

AUS DER ANATOMISCHEN ANSTALT  
LEHRSTUHL FÜR ZELLBIOLOGIE  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
VORSTAND: PROF. DR. DR. ULRICH WELSCH

**Steuerung humaner testikulärer peritubulärer Zellen durch  $\text{TNF}\alpha$   
und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $\text{J}_2$**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Christoph Bernhard Johannes Schell  
aus Freilassing

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer  
**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

**Mitberichterstatter:** Priv. Doz. Dr. Heike Künzel  
Priv. Doz. Dr. Michael Staehler

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** PD Dr. hum. biol. Martin Albrecht

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

**Tag der mündlichen Prüfung:** 12.01.2012

<b>Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen:</b>	<b>3</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>I.1. Morphologie und Funktion des Hodens</b>	<b>4</b>
I.1.1. Kompartimente des Hodens	4
I.1.2. Die peritubuläre Region – Struktur und Funktion	5
I.1.3. Die peritubuläre Region und Veränderungen im Rahmen eingeschränkter Spermato-genese	7
<b>I.2. Parakrine Faktoren – Regulation der peritubulären Zelle</b>	<b>10</b>
I.2.1. Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	10
I.2.2. COX-2 und Prostaglandine	13
<b>I.3. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>II. 1. Herstellerverzeichnis</b>	<b>18</b>
<b>II.2. Verwendete Lösungen</b>	<b>18</b>
II.2.1. Verwendete Medien und Stimulantien	20
<b>II.3. Isolation und Kultivierung von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs)</b>	<b>20</b>
II.3.1. Isolation von HTPCs aus humanen Hodenbiopsien	20
II.3.2. Kulturbedingungen von HTPCs	21
<b>II.4. Zellbiologie</b>	<b>22</b>
II.4.1. MTS – Assays	22
II.4.2. CASY – automatische Zellzählung und Volumenbestimmungen	23
<b>II.5. Immunhistochemie</b>	<b>24</b>
<b>I.6. Immunzytochemie</b>	<b>25</b>
<b>II.7. Westernblot – Experimente</b>	<b>26</b>
II.7.1. Proteinpräparation	26
II.7.2. SDS-PAGE Gelelektrophorese	26
II.7.3. Transferblotting und Antikörperinkubation	27
II.7.4. ECL-Detektion und semiquantitative Auswertung	28
<b>II.8. Molekularbiologie</b>	<b>28</b>
II.8.1. RNA-Isolation	28
II.8.2. Reverse Transkription	29
II.8.3. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	29
II.8.3.1. Semiquantitative PCR	32
II.8.4. Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung	32
<b>II.9. Calcium-Imaging</b>	<b>33</b>
<b>II.10. Gelatine-Zymographie</b>	<b>34</b>
<b>II.11. ELISAs (Enzyme linked immunoabsorbent assays)</b>	<b>35</b>
II.11.1. Nerve growth factor-beta - ELISA	35
II.11.2. Macrophage chemoattractant protein – 1 (MCP-1) ELISA	36
<b>II.12. cDNA-Array</b>	<b>36</b>
<b>II.13. Morphologische Untersuchungen (Semidünnschnitte)</b>	<b>37</b>
<b>II.14. Kollagen-Gel-Kontraktionsassay</b>	<b>38</b>
<b>II.15. Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)</b>	<b>39</b>
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>40</b>

<b>III.1. HTPCs als mögliche Zielzellen für TNF<math>\alpha</math></b>	<b>40</b>
III.1.1. Molekularbiologische Charakterisierung der TNF-Rezeptoren	40
III.1.2. Nachweis von TNF $\alpha$ – Rezeptoren mittels Immunfluoreszenz	40
III.1.3. Funktionalität der TNF $\alpha$ – Rezeptoren	41
<b>III.2. Einfluß von TNF<math>\alpha</math> auf die Regulation der Extrazellulären Matrix (ECM)</b>	<b>43</b>
III.2.1. ECM-Genarray unter TNF $\alpha$ Stimulation	43
III.2.2. Keine Regulation von MMP-2 und TIMP-1 unter TNF $\alpha$	45
III.2.3. Beeinflussung von MMP-2 Aktivität durch TNF $\alpha$	46
<b>III.3. Einfluß von TNF<math>\alpha</math> auf das Proliferationsverhalten von HTPCs</b>	<b>47</b>
III.3.1. Minderung der metabolischen Aktivität unter TNF $\alpha$	47
III.3.2. Morphologische Untersuchung und Zytotoxizität von TNF $\alpha$	48
<b>III.4. Einfluß von TNF<math>\alpha</math> auf die Expression inflammatorischer Marker in HTPCs</b>	<b>49</b>
III.4.1. Regulation des Macrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP1)	49
III.4.2. Bildung von MCP-1	50
III.4.2. Regulation von COX-2	51
III.4.3. Induktion von "Intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1) durch TNF $\alpha$	53
<b>III.5. Modulation der Nerve growth factor (NGF) Produktion in HTPCs durch TNF<math>\alpha</math></b>	<b>54</b>
III.5.1. NGF Expression und Regulation durch TNF $\alpha$	54
III.5.2. NGF Sekretion	55
<b>III.6. Effekte von 15-deoxy-<math>\Delta^{12,14}</math>-Prostaglandin J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) auf den Phänotyp von HTPCs</b>	<b>56</b>
III.6.1. 15dPGJ <sub>2</sub> induziert Hypertrophie in HTPCs	56
III.6.2. Hypertrophie wird von einer Zunahme metabolischer Aktivität begleitet	58
III.6.3. Hypertrophische Veränderungen gehen mit Verlust glattmuskulärer Marker einher	59
III.6.4. Immunhistochemischer Nachweis selektiven Verlusts glattmuskulärer Marker in testikulären Pathologien	60
III.6.4. Dedifferenzierung resultiert in einem funktionellen Verlust von Kontraktionsfähigkeit in Kollagen-Gel-Kontraktionsassays	61
III.6.5. 15dPGJ <sub>2</sub> induziert ROS in HTPCs – mögliche Implikation in Signaltransduktion von HTPCs	62
III.6.6. Inhibition von ROS mittels N-Acetylcystein und Effekte auf Zellvolumen und Kontraktilität von HTPCs	63
<b>IV. Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>IV.1. TNF-Rezeptoren und Funktionalität in HTPCs</b>	<b>65</b>
IV.1.2. TNF $\alpha$ , fibrotische Prozesse und männliche Infertilität	66
IV.1.3. Pro-inflammatorische Reaktion von HTPC's auf TNF $\alpha$ Stimulation	67
IV.1.4. Mögliches pathogenetisches Konzept von TNF $\alpha$ Wirkung auf HTPCs	72
<b>IV. 2. Effekte von 15-deoxy-<math>\Delta^{12,14}</math>-PG J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) in HTPCs</b>	<b>73</b>
IV.2.1 15dPGJ <sub>2</sub> moduliert phänotypische Plastizität in HTPCs	73
IV.2.2. Phänotypische Dedifferenzierung und Verlust kontraktile Eigenschaften	76
IV.2.3. Signaltransduktion und mögliche therapeutische Implikationen für die männliche Fertilität	77
<b>V. Zusammenfassung:</b>	<b>84</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>VII. Danksagung:</b>	<b>95</b>

**Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen:**

15dPGJ2		15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin-J <sub>2</sub>
CD90		Thy-1 T-Zell Antigen
COX-2		Cyclooxygenase Typ 2
DNA	Desoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EAO		Experimentell-induzierte autoimmune Orchitis
ECM	Extracellular matrix	Extrazellulärmatrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymimmunassay
HTPCs		Humane testikuläre peritubuläre Zellen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule- 1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein-1	
MCs	Mast cells	Mastzellen
MMP-2		Matrix-Metalloproteinase Typ 2
MPs	Macrophages	Makrophagen
MYH-11	Smooth muscle myosin heavy chain	Glattmuskuläres Myosin, Schwerer Kettenanteil
NGF	Nerve growth factor	Nervenwachstumsfaktor
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
ROS	Reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse transcription	Reverse Transkription
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Natrium-Dodecylsulfat
SMA	Smooth muscle actin	Glattmuskuläres Actin
TIMP-1	Tissue-Inhibitor of Metalloproteinase	Gewebshinhibitor von Metalloproteinase Typ 1
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$	Tumornekrose Faktor $\alpha$

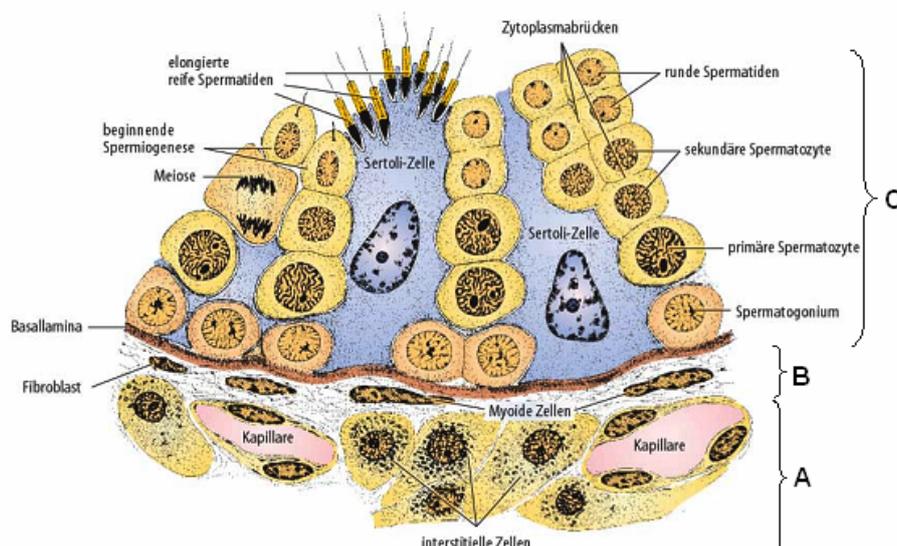
## I. Einleitung

Im Fokus dieser Arbeit steht die Charakterisierung eines erst kürzlich etablierten zellulären Modells humaner testikulärer peritubulärer Zellen (HTPCs). Anhand der Untersuchung zweier Signalmoleküle (TNF $\alpha$  und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin-J<sub>2</sub>) sollten mögliche Anhaltspunkte zu physiologischen wie pathologischen Funktionen dieses Zelltypus gewonnen werden. Zum besseren Verständnis folgt eine kurze Übersicht zur Anatomie des Hodens, seiner zellulären Komponenten und im Besonderen eine Beschreibung der testikulären peritubulären Zelle.

### I.1. Morphologie und Funktion des Hodens

#### I.1.1. Kompartimente des Hodens

Der männliche Hoden erfüllt in allen Säugetierspezies zwei wesentliche, miteinander verknüpfte Funktionen: einerseits die Produktion von Androgenen (Testosteron und Dihydrotestosteron) und andererseits die Spermatogenese. Diese beiden Prozesse erfolgen in unterschiedlichen Kompartimenten, die strukturell streng voneinander getrennt, funktionell aber über zahlreiche parakrine Signalwege verbunden sind [1-3]. Man unterscheidet in der histologischen Feinarchitektur des Hodens ein interstitielles Kompartiment, das im Wesentlichen von steroidogenen Leydigzellen bevölkert wird und das Kompartiment der Tubuli seminiferii. Dieses zweite Kompartiment ist Ort der Spermatogenese und setzt sich strukturell aus einer äußeren peritubulären Region, gefolgt von einem inneren Segment, bestehend aus Sertolizellen, Spermatozyten und -gonien zusammen. Da sich diese Arbeit zum Ziel gesetzt hat Regulation, Differenzierungspotenzial und sekretorisches Profil humaner testikulärer peritubulärer Zellen zu untersuchen, folgt im Weiteren eine detaillierte Beschreibung dieses Zelltypus.



### **Abbildung 1: Schematische Darstellung testikulärer Kompartimente**

Buchstabe A bezeichnet das interstitielle Kompartiment, das hauptsächlich aus Leydigzellen und Gefäßen besteht. B und C werden insgesamt als Tubuli seminiferii beschrieben, wobei B die peritubuläre Region mit myoiden Zellen und Fibroblasten bezeichnet (auch als Lamina propria benannt). In C schließlich finden sich Sertolizellen und Spermatogonien bzw. sämtliche Reifestufen der Spermatozyten. (Modifiziert nach Junqueira et al, 2004)

#### **I.1.2. Die peritubuläre Region – Struktur und Funktion**

In den üblicherweise als Modellorganismen verwendeten Nagerspezies lässt sich eine im Vergleich zum Menschen sehr gering ausgebildete peritubuläre Region beobachten, die lediglich aus einer Lage zirkulär angeordneter Myofibroblasten besteht. Im humanen Hoden hingegen findet sich eine 5-7 schichtige peritubuläre Region, wobei die inneren 3-4 Lagen aus Desmin und Vimentin exprimierenden glattmuskulären Zellen, die äußeren Schichten lediglich durch Vimentin positive Fibroblasten gekennzeichnet sein sollen [4, 5]. Zum Lumen der Tubuli seminiferi hin -unabhängig von den erwähnten Speziesunterschieden- bildet das peritubuläre Kompartiment mit seiner Basalmembran wiederum die Anhaftungszone und basale Begrenzung für Sertolizellen, die sowohl die Blut-Hoden Schranke ausbilden als auch für die Nährstoffversorgung der Spermatogonien unerlässlich sind.

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und unter Verwendung spezifischer Antikörper konnten durch Nachweis bestimmter Strukturproteine phänotypische Charakteristika der peritubulären Zellen (PC) genauer identifiziert werden. Mit als Erstes fand sich in diesen Untersuchungen *Desmin*, ein für Muskeln typisches Intermediärfilament, das wesentliche strukturelle Funktion im Zytoskelett erfüllt, indem es Z-Scheiben verbindet und Myofibrillen zu Bündeln formiert [6]. Der Nachweis weiterer, typischer Glattmuskel-Proteine wie *smooth-muscle-actin* (SMA) und *Vimentin* verdeutlicht [7, 8], dass die peritubuläre Region zu großen Teilen aus glatten Muskelzellen bzw. Myofibroblasten gebildet wird. Beruhend auf diesen phänotypischen Charakteristika könnte eine mögliche Funktion dieses Zelltypus die Erzeugung propulsiver Wellen sein. Diese wiederum dienen der Transportbewegung noch immotiler Spermatozyten, vom Ort ihrer Entstehung (Tubuli seminiferii) zum Rete testis [9].

Neben diesen eindeutig glattmuskulären Eigenschaften zeigen PCs jedoch auch synthetische Aktivität, da sie beispielsweise Collagen IV, Fibronectin und weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) sezernieren [10].

Die Bedeutung der ECM liegt darin begründet, dass sie einerseits Struktur, Funktion und Integrität anatomischer Kompartimente gewährleistet, dabei einem ständigem Umbau und externer Regulation unterworfen ist, und andererseits eine pathologische Zusammensetzung (wie beispielsweise im Rahmen fibrotischer Veränderungen) zu einer generellen Dysfunktion führen kann [11]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die synthetische

Funktion der PCs, also die Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) Bestandteile, durch die räumlich benachbarte Sertolizelle mitbeeinflusst wird und wiederum reziprok auf die Funktion der Sertolizellen zurückwirkt [12]. Dies soll als Beispiel dafür dienen, dass Produktion und Zusammensetzung der ECM eine wichtige Rolle in der parakrinen Kommunikation innerhalb der Tubuli seminiferii spielt.

Neben den bereits erwähnten strukturellen Funktionen besitzen PCs jedoch auch sekretorische Eigenschaften. Mitunter als erster Faktor wurde hierbei PmodS (peritubular factor modifying sertoli cells) in peritubulären Zellen der Ratte postuliert [13], wobei viele weitere folgten (siehe Tabelle 1). Anzumerken ist hierbei, dass der Großteil der neu beschriebenen, sekretorischen Faktoren im Wesentlichen an Tiermodellen festgestellt wurden (v.a. Nagerspezies). Eine direkte Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation im humanen testikulären Milieu ist daher nicht ohne weiteres möglich und bedarf sicherlich weiterer experimenteller Klärung.

Unabhängig davon hat die Identifikation sekretorischer Produkte durch PCs Hinweise dafür geliefert, dass diese Zellpopulation in die parakrine Regulation des testikulären Milieus eingebunden ist.

**Tabelle 1: Sekretorische Produkte peritubulärer Zellen und ihrer vermuteten Funktionen**

Produkte	Spezies	Vermutete Funktion	Quelle
Activin-A	Ratte	Sertolizellregulation	de Winter et al, 1994
Adrenomedullin	Ratte	Kontraktilität	Marinoni et al, 2005
Erythropoetin	Ratte	Leydigzellregulation	Magnanti et al, 2001
IGF-1	Ratte	Leydig/Sertolizellen	Cailleau et al, 1990
LIF	Ratte	Spermatogenese	Piquet-Pellorce et al, 2000
Neurotrophin 3	Ratte	Morphogenese	Russo et al, 1999
Neurotrophin 4	Human	Morphogenese	Robinson et al, 2003
PAI-1	Ratte	Spermatogenese	Hettle et al, 1988
PmodS	Ratte	Sertolizellregulation	Skinner et al, 1985
TGFbeta2	Ratte	Sertolizellregulation	Konrad et al, 2000

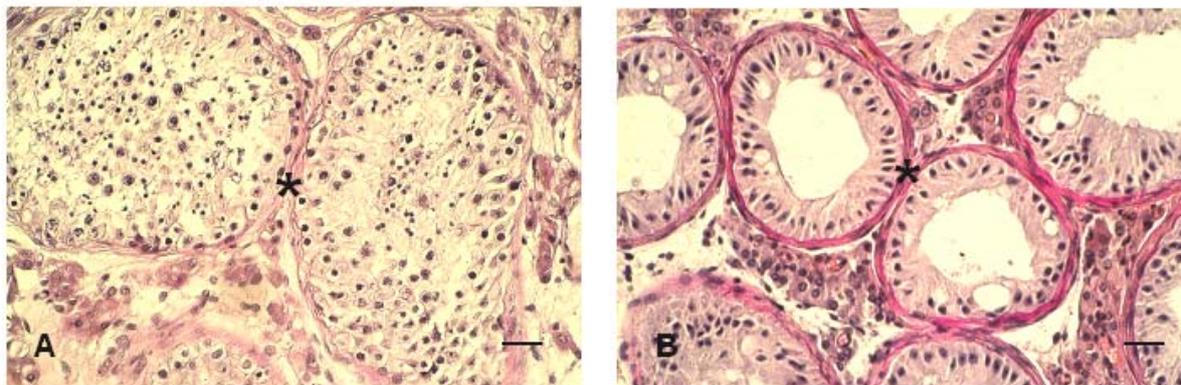
*verwendete Abkürzungen: IGF-1=Insulin like growth factor 1; LIF=Leukemia inhibitory factor; PAI-1=Plasminogen activator inhibitor 1; PmodS=Peritubular factor modifying Sertoli cells; TGFbeta2=Transforming growth factor beta 2*

Der Nachweis verschiedener Rezeptorsysteme verdeutlicht zudem, dass PCs auch Zielzellen im parakrinen Kommunikationsnetzwerk des Hodens sind. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Androgenrezeptor zu [14], aber auch weitere Rezeptoren für Vasopressin, Adrenomedullin und Interleukin-1 konnten auf PCs nachgewiesen werden [15-17].

Zusammenfassend lässt sich somit der Phänotyp der peritubulären Zelle als Myofibroblast beschreiben, mit vornehmlich drei Hauptaufgaben: 1.) einer rein strukturellen Funktion wie der Synthese von ECM-Bestandteilen und der Bildung der Lamina propria der Tubuli seminiferii, 2.) einer mechanischen Funktion durch Kontraktion und damit verbundener Propulsion immobiler Spermatozyten und letztlich 3.) der Regulation verschiedener physiologischer, testikulärer Prozesse durch Sekretion zahlreicher Signalmoleküle.

### **I.1.3. Die peritubuläre Region und Veränderungen im Rahmen eingeschränkter Spermatogenese**

Schon 1990 werden von Davidoff et al in einer histologischen Studie pathologische Veränderungen in der peritubulären Region in Fällen gestörter Spermatogenese beschrieben. Dieser zunächst lediglich als „Verdickung“ bezeichnete Prozess zeichnet sich durch Ablagerung von Extrazellulärmatrix zwischen den einzelnen Lagen der peritubulären Zellen aus [4]. Die Organisation und Lokalisation typischer Proteine der Basalmembran wie Collagen IV, Fibronectin oder Laminin ist dabei nicht verändert. Davidoff machte jedoch die Beobachtung, dass die typischerweise *Desmin* positiven Myozyten an Zahl abnehmen und führte dies darauf zurück, dass ein phänotypischer Wandel der eigentlich kontraktile Myozyten hin zu rein synthetischen Fibroblasten erfolgt. Der Begriff einer sogenannten „peritubulären Sklerose“ oder auch „peritubulären Fibrose“ wird erstmals von Santamaria et al in einer Untersuchung an Hodenbiopsaten von Patienten mit Varikozele verwendet. In der erwähnten Untersuchung zeigt sich, ähnlich zu den Befunden von Davidoff, eine Abnahme der Desminexpression und im Gegenzug eine vermehrte Expression von Vimentin im peritubulären Kompartiment. Zudem finden sich irregulär begrenzte Kerne und ausgedünnte Mikrofilamente [18]. Fast identische Befunde konnte die gleiche Arbeitsgruppe in der Folge auch in Hoden von Klinefelter Patienten erheben [8]. Letztlich werden phänotypische Veränderungen der PCs (wie oben beschrieben) auch in Fällen von Altersatrophie [19] und im Rahmen männlicher, idiopathischer Infertilität beobachtet [20-22]. Gemeinsam ist all diesen Prozessen eine Beeinträchtigung der Spermatogenese und so kann Haider et al in einer ultrastrukturellen Untersuchung an Hodenbiopsien infertiler Patienten weitere Veränderungen in der Morphologie der PCs beschreiben [23]. Dabei wird beobachtet, dass es zu Vakuolisierung des Zellkerns, Phagolysosomenbildung und Anhäufung von Lipidtröpfchen in den peritubulären Zellen kommt.



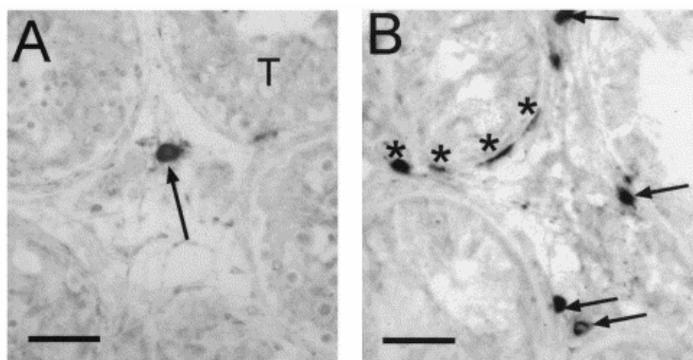
**Abbildung 2: Fibrose der peritubulären Region im Hoden eines infertilen Patienten (Abbildung A – fertiler Patient; Abbildung B – Sertoli-Cell-Only Syndrom)**

Abbildung A und B zeigen histologische Präparate humaner Hodenbiopsie (Färbung nach van Gieson - diese Färbung macht vor allem Bestandteile des Bindegewebes gut sichtbar). In Abbildung A wurde eine Hodenbiopsie eines fertilen Patienten gefärbt; das mit einem Stern gekennzeichnete Areal entspricht dabei der peritubulären Region. Abbildung B zeigt die Biopsie eines infertilen Patienten, der an dem Sertoli-Cell-Only Syndrom (SCO) leidet. In B fällt die markante Färbung der peritubulären Region (wieder durch einen Stern markiert) auf, die eine verstärkte Ablagerung von bindegewebigen Material anzeigt. Im Vergleich beider Biopsien ist auch erkenntlich, dass die peritubuläre Region in B wesentlich stärker ausgeprägt und verdickt ist. Dieses pathologische Bild wird als „peritubuläre Sklerose/Fibrose“ bezeichnet.

Bisher ungeklärt ist die pathophysiologische Signifikanz der beobachteten fibrotischen Veränderungen im Bereich der peritubulären Region. Speziell die Frage, ob und inwieweit Fibrose kausal für eingeschränkte bzw. gestörte Spermatogenese und damit verbundener Sub-/Infertilität verantwortlich ist, bleibt bislang unbeantwortet. Zudem kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage darüber getroffen werden, in welchem chronologischen Zusammenhang die erwähnten Veränderungen zur klinisch beobachtbaren Sub-/Infertilität stehen, d.h. ob die Fibrose der peritubulären Region lediglich ein Endpunkt im pathologischen Prozess gestörter Spermatogenese darstellt, oder aber fibrotische Veränderung als auslösende Ursache identifiziert werden könnten.

