak, T Bieber, CH Zhu, HC Schuppe, G Haidl, und JP Allam. 2011. 'Immunodeviation towards a Th17 Immune Response Associated with Testicular Damage in Azoospermic Men'. *International Journal of Andrology* 34 (6): 536–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01137.x>.
- Dudek, P, und D Picard. 2008. 'Genomics of Signaling Crosstalk of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells'. *PLoS One* 3 (3): 1859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001859>.
- Dumasia, K, A Kumar, L Kadam, und NH Balasinar. 2015. 'Effect of Estrogen Receptor-Subtype-Specific Ligands on Fertility in Adult Male Rats'. *Journal of Endocrinology* 225 (3): 169–80. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0045>.
- Dupont, S, A Krust, A Gansmuller, A Dierich, P Chambon, und M Mark. 2000. 'Effect of Single and Compound Knockouts of Estrogen Receptors Alpha (ERalpha) and Beta (ERbeta) on Mouse Reproductive Phenotypes'. *Development* 127 (19): 4277–4791.
- Durkee, TJ, M Mueller, und M Zinaman. 1998. 'Identification of Estrogen Receptor Protein and Messenger Ribonucleic Acid in Human Spermatozoa'. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 178 (6): 1288–1297. <https://doi.org/10.1016/S0002->

9378(98)70335-7.

- Dym, M, and DW Fawcett. 1970. 'The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium'. *Biology of Reproduction* 3 (3): 308–326. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/3.3.308>.
- Eddy, EM, TF Washburn, DO Bunch, EH Goulding, BC Gladen, DB Lubahn, and KS Korach. 1996. 'Targeted Disruption of the Estrogen Receptor Gene in Male Mice Causes Alteration of Spermatogenesis and Infertility'. *Endocrinology* 137 (11): 4796–4805. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895349>.
- Erlandsson, MC, C Ohlsson, JA Gustafsson, and H Carlsten. 2001. 'Role of Oestrogen Receptors Alpha and Beta in Immune Organ Development and in Oestrogen-Mediated Effects on Thymus'. *Immunology* 103 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01212.x>.
- Escribese, MM, T Kraus, E Rhee, A Fernandez-Sesma, CB López, and TM Moran. 2008. 'Estrogen Inhibits Dendritic Cell Maturation to RNA Viruses'. *Blood* 112 (12): 4574–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-148692>.
- Eskandari, F, JI Webster, and EM Sternberg. 2003. 'Neural Immune Pathways and Their Connection to Inflammatory Diseases'. *Arthritis Research and Therapy* 5: 251–65. <https://doi.org/10.1186/ar1002>.
- 'Estrogen Signaling Pathway'. n.d. Estrogen Signaling PathwayRat Genome Database. Accessed 1 May 2019. [https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc\\_id=PW:0000507&species=Rat](https://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW:0000507&species=Rat).
- Evans, CT, CJ Corbin, CT Saunders, JC Merrill, ER Simpson, and CR Mendelson. 1987. 'Regulation of Estrogen Biosynthesis in Human Adipose Stromal Cells. Effects of Dibutyryl Cyclic AMP, Epidermal Growth Factor, and Phorbol Esters on the Synthesis of Aromatase Cytochrome P-450'. *Journal of Biological Chemistry* 262 (14): 6914–6920.
- Fan, W, Y Xu, Y Lui, Z Zhang, L Lu, and Z Ding. 2018. 'Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility'. *Frontiers in Physiology* 8: 1117. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01117>.
- Fanelli, F, APN Themmen, and D Puett. 2001. 'Lutropin Receptor Function: Insights from Natural, Engineered and Computer-Simulated Mutations'. *IUBMB Life* 51 (3): 149–55. <https://doi.org/10.1080/152165401753544214>.
- Feng, F, J Nyland, M Banyai, A Tatum, AE Silverstone, and J Gavalchin. 2010. 'The Induction of the Lupus Phenotype by Estrogen Is via an Estrogen Receptor-Alpha-Dependent Pathway'. *Clinical Immunology* 134 (2): 226–36. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.10.004>.
- Fietz, D, C Ratzenböck, K Hartmann, O Raabe, S Kliesch, W Weidner, J Klug, and M Bergmann. 2014. 'Expression Pattern of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and G-protein-coupled Estrogen Receptor 1 in the Human Testis'. *Histochemistry and Cell Biology* 142: 421–432. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1216-z>.
- Fijak, M, A Pilatz, MP Hedger, N Nicolas, S Bhushan, V Michel, KSK Tung, HC Schuppe, and A. Meinhardt. 2018. 'Infectious, Inflammatory and “autoimmune” Male Factor Infertility: How Do Rodent Models Inform Clinical Practice?' *Human Reproduction Update* 24 (4): 416–41. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy009>.
- Fijak, M, LJ Damm, JP Wenzel, F Aslani, F Eisel, S Bhushan, H Hackstein, et al. 2015.

- ‘Influence of Testosterone on Inflammatory Response in Testicular Cells and Expression of Transcription Factor Foxp3 in T Cells.’ *American Journal of Reproductive Immunology* 74 (1): 12–25. <https://doi.org/doi:10.1111/aji.12363>.
- Fijak, M, E Schneider, J Klug, S Bhushan, H Hackstein, G Schuler, M Wygrecka, J Gromoll, und A Meinhardt. 2011. ‘Testosterone Replacement Effectively Inhibits the Development of Experimental Autoimmune Orchitis in Rats: Evidence for a Direct Role of Testosterone on Regulatory T Cell Expansion’. *Journal of Immunology* 186 (9): 5162–72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001958>.
- Fijak, M, S Bhushan, und A Meinhardt. 2010. ‘Immunoprivileged Sites: The Testis.’ In *Suppression and Regulation of Immune Responses*, 677:459–70. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, NJ: Humana Press.
- Fijak, M., R Iosub, E Schneider, M Linder, K Respondek, J Klug, und A. Meinhardt. 2005. ‘Identification of Immunodominant Autoantigens in Rat Autoimmune Orchitis’. *Journal of Pathology* 207 (2): 127–38. <https://doi.org/10.1002/path.1828>.
- Filardo, E, J Quinn, Y Pang, C Graeber, S Shaw, J Dong, und P Thomas. 2007. ‘Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane.’ *Endocrinology* 148 (7): 3236–3245. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1605>.
- Fisher, CR, KH Graves, AF Parlow, und ER Simpson. 1998. ‘Characterization of Mice Deficient in Aromatase (ArKO) Because of Targeted Disruption of the Cyp19 Gene’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12): 6965–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6965>.
- Fitzpatrick, F, F Lepault, F Homo-Delarche, JF Bach, und M Dardenne. 1991. ‘Influence of Castration, Alone or Combined with Thymectomy, on the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse’. *Endocrinology* 129 (3): 1382–1390. <https://doi.org/10.1210/endo-129-3-1382>.
- Fix, C, C Jordan, P Cano, und WH Walker. 2004. ‘Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase and the CAMP Response Element Binding Protein Transcription Factor in Sertoli Cells’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30): 10919–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404278101>.
- Fliegel, HC, U Rolle, R Metzger, S Gfoerer, und D Kluth. 2011. ‘Embryology of the Testicular Descent’. *Seminars in Pediatric Surgery* 20 (3): 170–75. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2011.03.007>.
- Flores, KG, J Li, GD Sempowski, BF Haynes, und LP Hale. 1999. ‘Analysis of the Human Thymic Perivascular Space during Aging’. *Journal of Clinical Investigation* 104 (8): 1031–1039. <https://doi.org/10.1172/JCI7558>.
- Foster, SC, C Daniel, DN Boudette, und BF Jr. Bebo. 2003. ‘Dysregulation of the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis’. *Journal of Neuroimmunology* 140 (1–2): 78–87. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(03\)00177-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(03)00177-2).
- Free, MJ, und RA Jaffe. 1979. ‘Collection of Rete Testis Fluid from Rats without Previous Efferent Duct Ligation’. *Biology of Reproduction* 20: 269–278.
- Ge, R, G Chen, und MP Hardy. 2009. ‘The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function’. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636:255–69. New York: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_14).

