

Der regulatorische Effekt von Testosteron auf die inflammatorische Antwort in
Sertoli Zellen und testikulären Makrophagen

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

vorgelegt von Damm, Lara-Jil, geb. Sauber
aus Saarbrücken

Gießen 2018

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie (Leiter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt)
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Middendorff

Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt

Gutachter: PD Dr. rer. nat. L. Konrad

Tag der Disputation: 05.06.2018

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Fijak, M., Damm, L.-J., Wenzel, J.-P., Aslani, F., Walecki, M., Wahle, E., ... Meinhardt, A. (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. doi:10.1111/aji.12363

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	LAGE UND ANATOMISCHER AUFBAU DES HODENS	1
1.2	FUNKTION DES HODENS	1
1.3	TESTOSTERON UND DIE ZELLEN DES INTERSTITIELLEN KOMPARTIMENTS	2
1.4	IMMUNPRIVILEG DES HODENS	3
1.5	TESTIKULÄRE MAKROPHAGEN	5
1.5.1	IMMUNOLOGISCHE FUNKTION VON TM	8
1.5.2	ZYTOKINPRODUKTION VON TM	8
1.5.3	CHEMOKINPRODUKTION VON TM	11
1.6	ZELLEN DES TUBULÄREN KOMPARTIMENTS	12
1.7	SERTOLI ZELLEN	13
1.7.1	BLUT-HODEN-SCHRANKE	14
1.7.2	IMMUNOLOGISCHE FUNKTION VON SC	15
1.7.3	ZYTOKINPRODUKTION VON SC	15
1.7.4	CHEMOKINPRODUKTION VON SC: MCP-1	17
1.8	DER HODEN UNTER INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN	17
1.9	EXPERIMENTELLE ENTZÜNDUNGSMODELLE IM HODEN	18
1.9.1	AKUTE ENTZÜNDUNG IM LPS-MODELL	18
1.9.2	EXPERIMENTELLE AUTOIMMUN-ORCHITIS (EAO) ALS MODELL CHRONISCHER HODEN-ENTZÜNDUNG	19
1.10	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2	<u>MATERIAL</u>	22
2.1	MATERIAL UND GERÄTE	22
2.2	REAGENZIEN UND VERSUCHSMATERIAL	24
2.3	DNA GELELEKTROPHORESE: VERWENDETE LÖSUNGEN	25
2.4	VERWENDETE ZELLKULTURMEDIENTEN	26
2.4.1	MEDIUM FÜR TM: DMEM/HAM'S F-12	26
2.4.2	MEDIUM FÜR SC: RPMI 1640	27

3	METHODEN	28
3.1	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON TM	28
3.2	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON SC	29
3.3	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	31
3.4	MORPHOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN: IMMUNFLUORESCENZ AN KULTIVierten PRIMÄREN TM	32
3.4.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	32
3.4.2	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	32
3.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN: NUKLEINSÄUREANALYTIK	33
3.5.1	ARBEITEN MIT RNA	33
3.5.2	RNA ISOLIERUNG AUS KULTIVierten ZELLEN	33
3.5.3	SPEKTROPHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	35
3.5.4	cDNA SYNTHESE MITTELS REVERSE-TRANSKRIPTASE-PCR (RT-PCR)	36
3.5.5	STANDARD PCR	37
3.5.6	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	38
3.5.7	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	38
3.5.8	PRIMER	42
3.5.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	DIE ISOLIERTEN PRIMÄREN TM WEISEN EINE HOHE REINHEIT AUF	44
4.2	GENEXPRESSION VON IL-6, MCP-1 UND TNF-α	45
4.2.1	DIE PRÄPARIERTEN RNA PROBEN WAREN FREI VON GENOMISCHER DNA	46
4.2.2	MITTELS REVERSE TRANSKRIPTION WURDE RNA IN cDNA UMGESCHRIEBEN	47
4.2.3	DIE mRNA EXPRESSION VON IL-6, MCP-1 UND TNF- α LÄSST SICH MITTELS PCR IN TM NACHWEISEN	48
4.2.4	DIE mRNA EXPRESSION VON IL-6, MCP-1 UND TNF- α LÄSST SICH MITTELS PCR IN SC NACHWEISEN	50
4.3	MITTELS REAL-TIME PCR LÄSST SICH DIE IL-6, IL-10, TNF-α UND MCP-1 mRNA EXPRESSION QUANTITATIV NACHWEISEN	52
4.3.1	SCHMELZKURVENANALYSE IN DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR SCHLIESST UNSPEZIFISCHE AMPLIFIKATIONSPRODUKTE AUS	53

4.3.2	DIE AMPLIFIKATIONSPRODUKTE LASSEN SICH MITTELS GELELEKTROPHORESE NACHWEISEN	54
4.3.3	DIE LPS-STIMULIERTE EXPRESSION VON MCP-1 UND TNF- α IST IN TM NACH 3 H UND IN SC NACH 6 H AM HÖCHSTEN	55
4.4	TESTOSTERON REGULIERT DIE STIMULIERTE EXPRESSION VON IL-6, IL-10 UND MCP-1 IN TM	56
4.5	TESTOSTERON MINDERT DIE LPS-STIMULIERTE TNF- α EXPRESSION IN SC	58
5	DISKUSSION	60
5.1	IMMUNREGULATION AUF ZELLULÄRER EBENE	60
5.1.1	IMMUNANTWORT VON TM IM LPS-ENTZÜNDUNGSMODELL	60
5.1.2	AKTIVIERUNG UND SIGNALWEGE VON TM	62
5.1.3	HERKUNFT DER TM	63
5.1.4	IMMUNOLOGISCHE FUNKTION VON SC	64
5.1.5	IMMUNANTWORT VON SC IM LPS-ENTZÜNDUNGSMODELL	65
5.1.6	SIGNALWEGE VON SC ÜBER TLR	66
5.2	ZYTOKINEXPRESSION IM ZELLVERGLEICH	67
5.2.1	IL-6	67
5.2.2	TNF- α	68
5.2.3	IL-10	69
5.3	EXPRESSION DES CHEMOKINS MCP-1 IM ZELLVERGLEICH	70
5.4	IMMUNREGULATION AUF ENDOKRINER EBENE	71
5.4.1	WIRKUNG VON TESTOSTERON AUF AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	71
5.4.2	REGULATORISCHE WIRKUNG VON TESTOSTERON AUF MOLEKULARER EBENE	72
5.4.3	AUSBLICK	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	SUMMARY	79
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	80
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	83
10	LITERATURVERZEICHNIS	84

<u>11</u>	<u>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</u>	<u>100</u>
<u>12</u>	<u>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>101</u>
<u>13</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>102</u>

1 Einleitung

1.1 Lage und anatomischer Aufbau des Hodens

Der Hoden (Testis) gehört zu den inneren Geschlechtsorganen und ist paarig angelegt. Nach embryonaler Anlage in der Bauchhöhle erfährt er im Laufe der Entwicklung einen Hodenabstieg (Descensus testis) währenddessen er entlang einer bandartigen Leitstruktur (Gubernaculum) durch den Leistenkanal in den Hodensack (Skrotum) wandert, der sich außerhalb des Bauchraums befindet. Er ist pflaumenförmig und hat ein Volumen von ca. 25 ml. Eine derbe bindegewebige Kapsel (Tunica albuginea) umgibt ihn und durchzieht das Hodengewebe mit feinen Septen, die es in zahlreiche Hodenläppchen (Lobuli testis) untergliedern. Die Lobuli bilden das Hodenparenchym und laufen von der Tunica albuginea zum Rete testis hin keilförmig zu, welches sich am Mediastinum testis befindet. Sie bestehen aus einem oder mehreren stark gewundenen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), die alle im Rete testis münden. Das Rete testis ist ein Netzwerk aus feinen Kanälchen, welches die Tubuli seminiferi mit 10-12 Ductuli efferentes verbindet und zum Nebenhodengang (Ductus epididymis) führt, der anschließend in den Samenleiter (Ductus deferens) übergeht. Über ihn werden die reifen Spermien nach außen befördert (Alfred Benninghoff, 2004).

1.2 Funktion des Hodens

Grundsätzlich hat der Hoden zwei verschiedene Funktionen. Er ist verantwortlich für die Reifung der Keimzellen (Spermatogenese), die im tubulären Kompartiment stattfindet (siehe Abbildung 1, Seite 2) und hauptsächlich von Sertoli Zellen (SC) reguliert und kontrolliert wird (Petersen & Soder, 2006). Die endokrine Funktion des Hodens besteht aus der Produktion und Sekretion verschiedener Hormone (Androgene, Östrogene, Gewebshormone), die im interstitiellen Kompartiment (siehe Abbildung 1, Seite 2) überwiegend von Leydig Zellen (LC) synthetisiert werden (Liu et al., 2013; O'Shaughnessy et al., 2006). Diese deutlich voneinander abgrenzbaren Kompartimente stehen in enger funktioneller Beziehung zueinander, da sie sich gegenseitig in hohem Maße beeinflussen (Rebourcet et al., 2014).

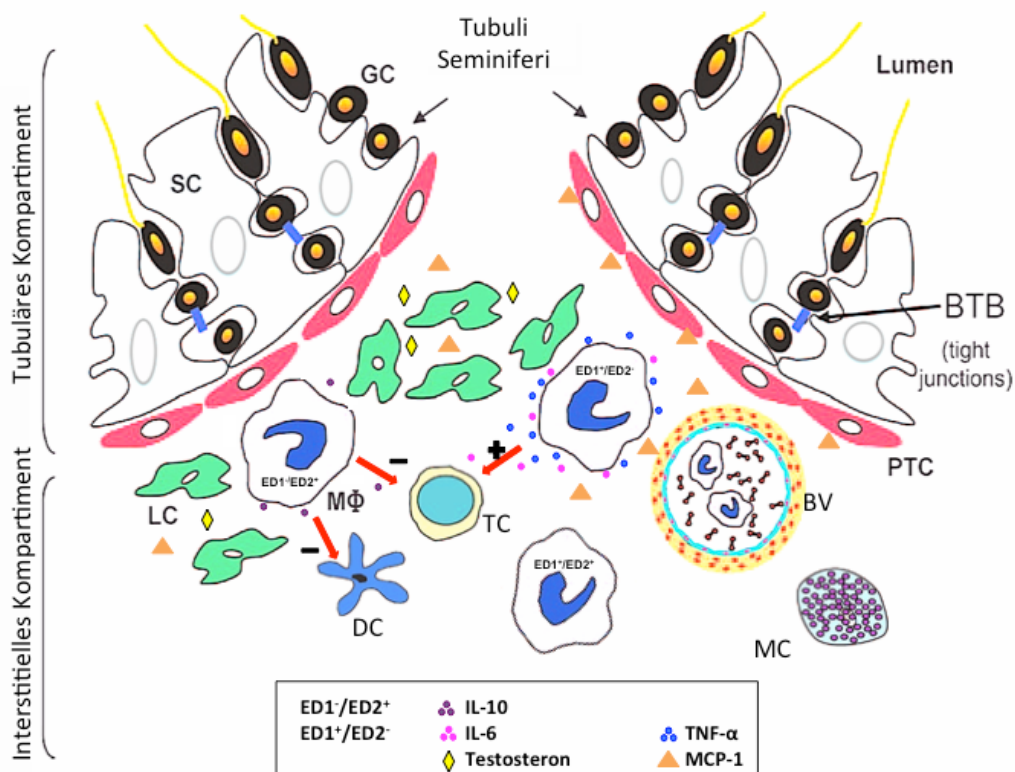


Abbildung 1: Interstitielles und tubuläres Kompartiment im Hoden

Schematische Darstellung des interstitiellen und tubulären Kompartiments im Hoden, stark modifiziert nach Fijak & Meinhardt, 2006. Die Tubuli seminiferi bestehen aus SC, peritubulären Zellen (PTC) und Keimzellen (GC) in verschiedenen Entwicklungsstadien, die durch die Blut-Hoden-Schranke (BTB) voneinander separiert werden. Im interstitiellen Kompartiment befinden sich LC, die Testosteron sezernieren. Die Makrophagenpopulation ($M\Phi$) lässt sich in drei Typen unterscheiden: residente Makrophagen ($ED1^+/ED2^+$), Makrophagen, die frisch aus der Blutzirkulation rekrutiert worden sind ($ED1^+/ED2^-$) und eine weitere Population, die sich in einem Entwicklungsstadium zwischen diesen beiden befindet ($ED1^+/ED2^+$). Residente Makrophagen wirken inhibierend auf Immunzellen durch Bildung von Interleukin-10 (IL-10). $ED1^+$ Makrophagen wirken stimulierend auf Immunzellen durch Bildung von IL-6 und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α). Das interstitielle Kompartiment wird des Weiteren von dendritischen Zellen (DC), T-Lymphozyten (TC) und Mastzellen (MC) besiedelt. Darüber hinaus liegen dort Blutgefäße (BV) in denen sich weitere Immunzellen befinden und rekrutiert werden können.

1.3 Testosteron und die Zellen des interstitiellen Kompartiments

Das interstitielle Bindegewebe umgibt die Samenkanälchen und enthält eine amorphe extrazelluläre Matrix, in der LC, testikuläre Makrophagen (TM) und vereinzelt Mastzellen sowie fibroblastenähnliche Zellen eingebettet sind. LC sind die größten Zellen im intertubulären Raum und bilden dichte Zellverbände aus, die von TM begleitet werden und Blutgefäße umschließen. Sie produzieren vornehmlich Testosteron, was in den interstitiellen Raum diffundiert und dort an das Trägerprotein androgenbindendes Protein (ABP) gebunden wird, welches von SC sezerniert wird

(Fritz et al., 1976). Dabei ist die intratestikuläre Testosteronkonzentration um das Hundertfache höher, als die im Serum. Es stimuliert die Entwicklung primärer und sekundärer Geschlechtsmerkmale, sowie die Spermatogenese. Darüberhinaus lassen zahlreiche Hinweise vermuten, dass Testosteron immunsupprimierende Wirkung hat und somit maßgeblich zum Immunprivileg des Hodens beiträgt (Fijak et al., 2011b). Die Steroidsynthese der LC unterliegt einem hormonellen Regelkreislauf, wobei luteinisierendes Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen stimulierend auf die Synthese von Testosteron wirkt. Jedoch kann sie auch entscheidend von den örtlichen Faktoren beeinflusst werden. Nachweislich können TM die Expression von Testosteron durch Sekretion von 25-Hydroxycholesterol stimulieren (Nes et al., 2000). Es zeigte sich, dass bei Abwesenheit von TM im Hoden der Testosteronspiegel sinkt, was zu Infertilität führen kann (Bergh et al., 1993). Jedoch sind TM ebenfalls in der Lage inhibierend auf die Testosteronbildung zu wirken, indem sie unter entzündlichen Bedingungen pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) sezernieren (Hales, 2002). Dies weist darauf hin, dass Testosteron im engen funktionellen Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen im Hoden steht.

1.4 Immunprivileg des Hodens

Ein Gewebe gilt als immunprivilegiert, wenn die Abstoßung von alloge-
nen Transplantaten verzögert oder gänzlich unterdrückt wird. Dieser immunologische Sonderstatus findet sich in der vorderen Augenkammer, im Gehirn, der Plazenta und im Hoden (Fijak, Bhushan, & Meinhardt, 2011; G Kaur, Mital, & Dufour, 2013; Santeford et al., 2016; Stenqvist et al., 2013; Zhu et al., 2016).

Mit Beginn der Pubertät teilen sich die Spermatogonien im Hoden und beginnen sich zu haploiden Spermatiden zu differenzieren, welche ein neues Antigenmuster exprimieren. Zu diesem Zeitpunkt ist die Reifung und Ausbildung der Selbsttoleranz des Immunsystems bereits abgeschlossen. Das Immunsystem ist jedoch in der Lage, die hoch immunogenen Spermatiden im Hoden zu tolerieren, während diese in anderen Körperteilen starke Immunreaktionen auslösen (Tung et al., 1981). Zwar ist die Immunantwort im Hoden verglichen mit anderem Gewebe wie der Leber deutlich reduziert, dennoch lässt sich nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine ausgeprägte Immunreaktion im Hoden nachweisen. Das Immunsystem bietet dem

Einleitung

Hoden also trotz der Toleranz immunogener Spermatozoen effektiven Schutz vor pathogenen Organismen (Bakterien) (O'Bryan et al., 2005). Ursprünglich hielt man die Blut-Hoden-Schranke für den ausschlaggebenden Faktor, dem das Immunprivileg des Hodens zu zuschreiben ist (siehe Abbildung 1, Seite 2). Jedoch stellte sich heraus, dass Transplantate im interstitiellen Kompartiment des Hodens von Ratten ebenfalls eine verlängerte Lebensdauer haben (Head et al., 1983). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie SC, Hormone, Wachstumsfaktoren, oder spezialisierte Leukozytenpopulationen und die Zytokine, die sie produzieren, dafür verantwortlich ist (Fijak, 2011a). Dabei spielen die ortsständigen Zellen durch das Muster ihrer Proteinexpression eine besonders große Rolle. TM besitzen einen überwiegend immunoregulatorischen Charakter der nachweislich dem testikulären Umfeld zuzuschreiben ist. Makrophagen, die aus der Blutzirkulation rekrutiert werden, erfahren eine Konversion zu residenten TM und weisen ein charakteristisches Zytokinprofil auf. Dadurch werden im Hoden - verglichen mit anderen Organen - konstitutiv hohe Mengen an immunoregulatorischen Zytokinen sezerniert (Winnall et al., 2011).

Es sind jedoch nicht nur immunkompetente Zellen am Immunprivileg des Hodengewebes beteiligt. Die somatischen Zellen (LC, SC und peritubuläre Zellen, siehe Abbildung 1, Seite 2) tragen ebenso dazu bei, indem sie unter anderem eine breitgefächerte Auswahl an Zytokinen sezernieren, mit denen sie die Immunreaktion im Hoden regulieren (Guazzone et al., 2009). Dabei spielt die Gesamtheit der Funktionen der SC eine herausragende Rolle beim Schutz des Keimepithels vor immunologischen Angriffen. Dies zeigen sämtliche Transplantationsstudien, die sich die immunologische Sonderstellung der SC bei allogenen (Empfänger und Spender gehören derselben Spezies an) und sogar xenogenen (Empfänger und Spender gehören unterschiedlichen Spezies an) Transplantationen zu Nutze machen (Doyle et al., 2012; Luca et al., 2016; Mital et al., 2010; Selawry & Cameron, 1993).

Neben all diesen Komponenten ist ein anderer wichtiger Faktor für das immunologische Milieu des Hodens nicht zu vernachlässigen. So wird dem Effekt von Testosteron immer mehr Bedeutung für die Regulation verschiedener immunologischer Funktionen im Körper zugesprochen. Viele Studien auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen haben bereits gezeigt, welches stark immunsuppressive Potential von Androgenen ausgeht (Airas, 2015; Keith et al., 2013; Lotter et al., 2013; Trigunaitė et al., 2013); dabei lassen sich die genauen Faktoren, die dazu führen in ihrer Gesamtheit jedoch noch

nicht exakt erklären. So wurde jedoch gezeigt, dass Testosteron eine wichtige Rolle in der Entstehung von immunoregulatorischen Foxp3⁺ T-Zellen sowie in der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokinen spielt (Fijak et al., 2015; Walecki et al., 2015).

1.5 Testikuläre Makrophagen

TM sind bereits bei Geburt im Rattenhoden zu finden (Hutson, 1990). Da sie zu den Immunzellen gehören, befinden sie sich unter physiologischen Bedingungen nur im interstitiellen und nie im tubulären Gewebe des Hodens, wo sie keinen direkten Kontakt zu Keimzellen haben können (siehe Abbildung 1, Seite 2). Neben LC bilden sie den größten zellulären Anteil des Interstitiums, wobei das Verhältnis zwischen LC und TM etwa 4:1 beträgt (Wang et al., 1994). Die Anzahl der TM im Hoden wird direkt durch LC gesteuert was auf das enge Zusammenspiel zwischen diesen beiden Zellarten hinweist. Diese Annahme wird bestätigt durch die Beobachtung, dass LC Zellausläufer ausbilden, mit denen sie in direktem Kontakt zu TM stehen (Hutson, 1992). TM sind für die Entwicklung von LC *in vivo* notwendig (Gaytan et al., 1994), umgekehrt erhalten LC testosteronabhängig die Makrophagenpopulation im Hoden und können eine Rekrutierung zirkulierender Makrophagen veranlassen, um Immunreaktionen zu initiieren (Hedger, 2002; Lei et al., 2004; Meinhardt et al., 1998; Wang et al., 1994; Winnall & Hedger, 2013).

Mantovani und Locati untergliederten die Reaktionen von Makrophagen entsprechend der Aktivierung von Th1- und Th2-Zellen in 2 Kategorien: klassische M1 Aktivierung und die alternative M2 Aktivierung. Der M1 Phänotyp wird aktiviert über Liganden von *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und Interferon- γ (IFN- γ). Die alternative M2 Aktivierung wird hingegen durch Interleukin-4 (IL-4) oder IL-13 vermittelt (Mantovani & Locati, 2009; Sica & Mantovani, 2012). Der M1 Phänotyp besitzt potente pro-inflammatorische Eigenschaften durch eine hohe Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen und wird mit der Immunantwort von Th1-Lymphozyten in Verbindung gebracht. Er ist charakterisiert durch eine starke Abwehrfunktion gegen Krankheitserreger und Tumorgewebe. Daher wird dieser Makrophagentyp mit der Einleitung und Erhaltung von akuten Entzündungsreaktionen assoziiert. Die Aktivierung findet über Bindung von LPS an

TLR4 oder Bindung von IFN- γ an dessen Rezeptor statt und stimuliert die Expression pro-inflammatorischer Gene wie TNF- α , IL-6 und Chemokine über den *Nuclear factor kappa B* (p65-NF- κ B) Signalweg, bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (*inducible Nitric Oxid Synthase*, iNOS) und weitere Chemokine über den *Signal Transducers and Activators of Transcription 1* (STAT1) Signalweg. Der M2 Phänotyp zeigt hingegen neben immunoregulatorischen Eigenschaften und parasitären Abwehrmechanismen auch Beteiligung an Gewebeumbau (*Remodeling*) und wird aktiviert über die Bindung von IL-4, IL-13 oder IL-10 an deren Rezeptoren, was über STAT6 bzw. p50-NF- κ B verschiedene Signalwege stimuliert, die mit Immunsuppression und Tumorwachstum in Verbindung stehen (Sica & Mantovani, 2012). M2 Makrophagen exprimieren *Scavenger*-Moleküle und sind daher effiziente Phagozyten, die Bakterien oder totes Zellmaterial aufnehmen können. Demzufolge spielen sie eine tragende Rolle bei chronischen Entzündungsreaktionen (Sica & Mantovani, 2012).

TM bilden einen gewebspezifischen Phänotyp aus, welcher sich bezüglich des sezernierten Proteinmusters deutlich von peritonealen Makrophagen unterscheidet (Hutson & Stocco, 1989; Winnall et al., 2011). Zur Unterscheidung der TM macht man sich daher ihre Proteinexpression zunutze: der monoklonale Antikörper ED2 bindet spezifisch an den *Scavenger*-Rezeptor *Cluster of Differentiation 163* (CD163), der nur auf der Zellmembran ortsständiger Makrophagen zu finden ist und mit dem Modell der alternativen Aktivierung (M2) assoziiert ist; der Antikörper ED1 bindet an das lysosomale Antigen CD68, das von Monozyten/Makrophagen in der Blutzirkulation exprimiert wird. Man unterscheidet dem Charakter nach vier Arten von TM, wobei der Proteinexpression nach nur drei verschiedene Typen existieren:

ED1⁺/ED2⁻ (residente TM), ED1⁺/ED2⁺ (Überganspopulation) und ED1⁻/ED2⁺ („neueingetroffene“ TM), die die physiologische Makrophagenpopulation erhalten, oder infiltrierende TM, die durch inflammatorische Stimuli aus der Blutzirkulation zum entzündeten Gewebe rekrutiert werden (siehe Tabelle 1, Seite 7 nach Winnall & Hedger, 2013).

Tabelle 1: Makrophagenpopulationen im Hoden (nach Winnall & Hedger, 2013)

Merkmal	Bezeichnung	Charakter
ED1 ⁻ /ED2 ⁺ (CD68 ⁻ CD163 ⁺)	Residente TM	Befinden sich bereits seit langem im Hoden. Differenzierte Makrophagen mit besonderen Eigenschaften, die von der testikulären Umgebung bestimmt werden.
ED1 ⁺ /ED2 ⁻ (CD68 ⁺ CD163 ⁻)	„Neu-eingetroffene“ TM	Monozytenartige Zellen, die sich erst seit kurzem im Hoden befinden. Besiedeln das Hodengewebe durch langsame Migration unter physiologischen Bedingungen.
	Infiltrierende TM	Monozyten/Makrophagen-Invasion, die den Hoden nach Entzündungsstimulus infiltriert.
ED1 ⁺ /ED2 ⁺ (CD68 ⁺ CD163 ⁺)	Zwischenpopulation	Hauptsächlich uncharakterisierte Zellen.

Residente ED1⁻/ED2⁺ Makrophagen zeigen immunoregulatorische Funktionen, wie die konstitutive Synthese von IL-10 oder *Macrophage Migration Inhibitory Factor* und weisen keine potenten Eigenschaften der T-Zell Stimulation auf (Guazzone et al., 2009; Meinhardt et al., 1996; Rival et al. 2006; Winnall & Hedger, 2013; Winnall et al., 2011). TM sind in der Lage, das Muster ihrer Proteinexpression an die Anforderungen ihrer Umgebung anzupassen, sodass „neu-eingetroffene“ physiologische Makrophagen (ED1⁺/ED2⁻) zu residenten ED1⁻/ED2⁺ Makrophagen werden können und in dem Gewebe verbleiben, ohne wieder in die Blutzirkulation zurück zu kehren (Wang et al., 1994). Eine solche physiologische Migration findet im Hoden konstitutiv statt und sichert den Erhalt der residenten Makrophagenpopulation, da diese nur in geringem Maße mitotische Aktivität aufweist, welche jedoch nicht ausreichend ist, um den Bestand der Population zu sichern (Schlatt et al. 1999; Winnall & Hedger, 2013). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Entzündungsreaktionen, die durch LPS induziert wurden, keine Proliferation residenter ED1⁻/ED2⁺ Makrophagen stattfindet. Vielmehr kommt es zu einer Rekrutierung von „infiltrierenden“ ED1⁺/ED2⁻ Monozyten/Makrophagen aus der Blutzirkulation, die durch SC oder LC gesteuert wird (Gerdprasert et al., 2002b). Sie weisen einen pro-inflammatorischen Charakter auf und exprimieren IL-1 β , TNF- α und andere inflammatorische Mediatoren (Winnall &

Hedger, 2013). Nach Entzündungsstimulus sezernieren sie IL-6 und *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1/CCL-2), was die inflammatorischen Eigenschaften dieser Subpopulation demonstriert. Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Subpopulation von „neu-eingetroffenen“ physiologischen ED1⁺/ED2⁻ Makrophagen, die kontinuierlich zum Hodengewebe migrieren, nur sehr geringe Reaktion auf eine *in vitro* Stimulation mit dem Entzündungsmediator LPS zeigt, obwohl sie das selbe Proteinmuster exprimieren wie „infiltrierende“ ED1⁺/ED2⁻ Makrophagen. Es wird daher angenommen, dass sie von unterschiedlichen Zellpopulationen abstammen (Winnall & Hedger, 2013).

1.5.1 Immunologische Funktion von TM

TM exprimieren Fc-Rezeptoren und besitzen bakterizide Eigenschaften, weshalb sie zu den Phagozyten zählen (Yee & Hutson, 1983). Im Rattenhoden können sie das angeborene Immunsystem aktivieren, da sie durch Expression von *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) Molekülen auf ihrer Oberfläche zur Antigenpräsentation für CD4⁺ T-Lymphozyten befähigt sind (Pöllänen & Maddocks, 1988; Rival et al., 2008). Sie spielen eine wichtige Rolle für das Immunsystem, da sie gleich am Anfang der „immunologischen Kaskade“ stehen.

1.5.2 Zytokinproduktion von TM

Die Funktion von Makrophagen ist neben Fc-Rezeptor-vermittelter Phagozytose körperfremder Stoffe (Pathogene) auch die Produktion von Chemokinen wie MCP-1 und Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-1, *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) und IL-10, wodurch sie die Immunantwort im Hoden steuern (Guazzone et al., 2003; Miller et al., 1983; Winnall et al., 2011). Zytokine spielen eine wichtige Rolle für die Vermittlung der Immunantwort. Im Hoden haben sie hauptsächlich zwei Funktionen: sie fungieren als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren während der Spermatogenese (unter physiologischen Bedingungen) und als Mediatoren von Immunreaktionen, die im Laufe von Entzündungsprozessen ausgeschüttet werden (unter pathologischen Bedingungen). Chemotaktisch wirkende Zytokine (Chemokine) veranlassen die Rekrutierung von Lymphozyten aus der Blutzirkulation zum Ort der Entzündung. Sie

werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt, die entweder primär auf neutrophile Granulozyten, Monozyten, oder T-Lymphozyten wirken (Baggiolini, 1993; Sozzani et al., 1996).

1.5.2.1 TNF- α

TNF- α gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und existiert in zwei biologisch aktiven Formen: als Typ-II Transmembranprotein und als die davon proteolytisch abgespaltene lösliche Form. Über den Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) kann TNF- α durch Kaspaseaktivierung in der Zielzelle ein Apoptosesignal induzieren. Jedoch auch Überlebenssignale werden über diesen Rezeptor vermittelt, was abhängig von der Anzahl der intrazellulären Adapterproteine ist. Durch diese Funktion ist es an der Regulation der Spermatogenese sowie Überleben und Apoptose von Keimzellen beteiligt. Im Hoden bewirkt TNF- α eine Hemmung der Testosteronproduktion und erhöht die Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke (Guazzone et al., 2009; Li et al., 2006; Lydka et al., 2012; Suescun et al., 2003).