Neben der auffälligen peritubulären Fibrose findet sich zudem in vielen Fällen männlicher Infertilität eine Akkumulation von Immunzellen [24]. Vor allem eine Zunahme an testikulären Mastzellen, sowohl im Interstitium als auch in der Lamina propria, wird von vielen Autoren beschrieben [20, 21, 25-27]. In einer neueren Studie belegt Hussein et al schließlich, dass in der Gesamtheit verschiedenster Subtypen männlicher Infertilität (Sertoli-Cell-Only Syndrom, Germ Cell Arrest, unspezifische Veränderungen der Spermatogenese) jeweils vermehrt Immunzellen in Interstitium und peritubulärer Region beobachtet werden können. So finden

sich in dieser und weiteren Untersuchungen Zunahmen an T und B-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen [24, 28].



**Abbildung 3: Mastzellakkumulationen in Hodenbiopsaten infertiler Patienten.**

In Abbildung A (Hoden eines fertilen Patienten) finden sich nur wenige Tryptase-positive MCs (mit einem Pfeil markiert). Im Gegensatz dazu weisen Biopsate infertiler Patienten, Abbildung

B, Mastzellakkumulationen sowohl im Interstitium (Pfeilspitzen) als auch in der peritubulären Region (Sterne) auf. (Meineke, 2002)

Diese Befunde führen zur Hypothese, dass Mastzellen und/oder Makrophagen durch sekretorische Produkte das testikuläre Milieu indirekt bzw. PCs direkt so beeinflussen könnten, dass diese vermehrt proliferieren und synthetisch aktiv werden. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Mastzellakkumulation und fibrotischen Prozessen sind für zahlreiche Pathologien verschiedener Organe bekannt, so zum Beispiel in Fällen von rheumatoider Arthritis [29], chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen [30, 31], chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [32, 33] und Formen der Glomerulonephritis [34].

Vor allem das Mastzellprodukte Tryptase, eine Trypsin-ähnliche Serin Protease, steht im Verdacht durch Aktivierung des PAR-2 Rezeptors (Proteinase-aktivierter Rezeptor), und über Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) proliferativ zu wirken [28, 35]. Ein weiterer Befund in Hoden infertiler Männer, nämlich der Nachweis einer COX-2 Expression im interstitiellen Kompartiment, weist auch speziell dem Arachidonsäuremetabolismus und damit den Prostaglandinen eine essentielle Bedeutung in dieser Pathologie zu [28].

Neben der erwähnten Tryptase, besitzen Mastzellen ein Arsenal weiterer Botenstoffe und Zytokine, die in verschiedenen Phasen ihrer Aktivierung freigesetzt werden können. Eines dieser Zytokine ist TNF $\alpha$ , das neben Mastzellen auch Makrophagen produzieren und synthetisieren können. Im Fokus dieser Arbeit stand - unter Bezugnahme auf die Hypothese einer Induktion fibrotischer Prozesse durch sezernierte Signalmoleküle - das Zytokin TNF $\alpha$  und die Gruppe der Prostaglandine, speziell Prostaglandin D<sub>2</sub> bzw. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>. Daher werden im Folgenden diese beiden Signalmoleküle vor allem in Hinblick auf ihre testikuläre Funktion unter physiologischen und pathologischen Zuständen dargestellt.

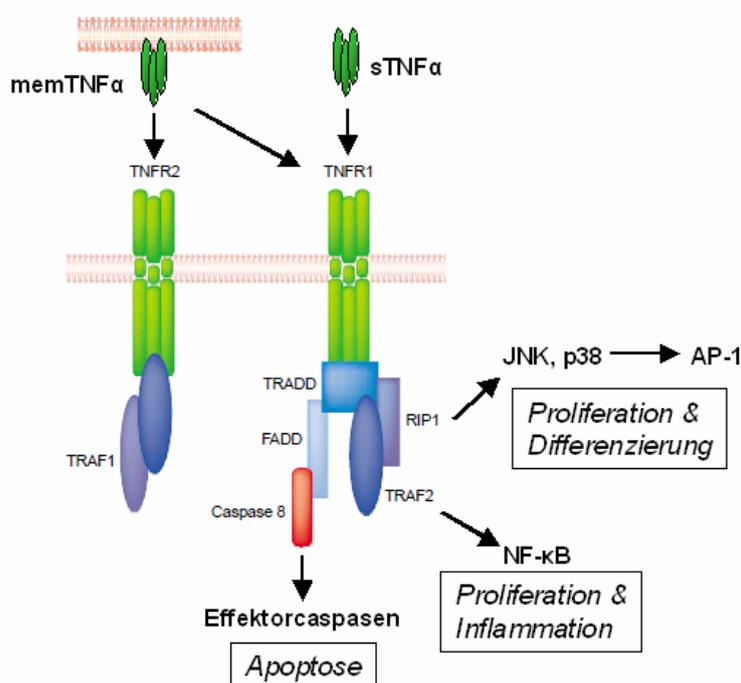
## **I.2. Parakrine Faktoren – Regulation der peritubulären Zelle**

### **I.2.1. Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

#### **I.2.1.1. Molekülstruktur, Quellen und Rezeptoren**

TNF $\alpha$  wird erstmals vor ungefähr 30 Jahren im Zusammenhang mit seinen cytotoxischen Eigenschaften gegenüber Tumoren in Mausmodellen und Krebslinien in vitro erwähnt. 1984 wird schließlich die cDNA von TNF $\alpha$  kloniert und die strukturelle Homologie zu Lymphotoxin erkannt (in der Folge wird dieses als TNF $\beta$  bezeichnet – [36]). TNF $\alpha$  ist Mitglied der TNF „superfamily“, einer großen Gruppe verwandter Zytokine, die in 15-25% ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen. Diese Superfamilie von Zytokinen besitzt ein ebenso großes, wie differenziertes Wirkungsspektrum: mit am Bekanntesten ist im Zusammenhang mit der Wirkung von TNF $\alpha$  die Induktion von Apoptose und die Regulation inflammatorischer Prozesse. Darüberhinaus steuern Mitglieder der TNF Superfamilie weitere essentielle zelluläre Funktionen wie Proliferation und Differenzierung [36]. TNF $\alpha$  wird hauptsächlich in einer membrangebundenen Form (memTNF) produziert und besteht aus drei jeweils 17 kDA großen Protomeren, die aus 2 antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen zusammengesetzt sind. Neben der membrangebundenen Form existiert noch eine 51 kDA große, lösliche TNF $\alpha$  Variante (sTNF), die durch proteolytische Spaltung mittels der Metalloproteinase TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) von der Zytoplasmamembran abgetrennt wird. Beide Formen, also memTNF und sTNF, können beide TNF Rezeptoren (TNFR-1 und TNFR-2) aktivieren [37]. Zahlreiche Zellen sind in der Lage TNF $\alpha$  zu produzieren und zu sezernieren, darunter sind sowohl Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen, aber auch Strukturzellen wie Fibroblasten und Keratinozyten [38].

Entsprechend der TNF-Superfamilie existiert auch eine TNF-Rezeptor-Superfamilie, wobei für die Bindung und Signaltransduktion von TNF $\alpha$  lediglich TNFR-1 und TNFR-2 maßgeblich sind. Die zytoplasmatische Domäne beider TNF Rezeptoren besitzt keinerlei enzymatische Aktivität und zeichnet sich durch Proteinbindungsdomänen aus: entweder der death domain (Todesdomäne) oder der TRAF Domäne (TNF-receptor associated factor). Kommt es durch Bindung von TNF $\alpha$  zur Aktivierung der Rezeptoren binden zytoplasmatisch verschiedene Signalmediatoren (siehe Abbildung), deren Interaktionen maßgeblich am Effekt der Rezeptoraktivierung beteiligt sind. Zwei wesentliche Proteine in dieser Signalkaskade sind FADD (Fas-associated death domain protein) und TRAF (TNF-receptor associated factor). Während über FADD eine Aktivierung von Caspase 8 und damit eine Initiation der Caspase-Kaskade mit konsekutiver Auslösung der Apoptose mediiert wird, kann über TRAF die Aktivierung verschiedener weiterer Signalwege erfolgen (vor allem MAP-Kinasen wie die c-JUN N-terminale Kinase oder p38 [36]).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von TNF $\alpha$  über seine Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2**

Erklärungen siehe Text (modifiziert nach Baud, 2001 in Trends in Cell Biology)

Abhängig von dieser komplexen Signalintegration erfolgt schließlich die Zellantwort, wobei auch hier (siehe Abbildung 4) ein äußerst diverses und heterogenes Spektrum möglich ist – einschließlich so konträrer Reaktionen von Apoptose und Proliferation, Differenzierung sowie Inflammation [38].

### I.2.1.2. Funktion im Hoden – Physiologie und Pathologie

Untersuchungen zur Lokalisation von Quellen für TNF $\alpha$  im testikulären Milieu ergaben im Wesentlichen eine Positivität für runde Spermatozoen im Lumen der Tubuli seminiferi [39] und zudem in interstitiellen Makrophagen [40]. Ob und inwieweit physiologisch TNF $\alpha$  im interstitiellen Kompartiment tatsächlich sezerniert wird, wurde durch Hutson et al genauer diskutiert und von der Annahme einer konstitutiven Sekretion im interstitiellen Kompartiment wurde Abstand genommen.

Um zu bestimmen, welche Zellpopulationen TNF-Rezeptoren im Hoden besitzen, wurde mittels Northern-Blot an isolierten Zellfraktionen, TNFR-1 hauptsächlich auf Leydig und Sertolizellen nachgewiesen (in letzteren konnte die Expression des Rezeptors mittels FSH reguliert werden – [41]).

In den letzten Jahren etablierte sich schließlich die Hypothese, dass niedrige Konzentrationen von TNF $\alpha$  vor allem physiologische Funktionen im Hoden regulieren und TNF $\alpha$  somit ein wichtiger Faktor in der parakrinen Kommunikation testikulärer Zellen darstellen dürfte. Ein Großteil dieser Erkenntnisse sind durch Studien an isolierten Sertolizellen entstanden (größtenteils experimentelle Studien an Isolaten der Ratte und des Schweines), in denen zahlreiche Regulationseffekte durch TNF $\alpha$  beobachtet wurden. Beispielsweise wird die Expression des Androgenrezeptors in Sertolizellen durch TNF $\alpha$  gesteuert [42]. Weitere Funktionen von TNF $\alpha$  finden sich in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Funktionen von TNF $\alpha$  in einzelnen testikulären Zelltypen (modifiziert nach Lysiak, 2004)**

Sertolizelle	Leydigzelle	Peritubuläre Zelle
Aromatase $\uparrow$	STAR $\downarrow$	PAI-1 $\uparrow$
Androgen-Rezeptor $\uparrow$	SCC $\downarrow$	EGFR $\uparrow$
MIS $\downarrow$	17 $\alpha$ -hydroxylase $\downarrow$	LIF $\uparrow$
Transferrin $\uparrow$	<i>insgesamt Testosteron</i> $\downarrow$	
Laktatdehydrogenase $\uparrow$		
MCT2 $\downarrow$		
Fas-Ligand $\uparrow$		
IGFBP – 3 $\uparrow$		
Interleukin 6 $\uparrow$		
ICAM-1 und VCAM $\uparrow$		
MMP9 $\uparrow$		
TIMP-1 und Collagen $\uparrow$		
Glutathion-S-Transferase $\downarrow$		

*verwendete Abkürzungen: MIS=Mullerian inhibiting secretory factor; MCT2=Monocarbonattransporter 2; IGFBP-3=Insulin like growth factor binding protein 3; ICAM/VCAM=Intercellular bzw. vascular cell adhesion molecule; MMP9=Matrixmetalloproteinase 9; TIMP-1=Tissue inhibitor of metallo proteinase 1; STAR=Steroidogenic acute regulatory facotor; SCC=Side chain cleavage enzyme; PAI-1=Plasminogen activator inhibitor 1; EGFR=Epidermal growth factor receptor; LIF=Leukemia inhibitory factor*

Hohe intratestikuläre Konzentrationen von TNF $\alpha$  werden hauptsächlich in pathologischen Situationen gemessen, so beispielsweise nach einem ischämischen Schaden (durch testikuläre Torsion – [43]) oder aber im Fall einer Entzündung (unter anderem Autoimmunorchitis). Das Krankheitsbild der Autoimmunorchitis (AO) kann in zahlreichen Versuchstieren spontan entstehen (Hund, Maus, Ratte, Meerschweinchen – siehe Lysiak) oder aber durch Injektion von homologen Hodenantigenen experimentell induziert werden (Experimentelle Autoimmunorchitis - EAO). Idiopathische testikuläre Dysfunktionen im Menschen, die oftmals mit Infertilität verbunden sind, ähneln in vielen Gesichtspunkten dem Krankheitsbild der AO [43]. Durch Verwendung von TNF $\alpha$  neutralisierenden Antikörpern und einer damit einhergehenden konsekutiven Minderung des Schweregrades der EAO in den Versuchstieren, konnte Yule und Tung nachweisen, dass TNF $\alpha$  eine wesentliche Rolle in diesem Krankheitsbild spielt [44]. Auch eine Zunahme an TNF $\alpha$  positiven Makrophagen im

Interstitium von EAO Versuchstieren lässt vermuten [45], dass dieses Zytokin an der Regulation dieses pathologischen Prozess beteiligt ist.

## **I.2.2. COX-2 und Prostaglandine**

Eine nachweisbare Expression von COX-2 Protein im interstitiellen Kompartiment des humanen Hodens findet sich lediglich in pathologischen Zuständen, wie denen eingeschränkter Spermatogenese und damit verbundener Sub-/Infertilität des Mannes [28]. Es ist daher anzunehmen, dass COX-2, als Schlüsselenzym im Arachidonsäuremetabolismus, zu erhöhten Niveaus von Prostaglandinen führt. Besonderes Augenmerk galt in dieser Arbeit Prostaglandinen der D<sub>2</sub> Reihe (und seinen Endmetaboliten J<sub>2</sub> und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>)), da einerseits die erforderliche Enzymausstattung vorhanden ist (s.u.) und noch unveröffentlichte Studien erhöhte Spiegel, speziell von 15dPGJ<sub>2</sub>, in Fällen eingeschränkter Spermatogenese nachweisen konnten (Persönliche Information M.B. Frungieri, Buenos Aires, Argentinien).

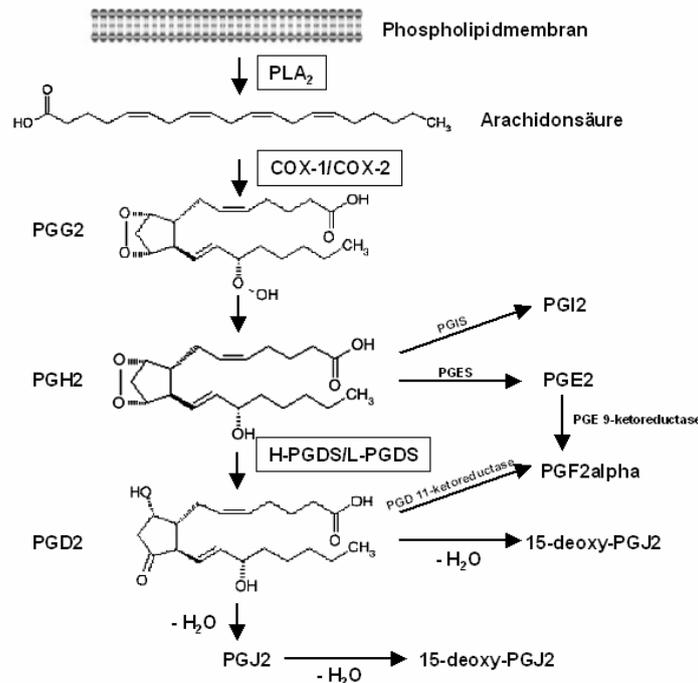
### **I.2.2.1. Synthese der Prostaglandine und ihre Rezeptoren**

Die Familie der Prostaglandine und ihre Metaboliten kommt ubiquitär im menschlichen Körper vor und ist in zahlreiche physiologische, aber auch pathologische Prozesse eingebunden. Eine erste Erwähnung finden die Prostaglandine durch die beiden Gynäkologen Kurzrok und Lieb im Jahr 1930. Sie beobachteten Kontraktionen von Myometrium in vitro, das zuvor in Kontakt mit frischem Ejakulat gebracht worden war. 1935 noch glaubte von Euler, die kontraktilitätsvermittelnden Bestandteile des Ejakulats würden ausschließlich in der Prostata produziert und benannte daher diese Mediatorengruppe auch Prostaglandine. Im Laufe der 60er Jahre etablierte sich schließlich die Erkenntnis, dass Prostaglandine von ihrer Struktur her freie Fettsäuren (FFAs) sind und nahezu aus jeder Phospholipidmembran entstehen können [46].

Der Grundbaustein der Prostaglandine ist die Arachidonsäure (5,8,11,14 – Eicosatetraensäure - AA), eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die als Bestandteil von Phospholipiden hauptsächlich in der Zellmembran lokalisiert ist. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese erfolgt durch die Cyclooxygenase, die zwei wesentliche Reaktionen katalysiert: 1.) einen Ringschluss zwischen den C Atomen 8 und 12, wobei Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) entsteht und 2.) eine Peroxidasereaktion aus der das instabile PGH<sub>2</sub> hervorgeht.

Bisher wurden zwei Isoformen der Cyclooxygenase identifiziert, die beide auf unterschiedlichen Genloci codiert werden (Chromosom 9 für COX-1 und Chromosom 1 für COX-2) und auch unterschiedlicher Regulation unterliegen. Darüberhinaus wurde eine weitere Isoform, COX-3, postuliert, die als spezifisches Ziel des pharmakologischen Wirkstoffs Paracetamol beschrieben wurde und zuerst in Kanninchen identifiziert wurde – kritische Übersichtsarbeiten zu COX-3 stellten jedoch in den letzten Jahren die tatsächliche Existenz eines COX-3 Proteins in Frage und die klinische Signifikanz für diese Isoform (zumindest im humanen System) bleibt daher eher zweifelhaft [47]. COX-1 ist konstitutiv in allen Körperzellen exprimiert und es wird angenommen, dass diese Isoform vermutlich an der Homöostase physiologischer Prostaglandineffekte maßgeblich beteiligt ist. Die induzierbare COX-2 (v.a. durch proinflammatorische Stimuli) hingegen wird vor allem für Effekte im Rahmen von entzündlichen Prozessen verantwortlich gemacht [46].

Die Hauptgruppe der Prostaglandine besteht aus den Prostaglandinen E2, F2, D2, und I2 – allen gemeinsam ist der 5-gliedrige Cyclopentan Ring. Prostaglandin D2 entsteht aus PGH2 durch die Wirkung der Prostaglandin D – Synthase, die in 2 verschiedenen Isoformen, nämlich dem sogenannten Lipocalin-Typ (auch brain-type oder beta-trace) und dem hämatopoetischen Typ (auch spleen-type oder Glutathionabhängige Form) vorliegt [48]. Die Prostaglandin J Reihe schließlich kann nicht-enzymatisch durch Dehydratation zu 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 (15dPGJ2) und  $\Delta^{12}$ -PGJ2 umgesetzt werden [49].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese**

Abkürzungen: PLA<sub>2</sub>=Phospholipase A<sub>2</sub>, COX-1/COX-2=Cyclooxygenase 1 und 2, PGIS,PGES = jeweils Prostaglandin I und E Synthase; Erklärungen siehe Text (modifiziert nach Herlong, 2006 in Immunology Letters)

Für Prostaglandin D2 existieren zwei verschiedene Rezeptoren: DP1 und DP2 (CRTH2). Beides sind Mitglieder der großen Familie von Sieben-Transmembran-Helix (7TM) G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wobei DP1 über die Kopplung an  $G_{\alpha/s}$  zu einer Stimulation der Adenylatcyclase und intrazellulärer Erhöhung von cAMP führt und im Gegensatz dazu DP2 über ein inhibitorisches G-Protein seine Wirkungen vermittelt [50]. Abgesehen von dieser gegensätzlichen Signaltransduktion unterscheiden sich diese beiden Rezeptoren weiterhin durch unterschiedliche Gewebsexpression, Struktur und in der Vermittlung ihrer Effekte.

Neben der Bindung an die klassischen DP-Rezeptoren, kann ein Mitglied der PG J Reihe (15dPGJ2) auch mit sogenannte Peroxisomen-Proliferator-Aktivator-Rezeptoren (PPARs) komplexieren, speziell mit dem Subtyp PPAR- $\gamma$  [51]. Insgesamt wurden bis heute 3 verschiedene PPAR- $\gamma$  Isotypen entdeckt (PPAR alpha, gamma, delta), die durch Ligandenbindung aktiviert werden, jedoch zusätzlich noch eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor eingehen müssen, bevor sie ihre transkriptionelle Aktivität entfalten können [52]. Neuere Studien zeigen zunehmend auf, dass 15dPGJ2 auch unabhängig von PPAR- $\gamma$  transkriptionelle Aktivität entfalten kann [53, 54]. Durch seine einzigartige Beschaffenheit unter den PGs, nämlich einer ungesättigten alpha/beta Keton Hälfte, ist es in der Lage an zahlreiche zelluläre, nucleophile Proteine im Rahmen einer Michael-Additions Reaktion kovalent zu binden und so unabhängig von einer regulären Ligand-Rezeptor Interaktion transkriptionelle Wirkungen zu vermitteln. Zudem erhöht 15dPGJ2 die intrazellulären Spiegel von sogenannten *reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS), die wiederum Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren durch Oxidation von Thiolresten aktivieren können [54].

**Tabelle 3: Rezeptoren und Effekte für Prostaglandine der D und J Reihe**

Rezeptor	Prostaglandin	Effekte
DP 1	PGD2	Vasodilatation ↑ T-Zell Zytokin Synthese ↓ Anti-apoptotisch ↑ Chemotaxis ↓
DP 2	PGD2 & 15dPGJ2	Chemotaxis ↑ Cytokin und CAM- Expression ↑
PPAR $\gamma$ abhängig	15dPGJ2	Apoptose ↑ Zellzyklus-Arrest ↑ inflammatorische Zytokine ↓
PPAR $\gamma$ unabhängig	15dPGJ2	MAP-Kinasen ↑ ROS ↑ Apoptose ↑ inflammatorische Zytokine ↓ COX-2 ↓ iNOS ↓

*Verwendete Abkürzungen: CAM = Zelladhäsionsmolekül; MAP-Kinase = Mitogen aktivierte Phospho-Kinase; iNOS = induzierbare NO-Synthase; ROS = reactive oxygen species; ↑ = Upregulation, ↓ = Downregulation (modifiziert nach Herlong, Immunology Letters 2006 und Hirotaka Sawano, 2002).*

### **I.2.2.2. Prostaglandin D2, J2 und 15dPGJ2 - ihre physiologischen Effekte im Körper und im Hoden**

Im Folgenden Abschnitt soll ein kurzer Abriss über mögliche Effekte der Prostaglandin J Reihe und im Speziellen 15dPGJ2 gegeben werden.

Prostaglandin D2 wird im zentralen Nervensystem, aber auch in peripheren Körpergeweben synthetisiert. Physiologisch ist es in zahlreiche Prozesse eingebunden, so beispielsweise in die Regulation des Schlaf-Wach Rhythmus, Kontrolle der Körpertemperatur, Relaxation von glatten Muskelzellen, Inhibition der Plättchenaggregation und vielen weiteren [46].

Ein ähnlich pleiotropes Wirkungsspektrum, also sowohl pro- wie auch anti-inflammatorisch, besitzt das Prostaglandin 15dPGJ2. Generell muss hier noch zwischen einer PPARy abhängigen, sowie unabhängigen Signaltransduktion unterschieden werden (siehe hierzu Tabelle 3 bzw. Diskussion).

Was die Wirkung von PGD bzw. 15dPGJ2 im Hoden anbelangt, existieren nur wenige fundierte Befunde und diese wurden fast ausschließlich anhand tierexperimenteller Studien erhoben. Die grundsätzliche Potenz PGs der D Reihe zu synthetisieren sind im Hoden vermutlich in zwei Zelltypen lokalisiert: einerseits Leydigzellen, die die dafür notwendige Lipocalin Typ PG-D-Synthase besitzen, sowie testikuläre Makrophagen und Mastzellen, die wiederum die hämatopoetische PG-D-Synthase aufweisen [55, 56]. Bisher wurden mögliche Effekte von 15dPGJ2 in physiologischen wie pathologischen Vorgängen des Hodens noch nicht untersucht oder beschrieben.

Wie aber bereits eingangs erwähnt, wird in verschiedenen, idiopathischen testikulären Dysfunktionen des Menschen, wie Sertoli-Cell-Only Syndrom (SCO), Germ-Cell-Arrest (GA) oder testikuläre Fibrose, eine nachweisbare Expression von COX-2 Protein in der interstitiellen Region beobachtet und daher kann angenommen werden, dass konsekutiv erhöhte Niveaus an Prostaglandinen (darunter auch 15dPGJ2) intratestikulär vorherrschen [28].