- Geierhaas, B, SR Bornstein, H Iarry, WA Scherbaum, Herrmann, und EF Pfeiffer. 1991. 'Morphological and Hormonal Changes Following Vasectomy in Rats, Suggesting a Functional Role for Leydig-Cell Associated Macrophages'. *Horm Metab Res* 23 (8): 373–78. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1003704>.
- Giefing-Kröll, C, P Berger, G Lepperdinger, und B Grubeck-Loebenstein. 2015. 'How Sex and Age Affect Immune Responses, Susceptibility to Infections, and Response to Vaccination'. *Aging Cell* 14 (3): 309–21. <https://doi.org/10.1111/ace1.12326>.
- Gilliver, SC, JJ Ashworth, SJ Mills, MJ Hardman, und GS Ashcroft. 2006. 'Androgens Modulate the Inflammatory Response during Acute Wound Healing'. *Journal of Cell Science* 119 (4): 722–32. <https://doi.org/10.1242/jcs.02786>.
- Gill-Sharma, M, S D'Souza, V Padwal, NH Balasinar, M Aleem, P Parte, und H Juneja. 2001. 'Antifertility Effects of Estradiol in Adult Male Rats'. *Journal of Endocrinological Investigation* 24 (8): 598–607. <https://doi.org/10.1007/BF03343900>.
- Gould, ML, PR Hurst, und HD Nicholson. 2007. 'The Effects of Oestrogen Receptors Alpha and Beta on Testicular Cell Number and Steroidogenesis in Mice'. *Reproduction* 134 (2): 271–79. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0025>.
- Goyal, HO, TD Braden, M Mansour, CS Williams, A Kamaleldin, und KK Srivastava. 2001. 'Diethylstilbestrol-Treated Adult Rats with Altered Epididymal Sperm Numbers and Sperm Motility Parameters, but without Alterations in Sperm Production and Sperm Morphology'. *Biology of Reproduction* 64 (3): 927–934. <https://doi.org/doi:10.1095/biolreprod64.3.927>.
- Griesbeck, M, S Ziegler, S Laffont, N Smith, K Chauveau, und et. al. 2015. 'Sex Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Levels of IRF5 Drive Higher IFN- $\alpha$  Production in Women'. *Journal of Immunology* 195 (11): 5327–5336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501684>.
- Griswold, A, und RR Behringer. 2009. 'Fetal Leydig Cell Origin and Development'. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation* 3 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1159/000200077>.
- Guazzone, VA, P Jacobo, MS Theas, und L Lustig. 2009. 'Cytokines and Chemokines in Testicular Inflammation: A Brief Review'. *Microscopy Research and Technique* 72 (8): 620–28. <https://doi.org/10.1002/jemt.20704>.
- Gubbels Bupp, MR, und TN Jorgensen. 2018. 'Androgen-Induced Immunosuppression'. *Frontiers in Immunology* 9: 794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00794>.
- Gubbels Bupp, MR. 2015. 'Sex, the Aging Immune System, and Chronic Disease'. *Cellular Immunology* 294 (2): 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.002>.
- Guo, Jingtao, Edward J. Grow, Hana Mlcochova, Geoffrey J. Maher, Cecilia Lindskog, Xichen Nie, Yixuan Guo, et al. 2018. 'The Adult Human Testis Transcriptional Cell Atlas'. *Cell Research* 28 (12): 1141–57. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>.
- Guo, Z, WP Benten, J Krücken, und F Wunderlich. 2002. 'Nongenomic Testosterone Calcium Signaling: Genotropic Actions in Androgen Receptor-Free Macrophages'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29600–29607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202997200>.
- Haidl, G., und W. Weidner. 2002. 'Epididymitis Und Orchitis - Klinisch-Andrologische Implikationen'. *Reproduktionsmedizin, Andrologie*, 18: 61–65.

- <https://doi.org/10.1007/s00444-002-0328-4>.
- Hales, DB. 2002. 'Testicular Macrophage Modulation of Leydig Cell Steroidogenesis'. *Journal of Reproductive Immunology* 57 (1–2): 3–18. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(02\)00020-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(02)00020-7).
- . 2007. 'Regulation of Leydig Cell Function as It Pertains to the Inflammatory Response'. In *The Leydig Cell in Health and Disease*, edited by MP Hardy and AH Payne, 305–22. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Hales, DB, T Diemer, and KH Hales. 1999. 'Role of Cytokines in Testicular Function'. *Endocrine* 10 (3): 201–17. <https://doi.org/10.1007/BF02738619>.
- Halvorson, L, UB Kaiser, and WW Chin. 1996. 'Stimulation of Luteinizing Hormone Beta Gene Promoter Activity by the Orphan Nuclear Receptor, Steroidogenic Factor-1'. *Journal of Biological Chemistry* 271 (12): 6645–50.
- Hamden, K, D Silandre, C Delalande, A Elfeki, and S Carreau. 2008. 'Protective Effects of Estrogens and Caloric Restriction during Aging on Various Rat Testis Parameters'. *Asian Journal of Andrology* 10 (6): 837–45. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2008.00430.x>.
- Hammes, A, TK Andreassen, R Spoelgen, J Raila, N Hubner, H Schulz, J Metzger, et al. 2005. 'Role of Endocytosis in Cellular Uptake of Sex Steroids'. *Cell* 122 (5): 751–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.032>.
- Hammes, SR, and ER Levin. 2007. 'Extranuclear Steroid Receptors: Nature and Actions'. *Endocrine Reviews* 28 (7): 726–741. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0022>.
- Hannah, MF, VB Bajic, and SL Klein. 2008. 'Sex Differences in the Recognition of and Innate Antiviral Responses to Seoul Virus in Norway Rats'. *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (4): 503–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.005>.
- Hao, S, J Zhao, J Zhou, S Zhao, Y Hu, and Y Hou. 2007. 'Modulation of 17 $\beta$ -Estradiol on the Number and Cytotoxicity of NK Cells in Vivo Related to MCM and Activating Receptors'. *International Immunopharmacology* 7 (13): 1765–1775. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.09.017>.
- Harbo, HF, R Gold, and M Tintoré. 2013. 'Sex and Gender Issues in Multiple Sclerosis'. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 6 (4): 237–48. <https://doi.org/10.1177/1756285613488434>.
- Hatakeyama, H, M Nishizawa, A Nakagawa, S Nakano, T Kigoshi, and K Uchida. 2002. 'Testosterone Inhibits Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells'. *FEBS Letters* 530 (1–3): 129–32. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03440-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03440-3).
- Head, JR, and RE Billingham. 1985. 'Immune Privilege in the Testis. II. Evaluation of Potential Local Factors.' *Transplantation* 40 (3): 269–275.
- Hedger, MP, and DB Hales. 2006. 'Immunophysiology of the Male Reproductive Tract'. In *Physiology of Reproduction*, 3rd ed., 1195–1286. Amsterdam: Academic Press.
- Hedger, MP, and A Meinhardt. 2003. 'Cytokines and the Immune-Testicular Axis'. *Journal of Reproductive Immunology* 58 (1): 1–26. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(02\)00060-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(02)00060-8).
- Hemendinger, RA, P Gores, L Blackstein, V Harley, and C Halberstadt. 2002. 'Identification of a Specific Sertoli Cell Marker, Sox9, for Use in Transplantation'. *Cell Transplantation* 11 (6): 499–505.
- Heng, TS, GL Goldberg, DH Gray, JS Sutherland, AP Chidgey, and RL Boyd. 2005. 'Effects of Castration on Thymocyte Development in Two Different Models of

- Thymic Involution'. *Journal of Immunology* 175 (5): 2982–2993. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2982>.
- Hennebold, JD, und RA Daynes. 1994. 'Regulation of Macrophage Dehydroepiandrosterone Sulfate Metabolism by Inflammatory Cytokines'. *Endocrinology* 135 (1): 67–75. <https://doi.org/10.1210/endo.135.1.8013393>.
- Herrmann, M, J Schölmerich, und RH Straub. 2002. 'Influence of Cytokines and Growth Factors on Distinct Steroidogenic Enzymes in Vitro: A Short Tabular Data Collection'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966: 166–186. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04213.x>.
- Herwig, R, K Tosun, GM Pinggera, E Soelder, KT Moeller, L Pallwein, F Frauscher, G Bartsch, L Wildt, und K Illmensee. 2004. 'Tissue Perfusion Essential for Spermatogenesis and Outcome of Testicular Sperm Extraction (TESE) for Assisted Reproduction'. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21 (5): 175–80. <https://doi.org/10.1023/B:JARG.0000031251.57848.04>.
- Hess, RA, und PS Cooke. 2018. 'Estrogen in the Male: A Historical Perspective'. *Biology of Reproduction* 99 (1): 27–44. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox043>.
- Hess, RA. 2003. 'Estrogen in the Adult Male Reproductive Tract: A Review'. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 (52). <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-1-52>.
- Hill, L, V Jeganathan, P Chinnasamy, C Grimaldi, und B Diamond. 2011. 'Differential Roles of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in Control of B-Cell Maturation and Selection.' *Molecular Medicine* 17 (3–4): 211–20. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00172>.
- Hirata, S, T Shoda, J Kato, und K Hoshi. 2003. 'Isoform/Variant MRNAs for Sex Steroid Hormone Receptors in Humans.' *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14 (3): 124–129. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(03)00028-6).
- Ho, KJ, und JK Liao. 2002. 'Nonnuclear Actions of Estrogen'. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (12): 1952–1961. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000041200.85946.4a>.
- Holm, A, KE Andersson, I Nordström, P Hellstrand, und BO Nilsson. 2010. 'Down-Regulation of Endothelial Cell Estrogen Receptor Expression by the Inflammation Promoter LPS'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 319 (1–2): 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.002>.
- Holstein, AF, W Schulze, und M Davidoff. 2003. 'Understanding Spermatogenesis Is a Prerequisite for Treatment'. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 (107). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107>.
- Hou, J, und WF Zheng. 1988. 'Effect of Sex Hormones on NK and ADCC Activity of Mice'. *International Journal of Immunopharmacology* 10 (1): 15–22. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90145-2](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90145-2).
- 'How Hormones Work'. n.d. How Hormones Work- Concepts of Biology. Accessed 1 May 2019. <https://opentextbc.ca/biology/chapter/18-2-how-hormones-work/>.
- Hsieh, CH, EA Nickel, J Chen, MG Schwacha, MA Choudhry, KI Bland, und IH Chaudry. 2009. 'Mechanism of the Salutary Effects of Estrogen on Kupffer Cell Phagocytic Capacity Following Trauma-Hemorrhage: Pivotal Role of Akt Activation'. *Journal of Immunology* 182 (7): 4406–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803423>.
- Huckstorf, C. 2013. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Edited by J Huppelsberg und K Walter. 4. Stuttgart: Thieme.
- Hussein, MR, ES Abou-Deif, MA Bedaiwy, TM Said, MG Mustafa, W Nada, A Ezat,