TNF- α nimmt eine pro-inflammatorische Schlüsselfunktion ein, denn es dient der Einleitung von Entzündungsreaktionen, indem es die Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen initiiert und diese zur Sekretion weiterer Zytokine wie IL-6 stimuliert. Es erhöht die Permeabilität von Gefäßwänden für Immunzellen und steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen, was die Extravasation von Immunzellen erleichtert (Eierman et al., 1989; Sica et al., 1990; Sirois et al., 1990). Die Wirkung des Zytokins ist primär lokal begrenzt und ist maßgeblich an dem Gewebeschaden (Keimzellapoptose) beteiligt, der im Verlauf einer Entzündung zu beobachten ist. Dabei wird es ebenso von residenten ED2⁺ Makrophagen wie von nicht-residenten ED1⁺ Makrophagen exprimiert (Theas et al., 2008).

TNF- α wird von aktivierten TM, verglichen mit Makrophagen anderer Organe, nur in geringen Mengen sezerniert. Dies unterstützt die These, dass der Hoden als immunprivilegiertes Organ eine geringere immunologische Grundaktivität aufweist, als andere Organe (O'Bryan et al., 2005).

1.5.2.2 IL-6

IL-6 ist eines der potentesten pro-inflammatorischen Zytokine, da es zur Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten sowie von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) und natürlichen Killer-Zellen führt und damit die Immunkaskade aktiviert (Rival et al., 2006). Es induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen (z.B. C reaktives Protein) in der Leber und die Erhöhung des Plasmakortisolspiegels. Trotz seiner pro-inflammatorischen Eigenschaften besitzt es auch immunoregulatorische Funktionen, abhängig davon, in welchem Gewebeumfeld die Wirkung stattfindet (Kamimura et al., 2003).

TM zeigen *in vitro* eine eher schwache Expression von IL-6 im Vergleich zu den somatischen Zellen des Hodens. Im Modell chronischer testikulärer Entzündung (experimentelle Autoimmun-Orchitis, EAO) zeigten aktivierte Makrophagen sowie LC eine erhöhte IL-6 Expression (Rival et al., 2006). IL-6 bewirkt eine Stimulation der IL-10 Expression durch Lymphozyten und Monozyten und wirkt anregend auf die Expression von IL-1ra (Rezeptorantagonist) in Makrophagen (Fischer, 2006).

Die Expression von IL-6 kann durch TNF- α , IL-1 und LPS stimuliert werden (Kern et al., 1995; Syed et al., 1993). TGF- β zeigt hingegen inhibitorische Wirkung auf die IL-6 Expression (O'Bryan et al., 2005).

1.5.2.3 IL-10

IL-10 ist ein immunoregulatorisches Zytokin und kann die LPS-induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie die Aktivierung von T-Lymphozyten hemmen (Said et al., 2010). Es wird im Hoden konstitutiv von residenten TM sezerniert und trägt dadurch zum Immunprivileg des Hodens bei. Durch Behandlung mit LPS lässt sich die Sekretion von IL-10 durch Makrophagen stimulieren (Winnall et al., 2013; Winnall et al., 2011). Im Ischämie-Reperusions-Modell des Hodens zeigt IL-10 einen protektiven Effekt auf die Auswirkungen von Ischämie auf die Zellstrukturen (Ozturk et al., 2014).

1.5.3 Chemokinproduktion von TM

Chemokine sind kleine chemotaktisch wirkende Zytokine, die ihrer molekularen Struktur nach in zwei Gruppen eingeteilt werden (CXC und CC). Diese Unterteilung richtet sich danach, ob die beiden N-terminalen Cysteine durch eine Aminosäure getrennt werden (CXC) oder direkt aufeinanderfolgen (CC). Chemokine binden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der mit sieben Helices in der Zellmembran verankert ist. Man unterscheidet etwa 50 Chemokine und 20 verschiedene Rezeptoren. Sie fördern die Rekrutierung von Leukozyten während Entzündungsreaktionen, da sie die Extravasation von Zellen in der Blutzirkulation begünstigen (Guazzone et al., 2009; Guazzone et al., 2012; Schall & Bacon, 1994; Sica et al., 1990; Zlotnik & Yoshie, 2012).

Monocyte Chemoattractant Protein -1 (MCP-1) / CC Chemokin Ligand 2 (CCL2)

MCP-1 ist ein Chemokin, das im Hoden vornehmlich von peritubulären Zellen und LC exprimiert wird, jedoch wurde es auch im Entzündungsmodell im Überstand von TM und auf Expressionsebene in SC nachgewiesen (Guazzone et al., 2003). Die Bildung von MCP-1 im Hoden wird durch inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-6 und TNF- α getriggert (Biswas et al., 1998; Gerdprasert et al., 2002b). MCP-1 nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen ein, die dem chemotaktischen Gradienten nach die Blutbahn in Richtung Entzündungsherd verlassen (Deshmane et al., 2009). Dadurch kommt es zu einer Umstrukturierung der testikulären Makrophagenpopulation mit einem erhöhten Anteil an aktivierten Zellen mit pro-inflammatorischem Zytokinprofil. Im EAO-Modell wurde eine stark erhöhte MCP-1 mRNA Expression nachgewiesen, welche sich dosisabhängig durch Behandlung mit Testosteron mindern ließ (Fijak et al., 2011b).

1.6 Zellen des tubulären Kompartiments

Im tubulären Kompartiment des Hodens befinden sich kontraktile peritubuläre Zellen, die die Tubuli umgeben und mit peristaltischen Kontraktionen für die Fortbewegung der amotilen Spermien in den Tubuli sorgen (Skinner et al., 1985). Zusammen mit SC produzieren sie die Basalmembran, welche das Samenepithel umgibt. SC sitzen der Lamina propria direkt auf. Sie bilden untereinander *Tight Junctions* aus (Blut-Hoden-Schranke) und umgeben die Keimzellen und ihre verschiedenen Entwicklungsstadien: Spermatogonien, postmeiotische Spermatozyten und Spermatiden (siehe Abbildung 2). Gemeinsam mit peritubulären Zellen bilden sie die tubuläre Struktur der Samenkanälchen, in denen die Keimzellen eingebettet sind (Nieschlag & Behre, 2001).

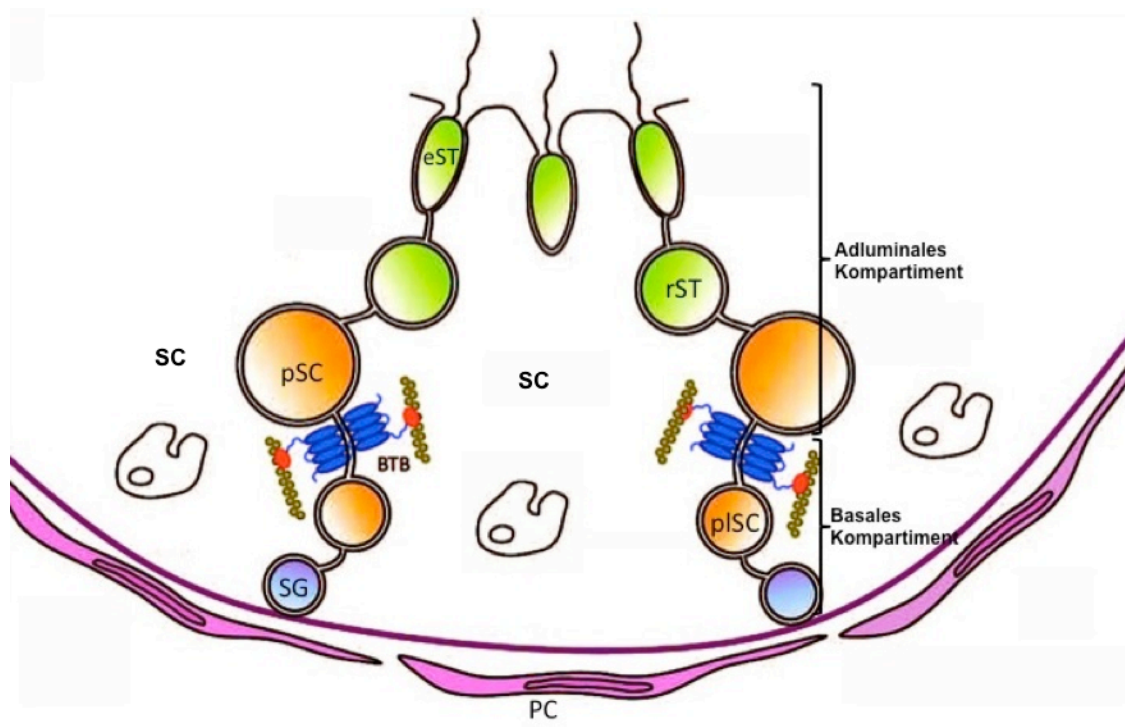


Abbildung 2: Zellen des tubulären Kompartiments

Schematische Darstellung des tubulären Kompartiments, modifiziert nach Pérez et al., 2013. Die Tubuli seminiferi werden von peritubulären Zellen (PC) umgeben. Sertoli Zellen (SC) umschließen die Keimzellen in ihren unterschiedlichen Entwicklungsstadien: Spermatogonien (SG) und präleptotäne Spermatozyten (plSC) befinden sich im basalen Kompartiment, das nach adluminal von der Blut-Hoden-Schranke (BTB) abgeschlossen wird. Im adluminalen Kompartiment befinden sich pachytäne Spermatozyten (pSC), runde Spermatiden (rST) und elongierte Spermatiden (eST), die über Adhäsionsverbindungen mit der SC in Kontakt stehen.

1.7 Sertoli Zellen

Sertoli Zellen (nach ihrem Erstbeschreiber, dem Physiologen Enrico Sertoli benannt, 1842-1910) gehören zu den somatischen Zellen, die unter physiologischen Bedingungen nur in den Samenkanälchen des Hodens zu finden sind. Sie erstrecken sich säulenförmig von der Lamina propria bis zum Lumen des Tubulussystems und fungieren als Stützzelle für Keimzellen mit denen sie über dynamische Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*) verknüpft sind (siehe Abbildung 2, Seite 12). Dabei werden Verbindungen zu Ankerproteinen des Zytoskeletts hergestellt, die ein transzelluläres Netzwerk zwischen SC und Keimzellen ausbilden (Das et al., 2013; Lui et al., 2003).

Als „Ammen-Zellen“ kontrollieren sie unter der Steuerung von follikelstimulierendem Hormon und Androgenen die Spermatogenese (Loss et al., 2011). Dies geschieht indem sie die Keimzellen über Zell-Zell-Kontakte (*Gap Junctions*) mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgen und ein für sie spezifisches Milieu schaffen (Griswold, 1998; Petersen & Soder, 2006). Sie produzieren unter anderem Transportproteine (ABP zum Transport von Testosteron, Transferrin zum Transport von Eisen), extrazelluläre Matrixproteine, sowie Metabolite (Laktat, Pyruvat), Aktivin, Inhibin und Zytokine. Da die Expression verschiedener Mediatoren auch in Spermatogonien nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass die Spermatogenese auf dem Austausch stimulierender und inhibierender Faktoren zwischen SC und Spermatogonien beruht (Foucault et al., 1994; Hoeben et al., 1999; Okuma et al., 2005). Als residente somatische Zellen des Hodens zählen SC zu den nicht-professionellen Phagozyten. Bei der Reifung von Spermatogonien zu Spermatiden bleibt das Zytoplasma mit einigen Zellorganellen zurück (Residualkörper), welches von SC phagozytiert wird. Ebenso phagozytieren sie apoptotische Keimzellen und spielen dabei eine wichtige Rolle zur Erhaltung der tubulären Homöostase (Pelletier et al., 2009). Bei der Phagozytose von Bakterien zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu Makrophagen: anders als Immunzellen eliminieren sie ein Bakterium indem es unter Umstrukturierung des Zytoskeletts im Zytoplasma aufgenommen wird, ohne dabei inflammatorische Signale auszusenden, was ihre immunologische Funktion unterstreicht (Akiko & Osada, 2013; Carr et al., 1968; Chemes, 1986; Yefimova et al., 2013).

1.7.1 Blut-Hoden-Schranke

SC bilden untereinander einen Verband von Zellen aus, der durch Zonulae occludentes (*Tight Junctions*) zusammengehalten wird. Die sogenannte Blut-Hoden-Schranke stellt eine Diffusionsbarriere für hydrophile Moleküle wie Proteine dar, was dem Schutz der heranreifenden Spermatiden dient, da sie von dem maturen Immunsystem als körperfremd eingestuft werden. Sie unterteilt das Samenepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment. In dem basalen Kompartiment befinden sich präleptotäne Spermatozyten und Spermatogonien, die sich mitotisch teilen. In dem adluminalen Kompartiment finden Meiose und Spermiogenese statt. Es enthält Spermatozyten und Spermatiden, die ins Lumen der Samenkanälchen abgegeben werden (siehe Abbildung 2, Seite 12). Durch die Barrierefunktion der Blut-Hoden-Schranke ist der adluminale Bereich der Samenkanälchen vom interstitiellen Gewebe, in dem sich Immunzellen und Blutgefäße befinden, abgegrenzt (Morrow et al., 2010; Schuppe & Meinhardt, 2005). Die Blut-Hoden-Schranke ist jedoch keine unüberwindbare Barriere, vielmehr ist sie als eine dynamische Struktur anzusehen, die ständigen Auf- und Abbauprozessen unterliegt. Dadurch wird die Migration der Keimzellen gewährleistet, ohne ihre Schutzfunktion zu vernachlässigen. Sie besteht aus verschiedenen Adhäsionsmolekülen, wie Claudin-11, N-Cadherin, Occludin und *Tight Junction Protein-1* (Zonula occludens-1, ZO-1) (Mazaud-Guittot et al., 2010; Morrow et al., 2010; Pérez et al., 2012).

Testosteron spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke. Im Mausmodell zeigte sich, dass das testikuläre Immunprivileg massiv beeinträchtigt wird, wenn der Androgenrezeptor (AR) in SC fehlt. Durch fehlerhafte Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke wird das Interstitium von Immunzellen besiedelt, die Antikörper gegen Keimzellantigene bilden und eine Autoimmunreaktion auslösen (Meng et al., 2011).

Auch die Adhäsionsverbindungen zwischen SC und Spermatiden unterliegen der Kontrolle von Testosteron, speziell die Verbindungen zwischen Cadherin/Cadherin und Integrin/Laminin. Bei Testosteronmangel kommt es zur Lösung der Zell-Zell-Verbindungen was eine verfrühte Abgabe der unreifen runden Spermatide in das Tubuluslumen zur Folge hat (Wong et al., 2005).

1.7.2 Immunologische Funktion von SC

Trotz ihrer Zuordnung zu den somatischen Zellen weisen SC hochpotente immunologische Funktionen auf, die sie zum Schutz des sie umgebenden Gewebes (heranreifende Keimzellen im Hoden) einsetzen. *In vitro* kultivierte SC sezernieren Faktoren, die immunsuppressiv auf die Proliferation aktivierter B- und T-Lymphozyten wirken und deren Sekretion von IL-2 senken (De Cesaris et al., 1992). Im Hoden von Ratten exprimieren sie Fas Ligand (FasL) und TGF- β und können dadurch in Lymphozyten von Mäusen, die Fas exprimieren Apoptose induzieren. Dies weist darauf hin, dass die Expression von FasL und TGF- β an der immunoregulatorischen Funktion von SC beteiligt ist (Yin et al., 2006). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Zellkulturüberstände von SC die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen stimulieren, was weitere Hinweise auf die immunologische Funktion von SC liefert (Campese et al., 2014).

Darüber hinaus haben zahlreiche Transplantationsstudien das hohe immunsuppressive Potential der „Ammen-Zellen“ belegt, wodurch es möglich ist, allogene und xenogene Inselorgane des Pankreas zusammen mit SC erfolgreich zu transplantieren, ohne dass eine zusätzliche immunsuppressive Therapie notwendig ist (Ar’Rajab et al., 1994; Cardona et al., 2006; Isaac et al., 2005; Selawry & Cameron, 1993). Diese Beobachtungen verdeutlichen die immunologische Schlüsselfunktion, die SC zur Erhaltung des Immunprivilegs im Hoden innehaben.

1.7.3 Zytokinproduktion von SC

Zytokine werden von SC nicht alleine zu immunologischen Zwecken gebildet. Sie dienen unter physiologischen Bedingungen als Wachstumsfaktoren und Regulatoren der Spermatogenese und beeinflussen die Dynamik der Blut-Hoden-Schranke, um die differenzierten Spermatogonien lumenwärts zu befördern, wobei die Integrität der Blut-Hoden-Schranke stets aufrechterhalten bleibt (Li et al., 2006; Lie et al., 2011).

1.7.3.1 IL-6

Im Rattenhoden wird IL-6 auch von SC sezerniert und moduliert Bestandteile der Blut-Hoden-Schranke. Unter inflammatorischen Bedingungen kann dies die Integrität der Blut-Hoden-Schranke beeinträchtigen, bis hin zum kompletten Verlust der Barrierefunktion. IL-6 initiiert interstitielle Entzündungsreaktionen und kann den Verlust der Keimzellen induzieren, der im EAO-Modell beobachtet wird (Pérez et al., 2012; Rival et al., 2006).

Durch LPS und pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 α und TNF- α lässt sich die IL-6 Produktion von SC stimulieren (Stéphan et al., 1997).

Es wird des Weiteren beschrieben, dass IL-6 unter normalen Bedingungen als parakriner und autokriner Faktor in die Steuerung der Spermatogenese involviert ist (Hedger & Meinhardt, 2003). IL-6 hat daneben eine wichtige Funktion als Differenzierungsfaktor. Es stimuliert Monozyten in der Blutzirkulation zu einer erhöhten Expression von *Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor* was zur Folge hat, dass sie sich bevorzugt zu Makrophagen differenzieren, anstatt zu dendritischen Zellen (Chomarat et al., 2000).

1.7.3.2 TNF- α

In geringen Mengen sezernieren auch SC TNF- α , jedoch wird der Hauptanteil unter inflammatorischen Bedingungen im Hoden von TM gebildet. TNF- α und dessen Rezeptor wird unter anderem von Spermatozyten und Spermatiden sezerniert. Es spielt eine wichtige Rolle für die Zell-Zell-Kontakte zwischen Spermatiden und SC und bewirkt eine Steigerung der Androgenrezeptoren (AR) in SC (Lydka et al., 2012; Pérez et al., 2013). Es wirkt als Überlebensfaktor für postmeiotische Keimzellen und bewirkt eine Öffnung der Blut-Hoden-Schranke, was den Spermatogonien die Migration Richtung Lumen ermöglicht (Lui & Lee, 2009). Li et al. (Li et al., 2006) zeigten, dass eine Behandlung mit TNF- α *in vivo* zu einer Reduktion der *Tight Junction* Proteine Occludin und ZO-1 führt, gefolgt von einer Diskontinuität der Blut-Hoden-Schranke. TNF- α zeigt des Weiteren einen negativen Einfluss auf die apikalen Zelladhäsionsmoleküle, die Spermatiden während der Reifung mit den SC verbinden. Durch den Effekt von TNF- α können unreife runde Spermatiden frühzeitig vom apikalen Pol ihrer „Ammen-Zelle“ getrennt und in das Tubulussumen freigesetzt

werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Auswirkungen der Behandlung mit TNF- α reversibel sind, was zu dem Schluss führt, dass der Effekt nicht auf Zytotoxizität basiert, sondern einen physiologischen Nutzen für die beteiligten Zellen hat (Li et al., 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass TNF- α ein sehr vielseitiges Zytokin ist, das nicht nur immunologische Funktionen besitzt. Es ist auch an der Steuerung der Spermatogenese beteiligt, indem es den AR in SC beeinflusst, oder die Versorgung der Keimzellen mit Laktat und Eisen unterstützt. Von Keimzellen sezerniert, bewirkt TNF- α in SC eine Erhöhung der Transferrinbildung und erhält damit die Spermatogenese (De et al., 1993). Da *in vitro* nachgewiesen wurde, dass TNF- α die Bildung von Adhäsionsmolekülen wie *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* und IL-6 in SC und peritubulären Zellen stimuliert, wird vermutet, dass unter inflammatorischen Bedingungen die Migration von Lymphozyten ins Gewebe durch TNF- α gefördert wird (Guazzone et al., 2009; Schell et al., 2008).

1.7.4 Chemokinproduktion von SC: MCP-1

SC exprimieren nur geringe Mengen an MCP-1 verglichen mit peritubulären Zellen oder LC. Über TLR wird in SC die Sekretion von MCP-1 und Adhäsionsmolekülen wie *Intercellular Adhesion Molecule-1* stimuliert. Es folgt eine chemotaktische Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen aus der Blutzirkulation und die Initiierung der Immunreaktion im Hoden (Riccioli et al., 2006; Starace et al., 2008).

1.8 Der Hoden unter inflammatorischen Bedingungen

Die Entzündung des Hodens stellt immunologisch eine besondere Situation dar. Durch das Zusammenspiel von TM, SC, sowie LC und deren Zytokinexpression wird das immunsuppressive Milieu im Hoden aufrechterhalten. Während entzündlichen Prozessen findet durch die Invasion immunologisch aktiver Zellen wie Lymphozyten oder Monozyten eine Änderung des Zytokinprofils statt. Oft geht dies einher mit Minderung der Spermatogenese und eingeschränkter Barrierefunktion der SC. Es kommt folglich zur Beeinträchtigung der tubulären Architektur wodurch Antigene differenzierter Spermatozyten und Spermatiden frei zugänglich für Immunzellen werden. Eine Autoimmunreaktion bis hin zum Untergang des Keimepithels ist die Folge (Fijak & Meinhardt, 2006; Guazzone et al., 2009).

1.9 Experimentelle Entzündungsmodelle im Hoden

Zur Erforschung der Immunreaktionen im Hoden wurden verschiedene experimentelle Modelle etabliert. Die Induktion einer Immunreaktion kann durch virale oder bakterielle Antigene erfolgen oder durch das Auslösen einer chronischen Autoimmunreaktion im *in vivo* Modell.

1.9.1 Akute Entzündung im LPS-Modell

LPS ist Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (z.B. *Escherichia coli*). Beim Zerfall von Bakterien werden LPS-Bruchteile freigesetzt, die toxische Wirkung besitzen (Endotoxine). Durch sie findet eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems statt. LPS ist ein potenter Aktivator von Makrophagen und regt sie zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine an, wodurch die immunologische Kaskade aktiviert wird (Andersson et al., 1992). Die Stimulation mit LPS wird genutzt, um eine akute Entzündungsreaktion zu imitieren, ohne pathogene Mikroorganismen zu applizieren. O'Bryan et al. (O'Bryan et al., 2000) beschrieben das durch intraperitoneale LPS-Injektion *in vivo* induziertes LPS-Entzündungsmodell mit seinen Auswirkungen im Rattenhoden. Sie beobachteten einen inhibierenden Effekt auf die Sekretion von LH und infolgedessen eine Senkung des Testosteronspiegels im Serum und im Hoden. Es zeigte sich eine reduzierte Funktion von LC als direkte Reaktion auf die Entzündung. Die durch LPS geförderte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , bewirkt im Hypothalamus eine verminderte Ausschüttung von *Gonadotropin Releasing Hormone*. Dies senkt die Sekretion von LH im Hypophysenvorderlappen, wodurch die Produktion von Testosteron reduziert wird. Das Hodengewebe erfährt eine Infiltration von Monozyten und Neutrophilen sowie vaskuläre Defekte bis hin zu Mikrohämorrhagien. Im tubulären Kompartiment kommt es zur Störung der Zell-Zell-Kontakte mit Apoptose von Spermatogonien und schließlich zum Untergang des Keimepithels im Laufe des Entzündungsprozesses (O'Bryan et al., 2000). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Anwesenheit aktivierter TM, die durch Sekretion von TNF- α und IL-1 β einen inhibitorischen Effekt auf die Steroidsynthese von LC haben (Hales, 2002).

Gerdprasert et al. beschrieben im gleichen Versuchsmodell, dass LPS keine Auswirkung auf die Anzahl der residenten ED1⁺/ED2⁺ Makrophagen im Hoden hat. Sie wiesen

jedoch eine massive Erhöhung der ED1⁺/ED2⁻ Makrophagenpopulation nach, die durch iNOS zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) befähigt ist, welches als pro-inflammatorischer Mediator an der Erweiterung der Gefäße oder der Induktion von Apoptose beteiligt ist (Gerdprasert et al., 2002a). Dies lässt sich durch den dramatischen MCP-1 Anstieg nach LPS-Behandlung erklären, infolgedessen die Rekrutierung von infiltrierenden ED1⁺/ED2⁻ Makrophagen stattfindet, die durch ihr hohes pro-inflammatorisches Potential die Entzündungsreaktion im Hoden vorantreiben (Gerdprasert et al., 2002b).

1.9.2 Experimentelle Autoimmun–Orchitis (EAO) als Modell chronischer Hoden-entzündung

Die EAO ist ein etabliertes Modell zur Erforschung chronisch entzündlicher Prozesse im Hoden. Es gibt verschiedene Ansätze, um eine Autoimmun-Orchitis auszulösen:

(I) Immunisierung mit Hodenproteinextrakten mit oder ohne Hilfe von Adjuvans (Fijak et al., 2011b; Musha et al., 2013; Naito et al., 2012; Suescun et al., 1994), (II) durch passiven Transfer von T-Lymphozyten, die zuvor mit Antigenen sensibilisiert worden sind (Tung, 1995; Yule & Tung, 1993) oder (III) durch Manipulation des Immunsystems mittels neonataler Thymektomie, wobei keine Sensibilisierung notwendig ist (Taguchi & Nishizuka, 1981).

Die wiederholte Immunisierung mit Hodenhomogenat in komplettem Freund's Adjuvans mit anschließender intravenöser Applikation von *Bordetella pertussis* als Co-Adjuvans stellt dabei eine erfolgreiche Methode dar, um eine testikuläre Entzündung (Orchitis) im adulten Rattenhoden auszulösen (Doncel et al., 1989). Die Entwicklung einer fokalen Orchitis zeigt sich ca. 50 Tage nach der ersten Immunisierung, das komplette Krankheitsbild ist nach etwa 80 Tagen ausgebildet (Fijak et al., 2005; Fijak et al., 2011b). Der Krankheitsverlauf ist charakterisiert durch Senkung des Testosteronspiegels aufgrund einer Dysfunktion der LC, Bildung von Autoantikörpern gegen testikuläre Antigene (Fijak et al., 2005) und einem Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-6, TNF α) und Chemokine (MCP-1) im Hoden (Fijak et al., 2011b; Suescun et al., 1994). Infolgedessen kommt es zu lymphomonozytären Infiltraten von ED1⁺/ED2⁻ Makrophagen (Rival et al., 2008), Mastzellen (Iosub et al., 2006), CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Fijak et al., 2011b; Jacobo et al., 2009), die im Spätstadium der Erkrankung

Granulome ausbilden können. Es kommt zum Schaden der Tubulusstrukturen mit Keimzellapoptose bis hin zum Verlust des Keimepithels mit Azoospermie und tubulärer Atrophie, die zu Volumenreduktion des Hoden führt (Doncel et al., 1989).

Die EAO stellt eine besondere immunologische Situation dar. Es kommt durch Umstrukturierung der testikulären immunoregulatorischen Zytokinzusammensetzung zu einem pro-inflammatorischen Milieu durch Aktivierung und Invasion immunologischer Zellen. Dabei findet man im Frühstadium der EAO einen dramatischen Anstieg von IFN- γ , später auch TNF- α , das den Verlauf der Krankheit durch Aktivierung von Immunzellen und Steigerung ihrer inflammatorischen Eigenschaften vorantreibt (Terayama et al., 2011; Yule et al., 1993). MCP-1 übernimmt eine tragende Rolle bei der Rekrutierung der Monozyten/Makrophagen. Es wurde nachgewiesen, dass unter anderem SC an der hohen Expression von MCP-1 während der Entwicklung der EAO beteiligt sind (Guazzone et al., 2003). Der Verlust der Keimzellen resultiert unter anderem aus einer Dysfunktion der Blut-Hoden-Schranke durch Umstrukturierung der *Tight Junction* Moleküle wie Occludin und Claudin-11 als Folge der erhöhten IL-6 Konzentration (Pérez et al., 2012).

Eine tragende Rolle spielt der Mangel an Testosteron bei der Entwicklung der EAO. Es konnte gezeigt werden, dass systemische Entzündungen sowie chronische testikuläre Entzündungen die Testosteronkonzentration im Hoden und im Serum senken (Fijak et al., 2011b; O'Bryan et al., 2000; Suescun et al., 1994). Im EAO-Modell kann die Supplementation von Testosteron die Ausbildung der EAO und die Schwere der Erkrankung signifikant reduzieren oder sogar verhindern. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass unter Testosteronsubstitution die für den Verlauf der EAO typische Infiltration des Hodengewebes mit Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen ausbleibt, während die Anzahl der immunsuppressiven CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen verglichen mit der EAO Kontrollgruppe zunimmt (Fijak et al., 2011b). Darüber hinaus demonstrierten Fijak et al., dass das testosteronhaltige Medium kultivierter LC von EAO Ratten zu einem spezifischen dosisabhängigen Anstieg des Transkriptionsfaktors Foxp3 in CD4⁺ T-Zellen aus der Milz führt; ein Effekt, der durch Flutamid inhibiert wird (Fijak et al., 2015). Der Expressionsanstieg von IL-6, TNF- α , MCP-1 und IL-10, der im Hodengewebe von EAO Ratten zu beobachten ist, kann durch die Behandlung mit Testosteron deutlich reduziert werden (Fijak et al., 2011b).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Der Hoden unterliegt als immunprivilegiertes Organ einem besonderen Status, der die Entstehung inflammatorischer Prozesse einschränkt, wenn nicht sogar verhindern kann. Viele Studien deuten bereits darauf hin, dass die Auswirkungen von Testosteron damit in Verbindung zu setzen sind. Die immunsuppressiven Effekte von Testosteron sind unter anderem im EAO-Modell beschrieben worden (Fijak et al., 2011b). Die Supplementation der erniedrigten Testosteronkonzentrationen im Verlauf der EAO führte zu einer deutlich geringeren Inzidenz der Erkrankung, stark herunterregulierten Konzentration der pro-inflammatorischen Mediatoren MCP-1, IL-6 und TNF- α im Hoden sowie zu einer signifikant reduzierten Anzahl von CD4⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (Fijak et al., 2011b). Allerdings ist der genaue Mechanismus, der zu diesem Effekt von Testosteron im entzündeten Hoden führt, noch nicht vollständig verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Auswirkung von Testosteron im *in vitro* Entzündungsmodell nachzuweisen. Dabei lag der Fokus auf zwei testikulären Zellarten, die immunologisch von höchster Wichtigkeit sind: SC, die durch ihre protektiven Eigenschaften bereits Ziel vieler Transplantationsstudien waren und die oben genannten Entzündungsmediatoren sezernieren sowie TM, die im Hoden die größte Population an Immunzellen darstellen. In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung von Testosteron auf die LPS-induzierte Expression von TNF- α , IL-6, IL-10 und MCP-1 in kultivierten primären TM sowie die Expression von TNF- α , IL-6 und MCP-1 in primären SC analysiert werden.