### **I.3. Zielsetzung der Arbeit**

Wie bereits dargelegt ist Sub- bzw. Infertilität des Mannes in zahlreichen Fällen durch eine histomorphologisch nachweisbare Fibrose (bzw. auch als „peritubuläre Sklerose“ beschrieben) im Bereich der peritubulären Region charakterisiert [21, 28]. Weitere deskriptive Befunde sind einerseits eine Akkumulation von Immunzellen (Mastzellen und

Makrophagen [20, 57]), v.a. im Bereich der interstitiellen Region, und andererseits eine nachweisbare Expression des COX-2 Proteins [28], das als Schlüsselenzym in der Synthese von Prostaglandinen fungiert. Inwiefern die einzelnen, erwähnten Beobachtungen miteinander vernetzt sind, oder sich gegenseitig bedingen und, in welcher chronologischen Reihenfolge die einzelnen Ereignisse stattfinden, ist bislang ungeklärt.

Zweifelsfrei jedoch kommt der peritubulären Region und damit den testikulären peritubulären Zellen (PCs) eine zentrale Rolle in diesem pathologischen Geschehen zu. Anhand eines erst kürzlich etablierten organischen Modells [10], erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung zweier Faktoren. Diese waren:

1.)  $\text{TNF}\alpha$ , welches von akkumulierten Immunzellen (Mastzellen und Makrophagen) nachweislich lokal produziert, sowie sezerniert werden kann. Dabei sollte im Speziellen eine Modulation des Proliferationsverhaltens, sowie eine Regulation der ECM-Synthese, als grundlegende Mechanismen der Fibroseentstehung durch das Zytokin  $\text{TNF}\alpha$  untersucht werden. Weiterhin erfolgte die Charakterisierung des proinflammatorischen Potentials von HTPCs, sowie dabei involvierte Moleküle und sekretorischer Produkte.

2.) Prostaglandin  $15\text{dPGJ}_2$ , als ein Endprodukt der Prostaglandinsynthese. Beruhend auf einer nachweisbaren Expression von COX-2 und damit vermutlich konsekutiv erhöhten Prostaglandinniveaus im Falle männlicher Infertilität, führten zur Fokussierung auf dieses pleiotrope Signalmolekül. Speziell die mögliche Beeinflussung der phänotypischen Plastizität von HTPCs stand hierbei im Vordergrund des Interesses.

## II. Material und Methoden

### II. 1. Herstellerverzeichnis

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte stammen von folgenden Firmen:

Acris, Hiddenhausen  
Agowa GmbH, Berlin  
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg  
BD Biosciences Clontech, Heidelberg  
Beckman Coulter GmbH, Krefeld  
Biolabs, Frankfurt  
Biomol GmbH, Hamburg  
Biorad Laboratories GmbH Life Science, München  
Biozol, Eching  
Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf  
BMG Labtech, Offenburg  
Cell Biolabs, San Diego, USA  
Chemicon International Inc., Temecula, USA  
Costar, Corning, USA  
Dianova GmbH, Hamburg  
Eppendorf AG, Hamburg  
Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot  
Graphpad Software Inc., La Jolla, USA  
Heraeus, Hanau  
Image J, NIH Software  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Kindler GmbH, Freiburg  
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar  
Millipore, CA, USA  
Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden  
PAA GmbH, Pasching, Österreich bzw. Cölbe, Deutschland  
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen  
Pierce, Weiskirchen bzw. Rockford, USA  
Promega GmbH, Mannheim bzw. Madison, USA  
Qiagen GmbH, Hilden  
R&D Systems, Wiesbaden  
Roche Innovatis, Bielefeld  
SABiosciences, USA  
Sarstedt, Nümbrecht  
Science Products GmbH, Hofheim  
Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen  
Stratagene, Heidelberg  
Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA  
Zeiss Jena GmbH, München  
Zeitz, Augsburg

### II.2. Verwendete Lösungen

Es wurde stets zweifach destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) verwendet. Alle Prozentangaben sind in Gewichtsprozent angegeben.

PBS (10 mM, 1 l): 0,386 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 1,023 g  $\text{Na}_2\text{H PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 8,776 g NaCl; in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 7,4

Extrazelluläre (EZ) Lösung (1 l): 8,2 g NaCl (140 mM), 0,22 g KCl (3 mM), 0,15 g  $\text{CaCl}_2$  (1 mM), 0,20 g  $\text{MgCl}_2$  (1 mM), 2,38 g HEPES (10 mM), 1,8 g Glucose (10 mM); in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 7,4

DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ : 500  $\mu\text{l}$  DEPC in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren

Elektrophoresepuffer (10 x, 1 l): 30,28 g Tris; 144,12 g Glycin, 10 g SDS; in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 8,3; zum Gebrauch 1:9 mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verdünnen

Ponceau S (10 x): 1 g Ponceau S auf 500 ml 3 % Trichloressigsäure (für Gebrauch 1:9 mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verdünnen)

TBE-Puffer (5 x, 1 l): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 8,0

TBS-Puffer (10 x, 1 l): 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl, in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 7,6

TBS-Tween (1 l): 100 ml TBS (10 x), 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest., 500  $\mu\text{l}$  Tween 20 (= 0.05 %)

Trenngelpuffer (100 ml): 18,15 g Tris (1,5 M); 0,4 g SDS (0,4 %), in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 8,8

Sammelgelpuffer (100 ml): 6 g Tris (0,5 M), 0,4 g SDS (0,4 %), in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 6,8

Transferpuffer (5 l): 72,1 g Glycin (192 mM), 15,14 g Tris (25 mM), 1 l Methanol, in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

PFA (4 %, 100 ml): 4 g Paraformaldehyd, 1 ml 1 N NaOH, 0,57 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,93 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.; pH 6,8

KPBS 0,12 M (500 ml): 1,47 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,59 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 27 g NaCl, in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,4

KPBS 0,02 M: 20 ml 0,12 M KPBS + 100 ml DEPC- $\text{H}_2\text{O}$

KPBS (Normalserum/Triton): 48,85 ml 0,02 M KPBS, 1 ml Normalserum des Zweitantikörpers, 150  $\mu\text{l}$  Triton X-100

F+-Marker (100-3000 bp): 40  $\mu\text{l}$  0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Gene Ruler 100 bp DNA Marker Plus (Fermentas), 50  $\mu\text{l}$  Farbstoff (6 x), 110  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Ethidiumbromid: 10 mg/ml; für Gebrauch 1:10 verdünnen

MMP-Inkubationspuffer: 50-mmol/L Tris-HCl, 200-mmol/L NaCl, 10-mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ,

0.06% Brij 35 Lösung 30%, pH 7.5

### **II.2.1. Verwendete Medien und Stimulantien**

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien und Chemikalien werden im Folgenden aufgelistet:

Erstkulturmedium (zur Explantation der Hodenbiopsien): Ham's F12 Medium (PAA GmbH, Pasching, Österreich), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schellendorf, Germany), 0.5 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), 15% (Vol/Vol) Fetales Kälberserum (FCS), 100 IU Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von PAA GmbH)

Normalmedium: DMEM, high glucose + L-Glutamine (PAA GmbH), 10% FCS, keine Antibiotika.

TNF $\alpha$  – rekombinant human (Konzentration wie in den Experimenten angegeben – Sigma Aldrich)

PGD2, PGJ2, 15dPGJ2 (Konzentration wie in den Experimenten angegeben – Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA)

### **II.3. Isolation und Kultivierung von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs)**

#### **II.3.1. Isolation von HTPCs aus humanen Hodenbiopsien**

Die Isolation primärer humaner testikulärer peritubulärer Zellen (HTPCs) erfolgte aus Anteilen von Hodenbiopsien, die in einem andrologischen Zentrum im Rahmen sogenannter Religations- bzw. Refertilisierungsoperationen (Vasovasotomie) durchgeführt wurden. Die Religationsoperation dient dabei einer vollständigen Rekonstruktion der zuvor in einer Vasektomie unterbundenen Samenleiter (Ductus deferentes). Die Methodik der Isolation und Kultivierung orientierte sich dabei an einem durch das Labor von Prof. Dr. Mayerhofer etablierten Protokoll [10].

Vor Beginn der durchgeführten Untersuchungen lag die Zustimmung der Ethikkommission, sowie das Einverständnis der teilnehmenden Patienten vor (siehe Anlagen). Nach Asservierung der diagnostikrelevanten Anteile der Hodenbiopsien wurde verbliebenes Material direkt nach der Entnahme in sogenanntes Erstkulturmedium überführt (I.2.1 verwendete Medien). Die Biopsiestücke mit einem durchschnittlichen Volumen von ca. 1-2 mm<sup>3</sup> wurden unter sterilen Bedingungen mit Pinzetten in kleinere Stückchen (6-8 Explantate) zerkleinert und anschließend mit kalzifizierten humanen Plasma auf dem Boden von Kulturschalen festgeklebt. Nach ca. 12 Stunden wurden die Stückchen mit Medium (Erstkulturmedium - 13ml) überschichtet und in diesem Zustand bei 37 Grad Celsius im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

In der folgenden Kulturperiode wurde jeweils alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle konnte das Auswachsen der Zellen am Rande der Biopsien beobachtet werden und in der Regel erfolgte nach 3 wöchiger Kultivierung das Entfernen der Biopsiestückchen und zudem eine Umstellung auf das Normalmedium (siehe I.2.1. - DMEM Medium +10% FCS). Die so gewonnenen Zellen wurden entweder weiter passagiert und für folgende Versuche verwendet, oder aber für spätere Experimente in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (unter Zugabe von DMSO).

Die Zahl der verwendeten Patientenisolate und damit unabhängigen Experimenten sind in den entsprechenden Versuchsdarstellungen explizit als „n“ aufgeführt.

### **II.3.2. Kulturbedingungen von HTPCs**

Die aus den Hodenbiopsien isolierten primären Zellen wachsen unter *in vitro* Kulturbedingungen adhärent und wurden in DMEM High glucose Medium mit L-Glutamin Zusatz (PAA GmbH, Cölbe, Deutschland) kultiviert. Um die Wachstumsbedingungen für diese Zellen optimal zu gestalten wurde dem Standardmedium zusätzlich 10% FCS (fetales Kälberserum) hinzugefügt (PAA GmbH, Cölbe, Deutschland). Für die Mehrzahl der Versuche wurden HTPCs in 60mm Kulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 37 Grad Celsius, einem Kohlendioxidanteil von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Brutschrank (Heraeus BBD6220, Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert.

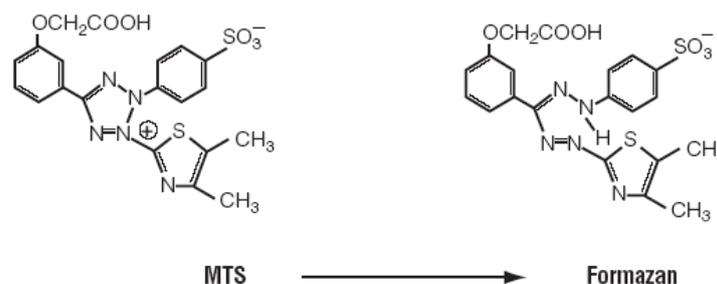
Wurde unter diesen Bedingungen annähernde Konfluenz erreicht, erfolgte eine Subpassagierung indem die Zellen zweimal mit PBS gespült wurden (PAA GmbH, Cölbe, Deutschland) und für die Dauer von 4 Minuten mit 1,5ml eines Gemischs aus sterilem EDTA und Trypsin (PAA GmbH) bei 37 Grad im Brutschrank überschichtet wurden. Die Aktivität dieser Trypsinreaktion wurde anschließend durch Zugabe von Normalmedium (enthält 10% FCS) abgestoppt und die nun non-adhären Zellen wurden in insgesamt 3-4ml Medium aufgenommen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 400g in einer Laborzentrifuge (Biofuge, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und das dabei gewonnene Zellpellet wurde erneut resuspendiert, gespült und dann entsprechend verdünnt auf 2-3 Kulturschalen aufgeteilt.

## II.4. Zellbiologie

### II.4.1. MTS – Assays

Um Vitalität und Proliferationsverhalten von HTPCs unter Stimulationsbedingungen zu evaluieren, wurde auf einen kommerziell erhältlichen Vitalitätsassay zurückgegriffen (Promega, Madison, USA). Der *CellTiter 96 AQueuos* ist ein colorimetrisches Messverfahren, das unter *in vitro* Kulturbedingungen auf der Basis von Redoxvorgängen Rückschlüsse auf Vitalität und/oder Zellzahlveränderungen erlaubt.

Grundlage der Messmethode ist dabei die oxidative Umwandlung von MTS-Tetrazolium-Reagenz in Formazan und der dabei entstehenden Absorptionsänderung. Unter der Annahme, dass diese Reaktion und der dabei entstehende Anteil an Formazan direkt proportional zur Zellzahl und deren Vitalität ist, wird der MTS-Assay standardmäßig für solche Applikationen verwendet.



**Abbildung 6: Oxidative Umwandlung des MTS-Reagenz in das Produkt Formazan**

Die oxidative Reaktion führt zur Umwandlung des Tetrazolium-Salzes und damit einer bei 490nm Wellenlänge messbaren Absorptionsänderung. Diese Änderungen können als Anhalt für Zellzahl, Proliferationsverhalten bzw. Vitalität der untersuchten Zellpopulationen dienen (modifiziert entsprechend Handbuch zum MTS-Assay Cell Titer 96 Aqueous)

HTPCs wurden für die MTS-Assays aus den Kulturschalen abtrypsinisiert und mit einer Multichannel Pipette in einem Volumen von 200µl in 96 Well Platten (Costar, Corning, USA) überführt. Nach einer Anwachsperiode von ca. 6-8 Stunden wurde das normale DMEM +10% FCS Medium durch reines DMEM Medium ohne Serum ersetzt, um durch den akuten Entzug von Wachstumsfaktoren eine Zellzyklusarretierung zu erreichen. Diese sogenannte „starving“ – Phase wurde für ca. 12h aufrechterhalten. Im Anschluß wurden die 96 Wellplatten mit 150µl DMEM+2,5%FCS befüllt und ca. 2-3 Stunden später erfolgte die eigentliche Stimulation der Zellen (siehe hierzu I.2.1 - Stimulantien) in einem Volumen von 20µl.

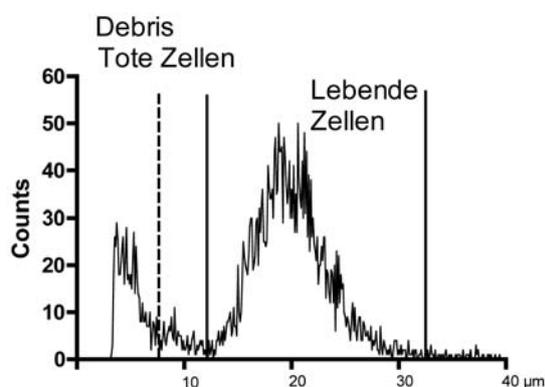
Nach Ende der vorgesehenen Stimulationsdauer wurde nun mit einer Repetierpipette das vorbereitete MTS-Reagenz in einem Volumen von 25µl in jedes Well einer 96 Wellplatte pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm (Fluostar, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland).

Die so gemessenen Absorptionsdaten wurden durch Abzug von Blank-Werten korrigiert (leeres Medium + MTS-Reagenz) und im Vergleich zu unbehandelten Zellen relativiert (Control – Zellen). Jede dieser Messungen erfolgte pro Stimulationsansatz mindestens in 8-fach Bestimmung und wurde mit verschiedenen Patientenisolaten wenigstens 3 mal wiederholt (ansonsten wie in den jeweiligen Experimenten angegeben). Um statistische Parameter für diese Messungen zu erhalten wurde auf die gesammelten Messdaten der ONE-WAY ANOVA Test angewendet.

#### II.4.2. CASY – automatische Zellzählung und Volumenbestimmungen

Um Veränderungen auf Zellzahlebene und tatsächliche Proliferationsänderungen zu erfassen, wurde ein automatisches Zellzahlgerät verwendet. Das CASY – System (Casy Modell TT, Roche Innovatis, Bielefeld) ist ein neuartiges automatisiertes Verfahren, das auf Basis von elektrischen Widerstandsänderungen durch die Lipiddoppelmembran sowohl Integrität der Zellmembran, Zellvolumenmessungen als auch Zellzahlbestimmungen in einem Messschritt bestimmen kann.

In einer Reihe von Eichmessungen wurde ein Profil typischer HTPCs Parameter (Zelldurchmesser, Kerngröße und typische Zelldebrisgröße – siehe hierzu beispielhafte Grafik) bestimmt.



**Abbildung 7: Repräsentatives Meßprofil von HTPCs in der CASY Applikation.** Anhand der angegebenen Kurven kann sowohl eine Aussage über die Anzahl toter Zellen, Debris als auch über vitale Zellpopulationen und weitere essentielle Parameter (Volumen, Durchmesser) getroffen werden (y-Achse: Zellzahlen; x-Achse: Durchmesser in µm).

In den folgenden Versuchen wurden HTPCs in Kulturflaschen (6-8 ml - Nunc, Wiesbaden) kultiviert und in einem Schritt vollständig abtrypsiniert. Identische Volumina der gewonnenen Zellsuspension (ca. 1-2 ml) wurden daraufhin gleichmäßig auf 60mm Kulturschalen aufgeteilt und nach einer Adhäsionsphase von 6-8 h mit Vollmedium (DMEM + 10%FCS) durch Entzug von Serum in die „starving“ – Phase überführt (DMEM ohne FCS). Am darauffolgenden Tag erfolgte dann, nach Wechsel in reduziertes DMEM Medium (+2,5%FCS), die Stimulation mit den entsprechenden Reagenzien (siehe I.2.1 – Stimulantien).

Für die eigentliche Messung wurde nach Beendigung der Stimulationsphase der Kulturüberstand abgenommen und der Zellrasen abtrypsiniert. Das dabei gewonnene Zellpellet wurde daraufhin resuspendiert und ein Volumen von 100µl dieser Suspension wurde in 900µl CASYTON (Messlösung) verdünnt. Die folgenden Messungen werden durch das Gerät automatisch für den entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert.

Jede Messung wird durch das CASY-System selbsttätig 4x wiederholt und die gemittelten Werte im Form eines Messdiagramms ausgegeben. Aus der präparierten Zellsuspension wurde in der Folge eine Wiederholungsmessung durchgeführt um eventuelle Pipettierfehler oder Heterogenitätsartefakte auszuschließen. Unterschiede zwischen unbehandelten (Kontrolle) und behandelten Proben wurden mit der Software Graphpad (Prism Version 4.0a – Graphpad Software Inc., La Jolla, USA) mit dem ONE-WAY ANOVA Test auf statistische Signifikanz überprüft.

### **II.5. Immunhistochemie**

Paraffinschnitte von Hodenbiopsien wurden in Xylol und in der Folge mit einer absteigenden Alkohol-Reihe entparaffiniert (2 x Xylol, 2 x Ethanol 100%, 2 x Ethanol 96% / 80% / 70%, jeweils 5 min) und anschließend mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1% Methanol in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet. Diese Reaktion sollte unspezifische Anfärbungen durch im Gewebe enthaltene endogene Peroxidasen unterbinden. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte im Mikrowellenofen für 15 Minuten auf 100°C erhitzt, wobei sie in einem 10mM Citratpuffer (pH=6,0) gelagert wurden. Da die Formalinfixierung der Biopsien zur Veränderung von Epitopen auf der Oberfläche des Gewebes führen kann und in Folge davon nur eingeschränkte Antikörperbindung möglich ist, soll dieser Schritt der erneuten Demaskierung der Epitope dienen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden mit 5% Ziegen-Normalserum in PBS blockiert (30 Minuten bei Raumtemperatur). Die Inkubation mit dem Primärantikörper (entsprechende Verdünnungen siehe Tabelle 4) erfolgte dann bei 4°C über Nacht.

Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Schnitte gründlich mit PBS gewaschen und mit dem passenden IgG Zweitantikörper überschichtet. Mittels Avidin-Biotin Komplex Methode (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurde anschließend die Immunfärbung sichtbar gemacht. Hierbei bindet das Biotin-affine Protein Avidin und biotinylierte Meerrettichperoxidase in einem Makrokomples an das biotinylierte Sekundärimmunoglobulin. Durch Zugabe von Diaminobenzidin als chromogenes Substrat der Meerrettichperoxidase entsteht an Bindungsstellen des Primärantikörpers eine braune Färbung. Die Schnitte wurden daraufhin in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, eingedeckelt und mit einem Axioplan Mikroskop (Zeiss) photographiert.

## I.6. Immunzytochemie

HTPCs wurden für immunzytochemische Experimente abtrypsinisiert und auf runde Plastik Deckgläschen ausgesät. Nach einer Adhäsionsphase von ca. 6-8h wurden die Deckgläschen mit DMEM Vollmedium überschichtet und nach einer weiteren Inkubationsdauer von ca. 12 h je nach Experiment stimuliert oder aber umgehend fixiert. Die Fixierung der Deckgläschen erfolgte mit 4% Paraformaldehyd (pH=6,8) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und einer anschließenden Spülung mit PBS. Als Wasch- und Spülpuffer wurde im Folgenden KPBS-Puffer verwendet. Die Permeabilisation der Zellmembran erfolgte mit dem nichtionischen Detergens Triton-X100 (in KPBS) und um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde 2% Ziegen Serum verwendet. Nach gründlichem Spülen wurden die Deckgläschen mit dem Primärantikörper (in KPBS verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Wiederum wurden die Deckgläschen gespült und anschließend mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt an FITC) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem Montagekit „ProLong antifade“ (Promega, Molecular Probes, Eugene, USA) wurden die Deckgläschen auf Objektträgern aufgebracht, und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) ausgewertet und photographiert.

**Tabelle 4: Antikörper für Immunhisto- als auch –zytochemie**

Antikörper	Verdünnung	Spezies/Klonalität	Hersteller
TNFR-1	1:1000	Human, monokl.	Biozol, Eching
TNFR-2	1:50	Human, monokl.	Biozol, Eching
ICAM-1	1:50	Maus, monoklonal	Acris, Hiddenhausen
COX-2	1:50	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
SMA	1:2000	Maus, monoklonal	Sigma, Klon 1A4
MYH-11	1:100	Maus, monoklonal	Sigma, Klon HSM-V

## II.7. Westernblot – Experimente

### II.7.1. Proteinpräparation

Nach abgelaufener Stimulation wurden die HTPC Zellrasen mit kaltem PBS zweimal gespült und anschließend mit Probenpuffer überschichtet (siehe Tabelle 5). Durch zusätzliche Anwendung von Gummischabern (Cellscraper) wurden die HTPCs noch in der Kulturschale lysiert und das gewonnene Lysat in ein Eppendorftube überführt. Nach einem Waschschrift mit PBS, wurde das Pellet mit Probenpuffer (1x) und einem Inhibitorcocktail versetzt (Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Natriumvadanat). Durch weitere kurze Ultraschallbehandlung (UP 50H, Dr. Hielscher GmbH) wurde der Homogenisationsprozess beendet.

Mittels Bradford-Proteinassay (DC Protein Assay, Biorad, München, Deutschland) konnte nach der Methode von Lowry die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden, die zuletzt noch mit 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1% Bromphenolblau versetzt wurden. Vor Verwendung der Proben wurden diese einmalig auf 95°C erhitzt.

**Tabelle 5: Puffer für Probenvorbereitung, Gelelektrophorese und Transfer**

	Probenpuffer	PAGE-Elektrophoresepuffer	Transferpuffer	TBS-TWEEN
Saccharose	10% (w/v)			
SDS	2,5% (w/v)	0,1% (w/v)		
Tris-Puffer	62,5 mM	25 mM	25 mM	50 mM
Glycin		192 mM	192 mM	
Methanol			20% (v/v)	
NaCl				138 mM
KCl				2,7 mM
TWEEN 20				0,05%
pH	6,8	8,3	8,3	7,6

SDS = Natrium-Duodecylsulfat; TWEEN 20 = Polyethylenglykol-sorbitanmonolaurat, nichtionisches Detergens; jeweils alles in bidest H<sub>2</sub>O

### II.7.2. SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem entsprechenden Molekulargewicht erfolgte nach der diskontinuierlichen PAGE Methode. Hierbei erfolgt durch unterschiedliche Zusammensetzung (Vernetzungsgrad und pH-Wert) eines Polyacrylamid Sammel- und Trenngels eine Fokussierung der Proteinproben an der Trennschicht der unterschiedlichen Gelphasen (siehe hierzu Tabelle 6). Pro Proteinprobe wurden jeweils 15 $\mu$ g Protein in eine Geltasche/Laufbahn des Sammelgels geladen und die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160V für ca. 1 Stunde im SDS-Laufpuffer (sämtliche Rezepturen siehe Tabelle 5). Als Molekulargewichtsmarker wurden jeweils zwei Bahnen mit

Prestained (Biolabs, Frankfurt, Deutschland) und Rainbow (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) mitbeladen.