- und A Agarwal. 2005. 'Phenotypic Characterization of the Immune and Mast Cell Infiltrates in the Human Testis Shows Normal and Abnormal Spermatogenesis'. *Fertility and Sterility* 83 (5): 1447–1453. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.062>.
- Hutson, JC. 1992. 'Development of Cytoplasmic Digitations between Leydig Cells and Testicular Macrophages of the Rat'. *Cell and Tissue Research* 267: 385–89. <https://doi.org/10.1007/BF00302977>.
- . 2006a. 'Physiologic Interactions between Macrophages and Leydig Cells.' *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1177/153537020623100101>.
- . 2006b. 'Physiologic Interactions Between Macrophages and Leydig Cells'. *Experimental Biology and Medicine* 231 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1177/153537020623100101>.
- Igarashi, H, T Kouro, T Yokota, PC Comp, and PW Kincade. 2001. 'Age and Stage Dependency of Estrogen Receptor Expression by Lymphocyte Precursors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15131–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.011513098>.
- Ikeda, Y, KL Parker, DS Lala, E Kim, and MP Moisan. 1993. 'Characterization of the Mouse FTZ-F1 Gene, Which Encodes a Key Regulator of Steroid Hydroxylase Gene Expression.' *Molecular Endocrinology* 7 (7): 852–60. <https://doi.org/10.1210/mend.7.7.8413309>.
- Jacobo, P, VA Guazzone, MS Theas, and L Livia. 2011. 'Testicular Autoimmunity'. *Autoimmunity Reviews, Autoimmunity Reviews*, 10 (4): 201–4. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.026>.
- Jaillon, S, K Berthenet, and C Garlanda. 2019. 'Sexual Dimorphism in Innate Immunity'. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 56: 308–321. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x>.
- Jarow, JP, WW Wright, TR Brown, X Yan, and BR Zirkin. 2005. 'Bioactivity of Androgens within the Testis and Serum of Normal Men'. *Journal of Andrology* 26 (3): 343–48. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04100>.
- Jin, JM, and WX Yang. 2014. 'Molecular Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Gonads Axis in Males'. *Gene* 551 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.048>.
- Joseph, A, RA Hess, DJ Schaeffer, C Ko, S Hudgin-Spivey, P Chambon, and BD Shur. 2010. 'Absence of Estrogen Receptor  $\alpha$  Leads to Physiological Alterations in the Mouse Epididymis and Consequent Defects in Sperm Function'. *Biology of Reproduction* 82 (5): 948–57. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079889>.
- Jungwirth, A, T Diemer, Z Kopa, C Krausz, S Mihas, and H Tournaye. 2018. 'European Association of Urology: Guidelines on Male Infertility'. 2018. <https://uroweb.org/guideline/male-infertility/>.
- Kamimura, D, Y Tanaka, R Hasebe, and M Murakami. 2019. 'Bidirectional Communication between Neural and Immune Systems'. *International Immunology*, dxz083. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz083>.
- Kanda, N, and K Tamaki. 1999. 'Estrogen Enhances Immunoglobulin Production by Human PBMCs'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103 (2): 282–88. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70503-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70503-8).
- Kanik, KS, GP Chrousos, HR Schumacher, ML Crane, CH Yarboro, and RL Wilder. 2000. 'Adrenocorticotropin, Glucocorticoid, and Androgen Secretion in Patients with

- New Onset Synovitis/Rheumatoid Arthritis: Relations with Indices of Inflammation'. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (4): 1461–66. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.4.6534>.
- Kanzaki, M, and PL Morris. 1998. 'Identification and Regulation of Testicular Interferon-Gamma (IFNgamma) Receptor Subunits: IFNgamma Enhances Interferon Regulatory Factor-1 and Interleukin-1beta Converting Enzyme Expression'. *Endocrinology* 139 (5): 2636–2644. <https://doi.org/10.1210/endo.139.5.5975>.
- Kaur, G, LA Thompson, and JM Dufour. 2014. 'Sertoli Cells - Immunological Sentinels of Spermatogenesis'. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30: 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.011>.
- Kaushik, MC, MM Misro, N Sehgal, and D Nandan. 2010. 'AR versus ERα Expression in the Testis and Pituitary following Chronic Estrogen Administration in Adult Rat' 56 (6): 420–430. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.501891>.
- Kelly, CD, AM Stoeckl, C Nunn, KN Smyth, and ZM Prokop. 2018. 'Sexual Dimorphism in Immunity across Animals: A Meta-Analysis'. *Ecology Letters* 21 (12): 1885–94. <https://doi.org/10.1111/ele.13164>.
- Khan, D, and AS Ansar. 2016. 'The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases'. *Frontiers in Immunology* 6: 635. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00635>.
- Kincade, PW, KL Medina, KJ Payne, MI Rossi, KS Tudor, Y Yamashita, and T Kouro. 2000. 'Early B-Lymphocyte Precursors and Their Regulation by Sex Steroids'. *Immunological Reviews* 175 (1): 128–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2000.imr017502.x>.
- King, SR, PR Manna, T Ishii, PJ Syapin, SD Ginsberg, K Wilson, LP Walsh, et al. 2002. 'An Essential Component in Steroid Synthesis, the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, Is Expressed in Discrete Regions of the Brain'. *Journal of Neuroscience* 22 (24): 10613–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-24-10613.2002>.
- Klein, B, T Haggene, D Fietz, S Indumathy, KL Loveland, MP Hedger, S Kliesch, W Weidner, M Bergmann, and HC Schuppe. 2016. 'Specific Immune Cell and Cytokine Characteristics of Human Testicular Germ Cell Neoplasia'. *Human Reproduction* 31 (10): 2192–2202. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew211>.
- Klein, SL, and KL Flanagan. 2016. 'Sex Differences in Immune Responses'. *Nature Reviews Immunology* 16: 626–38. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
- Kohno, S, JA Munoz, TM Williams, C Teuscher, CC Bernhard, and KSK Tung. 1983. 'Immunopathology of Murine Experimental Allergic Orchitis'. *Journal of Immunology* 130 (6): 2675–82.
- Koller, MD, E Templ, M Riedl, M Clodi, O Wagner, and JS Smolen. 2004. 'Pituitary Function in Patients with Newly Diagnosed Untreated Systemic Lupus Erythematosus'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63 (12): 1677–1680. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.018325>.
- Kovacs, WJ, and NJ Olsen. 1987. 'Androgen Receptors in Human Thymocytes'. *Journal of Immunology* 139 (2): 490–93.
- Kovats, S. 2015. 'Estrogen Receptors Regulate Innate Immune Cells and Signaling Pathways'. *Cell Immunol* 294 (2): 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>.
- Krege, JH, JB Hodgin, JF Couse, E Enmark, M Warner, JF Mahler, M Sar, KS Korach, JA Gustafsson, and O Smithies. 1998. 'Generation and Reproductive Phenotypes of

- Mice Lacking Estrogen Receptor  $\beta$ '. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15677–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>.
- Kretser, DM de, KL Loveland, A. Meinhardt, D Simorangkir, und N Wreford. 1998. 'Spermatogenesis'. *Human Reproduction* 13 (1): 1–8. [https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl\\_1.1](https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1).
- Kumar, A, K Dumasia, S Deshpande, und NH Balasinor. 2017. 'Direct Regulation of Genes Involved in Sperm Release by Estrogen and Androgen through Their Receptors and Coregulators'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 171: 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.017>.
- Kumar, K, und AK Singh. 2015. 'Trends of Male Factor Infertility, an Important Cause of Infertility: A Review of Literature'. *Journal of Human Reproductive Sciences* 8 (4): 191–96. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>.
- Laffont, S, N Rouquié, P Azar, C Seillet, J Plumas, C Aspod, und JC Guéry. 2014. 'X-Chromosome Complement and Estrogen Receptor Signaling Independently Contribute to the Enhanced TLR7-Mediated IFN- $\alpha$  Production of Plasmacytoid Dendritic Cells from Women'. *Journal of Immunology* 193 (11): 5444–5452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303400>.
- Lai, JJ, KP Lai, W Zeng, und KH Chuang. 2012. 'Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems: Lessons from Conditional AR Knockout Mice. *The American Journal of Pathology* 181 (5): 1504–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.008>.
- Lai, JJ, KP Lai, W Zeng, KH Chuang, S Altuwaijri, und C Chang. 2012. 'Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems'. *The American Journal of Pathology* 181 (5): 1504–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.008>.
- Lambert, KC, EM Curran, BM Judy, DB Lubahn, und DM Estes. 2004. 'Estrogen Receptor-Alpha Deficiency Promotes Increased TNF-Alpha Secretion and Bacterial Killing by Murine Macrophages in Response to Microbial Stimuli in Vitro'. *Journal of Leukocyte Biology* 75 (6): 1166–72. <https://doi.org/10.1189/jlb.1103589>.
- Lanciotti, L, M Cofini, A Leonardi, L Penta, und S Esposito. 2018. 'Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life'. *Frontiers in Endocrinology* 9 (410). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00410>.
- Leisegang, K, R Henkel, und A Agarwal. 2019. 'Obesity and Metabolic Syndrome Associated with Systemic Inflammation and the Impact on the Male Reproductive System'. *American Journal of Reproductive Immunology* 82 (5): e13178. <https://doi.org/10.1111/aji.13178>.
- Leisegang, K, PJ Bouic, und RR Henkel. 2016. 'Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Seminal Inflammatory Cytokines and Reproductive Dysfunction in a Case-controlled Male Cohort'. *American Journal of Reproductive Immunology* 76 (2): 155–63. <https://doi.org/10.1111/aji.12529>.
- Lélu, K, S Laffont, L Delpy, PE Paulet, T Périnat, SA Tschanz, L Pelletier, B Engelhardt, und JC Guéry. 2011. 'Estrogen Receptor Alpha Signaling in T Lymphocytes Is Required for Estradiol-Mediated Inhibition of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis'. *Journal of Immunology* 187 (5): 2386–2393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101578>.
- Lindberg, MK, Z Weihua, N Andersson, S Movérare, H Gao, O Vidal, M Erlandsson, et