2 Material

2.1 Material und Geräte

Substanzen/Chemikalien	Hersteller
5x GoTaq® Flexi Buffer	Promega, Mannheim
5x RT-Puffer	Promega, Mannheim
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (4,6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM/Ham's F-12 ohne Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DNA Größenmarker: <i>DNA Ladder</i> (100 bp)	Promega, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
DNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
dNTP Mix	Promega, Mannheim
Dulbecco's PBS ohne Ca&Mg	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
<i>Fluorescein Calibration Dye</i>	BioRad Laboratories, München
Flutamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega, Mannheim
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Kollagenase A	Roche, Mannheim
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
LPS <i>Escherichia coli</i> O127:B8	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgCl ₂	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl, RNase, H Minus, Point Mutant)	Molecular BioProducts, San Diego, USA
<i>Normal Horse Serum</i>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Oligo(dT) 15 Primer (500μg/ml)	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Material

<i>QuantiTect Primer Assay</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix</i>	Qiagen, Hilden
RNase Away®	Promega, Mannheim
RNasin® (40 U/μl)	Promega, Mannheim
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Testosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Trypan Blue Stain 0,4%</i>	Invitrogen GIBCO®, Darmstadt
Trypsin	Roche, Mannheim
<i>Trypsin-Inhibitor</i>	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Kits

RNase-free DNase I Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

Kunststoffmaterialien

0,2 μm Filter	Sarstedt, Nümbrecht
0,4 μm Filter	Millipore, Carrigtwohill, Ireland
100 μm Nylon-Filter	BD-Falcon™, Heidelberg
24-Well-Platten	BD-Falcon™, Heidelberg
6-Well-Platten	BD-Falcon™, Heidelberg
serologische Glaspipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	BD-Falcon™, Heidelberg

Geräte

CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Fluoreszenz Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Geldokumentationseinrichtung mit UV-Transilluminator <i>Gel Jet Imager 2000</i>	Intas, Göttingen
Horizontal Minielektrophoresesystem <i>PerfectBlue</i>	PeqLab, Erlangen

Material

iCycler Real-Time PCR Detektionssystem	BioRad Laboratories, München
Magnetrührer IKAMAG® RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Minishaker IKA®	IKA-Werke, Staufen
Photometer Ultrospec 2100pro	Amersham Biosciences, Freiburg
PCR Maschine PTC200 αCycler	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Heizblock Thermoleader 120	UniEquip, Martinsried
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge M6	Sarstedt, Nümbrecht
Umkehrmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Hanau

Versuchstiere

Wistar-Ratten (männlich) 18 Tage alt	Charles River, Sulzfeld
Wistar-Ratten, Unilever (männlich) 249 - 275 g	Charles River, Sulzfeld

Die männlichen Wistar Ratten wurden von Charles River Laboratories Germany GmbH bezogen. Jegliche Tiertötungen zwecks Organentnahme waren von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießens (Genehmigungsnummer GI 20/23 – Nr. A11/2009) im Vorfeld genehmigt worden.

Zu Randomisierungszwecken wurden bei jeder Zellisolierung mehrere Tiere gleichzeitig geopfert (4-6 Ratten bei Isolierung von TM und 10-20 Ratten bei Isolierung von SC). Die Hoden bildeten gleich nach Organentnahme einen Pool (rechter Hoden/linker Hoden) und wurden anschließend in separaten Isolierungsschritten aufgearbeitet und behandelt.

2.2 Reagenzien und Versuchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad.

Es wurde Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke verwendet oder steriles Wasser hergestellt. Die Herstellung des sterilen Wassers erfolgte sowohl mit Hilfe einer

Material

Optipure-Reinstwasseranlage der Firma MembraPure (Henningsdorf) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherkartusche (Ministil P21) der Firma Christ (Osterode/Harz), einer UV-Lampe und Ultrafiltration, als auch mit Hilfe einer MilliQ-Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherkartusche (Ministil P21) der Firma Christ (Osterode/Harz).

Die verwendeten thermostabilen Lösungen wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Entkeimung der thermolabilen Lösungen erfolgte durch Sterilfiltration Filtern der Firma Millipore (Eschborn) mit einer Porengröße von 0,2 µm für die Verwendung in der Zellkultur und 0,4 µm für die Verwendung in anderen Bereichen.

2.3 DNA Gelelektrophorese: verwendete Lösungen

0,5 M Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA-Lösung pH 8.0)

EDTA-Dinatriumsalz	93,05 g
Aqua dest.	400 ml
Natriumhydroxid (NaOH) Pellets	bis pH 8,0
Aqua dest.	ad 500 ml

50x Tris Acetat EDTA-Elektrophorese Puffer (TAE-Puffer)

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

10x DNA Probenpuffer

Glycerol	90 ml
Bromphenolblau	200 mg
Xylencyanol FF	50 mg
0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0	20 ml
Aqua dest.	ad 120 ml

Material

DNA Agarosegel (1,8%)

1x TAE-Puffer	100 ml
Agarosepulver	1,8 g
Ethidiumbromid 0,1% (w/v)	10 µl

10x Tris EDTA-Puffer (TE-Puffer pH 8,0)

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
EDTA-Lösung pH 8,0	10 mM

2.4 Verwendete Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien basieren auf einer bikarbonatgepufferten Salzlösung, die mit Vitaminen, Aminosäuren und anderen essentiellen Agenzien ergänzt wird. Sie enthalten Phenolrot als pH-Indikator, sowie Glucose zur Ernährung und zur immunologischen Unterstützung der Zellen. Der Zusatz von L-Glutamin unterstützt den Stoffwechsel der Zellen, Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) verhindern bakterielle Kontamination.

2.4.1 Medium für TM: DMEM/Ham's F-12

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ist ein standardisiertes Nährmedium, das durch hohe Konzentrationen von Aminosäuren und Vitaminen breite Verwendung in der Zellkultur von humanen und tierischen Zellen findet. Ham's F-12 Medium ist ebenfalls reich an Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen. Es weist einen hohen Gehalt an Zinksulfat, Purescin und Linolsäure auf. Ursprünglich zur Kultivierung von *Chinese Hamster Ovary Cells* entwickelt, ist es inzwischen Medium der Wahl, um auch das Wachstum von Rattenzellen zu unterstützen.

Die 1:1 Mischung von DMEM und Ham's F-12 Medium unter Zusatz von L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin erwies sich als optimales Nährmedium für die Kultur von TM.

2.4.2 Medium für SC: RPMI 1640

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium entstand Mitte der 1960er Jahre und wird seither mit nahezu unveränderter Rezeptur zur Kultivierung verschiedener Zelltypen verwendet. Es basiert auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Häufig wird RPMI Medium durch Zusatz von Serum ergänzt, um die Zellen mit Wachstumsfaktoren, Hormonen (z.B. Insulin) und Spurenelementen zu versorgen. Für die Kultur von SC wurde auf den Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS) verzichtet, um den Effekt von Wachstumsfaktoren auf die wenigen kontaminierenden peritubulären Zellen zu verhindern, es erfolgte jedoch die Ergänzung von Penicillin/Streptomycin.

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung von TM

TM wurden nach dem Protokoll von Hedger und Eddy (Hedger & Eddy, 1986) ohne Verwendung von Enzymen aus dem Hoden von Wistar Ratten isoliert. Für die Isolierung von TM wurden adulte Ratten geopfert, da diese bereits Immunkompetenz besitzen, was sehr wichtig für die Untersuchung von Immunzellen ist.

Die Ratten wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Das Abdomen der Ratten wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Hoden durch die geöffnete Bauchdecke steril entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen, in die zuvor Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* = DPBS) vorgelegt worden war, überführt. Alle weiteren Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Hoden wurden dekapsuliert, indem die Tunica albuginea am Rete testis mit einer Pinzette fixiert wurde und durch Inzision am gegenüberliegenden Ende aufgetrennt wurde. Das Hodengewebe ließ sich anschließend leicht aus der Tunica albuginea herauslösen. Mit Pinzetten wurde es leicht aufgelockert, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf 50 ml mit DPBS aufgefüllt. Nach 5 minütigem Sedimentieren des Hodengewebes wurde der tubulusfreie Überstand abgenommen und für 10 min bei 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet der interstitiellen Zellen mit 5 ml DMEM/Ham's F-12 resuspendiert.

Die Zellisolierung aus den Hoden einer Ratte ergab ausreichend Zellen, um 3 Wells einer 6-Well-Platte zu kultivieren. Es wurden je 2 ml DMEM/Ham's F-12 pro Well vorgelegt, die mit ca. 1 ml der Zellsuspension versetzt wurden. Die Platte wurde bei 32 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% für 30 min inkubiert. Da Makrophagen schnell adhärent werden, konnten kontaminierende Zellen wie LC, Keimzellen etc. nach der Inkubation durch Waschen mit DPBS zum großen Teil entfernt werden (siehe Abbildung 3, Seite 29). Der Waschvorgang wurde 3-4-mal wiederholt. Dadurch wurde eine Reinheit von mindestens 90% erreicht, was durch ED1/ED2-Färbung der Zellen verifiziert wurde (siehe Abbildung 4, Seite 45). Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen erneut für 30 min inkubiert und anschließend mit LPS, Testosteron und/oder Flutamid behandelt (siehe Abbildung 13, Seite 57).

TM wurden wie zuvor beschrieben unter mehrfachen Waschvorgängen aufgereinigt, wobei sich der letzte Waschvorgang als besonders effektiv erwies. Da die Pipettenspitze direkt auf den Boden der Wells gerichtet wurde, konnte die Kultur zu großen Teilen von verunreinigenden Zellen befreit werden (vgl. Abbildung 3A und B).

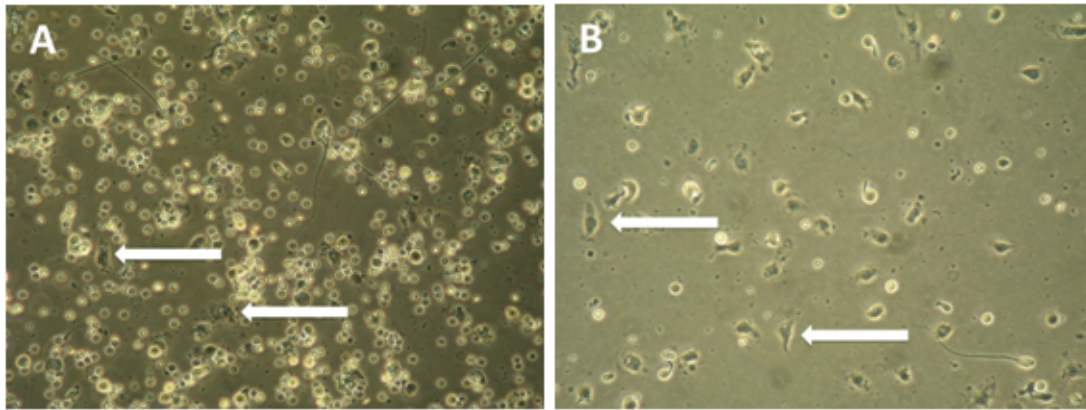


Abbildung 3: Aufreinigung von TM

Isolierte TM im Phasenkontrastmikroskop (40x Vergrößerung). 30 Minuten nach Plattierung sind TM bereits adhären und als dunkle Zellen am Boden der Kulturschale sichtbar (Pfeile). Nach mehrfachem Waschen befinden sich immer noch reichlich verunreinigende Zellen wie Keimzellen, Spermien und LC im Medium (A). Im letzten Waschvorgang wurden verunreinigende Zellen zum großen Teil entfernt. Die am Zellkulturplattenboden adhärenen Markophagen (Pfeile) sind nun deutlich zu erkennen (B).

3.2 Isolierung und Kultivierung von SC

SC wurden nach dem Protokoll von Bhushan et al. (Bhushan et al., 2016) aus dem Hoden von präpubertären 18 Tage alten Wistar Ratten enzymatisch isoliert, da die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke und Reifung der Keimzellen im Alter von 18 Tagen noch nicht stattgefunden hat (Aslani & Klug, 2016). Die Isolierung der Zellen wird daher stark vereinfacht. Um eine höchst mögliche Reinheit der Zellkultur zu erreichen, ist der Verzicht von Serumzusatz zum Medium sowie das Alter der Ratten relevant. Da die Spermatogenese zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht begonnen hat, finden sich keine verunreinigenden Spermatozoen oder Spermatiden in der Kultur. Dazu wurden mindestens zehn Ratten durch eine Überdosis Narkoseäther getötet und mittels Durchtrennen der Arteria carotis teilweise entblutet. Das Abdomen der Ratten wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert, die Hoden durch die geöffnete Bauchdecke steril entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen, in die zuvor 20 ml DPBS vorgelegt wurde, überführt. Alle weiteren Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Methoden

Zu den Hoden in DPBS wurden 20 ml 1%iger Jodalkohol zur Desinfektion hinzugefügt. Sofort danach wurden die Hoden zum Waschen in eine Petrischale mit DPBS gegeben bis keine Gelbfärbung durch das Jod mehr zu sehen war. Nach einer zweiten Waschung wurden die Hoden dekapsuliert. Dazu wurde die Tunica albuginea am Rete testis fixiert und durch Inzision auf der gegenüberliegenden Seite eröffnet. Das Hodengewebe wurde nun aus der Tunica albuginea herausgelöst und vorsichtig in eine Petrischale mit DPBS überführt.

25 mg Trypsin und 300 µg DNase wurden in 10 ml DPBS gelöst und mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert. Diese Lösung wurde in einen 100 ml Glaskolben gefüllt und die dekapsulierten Hoden mit einer Pinzette einzeln hinein gegeben. Zur enzymatischen Verdauung wurde der Glaskolben bei 120 rpm im 32 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Dauer der Inkubation wurde dem Verdauungszustand angepasst und nach mikroskopischer Kontrolle beendet, wenn die Tubuli einzeln und in verkürzten Abschnitten vorlagen. Dies dauerte 10-15 min. Durch Zugabe von Trypsin Inhibitor (50 mg/10 ml) wurde der Verdauungsvorgang beendet. Anschließend wurden die Tubuli in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min zum Sedimentieren ruhen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen und die Tubuli erneut mit Trypsin Inhibitor (25 mg/10 ml) gewaschen. Der Waschvorgang wurde 8-10-mal mit ca. 25 ml DPBS wiederholt.

Für den folgenden Verdauungsschritt wurden 10 mg Kollagenase, 10 mg Hyaluronidase und 300 µg DNase in 10 ml DPBS gelöst und anschließend steril filtriert. Die Tubuli wurden nach dem letzten Waschschrift zusammen mit dieser Lösung in denselben Glaskolben wie zuvor gegeben und bei 32 °C und 120 rpm im Wasserbad inkubiert. Auch dieser Verdauungsschritt wurde nach mikroskopischer Kontrolle beendet, wenn die Oberfläche der Tubuli durch Ablösen der peritubulären Zellen eine sägezahnartige Aufrauung zeigte. Die Tubuli wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 min ruhen gelassen. Es folgten ca. 8 Waschschrte, wie oben beschrieben.

Für den letzten Verdauungsschritt wurden 10 mg Hyaluronidase und 300 µg DNase in 10 ml DPBS gelöst, steril filtriert und zusammen mit den restlichen Tubuli in dem Glaskolben bei 32 °C und 120 rpm inkubiert. Nach dem Waschen wurde der klare Überstand verworfen, das Sediment mit 12 ml Medium für SC aufgefüllt und durch 10 maliges Aspirieren mit einer 18 Gauge Kanüle (1,2 x 40 mm) resuspendiert. Durch dieses Verfahren ließen sich adhärente Keimzellen aus den Tubulusfragmenten herauslösen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Das

Pellet wurde mit 20 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und durch ein 100 µm Nygonsieb filtriert. Es wurden 4×10^6 Zellen in jedes Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die SC wurden bei 32 °C und 5% CO₂-Gehalt insgesamt 7 Tage lang inkubiert. Am zweiten Tag der Kultivierung wurden die SC durch einen hypotonischen Schock von kontaminierenden Zellen wie peritubulären Zellen oder Keimzellen befreit. Dazu wurde das Medium abgenommen und der mit Zellen besiedelte Boden für ca. 30 sek mit steril filtrierter 20 mM Tris-HCl-Lösung bedeckt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen anschließend wieder mit Medium versetzt und inkubiert. An den folgenden Tagen wurden die Zellen bis zur Behandlung (siehe Abbildung 14, Seite 59) täglich gewaschen.

3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Bürker-Zählkammer vorgenommen. Der Kammerfaktor der Bürker-Zählkammer beträgt 10^4 .

Die Zellsuspension wurde 1:10 (v/v) mit *Trypan Blue* verdünnt und auf die Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden 16 Kleinstquadrate ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (1:10)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

3.4 Morphologische Nachweisverfahren: Immunfluoreszenz an kultivierten primären TM

3.4.1 Verwendete Lösungen

Gepuffertes Glycerol pH 8.6

0,5 M Natriumhydrogenkarbonatlösung (NaHCO ₃)	50 ml
0,5 M Dinatriumkarbonat (CNa ₂ CO ₃)	einstellen auf pH 8,6
Glycerol, H ₂ O-frei	100 ml

Primärantikörper	Firma	Cat. No.	Verdünnung
Maus anti-Ratte ED1	Serotec, Martinsried	MCA341R	1:50
Maus anti-Ratte ED2	Serotec, Martinsried	MCA342R	1:50

Sekundärantikörper	Firma	Cat. No.	Verdünnung
Cy3 konjugiertes Esel anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg	715-165-151	1:1000

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesäten TM wurden zweimal mit DPBS gewaschen, anschließend mit eiskaltem Methanol bedeckt und für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit DPBS geblockt, das 10% (v/v) *Normal Horse Serum* sowie 5% (w/v) *Bovine Serum Albumin* und 0,5% (v/v) Tween 20 enthielt. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:50) in DPBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000) in DPBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Detektionsantikörper war ein anti-mouse Immunglobulin der Klasse G, der an das stark rot fluoreszierende Fluorochrom Carbocyanin 3 (Cy3) gekoppelt war. Anschließend wurde erneut dreimal mit DPBS gewaschen und für weitere 10 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI inkubiert. Dieser bildet DNA-DAPI-Komplexe, wodurch sich jeder Zellkern fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lässt. Anschließend wurden die Glasplättchen aus den Wells der Platte entfernt und mit einem Tropfen gepuffertem Glycerol auf einen Objektträger gelegt. Die unter Lichtschutz gelagerten Objektträger wurden im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und photographisch dokumentiert.

3.5 Molekularbiologische Methoden: Nukleinsäureanalytik

Da die Zytokine nur in sehr geringen Mengen in testikulären Zellen exprimiert werden, erfolgte der Nachweis auf mRNA Expressionsebene. Dazu wurden die kultivierten und behandelten Zellen zunächst lysiert und aufbereitet, um anschließend die RNA aufzureinigen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) analysiert.

3.5.1 Arbeiten mit RNA

Bei dem Arbeiten mit RNA ist es auf Grund des ubiquitären Vorkommens von RNasen notwendig, Vorkehrungen zu treffen, die ein RNase-freies Arbeiten gewährleisten. Sämtliche Arbeiten wurden daher mit sterilen, autoklavierten Einmalgeräten bzw. mit hitzestabilen Glaswaren durchgeführt. Der Arbeitsplatz wurde vor Beginn mit RNase Away® gereinigt. Während der Arbeit wurden Handschuhe getragen.

3.5.2 RNA Isolierung aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits bei SC bzw. RNeasy® Micro Kits bei TM (da diese nur in geringen Mengen kultiviert wurden). Bei der Extraktion von RNA ist es besonders wichtig, die Proben von genomischen DNA Resten frei zu halten. Rückstände genomischer DNA können während der PCR als Template dienen und ein falsch positives Signal verursachen. Um dies zu vermeiden, wurden die RNA Proben zusätzlich einem DNA Verdau unterzogen.

3.5.2.1 RNA Isolierung aus TM

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus TM wurde dem kommerziellen RLT-Lysis-Puffer β -Mercaptoethanol in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt. Da die TM Präparation vergleichsweise nur wenige Zellen ergab, wurde die Zelllyse mit 350 μ l RLT-Puffer durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Plattenboden entfernt und das Zelllysate homogenisiert, bevor es mit 350 μ l 70%igem Ethanol versetzt

und resuspendiert wurde. Das Gemisch aus Zelllysatsat und Ethanol wurde auf die RNeasy MinElute Säule gegeben und bei 8000 G für 15 sek zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde verunreinigende genomische DNA entfernt. Dazu wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut bei 8000 G 15 sek lang zentrifugiert. Währenddessen wurden 10 µl der RNase-freien DNase I Stammlösung mit 70 µl RDD-Puffer versetzt und direkt nach der Zentrifugation auf die Membran der Säule pipettiert, die dann für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und wie zuvor bei 8000 G für 15 sek zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Membran gegeben, die dann bei 8000 G für 15 sek zentrifugiert wurde. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 500 µl 80%igem Ethanol durch zwei minütiges Zentrifugieren bei 8000 G gewaschen. Zum Trocknen wurde die Säule danach mit offenem Deckel für fünf min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Membran für ca. fünf min mit 14 µl RNase-freiem Wasser inkubiert und abschließend für eine min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Während der Inkubation löst sich die RNA im Wasser und wird dann von der Säule eluiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

3.5.2.2 RNA Isolierung aus SC

Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben aus SC isoliert. Hierzu wurde vor jeder Isolierung dem im Kit enthaltenen RLT-Lysis-Puffer in einer Verdünnung von 1:100 β-Mercaptoethanol frisch hinzugefügt. Da die Präparation von SC vergleichsweise viele Zellen ergab, wurden hier 650 µl Lysis-Puffer in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Kulturboden gelöst und das Zelllysatsat mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurde das Lysatsat durch 10-faches Resuspendieren mit einer 24 Gauge (0,7 x 19 mm) Kanüle homogenisiert und mit 650 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die Mischung aus Zelllysatsat und Ethanol wurde nach gründlichem Resuspendieren auf die RNeasy MinElute Säule pipettiert und für 15 sek bei 8000 G zentrifugiert. Der DNA Verdau erfolgte auf dieselbe Weise, wie bei TM bereits beschrieben. Nach der Inkubation mit der RNase-freien DNase I Stammlösung wurde die Membran mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, die bei 8000 G für zwei min und im Anschluss zum Trocknen in einem neuen

Auffangröhrchen für eine weitere min zentrifugiert wurde. Zum Eluieren der RNA wurde die Membran ca. fünf min mit 40 µl RNase-freiem Wasser inkubiert und für eine min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Alle Zentrifugations- und Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt.

3.5.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der RNA erfolgte bei neutralem pH mit Hilfe des Spektralphotometers Ultrospec 2100pro. Die gelöste RNA absorbiert UV-Licht bei einem Absorptions-maximum von $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Es gilt für die optische Dichte (optical density: OD):

$$\text{OD}_{260} = 1 \text{ entspricht } 40 \text{ µg/ml RNA}$$

Dabei gab der Quotient von $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der Präparation, wobei eine saubere Präparation Werte von 1,5 – 2,0 aufweisen sollte. Werte < 1,5 zeigen Verunreinigungen, beispielsweise durch Proteine an.

3.5.4 cDNA Synthese mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um den quantitativen Nachweis der RNA Expression zu erbringen, müssen die Proben zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mittels reverser Transkription. Um die Proben in der quantitativen Analyse besser vergleichen zu können, wurde für jeden Satz RNA Proben dieselbe Menge an RNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde zur Kontrolle eine β -Aktin-PCR durchgeführt.

Der folgende Probenansatz wurde zunächst bei 70 °C auf dem Heizblock für zehn min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt:

RNA Reaktionsansatz

PCR Komponenten	Menge
RNA Probe	1,5 – 2,5 μ g
Oligo(dT) 15 Primer (500 μ g/ml)	2,0 μ l
Aqua dest.	ad 22,0 μ l

Der folgende PCR-Reaktionsansatz wurde zunächst für zwei min auf einem 42 °C warmen Heizblock inkubiert, bevor der RNA-Reaktionsansatz hinzugefügt wurde.

Reaktionsansatz der reversen Transkription

PCR-Komponenten	Menge
5x RT-Puffer	8,0 μ l
10 nM dNTP Mix	2,0 μ l
RNasin® (40 U/ μ l)	1,0 μ l
Aqua dest.	7,0 μ l
Total	18,0 μl

Nach einminütiger Inkubation wurde 1,0 μ l Reverse Transkriptase hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 75 min bei 42 °C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 70 °C denaturiert, um die Reaktion zu stoppen. Die cDNA Proben wurden direkt auf ein Agarosegel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

3.5.5 Standard PCR

Zur Überprüfung der Reinheit der RNA Proben (Abwesenheit von genomischer DNA) und des Vorhandenseins von cDNA nach der reversen Transkription wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurde β -Aktin (Ratte) als Haushaltsgen nachgewiesen, welches in eukaryotischen Zellen konstitutiv synthetisiert wird. Die Primersequenzen finden sich in Tabelle 2 (Seite 43).

Reaktionsansatz der PCR

PCR-Komponenten	Menge
RNA oder cDNA Probe	1,0 μ l
5x GoTaq® Flexi Buffer	5,0 μ l
25 mM MgCl ₂	2,0 μ l
10 mM dNTP Mix	0,5 μ l
β -Aktin-Primer sense (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
β -Aktin-Primer antisense (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
GoTaq® DNA Polymerase (5U/ μ l)	0,125 μ l
Aqua dest.	ad 25 μ l

Dieser Ansatz wurde im PCR-Thermocycler folgendem Temperaturprofil unterzogen:

Temperaturprofil der PCR

PCR-Zyklus	Dauer	Temperatur	
Initiale Denaturierung	4 min	96 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} 24 Zyklen Wiederholung
Annealing	30 sek	60 °C	
Elongation	30 sek	72 °C	
Terminale Elongation	10 min	72 °C	

Die PCR Produkte wurden bei -20 °C gelagert oder direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.5.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1,8%igen Agarosegels wurde das Agarosepulver in 1x TAE-Puffer (die Komponenten sind in 2,3 aufgeführt) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit 0,1%iger Ethidiumbromid-Lösung in einer Verdünnung von 1:10.000 versetzt. Ethidiumbromid bindet an DNA und fluoresziert nach Bestrahlung mit UV-Licht (305 nm), so dass die im Agarosegel enthaltene DNA sichtbar wird. Anschließend wurde das Gel in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen und mit TAE-Puffer überschichtet. Die negativ geladene DNA wandert bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Proben wurden mit DNA Probenpuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel wird für 45 min bei 80 V (Spannung) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker dienen 100 bp DNA Ladder. Die photographische Dokumentation der im Gel aufgetrennten DNA wurde mit Hilfe eines Gel Jet Imager durchgeführt.

3.5.7 Quantitative Real-Time PCR

Da die Standard PCR keine Methode des quantitativen Nachweises ist, lässt sich damit lediglich überprüfen, ob ein Zielgen exprimiert wird oder nicht. Der quantitative Nachweis der mRNA wurde mittels Real-Time PCR erbracht und vergleicht die Expression des Zielgens mit einem Haushaltsgen als Referenz.

Während der PCR-Zyklen wird parallel eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, die die Menge an amplifizierter DNA in Echtzeit erfasst. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green, den man sich hierbei zu Nutze macht, bindet an der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz steigt. Daher korreliert der Anstieg der Fluoreszenz mit der Menge an amplifizierter DNA in der Probe. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Elongationsphase jedes Zyklus statt.

Zur Auswertung dieser Methode nimmt man eine Normalisierung der Expression des Zielgens zur Expression eines Referenzgens vor. Es wird also der ermittelte Wert des Zielgens relativ zum Kontrollgen angegeben (Huggett et al., 2005; Nolan et al., 2006). Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt über den C_t -Wert (*Cycle of Threshold* = Amplifikationsschwellenwert) jeder einzelnen Probe. Je mehr DNA in einer Probe vorhanden ist, umso weniger Zyklen sind nötig, bis das Signal der Fluoreszenz den Amplifikationsschwellenwert überschreitet und sich signifikant

gegenüber dem Hintergrund hervorhebt (umso geringer ist der C_t -Wert). Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, erfolgte eine Doppelbestimmung jeder Probe. Anschließend wurde der Mittelwert der Fluoreszenzmessung berechnet. Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte mittels Amplifikationskurve zur Festlegung der C_t -Werte (siehe Abbildung 9, Seite 52).