**Tabelle 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen**

<b>Zusammensetzung:</b>		
	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamidgehalt	12,5%	4%
Acrylamid 30%	1,6 ml	270µl
Trenngelpuffer pH 8,8	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	625µl
H <sub>2</sub> O bidest	2,1 ml	1500µl
Ammoniumpersulfat (10%)	75µl	19µl
Natriumduodecylsulfat (10%)	100µl	25µl
TEMED (100%)	12,5µl	3,25µl

### II.7.3. Transferblotting und Antikörperinkubation

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte nach dem „wet blotting“ Prinzip. Hierzu wird in einem Sandwichaufbau ein horizontaler Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Die Transferreaktion fand im eisgekühlten Transferpuffer (siehe Tabelle 5) bei 100V und 400mA für 1 Stunde statt. Im Anschluß daran wurden die Membranen in Ponceau Rot gefärbt, zugeschnitten und die entsprechenden Marker mit Bleistift auf der Membran nachgezeichnet (da folgende Wasch- und Inkubationsschritte zum Verblässen der Markerbanden führen kann).

Durch Inkubation der Nitrozellulosemembran mit Magermilchpulverlösung (5% (w/v) in TBS-Tween) wurden unspezifische Bindungsstellen auf dieser abgesättigt. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung in 0,5% Magermilch/TBS-Tweenlösung zu den Membranen gegeben und es folgte eine Inkubationsphase bei 4°C über Nacht.

**Tabelle 7: Für Westernblots verwendete Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies/Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>
p44/p42 (ERK1/2)	1:1000	Kanninchen, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
COX-2	1:1000	Kanninchen, polyklonal	Oxford Biomedical Research, Oxford, UK
SMA	1:500	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich
β-Actin	1:5000	Maus, monoklonal	Sigma Aldrich

### **II.7.4. ECL-Detektion und semiquantitative Auswertung**

Nach erfolgter Inkubation und dreimaligem Waschen in TBS-Tween wurde der entsprechende, Meeretichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper zu den Membranen hinzugefügt (2 Stunden bei Raumtemperatur und auf dem Schüttler). Auf erneute Waschschrte (jeweils 5 Minuten in TBS-Tween) erfolgte die Detektion der immunoreaktiven Banden, wobei die Entwicklung mit einem kommerziellen Kit (Super Signal West femto/pico, Pierce, Rockford, USA) durchgeführt wurde. Die Bilddokumentation wurde hierbei an einer kombinierten Detektions und Dokumentations-Workstation Chemi-Smart 5000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) und des Programms ChemiCapt vorgenommen. Um quantitative Unterschiede zu evaluieren wurden die Membranen im Anschluß mit einem Primärantikörper für beta-Actin (als Housekeeping-Gen – siehe Tabelle 7) inkubiert und die Intensität der entsprechenden Banden von untersuchtem Gen auf die Intensität von beta-Actin relativiert (in entsprechenden Experimenten wurde, wie dort angegeben, z.T. ERK1/2 als housekeeping gene verwendet). Die Messung der optischen Dichte erfolgte hierbei mit Hilfe des Programms Image J Version 1.40 (NIH Software). Diese semiquantitativen Daten wurden anschließend mit der statistischen Software Graphpad weiterhin evaluiert.

## **II.8. Molekularbiologie**

### **II.8.1. RNA-Isolation**

HTPCs wurden für die RNA-Isolation wie zuvor beschrieben in 60mm Kulturschalen kultiviert, stimuliert und nach Ende der Stimulationsphasen wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) die RNA-Isolation durchgeführt.

Nach Abnahme des Kulturüberstandes wurde der Zellrasen mit 600µl RLT – Buffer (Guanidinisothiocyanat mit  $\beta$ -Mercaptoethanol 1%) überschichtet und mit Hilfe eines Gummischabers (Cellscraper) der Zellrasen von der Oberfläche der Kulturschälchen geerntet. Die 600µl Zellsuspension wurde anschließend fünfmal durch sterile Einwegspritzen und 27 Gauge Spritzenadeln gepresst um eine bessere Auflösung der Zellmembranen zu gewährleisten. Diese homogenisierte Suspension wurde anschließend im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol versetzt und in die mitgelieferten RNeasy Filtersäulen überführt. Das Prinzip dieser Isolation beruht dabei auf non-kovalenter und pH-abhängiger Bindung von RNA an eine Silica Membran. Verschiedene Waschpuffer gewährleisten durch ihren pH, dass Verunreinigungen bei den Zentrifugationsschritten aus der Membran gespült werden, während RNA gebunden bleibt. Zuletzt wurde mit RNase freiem Wasser die RNA aus der Membran eluiert (zumeist in einem Volumen von 30µl). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die eluierte RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben erfolgte elektrophotometrisch (Biophotometer, Eppendorf) indem bei einer Wellenlänge von 260nm die Absorption bestimmt wurde. Außerdem wurde das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Wert des Verhältnisses  $A_{260} / A_{280}$  von 1,5 deutet auf eine Proteinverunreinigung, ein Wert von mehr als 2,0 auf eine Phenolverunreinigung hin. Die Bestimmung des RNA-Gehalts war wichtig, um in der anschließenden reversen Transkription jeweils die gleiche Ausgangsmenge an RNA zu verwenden, was vor allem für die semiquantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse von Bedeutung war.

### II.8.2. Reverse Transkription

Um zelluläre mRNA in cDNA umzuschreiben wurde auf die Reverse Transkription (RT) mit sogenannten Hexamer-Primern zurückgegriffen. Diese Primer bestehen aus einer zufälligen Kombination von Nukleotiden um eine effektivere Umschreibung zu ermöglichen.

Hierzu wurde die standardisierte Menge von 200 ng mRNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10,7µl aufgefüllt und 0,8µl Hexamer Primer hinzugefügt. Die weiteren Schritte der Transkription erfolgten in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Die erste Inkubationsphase wurde bei 70° C für 10 Minuten durchgeführt und darauf folgte eine Abkühlung auf 25° C für 5 Minuten. Dieser Schritt dient dem Annealing der Hexamer Primer an die mRNA (Annealingphase). Im Anschluß daran wurden dem Reaktionsansatz 4µl First Strand Buffer (5x, Invitrogen), 2µl DTT (0,1 M, Invitrogen), 1µl dNTP (10mM) und 0,5µl Rnasin (Rnase Block Ribonuclease Inhibitor, Promega) hinzugefügt. Es folgte eine weitere Phase für 10 Minuten bei 25° C und daraufhin eine Erwärmung auf 42° C für 2 Minuten. Nach diesem Schritt wurde jeweils 1µl Reverse Transkriptase jedem Reaktionsansatz hinzugefügt ( Superscript II, Invitrogen) und folgendes PCR-Programm durchgeführt:

- 42 °C für 50 Minuten
- 70 °C für 15 Minuten
- 4 °C für 10 Minuten

Diese Art der RT mit anschließender PCR ergab für HTPCs eine ausreichende Menge der PCR-Produkte, so dass auf eine anschließende nested-PCR verzichtet werden konnte.

### II.8.3. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Sämtlich für diese Arbeit verwendeten Primersequenzen entstammen entweder der Harvard Primerdatenbank (Adresse: [www.pga.mgh.harvard.edu/primerbank](http://www.pga.mgh.harvard.edu/primerbank)) oder wurden mit der

Opensource Software Primer3 (Adresse: [www.frodo.wi.mit.edu](http://www.frodo.wi.mit.edu)) hergestellt. Um etwaige genomische Verunreinigungen im Rahmen der PCR – Reaktion detektieren zu können, wurden die Sequenzen weitestgehend Intronspannend gelegt (Primer ohne Intron überspannendes Design sind mit einem x gekennzeichnet). Die Synthese der Primersequenzen wurde durch die Firma Metabion (Metabion, München) vorgenommen, die diese gereinigt und lyophilisiert zur Verfügung stellte. Nach erfolgreicher PCR-Reaktion wurden Aliquots der Ansätze an die Firma Agowa versendet und dort chromatographisch sequenziert, und im Anschluß daran mit Hilfe des Programms BLAST (NIH, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/seq/BlastGen](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/seq/BlastGen)) identifiziert.

Die PCR-Reaktion wurde mit einem Kit der Firma Promega durchgeführt und sämtliche Amplifikationsschritte erfolgten an einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA). Als Positivkontrollen dienten cDNAs aus Hoden, Haut, Milz und Leukozyten der Firma clonTech (clonTech, Palo Alto, USA). Für Negativkontrollen wurden den Ansätzen anstatt cDNA entsprechende Mengen H<sub>2</sub>O bidest zugefügt.

**Tabelle 8: Reaktionsansatz PCR-Mix mit GoTaq-Polymerase**

Reagenz	Volumen
Go Taq-Puffer (5x) (Promega)	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3µl
dNTPs (2mM)	5µl
H <sub>2</sub> O bidest	28µl
Gesamtvolumen	41µl

**Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50µl**

Reagenz	Volumen
PCR-Mix	41µl
Primer forward (50µM)	1µl
Primer reverse (50µM)	1µl
H <sub>2</sub> O bidest	4,75-6,25µl
GoTaq-Polymerase	0,25µl
cDNA	0,5-1µl
Gesamtvolumen	50µl

Folgende PCR-Amplifikationsprogramme wurden standardmäßig verwendet (siehe Tabelle); mit Ausnahme der Annealingtemperatur und entsprechend divergierenden Cyclezahlen wurde jeweils nur dieses Standardprogramm angewendet (für Annealingtemperatur und Cyclezahlen siehe Primertabelle). Nach Beendigung der PCR wurde der Cycler auf 4° C

gekühlt und die Proben entweder elektrophoretisch aufgetrennt oder aber bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 10: Standardeinstellungen für PCR-Reaktion**

PCR-Standardprogramm			
PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Cycles
<i>Denaturierung</i>	95° C	2 min	einmalig
<i>Denaturierung</i>	95°C	1 min	
<i>Primer-Annealing</i>	s. Primertabelle	30sec	Cycles s. Tabelle
<i>Elongation</i>	72 C	1 min	
<i>Finale-Elongation</i>	72° C	5 min	
<i>Kühlphase</i>	4° C	forever	

**Tabelle 11: Liste der verwendeten Primer**

Primer			
Genprodukt	Sequenz (5'-3')	Ref-Seq./Amplicon	Annealing-Temp.
TNFR-1		NM_001065	57°
<i>TNFR-1fow</i>	ACC GGC ATT ATT GGA GTG AAA A	198bp	
<i>TNFR-1rev</i>	GGG GTA GGC ACA ACT TCG TG		
TNFR-2		NM_001066	58,5°
<i>TNFR-2fow</i>	CGC TCT TCC AGT TGG ACT GAT	105bp	
<i>TNFR-2rev</i>	CAC AAG GGC TTC TTT TTC ACC T		
TIMP-1		NM_003245	58°
<i>TIMP-1fow</i>	GGA CAC CAG AAG TCA ACC AGA	220bp	
<i>TIMP-1rev</i>	TGC AGG TAG TGA TGT GCA AGA		
MMP-2		NM_004530	58°
<i>MMP-2fow</i>	CTT CCA AGT CTG GAG CGA TGT	119bp	
<i>MMP-2rev</i>	TAC CGT CAA AGG GGT ATC CAT		
ICAM-1		NM_000201	58°
<i>ICAM-1fow</i>	TTG AAC CCC ACA GTC ACC TAT	190bp	
<i>ICAM-1rev</i>	CCT CTG GCT TCG TCA GAA TCA		
MCP-1		NM_002982	59°
<i>MCP-1fow</i>	CAG CCA GAT GCA ATC AAT GCC	190bp	
<i>MCP-1rev</i>	TGG AAT CCT GAA CCC ACT TCT		
IL-6		NM_000600	59,5°
<i>IL-6fow</i>	AACCTGAACCTTCCAAAGATGG	159bp	

<i>IL-6rev</i>	TCTGGCTTGTTCTCACTACT		
NGFb		BC032517	59°
<i>NGFb-fow</i>	AGG GAG CAG CTT TCT ATC CTG	185bp	
<i>NGFb-rev</i>	GGC AGT GTC AAG GGA ATG C		
Cyclophilin		NM_006347	56°
<i>Cyclophilin-fow</i>	CTC CTT TGA GCT GTT TGC AG	325bp	
<i>Cyclophilin-rev</i>	CAC CAC ATG CTT GCC ATC C		
Calponin		NM_001299.4	50°
<i>Calponin-fow</i>	CGA AGA CGA AAG GAA ACA AGG T	183bp	
<i>Calponin-rev</i>	GCT TGG GGT CGT AGA GGT G		
CD90		NM_006288.3	61°
<i>CD90-fow</i>	AGC ATC GCT CTC CTG CTA ACA	138bp	
<i>CD90-rev</i>	CTC GTA CTG GAT GGG TGA ACT		
CollagenIV		NM_001846	62°
<i>CollagenIV-fow</i>	CTC CGC ACT CAA GAG GCT C	352bp	
<i>CollagenIV-rev</i>	AGA CGC TCT GGG CGA GGA A		
MYH-11		NM_001040114	60°
<i>MYH-11-fow</i>	GGA CGA CCT GGT TGT TGA TT	656bp	
<i>MYH-11-rev</i>	GTA GCT GCT TGA TGG CTT CC		
SMA		NM_001615.3	61°
<i>SMA-fow</i>	GTG ACC TCA CGG ACT ACC TCA	205bp	
<i>SMA-rev</i>	CCA ATG GTG ATA ACC TGC CC		

### II.8.3.1. Semiquantitative PCR

Um stimulationsbedingte Änderung in mRNA Mengen zu bestimmen wurde auf die Methode der semiquantitativen PCR zurückgegriffen [28]. Als Referenzkontrolle wurde hierbei das Housekeeping Gen humanes Cyclophilin verwendet. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.36b, Wayne Rasband, NIH, USA).

### II.8.4. Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung

Nach Abschluß der PCR-Reaktion wurden jeweils 15µl des PCR-Mixes auf Agarosegele übertragen. Diese Gele wurden hierzu aus 2% Agarosetrockenpulver (Biozym/Cambrex, Rockland, USA) und TBE-Puffer (siehe I.2.1.) hergestellt und bei 600 Watt im Mikrowellenofen erhitzt bis es zur vollständigen Lösung des Pulvers kam. Noch vor dem

Gießen in die vorbereiteten Trays (Gußformen, versehen mit Kämmen) wurde entsprechend dem Volumen des Gelansatzes 1% Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugegeben. Da die in dieser Arbeit weitestgehend verwendete Metaphor-Agarose relativ schwer auspolymerisiert, musste das Gel nach dem Gießen 20 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von 20 Minuten bei 4°Grad vollständig aushärten. Als Referenzmarker wurde auf jedes Gel ein Größenmarker aufgebracht (F+, Fermentas).

Die Elektrophorese (Power Pac 300, Biorad) erfolgte in TBE-Puffer, bei einer Spannung von 90mV und einer Laufzeit von 45 Minuten. Im Anschluß daran wurden die Gele auf einem UV-Leuchttisch (Wellenlänge = 302nm) untersucht, wobei der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid Marker und PCR-Produkte hellblau leuchten lässt. Die Gele wurden mittels CCD-Kameradokumentationssystem (MWG Biotech, Peqlab, Erlangen, Deutschland) photographiert und digitalisiert.

### **II.9. Calcium-Imaging**

Qualitative Änderungen intrazellulärer Calcium-Niveaus unter Stimulationsbedingungen wurden in HTPCs mithilfe des fluoreszierenden Calcium-bindenden Farbstoffs Fluo-4 (Fluo-4 Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gemessen.

Dafür wurden HTPCs 1-2 Tage vor der Messung (respektive 7-8 Tage für Langzeituntersuchungen) auf unbeschichteten Glasplättchen ausgesät und bis zur Adhäsion in DMEM +10% FCS kultiviert.

Zur Beladung der Zellen wurde ein Glasplättchen unter sterilen Bedingungen in ein 30mm Kulturschälchen (Sarstedt) überführt und mit farblosem DMEM High Glucose Medium (ohne FCS), das 5µM Fluo-4 AM (Stocklösung verdünnt 1:10 in DMSO) enthielt, überschichtet. Nach einer Inkubationsphase für 20-30 Minuten bei 37° C wurden die Deckgläschen in eine Messkammer, die bereits 1ml Puffer enthielt, umgesetzt und diese wurde auf dem Trägertisch des konfokalen Mikroskops (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar) befestigt.

Während der Messung wurde mithilfe eines Mikropumpensystems diese Messkammer kontinuierlich von Extrazellulärlösung (siehe I.2.1.) bzw. dem entsprechenden Stimulanz perfundiert.

Mit einem luftgekühlten Argon-Laser-System (Uniphase, San Jose, USA) erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von 488nm, wobei die dabei emittierte Fluoreszenz ca. alle 2 Sekunden von einem Scanner-System (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar) bei

500-540nm detektiert wurde. Zur Aufzeichnung der Daten wurde ein 20x Immersionsöl Objektiv verwendet.

Veränderungen der Fluoreszenzsignale wurden mit der Leica Confocal Software v.2.6.1 (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet. Hierzu wurden sogenannte ROIs (Region of Interest) über die Areale einzelner Zellen gelegt und die Änderungen in diesen Regionen zeitlich integriert. Die so gewonnenen Datensätze wurden anschließend in das Programm Graphpad exportiert und als Grafiken visualisiert.

## **II.10. Gelatine-Zymographie**

Die Zymographie – Methode kann genutzt werden um die enzymatische Aktivität Matrix degradierender Proteine zu quantifizieren [58]. Speziell die Gelatine-Zymographie wird verwendet um die Aktivität von sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zu bestimmen.

Dazu wurden HTPCs in 60mm Kulturschalen ausgesät und mit TNF $\alpha$  in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden nach jeweils 24 bzw. 48 Stunden entnommen und sofort bei 300g zentrifugiert, um eventuelle Zellverunreinigungen von den Überständen zu separieren. Die anschließende Lagerung der Überstände erfolgte bei  $-80^{\circ}$  C.

Um die Konzentration an Enzym in der jeweiligen Probe zu erhöhen, wurden die Überstände auf Amicon Filtertubes der Größe 10kDA (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, Millipore, USA) geladen und für ca. 1 Stunde bei 4000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mithilfe des Bradford Protein DC Assays bestimmt und jeweils 20 $\mu$ g Protein pro Probe auf das SDS/Gelatine Gel geladen.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen erfolgte dann die Auftrennung von in Zellkulturüberständen enthaltenen Enzymen in einem SDS-Page Gel. Dieses Gel (Trenngel) wird mit Haushaltsgelatine (1mg/ml) kopolymerisiert und stellt das Substrat für die Enzyme dar. Die Auftrennung wird bei sehr niedriger Stromstärke (ca. 25min bei 20mA und dann in der Folge 40mA für ca. 90 Minuten) durchgeführt um eine etwaige Beeinträchtigung der Enzyme zu vermeiden. Nach erfolgter Separation werden die SDS-Gele zweimal für 20 Minuten in einem MMP-Puffer mit Triton X-100 (2,5 %) gewaschen und anschließend für ca. 16 Stunden bei 37 $^{\circ}$  C mit einem MMP-Inkubationspuffer überschichtet (siehe I.2.1.).

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Blue R-250 (0,5%) für 1 Stunde und die Entfärbung wurde bis zur Einstellung des optimalen Kontrasts mit Entfärberlösung (45%

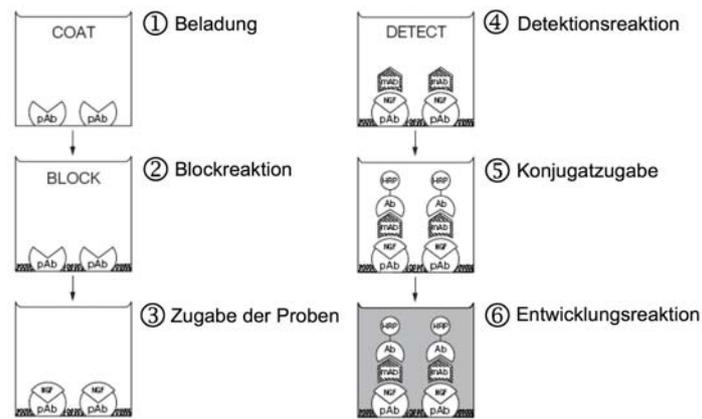
Methanol, 10% Ethanol) wiederholt. Dabei stellten sich die Zonen, in denen ein erfolgreicher Verdau der Gelatine erfolgt war, als eine helle Bande dar. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (NikonPic, Nikon, Japan) und wurde an einem Leuchttisch vorgenommen. Die Bilder wurden anschließend digitalisiert und mit der Software Image J ausgewertet.

### **II.11. ELISAs (Enzyme linked immunoadsorbent assays)**

#### **II.11.1. Nerve growth factor-beta - ELISA**

Die Bestimmung von sezerniertem NGFb (Nerve growth factor - beta) im serumfreien Kulturüberstand wurde mithilfe des Emax NGF Elisas (Promega) durchgeführt. Dazu wurden HTPCs in 60mm Kulturschalen ausgesät und nach eine Anwachsperiode von 24 Stunden in DMEM +10% FCS unter serumfreien Bedingungen (FCS – freies DMEM) mit TNF $\alpha$  für 6 bzw. 24 Stunden stimuliert (5, 50 bzw. 100 ng/ml). Die Überstände wurden nach Abschluß der Stimulationsphase gesammelt und bei – 80° C bis zur Messung gelagert. Die in den Kulturschalen verbliebenen Zellen wurden wie unter Punkt I.7.1 beschrieben präpariert und die Proteinmenge pro Schale im Bradford Assay bestimmt. Dieser Wert wurde später in der Auswertung der Daten als Referenzgröße verwendet.

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde eine 96 Well Nunc Maxisorp Platte mit jeweils 100 $\mu$ l NGF (polyklonaler Antibody) in einem Carbonat Buffer (Inhalt des Kits) über Nacht beladen und am folgenden Tag wurde nach einem Waschschrift die Applikation der Proben bzw. der Standardverdünnungen für insgesamt 6 Stunden durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde nun der monoklonale Antikörper (Anti-NGF capture) hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Schließlich erfolgte (nach Waschschriften) die Detektionsreaktion, indem ein Anti-Ratten IgG Merrettichperoxidase Konjugat hinzugefügt wurde und dieses den Anti-NGF capture Antikörper absättigte. Durch Zugabe einer Entwicklerlösung konnte schließlich die Detektionsreaktion induziert werden und nach Abstoppen (mit HCl) von dieser die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Abbildung 8 fasst das Prinzip des ELISAs zusammen.



**Abbildung 8: Prinzip des NGF Emax Elisa**

Die Daten relativiert zur jeweiligen Proteinkonzentration wurden mithilfe des Programms GraphPad weiterhin evaluiert. Insgesamt wurden für die Bestimmung der NGF Konzentrationen HTPCs von 5 verschiedenen Patientenisolaten verwendet und jede dieser Messungen erfolgte zumindest in Doppelbestimmung. Statistische Unterschiede zwischen behandelten und Kontrollzellen wurden mit dem ONE-WAY ANOVA Test untersucht.

### II.11.2. Macrophage chemoattractant protein – 1 (MCP-1) ELISA

Die Bestimmung der MCP-1 Konzentration im Mediumüberstand erfolgte im Wesentlichen ähnlich zum zuvor beschriebenen NGF-Elisa, mit der Ausnahme, dass dem Medium 2.5% FCS zugesetzt wurde (entsprechend den Angaben des Herstellers). Zur Messung wurde ein kommerzieller MCP-1 Elisa (Quantikine CCL-2/MCP-1 ELISA; R&D Systems, Wiesbaden) verwendet (Assay Spezifikationen: Detektionsbegrenzung 5.0 pg/ml; keine wesentliche Kreuzreaktion mit anderen chemotaktischen Proteinen). Nach entsprechenden Stimulationszeiträumen (jeweils 6 bzw. 24 Stunden mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  – 24 Stunden für die Dosis-Wirkungsexperimente) wurden die Überstände gesammelt, bei -80° Grad Celsius gelagert oder direkt gemessen. Für die aufgeführten Messungen wurden Materialien von insgesamt 4 verschiedenen Patienten verwendet und zu den zuvor bestimmten zellulären Proteingehalten normalisiert.