- al. 2002. 'Estrogen Receptor Specificity for the Effects of Estrogen in Ovariectomized Mice'. *Journal of Endocrinology* 174 (2): 167–78. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1740167>.
- Liva, SM, and RR Voskuhl. 2001. 'Testosterone Acts Directly on CD4+ T Lymphocytes to Increase IL-10 Production'. *Journal of Immunology* 167 (4): 2060–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2060>.
- Lu, B, H Dotzlaw, E Leygue, LJ Murphy, and C Murphy. 2000. 'Functional Characteristics of a Novel Murine Estrogen Receptor- $\beta$  Isoform, Estrogen Receptor- $\beta$  2.' *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 229–242. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250229>.
- Lü, FX, K Abel, Z Ma, T Rourke, D Lu, J Torten, M McChesney, and CJ Miller. 2002. 'The Strength of B Cell Immunity in Female Rhesus Macaques Is Controlled by CD8+ T Cells under the Influence of Ovarian Steroid Hormones'. *Clinical and Experimental Immunology* 128 (1): 10–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01780.x>.
- Lu, LF, EF Lind, DC Gondek, K Bennett, MW Gleeson, K Pino-Lagos, Z Scott, et al. 2006. 'Mast Cells Are Essential Intermediaries in Regulatory T-Cell Tolerance'. *Nature* 442: 997–1002. <https://doi.org/10.1038/nature05010>.
- Lu, Y, W Weidner, B Sudhanshu, S Tchatalbachev, M Marconi, M Bergmann, T Chakraborty, and A Meinhardt. 2013. 'Necrosis Is the Dominant Cell Death Pathway in Uropathogenic Escherichia Coli Elicited Epididymo-Orchitis and Is Responsible for Damage of Rat Testis'. *PLoS One* 8 (1): e52919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052919>.
- Lucas, TF, MF Lazari, and CS Porto. 2014. 'Differential Role of the Estrogen Receptors ESR1 and ESR2 on the Regulation of Proteins Involved with Proliferation and Differentiation of Sertoli Cells from 15-Day-Old Rats'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (1): 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.015>.
- Lucas, TF, MT Pimenta, R Pisolato, MF Lazari, and CS Porto. 2011. '17 $\beta$ -Estradiol Signaling and Regulation of Sertoli Cell Function.' *Spermatogenesis* 1 (4): 318–24. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.4.18903>.
- Lucas, TF, ER Siu, CA Esteves, HP Monteiro, CA Oliveira, CS Porto, and MF Lazari. 2008. '17 $\beta$ -Estradiol Induces the Translocation of the Estrogen Receptors ESR1 and ESR2 to the Cell Membrane, MAPK3/1 Phosphorylation and Proliferation of Cultured Immature Rat Sertoli Cells.' *Biology of Reproduction* 78 (1): 101–114. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063909>.
- Luconi, M, G Forti, and E Baldi. 2002. 'Genomic and Nongenomic Effects of Estrogens: Molecular Mechanisms of Action and Clinical Implications for Male Reproduction'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80 (4–5): 369–381. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00041-9).
- Lukyanenko, YO, JJ Chen, and JC Hutson. 2001. 'Production of 25-Hydroxycholesterol by Testicular Macrophages and Its Effects on Leydig Cells'. *Biology of Reproduction* 64 (3): 790–96. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.790>.
- Lukyanenko, YO, MM Boone, AM Carpenter, CR Baker, DE McGunegle, and JC Hutson. 2000. 'Specificity of a New Lipid Mediator Produced by Testicular and Peritoneal Macrophages on Steroidogenesis'. *International Journal of Andrology* 23 (5): 258–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00249.x>.
- . 2002. 'Testosterone Regulates 25-Hydroxycholesterol Production in Testicular Macrophages'. *Biology of Reproduction* 67 (5): 1435–38. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007575>.

- Lüllmann-Rauch, R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*. 5th ed. Stuttgart: Thieme.
- Lumeng, CN, und AR Saltiel. 2011. 'Inflammatory Links between Obesity and Metabolic Disease'. *Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2111–17. <https://doi.org/10.1172/JCI57132>.
- Lustig, L, L Lourttau, L Perez, und GF Donzel. 1993. 'Phenotypic Characterization of Lymphocytic Cell Infiltrates into the Testes of Rats Undergoing Autoimmune Orchitis'. *International Journal of Andrology* 16: 279–84.
- Lynch, PJ, DS Lala, JJ Peluso, W Luo, KL Parker, und BA White. 1993. 'Steroidogenic Factor 1, an Orphan Nuclear Receptor, Regulates the Expression of the Rat Aromatase Gene in Gonadal Tissues'. *Molecular Endocrinology* 7 (6): 776–86. <https://doi.org/10.1210/mend.7.6.8395654>.
- Mahato, D, EH Goulding, KS Korach, und EM Eddy. 2001. 'Estrogen Receptor- $\alpha$  Is Required by the Supporting Somatic Cells for Spermatogenesis'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 178 (1–2): 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00410-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00410-5).
- Mahi-Brown, CA, TD Yule, und KS Tung. 1987. 'Adoptive Transfer of Murine Autoimmune Orchitis to Naive Recipients with Immune Lymphocytes'. *Cellular Immunology* 106 (2): 408–19. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(87\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0008-8749(87)90183-3).
- Manna, PR, CL Stetson, AT Slominski, und K Pruitt. 2016. 'Role of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Health and Disease'. *Endocrine* 51 (January): 7–21. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0715-6>.
- Mantalaris, A, N Panoskaltsis, Y Sakai, P Bourne, C Chang, EM Messing, und JH Wu. 2001. 'Localization of Androgen Receptor Expression in Human Bone Marrow'. *Journal of Pathology* 193 (3): 361–66. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(0000\)9999:9999<::AID-PATH803>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1096-9896(0000)9999:9999<::AID-PATH803>3.0.CO;2-W).
- Marino, M, P Galluzzo, und P Ascenzi. 2006. 'Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription'. *Current Genomics* 7 (8): 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>.
- Mascarenhas, MN, SR Flaxman, T Boerma, S Vanderpoel, und GA Stevens. 2012. 'National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys'. *PLoS Medicine* 9 (12): e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>.
- Matthews, J, und JA Gustafsson. 2003. 'Estrogen Signaling: A Subtle Balance between ER Alpha and ER Beta'. *Molecular Interventions* 3 (5): 281–92. <https://doi.org/10.1124/mi.3.5.281>.
- Mauduit, C, DJ Hartmann, MA Chauvin, A Revol, AM Morera, und M Benahmed. 1991. 'Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibits Gonadotropin Action in Cultured Porcine Leydig Cells: Site(s) of Action'. *Endocrinology* 129 (6): 2933–40. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-2933>.
- McCrudden, AB, und WH Stimson. 1984. 'Androgen Receptor in the Human Thymus'. *Immunology Letters* 8 (1): 49–53. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(84\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0165-2478(84)90104-4).
- McDonnell, ND, und RB Livingston. 1994. 'Severe Reversible Neutropenia Following Treatment of Prostate Cancer with Flutamide'. *Journal of Urology* 151 (5): 1353–54. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)35251-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)35251-5).
- Meinhardt, A, und M Fijak. 2006. 'The Testis in Immune Privilege'. *Immunological Reviews* 213: 66–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x>.
- Meinhardt, A., und HC Schuppe. 2003. 'Immunologie Des Hodens - Balance Zwischen