3.5.7.1 Schmelzkurve

Der Nachteil an der Verwendung von SYBR® Green ist die geringe Spezifität. Während der Bindung des Farbstoffes an DNA kann nicht zwischen Primer-Dimeren oder PCR-Produkten unterschieden werden. Um diesen Nachteil auszugleichen, wird am Ende der Amplifikation überprüft, ob die gemessenen Fluoreszenzwerte auf die gewünschten Amplifikationsprodukte alleine zurückzuführen sind, oder ob es zu unspezifischen Bindungen gekommen ist, die die Fluoreszenzmessung beeinflusst haben. Zu diesem Zweck wird eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt. Während der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA durch kontinuierlichen Temperaturanstieg (50-100 °C) in zwei einzelne DNA Stränge aufgeschmolzen. Die Temperatur, bei der die Doppelstränge voneinander getrennt werden, ist für die jeweilige DNA Sequenz spezifisch, da sie von der Zusammensetzung der Basenpaare abhängt. Bei der Trennung der Doppelstränge wird das gebundene SYBR® Green plötzlich wieder freigesetzt und es kommt folglich zu einer Fluoreszenzminderung, die in der Schmelzkurve aufgezeichnet wird. Trägt man die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur auf, erhält man einen Peak (siehe Abbildung 10, Seite 53). Die Höhe des Peaks einer Schmelzkurve korreliert dabei mit der Menge an DNA Fragmenten. Es lassen sich dadurch spezifische PCR-Produkte mit hohem Schmelzpunkt von unspezifischen Primer-Dimeren mit niedrigem Schmelzpunkt unterscheiden.

Die Bewertung der Schmelzkurve gibt Aufschluss darüber, wie spezifisch die Bindung der Primer an der dafür vorgesehenen DNA Sequenz ist und damit auch wie ihre PCR-Produkte zu bewerten sind. Jedes Primerpaar sollte einen einzigen Peak in der Schmelzkurve auslösen. Gibt es zwei oder mehrere Peaks in der Schmelzkurve, spricht dies für Kontaminationen, unspezifische Bindungen, Artefakte durch Primer-Dimere, oder andere Probleme, die die Auswertung der Real-Time PCR erschweren.

3.5.7.2 Zusammensetzung des Real-Time PCR Reaktionsansatzes

Zu dem Ansatz einer gewöhnlichen PCR werden die Farbstoffe SYBR® Green und Fluorescein hinzugefügt. Fluorescein dient dem internen Fluoreszenzabgleich vor Beginn der PCR. Das beschriebene Verfahren ist eine von mehreren Methoden der Real-Time PCR.

Entsprechend der verwendeten Primer wurde folgender Ansatz hergestellt:

Reaktionsansatz der Real-Time PCR

PCR Komponenten	Menge
cDNA Probe	1,0 µl
2x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix	12,5 µl
Primer sense (10 pmol/µl)	0,6 µl
Primer antisense (10 pmol/µl)	0,6 µl
Fluorescein Calibration Dye (Verdünnung 1:4)	1,0 µl
Aqua dest.	ad 25,0 µl

ODER:

Reaktionsansatz der Real-Time PCR: verwendet mit QuantiTect Primer Assay für CCL2, IL-6 und IL-10

PCR-Komponenten	Menge
cDNA Probe	1,0 µl
2 x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix	12,5 µl
QuantiTect Primer Assay	2,5 µl
Fluorescein Calibration Dye (Verdünnung 1:4)	1,0 µl
Aqua dest.	8,0 µl
Total	25,0 µl

Nach der durchgeführten Real-Time PCR wurden die Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt, um nachzuweisen, dass die gemessene Fluoreszenz dem erwarteten Amplifikationsprodukt der Primer entspricht.

3.5.7.3 Berechnung der Relativen Expression (RE) eines Zielgens

Für die Berechnung der Genexpression wurde die $\Delta\Delta C_t$ Methode verwendet (Page & Stromberg, 2011). Da während der PCR eine exponentielle Vervielfältigung eines Genabschnittes stattfindet, können selbst kleinste Unterschiede bei den Ausgangsmengen, die im Rahmen der Pipettierungenauigkeiten liegen können, einen großen Unterschied bei der Endmenge an amplifizierter DNA bewirken. Um darauf basierende Fehlinterpretationen zu verhindern, wird die Expression eines Zielgens immer in Relation zu einem Referenzgen angegeben. β_2 -Mikroglobulin wird von allen Zellen konstitutiv exprimiert und diente daher als Referenzgen zur Berechnung der relativen Expression.

Um eine einheitliche Darstellung der Werte zu schaffen und diese vergleichen zu können, musste zunächst die Differenz der C_t -Werte von Zielgen und Referenzgen gebildet werden (ΔC_t).

Normalisierung mit β_2 -Mikroglobulin:

$$C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen} = \beta_2\text{-Mikroglobulin}) = \Delta C_t$$

Anschließend wurde der ΔC_t -Wert der unbehandelten Kontrollprobe mit dem der behandelten Proben verglichen und die Differenz ($\Delta\Delta C_t$) gebildet. Die Berechnung der relativen Expression (RE) erfolgte schließlich wie folgt:

$$\Delta C_t P (\text{behandelte Probe}) - \Delta C_t K (\text{Kontrollprobe}) = \Delta\Delta C_t$$

$$RE = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.5.8 Primer

Die Primer für MCP-1, TNF- α , β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin wurden mit Hilfe des Programms "Primer3" entworfen, welches unter <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> zu finden ist. Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l in 1x Tris-EDTA (pH 8,0) Puffer gelöst und als Stammlösung bei -20 °C aufbewahrt. Die Primer für IL-6, IL-10 und MCP-1 wurden als *QuantiTect Primer Assay* von der Fa. Qiagen bezogen (siehe Tabelle 2, Seite 43).

3.5.9 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung sowie statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Zunächst wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte als *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit dem *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Dabei können die Mittelwerte verschiedener Proben miteinander verglichen werden. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

Tabelle 2: verwendete Oligonukleotidprimer in der PCR

Gen	Primer	Cat. Nr. (Qiagen)	Entrez Gene ID	Produkt-Länge (bp)	Exon übergreifend	Annealing Temperatur
TNF- α Primer sense	5'-GCC TCT TCT CAT TCC TGC TC-3'	-	24835	101	ja	60,0 °C
TNF- α Primer antisense	5'-CCC ATT TGG GAA CTT CTC CT-3'					
β -Aktin Primer sense	5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AA-3'	-	81822	232	ja	60,0 °C
β -Aktin Primer antisense	5'-GGG TCA TCT TTT CAC GGT TG-3'					
β_2 -Mikroglobulin Primer sense	5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3'	-	24223	113	ja	60,0 °C
β_2 -Mikroglobulin Primer antisense	5'-AAG TTG GGC TTC CCA TTC TC-3'					
MCP-1 sense	5'-CAG GTC TCT GTC ACG CTT CT-3'	-	24770	525	ja	55,0 °C
MCP-1 antisense	5'-AGT ATT CAT GGA AGG GAA TAG-3'					
CCL2 (MCP-1)	QuantiTect Primer Assay	QT 00183252	24770	117	ja	55,0 °C
IL-6	QuantiTect Primer Assay	QT 00182896	24498	128	ja	55,0 °C
IL-10	QuantiTect Primer Assay	QT 00177618	25325	69	ja	55,0 °C

4 Ergebnisse

4.1 Die isolierten primären TM weisen eine hohe Reinheit auf

Zur Ermittlung der Reinheit der isolierten Zellen wurden TM mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Die Zellkerne wurden durch den DNA Farbstoff DAPI dargestellt. TM wurden mit den Antikörpern ED1 (gegen CD68) und ED2 (gegen CD163) markiert und ließen sich durch den Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper darstellen.

Die Einzelaufnahmen mit den ED1-, ED2- und DAPI-Färbungen wurden übereinandergelegt und die jeweiligen positiven Zellen gezählt (siehe Abbildung 4, Seite 45). 70% der Zellen waren positiv für ED1 (siehe Abbildung 4A-C) und 72% der Zellen ließen sich mit dem Antikörper ED2 markieren (siehe Abbildung 4D-F). Die Färbung mit beiden Markern ED1 und ED2 zusammen ergab eine TM-Reinheit von 90% (siehe Abbildung 4G-I). Es gelang also durch das intensive Waschen der TM, eine Verunreinigung von kontaminierenden Zellen zu großem Teil zu vermeiden. Da die Isolierung der TM nach einem erprobten Protokoll erfolgte, waren diese Ergebnisse zu erwarten (Bhushan et al., 2011, 2015).

Für die Kultur von SC wurde keine Überprüfung der Reinheit vorgenommen, da diese Zellen nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll isoliert wurden. Erfahrungsgemäß beträgt die Reinheit bei diesem Verfahren > 90% (Bhushan et al., 2016)

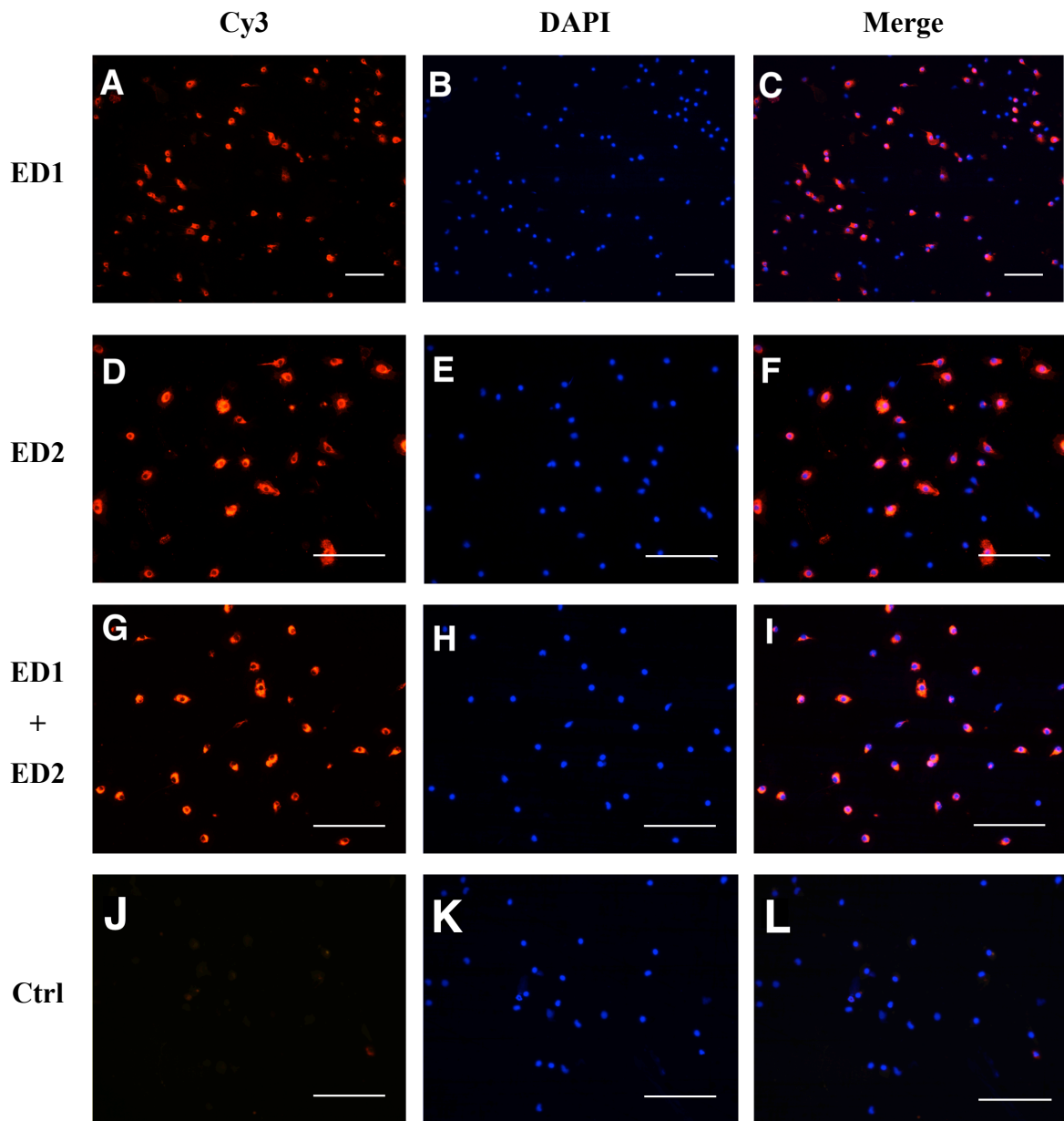


Abbildung 4: Die isolierten primären TM weisen eine Reinheit von 90% auf

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von TM. Die ED1-markierten (A-C) oder ED2-markierten (D-F) sowie ED1/ED2-markierten (G-I) Zellen lassen sich durch den Cy3-gekoppelten Detektionsantikörper darstellen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI-Färbung verwendet. Die individuellen Aufnahmen der ED1/ED2- und der DAPI-Färbung wurden mittels Bildbearbeitung übereinander projiziert (Merge). Die Negativ-Kontrolle (ED1/ED2/Cy3⁺) weist keine Fluoreszenz auf (Ctrl; J-L), der Detektionsantikörper geht folglich keine unspezifischen Bindungen ein. Die Maßstab Balken entsprechen 100 μ m.

4.2 Genexpression von IL-6, MCP-1 und TNF- α

Für die Untersuchungen der mRNA Expression von IL-6, MCP-1 und TNF- α in TM und SC wurden die Zellen zunächst lysiert, um die Gesamt-RNA zu isolieren. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und die Zielgene mittels PCR analysiert. Der Nachweis von IL-10 in TM erfolgte auf quantitativer Ebene.

4.2.1 Die präparierten RNA Proben waren frei von genomischer DNA

Zur Erfolgskontrolle des genomischen DNA Verdau während der RNA Extraktion von TM und SC wurde eine PCR mit dem Haushaltsgen β -Aktin vorgenommen (siehe Kapitel 3.5.5, Seite 37). Das Fehlen der Amplifikationsprodukte von β -Aktin nach 24 Zyklen zeigt, dass sowohl die RNA Proben von TM (siehe Abbildung 5A, Spur 1-6) als auch von SC (siehe Abbildung 5B, Spur 1-5) frei von genomischer DNA waren, während in den Positiv-Kontrollen ein deutlicher Nachweis der Amplifikationsprodukte von β -Aktin als Erfolgskontrolle der PCR gelang (siehe Abbildung 5A und B, Spur +). Ein zusätzlicher DNA Verdau war daher nicht notwendig, die RNA Proben konnten direkt in cDNA umgeschrieben werden.

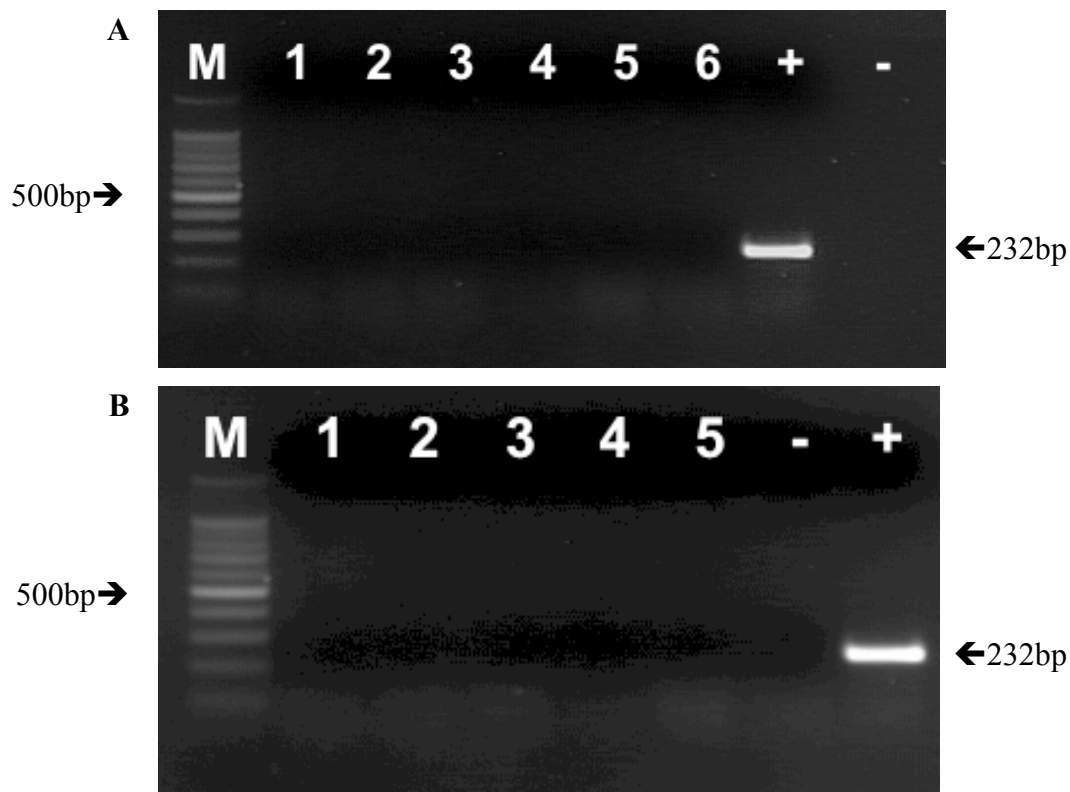


Abbildung 5: β -Aktin-Amplifikation bestätigt die vollständige Eliminierung genomischer DNA.

β -Aktin-PCR zum Nachweis der Eliminierung genomischer DNA in RNA Proben von TM (A) und SC (B). M = 100bp Marker, + = Positiv-Kontrolle (cDNA aus Rattenhoden), - = Negativ-Kontrolle (PCR-Reaktionsansatz ohne RNA Probe). (A) Spur 1 = Ethanol Vehiclekontrolle, Spur 2 = 3 h LPS 10 μ g/ml, Spur 3 = 3 h LPS 5 μ g/ml, Spur 4 = 4 h T 1000 nM, Spur 5 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 3 h LPS 10 μ g/ml, Spur 6 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 3 h LPS 5 μ g/ml. (B) Spur 1 = unbehandelte Kontrolle, Spur 2 = 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 3 = 1 h Präinkubation T 10 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 4 = 1 h Präinkubation T 500 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 5 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml. Alle TM und SC Proben sind negativ für den Nachweis von β -Aktin. Eine deutliche Bande auf Höhe von 232bp ist dagegen in den Positiv-Kontrollen sichtbar, was erwartungsgemäß β -Aktin entspricht. Die Gelelektrophorese wurde in einem 1.8%igen Agarosegel durchgeführt; T = Testosteron.

4.2.2 Mittels reverser Transkription wurde RNA in cDNA umgeschrieben

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde eine PCR zur Erfolgskontrolle durchgeführt. Bei allen RNA Proben von TM (siehe Abbildung 6A, Spur 1-6) und SC (siehe Abbildung 6B, Spur 1-5) war die Umschreibung in cDNA erfolgreich, da in allen Proben ein Teil der β -Aktin cDNA amplifiziert werden konnte.

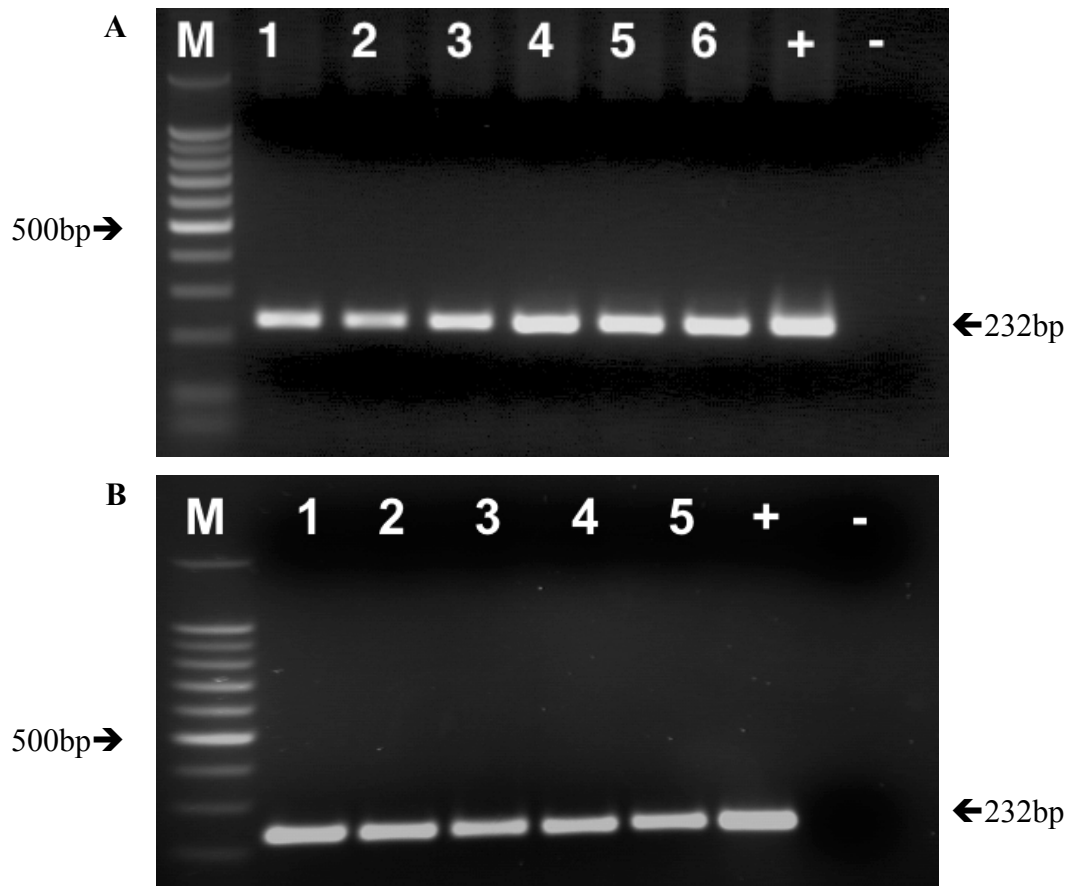


Abbildung 6: β -Aktin-PCR bestätigt eine erfolgreiche reverse Transkription.

β -Aktin-PCR zum Nachweis der erfolgreichen cDNA Umschreibung in Proben von TM (A) und SC (B) nach reverser Transkription. M = 100bp Marker, + = Positiv-Kontrolle (cDNA aus Rattenhoden), - = Negativ-Kontrolle (PCR-Reaktionsansatz ohne cDNA Probe). (A) Spur 1 = Ethanol Vehiclekontrolle, Spur 2 = 3 h LPS 10 μ g/ml, Spur 3 = 3 h LPS 5 μ g/ml, Spur 4 = 4 h T 1000 nM, Spur 5 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 3 h LPS 10 μ g/ml, Spur 6 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 3 h LPS 5 μ g/ml. (B) Spur 1 = unbehandelte Kontrolle, Spur 2 = 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 3 = 1 h Präinkubation T 10 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 4 = 1 h Präinkubation T 500 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 5 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml. Alle Proben sowie die Positiv-Kontrolle enthalten cDNA und zeigen eine starke Bande auf Höhe von 232bp, was dem erwarteten Amplifikationsprodukt für β -Aktin cDNA entspricht. Die Negativ-Kontrolle weist keine Bande auf. Die Gelelektrophorese wurde in einem 1,8%igen Agarosegel durchgeführt; T = Testosteron.

4.2.3 Die mRNA Expression von IL-6, MCP-1 und TNF- α lässt sich mittels PCR in TM nachweisen

Zunächst wurde die mRNA Expression von IL-6, MCP-1 und TNF- α in TM mittels PCR nachgewiesen (Abbildung 7, Seite 49), was – wie bereits beschrieben - keine quantitative Methode ist. Sie diente jedoch dazu, einen Trend festzustellen, welcher später mit Hilfe der Real-Time PCR genauer untersucht wurde.

Eine LPS-Behandlung von TM führte zu einer deutlichen mRNA Expression von IL-6 (128 bp) im Vergleich zur unbehandelten Probe, die keine basale IL-6 Expression aufweist (siehe Abbildung 7, Vgl. Spur 1 und 2). Anders als IL-6 ließ sich bereits in unbehandelten TM eine basale mRNA Expression von TNF- α (101 bp) nachweisen (siehe Abbildung 7, Spur 1), die durch LPS allenfalls leicht stimuliert wurde, während LPS auf die unstimulierte Expression von MCP-1 (525 bp) keinen Einfluss zu haben schien (siehe Abbildung 7, Spur 2). Es konnte lediglich eine reduzierte stimulierte Expression von IL-6 dargestellt werden, vergleicht man die LPS-stimulierten Proben mit denen, die zuvor mit Testosteron präinkubiert worden waren, was auf einen regulatorischen Effekt von Testosteron hindeutet (siehe Abbildung 7, Spur 4). Die Expression von TNF- α und MCP-1 schien (soweit mittels PCR nachweisbar) durch die Vorbehandlung mit Testosteron unbeeinflusst. Eine geringe Expression aller drei Zielgene ließ sich nach Behandlung mit Testosteron alleine nachweisen (siehe Abbildung 7, Spur 3). Da diese Ergebnisse nicht sicher reproduzierbar waren und aufgrund der fehlenden Quantifizierbarkeit nicht vergleichbar waren, wurde im Folgenden die Bewertung der Proben mittels Real-Time PCR vorgenommen.

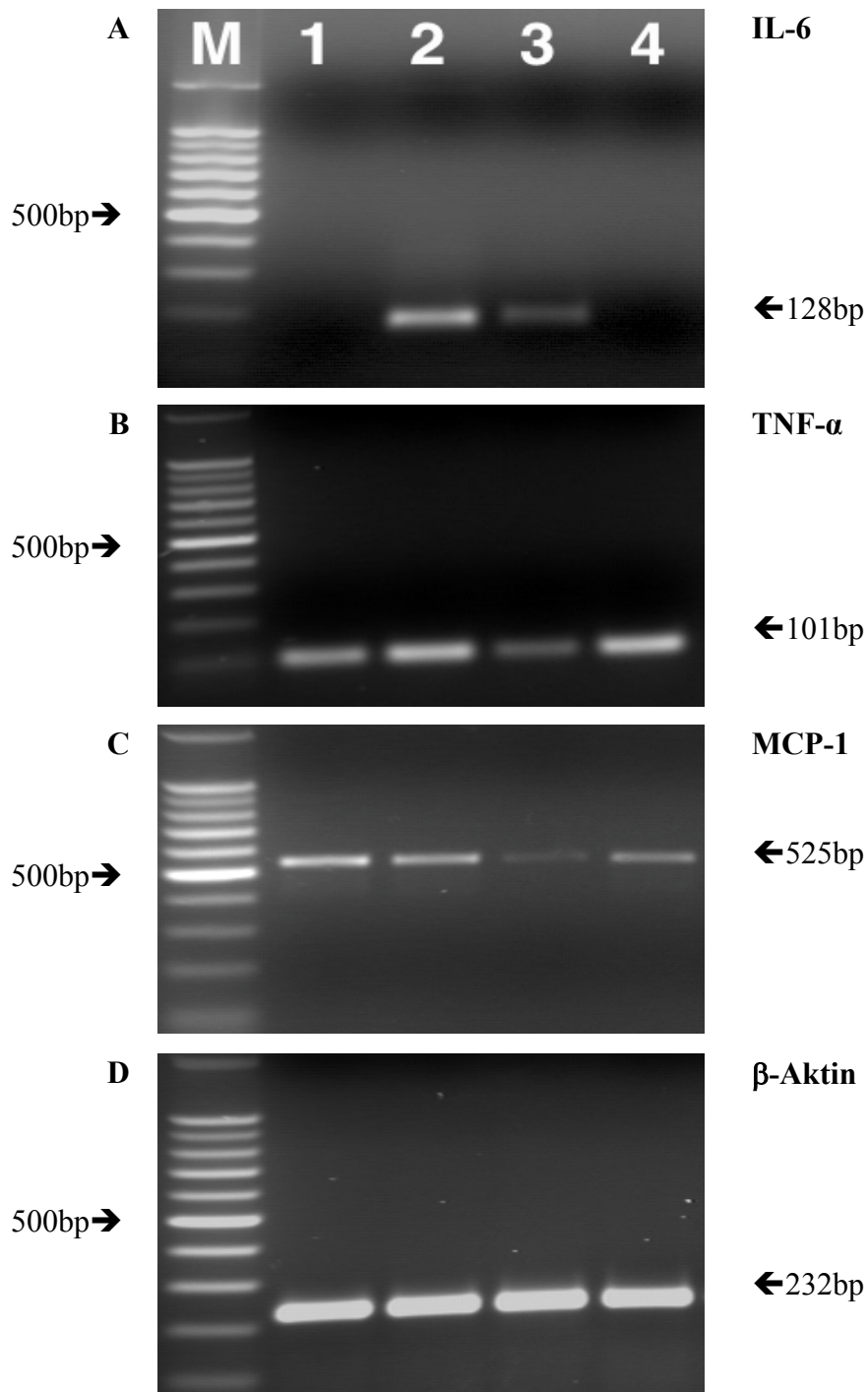


Abbildung 7: Nachweis von IL-6, TNF- α und MCP-1 mRNA Expression in TM.

PCR zum Nachweis der mRNA Expression von IL-6 (128bp) (A), TNF- α (101bp) (B) und MCP-1 (525bp) (C) in TM. β -Aktin (232bp) (D) diente als Referenzgen. M = 100bp Marker, Spur 1 = Ethanol Vehiclekontrolle, Spur 2 = 3 h LPS 10 μ g/ml, Spur 3 = 4 h T 1000 nM, Spur 4 = 1 h Präinkubation T 1000 nM + 3 h LPS 10 μ g/ml. Die PCR Produkte wurden in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt; T = Testosteron.

4.2.4 Die mRNA Expression von IL-6, MCP-1 und TNF- α lässt sich mittels PCR in SC nachweisen

Eine Behandlung mit LPS führte in SC zu einer deutlichen MCP-1 mRNA Expression, in geringem Maß auch zu einer gesteigerten IL-6 mRNA Expression. Aufgrund der schwachen DNA-Banden ließ sich die TNF- α mRNA Expression nur schwer beurteilen, LPS schien jedoch einen stimulatorischen Effekt zu haben. Die LPS-stimulierte mRNA Expression von TNF- α und MCP-1 waren jedoch deutlich geringer, wenn SC zuvor mit 1000 nM Testosteron vorbehandelt worden waren (siehe Abbildung 8, Seite 51).