### II.12. cDNA-Array

Zur Untersuchung der Genexpression von humanen peritubulären Zellen wurde der ECM (Extracellular Matrix) and Adhesion Gene Array (Super Array, SABiosciences, USA) verwendet. Dazu wurden HTPCs von 3 verschiedenen Patientenisolaten jeweils 180 min lang mit dem jeweiligen Stimulanz behandelt und unmittelbar darauf die mRNA als Ausgangsmaterial für die benötigte cDNA gewonnen. Falls notwendig (bei nur gering

konzentrierter mRNA) wurde dem RT – Schritt eine Fällungsreaktion vorgeschaltet. Hierzu wurde die gesamte mRNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt, mit 10 µl Natriumacetat (3M, pH 5,5) und 275 µl Ethanol (100%) versetzt und dieser Ansatz bei –20° über Nacht ausgefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 10.000 U/min für ca. 60 min und das dabei gewonnene Pellet wurde im Anschluß mit 70% Ethanol gewaschen und nach Abnahme des Überstandes getrocknet.

Insgesamt wurden für die RT jeweils 3,5µg mRNA verwendet. Mit Biotin-dUTP wurden die Proben daraufhin prähybridisiert und die so biotinylierten cDNA – Proben über Nacht auf die Array-Membranen gegeben. Für die Chemilumineszenzdetektion des Genarrays wurde der GEArray Chemiluminescent Detection Kit verwendet. Die Belichtung wurde mit Hilfe des Chemi-Smart 5000 (Pqlab, Vilber, Lourmat) und des Programms ChemiCapt vorgenommen. Die Evaluation der einzelnen Genspots wurde mit dem Program ImageJ durchgeführt, wobei als Bezugsgröße jeweils die gemittelte optische Dichte der Housekeeping Gene der benützten Membran verwendet wurden. Die im Ergebnisteil aufgeführten Gene unterschieden sich zu Kontrollbedingungen um wenigstens den Faktor 2, alle anderen Spots wurden nicht berücksichtigt.

### **II.13. Morphologische Untersuchungen (Semidünnschnitte)**

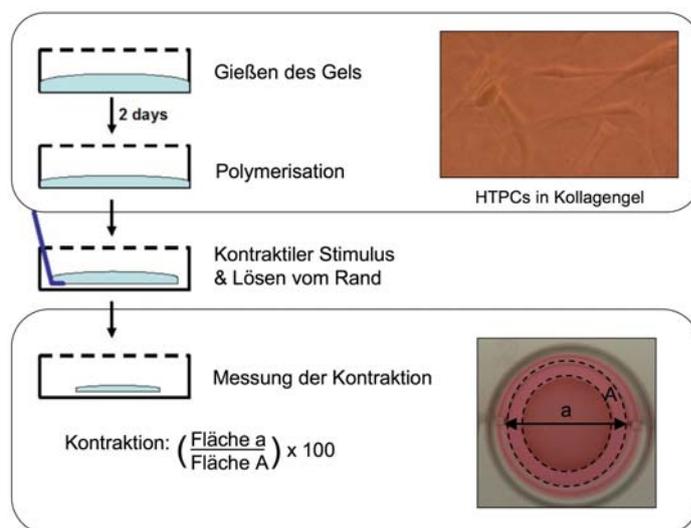
HTPCs wurden auf Deckgläschen in 24 Well Kulturplatten kultiviert und nach einer durchschnittlichen Anwachsperiode von 3-4 Tagen mit den entsprechenden Reagenzien stimuliert. Nach Abschluß der Stimulationsphase erfolgte die Fixation mit Glutaraldehyde (2,5%) in Natrium-Cacodylat-Puffer I für eine Stunde. Dann wurden die Zellen 2x mit PBS für ca. 5 Minuten gewaschen, bevor die Postfixierung für 1 Stunde mit einer Mischung aus Osmiumtetroxid (0,04 M) und Kaliumhexacyanoferrat (II) (0,1 M) durchgeführt wurde. Wiederum wurde ein zweimaliger Waschschrift mit PBS für 5 min vorgenommen. Dann wurden die Deckgläschen je 10 Minuten mit Ethanol (50%, 70%, 80%, 95%) und 3 x 10 Minuten mit Ethanol (100%) versetzt, um sie zu entwässern. Es folgte eine Überführung in Epon (Merck)/Ethanol 1:1 für 10 Minuten, Epon/Ethanol 2:1 für 20 Minuten und schließlich 2 x 20 Minuten in Epon (100%) bzw. über Nacht bei Raumtemperatur. Diese Schritte dienen letztlich der Entfernung des Ethanol aus den Präparaten.

Die Polymerisation des Epon-Harztes erfolgte dann für 16 – 24 Stunden bei ca. 60°. Die dabei entstehende, harte Scheibe wurde in flüssigen Stückstoff eingetaucht, um eine bessere Ablösung aus den 24 Wellplatten zu ermöglichen. Aus dieser Scheibe wurden im Anschluss Stücke herausgesägt und auf Halterungen montiert. Aus diesen Präparaten wurden Semidünnschnitte (1µM) hergestellt.

Semidünnschnitte wurden mit Azur II/Methylenblau gefärbt und mit dem Lichtmikroskop (Axioplan, Zeiss) evaluiert. Die Semidünnschnitte wurden zur Einschätzung der morphologischen Integrität der Zellen auf Behandlungsreize angewendet.

## II.14. Kollagen-Gel-Kontraktionsassay

HTPCs wurden in der Gegenwart von 15dPGJ2 (10  $\mu$ M), NAC (1mM) alleine oder in der jeweiligen Kombination mit 15dPGJ2 (oder der entsprechenden Kontrolle Ethanol – 0.01%) in Medium (enthält 10% FCS) für 3 Wochen kultiviert. Nach Abschluß dieser Kulturperiode wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt (Neubauer improved Zählkammer) und jeweils 100.000 Zellen wurden in Wells (Nunc) überführt, die bereits eine Kollagengelmatrix enthielten (Cell contraction assay, Cell Biolabs, San Diego, USA). Nach einer Phase von 2 Tagen, in der das Gel polymerisiert und die Zellen in dieses einwachsen, wurde der Kontraktionsassay in Medium ohne FCS durchgeführt. Als kontraktionsauslösende Stimulantien wurde FCS (in einer 5% Konzentration) verwendet. Dazu wurde das Stimulanz dem Medium zugefügt und nach 1 Stunde die gedehnte Matrix vom umgebenden Rand der Meßkammer abgelöst. In der folgenden Abbildung sind die wesentlichen Schritte des Assays zusammengefasst:



**Abbildung 9: Schematische Zusammenfassung des Kontraktionsassayprinzips.** In einem ersten Schritt werden stimulierte HTPCs in das Gel eingegossen und nach einer 2-tägigen Polymerisationsphase erfolgt die Stimulation mit einem kontraktilem Reiz. Nach Ablösung der gestressten Matrix, kann der Grad der Kontraktion im Vergleich zur Grundfläche berechnet werden.

Kurz nach der Loslösung wurden Bilder der freischwimmenden Gelmatrizen aufgenommen, ebenso nach 24 und 48 Stunden. Um die jeweilige Kontraktion zu bestimmen, wurde die Flächenänderung der Gelmatrix in Relation zur Grundfläche des Wells berechnet. Die Fläche der Gelmatrizen wurde hierbei mit der Software ImageJ bestimmt. Alle Messungen wurden mit Zellen von 3 verschiedenen Patienten durchgeführt.

### II.15. Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

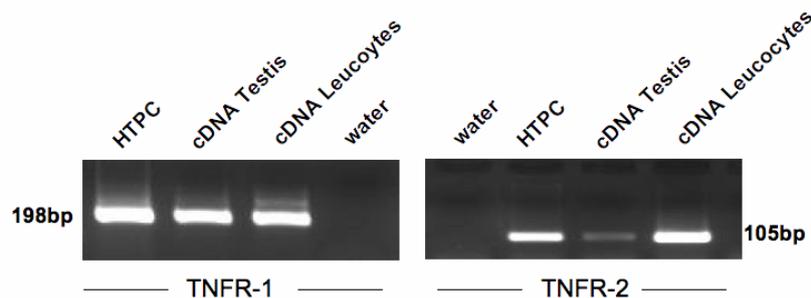
Die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde mithilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH<sub>2</sub>-DA) gemessen. DCFH<sub>2</sub>-DA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ist ein zellpermeabler Farbstoff, der mittels Abspaltung der Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen in der Zelle akkumuliert und weiterhin durch Oxidation zum stark fluoreszierenden DCF umgesetzt wird. Zur Messung von ROS, wurden HTPCs auf Deckgläschen in subkonfluenter Dichte ausgesät und für 4 Stunden mit oder ohne 15dPGJ2 (10 µM) behandelt. In Versuchen mit dem unspezifischen Antioxidans N-Acetylcystein erfolgte eine halbstündige Präinkubation der HTPCs, bevor schließlich 15dPGJ2 hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (10 mM, pH 7.4) gewaschen und in FCS-freies Medium überführt, das DCFH<sub>2</sub>-DA in einer Konzentration von 10 µM enthielt (Dauer 30 min). Nach diesem Beladungsschritt wurde die Fluoreszenz von DCF mittels einem konfokalen Mikroskop gemessen (Leica TCS SP2 – Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Die verwendeten Wellenlängen hierbei waren: Exzitation von 488 nm, sowie Emission von 520 +/- 20 nm.

### III. Ergebnisse

#### III.1. HTPCs als mögliche Zielzellen für TNF $\alpha$

##### III.1.1. Molekularbiologische Charakterisierung der TNF-Rezeptoren

Zum Nachweis von TNF $\alpha$  Rezeptoren in HTPCs wurde aus 4 verschiedenen Patientenisolaten RNA gewonnen und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Im Folgenden wurde diese cDNA mit spezifischen Primern für beide TNF-Rezeptoren (siehe Tabelle 1) untersucht und dabei konnte die Expression sowohl von TNFR-1 als auch TNFR-2 in HTPCs bestätigt werden (Abbildung 10). Um die Bedingungen der RT-PCR/PCR und die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurden die Versuche ebenfalls mit kommerzieller cDNA aus Hodengewebe und Leukozyten durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluß an die Gelelektrophorese aufgereinigt und sequenziert. Ein Vergleich der so erhaltenen Sequenzen mittels dem Programm BLAST (siehe Methoden) bestätigte die Identität der PCR-Produkte als TNFR-1 und TNFR-2.

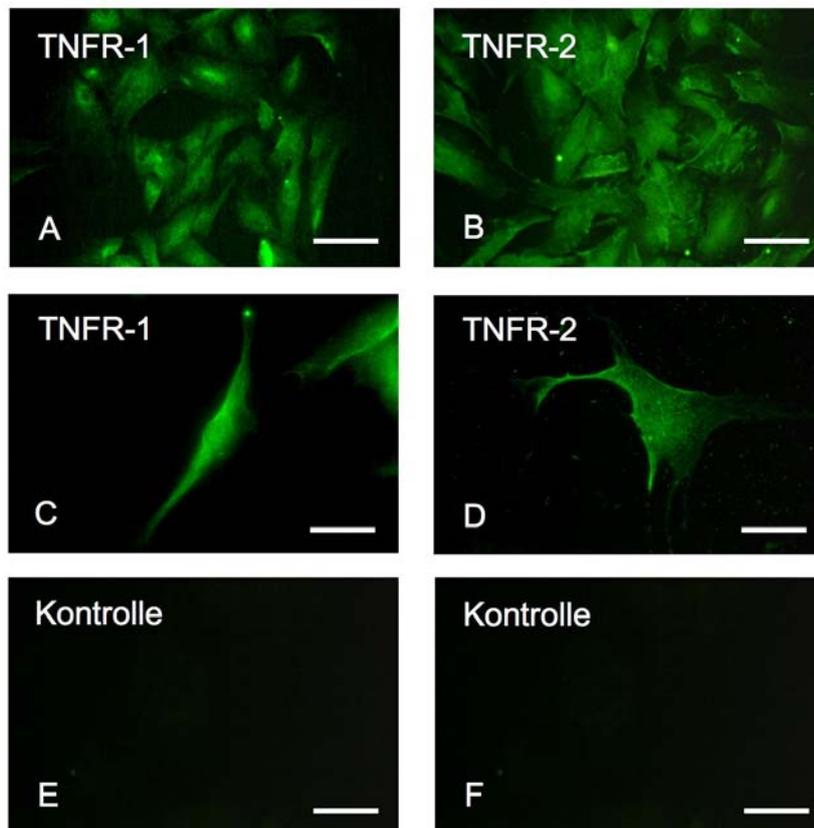


**Abbildung 10: Nachweis für die mRNA Expression von TNFR-1 und TNFR-2 in HTPCs.** Mittels RT-PCR Methodik konnte die Expression von TNFR-1 (198 Basenpaare) und TNFR-2 (105 Basenpaare) in HTPCs bestätigt werden. Diese Ergebnisse konnten im Vergleich mit kommerziellen cDNA Banken (human testis, leucocytes) validiert werden.

##### III.1.2. Nachweis von TNF $\alpha$ – Rezeptoren mittels Immunfluoreszenz

Um die Expression der TNF $\alpha$  – Rezeptoren auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunzytochemische Experimente mit HTPCs durchgeführt. Hierzu wurden HTPCs aus insgesamt drei unterschiedlichen Patientenisolaten auf Deckgläschen kultiviert und mit spezifischen Antikörpern, die gegen TNFR-1 und TNFR-2 (Tabelle 4) gerichtet sind, untersucht. Dabei konnten die Ergebnisse aus den RT-PCR/PCR Experimenten bestätigt werden und es fand sich sowohl für TNFR-1 als auch für TNFR-2 eine Lokalisation an der Plasmamembran (in geringem Maß auch im Bereich des Zytoplasmas; Abbildung 11). Ein

Vergleich mit den Durchlichtbildern ergab, dass ca. 80% aller HTPCs positiv für beide TNF $\alpha$  – Rezeptoren waren. Humane PTCs, die ohne Erstantikörper (Kontrolle) oder aber mit Normalserum (jeweilige Spezies des Erstantikörpers) behandelt worden waren, zeigten keine Färbung.



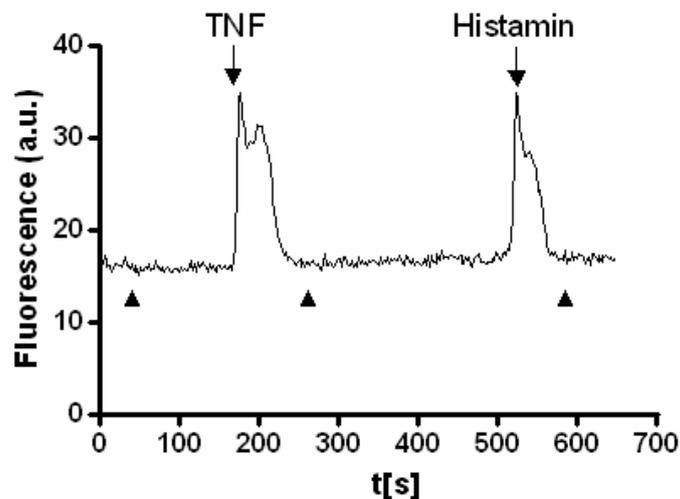
**Abbildung 11: HTPCs zeigen eine deutliche Immunfluoreszenz für TNFR-1 und TNFR-2.** Bild A und B zeigen eine Übersichtsaufnahme von HTPC Kulturen (Balken entsprechen ca. 20  $\mu$ m), wobei sich eine deutliche Fluoreszenz für ca. 80-90% der untersuchten Zellen beobachten lässt. Bei Betrachtung von Einzelzellen (Bild C und D) stellt sich, v.a. für TNFR-2, die Plasmamembran gefärbt dar (Balken entsprechen ca. 5 $\mu$ m). In Bild E und F finden sich die entsprechenden Kontrollen, wobei der jeweilige Erstantikörper nicht verwendet wurde.

### III.1.3. Funktionalität der TNF $\alpha$ – Rezeptoren

#### III.1.3.1. Calcium-Imaging

Die Funktionalität der TNF $\alpha$ -Rezeptoren wurde weiterhin in Calcium-Imaging Experimenten untersucht. Dazu wurden HTPCs auf Deckgläschen für ca. 2-3 Tage kultiviert und für die jeweilige Untersuchung für 25-30 Minuten mit dem Farbstoff Fluo-4 AM beladen. Nach

Kalibrierung des konfokalen Mikroskops wurde jeweils eine Gruppe von ca. 20-30 Zellen pro Gesichtsfeld eingestellt und eine Messreihe mit einer Bildrate von einem Bild pro 2sec gestartet. Die Zellen wurden während der gesamten Messung von extrazellulärem Puffer umspült. TNF $\alpha$  wurde mit einer Applikationsvorrichtung in Konzentrationen von 10 – 100 ng/ml an die Zellgruppen für maximal 60 Sekunden angespült und im Anschluß erfolgten Phasen der Pufferspülung (weiteres siehe Material&Methoden II.9.). Insgesamt wurden HTPCs aus 6 verschiedenen Patientenisolaten verwendet, wobei sowohl sehr niedrige Passagen (d.h. bereits kurz nach Explantation) als auch höhere (Passage 6-9) der entsprechenden Isolate untersucht wurden. In rund 10% aller untersuchten Zellen konnten deutliche Calciumsignale auf TNF $\alpha$  – Stimulation mit 100 ng/ml detektiert werden, es ergab sich jedoch kein Zusammenhang mit der Passagenzahl. Derselbe experimentelle Ansatz wurde zudem unter calciumfreien Bedingungen wiederholt und die Calciumsignalhöhe als auch Anzahl der reagierenden Zellen änderte sich hierbei nicht. Da funktionelle Histaminrezeptoren für HTPCs bereits beschrieben sind [10], wurde in jedem Experiment Histamin in einer Konzentration von 10 $\mu$ M im Anschluß an die TNF $\alpha$  Stimulationen appliziert und hierbei reagierten nahezu 100% der HTPCs mit deutlichen Calciumsignalerhöhungen.

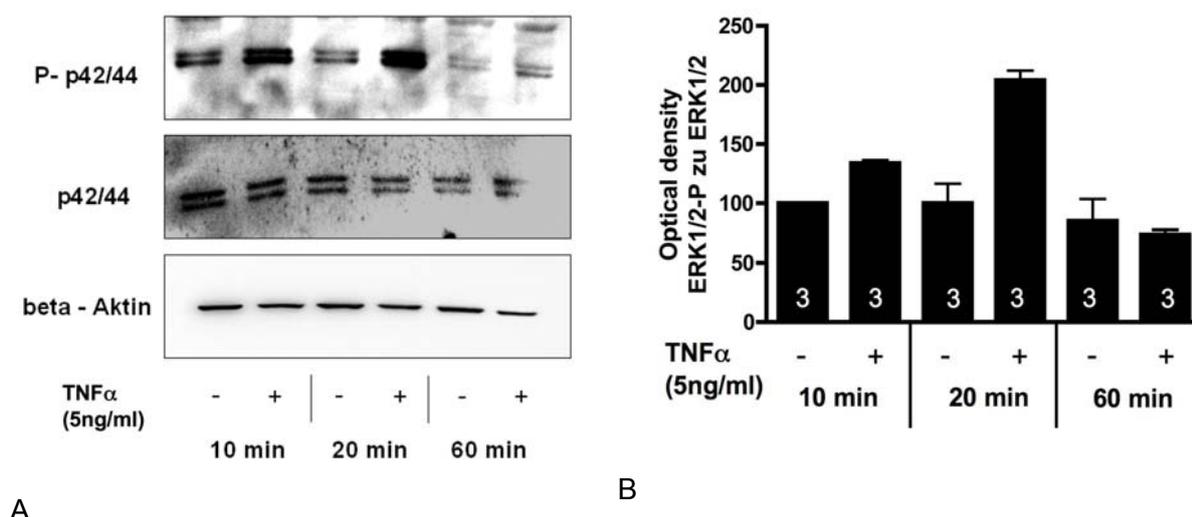


**Abbildung 12: TNF $\alpha$  führt nur in ca. 10% der HTPCs zu intrazellulärer Calciumerhöhung.** HTPCs wurden in diesem Experiment für ca. 130 Sekunden mit extrazellulärem Puffer umspült (kleines schwarzes Dreieck) und schließlich mit TNF $\alpha$  (100ng/ml) kurzzeitig stimuliert. Der Anstieg in der Fluoreszenz spiegelt in diesem Fall die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wieder und kann anhand der Ordinate (Fluoreszenz – a.u. = arbitrary units) abgelesen werden. Eine erneute Applikation von Pufferlösung (s.o.) führt hierbei zur Normalisierung der Calciumniveaus, bis schließlich mit der Zufuhr

von Histamin ( $10\mu\text{M}$ ) wiederum ein Anstieg zu verzeichnen ist. Dargestellt ist eine exemplarische Messung anhand einer Zelle aus der Versuchsreihe ( $n = 10$  – eines Patientenisolats).

### III.1.3.2. Phosphorylierung der p44/p42 (ERK1/2) MAP-Kinasen durch $\text{TNF}\alpha$

Im Rahmen der  $\text{TNF}\alpha$  Signaltransduktion (siehe Einleitung) werden verschiedenste Signalwege aktiviert, unter anderem auch die MAP-Kinase Kaskade (MAP steht für mitogen-activated protein). Ein wesentlicher Faktor in dieser Kaskade ist die ERK1/2 (extracellular regulated kinase), die durch Phosphorylierung aktiviert wird. Mittels eines Set an Antikörper (spezifisch gegen die phosphorylierte und wiederum ein weiterer Antikörper spezifisch gegenüber der unphosphorylierten Form) konnte unter  $\text{TNF}\alpha$  Stimulation (100 und 5 ng/ml) eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Transiente Phosphorylierung von p42/p44-Kinase durch  $\text{TNF}\alpha$  in HTPCs**

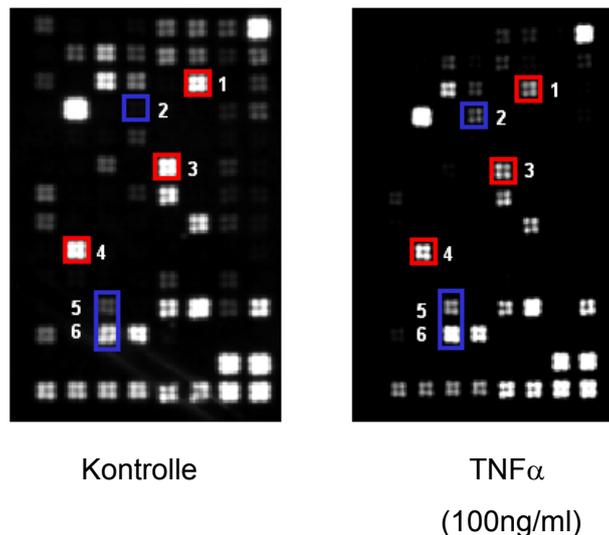
In Bild A findet sich die Darstellung eines repräsentativen Westernblot-Experiments, dass die transiente Phosphorylierung der p42/p44-Kinase zeigt. HTPCs wurden mit  $\text{TNF}\alpha$  (5ng/ml) für die angegebenen Zeiträume (10-60 min) stimuliert und der Vergleich der verschiedenen Proteinmengen für die phosphorylierte Form von p44/p42 zur inaktiven Form und einem weiteren housekeeping Protein (beta-Aktin), weist eine deutliche Aktivierung für den Zeitpunkt 10 und 20 Minuten nach. In Bild B findet sich die semiquantitative Auswertung der optischen Dichte von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten (3 verschiedene Patientenisolats) und zeigt ebenfalls eine deutliche Aktivierung, v.a. für den Zeitpunkt 20 Minuten an.

## III.2. Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Regulation der Extrazellulären Matrix (ECM)

### III.2.1. ECM-Genarray unter $\text{TNF}\alpha$ Stimulation

Um den Einfluß von  $\text{TNF}\alpha$  auf Strukturproteine oder den Umsatz regulierender Enzyme der extrazellulären Matrix (ECM) zu untersuchen, wurde auf kommerzielle Genarrays (Superarray) zurückgegriffen. Neben erwähnten Strukturproteinen, wie z.B. Kollagenen, sind auf diesen Arrays auch weitere Gene „gespottet“, die in den Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix involviert sind. Das Ausgangsmaterial für die Array-Untersuchungen stellten HTPCs aus 3 verschiedenen Patientenisolaten dar, die entweder mit Kontrollmedium (enthielt aqua bidest) oder aber mit  $\text{TNF}\alpha$  (100ng/ml) für 3 Stunden behandelt wurden. Die so gewonnene RNA wurde gepoolt und entsprechend den Herstellerangaben für die Experimente eingesetzt.

Nach Entwicklung der Membranen wurde mit Hilfe densitometrischer Auswertung jeder Genspot zur Intensität von Housekeeping Genen relativiert und die Kontroll bzw.  $\text{TNF}\alpha$  behandelten Proben auf Regulationsunterschiede hin evaluiert. Letztlich wurden nur Regulationsunterschiede mit einem Faktor größer 2 berücksichtigt.