- Immunprivileg Und Entzündung'. *Andrologie Reproduktionsmedizin* (5–6): 257–66.
- Mikuz, G. 1978. 'Orchitis'. *Normale Und Pathologische Anatomie* 36: 1–111. <https://doi.org/PMID: 356002>.
- Mitchner, N, C Garlick, und N Ben-Jonathan. 1998. 'Cellular Distribution and Gene Regulation of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the Rat Pituitary Gland'. *Endocrinology* 139 (9): 3976–3983. <https://doi.org/10.1210/endo.139.9.6181>.
- Mor, G, E Sapi, VM Abrahams, T Rutherford, J Song, XY Hao, S Muzaffar, und F Kohen. 2003. 'Interaction of the Estrogen Receptors with the Fas Ligand Promoter in Human Monocytes'. *Journal of Immunology* 170 (1): 114–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.114>.
- Morohashi, K, H Lida, M Nomura, O Hatano, S Honda, T Tsukiyama, O Niwa, et al. 1994. 'Functional Difference between Ad4BP and ELP, and Their Distributions in Steroidogenic Tissues.' *Molecular Endocrinology* 8 (5): 643–53. <https://doi.org/10.1210/mend.8.5.8058072>.
- Moulton, VR. 2018. 'Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease'. *Frontiers in Immunology* 9 (2279): 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02279>.
- Müller, B. 2007. 'Endocrine Aspects of Critical Illness'. *Annales d'Endocrinologie* 68 (4): 290–98. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ando.2007.06.006>.
- Murai, T, K Noguchi, A Nagamoto, und M Hosaka. 1992. 'A Partial Characterization of a Sertoli Cell-Secreted Protein Stimulating Leydig Cell Testosterone Production'. *Endocrinologia Japonica* 39 (2): 209–15. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.39.209>.
- Murphy, AJ, PM Guyre, CR Wira, und PA Pioli. 2009. 'Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER $\alpha$ 46 in Human Macrophages'. *PLoS One* 4 (5): e5539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005539>.
- Nakada, D, H Oguro, BP Levi, N Ryan, A Kitano, Y Saitoh, M Takeichi, GR Wendt, und SJ Morrison. 2014. 'Oestrogen Increases Haematopoietic Stem-Cell Self-Renewal in Females and during Pregnancy'. *Nature* 505: 555–58. <https://doi.org/10.1038/nature12932>.
- Nakaya, M, H Tachibana, und K Yamada. 2006. 'Effect of Estrogens on the Interferon- $\gamma$  Producing Cell Population of Mouse Splenocytes'. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70 (1): 47–53. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.47>.
- Nasr, IW, Y Wang, G Gao, S Deng, L Diggs, DM Rothstein, G Tellides, FG Lakkis, und Z Dai. 2005. 'Testicular Immune Privilege Promotes Transplantation Tolerance by Altering the Balance between Memory and Regulatory T Cells'. *Journal of Immunology* 174 (10): 6161–68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6161>.
- Nickel, JC, DR Siemens, KR Nickel, und J Downey. 2002. 'The Patient with Chronic Epididymitis: Characterization of an Enigmatic Syndrome'. *Journal of Urology* 167 (4): 1701–4. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65181-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65181-6).
- Nicolas, N, V Michel, S Bhushan, E Wahle, S Hayward, H Ludlow, DM de Kretser, et al. 2017. 'Testicular Activin and Follistatin Levels Are Elevated during the Course of Experimental Autoimmune Epididymo-orchitis in Mice'. *Scientific Reports* 7 (42391). <https://doi.org/10.1038/srep42391>.
- Nicolas, N, JA Muir, S Hayward, LJ Chen, PG Stanton, P Gregorevic, DM de Kretser, et al. 2017. 'Induction of Experimental Autoimmune Orchitis in Mice: Responses to Elevated Circulating Levels of the Activin-Binding Protein, Follistatin'. *Reproduction* 154 (3): 293–305. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0010>.

- Nie, J, YY Li, SG Zheng, A Tsun, und B Li. 2015. 'FOXP3+ Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases'. *Frontiers of Immunology* 6 (493). <https://doi.org/doi:10.3389/fimmu.2015.00493>.
- Nieschlag, E, G. Weinbauer, H. Behre, C. Luetjens, M. Simoni, T. Cooper, C.-H. Yeung, F. Tüttelmann, M. Zitzmann, und P. Wieacker. 2010. *Andrology - Male Reproductive Health and Dysfunction*. Edited by E Nieschlag, HM Behre, and S Nieschlag. 3. Heidelberg: Springer.
- Nieschlag, E, GF Weinbauer, TG Cooper, W Wittkowski, und T Cantz. 2008. 'Reproduktion'. In *Physiologie*, edited by E-J Speckmann, J Hescheler, und R Köhling, 5., 652–677. München: Urban & Fischer.
- Nilsson, S, S Makela, E Treuter, M Tujague, J Thomsen, G Anderrson, E Enmark, K Pettersson, M Warner, und JA Gustafsson. 2001. 'Mechanisms of Estrogen Action'. *Physiological Reviews* 81 (4): 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>.
- O'Bryan, MK, O Gerdprasert, DJ Nikolic-Paterson, A Meinhardt, JA Muir, LM Foulds, DJ Phillips, DM de Kretser, und MP Hedger. 2005. 'Cytokine Profiles in the Testes of Rats Treated with Lipopolysaccharide Reveal Localized Suppression of Inflammatory Responses'. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (6): 1744–55. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00651.2004>.
- O'Bryan, MK, S Schlatt, O Gerdprasert, DJ Phillips, DM de Kretser, und MP Hedger. 2000. 'Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Testis: Evidence for Potential Roles in Both Normal Function and Inflammation-Mediated Infertility'. *Biology of Reproduction* 63 (5): 1285–93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1285>.
- O'Donnell, L, KM Robertson, ME Jones, und ER Simpson. 2001. 'Estrogen and Spermatogenesis'. *Endocrine Reviews* 22 (3): 289–318. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.3.0431>.
- Ojeifo, J. O., S.W. Byers, V. Papadopoulos, und M. Dym. 1990. 'Sertoli Cell-Secreted Protein(s) Stimulates DNA Synthesis in Purified Rat Leydig Cells in Vitro'. *Journals of Reproduction and Fertility* 90 (1): 93–108. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900093>.
- Olsen, NJ, und WJ Kovacs. 1995. 'Case Report: Testosterone Treatment of Systemic Lupus Erythematosus in a Patient with Klinefelter's Syndrome'. *American Journal of the Medical Sciences* 310 (4): 158–160. <https://doi.org/10.1097/00000441-199510000-00006>.
- . 2001. 'Effects of Androgens on T and B Lymphocyte Development'. *Immunologic Research* 23 (2–3): 281–288. <https://doi.org/10.1385/IR:23:2-3:281>.
- Paharkova-Vatchkova, V, R Maldonado, und S Kovats. 2004. 'Estrogen Preferentially Promotes the Differentiation of CD11c+ CD11b(Intermediate) Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors'. *Journal of Immunology* 172 (3): 1426–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1426>.
- Panchanathan, R, H Liu, und D Choubey. 2013. 'Expression of Murine Unc93b1 Is Up-Regulated by Interferon and Estrogen Signaling: Implications for Sex Bias in the Development of Autoimmunity'. *International Immunology* 25 (9): 521–29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxt015>.
- Panchanathan, R, H Shen, X Zhang, SM Ho, und D Choubey. 2010. 'Mutually Positive Regulatory Feedback Loop between Interferons and Estrogen Receptor- $\alpha$  in Mice: Implications for Sex Bias in Autoimmunity'. *PLoS One* 5: e10868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010868>.

- Papadopoulos, V. 1991. 'Identification and Purification of a Sertoli-Cell Secreted Protein (HSCSP-80) Stimulating Leydig Cell Steroid Biosynthesis'. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 72 (6): 1332–39. <https://doi.org/10.1210/jcem-72-6-1332>.
- Papenfuss, TL, ND Powell, MA McClain, A Bedarf, A Singh, IE Gienapp, T Shawler, und CC Whitacre. 2011. 'Estriol Generates Tolerogenic Dendritic Cells in Vivo That Protect against Autoimmunity'. *Journal of Immunology* 186 (6): 3346–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001322>.
- Parker, KL, DL Rice, DS Lala, Y Ikeda, X Luo, M Wong, M Bakke, et al. 2002. 'Steroidogenic Factor 1: An Essential Mediator of Endocrine Development'. *Recent Progress in Hormone Research* 57: 19–36. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.19>.
- Parker, KL, und BP Schimmer. 1997. 'Steroidogenic Factor 1: A Key Determinant of Endocrine Development and Function'. *Endocrine Reviews* 18 (3): 361–77. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0301>.
- Pauklin, S, IV Sernández, G Bachmann, AR Ramiro, und SK Petersen-Mahrt. 2009. 'Estrogen Directly Activates AID Transcription and Function'. *Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 99–111. <https://doi.org/10.1084/jem.20080521>.
- Pelletier, G, C Labrie, und F Labrie. 2000. 'Localization of Oestrogen Receptor, Oestrogen Receptor and Androgen Receptors in the Rat Reproductive Organs'. *Journal of Endocrinology* 165 (2): 359–70. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1650359>.
- Pelletier, RM, und SW Byers. 1992. 'The Blood-Testis Barrier and Sertoli Cell Junctions: Structural Considerations'. *Microscopy Research and Technique* 20 (1): 3–33. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070200104>.
- Pelt, AM van, DG de Rooji, B van der Burg, PT van der Saag, JA Gustafsson, und GG Kuiper. 1999. 'Ontogeny of Estrogen Receptor-Beta Expression in Rat Testis'. *Endocrinology* 140 (1): 478–83. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6438>.
- Pentikäinen, V, K Erkkilä, L Suomalainen, M Parvinen, und L Dunkel. 2000. 'Estradiol Acts as a Germ Cell Survival Factor in the Human Testis in Vitro'. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (5): 2057–67. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.5.6600>.
- Pérez, AR, O Bottasoa, und W Savino. 2009. 'The Impact of Infectious Diseases upon Neuroendocrine Circuits'. *Neuroimmunomodulation* 16: 96–105. <https://doi.org/10.1159/000180264>.
- Perez, CV, CM Sobarzo, PV Jacobo, EH Pellizzari, SB Cigorraga, B Denduchis, und L Lustig. 2012. 'Loss of Occludin Expression and Impairment of Blood-Testis-Barrier Permeability in Rats with Autoimmune Orchitis: Effect of IL-6 on Sertoli-Cell Tight Junctions'. *Biology of Reproduction* 87 (5): 122. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101709>.
- Pergola, C, G Dodt, A Rossi, E Neunhoeffter, B Lawrenz, H Northoff, B Samuelsson, O Radmark, L Sautebin, und O Werz. 2008. 'ERK-Mediated Regulation of Leukotriene Biosynthesis by Androgens: A Molecular Basis for Gender Differences in Inflammation and Asthma'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19881–19886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809120105>.
- Pettersson, A, C Ciumas, V Chirsky, H Link, YM Huang, und BG Xiao. 2004. 'Dendritic Cells Exposed to Estrogen in Vitro Exhibit Therapeutic Effects in Ongoing Experimental Allergic Encephalomyelitis'. *Journal of Neuroimmunology* 156 (1–2): 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.07.004>.