Unbehandelte SC wiesen eine Grundexpression der Transkripte von IL-6 auf (siehe Abbildung 8A, Spur 1). Nach Behandlung mit LPS ließ sich die mRNA Expression von IL-6 stimulieren (siehe Abbildung 8A, Spur 2). Die Präinkubation mit physiologischen Dosen an Testosteron (500 nM und 1000 nM) zeigte eine geringere IL-6 mRNA Expression in SC als nur die Behandlung mit 100 nM Testosteron (siehe Abbildung 8A, Spur 4 und 5) im Vergleich zu SC, die mit LPS allein stimuliert worden waren.

Die basale mRNA Expression von TNF- α in SC war sehr schwach (siehe Abbildung 8B, Spur 1). Eine geringe Stimulation der TNF- α mRNA Expression konnte durch Behandlung mit LPS erreicht werden (siehe Abbildung 8B, Spur 2). Es konnte nach Präinkubation mit Testosteron ein leichter inhibierender Effekt auf die LPS-stimulierte TNF- α mRNA Expression beobachtet werden (siehe Abbildung 8B, Spur 5).

In unstimulierten SC konnte keine basale MCP-1 mRNA Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8C, Spur 1). Nach Stimulation mit LPS ließ sich in SC jedoch ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression von MCP-1 beobachten (siehe Abbildung 8C, Spur 2). Dagegen konnte in SC, die zuvor mit Testosteron behandelt worden waren, eine geringere stimulierte Expression der Amplifikationsprodukte von MCP-1 detektiert werden (siehe Abbildung 8C, Spur 5).

Da besonders die DNA-Banden der IL-6 und TNF- α Transkripte sehr schwer zu beurteilen waren, erfolgten detailliertere Untersuchungen mittels Real-Time PCR.

Ergebnisse

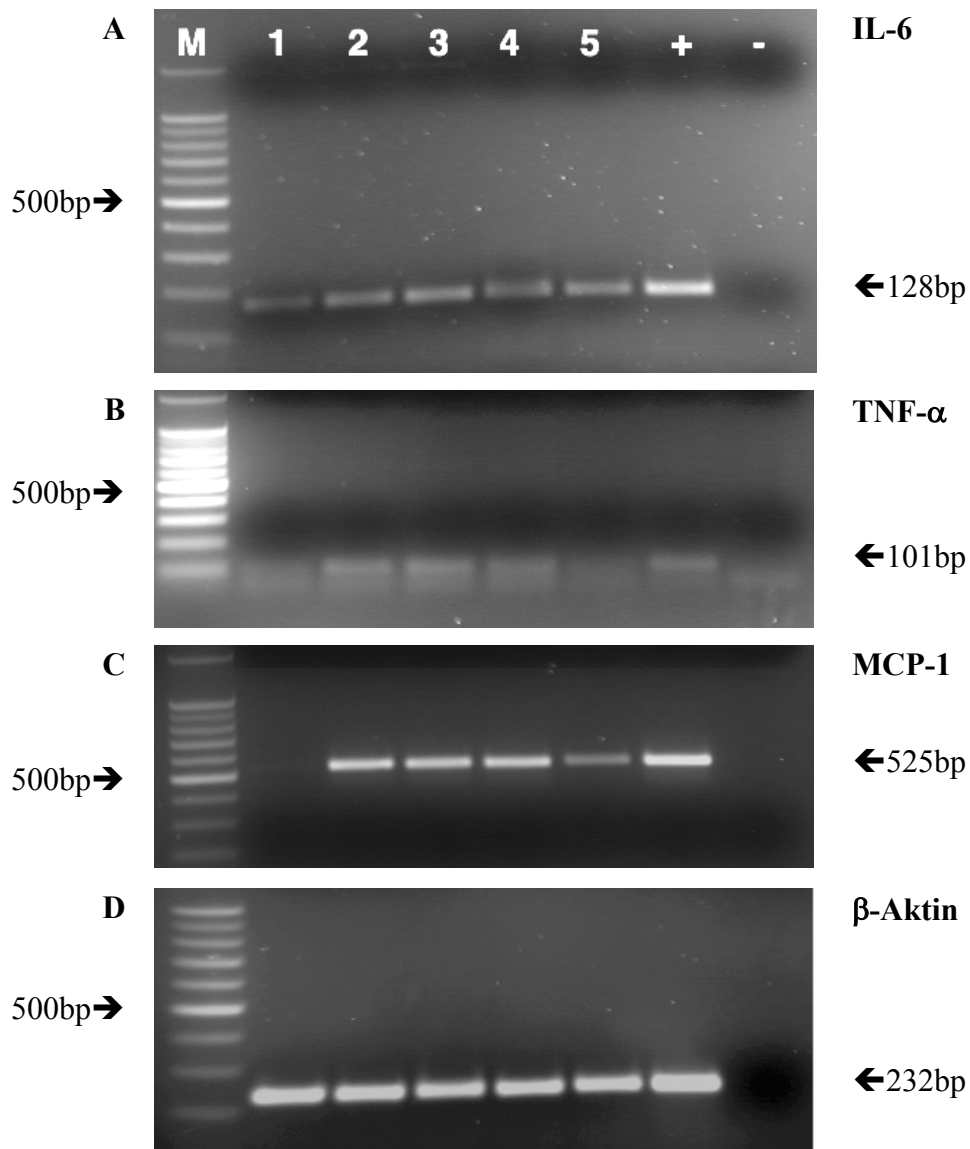


Abbildung 8: Nachweis von IL-6, TNF- α und MCP-1 mRNA Expression in SC.

PCR zum Nachweis der mRNA Expression von IL-6 (128bp) (A), TNF- α (101bp) (B) und MCP-1 (525bp) (C) in SC. β -Aktin (232bp) (D) diente als Referenzgen. M = 100bp Marker, += Positiv-Kontrolle (cDNA aus Rattenhoden), - = Negativ-Kontrolle (PCR-Reaktionsansatz cDNA Probe), Spur 1 = Ethanol Vehiclekontrolle, Spur 2 = 6 h LPS, Spur 3 = 1 h Präinkubation T100 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 4 = 1 h Präinkubation T500 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml, Spur 5 = 1 h Präinkubation T1000 nM + 6 h LPS 10 μ g/ml. Die PCR Produkte wurden in einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt; T = Testosteron.

4.3 Mittels Real-Time PCR lässt sich die IL-6, IL-10, TNF- α und MCP-1 mRNA Expression quantitativ nachweisen

Da die PCR ein Verfahren ist, das zum Nachweis eines bestimmten Genabschnittes dient, nicht jedoch zur quantitativen Analyse, erfolgten weiterführende Bestimmungen zum quantitativen Nachweis der mRNA Expression von IL-6, IL-10, TNF- α sowie MCP-1 mittels Real-Time PCR.

Die exemplarische Amplifikationskurve der Real-Time PCR (siehe Abbildung 9) zeigt die Ergebnisse der IL-6 mRNA Expression von SC. Der C_t -Wert jeder einzelnen Probe entspricht dem PCR-Zyklus, in dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant von dem unspezifischen Hintergrundsignal abhebt. Der C_t -Wert ist umso niedriger, je mehr cDNA des Zielgens in der Probe vorhanden ist. Demnach lässt sich die stärkste Expression der Amplifikationsprodukte von IL-6 nach der Behandlung mit LPS nachweisen ($C_t = 29,86$). Die Expression der Transkripte von IL-6 war geringer in Proben, die vor der LPS Stimulation mit 100 nM Testosteron präinkubiert worden waren ($C_t = 30,72$) und sogar noch geringer, wenn die Präinkubation mit 1000 nM Testosteron erfolgte ($C_t = 32,49$). Die geringste Expression findet sich in der unstimulierten Vehiclekontrolle ($C_t = 33,72$).

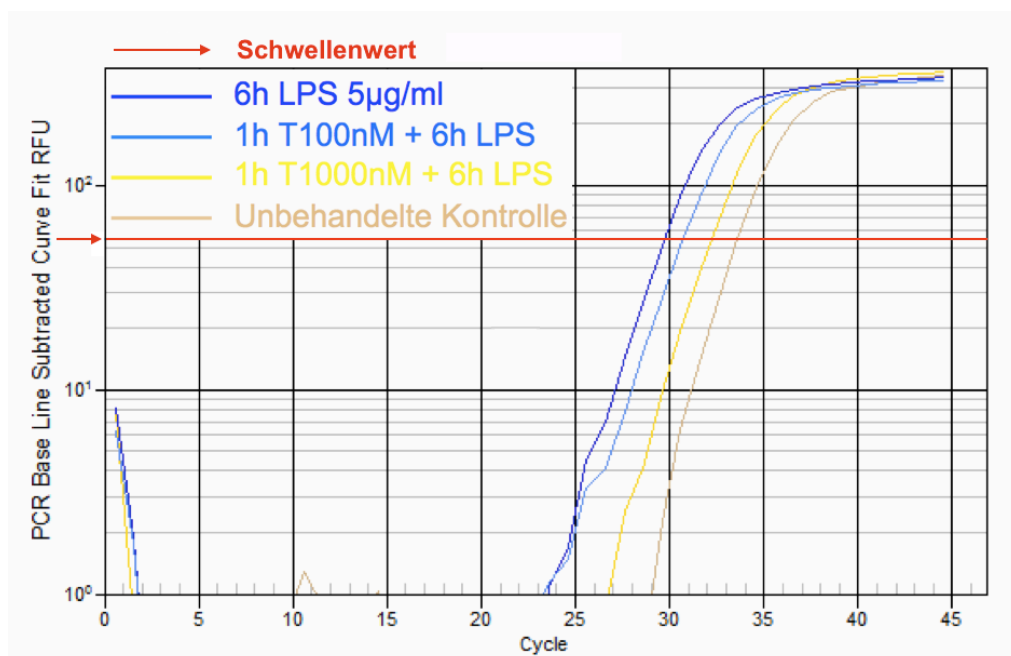


Abbildung 9: Amplifikationskurve einer Real-Time PCR zur Darstellung der C_t -Werte

Halb-logarithmische Ansicht zur Festlegung des C_t -Wertes. Untersucht wurde die Expression der Transkripte von IL-6 in sowohl in unbehandelten (Ethanol Vehiclekontrolle, $C_t = 33,72$), als auch in SC, die mit LPS 5 µg/ml alleine ($C_t = 29,86$) oder LPS + T 100 nM ($C_t = 30,72$) bzw. LPS + T 1000 nM ($C_t = 32,49$) behandelt worden sind; T = Testosteron.

4.3.1 Schmelzkurvenanalyse in der quantitativen Real-Time PCR schließt unspezifische Amplifikationsprodukte aus

Die Schmelzkurve entsteht am Ende des letzten PCR-Zyklus durch Messung des Fluoreszenzsignals aller Proben während die Temperatur sukzessive erhöht wird. Es wird die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals ($-d(RFU)/dT$; relative fluorescence units = RFU) in Abhängigkeit von der Zeit (Time = T) auf der Y-Achse gegen die Temperatur in °C auf der X-Achse aufgetragen.

Exemplarisch ist die Schmelzkurve der IL-6 Expression von SC dargestellt, die mit 5 µg/ml LPS und zwei verschiedenen Testosteronkonzentrationen (100 nM, 1000 nM) behandelt worden sind (siehe Abbildung 10). Die Schmelzkurve weist lediglich einen Peak bei 78 °C auf, es liegen somit keine unspezifischen Amplifikate vor. Die gemessene Fluoreszenz basiert ausschließlich auf der Amplifikation des korrekten DNA Fragments. Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse von TM waren mit den Ergebnisse von SC vergleichbar und wurden daher nicht zusätzlich gezeigt.

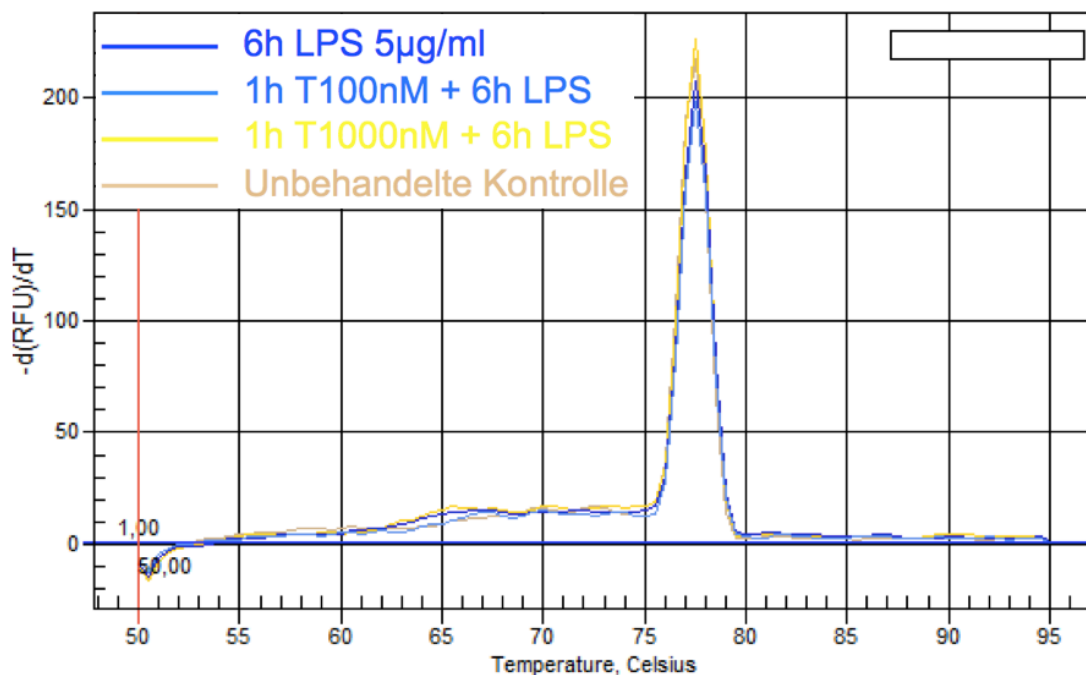


Abbildung 10: Schmelzkurve einer Real-Time PCR

Schmelzkurve zur Überprüfung auf unspezifische Amplifikationsprodukte. Als Proben dienten sowohl unbehandelte SC (Ethanol Vehiclekontrolle) als auch solche, die mit LPS 5 µg/ml alleine oder mit LPS + T 100 nM bzw. LPS + T 1000 nM behandelt worden sind. Das IL-6 PCR-Amplifikat weist einen einzigen Schmelzpunkt bei 77-78 °C auf. Alle Kurven überlagern sich und weisen keine Mehrfachpeaks auf, was für spezifische Bindungen der Primer an die dafür vorgesehenen cDNA Sequenzen und folglich der Amplifikation des korrekten Genabschnitts spricht; T = Testosteron.

4.3.2 Die Amplifikationsprodukte lassen sich mittels Gelelektrophorese nachweisen

Neben der Schmelzkurvenanalyse macht man sich die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegel zu Nutze, um zu überprüfen, ob die gemessene Fluoreszenz den erwarteten PCR-Produkten entspricht. Für jede durchgeführte Real-Time PCR konnte das PCR-Produkt mit spezifischer Größe nachgewiesen werden. Die Negativ-Kontrollen wiesen kein Amplifikationsprodukt auf (siehe Abbildung 11).

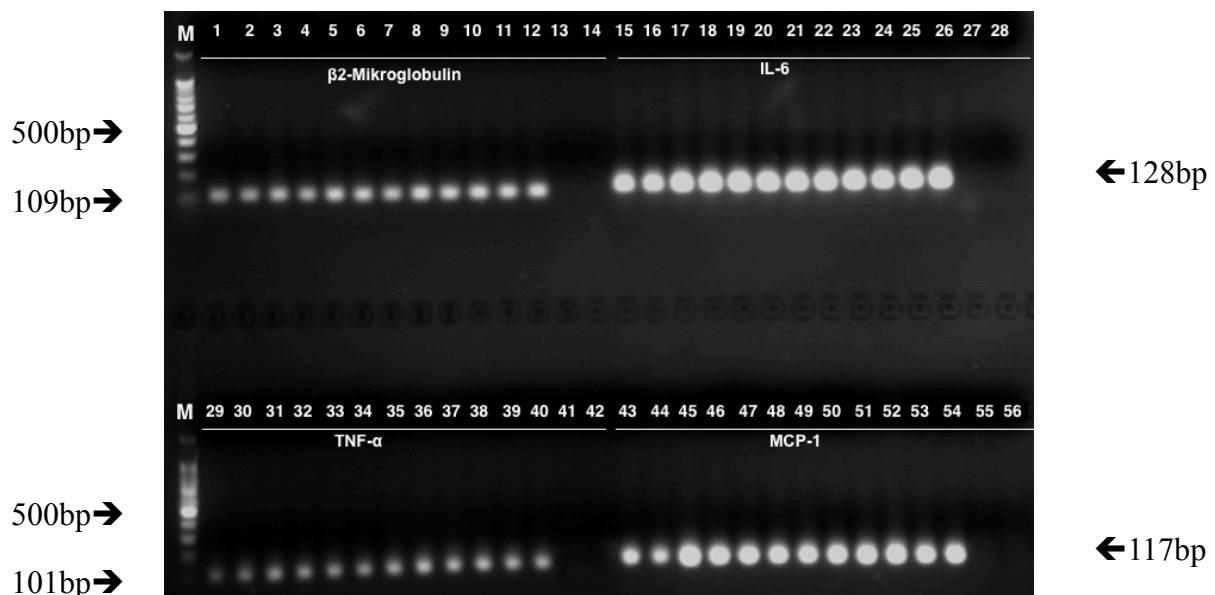


Abbildung 11: Nachweis der Amplifikationsprodukte für $\beta 2$ -Mikroglobulin (109bp), IL-6 (128bp), TNF- α (101bp) und MCP-1 (117bp) in der quantitativen Real-Time PCR

Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte einer Real-Time PCR von SC in einem 1,8%igen Agarosegel. Es erfolgten 45 Zyklen der Real-Time PCR, anschließend wurde in jede Geltasche die gesamte Probe aufgetragen (25 μ l). Die SC wurden entweder mit LPS 5 μ g/ml oder Testosteron (100 nM, 1000 nM) alleine oder in Kombination behandelt. Die Duplikate von 6 Proben wurden nebeneinander aufgetragen. Spur 1-12 = $\beta 2$ -Mikroglobulin, Spur 13 + 14 = Duplikate der Negativ-Kontrolle (PCR-Mix ohne cDNA Probe) von $\beta 2$ -Mikroglobulin, Spur 15-26 = IL-6, Spur 27 + 28 = Duplikate der Negativ-Kontrolle von IL-6, Spur 29-40 = TNF- α , Spur 41 + 42 = Duplikate der Negativ-Kontrolle von TNF- α , Spur 43-54 = MCP-1, Spur 55 + 56 = Duplikate der Negativ-Kontrolle von MCP-1. Die Negativ-Kontrollen zeigen keine PCR-Produkte. Für jede Probe zeigt sich eine einzige Bande auf Höhe des erwarteten Genproduktes.

4.3.3 Die LPS-stimulierte Expression von MCP-1 und TNF- α ist in TM nach 3 h und in SC nach 6 h am höchsten

Da die Zelltypen, mit denen gearbeitet wurde, auf unterschiedliche Weise auf die Stimulation mit LPS reagieren können, wurde zunächst ein zeitabhängiges mRNA Expressionsprofil erstellt, um den Zeitpunkt der maximalen mRNA Expression zu ermitteln. Dazu wurden SC und TM unterschiedlich lange (1-24 h) mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Die gewonnenen Proben wurden mittels quantitativer Real-Time PCR auf die mRNA Expression von MCP-1 und TNF- α untersucht. Bei TM konnte nach dreistündiger Stimulation eine 4-fach erhöhte MCP-1 mRNA Expression beobachtet werden (siehe Abbildung 12A). Für TNF- α wurde eine mindestens 90-fach erhöhte mRNA Expression nach zwei- bis sechsstündiger LPS-Behandlung der TM detektiert (siehe Abbildung 12C). SC zeigten das Maximum der MCP-1 mRNA Expression nach sechsstündiger LPS-Behandlung. Es konnte in diesem Behandlungsintervall eine 120-fach erhöhte MCP-1 mRNA Expression gezeigt werden (siehe Abbildung 12B). Die mRNA Expression von TNF α war nach sechsstündiger LPS-Behandlung in SC um das 3.5-fache erhöht (siehe Abbildung 12D). Die LPS-Behandlungszeiträume wurden daher für SC bei 6 h festgelegt und für TM bei 3 h.

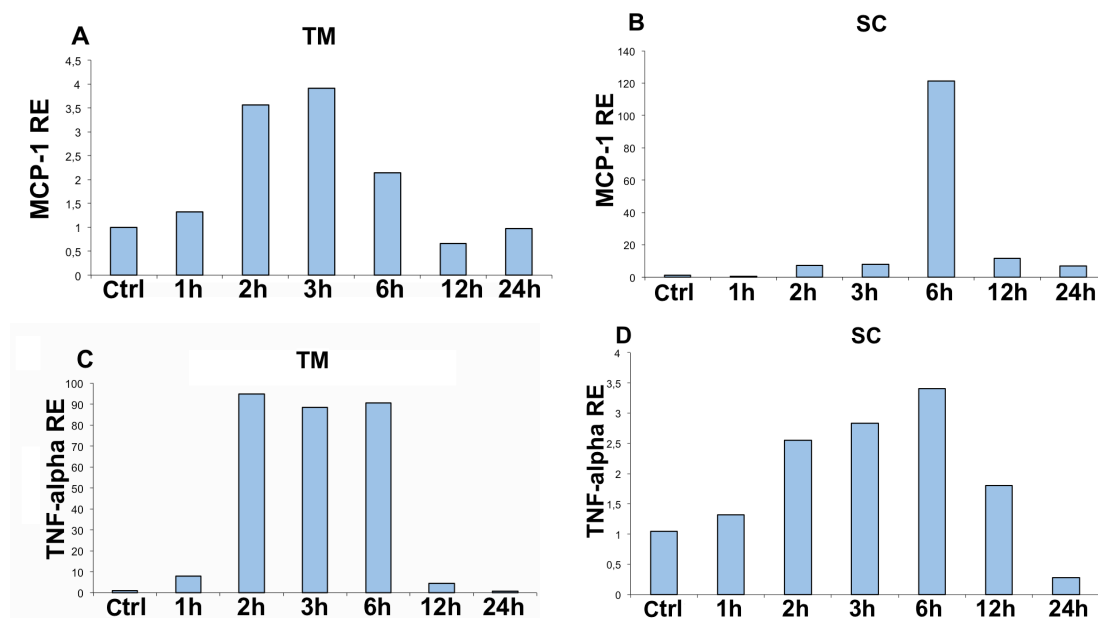


Abbildung 12: Zeitabhängige mRNA Expression von MCP-1 und TNF- α in LPS-stimulierten TM und SC

Quantitative Real-Time PCR-Analyse der relativen mRNA Expression von MCP-1 (A, B) und TNF- α (C, D) in TM (A, C) und SC (B, D), die für die angegebene Zeitspanne (X-Achse) mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert worden waren. Mittels β_2 -Mikroglobulin wurden die Werte normalisiert und in x-facher Änderung (Y-Achse) verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Ctrl) angegeben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten. Da die Ergebnisse in der Arbeitsgruppe bereits vorher in dieser Weise bekannt waren, wurde auf eine Wiederholung des Experiments verzichtet.

4.4 Testosteron reguliert die LPS-stimulierte Expression von IL-6, IL-10 und MCP-1 in TM

Die Behandlung mit LPS führte in TM zu einem signifikanten Expressionsanstieg von IL-6, TNF- α , IL-10 und MCP-1 im Gegensatz zu Testosteron oder Flutamid alleine, die keinen Effekt auf die Expression hatten.

Die IL-6 mRNA Expression in TM ist im Vergleich zur Kontrolle durch LPS-Behandlung um das 38-fache gestiegen ($p < 0,0001$; siehe Abbildung 13, Seite 57). Nach Präinkubation der TM mit verschiedenen Testosteronkonzentrationen (10 nM, 100 nM, 1000 nM) ließ sich die LPS-stimulierte IL-6 Expression dosisabhängig inhibieren. Nur eine hohe Dosis an Testosteron (1000 nM) konnte die LPS-stimulierte IL-6 mRNA Expression statistisch signifikant um 24% reduzieren ($p < 0,01$). Dieser Effekt ließ sich durch Behandlung mit Flutamid (1 μ M) aufheben, was darauf hinweist, dass die Testosteronwirkung spezifisch ist ($p < 0,001$; siehe Abbildung 13).

TM reagierten auf die LPS-Behandlung mit einer 110-fachen Steigerung der TNF- α mRNA Expression ($p < 0,0001$). Nach Präinkubation mit 1000 nM Testosteron war die TNF- α mRNA Expression in TM um 24% geringer, als die LPS-stimulierte Expression (nicht signifikant). Verglichen dazu zeigte sich ein signifikanter Expressionsanstieg von 46% nach Inhibition der Androgenwirkung mittels Flutamid ($p < 0,01$; siehe Abbildung 13).

Nach LPS-Behandlung ließ sich in TM eine 10-fache Steigerung der MCP-1 mRNA Expression beobachten ($p < 0,0001$). Es konnte nach Behandlung mit 100 nM Testosteron eine Minderung der LPS-stimulierten MCP-1 mRNA Expression um 30% beobachtet werden ($p < 0,0001$). Nach Inkubation mit 1000 nM Testosteron war die stimulierte MCP-1 mRNA Expression 23% geringer als nach LPS-Behandlung alleine ($p < 0,01$; siehe Abbildung 13).

Die Expression der IL-10 mRNA wurde nur in TM untersucht, da die konstitutive Expression dieses Zytokins in TM nachgewiesen wurde, jedoch nicht in SC. Durch LPS-Behandlung ließ sich die Expression von IL-10 um das 6-fache steigern ($p < 0,0001$). Dieser Expressionsanstieg konnte durch vorangegangene Inkubation mit 1000 nM Testosteron um 41% reduziert werden ($p < 0,01$). Die Behandlung mit dem AR-Antagonisten Flutamid führte zu einem Anstieg der Expression um 31%, jedoch waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 13).

Ergebnisse

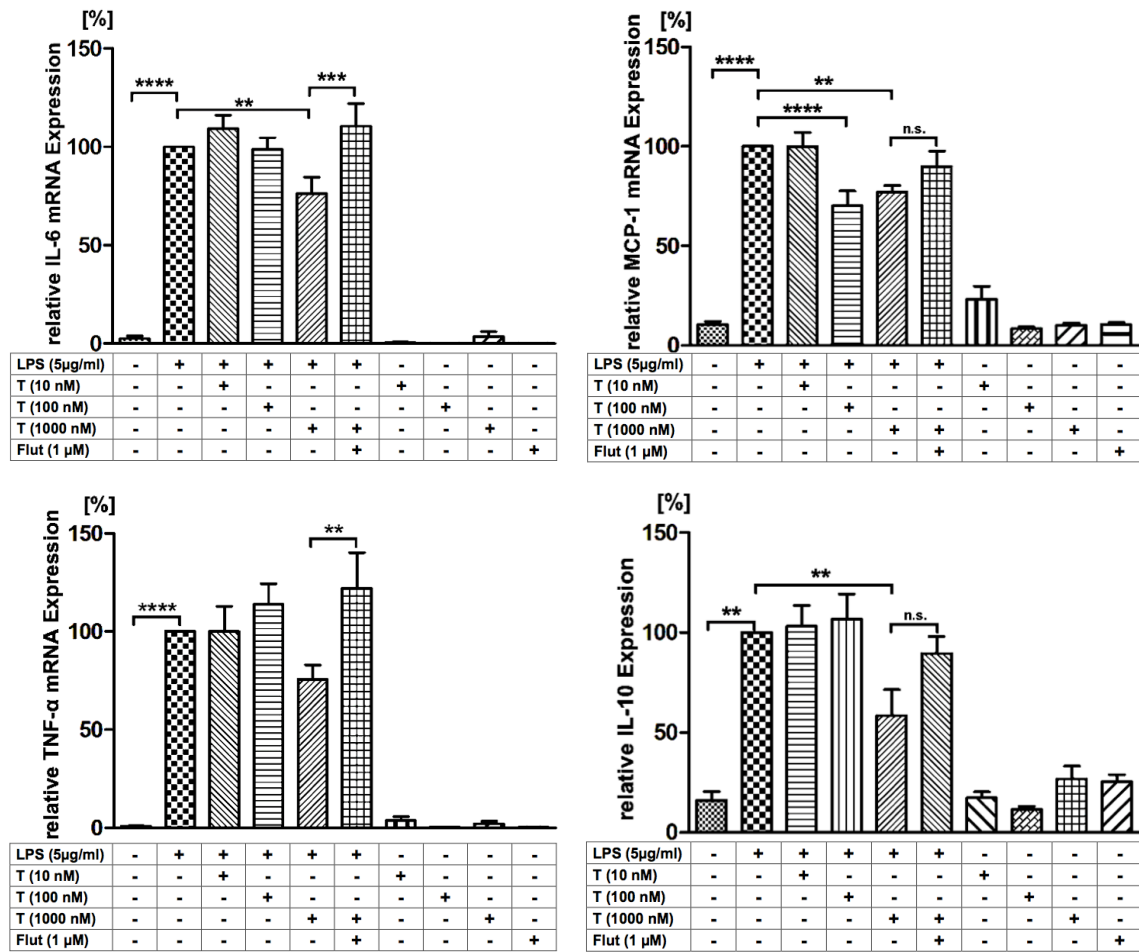


Abbildung 13: Testosteron reduziert die LPS-stimulierte Expression von IL-6, MCP-1 und IL-10 in TM.