**Abbildung 14: Massive Induktion von ICAM-1 durch  $\text{TNF}\alpha$  in HTPCs**

Darstellung zweier Blot-Membranen, auf denen Gensonden für Enzyme und Strukturgene zur Regulation der extrazellulären Matrix (ECM) aufgebracht sind. Rot umrandete Genspots sind im Vergleich zwischen Kontrolle und  $\text{TNF}\alpha$  behandelten Zellen in ihrer Expression herabreguliert, während blau umrandete Spots einer erhöhten Expression entsprechen. Die eingesetzten cDNA Proben wurden aus 3 verschiedenen Patientenisolaten gepooled und einer  $\text{TNF}\alpha$  Behandlung von 3 Stunden unterzogen. Den entsprechenden Zahlen finden sich bestimmte Gene zugeordnet

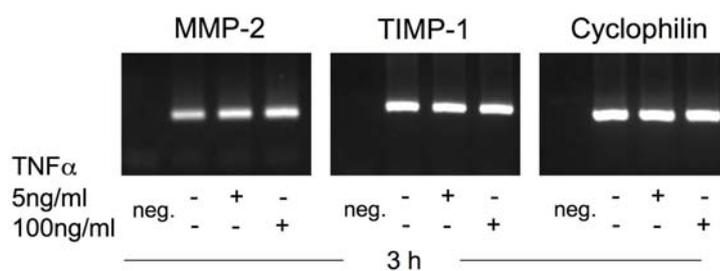
1 = Cathepsin – L	4 = MMP-2
2 = ICAM-1	5 = PAI-2
3 = Integrin-beta-1	6 = TIMP-1

### III.2.2. Keine Regulation von MMP-2 und TIMP-1 unter TNF $\alpha$

Da sich in der ECM-Analyse mittels Genarray letztlich nur geringe Änderungen feststellen ließen und diese hauptsächlich Enzyme betrafen, die an der Homöostase der ECM-Synthese bzw. Degradierung beteiligt sind, wurde eine weitere Evaluation mit einem semiquantitativen RT-PCR Ansatz durchgeführt.

Hierzu wurden erneut HTPCs aus 3 verschiedenen Patientenisolaten mit TNF $\alpha$  und Kontrollmedium behandelt und die so gewonnene RNA nach der RT-PCR- mit spezifischen Primern für MMP-2 und TIMP-1 in semiquantitativen PCR-Experimenten eingesetzt. Die Stimulationsdauer betrug für alle Experimente 3 Stunden und wurde letztlich für MMP-2 / TIMP-1 Ansätze auf 24 bzw. 48 Stunden ausgedehnt. Um Unterschiede in den eingesetzten RNA-Mengen zu detektieren wurden parallel PCR-Experimente für humanes Cyclophilin als Housekeeping Gen durchgeführt und die Intensität der Banden für MMP-2 und TIMP-1 mit der Intensität der respektiven Cyclophilin Bande verglichen.

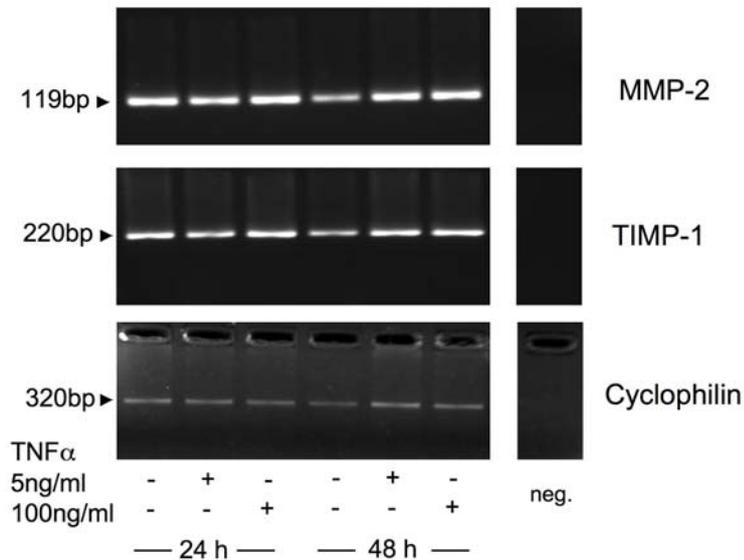
Für MMP-2 und TIMP-1 ergab sich zu keinem gewählten Zeitpunkt (3, 24, 48 Stunden) und unterschiedlichen TNF $\alpha$  Dosen (5 und 100ng/ml) eine Änderung in den mRNA-Mengen. Somit konnten die beobachteten Regulationen der Genarray-Experimente für MMP-2 und TIMP-1 nicht bestätigt werden.



**Abbildung 15.a: TNF $\alpha$  hat keinen Einfluß auf das Expressionsniveau von MMP-2 und TIMP-1 in HTPCs.**

In Stimulationsexperimenten für die Dauer von 3 Stunden

zeigen sich sowohl für die Intensität von MMP-2, als auch für TIMP-1 keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu Cyclophilin.



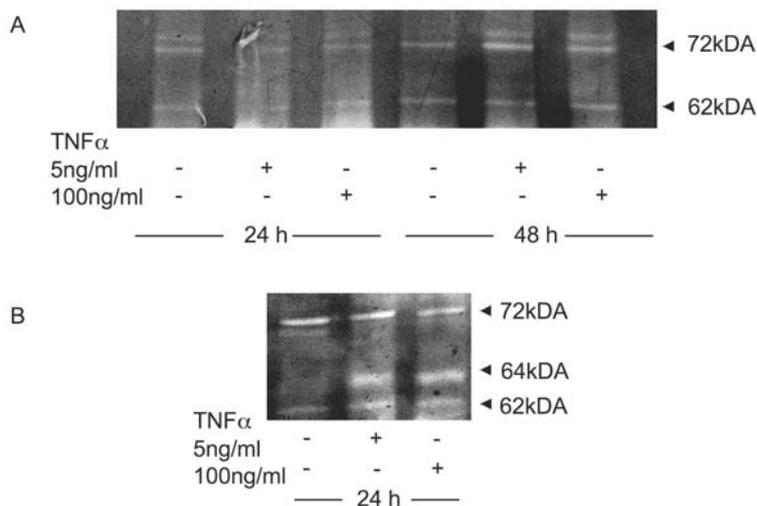
**Abbildung 15.b:** Desweiteren wurden die Experimente mit längeren Stimulationszeiträumen durchgeführt (24 und 48 Stunden) und in ähnlicher Weise zur Stimulation von 3 Stunden, finden sich auch hier keine Unterschiede in der Intensität und somit der Expression von MMP-2 und TIMP-1.

### III.2.3. Beeinflussung von MMP-2 Aktivität durch TNFα

Änderungen in der Aktivität der MMP (Matrix-Metallo-Proteinase) Enzyme können mit Genarray Analysen natürlich nicht erfasst werden, dafür bietet jedoch die Methode der Gelatinezymographie die Möglichkeit Änderungen in der Enzymaktivität spezifisch zu erfassen. Die MMP-2 liegt gewöhnlich als inaktives Molekül vor, das in der Gelatinezymographie mit einer Größe von 72 kDA erkannt werden kann. Jede Aktivitätsänderungen der MMP-2 spiegelt sich somit in einer Zunahme der aktiven MMP-2 Form (62 kDA) wider.

HTPCs wurden jeweils 24 bzw. 48 Stunden mit TNFα (5 bzw. 100ng/ml) oder Kontrollmedium (enthält aqua bidest) behandelt und nach Ablauf dieser Stimulationsdauer wurden die Überstände der Kulturschalen gesammelt. Nach Konzentration und Proteingehaltsmessung der einzelnen Proben (siehe Material u. Methoden) wurden jeweils gleiche Mengen der Überstände auf die SDS- Gele (mit Gelatine kopolymerisiert) geladen. In 2 der 4 untersuchten Patienten isolate (insgesamt n=4) erschienen unter TNFα Behandlung sogenannte *latent aktive* Banden mit einer Größe von 64 kDA, die einen Hinweis auf Aktivierung liefern können. In allen anderen untersuchten Proben fanden sich jedoch keine Änderungen in Hinblick auf die aktive MMP-2 Form (62 kDA). Somit erscheint die Aktivierung von MMP-2 durch TNFα in HTPCs einem heterogenen, evtl. Patienten isolate abhängigen Muster zu unterliegen.

Eine eindeutige Aussage über die Aktivitätsbeeinflussung des Enzyms ließ sich im gewählten experimentellen Ansatz somit nicht erzielen.



**Abbildung 16: Aktivitätszustand von MMP-2 in HTPCs unter TNF $\alpha$  Stimulation**

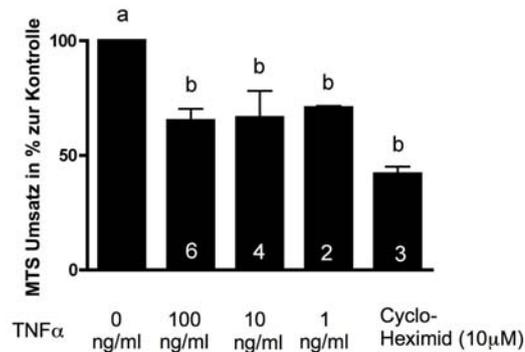
Bild A zeigt das Beispiel eines repräsentativen Patientenisolats, das unter TNF $\alpha$  Stimulation sowohl zum Zeitpunkt 24 als auch 48 Stunden keine Aktivierung der MMP-2 aufweist. In Bild B hingegen, kann die latent aktive Form der MMP-2 (64 kDA) unabhängig von der gewählten TNF $\alpha$  Konzentration beobachtet werden.

### III.3. Einfluß von TNF $\alpha$ auf das Proliferationsverhalten von HTPCs

#### III.3.1. Minderung der metabolischen Aktivität unter TNF $\alpha$

Veränderungen in der metabolischen Aktivität, die wiederum mit vermehrter mitochondrialer Aktivität korreliert, können mit kommerziellen MTS-Assays gemessen werden (siehe Material und Methoden – MTS). HTPCs wurden nach einer Zellzyklusarretierung mit verschiedenen TNF $\alpha$  Konzentrationen (1, 10, 100 ng/ml) für insgesamt 48 Stunden behandelt und im direkten Anschluß wurden MTS-Assays mit den Zellen durchgeführt. Die Experimente wurden für jede Konzentration mit mindestens 2 verschiedenen Patientenisolaten durchgeführt (als weiße Index-Zahlen angegeben) und dabei ergab sich ein Trend, der eine Minderung der metabolischen Aktivität bzw. Zellzahl (Vitalität) beschreibt. Dieser Trend war größtenteils unbeeinflusst von der gewählten Dosis, so dass sich hierbei keine klare Dosis-Wirkungsbeziehung beobachten ließ. Als Positivkontrolle (d.h. maximale Minderung des MTS-Umsatzes) wurde Cycloheximid verwendet, ein klassischer Translationshemmer und damit geeignet zur Induktion der Apoptose. In den Experimenten mit Cycloheximid ergab sich

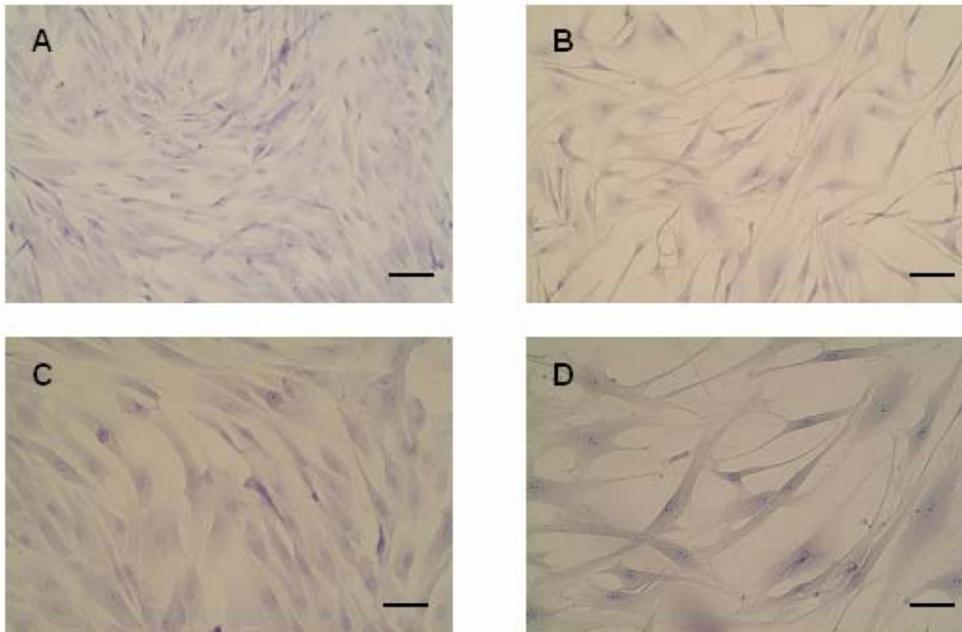
eine Minderung des MTS-Umsatzes auf ein Niveau von ca. 45% und lag damit sehr viel niedriger als alle untersuchten  $\text{TNF}\alpha$  Konzentrationen. Die statistische Überprüfung ergab signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Zellpopulationen und den Kontrollbedingungen auf einem Niveau von  $p < 0.001$ .



**Abbildung 17:  $\text{TNF}\alpha$  mindert metabolische Aktivität in HTPCs.** Unabhängig von der gewählten  $\text{TNF}\alpha$  Konzentration zeigt sich nach einer Behandlung von 48 Stunden eine deutliche Minderung des MTS-Umsatzes in HTPCs. Als Positivkontrolle wurde Cycloheximid gewählt – hierbei konnten die deutlichsten Minderungen im MTS-Umsatz beobachtet werden. Weiße Indexzahlen entsprechen „n“ – Versuchen. Kleinbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede auf einem Niveau von  $p < 0.001$  an.

### II.3.2. Morphologische Untersuchung und Zytotoxizität von $\text{TNF}\alpha$

Zu den zahlreichen Wirkungen von  $\text{TNF}\alpha$  zählt auch die Induktion von Apoptose. Um etwaige zytotoxische Effekte an HTPCs zu evaluieren, wurden zellmorphologische Untersuchungen angestrengt. Dabei wurden HTPCs unter identischen Bedingungen der MTS-Versuche mit  $\text{TNF}\alpha$  (5 und 100ng/ml) für 48 Stunden inkubiert und anschliessend fixiert, eingebettet und geschnitten (siehe Material und Methoden). Nach der Färbung (Azur II / Methylenblau) wurden behandelte und Kontroll-Zellen lichtmikroskopisch evaluiert und dabei ließen sich keine offensichtlichen Veränderungen in Hinblick auf Nekrosen / zytotoxische Effekte zwischen beiden Gruppen finden.



**Abbildung 18: Keine sichtbaren zytotoxischen Veränderungen durch TNF $\alpha$  in HTPCs**

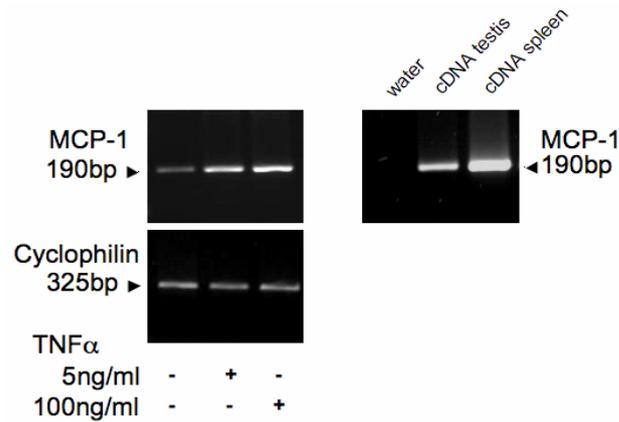
In Bild A und C finden sich Darstellungen von Kontrollzellen, wohingegen in Bild B und D mit TNF $\alpha$  (5ng/ml) behandelte Zellen gezeigt werden. Die Behandlungsdauer betrug insgesamt 48 Stunden. Bild C und D wurden mit einer stärkeren Vergrößerung aufgenommen. Die Balkengröße beträgt in Bild A&B 40 $\mu$ m, und in Bild C&D 20 $\mu$ m.

### III.4. Einfluß von TNF $\alpha$ auf die Expression inflammatorischer Marker in HTPCs

#### III.4.1. Regulation des Macrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP1)

TNF $\alpha$  ist allgemein als ein äußerst potentes proinflammatorisches Molekül beschrieben. Inwieweit jedoch HTPCs unter *in vitro* Bedingungen mit einer inflammatorischen Antwort auf eine TNF $\alpha$  Stimulation reagieren, ist unbekannt. Aus diesem Grund wurden HTPCs wie bereits beschrieben mit TNF $\alpha$  (5 und 100ng/ml) für 3 Stunden behandelt und wichtige Marker der testikulären Inflammation, wie beispielsweise MCP-1, untersucht.

RNA von HTPCs, die mit TNF $\alpha$  inkubiert wurden, wurde für RT-PCR und im Folgenden für semiquantitative PCR-Experimente verwendet (3 verschiedene Patientenisolate). mRNA für MCP-1 fand sich unter diesen Bedingungen auch schon unter basalen Verhältnissen (Kontrollzellen). Nach einer Stimulationsdauer von 3 Stunden fanden sich sowohl mit Konzentrationen von 5ng/ml als auch 100ng/ml TNF $\alpha$  deutliche Zunahmen in den mRNA Mengen für MCP-1.

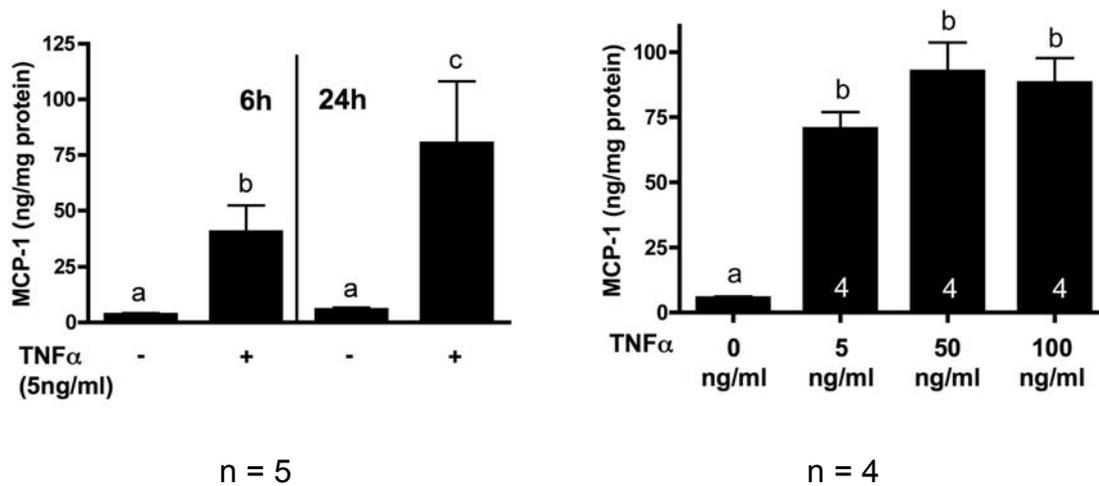


**Abbildung 19: TNF $\alpha$  führt zu verstärkter Expression von MCP-1 in HTPCs**

Auch unter basalen Bedingungen (keine TNF $\alpha$  Stimulation) findet sich eine geringfügige Expression von MCP-1 mRNA in HTPCs. Unter Stimulation mit TNF $\alpha$  (5 und 100 ng/ml für 3 Stunden) zeigt sich eine deutliche Zunahme dieser Niveaus im Vergleich mit dem Housekeeping Gen Cyclophilin. Die Identität des Produkts wurde schließlich durch Sequenzierung bestätigt. Als positive Kontrollen wurden kommerzielle cDNA Banken (Hoden und Milz - human) verwendet.

### III.4.2. Bildung von MCP-1

In seiner wesentlichen Funktion als Makrophagen steuerndes Chemokin, wird MCP-1 in entzündlichen Zuständen in das interstitielle Gewebe sezerniert. Mittels ELISA Methodik konnte an TNF $\alpha$  stimulierten HTPCs gezeigt werden, dass auch HTPCs MCP-1 in das Medium sezernieren. HTPCs wurden hierzu sowohl für 6, als auch für 24 Stunden mit TNF $\alpha$  stimuliert und im Anschluß daran, die Überstände gesammelt und die Konzentration gemessen. In diesen Experimenten an insgesamt 5 verschiedenen Patientenisolaten zeigte sich schon bereits nach 6 Stunden ein deutlicher Anstieg in der Konzentration von MCP-1 in den Überständen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Verwendung von verschiedenen TNF $\alpha$  Konzentrationen (5, 50, 100 ng/ml), wobei eine Konzentration von 50 ng/ml bereits einen maximalen Effekt aufwies. Auch hierbei wurden 4 verschiedene Isolaten verwendet.



**Abbildung 20: TNF $\alpha$  stimuliert zeit- und dosisabhängig die Sekretion von MCP-1 durch HTPCs**

In Abbildung A zeigt sich die deutliche Zunahme der Konzentration von MCP-1 im Mediumüberstand von HTPCs, die jeweils 6 oder 24 Stunden mit TNF $\alpha$  (5 ng/ml) stimuliert wurden. Die statistische Analyse auf signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Konzentrationen (n=5 verschiedene Patientenisolat) fiel positiv aus, und zwar auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  (signifikante Unterschiede wurden mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben in der Abbildung markiert). In Abbildung B sind die Konzentrationen von MCP-1 bei Verwendung verschiedener TNF $\alpha$  Dosen dargestellt. Hierbei zeigt sich schon ein deutlicher Effekt bei einer minimalen Stimulationskonzentration von 5 ng/ml und eine maximale Wirkung im untersuchten Konzentrationsbereich bei 50 ng/ml. Es wurden in diesen Versuchen insgesamt 4 verschiedene Patientenisolat gemessen und die Dauer der Stimulation betrug 24 Stunden.

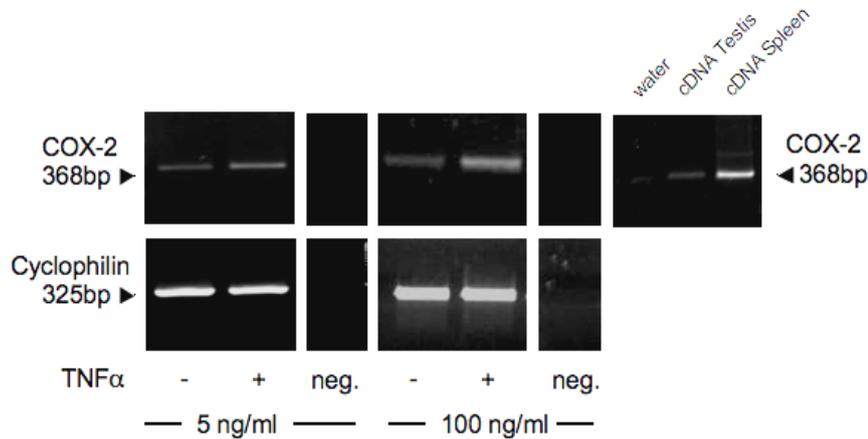
#### III.4.2. Regulation von COX-2

Neben den bereits beschriebenen proinflammatorischen Molekülen, spielen vor allem Prostaglandine als ubiquitäre Mediatoren von Entzündungsgeschehen eine entscheidende Rolle in der testikulären Inflammation. Geschwindigkeitslimitierendes Enzyme in der Synthese von Prostaglandinen ist das Enzym Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2).

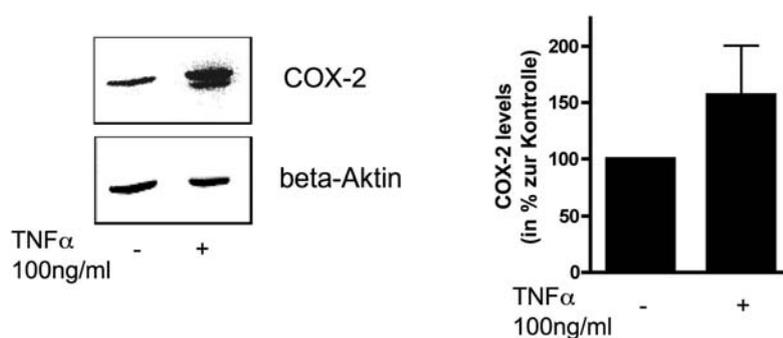
In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die COX-2 mRNA Menge unter TNF $\alpha$  Stimulation zunimmt und dafür wurden, wie bereits beschrieben, HTPCs mit TNF $\alpha$  für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die so gewonnene RNA in semiquantitativen RT-PCR Experimenten eingesetzt. Es zeigte sich hier sowohl für 5 als auch 100 ng/ml TNF $\alpha$  eine deutlich verstärkte Expression von COX-2 mRNA.