- Pfaffl, M, und I Riedmaier. 2011. 'Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse Im Fokus Der MIQE-Richtlinie'. *BIOspektrum* 17 (3): 295–97. <https://doi.org/10.1007/s12268-011-0047-x>.
- Pfaffl, M. 2004. 'Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze Zur Exakten mRNA Quantifizierung'. *BIOspektrum* 10: 92–95.
- Phiel, KL, RA Henderson, SJ Adelman, und MM Elloso. 2005. 'Differential Estrogen Receptor Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Populations'. *Immunology Letters* 97 (1): 107–13. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.10.007>.
- Pierdominici, M, A Maselli, T Colasanti, AM Giammarioli, F Delunardo, und D Varcirca. 2010. 'Estrogen Receptor Profiles in Human Peripheral Blood Lymphocytes'. *Immunology Letters* 132 (1–2): 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.06.003>.
- Pilatz, A, M Boecker, HC Schuppe, T Diemer, und F Wagenlehner. 2016. 'Infection and Infertility'. *Urologe A*. 55 (7): 883–89. <https://doi.org/10.1007/s00120-016-0151-0>.
- Plant, TM, S Ramaswamy, D Simorangkir, und GR Marshall. 2005. 'Postnatal and Pubertal Development of the Rhesus Monkey (Macaca Mulatta) Testis'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1061 (1): 149–162. <https://doi.org/10.1196/annals.1336.016>.
- Polanczyk, MJ, C Hopke, J Huan, AA Vandenbark, und H Offner. 2005. 'Enhanced FoxP3 Expression and Treg Cell Function in Pregnant and Estrogen-Treated Mice'. *Journal of Neuroimmunology* 170 (1–2): 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.08.023>.
- Pollack, SE, EE Furth, CB Kallen, F Arakane, M Kiriakidou, KF Kozarsky, und JF Strauss. 1997. 'Localization of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Human Tissues'. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82 (12): 4243–51. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4445>.
- Priyanka, HP, HC Krishnan, RV Singh, L Hima, und S Thyagarajan. 2013. 'Estrogen Modulates in Vitro T Cell Responses in a Concentration- and Receptor-Dependent Manner: Effects on Intracellular Molecular Targets and Antioxidant Enzymes'. *Molecular Immunology* 56 (4): 328–39. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.226>.
- Prossnitz, ER, und HJ Hathaway. 2015. 'What Have We Learned about GPER Function in Physiology and Disease from Knockout Mice?' *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 153: 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.014>.
- Punab, M, O Poolamets, P Paju, V Vihljajev, K Pomm, R Ladva, P Korrovits, und M Laan. 2017. 'Causes of Male Infertility: A 9-Year Prospective Monocentre Study on 1737 Patients with Reduced Total Sperm Counts'. *Human Reproduction* 32 (1): 18–31. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew284>.
- Rettew, JA, YM Huet-Hudson, und I Marriott. 2008. 'Testosterone Reduces Macrophage Expression in the Mouse of Toll-like Receptor 4, a Trigger for Inflammation and Innate Immunity'. *Biology of Reproduction* 78 (3): 432–37. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>.
- Rival, C, VA Guazzone, W von Wulffen, H Hackstein, E Schneider, L Lustig, A Meinhardt, und M Fijak. 2007. 'Expression of Co-Stimulatory Molecules, Chemokine Receptors and Proinflammatory Cytokines in Dendritic Cells from Normal and Chronically Inflamed Rat Testis'. *Molecular Human Reproduction* 13 (12): 853–861. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam067>.

- Rival, C, L Lustig, R Iosub, VA Guazzone, E Schneider, A Meinhardt, und M Fijak. 2006. 'Identification of a Dendritic Cell Population in Normal Testis and in Chronically Inflamed Testis of Rats with Autoimmune Orchitis'. *Cell and Tissue Research* 324 (2): 311–18. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0129-5>.
- Rivest, S, und C Rivier. 1993. 'Centrally Injected Interleukin-1 Beta Inhibits the Hypothalamic LHRH Secretion and Circulating LH Levels via Prostaglandins in Rats'. *Journal of Neuroendocrinology* 5 (4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1993.tb00506.x>.
- Rivier, C, und S Rivest. 1991. 'Effect of Stress on the Activity of the Hypothalamic – Pituitary – Gonadal Axis: Peripheral and Central Mechanisms'. *Biology of Reproduction* 45 (4): 523–32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.4.523>.
- Rivier, C, J Rivier, und W Vale. 1986. 'Stress-Induced Inhibition of Reproductive Functions: Role of Endogenous Corticotropin-Releasing Factor'. *Science* 231 (4738): 607–9. <https://doi.org/10.1126/science.3003907>.
- Robertson, KM, L O'Donnell, ME Jones, SJ Meachem, WC Boon, CR Fisher, KH Graves, RI McLachlan, und ER Simpson. 1999. 'Impairment of Spermatogenesis in Mice Lacking a Functional Aromatase (Cyp 19) Gene'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14): 7986–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7986>.
- Roby, KF, D Larsen, S Deb, und MJ Soares. 1991. 'Generation and Characterization of Anti-peptide Antibodies to Rat Cytochrome P-450 Side-Chain Cleavage Enzyme'. *Molecular and Cellular Biology* 79 (1–3): 13–20. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(91\)90090-F](https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90090-F).
- Rochira, V, B Madeo, C Diazzi, L Zirilli, D Santi, und C Carani. 2013. 'Estrogens and Male Reproduction'. In *Endocrinology of Male Reproduction*, edited by R McLachlan. South Dartmouth: MDTText.com, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278933/>.
- Rochira, V, und C Carani. 2009. 'Aromatase Deficiency in Men: A Clinical Perspective'. *Nature Reviews of Endocrinology* 5 (10): 559–68. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.176>.
- Royer, C, TF Lucas, MF Lazari, und CS Porto. 2012. '17 $\beta$ -Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells'. *Biology of Reproduction* 86 (4): 108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096891>.
- Sambroni, E, AD Rolland, JJ Lareryre, und F Le Gac. 2013. 'FSH and LH Have Common and Distinct Effects on Gene Expression in Rainbow Trout Testis'. *Journal of Molecular Endocrinology* 50 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0197>.
- Sar, M, und F Welsch. 2001. 'Oestrogen Receptor Alpha and Beta in Rat Prostate and Epididymis'. *Andrologia* 32 (4–5): 295–301. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00396.x>.
- Schmidt, M, M Kreutz, G Löffler, J Schölmerich, und RH Straub. 2000. 'Conversion of Dehydroepiandrosterone to Downstream Steroid Hormones in Macrophages'. *Journal of Endocrinology* 164 (2): 161–69. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1640161>.
- Schuppe, HC, A Pilatz, H Hossain, T Diemer, F Wagenlehner, und W Weidner. 2017. 'Urogenital Infection as a Risk Factor for Male'. *Deutsches Ärzteblatt* 114: 339–46. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0339>.
- Schuppe, HC, und M Bergmann. 2013. 'Inflammatory Conditions of the Testis'. In *Atlas of the Human Testis*, Springer, 113–121. London: Jezek D (ed).