Quantitative Auswertung der relativen mRNA Expression von IL-6, TNF- α , IL-10 und MCP-1 in TM mittels Real-Time PCR. Die Ergebnisse wurden anhand der Expression von β_2 -Mikroglobulin normalisiert und im Vergleich zur LPS-stimulierten Expression (100%) angegeben. Die Stimulation mit LPS erfolgte über 3 h, Behandlungen mit Testosteron (T) oder Flutamid (Flut) gingen dem jeweils 1 h voraus, als unbehandelte Probe gilt die Ethanol Vehiclekontrolle. n = 6. ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

4.5 Testosteron mindert die LPS-stimulierte TNF- α Expression in SC

Vergleicht man die C_t -Werte der unstimulierten Vehiclekontrolle von β_2 -Mikroglobulin, IL-6, MCP-1 und TNF- α mit den C_t -Werten der LPS-stimulierten Proben so wird die geringe mRNA Expression in SC deutlich.

	β_2 -Mikroglobulin	IL-6	TNF- α	MCP-1
unbehandelte Kontrolle (C_t)	19,17	33,27	34,33	34,73
LPS 5 μ g/ml (C_t)	19,01	30,62	29,49	26,52

SC reagieren im Allgemeinen weniger sensitiv auf die Stimulation mit LPS als TM. Die Behandlung mit Testosteron oder Flutamid alleine führte zu keinem statistisch signifikanten Expressionsunterschied in SC.

Es konnte ein Anstieg der IL-6 mRNA Expression um das 5-fache nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden ($p < 0,001$; siehe Abbildung 14, Seite 59). Nach Präinkubation mit Testosteron konnte aufgrund der Streuung der Werte kein signifikanter Expressionsunterschied verglichen mit der LPS-stimulierten Kontrolle dargestellt werden (siehe Abbildung 14).

Die Stimulation mit LPS bewirkte in SC eine Steigerung der TNF- α Expression um das 9-fache ($p < 0,001$). Die Behandlung mit 100 nM Testosteron senkte die TNF- α mRNA Expression nach LPS-Stimulation um 30% (nicht statistisch signifikant). Es konnte eine statistisch signifikante Minderung (43%) der LPS stimulierten Expression von TNF- α nach Präinkubation mit 1000 nM Testosteron gezeigt werden ($p < 0,05$), diese ließ sich jedoch mit Flutamid nicht statistisch signifikant inhibieren (siehe Abbildung 14).

Die Expression von MCP-1 war nach Stimulation mit LPS um das 83-fache höher, als in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Änderungen der stimulierten MCP-1 Expression nach Präinkubation mit Testosteron (siehe Abbildung 14).

Ergebnisse

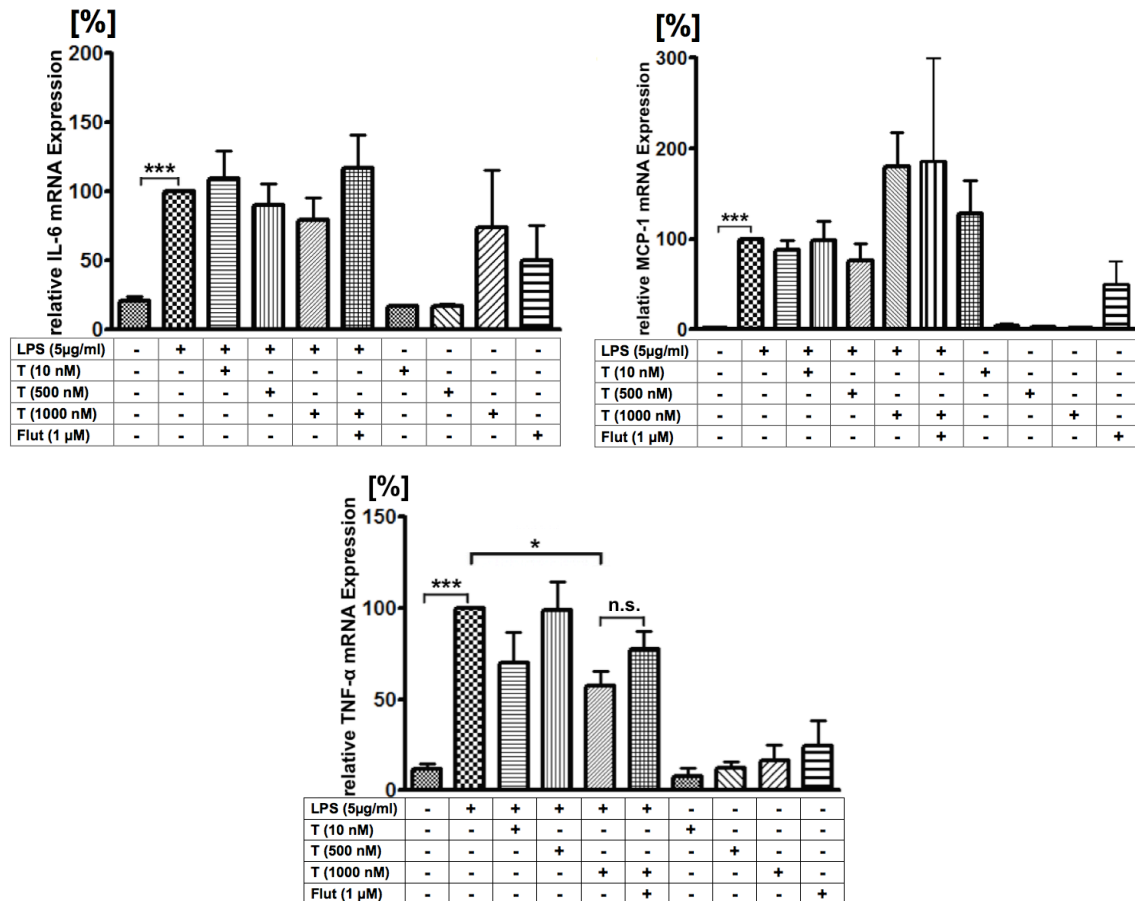


Abbildung 14: Testosteron inhibiert die LPS-stimulierte TNF-α Expression in SC.

Quantitative Auswertung der relativen mRNA Expression von IL-6, TNF-α und MCP-1 in SC mittels Real-Time PCR. Die Ergebnisse wurden anhand der Expression von β_2 -Mikroglobulin normalisiert und im Vergleich zur LPS-stimulierten Expression (100%) angegeben. Die Stimulation mit LPS erfolgte über 6 h, Behandlungen mit Testosteron (T) oder Flutamid (Flut) gingen dem jeweils 1 h voraus, als unbehandelte Probe gilt die Ethanol Vehiclekontrolle. n = 3-5. * p < 0,05, *** p < 0,001.

5 Diskussion

In zahlreichen *in vivo* Tiermodellen konnte bereits ein inhibitorischer Effekt von Androgenen auf die pro-inflammatorische Immunreaktion demonstriert werden (Fijak et al., 2011b; Olsen et al., 2014; Spence & Voskuhl, 2012). Allerdings sind bisher die molekularen Mechanismen die dazu führen zu großen Teilen unerforscht. In dieser Arbeit konnte jetzt auch die hemmende Wirkung von Testosteron im *in vitro* Modell einer akuten LPS-induzierten Entzündungsreaktion in primären testikulären Zellen nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass Testosteron inhibierend auf die LPS-stimulierte mRNA Expression von IL-6, MCP-1 und IL-10 in TM wirkt, während in SC nur die LPS-stimulierte mRNA Expression von TNF- α durch Testosteron signifikant reduziert wird. Dieser Effekt ließ sich jedoch durch Behandlung mit Flutamid nicht revidieren.

5.1 Immunregulation auf zellulärer Ebene

5.1.1 Immunantwort von TM im LPS-Entzündungsmodell

TM bilden im Hoden die größte Population an Leukozyten und sind an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt (Winnall et al., 2011), weshalb sie im Fokus dieser Studien standen. Sie besitzen immunologische Eigenschaften, die sie von Makrophagen anderer Organe deutlich abgrenzen, denn sie bilden einen gewebsspezifischen Phänotyp aus, der in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden kann (Bhushan et al., 2015; Winnall & Hedger, 2013).

Zur Erforschung der Immunantwort von TM wurde in dieser Arbeit LPS als etablierter akuter Entzündungsstimulus verwendet, der bereits *in vivo* und *in vitro* Anwendung fand. O'Bryan et al. charakterisierten ein LPS *in vivo* Entzündungsmodell mit eingeschränkter LC-Funktion, reduzierter Testosteronproduktion, Gewebeeinfiltration von Leukozyten, Verlust der Zellkontakte zwischen SC und Keimzellen und schließlich Untergang des Keimepithels aufgrund inflammatorischer Mediatoren (O'Bryan et al., 2000). Erwartungsgemäß war aufgrund des immunprivilegierten Status des Hodengewebes die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α als

Reaktion auf die Behandlung mit LPS gering. Ähnliche Beobachtungen machte Hutson bereits 1993, als er den Nachweis von TNF- α im Zellkulturmedium kultivierter TM beschrieb, die auf Behandlung mit LPS nur mit einer leichten Steigerung der TNF- α Sekretion reagierten (Hutson, 1993). Dies bestätigt die Beobachtungen von O'Bryan et al., die die Reaktion des Hodens auf LPS-Behandlung mit Lebergewebe verglichen und ein reduziertes pro-inflammatorisches Potential der TM beschrieben hatten (O'Bryan et al., 2005). Zwar sind genaue Mechanismen die dazu führten unbekannt, dennoch war Hedger bereits 2002 der Annahme, dass TM durch ihren immunoregulatorischen Charakter maßgeblich dazu beitragen (Hedger, 2002), was vorherige Untersuchungen von Kern unterstützte (Kern et al., 1995). Deutliche Hinweise darauf lieferte auch die Beobachtung einer hohen Expression an immunoregulatorischen Faktoren wie *Granulocyte Macrophages Colony stimulating Factor* und dass sie, verglichen mit peritonealen Makrophagen, durch Behandlung mit LPS nur in geringem Maße zur Bildung von IL-1, IL-6 oder TNF- α stimuliert werden können (Bhushan et al., 2015; Hayes et al., 1996; Kern et al., 1995).

In den Studien von Kern et al. zeigte LPS alleine keine signifikante Auswirkung auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, was in späteren Studien sowie in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die enzymatische Isolierung der TM sein, die Kern 1995 durchführte, während in dieser Arbeit auf die Verwendung von Enzymen explizit verzichtet wurde, um die Immunantwort der Zellen nicht zu beeinflussen.

Spätere Studien befassten sich mit weiteren immunologischen Funktionen von TM und beschrieben den stimulatorischen Effekt von LPS auf die Bildung von Entzündungsmediatoren wie iNOS oder MCP-1 (Gerdprasert et al., 2002a; Gerdprasert et al., 2002b).

Untersuchungen zur Immunantwort von TM wurden zunächst größten Teils an der gesamten Zellpopulation durchgeführt, ohne die einzelnen Subtypen getrennt voneinander auf ihre spezifische Reaktion zu untersuchen. Die Vermutung, dass ED1⁺ Makrophagen sich funktionell von ED2⁺ Zellen unterscheiden, wurde durch Beobachtungen von Gerdprasert et al. bestärkt. Sie beschrieben nach *in vivo* LPS-Behandlung einen Anstieg der ED1⁺ Makrophagenpopulation, während die Anzahl der ED2⁺ Zellen, unverändert blieb (Gerdprasert et al., 2002b). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Melaine et al. gemacht, die nach Infektion mit Sendai Virus einen Anstieg der ED1⁺ Makrophagen verzeichneten, jedoch keinen Effekt des Virus auf die

Anzahl der ED2⁺ Zellen demonstrieren konnten (Melaine et al., 2003). Diesen ED1⁺ Zellen wurde ein pro-inflammatorischer Charakter zugesprochen, da sie Mediatoren wie iNOS und MCP-1 exprimieren, die in ED2⁺ Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnten (Gerdprasert et al., 2002a; Gerdprasert et al., 2002b). Den ED2⁺ Makrophagen hingegen wurden später überwiegend immunoregulatorische Eigenschaften zugeschrieben, wie im Folgenden näher ausgeführt wird (Winnall & Hedger, 2013).

5.1.2 Aktivierung und Signalwege von TM

Genauere Untersuchungen der TM in Hinblick auf ihren Aktivierungstyp gelangen Winnall et al., die die ED2⁻ und ED2⁺ Makrophagenpopulationen getrennt voneinander analysierten (Winnall et al., 2011). In ED2⁺ Makrophagen (residente Makrophagen) beobachteten sie neben einer konstitutiv hohen Expression von IL-10, die durch LPS stimuliert werden konnte, eine schwache Expression von Genen der klassischen Aktivierung, ebenso wie eine geringe Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen. Als ED2⁻ Zellen wurden hierbei nur „neu-eingetroffene“ Makrophagen eingestuft, da „infiltrierende“ Makrophagen unter physiologischen Bedingungen im Hoden nicht zu finden sind. In ED2⁻ Makrophagen hingegen konnte keine konstitutive IL-10 Expression nachgewiesen werden, während die Expression inflammatorischer Gene selbst nach LPS-Stimulation immer noch gering war. Dies deutet darauf hin, dass residente Makrophagen im Hodengewebe einen M2 spezifischen Phänotyp besitzen, der durch geringe pro-inflammatorische Aktivität, sowie das Fehlen co-stimulatorischer Moleküle (CD86) zur Erhaltung des Immunprivilegs beiträgt (Winnall et al., 2011), oder sogar dafür mitverantwortlich ist, Immunreaktionen im Hoden zu unterdrücken (Meinhardt & Hedger, 2011).

Diese Erkenntnisse werden von weiteren Studien unterstützt, die zeigen, dass TM verglichen mit peritonealen Makrophagen eine geringere konstitutive Expression von spezifischen TLR-Signalweg-Genen aufweisen. Die Behandlung von TM mit LPS führt zwar zur Aktivierung der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) sowie des Aktivator Protein 1 (AP-1) und *cAMP Response Element-Binding Protein* Signalweges über STAT3, die darüber vermittelte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α ist jedoch deutlich geringer als in peritonealen Makrophagen, so dass man von einem regulatorischen Charakter der TM ausgehen kann (Bhushan et al., 2015).

5.1.3 Herkunft der TM

In dieser Arbeit stimulierte die Behandlung von primären TM mit LPS sowohl die Bildung pro-inflammatorischer als auch immunoregulatorischer Zytokine. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, welcher Subpopulation der Makrophagen die Bildung der verschiedenen Zytokine zuzuschreiben ist. Die Zytokinantwort der unterschiedlichen Makrophagentypen im Hoden scheint einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu unterliegen und ist vermutlich abhängig von den Vorgängerzellen aus denen die einzelnen Subtypen abstammen, was die funktionellen Unterschiede der Makrophagenpopulation erklären könnte.

Ausgehend von der Frage warum ED1⁺/ED2⁻ „neu-eingetroffene“ Makrophagen kaum Reaktion auf LPS-Stimulation zeigen, beschrieben Winnall und Hedger ein neues Modell, in dem sie eine mögliche Erklärung für die Unterschiede der Zytokinexpression fanden (Winnall & Hedger, 2013). Entsprechend ihres Expressionsmusters für Chemokinrezeptoren und andere Marker werden Monozyten von Ratten in zwei Gruppen eingeteilt: (a) CD43^{lo}CCR2⁺CX₃CR1⁻ Monozyten besitzen den MCP-1 Rezeptor (CCR2) und infiltrieren entzündetes Gewebe getriggert durch den MCP-1 Gradienten (Palframan et al., 2001), wo sie sich zu dendritischen Zellen oder ED1⁺ Makrophagen mit klassisch aktiviertem M1 Phänotyp differenzieren.

(b) CD43^{hi}CCR2⁻CX₃CR1⁺ Zellen exprimieren den Rezeptor des Chemokins Fraktalkin (CX₃CR1) und reagieren daher auf die konstitutive Expression von Fraktalkin (CX₃CL1), die unter physiologischen Bedingungen unter anderem in LC nachgewiesen wurde (Ancuta et al., 2003; Habasque, 2003). Sie bilden die größere Gruppen an Monozyten und werden kontinuierlich zum gesunden Gewebe rekrutiert, wo sie den Erhalt der residenten Makrophagenpopulation sichern und sich zu alternativ aktivierten M2 Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren können (Geissmann et al., 2003; Yrlid et al., 2006). Da MCP-1 nach momentanem Kenntnisstand das einzige monozytenrekrutierende Chemokin ist, das im entzündeten Hodengewebe gebildet wird, ist es wahrscheinlich, dass „infiltrierende“ ED1⁺ Makrophagen von CD43^{lo}CCR2⁺CX₃CR1⁻ Monozyten abstammen, die durch pro-inflammatorische Eigenschaften charakterisiert sind. Die Subpopulation von „neu-eingetroffenen“ ED1⁺ Makrophagen scheint durch Fraktalkin angelockt zu werden und entspricht damit der differenzierten Population von CD43^{hi}CCR2⁻CX₃CR1⁺ Monozyten, was das schwache pro-inflammatorische Potential dieser Zellen erklären könnte (Winnall & Hedger,

2013). Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass die Expression inflammatorischer Gene selbst nach LPS-Behandlung der „neu-eingetroffenen“ TM von Winnall et al. nicht nachgewiesen werden konnte, da es sich um durch Fraktalkin rekrutierte Monozyten handelt, die zum Erhalt der physiologischen Makrophagenpopulation im Hoden dienen und nicht der akuten Immunabwehr (Winnall et al., 2011).

Ausgehend von diesem neuen Modell, lässt sich vermuten, dass die gemessenen Zytokine in dieser Arbeit nicht auf „infiltrierende“ ED1⁺ Makrophagen zurück zu führen sind, die lediglich durch Entzündungsstimulus zum Hoden rekrutiert werden. Da in dieser Studie mit der gesamten Makrophagenpopulation gearbeitet wurde, die unter physiologischen Bedingungen isoliert worden ist, ist davon auszugehen, dass die relativ geringe Expression von TNF- α und IL-6 hauptsächlich von ED2⁺ Makrophagen, in sehr geringen Mengen auch von ED1⁺ „neu-eingetroffenen“ Makrophagen gebildet wurde, die alternativer Aktivierung unterliegen und nur wenig durch LPS stimuliert werden können. Die klare Expression von IL-10, die nachgewiesen wurde und durch LPS stimuliert werden konnten, unterstützt diese Vermutung, da „neu-eingetroffene“ Makrophagen keine konstitutive Expression von IL-10 aufweisen (Winnall et al., 2011). Nach den Ergebnissen von Winnall et al. scheint die Expression von IL-10 ebenfalls von den ED2⁺ residenten Makrophagen auszugehen, da es als Marker der M2 Aktivierung gilt, was den immunoregulatorischen Charakter der Population unterstreicht (Winnall et al., 2011).

5.1.4 Immunologische Funktion von SC

SC stehen aufgrund ihrer immunprotektiven Funktionen bereits seit vielen Jahren im Fokus der Forschung, insbesondere auf dem Gebiet der Transplantationsforschung. Besonders sind es die Ergebnisse in Studien zur Untersuchung der non-obese diabetic (NOD) Maus, die verdeutlichen, dass es nicht alleine die Funktion der Blut-Hoden-Schranke ist, die das Überleben der differenzierten Keimzellen gewährleistet, sondern vielmehr die inhibitorische Wirkung, die SC auf die Immunantwort haben. Suarez-Pinzon et al. etwa untersuchten das Transplantatüberleben und die TGF- β Expression von SC, die unter die rechte Nierenkapsel von NOD Mäusen platziert worden waren, während NOD Inselorgane unter die linke Nierenkapsel transplantiert wurden (Suarez-Pinzon et al., 2000). Sie beschrieben, dass 64% der Mäuse, denen SC und Inselorgane transplantiert worden waren, nach 60 Tagen normoglykämisch waren, verglichen mit

0% der Tiere, die keine Transplantation von SC erhielten. Weiter zeigten sie erhöhte Plasmaspiegel von TGF- β 1, sowie eine Konversion der destruktiven Immunzellen hin zu einem nicht-destruktiven IL-4⁺ Phänotyp und demonstrierten damit eindrucksvoll die immunoregulatorische Wirkung von SC *in vivo* (Suarez-Pinzon et al., 2000). Dass SC das Überleben von xenogenen Transplantaten verlängern, konnte sogar in Rattenmodellen unter Verzicht auf zusätzliche Immunsuppression demonstriert werden und verdeutlicht ihr Potential, spezieübergreifend Immunschutz zu gewähren (Yin et al., 2006).

Jüngere Studien zeigten den immunoregulatorischen Effekt von SC auf eine Kultur von Endothelzellen *in vitro*. Durch die Zugabe von SC konnte die Proliferation und Angiogenese der Endothelzellen gesteigert werden, während die Fähigkeit zur Stimulation von Lymphozyten deutlich verringert war. Die durch INF- γ stimulierte Expression von MHC II Molekülen, sowie die TNF- α getriggerte IL-6 Expression konnte ebenfalls durch SC inhibiert werden (Fan et al., 2011). Nicht nur die Hemmung der pro-inflammatorischen Zytokine, sondern auch die Bildung immunoregulatorischer Faktoren wie TGF- β oder Aktivin A und der regulatorische Effekt auf die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie des Komplementsystems sind mögliche Faktoren, die das Immunprivileg unterstützen (Doyle et al., 2012; Kaur et al., 2014). Diese Ergebnisse liefern deutliche Hinweise dafür, dass SC am Immunprivileg des Hodengewebes beteiligt sind und dies u. a. dadurch vermitteln, dass sie Immunreaktionen lokal und systemisch modulieren (Mital et al., 2010).

5.1.5 Immunantwort von SC im LPS-Entzündungsmodell

In dieser Arbeit wurde LPS verwendet, um eine inflammatorische Antwort in primären SC zu stimulieren und den Einfluss von Testosteron auf diese Immunantwort *in vitro* zu untersuchen. Es ist bekannt, dass SC eine Vielzahl an Zytokinen wie IL-1 α , Aktivin A und Inhibin B exprimieren, die unter physiologischen Bedingungen als Wachstumsfaktoren dienen können und die Integrität der Blut-Hoden-Schranke und Prozesse der Spermatogenese regulieren (Winnall et al., 2009). Eine erhöhte Sekretion von IL-6 konnte nach *in vitro* Stimulation mit LPS im Medium kultivierter SC nachgewiesen werden (Stéphan et al., 1997; Syed et al., 1993). Ähnliche Resultate konnten in dieser Arbeit auf Expressionsebene erzielt werden, wobei SC verglichen mit TM deutlich weniger sensibel für die Stimulation mit LPS waren. Dies bestätigt die Beobachtungen

von Winnall et al., die demonstrierten, dass TM bezüglich ihrer IL-6 mRNA Expression mindestens 10 mal sensibler auf LPS reagieren, als SC (Winnall et al., 2011).

Die Sekretion von TNF- α wurde für Spermatozoen und Makrophagen nachgewiesen, jedoch nicht im Medium kultivierter SC (Hutson, 1993), während die mRNA Expression in sehr geringen Mengen gefunden werden konnte (De et al., 1993). Vor und nach Behandlung mit LPS gelang es in dieser Arbeit, die Expression von TNF- α in SC nachzuweisen. Eine frühere Studie von Winnall et al. verwendete ebenfalls LPS als Stimulus, jedoch war die Expression von TNF- α in SC kaum detektierbar, während TM - vergleichbar mit den Ergebnissen aus dieser Studie - mit einem deutlichen Expressionsanstieg reagierten (Winnall et al., 2009).

Weiter konnte in dieser Arbeit ein klarer stimulierender Effekt von LPS auf die Expression von MCP-1 in SC gezeigt werden. Bereits Aubry et al. wiesen nach LPS-Stimulation in geringen Mengen in SC die MCP-1 mRNA Expression nach, jedoch verwendeten sie eine PCR, die im Vergleich zu den Ergebnissen der Real-Time PCR in dieser Arbeit keine quantitative Aussage ermöglichte (Aubry et al., 2000). Diese hier dargestellten Ergebnisse bestätigen die Resultate von Bhushan et al., die ebenfalls mittels quantitativer Real-Time PCR eine erhöhte MCP-1 mRNA Expression nach Stimulation mit LPS in SC nachwiesen (Bhushan et al., 2008). Im Zellvergleich konnte nun gezeigt werden, dass SC bezüglich der mRNA Expression von MCP-1 sensibler auf LPS reagierten als TM.

5.1.6 Signalwege von SC über TLR

Die Ergebnisse in dieser Studie verdeutlichen, dass TM bezüglich der mRNA Expression von IL-6 und TNF- α sensibler auf LPS reagieren als SC, während diese mit einer stärkeren MCP-1 Expression antworten. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die nähere Betrachtung der Signaltransduktion nach Aktivierung von TLR4 durch LPS, der mit *Myeloid Differentiation 2* und CD14 einen Rezeptorkomplex bildet. Die anschließende Signaltransduktion kann über einen *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88)-abhängigen Weg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und schließlich zur Bildung von IL-6 und TNF- α führen. Der MyD88-unabhängige Signalweg aktiviert ebenfalls NF- κ B, jedoch mit Verzögerung und führt über Aktivierung von *IFN-regulated Factor 3* zur Bildung von regulatorischen Interferonen und MCP-1 (Akira & Hoshino, 2003; Barton & Medzhitov, 2003; Fitzgerald et al.,

2003; Takeda & Akira, 2004). Es lässt sich daher vermuten, dass die Expression von TLR4, CD14 oder MyD88 Auswirkung auf die Zytokinantwort der untersuchten Zellen haben könnte.

Während TM eine starke Expression von MyD88, sowie eine schwache Expression von TLR4 aufweisen, gibt es keine Expression von MyD88 und nur eine sehr geringe Expression von TLR4 und CD14 in SC (Bhushan et al., 2008; Winnall et al., 2011). Ausgehend davon, dass die Expression von IL-6 und TNF- α primär MyD88-abhängig vermittelt wird, könnte die starke Expression von MyD88 in TM und die geringe Expression von CD14 bzw. das Fehlen von MyD88 in SC eine mögliche Erklärung dafür sein, dass diese bezüglich der Expression von IL-6 und TNF- α geringer auf LPS ansprechen. Da sich die MCP-1 Expression in SC stärker stimulieren ließ als in TM, lässt sich vermuten, dass ihre Beteiligung an Immunreaktionen primär über den MyD88-unabhängigen Signalweg vermittelt wird, der zur Bildung von Interferonen und Chemokinen zur M1 Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten führt. Dieser ist jedoch in SC nur wenig erforscht.

5.2 Zytokinexpression im Zellvergleich

5.2.1 IL-6

Als eines der potentesten pro-inflammatorischen Zytokine, spielt IL-6 eine tragende Rolle für die Entwicklung und den Verlauf von Entzündungsreaktionen im Hodengewebe. TM, die IL-6 unter physiologischen Bedingungen nur in geringem Maße exprimieren, zeigten einen deutlichen mRNA Expressionsanstieg nach LPS-Behandlung. Laut den Studien von Rival et al. und Gerdprasert et al. ist dieser möglicherweise auf die Population von ED1⁺ Makrophagen zurückzuführen, die ein pro-inflammatorisches Potential aufweisen (Gerdprasert et al., 2002a; Rival et al., 2006). Dies steht jedoch im Gegensatz zu neueren Studien von Winnall et al., die beschreiben, dass unter physiologischen Bedingungen keine “infiltrierenden” Makrophagen im Hodengewebe vorherrschen und “neu-eingetroffene” Makrophagen durch LPS nicht zur Expression inflammatorischer Gene stimuliert werden können (Winnall et al., 2011). Weiter verglichen sie die Expression von Markern der klassischen Aktivierung und der alternativen Aktivierung von TM mit Makrophagen aus dem Knochenmark. Es zeigte sich, dass die kombinierte Stimulation mit LPS und INF- γ in

Makrophagen aus dem Knochenmark zu einem deutlich höheren Anstieg der IL-6 mRNA Expression führte, als in TM. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass TM über ein geringeres pro-inflammatorisches Potential verfügen, als Makrophagen anderer Gewebe (Winnall et al., 2011).

SC exprimieren höhere basale Konzentrationen an IL-6 als TM. Sie zeigten in dieser Studie ebenfalls eine deutliche Reaktion auf LPS-Stimulation, wie bereits in anderen Studien beschrieben wurde. Diese war jedoch geringer, als die Reaktion von TM, die deutlich sensitiver auf LPS-Stimulation reagieren (Stéphan et al., 1997; Winnall et al., 2011). Nach Vorbehandlung mit einer physiologischen Konzentration von Testosteron (1000 nM) konnte in dieser Studie in TM ein signifikanter Abfall der LPS-stimulierten IL-6 Expression demonstriert werden ($p < 0,01$, siehe Abbildung 13, Seite 57). Der Effekt von Testosteron ließ sich durch den AR-Antagonisten Flutamid signifikant inhibieren ($p < 0,001$, siehe Abbildung 13). In SC zeigte die Inkubation mit Testosteron den gleichen Trend, der auch bei TM beobachtet wurde. Jedoch erreichten die Ergebnisse keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 14, Seite 59).

Ältere *in vitro* Studien zu diesem Thema zeigten bereits, dass die Produktion von IL-6 in SC nach Stimulation mit geringen Mengen an Testosteron (0,01 nM – 10 nM) dosisabhängig ansteigt, wobei ab einer Konzentration von 100 nM kein stimulatorischer Effekt mehr nachgewiesen werden konnte (Stéphan et al., 1997).

5.2.2 TNF- α

Bereits mehrfach wurden eine erhöhte testikuläre Expression von TNF- α sowie die lokale Wirkung des Zytokins unter inflammatorischen Bedingungen beschrieben (Fijak et al., 2015; Hutson, 1993; O'Bryan et al., 2005; Sica et al., 1990; Suescun et al., 2003). Ähnlich wie IL-6 wird auch TNF- α in TM nur schwach exprimiert. In dieser Arbeit führte die Stimulation mit LPS zu einem klaren TNF- α mRNA Expressionsanstieg (siehe Abbildung 13, Seite 57), wie es auch frühere Studien beschrieben haben (Winnall et al., 2009). Nach Winnall et al. spricht dies für eine klassische Aktivierung der residenten ED2⁺ Makrophagenpopulation, die auf LPS-Stimulation mit einem starken Anstieg der TNF- α Expression reagieren, während solch eine Reaktion in ED2⁻ Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnte (Winnall et al., 2011).