Um die so gewonnenen Ergebnisse auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden insgesamt 3 verschiedene Patientenisolat mit TNF $\alpha$  für 3 Stunden inkubiert und

Proteinproben für Westernblot-Experimente verwendet. Mit spezifischen Antikörpern, die gegen COX-2 gerichtet sind, wurden in diesen Versuchen, die zuvor bereits in den RT-PCR Experimenten gewonnen Ergebnisse bestätigt. Somit fand sich in allen untersuchten Proben eine signifikante Zunahme der spezifischen Bande von COX-2 unter TNF $\alpha$  Stimulation.



**Abbildung 21.a: COX-2 Expression wird durch TNF $\alpha$  in HTPCs reguliert.** Mittels semiquantitativer RT-PCR Experimente (n = 3) an HTPCs konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit TNF $\alpha$  (5 oder 100 ng/ml) für eine Dauer von 3 Stunden in einer deutlichen Zunahme an mRNA Mengen für COX-2 resultiert. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass bereits unter basalen Bedingungen, d.h. ohne TNF $\alpha$  Stimulation, eine Expression messbar ist. Die Identität der PCR Produkte wurde schließlich durch Sequenzierung bestätigt. Als Positivkontrollen wurden kommerzielle cDNA Banken verwendet (human testis, spleen).

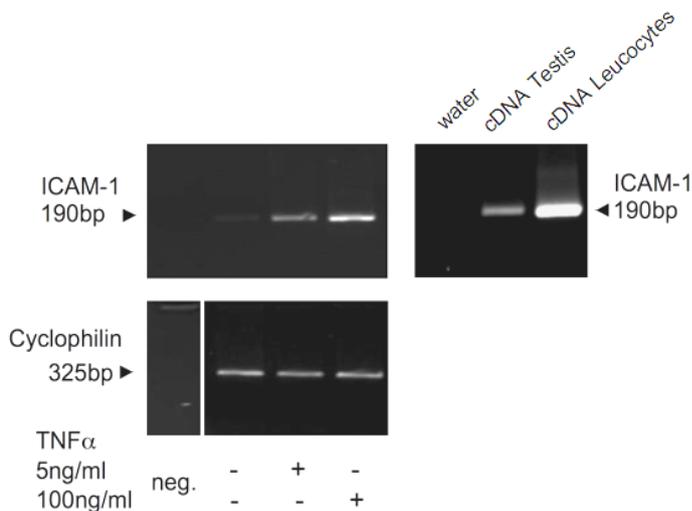


**Abbildung 21.b: COX-2 Expression wird durch TNF $\alpha$  in HTPCs reguliert.** In Westernblot-Experimenten mit spezifischen Antikörpern gegen COX-2, sowie gegen das Housekeeping Gen beta-Aktin konnte eine Zunahme des COX-2 Proteins unter TNF $\alpha$  Stimulation beobachtet werden. Die densitometrische Auswertung der Versuche (n = 3) ergab eine Zunahme im Vergleich zur normalisierten Kontrolle von rund 50% (p = 0.26).

### III.4.3. Induktion von "Intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1) durch TNF $\alpha$

Aus den Ergebnissen der ECM-Genarray Untersuchungen ging hervor, dass TNF $\alpha$  eine massive Induktion von ICAM-1 in HTPCs auslösen kann. Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde, wie für die anderen proinflammatorischen Moleküle bereits beschrieben, ein semiquantitativer RT-PCR Ansatz gewählt (HTPCs wurden wie zuvor mit 5 bzw. 100 ng/ml TNF $\alpha$  für 3 Stunden behandelt, n=4 Patientenisolate). In diesen Versuchen konnten die Genarray-Ergebnisse eindeutig bestätigt werden, fand sich doch in allen untersuchten Proben eine massive Induktion von ICAM-1 mRNA in HTPCs.

Immunzytochemische Experimente mit spezifischen ICAM-1 Antikörpern konnten wiederum auf Proteinebene, die RT-PCR Ergebnisse untermauern. HTPCs, die zuvor für 24h mit TNF $\alpha$  (5ng/ml und 100ng/ml) behandelt worden waren, zeigten deutliche positive Reaktionen an der Plasmamembran. In den Kontrollzellen hingegen ließ sich bis auf unspezifische, flauere Reaktionen kein positives Signal erkennen.



**Abbildung 22.a: ICAM-1 Induktion durch TNF $\alpha$  in HTPCs.** Wie in den bereits zuvor beschriebenen

Regulationsprozessen für MCP-1 und COX-2 findet sich auch für ICAM-1 ein starker Regulations- bzw. Induktionsprozess, ausgelöst durch eine Stimulation mittels TNF $\alpha$ . Dies zeigt sich in den semiquantitativen RT-PCR Experimenten (n = 4), in denen sich eine Zunahme der ICAM-1 mRNA Menge beobachten lässt.

**Abbildung 22.b: ICAM-1****Induktion durch TNF $\alpha$  in**

**HTPCs.** Bild A und B zeigen Kontrollbedingungen, C und D, die mit TNF $\alpha$  stimulierten HTPCs (5 und 100 ng/ml TNF $\alpha$ , respektive). Bild E zeigt die vergrößerte Darstellung von HTPCs, wobei die deutliche Immunpositivität für ICAM-1 auffällt.

(Immunzytochemische

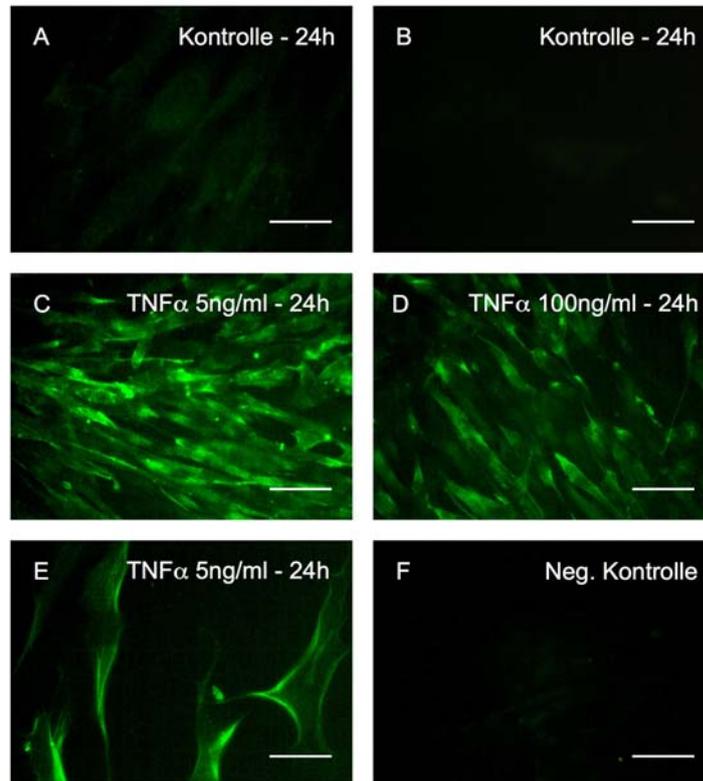
Färbungen, n=3,

Balkengrößen: A – D jeweils

40  $\mu$ m, E und F 5  $\mu$ m). Bild F

zeigt die Negativkontrolle – in diesem Fall wurde kein

Erstantikörper verwendet.

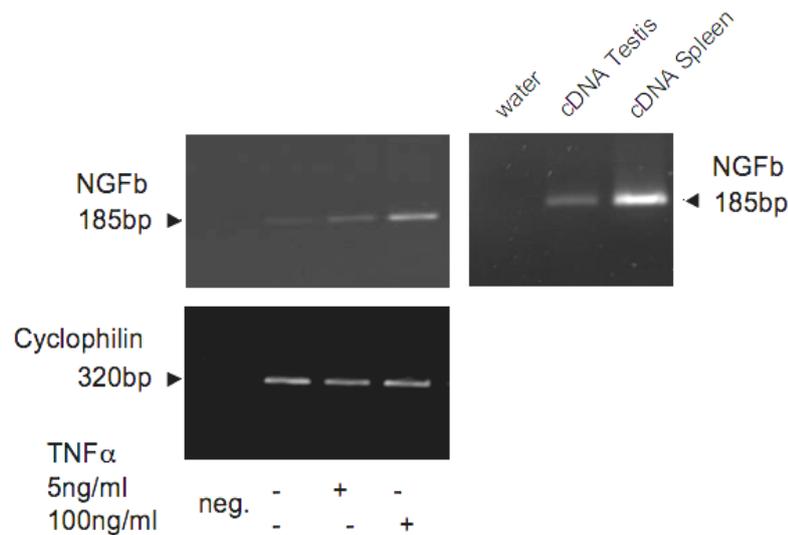


### III.5. Modulation der Nerve growth factor (NGF) Produktion in HTPCs durch TNF $\alpha$

#### III.5.1. NGFb Expression und Regulation durch TNF $\alpha$

Bereits seit mehreren Jahren ist bekannt, dass Neurotrophine in den männlichen Gonaden exprimiert werden und vor allen Dingen in Prozessen der Morphogenese im Rahmen der frühen Entwicklung als auch in der Spermatogenese eingebunden sind [59-61]. Immunhistochemische Studien an humanen Biopsien wiesen vor allen Dingen Leydigzellen, als auch Sertolizellen als primäre Produzenten von Nerve growth factor aus.

In isolierten HTPCs konnte nun, unter *in vitro* Bedingungen, erstmals mRNA für das NGFb Gen detektiert werden (siehe Abbildung 23). In weiteren Experimenten wurde nun untersucht, ob TNF $\alpha$  einen modulatorischen Effekt auf die mRNA Expression von NGF haben könnte. HTPCs wurden dafür mit 5 bzw. 100 ng/ml TNF $\alpha$  für 3h stimuliert und die cDNA in semiquantitativen RT-PCR Experimenten untersucht (n=4 verschiedene Patientenisolate). In diesen Experimenten ergab sich eine massive Zunahme an NGFb mRNA in den behandelten HTPCs und zudem Hinweise auf eine deutliche Dosisabhängigkeit.



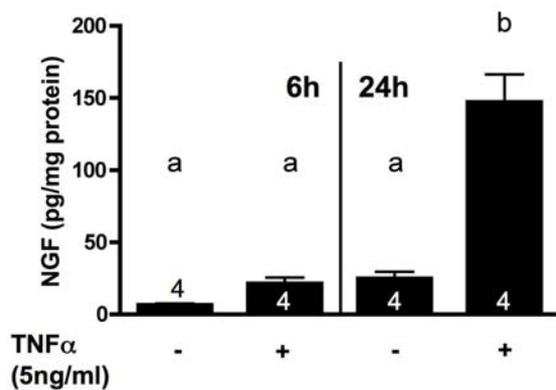
**Abbildung 23: Dosisabhängige Regulation von NGFb mRNA Spiegeln durch TNF $\alpha$  in HTPCs**

Die Messung von mRNA Mengen für den neurotrophen Wachstumsfaktor NGFb ergeben eine dosisabhängige Regulation durch TNF $\alpha$  in HTPCs. Bereits die Stimulation mit 5 ng/ml TNF $\alpha$  gibt Hinweise auf eine Regulation (n = 4, Stimulationsdauer 3 h) - vergleicht man die entsprechenden Banden mit dem Housekeeping Gen Cyclophilin. Einen darüberhinaus noch stärkeren Effekt zeigt hierbei die Verwendung einer höheren Dosis von TNF $\alpha$  (100 ng/ml). Als Positiv-Kontrollen wurden unter identischen PCR Bedingungen kommerzielle cDNA Banken verwendet (human testis, spleen). Die Identität der PCR Produkte erfolgte durch anschließende Sequenzierung.

### III.5.2. NGFb Sekretion

Um die sezernierten NGFb Mengen zu quantifizieren und die regulatorischen Einflüsse von TNF $\alpha$  zu verifizieren, wurde auf einen kommerziellen NGF-ELISA zurückgegriffen. Überstände von 6 bzw. 24 Stunden behandelten HTPCs (n = 4 verschiedene Patientenisolaten) wurden hierzu entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Es fand sich bereits unter basalen Bedingungen eine geringe NGFb Produktion durch HTPCs, die sich eindeutig durch Zugabe von TNF $\alpha$  modulieren ließ und letztlich zu einer ca. 8-9 fachen Menge an NGFb in den stimulierten Zellen nach 24 Stunden führte (siehe Abbildung 24.a). Die statistische Analyse zwischen behandelten und nicht behandelten Zellisolaten ergab hierbei statistisch signifikante Unterschiede auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$ .

In weiteren Versuchsreihen wurde die Dosisabhängigkeit der NGFb Modulation untersucht und hierzu wurde ein relativ breites Konzentrationsfenster (0 – 100 ng/ml TNF $\alpha$ ) verwendet (24.b). Hierbei ergab sich eine weitestgehende Konzentrationsabhängigkeit für das untersuchte Stimulanz TNF $\alpha$ .

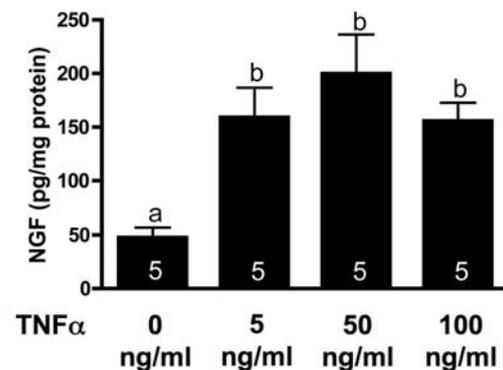


**Abbildung 24.a: Zeitabhängige Sekretion von NGFb und Regulation durch TNF $\alpha$**

HTPCs sezernieren auch unter basalen Bedingungen NGFb, wobei die Stimulation mit TNF $\alpha$  (sowohl nach 6, als auch nach 24 Stunden – n = 4) eine massive Regulation der Sekretion auslöst. So führt TNF $\alpha$  bereits nach 6 Stunden zu einem ca. 4x Anstieg und nach insgesamt 24 Stunden zu einem Zuwachs auf rund 140 pg/mg Protein. Die Ergebnisse wiesen statistisch signifikante Unterschiede auf einem Niveau von  $p < 0.001$  auf (markiert durch Kleinbuchstaben).

**Abbildung 24.b: TNF $\alpha$  dosisabhängige Sekretion von NGFb in HTPCs**

Durch Verwendung verschiedener TNF $\alpha$  Dosen (Stimulation für 24 Stunden) konnte die dosisabhängige Wirkung auf die Sekretion von NGFb nachgewiesen werden. Ein maximaler Effekt wurde hierbei für 50ng/ml TNF $\alpha$  beobachtet, der zu einer ca. 4-5 fachen Steigerung der NGFb Konzentrationen im Überstand führte. Der One Way Anova Test wies statistisch signifikante Unterschiede auf einem Niveau von  $p < 0.05$  nach (markiert durch Kleinbuchstaben – n = 5 verschiedene Patientenisolat).

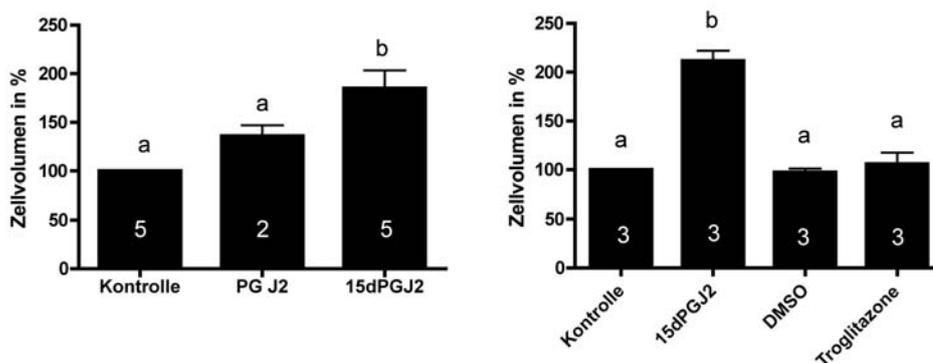


### III.6. Effekte von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) auf den Phänotyp von HTPCs

#### III.6.1. 15dPGJ<sub>2</sub> induziert Hypertrophie in HTPCs

Die Stimulation von HTPCs mit Prostaglandinen der J<sub>2</sub> Reihe (d.h. Prostaglandin D<sub>2</sub>, J<sub>2</sub> und 15dPGJ<sub>2</sub>) resultiert in einer erheblichen Zellvolumensänderung. Dabei wurden Veränderungen bis zum Doppelten des ursprünglichen Volumens gemessen. HTPCs

wurden hierzu für die Dauer von 48 Stunden mit PGJ2 oder 15dPGJ2 (10 $\mu$ M), bzw. dem entsprechenden Kontrollmedium (Zusatz vom Lösungsmittel Ethanol in gleicher Konzentration) behandelt und anschließend mit einem automatisierten Zellzählsystem (welches auch Durchmesser und Volumen bestimmt) analysiert. Hierbei ergab sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Prostaglandin eine Zellvolumenzunahme von ca. 150%  $\pm$  8 (für PGJ2) bzw. ca. 190%  $\pm$  11 (für 15dPGJ2). Der Vergleich mit den Kontrollzellen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen auf einem Niveau von  $p < 0.05$ . Da 15dPGJ2 ebenfalls über PPAR $\gamma$  seine Effekte vermitteln kann, wurde zudem ein klassischer Agonist, Troglitazone (10 $\mu$ M) verwendet. Hier konnte jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen kein wesentlicher Größenzuwachs beobachtet werden. Eine direkte Aktivierung des entsprechenden PPAR $\gamma$ -Rezeptors scheint also für die beschriebenen Effekte keine maßgebliche Rolle zu spielen.

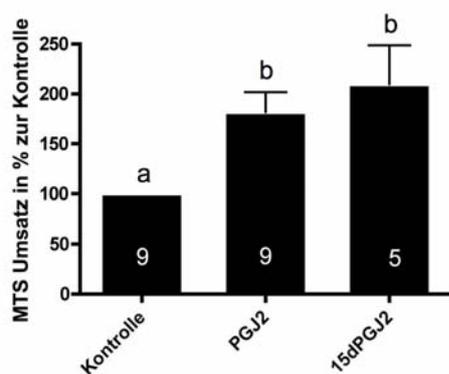


#### Abbildung 25: 15dPGJ2 führt zu PPAR- $\gamma$ unabhängiger hypertrophischer Reaktion in HTPCs

Nach einer Stimulationsdauer für 48 Stunden wurden HTPCs (weiße Indexzahlen geben die Anzahl der verschiedenen Patientenisolate an) mittels eines automatisierten Zellcounters (CASY) analysiert. Hierbei ergab sich, dass die Stimulation mit PGJ2 (10 $\mu$ M) zu einer relativierten Volumenzunahme von rund 150% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen führte (linke Abbildung). Im selben Ansatz konnte zudem nachgewiesen werden, dass 15dPGJ2 (ebenfalls 10 $\mu$ M) eine noch stärkere Wirkung aufweist (rund 200% Zellvolumenzuwachs). Durch Verwendung des Agonisten Troglitazone (10  $\mu$ M) konnte in weiteren Versuchen nachgewiesen werden, dass der PPAR $\gamma$ -Rezeptor in die Signaltransduktion vermutlich nicht involviert ist (siehe rechte Abbildung). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben markiert ( $p < 0.05$ ).

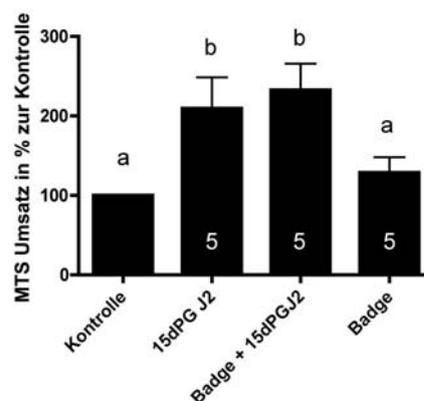
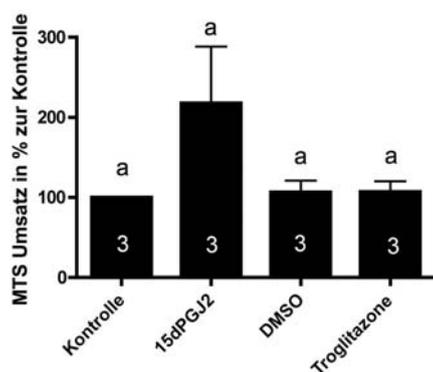
### III.6.2. Hypertrophie wird von einer Zunahme metabolischer Aktivität begleitet

Im gleichen Maß wie die zuvor beschriebene Volumenzunahme, findet sich auch ein Zuwachs an metabolischer Aktivität (MTS-Umsatz) in mit 15dPGJ2 behandelten HTPCs (Abbildung 26.a). In Hinblick auf die Signalvermittlung dieses Effektes lassen sich ähnliche Schlüsse ziehen, wie zuvor für die Größenzunahme, da sowohl der Einsatz von spezifischen Blockern für PPAR $\gamma$  (BADGE), als auch Agonisten (Troglitazone) zu keiner wesentlichen Veränderung des MTS-Umsatzes führte (Abbildung 26.b). Zur besseren Visualisierung des hypertrophischen Effektes wurden zudem Kernfärbungen mit 4'6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) vorgenommen, dabei fanden sich massiv vergrößerte Zellmorphologien, die in Übereinstimmungen mit den Volumenmessungen stehen (Abbildung 26.c).



**Abbildung 26.a: Zunahme der metabolischen Aktivität durch Stimulation mit 15dPGJ2**

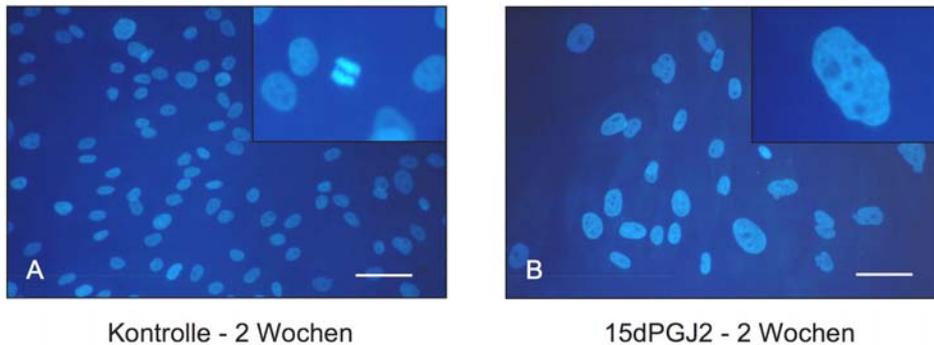
Nach einer Stimulation für 48 Stunden zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des MTS-Umsatzes im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (sowohl für PGJ2, als auch 15dPGJ2 – jeweils 10 $\mu$ M).



**Abbildung 26.b: PPAR $\gamma$ -unabhängige Veränderung im MTS-Umsatz durch 15dPGJ2**

Um eine etwaige Involvierung von PPAR $\gamma$  in die zuvor beschriebenen Effekte zu klären, wurden ein spezifischer Agonist (Troglitazone), sowie Antagonist (BADGE) unter identischen Versuchsbedingungen verwendet. Dabei zeigt sich, dass Troglitazone die Effekte von 15dPGJ2 nicht imitieren kann (linke Abbildung) und eine gleichzeitige Blockade mittels BADGE (rechte

Abbildung) ebensowenig eine Zunahme des MTS-Umsatzes durch 15dPGJ2 verhindern kann (statistisch signifikant für ein Niveau von  $p < 0.05$ ).