- Schuppe, HC, A Meinhardt, J Allam, M Bergmann, W Weidner, und G Haidl. 2008. 'Chronic Orchitis: A Neglected Cause of Male Infertility?' *Andrologia* 40: 84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x>.
- Schuppe, HC, und A Meinhardt. 2005. 'Immune Privilege and Inflammation of the Testis'. *Chemical Immunology and Allergy* 88: 1–14. <https://doi.org/10.1159/000087816>.
- Segner, H, BML Verburg-van Kemenade, und M Chadzinska. 2017. 'The Immunomodulatory Role of the Hypothalamus-Pituitary-Gonad Axis: Proximate Mechanism for Reproduction-Immune Trade Offs?' *Developmental and Comparative Immunology* 66: 43–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.004>.
- Seillet, C, S Laffont, F Trémollières, N Rouquié, C Ribot, JF Arnal, V Douin-Echinard, P Gourdy, und JC Guéry. 2012. 'The TLR-Mediated Response of Plasmacytoid Dendritic Cells Is Positively Regulated by Estradiol in Vivo through Cell-Intrinsic Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling'. *Blood* 119 (2): 454–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371831>.
- Selvaraj, V, D Bunick, C Finnigan-Bunick, RW Johnson, H Wang, L Liu, und PS Cooke. 2005. 'Gene Expression Profiling of 17 $\beta$ -Estradiol and Genistein Effects on Mouse Thymus'. *Toxicological Sciences* 87 (1): 97–112. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi219>.
- Shang, Y, M Myers, und M Brown. 2002. 'Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex'. *Molecular Cell* 9 (3): 601–10. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00471-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00471-9).
- Sharma, G, F Mauvais-Jarvis, und ER Prossnitz. 2018. 'Roles of G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER in Metabolic Regulation'. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 176: 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.012>.
- Sharpe, RM. 1990. 'Intratesticular Control of Spermatogenesis'. *Clinical Endocrinology* 33: 787–807.
- Sharpe, RM, K Donachie, und I Cooper. 1988. 'Re-Evaluation of the Intesticular Level of Testosterone Required for Quantitative Maintenance of Spermatogenesis in the Rat'. *Journal of Endocrinology* 117 (1): 19–26. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1170019>.
- Silva, CA, M Cocuzza, JF Carvalho, und E Bonfá. 2014. 'Diagnosis and Classification of Autoimmune Orchitis'. *Autoimmunity Reviews* 13 (4–5): 431–34. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.024>.
- Sinkevicius, KW, M Laine, TL Lotan, K Woloszyn, JH Richburg, und GL Greene. 2009. 'Estrogen-Dependent and -Independent Estrogen Receptor-Alpha Signaling Separately Regulate Male Fertility'. *Endocrinology* 150 (6): 2898–2905. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1016>.
- Sirianni, R, A Chimento, C Ruggiero, A De Luca, R Lappano, S Andò, M Maggiolini, und V Pezzi. 2008. 'The Novel Estrogen Receptor, G Protein-Coupled Receptor 30, Mediates the Proliferative Effects Induced by 17 $\beta$ -Estradiol on Mouse Spermatogonial GC-1 Cell Line'. *Endocrinology* 149 (10): 5043–51. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1593>.
- Smith, EP, J Boyd, GR Frank, H Takahashi, RM Cohen, B Specker, TC Williams, DB Lubahn, und KS Korach. 1994. 'Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man'. *New England Journal of Medicine* 332 (2): 1056–61. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410203311604>.

- Smith, LB, und WH Walker. 2014. 'The Regulation of Spermatogenesis by Androgens'. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 30 (2): 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>.
- Smithson, G, JF Couse, DB Lubahn, KS Korach, und PW Kincade. 1998. 'The Role of Estrogen Receptors and Androgen Receptors in Sex Steroid Regulation of B Lymphopoiesis'. *Journal of Immunology* 161 (1): 27–34.
- Sohni, A, K Tan, HW Song, D Burow, DG de Rooij, L Laurent, TC Hsieh, et al. 2019. 'The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level'. *Cell Reports* 26 (6): 1501–17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>.
- Spence, RD, AJ Wisdom, Y Cao, HM Hill, CR Mongerson, B Stapornkul, N Itoh, MV Sofroniew, und RR Voskuhl. 2013. 'Estrogen Mediates Neuroprotection and Anti-Inflammatory Effects during EAE through ER $\alpha$  Signaling on Astrocytes but Not through ER $\beta$  Signaling on Astrocytes or Neurons'. *Journal of Neuroscience* 33 (26): 10924–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0886-13.2013>.
- Spitzer, JA. 1999. 'Gender Differences in Some Host Defense Mechanisms'. *Lupus* 8 (5): 380–83. <https://doi.org/10.1177/096120339900800510>.
- Spratt, DI. 2001. 'Altered Gonadal Steroidogenesis in Critical Illness: Is Treatment with Anabolic Steroids Indicated?' *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 15 (4): 479–94. <https://doi.org/10.1053/beem.2001.0165>.
- Steeg, LG vom, und SL Klein. 2016. 'SeXX Matters in Infectious Disease Pathogenesis'. *PLOS Pathogens* 12 (2): e1005374. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005374>.
- Stocco, DM, X Wang, Y Jo, und PR Manna. 2005. 'Multiple Signaling Pathways Regulating Steroidogenesis and StAR Expression: More Complicated than We Thought'. *Molecular Endocrinology* 19 (11): 2647–59. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0532>.
- Straub, RH, JWW Bijlsma, A Masi, und M Cutolo. 2013. 'Role of Neuroendocrine and Neuroimmune Mechanisms in Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases - The 10-Year Update'. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43 (3): 392–404.
- Straub, RH. 2007. 'The Complex Role of Estrogens in Inflammation'. *Endocr Rev* 28 (5): 521–74. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>.
- Suescun, M, R Calandra, und L Lustig. 1994. 'Alterations of Testicular Function After Induced Autoimmune Orchitis in Rats'. *Journal of Andrology* 15 (5): 442–48. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00478.x>.
- Tai, P, J Wang, H Jin, X Song, J Yan, Y Kang, L Zhao, et al. 2007. 'Induction of Regulatory T Cells by Physiological Level Estrogen'. *Journal of Cellular Physiology* 214 (2): 456–64. <https://doi.org/10.1002/jcp.21221>.
- Taylor, S, M Wakem, M Alsarraj, und M Nguyen. 2010. 'A Practical Approach to RT-PCR - Publishing Data That Conform to the MIQE Guidelines'. *Methods* 50 (4): S1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>.
- Thaler, JP, CX Yi, EA Schur, SJ Guyenet, BH Hwang, MO Dietrich, X Zhao, et al. 2012. 'Obesity Is Associated with Hypothalamic Injury in Rodents and Humans'. *Journal of Clinical Investigation* 122 (1): 153–62. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>.
- Trigunait, A, J Dimo, und TN Jorgensen. 2015. 'Suppressive Effects of Androgens on the Immune System'. *Cellular Immunology* 294 (2): 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.004>.
- Tung, KSK, J Harakal, H Qiao, C Rival, JCH Li, AGA Paul, K Wheeler, et al. 2017. 'Egress of Sperm Autoantigen from Seminiferous Tubules Maintains Systemic

- Tolerance'. *The Journal of Clinical Investigation* 127 (3): 1046–1060. <https://doi.org/10.1172/JCI89927>.
- Turek, PJ, und LI Lipshultz. 1994. 'Immunologic Infertility'. *The Urologic Clinics of North America* 21 (3): 447–468.
- Turnbull, AV, und CL Rivier. 1999. 'Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action'. *Physiological Reviews* 79 (1): 1–71. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.1>.
- Van Roijen, JH, S Van Assen, T Van der Kwast, DG de Rooji, WJA Boersma, JTM Vreeburg, und RFA Weber. 1995. 'Androgen Receptor Immunoexpression in the Testis of Subfertile Men'. *Journal of Andrology* 16 (6): 510–16. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1995.tb00571.x>.
- Verhoeven, O, und J Cailleau. 1985. 'A Factor in Spent Media from Sertoli Cell- Enriched Cultures That Stimulates Steroidogenesis in Leydig Cells'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 40 (1): 57–68. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(85\)90158-3](https://doi.org/10.1016/0303-7207(85)90158-3).
- Verthelyi, D, und SA Ahmed. 1998. 'Estrogen Increases the Number of Plasma Cells and Enhances Their Autoantibody Production in Nonautoimmune C57BL/6 Mice'. *Cellular Immunology* 189 (2): 125–34. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1372>.
- Villablanca, A, S Tetali, R Altman, K Ng, und J Rutledge. 2013. 'Testosterone- Derived Estradiol Production by Male Endothelium Is Robust and Dependent on P450 Aromatase via Estrogen Receptor Alpha'. *SpringerPlus* 2 (214). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-214>.
- Viselli, SM, NJ Olsen, K Shults, G Steizer, und WJ Kovacs. 1995. 'Immunochemical and Flow Cytometric Analysis of Androgen Receptor Expression in Thymocytes'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 109 (1): 19–26. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03479-Q](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03479-Q).
- Vornberger, W, G Prins, NA Musto, und SA Suarez-Quian. 1994. 'Androgen Receptor Distribution in Rat Testis: New Implications for Androgen Regulation of Spermatogenesis'. *Endocrinology* 134 (5): 2307–16. <https://doi.org/10.1210/endo.134.5.8156934>.
- Walecki, M, F Eisel, J Klug, N Baal, A Paradowska-Dogan, E Wahle, H Hackstein, A Meinhardt, und M Fijak. 2015. 'Androgen Receptor Modulates Foxp3 Expression in CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T-Cells'. *Molecular Biology of the Cell* 26 (15): 2845–57. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-08-1323>.
- Wang, M, M Fijak, H Hossain, M Markmann, RM Nusing, G Lochnit, MF Hartmann, et al. 2017. 'Characterization of the Micro-Environment of the Testis That Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages'. *Journal of Immunology* 198 (11): 4327–4340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700162>.
- Weidler, C, S Struharova, M Schmidt, B Ugele, J Schölmerich, und RH Straub. 2005. 'Tumor Necrosis Factor Inhibits Conversion of Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) to DHEA in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells: A Prerequisite for Local Androgen Deficiency'. *Arthritis & Rheumatism* 52 (6): 1721–1729. <https://doi.org/10.1002/art.21112>.
- Weinbauer, GF, CM Luetjens, M Simoni, und E Nieschlag. 2010. 'Physiology of Testicular Function'. In *Andrology*, 3rd ed., 11–59. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Weinbauer, GF, M Niehaus, und E Nieschlag. 2004. *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*. Cambridge University Press. Cambridge: Nieschlag E, Behre HM.