Die physiologische Expression von TNF- α in SC ist entsprechend ihres

immunoregulatorischen Charakters sehr gering und dient der Regulation von Auf- und Abbauprozessen der Blut-Hoden-Schranke für die Spermatogenese (Li et al., 2009; Lydka et al., 2012; Suh et al., 2008). Eine erhöhte Expression von TNF- α kann in SC über TLR vermittelt werden und fördert inflammatorische Prozesse im Hoden (Zhang et al., 2013). Durch Stimulation mit LPS konnte in SC ein starker Anstieg der TNF- α Expression demonstriert werden, welcher jedoch deutlich geringer war, als in TM (siehe Abbildung 14, Seite 59). Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse von Winnall et al., die zeigen, dass TM sensitiver auf die Stimulation mit LPS reagieren als SC und eine stärkere Antwort pro-inflammatorischer Zytokine aufweisen (Winnall et al., 2011). In SC konnte in dieser Studie der regulatorische Effekt von Testosteron beobachtet werden. Die Behandlung mit 1000 nM Testosteron senkte die LPS stimulierte TNF- α Expression signifikant (siehe Abbildung 14, Seite 59), was jedoch durch Behandlung mit Flutamid nicht reversibel war, so dass ein Wirkmechanismus alternativ zum klassischen AR diskutiert werden muss. Dies unterstützt Ergebnisse von Fijak et al., die bereits zeigten, dass die Testosteronsupplementation im Verlauf einer Orchitis zu einer Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokinantwort führt (Fijak et al., 2011b).

5.2.3 IL-10

TM exprimieren IL-10 konstitutiv und verglichen mit Makrophagen anderer Organe in deutlich höheren Mengen. Sie reagierten auf LPS-Stimulation mit einem starken IL-10 mRNA Expressionsanstieg, wie es bereits in ähnlichen Studien demonstriert wurde (Winnall et al., 2011). Die Behandlung mit Testosteron führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der stimulierten IL-10 Expression in TM, was durch Flutamidbehandlung nicht reversibel war (statistisch nicht signifikant, siehe Abbildung 13, Seite 57). Man kann nach jüngeren Studien davon ausgehen, dass die Expression von IL-10 in primären TM, die wie in dieser Arbeit unter nicht-inflammatorischen Bedingungen isoliert wurden, den ED2⁺ Makrophagen zuzuschreiben ist (Winnall & Hedger, 2013; Winnall et al., 2011).

5.3 Expression des Chemokins MCP-1 im Zellvergleich

Im Hoden ist MCP-1 ein wichtiges Chemokin, da es die Migration von Leukozyten reguliert und eine große Rolle für das immunologische Gleichgewicht spielt (Deshmane et al., 2009). Befunde dazu stammen unter anderem aus den Studien zur chronischen EAO (Fijak et al., 2011b; Guazzone et al., 2003; Iosub et al., 2006) oder akuten LPS-Modellen (Gerdprasert et al., 2002b). TM zeigten auch in dieser Arbeit eine starke Expression von MCP-1, die durch LPS deutlich stimuliert wurde. Frühere Studien beschrieben bereits, dass die Stimulation mit LPS nur in ED1⁺ Makrophagen zu einer erhöhten MCP-1 Expression zu führen scheint, während in ED2⁺ Zellen kaum eine Expression von MCP-1 festzustellen war (Gerdprasert et al., 2002b). Wie bereits beschrieben, ist jedoch davon auszugehen, dass die in dieser Studie nachgewiesene Population an ED1⁺ Makrophagen zu den „neu-eingetroffenen“ Makrophagen zählt und nicht wie die infiltrierenden Makrophagen durch starkes pro-inflammatorisches Potential gekennzeichnet ist. Demnach muss man annehmen, dass die Expression von MCP-1 durch residente ED2⁺ Makrophagen und weniger durch ED1⁺ Makrophagen zu erklären ist.

Die Expression von MCP-1 wird in SC über TLR vermittelt und lässt sich durch bakterielle Stimuli (Bhushan et al., 2008; Riccioli et al., 2006; Starace et al., 2008) sowie Infektion mit dem Sendai Virus steigern (Le Goffic et al., 2002). Eine *in vivo* Studie von Guazzone et al. beschrieb einen starken Anstieg der MCP-1 Expression in der testikulären interstitiellen Flüssigkeit von EAO Ratten (Guazzone et al., 2003). Sie konnten mittels Immunfluoreszenz nachweisen, dass es im Rahmen einer EAO zu ausgeprägten Immunreaktionen im tubulären Segment kommt, die von SC mittels MCP-1 initiiert werden. Es ist davon auszugehen, dass MCP-1 eine tragende Rolle dabei spielt, da die immunhistochemischen Nachweise eine interstitielle Invasion lymphomononukleärer Zellen zeigen, die den MCP-1 Rezeptor (CCR2) tragen (Guazzone et al., 2003).

Es konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Real-Time PCR in unstimulierten SC eine klare MCP-1 Expression gezeigt werden. Auf die Stimulation mit LPS reagierten sie jedoch deutlich stärker als TM. Die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Testosteron bewirkte in TM eine signifikante Reduktion der LPS-stimulierten MCP-1 mRNA Expression. Ein entsprechender Trend konnte auch in SC beobachtet werden, jedoch zeigten die Ergebnisse kein statistisches Signifikanzniveau. Ebenso konnten

frühere Studien von Aubry et al. MCP-1 in SC mittels PCR nur in sehr geringen Mengen und mittels Northern Blot und ELISA nicht sicher nachweisen (Aubry et al., 2000), es stellt sich demnach die Frage, ob die MCP-1 Expression von SC tatsächlich eine chemotaktische Wirkung besitzt, wie sie von Guazzone et al. beschrieben wurde (Guazzone et al., 2003), oder ob die chemotaktische Rekrutierung vielmehr von anderen Zellen des interstitiellen Gewebes gesteuert wird. Möglicher Weise gelang Aubry et al. auch der Nachweis von MCP-1 auf Proteinebene deshalb nicht, weil die Stimulation der Sekretion mit 1µg/ml LPS zu gering war. Diesbezüglich wären weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene erforderlich.

5.4 Immunregulation auf endokriner Ebene

5.4.1 Wirkung von Testosteron auf Autoimmunerkrankungen

Es ist bereits seit langem bekannt, dass die Prävalenz vieler Erkrankungen geschlechtsspezifischen Unterschieden unterliegt, was darauf hinweist, dass Geschlechtshormone an der Entstehung einer Krankheit beteiligt sein können (Ansar Ahmed et al., 1985). So sind Frauen deutlich häufiger von Autoimmunerkrankungen betroffen als Männer (Ngo et al., 2014; Rubtsova et al., 2015). Im Gegensatz zu akuten bakteriellen Entzündungsprozessen sowie Immunreaktionen gegen parasitäre Erreger, zeigt die Wirkung von Testosteron einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, bei denen es zu überschießenden Reaktionen des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe kommt. Im Modell der NOD Maus zur Erforschung des autoimmunbedingten Diabetes mellitus konnte demonstriert werden, dass Androgenmangel durch Kastration zu einem Prävalenzanstieg von Diabetes mellitus in männlichen NOD Mäusen führt, die unter normalen Umständen deutlich weniger anfällig für die Entwicklung der Erkrankung sind als weibliche Mäuse (Fitzpatrick et al., 1991).

Ebenso ist die Prävalenz der multiplen Sklerose (MS) deutlich höher beim weiblichen Geschlecht, was weitere Hinweise darauf gibt, dass männliche Sexualhormone einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung dieser Erkrankungen haben (Orton et al., 2006). Im Modell der EAE zur Erforschung der MS konnte der neuroprotektive Effekt von Testosteron bereits gezeigt werden. Weibliche Tiere sind für die Entwicklung einer EAE anfälliger als männliche Tiere, die eine erhöhte Sekretion regulatorischer Zytokine

wie IL-10 aufweisen. Die Behandlung weiblicher Tiere mit Dihydrotestosteron-Pellets führte zur Ausbildung einer deutlich milderen Form der EAE verglichen mit der Placebogruppe und resultierte in einer erhöhten Sekretion von IL-10 in T-Lymphozyten (Dalal et al., 1997; Liva & Voskuhl, 2001). Diese Beobachtungen führten zu dem Ansatz, den regulatorischen Effekt von Testosteron therapeutisch einzusetzen, um den Verlust der hippocampalen Funktion, der im Verlauf der MS zu beobachten ist zu verhindern. Darüber hinaus lassen sich durch Testosteron erfolgreich die klinischen Symptome der ZNS-Entzündung, sowie Demyelinisierungsvorgänge reduzieren (Gold & Voskuhl, 2009; Spence & Voskuhl, 2012; Ziehn et al., 2012).

Für systemischen Lupus Erythematoses, der ebenfalls bevorzugt Frauen befällt, konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung und Schwere der Erkrankung mit der Aktivität des AR korreliert (Olsen et al., 2014). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung einer inhibitorisch wirkenden myeloiden Zellreihe in männlichen Mäusen, die unter Regulation von Testosteron die Zytokinexpression sowie die Differenzierung von B-Zellen hemmt und damit die Entwicklung der *Lupus-like Disease* in männlichen Mäusen reduziert (Trigunaite et al., 2013).

Ähnliche Ergebnisse auf dem Gebiet der Zytokinexpression zeigte eine Studie zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis. Unterstützend zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit beschrieben Xu et al., dass die Behandlung mit Dihydrotestosteron inhibierend auf die IL-6 Expression in einer Synovia Zelllinie wirkt, die durch Mediatoren wie IL-1 α und TNF- α stimuliert wurde (Xu et al., 2011).

5.4.2 Regulatorische Wirkung von Testosteron auf molekularer Ebene

Trotz dieser zahlreichen *in vivo* Studien ist bisher noch wenig über den Wirkmechanismus bekannt, der das immunoregulatorische Potential von Testosteron vermittelt. Strukturell ist der AR vergleichbar mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR), besitzt jedoch durch geringe Unterschiede im Bereich der Bindungsdomäne eine hohe Spezifität für den Liganden was neben der gewebsspezifischen Expression die Wirkung vermittelt (Claessens et al., 2017). Der zytosolische AR ist typischer Weise an ein Hitzeschockprotein gebunden und wird aktiviert durch Bindung von Testosteron oder Dihydrotestosteron was zur Konformitätsänderung und Translokation in den Zellkern führt. Es kommt zur Bindung des AR am Androgenreaktionselement in den Promotorregionen des Gens und zur Anbindung von Co-Faktoren, die die

Transkriptionsrate regulieren (Claessens et al., 2017; Ueda et al., 2002).

Beide Rezeptoren, AR und GR wirken unter anderem über die Transkription der selben anti-apoptotischen Zielgene wie z.B. die Serum und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 oder die MAPK-Phosphatase 1 (Isikbay et al., 2014). Studien zur Erforschung des Prostatakarzinoms lassen vermuten, dass die erworbene Resistenz gegen die AR-gerichtete Therapie unter anderem dadurch entsteht, dass der inhibierte AR durch Aktivierung des GR umgangen wird, was zu einem Anstieg der gemeinsamen Zielgene und zum Tumorwachstum führt (Isikbay et al., 2014). *In vitro* Modelle haben gezeigt, dass es in Prostatakarzinomzelllinien bei Androgenentzug zu einer Mutation im AR kommen kann, so dass dieser Glukokortikoide als Ligand erkennt und es somit auch bei Abwesenheit von Androgenen zu vermehrter Sekretion von PSA und zum Tumorwachstum kommen kann (Zhao et al., 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass durch Phosphorylierung oder die STAT3-abhängige Wirkung von IL-6 in Anwesenheit des Steroid Rezeptor Coaktivators 1 eine ligandunabhängige Aktivierung des AR über den MAPK-Signalweg erfolgt (Chen et al., 2000; Culig, 2014; Ueda et al., 2002). Bisher ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, über welche Signalwege die immunoregulatorische Wirkung des AR vermittelt wird, während die Wirkung von Glukokortikoiden bereits ausführlich beschrieben ist.

Die Bindung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α an dessen Rezeptor führt in der Zielzelle zur Ablösung des Inhibitorproteins I κ B α vom Transkriptionsfaktor NF- κ B, was zur Aktivierung führt und die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine stimuliert (Nelson et al., 2003). Für den GR ist bereits beschrieben, dass durch dessen Aktivierung die Transkription regulatorischer Gene wie I κ B α stimuliert wird, dass jedoch auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GR und der DNA-gebundenen Untereinheit von NF- κ B möglich ist, was die Aktivierung inhibiert (Majdalawieh & Ro, 2010). Durch die folglich fehlende Stimulation der Transkription pro-inflammatorischer Zytokine entsteht unter anderem die regulatorische Wirkung von Glukokortikoiden. Es wäre also denkbar, dass ein ähnlicher Mechanismus aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten der Rezeptoren und der gemeinsamen Zielgene auch für die Wirkung von Androgenen existiert (McKay & Cidlowski, 1999). Das könnte eine Erklärung dafür sein, wie die LPS-stimulierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine in TM nach Testosteronbehandlung reduziert werden kann. Nach Bindung an TLR4 kommt es über den MyD88-abhängigen Signalweg unter anderem zur Aktivierung von NF- κ B und somit zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie

IL-6, die an dieser Stelle durch den AR inhibiert werden könnte. Ein anderer Wirkmechanismus könnte der nicht-genomische Signalweg über die MAPK sein (Leung & Sadar, 2017). Ist der AR durch Ligandbindung transformiert, kann dieser konzentrationsabhängig eine direkte Verbindung mit zytosolischen Substraten eingehen und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Androgene führen zellspezifisch zu einem biphasischen Effekt auf den nicht-genomischen Signalweg des AR: niedrige Androgenen-Konzentrationen (0,1 – 10 nM) führen in Prostatakarzinomzellen zum Tumorwachstum während höhere Konzentrationen (100 nM) das Tumorwachstum inhibieren (Unni et al., 2004). Es wäre also denkbar, dass auch in testikulären Zellen konzentrationsabhängig durch Aktivierung der genomischen Signalkaskade andere Funktionen über den AR vermittelt werden, als über den nicht-genomischen Signalweg. Auch die Wirkung verschiedener Faktoren auf die Expression des AR könnte dabei eine Rolle spielen, diese lässt sich beispielsweise durch IL-6 oder Dihydrotestosteron stimulieren (Blanchere et al., 1998; Culig et al., 2002).

In dieser Arbeit gelang es, inhibitorische Effekte von Testosteron auf die Zytokinexpression von primären TM nachzuweisen. Der Effekt von Testosteron auf die IL-6 Expression in SC wurde bereits 1997 von Stéphan et al. untersucht, die eine stimulatorische Wirkung von geringen Dosen Testosteron (0,01 – 1,0 nM) demonstrierten, welche jedoch bei hohen Dosen (100 nM) ausblieb (Stéphan et al., 1997). Nähere Untersuchungen von TM zu diesem Thema gab es jedoch bisher nicht. In dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass die *in vitro* Behandlung mit 1000 nM Testosteron inhibierend auf die LPS-stimulierte IL-6 mRNA Expression in TM wirkt.

Die reduzierte mRNA Expression von TNF- α wurde bereits im Modell der experimentellen pulmonalen Tuberkulose sowie im EAO Modell mit Testosteron in Verbindung gebracht (Bini et al., 2014; Fijak et al., 2011b), jedoch ohne detaillierten Nachweis der Herkunft dieses Zytokins. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass primäre SC und TM unter inflammatorischen Bedingungen an der mRNA Expression von TNF- α beteiligt sind. Nach Behandlung mit 1000 nM Testosteron war die TNF- α Expression in SC signifikant reduziert, jedoch konnte dieser Effekt nicht durch Flutamid inhibiert werden. Ähnliches ließ sich für die Expression von MCP-1 und IL-10 in TM beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Wirkung von Testosteron über einen nicht-klassischen Signalweg sein, welcher nicht über den

zytosolischen AR vermittelt wird, sondern über einen Plasmamembran-gebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Shihan et al., 2014).

Im EAO Modell wurde auch die mRNA Expression von MCP-1 als wichtiger Faktor zur Rekrutierung von Immunzellen in TM und SC nachgewiesen (Guazzone et al., 2003). Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass die Stimulation mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1 Expression in beiden Zellarten führt. Es konnte demonstriert werden, dass die MCP-1 Expression in TM durch 100 nM und 1000 nM Testosteron signifikant reduziert werden kann. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die EAO-typische Infiltration des Hodengewebes von CCR2⁺ Makrophagen durch Testosteronimplantate verhindert werden kann (Fijak et al., 2011b). In früheren Studien wurde bereits eine erhöhte Expression von IL-10 mit der Wirkung von Testosteron in Verbindung gebracht (Dalal et al., 1997; Liva & Voskuhl, 2001). Die konstitutive IL-10 Expression in ED2⁺ Makrophagen unterstützt diese Beobachtungen (Winnall et al., 2011). Ergänzend hierzu konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Testosteron die LPS-stimulierte Expression von IL-10 in TM signifikant reduziert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die *in vivo* Ergebnisse von Fijak et al. sein, die nach Versorgung von EAO-Ratten mit Testosteronimplantaten eine reduzierte IL-10 Expression im Hoden von EAO Ratten verglichen mit der EAO Kontrollgruppe nachwiesen (Fijak et al., 2011b).

Zusammenfassend gehen aus dieser Arbeit Evidenzen hervor, dass TM und SC an der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α , sowie an der Expression von MCP-1 unter inflammatorischen Bedingungen beteiligt sind. Darüber hinaus exprimieren TM physiologisch und unter stimulierten inflammatorischen Bedingungen IL-10. Ferner wurde gezeigt, dass Testosteron *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-stimulierte IL-10, IL-6 und MCP-1 mRNA Expression in TM hat. Dieser wird zumindest für IL-6 über den klassischen zytosolischen AR vermittelt, da die Wirkung mit Flutamid aufgehoben werden kann, während Testosteron alleine keinen Effekt hat. Auf die stimulierte TNF- α mRNA Expression in SC hat Testosteron einen signifikant inhibierenden Effekt gezeigt. Hier könnte es sich um einen Wirkmechanismus handeln, der unabhängig vom klassischen zytosolischen AR vermittelt wird, da der Effekt nicht mit Flutamid inhibiert werden konnte.

In Anbetracht dieser Beobachtungen kann man davon ausgehen, dass TM und SC an

Diskussion

dem testikulären Zytokinprofil, das im Entzündungsmodell beschrieben wurde (Fijak et al., 2011b), maßgeblich beteiligt sind. Die Reaktion von TM und SC auf Testosteronbehandlung *in vitro* kann als mögliche Erklärung für die reduzierte Zytokinexpression *in vivo* betrachtet werden, wobei der Effekt von Testosteron scheinbar über den klassischen zytosolischen AR und einen alternativen Signalweg vermittelt wird.

5.4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Beteiligung von isolierten TM und SC am testikulären Zytokinprofil unter entzündlichen Bedingungen dargestellt werden. Ein weiterführender Ansatz wäre es, eine kombinierte Behandlung der untersuchten Zellen mit LPS und INF- γ durchzuführen, um die klassische Aktivierung der Makrophagen zu stimulieren oder mit IL-4 für die alternative Aktivierung (Winnall et al., 2011).

Da die untersuchten Zellen jedoch nur einen Teil der immunologisch aktiven Population im Hoden darstellen, sollten weiterführende Studien die Beteiligung von LC, peritubulären oder dendritischen Zellen am testikulären Zytokinprofil untersuchen.

Um den näheren Mechanismus, der für die Wirkung von Testosteron verantwortlich ist, zu verstehen, sollten Studien zur Signaltransduktion klären, über welche Signalwege der Effekt von Testosteron in der Zielzelle vermittelt wird und wie diese beeinflusst werden. An dieser Stelle wäre es interessant, die Wirkung von Testosteron über den Membran-gebundenen Rezeptor oder die ligandunabhängige AR-Aktivierung näher zu erforschen. Auf diese Weise könnten eventuell alternative Behandlungsmöglichkeiten neben dem therapeutischen Ansatz der Androgenbehandlung entwickelt werden, um das Nebenwirkungsprofil von Androgenen für eine effektive Behandlung zu vermeiden.

Basierend auf der Tatsache, dass SC an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt sind (Mital et al., 2010), stellt sich die Frage, wie sich das Zytokinprofil von TM und SC verhält, wenn sie in einer gemeinsamen Kultur behandelt werden. Es wäre denkbar, für die Untersuchungen der Co-Kultur von TM und SC adulte SC zu verwenden, wie es bereits in Studien mit Endothelzellen durchgeführt worden ist (Fan et al., 2011), um das volle immunologische Potential dieser Population zu erfassen.

6 Zusammenfassung

Im Rattenmodell der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) besteht ein Zusammenhang zwischen reduzierter Testosteronkonzentration und gesteigerter inflammatorischer Antwort mit folgender Beeinträchtigung der Spermatogenese. Im Verlauf der EAO wird die Hodenentzündung durch Testosteronsupplementation unterdrückt. Dieser Effekt könnte durch Zunahme der regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) und/oder Reduktion der mRNA Expression pro-inflammatorischer Mediatoren erklärt werden. In dieser Arbeit sollte daher der Effekt von Testosteron auf die inflammatorische Antwort isolierter testikulärer Makrophagen (TM) und Sertoli Zellen (SC) *in vitro* untersucht werden. Die Expression der Zytokine Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und IL-10, sowie des Chemokins *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR auf mRNA Ebene bestimmt, da diese im EAO Modell unter Testosteronsupplementation supprimiert werden. Hierzu wurden die primären TM und SC *in vitro* mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, um eine akute inflammatorische Reaktion auszulösen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit LPS in beiden untersuchten Zellarten zu einem signifikanten Expressionsanstieg aller untersuchten Zytokine sowie des Chemokins MCP-1 führte. TM, die zuvor mit Testosteron behandelt worden waren, zeigten eine deutlich reduzierte Expression von IL-6, MCP-1 und IL-10. In SC war nach Präinkubation mit Testosteron die TNF- α Expression signifikant reduziert, jedoch ließ sich dieses Ergebnis durch den AR-Antagonisten Flutamid nicht inhibieren.

Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Beobachtungen und zeigen, dass das immunoregulatorische Potential, von Testosteron unter anderem durch die Regulation der Zytokinexpression sowie die Regulation chemotaktischer Mediatoren vermittelt wird. Detailliertere Untersuchungen zu der Signaltransduktion oder der Interaktion verschiedener testikulärer Zellarten miteinander könnten weiteren Aufschluss über Immunreaktionen im Hoden liefern, um die Ergebnisse zu therapeutischen oder präventiven Zwecken nutzen zu können.

7 Summary

In the rodent model of chronic testicular inflammation (experimental autoimmune orchitis; EAO) there is a clear correlation between a reduced concentration of testosterone and an augmented immune response followed by an impairment of spermatogenesis. It has been shown that the supplementation of testosterone during EAO suppresses the onset of orchitis. This effect could be explained by the increase of regulatory T cells ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) as well as/or reduced mRNA levels of proinflammatory mediators. Therefore this study concentrated on the effect of testosterone on the inflammatory response of isolated testicular macrophages (TM) and Sertoli Cells (SC) *in vitro*. The expression of the cytokines Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) and IL-10 as well as the chemokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) has been detected by quantitative Real-Time PCR since they have shown to be reduced *in vivo* after testosterone supplementation. Therefore primary TM and SC have been stimulated *in vitro* with lipopolysaccharide (LPS) in order to initiate an acute inflammatory response. It could be demonstrated that the LPS treatment lead to a significant increase of all cytokines of interest as well as the chemokine MCP-1 in both TM and SC. The testosterone treatment lead to lower stimulated expression of IL-6, IL-10 and MCP-1 in TM. In SC we observed a significantly reduced TNF- α expression after pretreatment with testosterone compared to LPS treatment. However this effect was not reversible by blocking the androgen receptor using flutamide.

These results support previous observations to this subject and demonstrate that the immunoregulatory potential of testosterone is at least partly mediated by the regulation of cytokine expression and via the regulation of chemotactic mediators. Detailed investigations concerning the signal transduction or the interaction of testicular cell species could provide further information about the immunological reaction of the testicular tissue under chronic and acute inflammatory conditions, in order to use them for therapeutic or preventive means.

8 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenkonzentration (Volumen/Volumen)
(w/v)	Massenkonzentration (Masse/Volumen)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABP	Androgenbindendes Protein
AP-1	Aktivator Protein 1
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
atü	Technische Atmosphären über Bezugsniveau
bp	Basenpaare
BTB	<i>Blood-Testis Barrier</i> , Blut-Hoden-Schranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EAO	Experimentelle Autoimmunorchitis
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
Fa.	Firma
FasL	Fas Ligand
FKS	Fötale Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Gravitationskonstante
g	Gramm
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible Nitric Oxid Synthase</i>
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LC	Leydig Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
m	Meter
M-MLV	<i>Monoley Murine Leukemia Virus</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
nM	nanomolar
NOD Maus	<i>Non-Obese-Diabetic</i> Maus
PBS	<i>Phospate-Buffered Saline</i>
PC	Peritubuläre Zellen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potentia Hydrogenii (pH-Wert)
pM	picomolar
ra	Rezeptorantagonist
RE	Relative Expression
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Reverse Transkription

Abkürzungsverzeichnis

SC	Sertoli Zellen
sek	Sekunde
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TM	Testikuläre Makrophagen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula Occludens
Δ	Delta = Differenz
ε	Epsilon = Extinktionskoeffizient
λ	Lambda = Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikrometer

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1: INTERSTITIELLES UND TUBULÄRES KOMPARTIMENT IM HODEN	2
ABBILDUNG 2: ZELLEN DES TUBULÄREN KOMPARTIMENTS	12
ABBILDUNG 3: AUFREINIGUNG VON TM	29
ABBILDUNG 4: DIE ISOLIERTEN PRIMÄREN TM WEISEN EINE REINHEIT VON 90% AUF	45
ABBILDUNG 5: β -AKTIN-AMPLIFIKATION BESTÄTIGT DIE VOLLSTÄNDIGE ELIMINIERUNG GENOMISCHER DNA	46
ABBILDUNG 6: β -AKTIN-PCR BESTÄTIGT EINE ERFOLGREICHE REVERSE TRANSKRIPTION	47
ABBILDUNG 7: NACHWEIS VON IL-6, TNF- α UND MCP-1 mRNA EXPRESSION IN TM	49
ABBILDUNG 8: NACHWEIS VON IL-6, TNF- α UND MCP-1 mRNA EXPRESSION IN SC.	51
ABBILDUNG 9: AMPLIFIKATIONSKURVE EINER REAL-TIME PCR ZUR DARSTELLUNG DER C_T -WERTE	52
ABBILDUNG 10: SCHMELZKURVE EINER REAL-TIME PCR	53
ABBILDUNG 11: NACHWEIS DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE FÜR β 2-MIKROGLOBULIN (109BP), IL-6 (128BP), TNF- α (101BP) UND MCP-1 (117BP) IN DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR	54
ABBILDUNG 12: ZEITABHÄNGIGE mRNA EXPRESSION VON MCP-1 UND TNF- α IN LPS-STIMULIERTEN TM UND SC	55
ABBILDUNG 13: TESTOSTERON REDUZIERT DIE EXPRESSION VON IL-6, MCP-1 UND IL-10 IN TM.	57
ABBILDUNG 14: TESTOSTERON INHIBIERT DIE STIMULIERTE TNF- α EXPRESSION IN SC.	59
 TABELLE 1: MAKROPHAGENPOPULATIONEN IM HODEN (NACH WINNALL & HEDGER, 2013)	7
TABELLE 2: VERWENDETE OLIGONUKLEOTID PRIMER	43

10 Literaturverzeichnis

- Airas, L. (2015). Hormonal and gender-related immune changes in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*, 132(199), 62–70. doi:10.1111/ane.12433
- Akira, S., & Hoshino, K. (2003). Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *The Journal of infectious diseases*, 187 Suppl (Suppl 2), S356–63. doi:10.1086/374749
- Alfred Benninghoff, D. D. (2004). *Anatomie. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Urban & Schwarzenberg.
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., & Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 197(12), 1701–7. doi:10.1084/jem.20022156
- Andersson, J., Nagy, S., Björk, L., Abrams, J., Holm, S., & Andersson, U. (1992). Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunological reviews*, 127, 69–96.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W. J., & Talal, N. (1985). Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *The American journal of pathology*, 121(3), 531–51.
- Ar’Rajab, A., Dawidson, I. J., Harris, R. B., & Sentementes, J. T. (1994). Immune privilege of the testis for islet xenotransplantation (rat to mouse). *Cell transplantation*, 3(6), 493–8.
- Aslani, F., & Klug, J. (2016). Correspondence. *Toxicology*, 350-352(April), 62. doi:10.1016/j.tox.2016.04.003
- Aubry, F., Habasque, C., Satie, a P., Jégou, B., & Samson, M. (2000). Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary culture. *Biology of reproduction*, 62(5), 1427–35.
- Baggiolini, M. (1993). Chemotactic and inflammatory cytokines-CXC and CC proteins. *Advances in experimental medicine and biology*, 351, 1–11.
- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625), 1524–5. doi:10.1126/science.1085536
- Bergh, A., Damber, J. E., & van Rooijen, N. (1993). Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *The Journal of endocrinology*, 136(3), 407–13.
- Bhushan, S., Aslani, F., Zhang, Z., Sebastian, T., Elsässer, H.-P., & Klug, J. (2016). Isolation of sertoli cells and peritubular cells from rat testes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (108), e53389. doi:10.3791/53389

- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Lu, Y., Fröhlich, S., Fijak, M., Vijayan, V., ... Meinhardt, A. (2015). Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity. *Journal of immunology*, 194(11), 5455–64. doi:10.4049/jimmunol.1401132
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Klug, J., Fijak, M., Pineau, C., Chakraborty, T., & Meinhardt, A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *Journal of immunology*, 180(8), 5537–5547.
- Bini, E. I., Mata Espinosa, D., Marquina Castillo, B., Barrios Payán, J., Colucci, D., Cruz, A. F., ... Pando, R. H. (2014). The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PloS one*, 9(4), e93831. doi:10.1371/journal.pone.0093831
- Biswas, P., Delfanti, F., Bernasconi, S., Mengozzi, M., Cota, M., Polentarutti, N., ... Poli, G. (1998). Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*, 91(1), 258–65.
- Blanchere, M., Berthaut, I., Portois, M. C., Mestayer, C., & Mowszowicz, I. (1998). Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 66(5-6), 319–26.
- Campese, A. F., Grazioli, P., de Cesaris, P., Riccioli, A., Bellavia, D., Pelullo, M., ... Starace, D. (2014). Mouse Sertoli cells sustain de novo generation of regulatory T cells by triggering the notch pathway through soluble JAGGED1. *Biology of reproduction*, 90(3), 53. doi:10.1095/biolreprod.113.113803
- Cardona, K., Korbitt, G. S., Milas, Z., Lyon, J., Cano, J., Jiang, W., ... Larsen, C. P. (2006). Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nature medicine*, 12(3), 304–6. doi:10.1038/nm1375
- Chen, T., Wang, L. H., Farrar, W. L., Prostate, L., & Cells, C. (2000). Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research*, 60(23), 2132–2135.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*, 1(6), 510–4. doi:10.1038/82763
- Claessens, F., Joniau, S., & Helsen, C. (2017). Comparing the rules of engagement of androgen and glucocorticoid receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 0(0), 1–12. doi:10.1007/s00018-017-2467-3
- Culig, Z. (2014). Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *American journal of clinical and experimental urology*, 2(3), 231–8.