- Weinstein, Y, S Ran, und S Segal. 1984. 'Sex-Associated Differences in the Regulation of Immune Responses Controlled by the MHC of the Mouse'. *Journal of Immunology* 132 (2): 656–61.
- Weissman, BA, E Niu, R Ge, CN Sottas, M Holmes, JC Hutson, und MP Hardy. 2005. 'Paracrine Modulation of Androgen Synthesis in Rat Leydig Cells by Nitric Oxide'. *Journal of Andrology* 26 (3): 369–78. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04178>.
- Wensing, CJG. 1988. 'The Embryology of Testicular Descent'. *Hormone Research in Paediatrics* 30: 144–52. <https://doi.org/10.1159/000181051>.
- Wilder, RL. 1996. 'Hormones and Autoimmunity: Animal Models of Arthritis'. *Baillière's Clinical Rheumatology* 10 (2): 259–71. [https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(96\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0950-3579(96)80017-3).
- Winnall, WR, JA Muir, und MP Hedger. 2011. 'Rat Resident Testicular Macrophages Have an Alternatively Activated Phenotype and Constitutively Produce Interleukin-10 in Vitro'. *Journal of Leukocyte Biology* 90 (1): 133–43. <https://doi.org/10.1189/jlb.1010557>.
- Wu, H, L Shi, Q Wang, L Cheng, X Zhao, Q Jiang, M Feng, Q Li, und D Han. 2016. 'Mumps Virus-Induced Innate Immune Responses in Mouse Sertoli and Leydig Cells'. *Scientific Reports* 6: 19507. <https://doi.org/10.1038/srep19507>.
- Wudy, SA, G Schuler, A Sánchez-Guijoa, und MF Hartmann. 2018. 'The Art of Measuring Steroids: Principles and Practice of Current Hormonal Steroid Analysis'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 179: 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>.
- Xu, Q, HY Lin, SD Yeh, IC Yu, RS Wang, YT Chen, C Zhang, et al. 2007. 'Infertility with Defective Spermatogenesis and Steroidogenesis in Male Mice Lacking Androgen Receptor in Leydig Cells'. *Endocrine* 32 (1): 96–106. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9015-0>.
- Yacoub, SZW. 2004. 'Gender Differences in Systemic Lupus Erythematosus'. *Gender Medicine* 1 (1): 12–17. [https://doi.org/10.1016/S1550-8579\(04\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S1550-8579(04)80006-8).
- Yee, JB, und JC Hutson. 1985. 'Effects of Testicular Macrophage-Conditioned Medium on Leydig Cells in Culture'. *Endocrinology* 116 (6): 2682–84. <https://doi.org/10.1210/endo-116-6-2682>.
- Yildirim, OG, E Sumulu, E Aslan, HB Koca, MB Pektas, G Sadi, und F Akar. 2019. 'High-fructose in Drinking Water Initiates Activation of Inflammatory Cytokines and Testicular Degeneration in Rat'. *Toxicology Mechanisms and Methods* 29 (3): 224–32. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1543745>.
- Yu, HP, YC Hsieh, T Suzuki, MA Choudhry, MG Schwacha, und Bland KI. 2007. 'Mechanism of the Nongenomic Effects of Estrogen on Intestinal Myeloperoxidase Activity Following Trauma-Hemorrhage: Up-Regulation of the PI-3K/Akt Pathway'. *Journal of Leukocyte Biology* 82 (3): 774–780. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307182>.
- Zhang, C, S Yeh, YT Chen, CC Wu, KH Chuang, HY Lin, RS Wang, et al. 2006. 'Oligozoospermia with Normal Fertility in Male Mice Lacking the Androgen Receptor in Testis Peritubular Myoid Cells.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (47): 17718–17723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608556103>.
- Zhang, K, L Kuang, F Xia, Y Chen, W Zhang, H Zhai, C Wang, N Wang, und Y Lu. 2019. 'Follicle-stimulating Hormone Promotes Renal Tubulointerstitial Fibrosis in Aging Women via the AKT/GSK-3 $\beta$ /B-catenin Pathway'. *Aging Cell* 18 (5): e12997.

- <https://doi.org/10.1111/accel.12997>.
- Zhao, S, W Zhu, S Xue, und D Han. 2014. 'Testicular Defense Systems: Immune Privilege and Innate Immunity.' *Cellular & Molecular Immunology* 11 (5): 428–437. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.38>.
- Zhengwei, Y, NG Wreford, P Royce, DM de Kretser, und RI McLachlan. 1998. 'Stereological Evaluation of Human Spermatogenesis after Suppression by Testosterone Treatment: Heterogeneous Pattern of Spermatogenic Impairment'. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (4): 1284–1291. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.4.4724>.
- Zhengwei, Y, NG Wreford, S Schlatt, GF Weinbauer, E Nieschlag, und RI McLachlan. 1998b. 'Acute and Specific Impairment of Spermatogonial Development by GnRH Antagonist-Induced Gonadotrophin Withdrawal in the Adult Macaque (*Macaca Fascicularis*)'. *Journal of Reproduction and Fertility* 112 (1): 139–147. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1120139>.

## 8 Anhang

### 8.1 Publikationsverzeichnis

- Stefanou MI, **Stadler V**, Baku D, Hennersdorf F, Ernemann U, Ziemann U, Poli S, Mengel A. Optimizing patient selection for interhospital transfer and endovascular therapy in acute ischemic stroke: real-world data from a supraregional, hub-and-spoke neurovascular network in Germany. *Front Neurol*. 2020. doi: 10.3389/fneur.2020.600917
- Mengel A, Stefanou MI, Hadaschik KA, Wolf M, **Stadler V**, Poli K, Lindig T, Ernemann U, Grimm F, Tatagiba M, Ziemann U, Poli S. Early Administration of Desmopressin and Platelet Transfusion for Reducing Hematoma Expansion in Patients With Acute Antiplatelet Therapy Associated Intracerebral Hemorrhage. *Crit Care Med*. 2020. doi: 10.1097/CCM.0000000000004348.
- Boßelmann C, Zurluh J, Stefanou MI, **Stadler V**, Weber Y, Lerche H, Poli S, Ziemann U, Mengel A. Delirium Screening in Aphasic Patients With the Intensive Care Delirium Screening Checklist (ICDSC): A Prospective Cohort Study. *Front Neurol*. 2019. doi: 10.3389/fneur.2019.01198.
- Stefanou MI, Rath D, **Stadler V**, Richter H, Hennersdorf F, Lausberg HF, Lescan M, Greulich S, Poli S, Gawaz MP, Ziemann U, Mengel A. Cardiac Myxoma and Cerebrovascular Events: A Retrospective Cohort Study. *Front Neurol*. 2018. doi: 10.3389/fneur.2018.00823.

## **8.2 Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation**

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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiats-erkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Vera Wilke, geb. Stadler

Tübingen, 11.11.2020

### **8.3 Danksagung**

Abschließend darf ich mich bei all jenen bedanken, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte vollenden können.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt, der mich in seine Forschungsgruppe aufnahm und die Möglichkeit zur Erlangung eines Doktorgrades überhaupt erst schaffte.

Bei Frau Dr. Monika Fijak bedanke ich mich für die Betreuung. Vielen Dank auch an Frau Dr. Magdalena Walecki, die mich die Labortechniken lehrte.

Auch dem restlichen Team der AG Meinhardt, Dr. Jörg Klug, Dr. Sudhanshu Bhushan, Dr. Ferial Aslani, Dr. Florian Eisel, Dr. Zhengguo Zhang, Dr. Vera Michel, Suada Fröhlich und Dr. Jan-Per Wenzel gilt es, meinen Dank auszusprechen. Nicht nur durch kompetente Hilfestellung, sondern auch durch gemeinsames Lachen habt ihr mich tagtäglich unterstützt.

Dann bleibt noch der Dank an jene, die mich privat während dieser Zeit unterstützten. Hierbei kann ich sicherlich nicht alle nennen, die mir Zuspruch taten, aber insbesondere gilt mein Dank meiner Familie Jutta und Rudolf Stadler, Anna und Christian Strob, Florian Stadler, Andrea Kraus, Julia und Maximilian Stadler, Milan Stadler, sowie meinen FreundInnen Daniela Lang, Barbara Dirscherl, Santhiya Sivanesakumar, Thomas Wendling, Simon-Richard Finke, Birgit Saller, Inga Rimkutė, Jurgita Ivanauskaitė, Max Metze, Corinna Blum, Annerose Mengel und zuletzt Carlo Wilke. Ihr seid das Beste, was einem passieren kann.