- Culig, Z., Bartsch, G., & Hobisch, A. (2002). Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Molecular and cellular endocrinology*, 197(1-2), 231–8.
- Dalal, M., Kim, S., & Voskuhl, R. R. (1997). Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *Journal of immunology*, 159(1), 3–6.
- Das, D. S., Wadhwa, N., Kunj, N., Sarda, K., Pradhan, B. S., & Majumdar, S. S. (2013). Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/ β -CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis. *PloS one*, 8(5), e63603. doi:10.1371/journal.pone.0063603
- De Cesaris, P., Filippini, A., Cervelli, C., Riccioli, A., Muci, S., Starace, G., ... Ziparo, E. (1992). Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 186(3), 1639–46.
- De, S. K., Chen, H. L., Pace, J. L., Hunt, J. S., Terranova, P. F., & Enders, G. C. (1993). Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology*, 133(1), 389–96. doi:10.1210/endo.133.1.8319585
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313–26. doi:10.1089/jir.2008.0027
- Doncel, G. F., Di Paola, J. A., & Lustig, L. (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.
- Doyle, T. J., Kaur, G., Putrevu, S. M., Dyson, E. L., Dyson, M., McCunniff, W. T., ... Dufour, J. M. (2012). Immunoprotective properties of primary Sertoli cells in mice: potential functional pathways that confer immune privilege. *Biology of reproduction*, 86(1), 1–14. doi:10.1095/biolreprod.110.089425
- Eierman, D. F., Johnson, C. E., & Haskill, J. S. (1989). Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *Journal of immunology*, 142(6), 1970–6.
- Fan, P., He, L., Pu, D., Lv, X., Zhou, W., Sun, Y., & Hu, N. (2011). Testicular Sertoli cells influence the proliferation and immunogenicity of co-cultured endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(3), 829–33. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.068
- Fijak, M., Damm, L.-J., Wenzel, J.-P., Aslani, F., Walecki, M., Wahle, E., ... Meinhardt, A. (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. doi:10.1111/aji.12363

- Fijak, M., Bhushan, S., & Meinhardt, A. (2011a). Immunoprivileged sites: the testis. *Methods in molecular biology*, 677, 459–70. doi:10.1007/978-1-60761-869-0_29
- Fijak, M., Schneider, E., Klug, J., Bhushan, S., Hackstein, H., Schuler, G., ... Meinhardt, A. (2011b). 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. doi:10.4049/jimmunol.1001958
- Fijak, M., & Meinhardt, A. (2006). The testis in immune privilege. *Immunological reviews*, 213, 66–81. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x
- Fijak, M., Iosub, R., Schneider, E., Linder, M., Respondek, K., Klug, J., & Meinhardt, A. (2005). Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. *The Journal of pathology*, 207(2), 127–38. doi:10.1002/path.1828
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review*, 12(115), 6–33.
- Fitzgerald, K. a, Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., ... Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine*, 198(7), 1043–55. doi:10.1084/jem.20031023
- Fitzpatrick, F., Lepault, F., Homo-Delarche, F., Bach, J. F., & Dardenne, M. (1991). Influence of castration, alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology*, 129(3), 1382–90. doi:10.1210/endo-129-3-1382
- Foucault, P., Drosowsky, M. A., & Carreau, S. (1994). Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Human reproduction*, 9(11), 2062–2068.
- Fritz, I. B., Rommerts, F. G., Louis, B. G., & Dorrington, J. H. (1976). Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *Journal of reproduction and fertility*, 46(1), 17–24.
- Gaytan, F., Bellido, C., Aguilar, E., & van Rooijen, N. (1994). Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Journal of reproduction and fertility*, 102(2), 393–9.
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71–82.
- Gerdprasert, O., O'Bryan, M. K., Muir, J. A., Caldwell, A. M., Schlatt, S., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2002a). The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell and tissue research*, 308(2), 277–85. doi:10.1007/s00441-002-0547-6

- Gerdprasert, O., O'Bryan, M. K., Nikolic-paterson, D. J., Sebire, K., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2002b). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Molecular human reproduction*, 8(6), 518–24.
- Gold, S. M., & Voskuhl, R. R. (2009). Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Progress in brain research*, 175(09), 239–51.
doi:10.1016/S0079-6123(09)17516-7
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 9(4), 411–6. doi:10.1006/scdb.1998.0203
- Guazzone, V. A., Jacobo, P., Denduchis, B., & Lustig, L. (2012). Expression of cell adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis. *Reproduction*, 143(5), 651–62. doi:10.1530/REP-11-0079
- Guazzone, V. A., Jacobo, P., Theas, M. S., & Lustig, L. (2009). Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microscopy research and technique*, 72(8), 620–8. doi:10.1002/jemt.20704
- Guazzone, V. A., Rival, C., Denduchis, B., & Lustig, L. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *Journal of reproductive immunology*, 60(2), 143–57.
- Habasque, C. (2003). Expression of fractalkine in the rat testis: molecular cloning of a novel alternative transcript of its gene that is differentially regulated by pro-inflammatory cytokines. *Molecular Human Reproduction*, 9(8), 449–455. doi:10.1093/molehr/gag059
- Hales, D. B. (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2), 3–18.
- Hayes, R., Chalmers, S. A., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C., & Hedger, M. P. (1996). Secretion of bioactive interleukin 1 by rat testicular macrophages in vitro. *Journal of andrology*, 17(1), 41–9.
- Head, J. R., Neaves, W. B., & Billingham, R. E. (1983). Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation*, 36(4), 423–31.
- Hedger, M. P., & Meinhardt, A. (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of reproductive immunology*, 58(1), 1–26.
- Hedger, M. P. (2002). Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2), 19–34.
- Hedger, M. P., & Eddy, E. M. (1986). Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biology of reproduction*, 35(5), 1309–19.

- Hoeben, E., Swinnen, J. V., Heyns, W., & Verhoeven, G. (1999). Heregulins or new differentiation factors and the interactions between peritubular myoid cells and Sertoli cells. *Endocrinology*, 140(5), 2216–23. doi:10.1210/endo.140.5.6712
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4), 279–84. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Hutson, J. C. (1993). Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages. *Journal of reproductive immunology*, 23(1), 63–72.
- Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and tissue research*, 267(2), 385–9.
- Hutson, J. C. (1990). Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biology of reproduction*, 43(5), 885–90.
- Hutson, J. C., & Stocco, D. M. (1989). Comparison of cellular and secreted proteins of macrophages from the testis and peritoneum on two-dimensional polyacrylamide gels: evidence of tissue specific function. *Regional immunology*, 2(4), 249–53.
- Iosub, R., Klug, J., Fijak, M., Schneider, E., Fröhlich, S., Blumbach, K., ... Meinhardt, A. (2006). Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *The Journal of pathology*, 208(5), 686–98. doi:10.1002/path.1938
- Isaac, J. R., Skinner, S., Elliot, R., Salto-Tellez, M., Garkavenko, O., Khoo, A., ... Wang, D. Z. (2005). Transplantation of neonatal porcine islets and sertoli cells into nonimmunosuppressed nonhuman primates. *Transplantation proceedings*, 37(1), 487–8. doi:10.1016/j.transproceed.2004.11.062
- Isikbay, M., Otto, K., Kregel, S., Kach, J., Cai, Y., Vander Griend, D. J., ... Szmulewitz, R. Z. (2014). Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones and Cancer*, 5(2), 72–89. doi:10.1007/s12672-014-0173-2
- Jacobo, P. V., Guazzone, V. A., Jarazo-Dietrich, S., Theas, M. S., & Lustig, L. (2009). Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *Journal of reproductive immunology*, 81(1), 44–54. doi:10.1016/j.jri.2009.04.005
- Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 149, 1–38. doi:10.1007/s10254-003-0012-2
- Kaur, G., Thompson, L. A., & Dufour, J. M. (2014). Sertoli cells - Immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.011

- Kaur, G., Mital, P., & Dufour, J. M. (2013). Testisimmune privilege - Assumptions versus facts. *Animal reproduction*, 10(1), 3–15.
- Keith, R. C., Sokolove, J., Edelman, B. L., Lahey, L., Redente, E. F., Holers, V. M., ... Riches, D. W. H. (2013). Testosterone is protective in the sexually dimorphic development of arthritis and lung disease in SKG mice. *Arthritis and rheumatism*, 65(6), 1487–93. doi:10.1002/art.37943
- Kern, S., & Maddocks, S. (1995). Indomethacin blocks the immunosuppressive activity of rat testicular macrophages cultured in vitro. *Journal of reproductive immunology*, 28(3), 189–201.
- Kern, S., Robertson, S. a, Mau, V. J., & Maddocks, S. (1995). Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of reproduction*, 53(6), 1407–16.
- Le Goffic, R., Mouchel, T., Aubry, F., Patard, J., Ruffault, A., Jégou, B., & Samson, M. (2002). Production of the chemokines monocyte chemotactic protein-1, regulated on activation normal T cell expressed and secreted protein, growth-related oncogene, and interferon-gamma-inducible protein-10 is induced by the Sendai virus in human and rat testis. *Endocrinology*, 143(4), 1434–40. doi:10.1210/endo.143.4.8735
- Lei, Z. M., Mishra, S., Ponnuru, P., Li, X., Yang, Z. W., & Rao, C. V. (2004). Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. *Biology of reproduction*, 71(5), 1605–13. doi:10.1095/biolreprod.104.031161
- Leung, J. K., & Sadar, M. D. (2017). Non-genomic actions of the androgen receptor in prostate cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 8(1), 1–8. doi:10.3389/fendo.2017.00002
- Li, M. W. M., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(4), 329–38. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.07.007
- Li, M. W. M., Xia, W., Mruk, D. D., Wang, C. Q. F., Yan, H. H. N., Siu, M. K. Y., ... Cheng, C. Y. (2006). Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *The Journal of endocrinology*, 190(2), 313–29. doi:10.1677/joe.1.06781
- Lie, P. P. Y., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). Interleukin-1 α is a regulator of the blood-testis barrier. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(4), 1244–53. doi:10.1096/fj.10-169995
- Liu, M.-L., Wang, H., Wang, Z.-R., Zhang, Y.-F., Chen, Y.-Q., Zhu, F.-H., ... Li, Z. (2013). TGF- β 1 regulation of estrogen production in mature rat Leydig cells. *PloS one*, 8(3), e60197. doi:10.1371/journal.pone.0060197

- Liva, S. M., & Voskuhl, R. R. (2001). Testosterone acts directly on CD4⁺ T lymphocytes to increase IL-10 production. *Journal of immunology*, 167(4), 2060–7. doi:10.4049/jimmunol.167.4.2060
- Loss, E. S., Jacobus, A. P., & Wassermann, G. F. (2011). Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes. *Life sciences*, 89(15-16), 577–83. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.017
- Lotter, H., Helk, E., Bernin, H., Jacobs, T., Prehn, C., Adamski, J., ... Tannich, E. (2013). Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN γ secretion in natural killer T cells. *PloS one*, 8(2), e55694. doi:10.1371/journal.pone.0055694
- Luca, G., Arato, I., Mancuso, F., Calvitti, M., Falabella, G., Murdolo, G., ... Calafiore, R. (2016). Xenograft of microencapsulated Sertoli cells restores glucose homeostasis in db/db mice with spontaneous diabetes mellitus. *Xenotransplantation*. doi:10.1111/xen.12274
- Lui, W., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2003). Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis are regulated by RhoB GTPase via the ROCK/LIMK signaling pathway. *Biology of reproduction*, 68(6), 2189–206. doi:10.1095/biolreprod.102.011379
- Lui, W.-Y., & Lee, W. M. (2009). Molecular mechanisms by which hormones and cytokines regulate cell junction dynamics in the testis. *Journal of molecular endocrinology*, 43(2), 43–51. doi:10.1677/JME-08-0174
- Lydka, M., Bilinska, B., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). Tumor necrosis factor α -mediated restructuring of the Sertoli cell barrier in vitro involves matrix metalloprotease 9 (MMP9), membrane-bound intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the actin cytoskeleton. *Spermatogenesis*, 2(4), 294–303. doi:10.4161/spmg.22602
- Majdalawieh, A., & Ro, H. S. (2010). Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2010. doi:10.1155/2010/823821
- Mantovani, A., & Locati, M. (2009). Orchestration of macrophage polarization. *Blood*, 114(15), 3135–6. doi:10.1182/blood-2009-07-231795
- Mazaud-Guittot, S., Meugnier, E., Pesenti, S., Wu, X., Vidal, H., Gow, A., & Le Magueresse-Battistoni, B. (2010). Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biology of reproduction*, 82(1), 202–213. doi:10.1095/biolreprod.109.078907
- McKay, L. I., & Cidlowski, J. a. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Reviews*, 20(4), 435–459. doi:10.1210/edrv.20.4.0375

- Meinhardt, A., & Hedger, M. P. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(1), 60–8. doi:10.1016/j.mce.2010.03.022
- Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C., Bucala, R., Wreford, N., Lan, H., ... Hedger, M. P. (1998). Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of reproduction*, 59(2), 371–8.
- Meinhardt, A., Bacher, M., McFarlane, J. R., Metz, C. N., Seitz, J., Hedger, M. P., ... Bucala, R. (1996). Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Molecular and cellular endocrinology*, 137(11), 5090–5. doi:10.1016/j.mce.2010.03.022
- Melaine, N., Ruffault, A., Dejucq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2003). Experimental inoculation of the adult rat testis with Sendai virus: effect on testicular morphology and leukocyte population. *Human reproduction*, 18(8), 1574–9. doi:10.1093/humrep/deg323
- Meng, J., Greenlee, A. R., Taub, C. J., & Braun, R. E. (2011). Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biology of reproduction*, 85(2), 254–60. doi:10.1095/biolreprod.110.090621
- Miller, S. C., Bowman, B. M., & Rowland, H. G. (1983). Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *The American journal of anatomy*, 168(1), 1–13. doi:10.1002/aja.1001680102
- Mital, P., Kaur, G., & Dufour, J. M. (2010). Immunoprotective sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *Reproduction*, 139(3), 495–504. doi:10.1530/REP-09-0384
- Morrow, C. M. K., Mruk, D., Cheng, C. Y., & Hess, R. a. (2010). Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1546), 1679–96. doi:10.1098/rstb.2010.0025
- Musha, M., Hirai, S., Naito, M., Terayama, H., Qu, N., Hatayama, N., & Itoh, M. (2013). The effects of adjuvants on autoimmune responses against testicular antigens in mice. *The Journal of reproduction and development*, 59(2), 139–44.
- Naito, M., Terayama, H., Hirai, S., Qu, N., Lustig, L., & Itoh, M. (2012). Experimental autoimmune orchitis as a model of immunological male infertility. *Medical molecular morphology*, 45(4), 185–9. doi:10.1007/s00795-012-0587-2
- Nelson, G., Wilde, G. J. C., Spiller, D. G., Kennedy, S. M., Ray, D. W., Sullivan, E., ... White, M. R. H. (2003). NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms. *Journal of cell science*, 116(Pt 12), 2495–2503. doi:10.1242/jcs.00461

- Nes, W. D., Lukyanenko, Y. O., Jia, Z. H., Quideau, S., Howald, W. N., Pratum, T. K., ... Hutson, J. C. (2000). Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology*, 141(3), 953–8. doi:10.1210/endo.141.3.7350
- Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. a. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), 347–69. doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.004
- Nieschlag, E., & Behre, H. (2001). *Andrology*. (E. Nieschlag & H. M. Behre, Hrsg.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-04491-9
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559–82. doi:10.1038/nprot.2006.236
- O'Bryan, M. K., Gerdprasert, O., Nikolic-paterson, D. J., Meinhardt, A., Muir, J. A., Foulds, L. M., ... Nikolic-, D. J. (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), R1744–55. doi:10.1152/ajpregu.00651.2004
- O'Bryan, M. K., Schlatt, S., Phillips, D. J., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2000). Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*, 141(1), 238–46. doi:10.1210/endo.141.1.7240
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., & Johnston, H. (2006). The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *International journal of andrology*, 29(1), 90–5; discussion 105–8. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x
- Okuma, Y., O'Connor, a E., Muir, J. A., Stanton, P. G., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2005). Regulation of activin A and inhibin B secretion by inflammatory mediators in adult rat Sertoli cell cultures. *The Journal of endocrinology*, 187(1), 125–34. doi:10.1677/joe.1.06266
- Olsen, N. J., Benko, A. L., & Kovacs, W. J. (2014). Variation in the androgen receptor gene exon 1 CAG repeat correlates with manifestations of autoimmunity in women with lupus. *Endocrine connections*, 3(2), 99–109. doi:10.1530/EC-14-0039
- Orton, S.-M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V, Sadovnick, A. D., & Ebers, G. C. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet neurology*, 5(11), 932–6. doi:10.1016/S1474-4422(06)70581-6
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E. H., Bugdayci, G., & Duran, A. (2014). Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology*, 83(2), 508.e1–6. doi:10.1016/j.urology.2013.09.027
- Page, R. B., & Stromberg, A. J. (2011). Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *The Scientific World Journal*, 11, 1383–93. doi:10.1100/tsw.2011.124

- Palframan, R. T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., ... von Andrian, U. H. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*, 194(9), 1361–73.
- Pelletier, R.-M., Yoon, S. R., Akpovi, C. D., Silvas, E., & Vitale, M. L. (2009). Defects in the regulatory clearance mechanisms favor the breakdown of self-tolerance during spontaneous autoimmune orchitis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 296(3), R743–62.
doi:10.1152/ajpregu.90751.2008
- Pérez, C. V, Theas, M. S., Jacobo, P. V, Jarazo-Dietrich, S., Guazzone, V. A., & Lustig, L. (2013). Dual role of immune cells in the testis: protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis*, 3(1), e23870. doi:10.4161/spmg.23870
- Pérez, C. V, Sobarzo, C. M., Jacobo, P. V, Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., Denduchis, B., & Lustig, L. (2012). Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biology of reproduction*, 87(5), 122. doi:10.1095/biolreprod.112.101709
- Petersen, C., & Soder, O. (2006). The sertoli cell--a hormonal target and „super“ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone research*, 66(4), 153–61.
doi:10.1159/000094142
- Pöllänen, P., & Maddocks, S. (1988). Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 437–45.
- Rebourcet, D., O’Shaughnessy, P. J., Pitetti, J.-L., Monteiro, A., O’Hara, L., Milne, L., ... Smith, L. B. (2014). Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*, 141(10), 2139–49.
doi:10.1242/dev.107029
- Riccioli, A., Starace, D., Galli, R., Fuso, A., Scarpa, S., Palombi, F., ... Filippini, A. (2006). Sertoli cells initiate testicular innate immune responses through TLR activation. *Journal of immunology*, 177(10), 7122–30.
- Rival, C., Theas, M. S., Suescun, M. O., Jacobo, P. V, Guazzone, V. A., van Rooijen, N., & Lustig, L. (2008). Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *The Journal of pathology*, 215(2), 108–17.
doi:10.1002/path.2328
- Rival, C., Theas, M. S., Guazzone, V. A., & Lustig, L. (2006). Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology*, 70(1-2), 43–58. doi:10.1016/j.jri.2005.10.006
- Rubtsova, K., Marrack, P., & Rubtsov, A. (2015). Sexual dimorphism in autoimmunity. *The Journal of Clinincal Investigation*, 125, 2187–2194. doi:10.1016/S1529-1049(01)00035-6

- Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., ... Sekaly, R.-P. (2010). Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nature medicine*, 16(4), 452–9. doi:10.1038/nm.2106
- Santeford, A., Wiley, L. A., Park, S., Bamba, S., Nakamura, R., Gdoura, A., ... Apte, R. S. (2016). Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy*, 12(10), 1876–1885. doi:10.1080/15548627.2016.1207857
- Schall, T. J., & Bacon, K. B. (1994). Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current opinion in immunology*, 6(6), 865–73.
- Schell, C., Albrecht, M., Mayer, C., Schwarzer, J. U., Frungieri, M. B., & Mayerhofer, A. (2008). Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*, 149(4), 1678–86. doi:10.1210/en.2007-1064
- Schlatt, S., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (1999). Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *Journal of reproduction and fertility*, 116(2), 223–8.
- Schuppe, H.-C., & Meinhardt, A. (2005). Immune privilege and inflammation of the testis. *Chemical immunology and allergy*, 88, 1–14. doi:10.1159/000087816
- Selawry, H. P., & Cameron, D. F. (1993). Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. *Cell transplantation*, 2(2), 123–9.
- Shihan, M., Bulldan, A., & Scheiner-Bobis, G. (2014). Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with Gna11. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(6), 1172–1181. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.03.002
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Science in medicine Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *journal of clinical investigation*, 122(3), 787–795. doi:10.1172/JCI59643DS1
- Sica, A., Wang, J. M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., ... Matsushima, K. (1990). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *Journal of immunology*, 144(8), 3034–8.
- Sirois, M. G., Plante, G. E., Braquet, P., & Sirois, P. (1990). Tumor necrosis factor primes the effects of platelet-activating factor on rat vascular permeability. *Journal of lipid mediators*, 2 Suppl, S109–17.
- Skinner, M. K., Tung, P. S., & Fritz, I. B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *The Journal of cell biology*, 100(6), 1941–7.

- Sozzani, S., Zhou, D., Locati, M., Bernasconi, S., Luini, W., Mantovani, A., & O’Flaherty, J. T. (1996). Stimulating properties of 5-oxo-eicosanoids for human monocytes: synergism with monocyte chemotactic protein-1 and -3. *Journal of immunology*, 157(10), 4664–71.
- Spence, R. D., & Voskuhl, R. R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(1), 105–15. doi:10.1016/j.yfrne.2011.12.001
- Starace, D., Galli, R., Paone, A., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., & Riccioli, A. (2008). Toll-like receptor 3 activation induces antiviral immune responses in mouse sertoli cells. *Biology of reproduction*, 79(4), 766–75. doi:10.1095/biolreprod.108.068619
- Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2013). Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *Journal of immunology*, 191(11), 5515–23. doi:10.4049/jimmunol.1301885
- Stéphan, J. P., Syed, V., & Jégou, B. (1997). Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 134(2), 109–18.
- Suarez-Pinzon, W., Korbitt, G. S., Power, R., Hooton, J., Rajotte, R. V., & Rabinovitch, a. (2000). Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. *Diabetes*, 49(11), 1810–8.
- Suescun, M. O., Calandra, R. S., & Lustig, L. (1994). Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *Journal of andrology*, 15(5), 442–8.
- Suescun, M. O., Rival, C., Theas, M. S., Calandra, R. S., & Lustig, L. (2003). Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biology of reproduction*, 68(6), 2114–21. doi:10.1095/biolreprod.102.011189
- Suh, J. H., Gong, E.-Y., Hong, C. Y., Park, E., Ahn, R. S., Park, K. S., & Lee, K. (2008). Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 112(1-3), 117–21. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.09.003
- Syed, V., Gérard, N., Kaipia, A., Bardin, C. W., Parvinen, M., & Jégou, B. (1993). Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology*, 132(1), 293–9. doi:10.1210/endo.132.1.8380379
- Taguchi, O., & Nishizuka, Y. (1981). Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clinical and experimental immunology*, 46(2), 425–34.
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003

- Terayama, H., Naito, M., Qu, N., Hirai, S., Kitaoka, M., Ogawa, Y., & Itoh, M. (2011). Intratesticular expression of mRNAs of both interferon γ and tumor necrosis factor α is significantly increased in experimental autoimmune orchitis in mice. *The Journal of reproduction and development*, 57(2), 296–302.
- Theas, M. S., Rival, C., Jarazo-Dietrich, S., Jacobo, P., Guazzone, V. a, & Lustig, L. (2008). Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Human reproduction*, 23(8), 1865–72.
doi:10.1093/humrep/den240
- Trigunaite, A., Khan, A., Der, E., Song, A., Varikuti, S., & Jørgensen, T. N. (2013). Gr-1(high) CD11b+ cells suppress B cell differentiation and lupus-like disease in lupus-prone male mice. *Arthritis and rheumatism*, 65(9), 2392–402. doi:10.1002/art.38048
- Tung, K. S. (1995). Elucidation of autoimmune disease mechanism based on testicular and ovarian autoimmune disease models. *Hormone and metabolic research*, 27(12), 539–43. doi:10.1055/s-2007-980021
- Tung, K. S., Teuscher, C., & Meng, A. L. (1981). Autoimmunity to spermatozoa and the testis. *Immunological reviews*, 55, 217–55.
- Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchovsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38087–38094. doi:10.1074/jbc.M203313200
- Unni, E., Sun, S., Nan, B., McPhaul, M. J., Cheskis, B., Mancini, M. A., & Marcelli, M. (2004). Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Research*, 64(19), 7156–7168. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1121
- Walecki, M., Eisel, F., Klug, J., Baal, N., Paradowska-Dogan, A., Wahle, E., ... Fijak, M. (2015). Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells. *Molecular biology of the cell*, 26(15), 2845–57. doi:10.1091/mbc.E14-08-1323
- Wang, J., Wreford, N. G., Lan, H. Y., Atkins, R., & Hedger, M. P. (1994). Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biology of reproduction*, 51(3), 551–61.
- Winnall, W. R., & Hedger, M. P. (2013). Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: A new regulatory model. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(2), 147–158. doi:10.1016/j.jri.2013.01.001
- Winnall, W. R., Muir, J. A., & Hedger, M. P. (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. doi:10.1189/jlb.1010557

- Winnall, W. R., Okuma, Y., Saito, K., Muir, J. a., & Hedger, M. P. (2009). Regulation of interleukin 1alpha, activin and inhibin by lipopolysaccharide in Sertoli cells from prepubertal rats. *Molecular and cellular endocrinology*, 307(1-2), 169–75. doi:10.1016/j.mce.2009.02.007
- Wong, C.-H., Xia, W., Lee, N. P. Y., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2005). Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. *Endocrinology*, 146(3), 1192–204. doi:10.1210/en.2004-1275
- Xu, J., Itoh, Y., Hayashi, H., Takii, T., Miyazawa, K., & Onozaki, K. (2011). Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1 α or tumor necrosis factor α -induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 34(11), 1724–30.
- Yee, J. B., & Hutson, J. C. (1983). Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biology of reproduction*, 29(5), 1319–26.
- Yin, Z. Z., Xie, L., Zeng, M. H., Li, R., Huang, Y. B., Zhu, M., ... Chen, S. (2006). Sertoli Cells Induce Xenolymphocyte Apoptosis In Vitro. *Transplantation Proceedings*, 38(10), 3309–3311. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.126
- Yrlid, U., Jenkins, C. D., & MacPherson, G. G. (2006). Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *Journal of immunology*, 176(7), 4155–62. doi:10.4049/jimmunol.176.7.4155
- Yule, T. D., & Tung, K. S. (1993). Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology*, 133(3), 1098–107. doi:10.1210/endo.133.3.8103448
- Zhang, X., Wang, T., Deng, T., Xiong, W., Lui, P., Li, N., ... Han, D. (2013). Damaged spermatogenic cells induce inflammatory gene expression in mouse Sertoli cells through the activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Molecular and cellular endocrinology*, 365(2), 162–73. doi:10.1016/j.mce.2012.10.016
- Zhao, X. Y., Malloy, P. J., Krishnan, a V, Swami, S., Navone, N. M., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nature medicine*, 6(6), 703–706. doi:10.1038/76287
- Zhu, Y., Yao, S., Augustine, M. M., Xu, H., Wang, J., Sun, J., ... Chen, L. (2016). Neuron-specific SALM5 limits inflammation in the CNS via its interaction with HVEM. *Science Advances*, 2(April), 1–9. doi:10.1126/sciadv.1500637

- Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Dervin, S. M., Umeda, E. A., O'Dell, T. J., & Voskuhl, R. R. (2012). Therapeutic testosterone administration preserves excitatory synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *The Journal of neuroscience*, 32(36), 12312–24. doi:10.1523/JNEUROSCI.2796-12.2012
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36(5), 705–16. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.008

11 Publikationsverzeichnis

- Fijak, M., Damm, L.-J., Wenzel, J.-P., Aslani, F., Walecki, M., Wahle, E., ... Meinhardt, A. (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. doi:10.1111/aji.12363
- Szurman, P., Januschowski, K., Rickmann, A., Damm, L.-J., Boden, K. T., & Opitz, N. (2016). Novel liquid bubble dissection technique for DMEK lenticule preparation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(9), 1819–1823. doi:10.1007/s00417-016-3377-z
- Rickmann, A., Opitz, N., Surman, P., Boden, K. T., Jung, S., Wahl, S., ... Januschowski, K. (2017). Clinical comparison of two methods of graft preparation in descemet membrane endothelial keratoplasty. *Current Eye Research*, 1–6. doi:10.1080/02713683.2017.1368086

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ein großer Dank gilt Monika Fijak und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Meinhardt sowie meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.