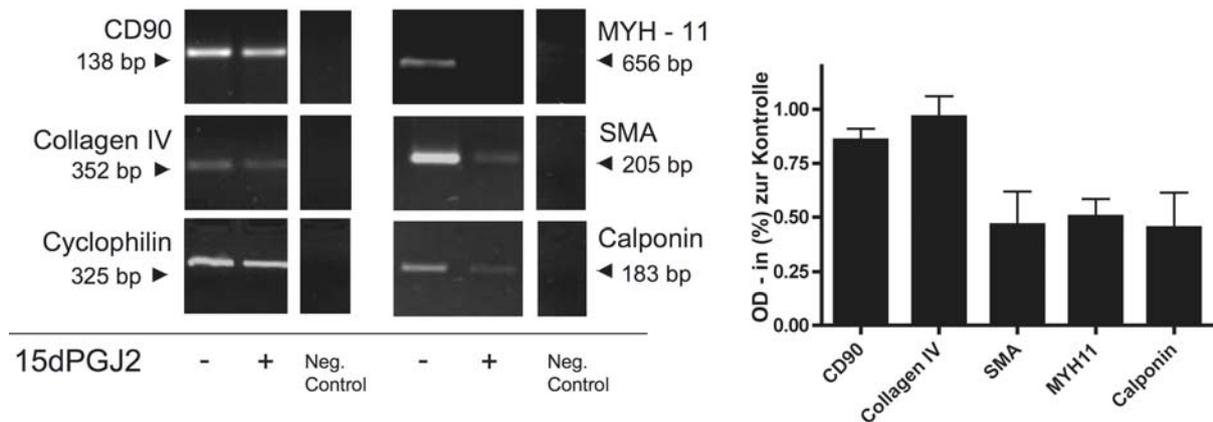


#### **Abbildung 26.c: Kernfärbung weist veränderte Kernmorphologie in HTPCs nach**

In Abbildung A wurden Kontroll-HTPCs (EtOH) mit DAPI gefärbt und in Abbildung B sind die entsprechend mit 15dPGJ2 behandelten HTPCs dargestellt (Behandlungsdauer betrug insgesamt 2 Wochen, wobei an jedem 2 Tag sowohl Kontroll- bzw. Stimulationsmedium gewechselt wurde). In Abbildung B sind die deformierten und vergrößerten Zellkerne von HTPCs deutlich erkennbar. Das Inset in Abbildung A zeigt eine exemplarische Mitose, als Zeichen fortdauernder Proliferation – ähnliche Vorgänge konnten in 15dPGJ2 behandelten HTPCs nicht beobachtet werden. Das Inset in Abbildung B zeigt in vergrößerter Abbildung einen massiv hypertrophischen Zellkern. Die Größe des Balken entspricht in beiden Abbildungen rund 20  $\mu\text{m}$ .

### **III.6.3. Hypertrophische Veränderungen gehen mit Verlust glattmuskulärer Marker einher**

Ob sich weitere phänotypische Charakteristika von HTPCs unter 15dPGJ2 Behandlung verändern, wurde mit einem semiquantitativen RT-PCR Ansatz untersucht. Nach einer Behandlungsdauer von 7 Tagen wurden verschiedene Marker für fibroblastäre Zelltypen (CD90 und Collagen IV), sowie spezifische Marker für glattmuskuläre Zellen (MYH-11, SMA und Calponin) untersucht. Der Trend in allen untersuchten Patientenisolaten ( $n=4$ ) ergab hierbei deutlich eine Reduktion in der Expression typischer glattmuskulärer Markergene, während fibroblastäre Marker unbeeinflusst blieben. In Zusammenschau mit der Größen- und Morphologieveränderung der HTPCs lässt sich somit eine durch 15dPGJ2 induzierte Dedifferenzierung der HTPCs vermuten.

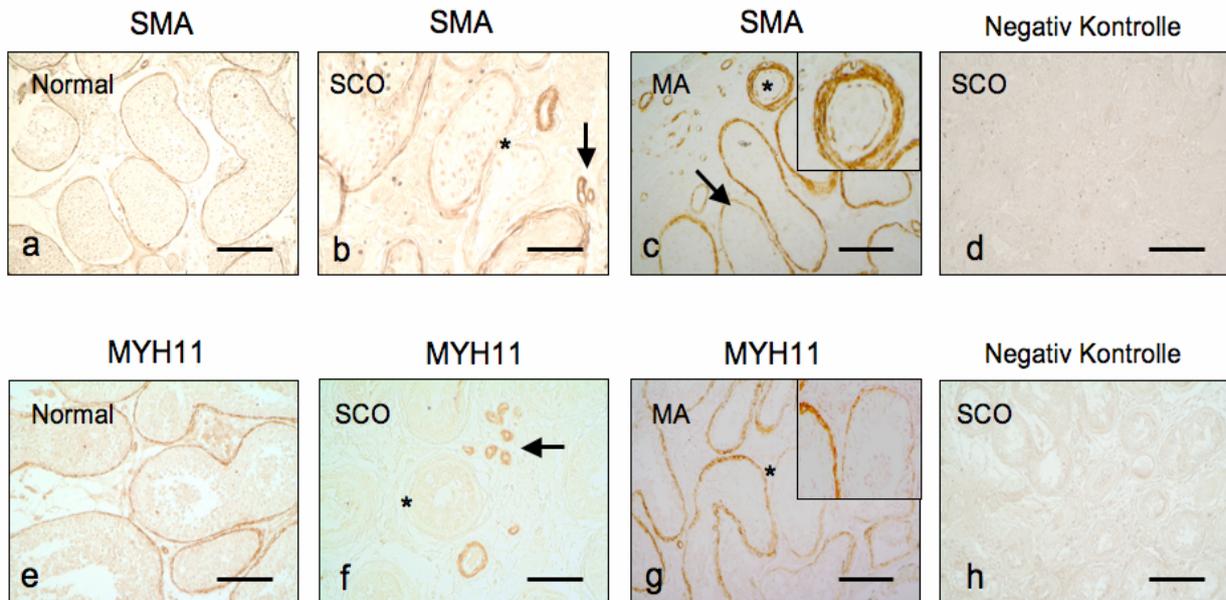


**Abbildung 27: 15dPGJ2 führt zum selektiven Verlust glattmuskulärer Marker in HTPCs**

Mittels semiquantitativer RT-PCR Experimente konnte eine selektive Suppression glattmuskulärer Marker durch 15dPGJ2 nachgewiesen werden. So erscheinen Banden für die Genprodukte von MYH-11, SMA und Calponin in verminderter Intensität im Vergleich zum unbeeinflussten Housekeeping Gen Cyclophilin. Eine densitometrische Auswertung (rechte Abbildung) verdeutlicht diese Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Fibroblastäre Marker wie CD90 oder CollagenIV weisen insgesamt keine wesentlichen Veränderungen in ihrem Expressionsniveau bzw. der gemessenen mRNA Menge auf. Die Behandlungsdauer betrug 7 Tage, wobei alle 2 Tage die Medien (inkl. Stimulanz) ausgetauscht wurden – n = 4.

### III.6.4. Immunhistochemischer Nachweis selektiven Verlusts glattmuskulärer Marker in testikulären Pathologien

Zur Evaluation typischer glattmuskulärer Marker in verschiedenen testikulären Pathologien, wurden immunhistochemische Studien mit Antikörpern, gerichtet gegen smooth-muscle actin (SMA), sowie gegen myosin-heavy chain (MYH11) durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten einerseits Biopsieproben fertiler Patienten, andererseits Proben von Pathologien wie dem Sertoli-cell-only Syndrom (SCO) oder der sogenannten gemischten Atrophie (mixed atrophy - MA). Unter normalen Bedingungen, d.h. Proben von fertilen Patienten, fand sich eine homogene Lokalisation sowohl für SMA wie für MYH11, vor allem im Bereich der peritubulären Region, sowie in kleineren Blutgefäßen. Im Gegensatz dazu konnte MYH11 und zu einem geringeren Ausmaß SMA in den pathologischen Proben nur zu einem geringem Ausmaß detektiert werden (Abbildung 28 – b und f). In den untersuchten gemischten Atrophien fielen diese Unterschiede weniger ausgeprägt auf, doch auch hier kam eine Alteration der peritubulären Lokalisation der glattmuskulären Marker deutlich zur Darstellung.



**Abbildung 28: Selektiver Verlust glattmuskulärer Marker in testikulären Pathologien:**

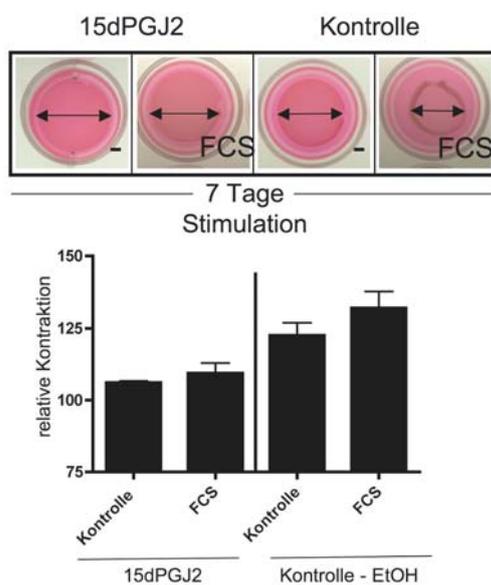
Immunohistochemische Färbungen für SMA (a–c) und MYH11 (e–g) an humanen testikulären Biopsien und Kontrollen (d und h). In (a) dargestellt die Detektion von SMA in einer normalen Biopsie; zu beachten ist hier das homogene Färbungsmuster im Bereich der peritubulären Region – Balken ca. 50  $\mu\text{m}$ . In (b) SMA Färbung an der Biopsie eines SCO Patienten; auffällig ist hier die heterogene Färbung der peritubulären Region, vor allem die extrem schwache Anfärbung (Asterisk) in unmittelbarer Nähe zu normal gefärbter peritubulärer Region – Balken ca. 30  $\mu\text{m}$ . In (c) schließlich SMA Färbung in einer Biopsie mit gemischter Atrophie (MA); hier ist erneut ein heterogenes Färbungsmuster bemerkenswert (Pfeil). Ein stark gefärbter Tubulus (Asterisk) ist innerhalb eines Insets vergrößert: hier ist eine Separation des gefärbten Materials auffällig, vermutlich durch extrazelluläre Matrix. (d) Negativ Kontrolle (Verwendung von Normalserum anstatt des Erstantikörpers). In Abbildung (e) Darstellung der MYH11 Färbung an einer normalen Biopsie mit kontinuierlichem und homogenen Färbungsmuster – Balken 30  $\mu\text{m}$ . Färbungen an SCO Material für MYH11 (f) zeigen einen selektiven Verlust im Bereich der peritubulären Region an (ein Pfeil weist auf vaskuläre Glattmuskelzellen testikulärer Blutgefäße). In Abbildung (g) schließlich MYH11 in Biopsiematerial mit gemischter Atrophie (MA); heterogenes Färbungsmuster im Bereich der peritubulären Region (Pfeil und Inset). (h) entspricht einer Negativ Kontrolle (Normalserum anstatt des Erstantikörpers – n=3-5).

#### III.6.4. Dedifferenzierung resultiert in einem funktionellen Verlust von Kontraktionsfähigkeit in Kollagen-Gel-Kontraktionsassays

Um die funktionelle Relevanz der bereits zuvor beschriebenen selektiven Suppression glattmuskulärer Marker zu validieren, wurden 15dPGJ2 behandelte HTPCs mithilfe eines Kollagen-gel-kontraktionsassays untersucht. Dazu wurden HTPCs für die Dauer von 7 Tagen mit 15dPGJ2 (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt und im Anschluß daran in ein

Kollagengel eingegossen. Nach einer zweitägigen Anpassungsphase, wurden die Kollagenplättchen vom Rand der Messkammer gelöst und ein entsprechendes kontraktiles Agens (Fetales Kälberserum – FCS 5%) dem Medium zugesetzt. Die Messung der Kontraktion erfolgte schließlich nach 24 Stunden und wurde als Ausmaß der Flächenverringering im Vergleich zur Ausgangssituation als Gel-Kontraktion angegeben (weiteres siehe Material&Methoden).

Der Vergleich von 15dPGJ2 behandelten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (Medium ohne 15dPGJ2) zeigt hier, dass behandelte Zellen ein vermindertes kontraktiles Potential aufweisen und somit die Suppression glattemuskulärer Marker eine funktionelle Konsequenz besitzt.

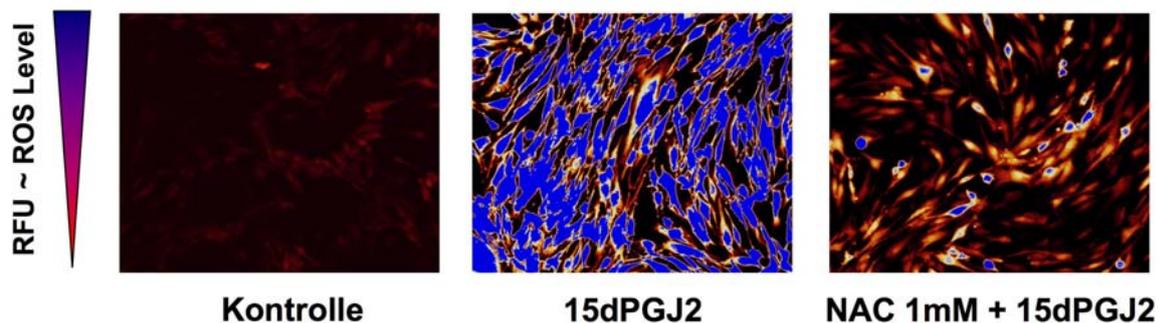


**Abbildung 29: 15dPGJ2 Behandlung resultiert in verminderter Kontraktilität.** In der oberen Reihe der Abbildung sind Auflichtbilder der Kollagenplättchen 24 Stunden nach der Ablösung vom Messkammerrand dargestellt. Die Doppelpfeile markieren hierbei den größten Durchmesser des Plättchens. Im Fall der Kontrolle ist dabei deutlich erkennbar, dass die Zugabe von FCS im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen zu einer massiven Verkleinerung des Plättchens führt (gekennzeichnet durch einen Bindestrich). Die Kollagenplättchen von 15dPGJ2 behandelten HTPCs weisen hingegen nur geringfügige Unterschiede auf und zeigen somit den Verlust der Kontraktilität an. Das Balkendiagramm fasst die Versuche an 3 verschiedenen Patientenisolaten zusammen.

### III.6.5. 15dPGJ2 induziert ROS in HTPCs – mögliche Implikation in Signaltransduktion von HTPCs

Da 15dPGJ2 als klassischer Ligand des PPAR $\gamma$ -Rezeptors, auch viele weitere Signaltransduktionswege aktivieren kann (siehe hierzu Diskussion – Signaltransduktion von 15dPGJ2) und in einigen Experimenten bereits PPAR $\gamma$ -unabhängige Effekte beobachtet wurden (siehe II.7.1), sollte auch die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als möglicher Signalweg untersucht werden.

HTPCs wurden dafür mit einem redox-sensitiven Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein Diacetat (DCFH<sub>2</sub>-DA) beladen und anschließend mit dem Prostaglandin 15dPGJ2 stimuliert. Die Induktion von ROS führt schließlich zu einer Strukturveränderung des Farbstoffs und lässt eine Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies zu. Dabei konnte in 15dPGJ2 stimulierten HTPCs eine deutliche Zunahme an ROS-Spezies gemessen werden und dieser Prozess konnte zudem durch ein unspezifisches Antioxidans (NAC – N-Acetylcystein) nahezu vollständig unterbunden werden. Mit diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass 15dPGJ2 zu einer Zunahme an ROS in HTPCs führt.

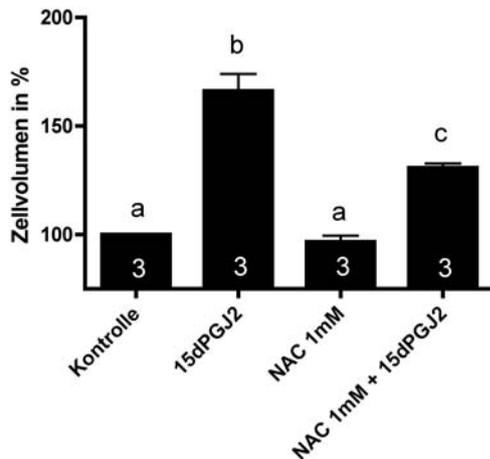


**Abbildung 30: 15dPGJ2 induziert ROS Bildung in HTPCs**

Dargestellt sind jeweils HTPCs, die mit dem redoxsensitiven Farbstoff DCFH<sub>2</sub>-DA beladen wurden und anschließend einer Stimulation mit 15dPGJ2 unterzogen wurden. Die deutliche Farbintensitätsänderung (als Maß einer Fluoreszenzunahme) zeigt dabei eine Zunahme an ROS in HTPCs an. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit dem unspezifischen Antioxidans NAC vorbehandelt und die Zugabe von 15dPGJ2 konnte dabei nur verringerte ROS Induktion auslösen (n=3 verschiedene Patientenisolate).

### III.6.6. Inhibition von ROS mittels N-Acetylcystein und Effekte auf Zellvolumen und Kontraktilität von HTPCs

Um die Frage zu klären, ob ROS eine wesentliche Rolle in 15dPGJ2 vermittelten Effekten spielen, wurden Experimente zu Zellvolumenveränderung und Kontraktilität unter Verwendung des Antioxidans NAC durchgeführt. Dabei zeigte sich für Veränderungen im Zellvolumen, dass eine Vorbehandlung von HTPCs mit NAC zu einer verringerten Zunahme des Volumens führte (ca. 170% vs 135% mit NAC) und somit ROS in die 15dPGJ2 vermittelte Signaltransduktion involviert zu sein erscheinen (Abbildung 30). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Verwendung von NAC in Kollagen-gel-kontraktionsassays, da mit NAC behandelte HTPCs ihr Potential zur Kontraktion behielten.



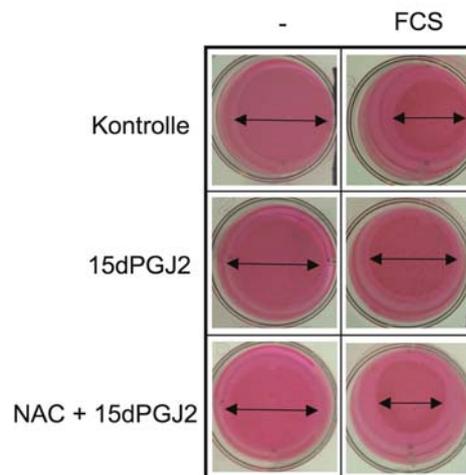
**Abbildung 31.a: NAC Vorbehandlung mindert 15dPGJ2 induzierte Hypertrophie**

In nebenstehender Grafik ist erkennbar, dass HTPCs mit einer Vorbehandlung durch NAC einen geringeren Zellvolumenzuwachs aufweisen (135% vs 170%), im Vergleich zu Zellen, die nur mit 15dPGJ2 behandelt wurden (n = 3, statistische Signifikanz auf einem Niveau von  $p < 0.001$ )

**Abbildung 31.b: NAC erhält funktionelle Kontraktionsfähigkeit von 15dPGJ2 behandelten HTPCs**

In der linken Spalte sind Kollagenplättchen aufgeführt, die ohne kontraktiles Stimulanz (kein Fetales Kälberserum - FCS) behandelt wurden. 15dPGJ2 behandelte HTPCs weisen unabhängig von FCS Zugabe keine Veränderungen im Kollagenplättchen-durchmesser auf, und somit keine Kontraktilität. Die Vorbehandlung mit NAC führt hingegen zu annähernd gleichen Durchmesseränderungen, wie bei Kontrollbedingungen und gibt somit Hinweis auf erhaltenes kontraktiles Verhalten.

(n = 2).



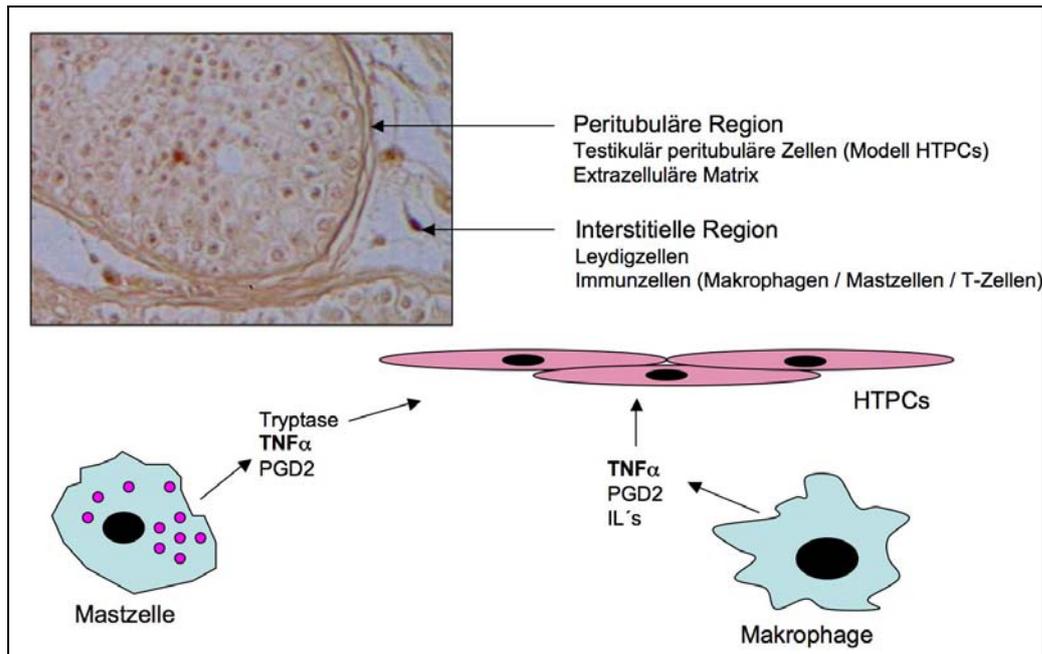
## IV. Diskussion

Sub- bzw. Infertilität des Mannes, und vor allem die Entität der sogenannten idiopathischen Infertilität des Mannes, ist histomorphologisch, neben einer Einschränkung der Spermatogenese, durch eine Reihe weiterer Veränderungen gekennzeichnet: Akkumulation von Immunzellen im Interstitium (darunter Makrophagen und Mastzellen), Verdickung bzw. fibrotischer Umbau der peritubulären Region und vermehrte Expression von COX-2 im interstitiellen Kompartiment zählen hierzu [18, 21, 62, 63]. Die Untersuchung zweier möglicher zentraler Modulatoren (TNF $\alpha$  und 15dPGJ2) in der Pathogenese dieses komplexen Geschehens wurde am Modell der humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs) in dieser Arbeit durchgeführt.

### IV.1. TNF-Rezeptoren und Funktionalität in HTPCs

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass HTPCs sowohl TNFR-1, als auch TNFR-2 exprimieren. In weiterführenden funktionellen Studien (Calcium-Imaging Versuchen), sowie dem Nachweis einer transienten Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade, als auch letztlich Änderungen im Expressionsniveau in Genarraystudien konnte umfassend eine Funktionalität dieser Rezeptoren nachgewiesen werden (Abbildung 11-13).

TNF-Rezeptoren, v.a. TNFR-1/2 weisen eine ubiquitäre Expression auf [63] und detaillierte Studien zur Lokalisation dieser Rezeptoren im Hoden beschränken sich zumeist nur auf einzelne Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie [64, 65]. Die Anwesenheit von TNF $\alpha$  im testikulären Mikromilieu wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt, wobei sich in den erwähnten Studien insgesamt abzeichnet, dass TNF $\alpha$  im interstitiellen Kompartiment zumeist von Immunzellen produziert wird [45, 65, 66]. Anhalte über die tatsächlichen Konzentrationen (0,25ng/ml – 0,05ng/ml) schwanken stark, beziehen sich im wesentlichen auf tierexperimentelle Ergebnisse, deuten jedoch allesamt auf eine Erhöhung der Konzentration im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen hin [45]. Der in diesen Experimenten gewählte Konzentrationsbereich orientiert sich vor allem an *in vitro* Untersuchungen ähnlicher Zelltypen, wie beispielsweise glattmuskulären Bronchialzellen oder Myofibroblasten [67].



**Abbildung 32: Mögliche intratestikuläre Quellen für TNF $\alpha$  und HTPCs als potentielle Ziele**

Neben TNF $\alpha$  Produktion innerhalb der Tubuli seminiferi durch Spermatozyten, findet sich v.a. auch im Bereich der interstitiellen Region eine heterogene Population an Leukozyten, die neben vielen anderen potenten Zytokinen, u.a. auch TNF $\alpha$  produzieren und sezernieren kann. Zu dieser zählen Mastzellen und Makrophagen. Unter pathologischen Bedingungen, wie testikulärer Inflammation oder eingeschränkter Spermatogenese findet sich eine verstärkte Infiltration dieser Leukozytenpopulation. Verwendete Abkürzungen: TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; PGD2 = Prostaglandin D2; IL's = Interleukine

#### IV.1.2. TNF $\alpha$ , fibrotische Prozesse und männliche Infertilität

Der Umsatz der extrazellulären Matrix wird im wesentlichen von einem Gleichgewicht zweier Enzymtypen bestimmt: einerseits Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), Mitglieder einer Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die im Wesentlichen als ECM degradierende Enzyme arbeiten und andererseits Inhibitoren von diesen, die sogenannten „tissue inhibitors of metallo-proteinases“ (TIMPs) [11]. Als ein allgemeines, organunabhängiges Konzept fibrotischen Umbaus wird ein Ungleichgewicht zugunsten der Inhibitoren, Einschränkung der Matrix umsetzenden Enzyme (MMPs) oder aber eine vermehrte Synthese von ECM-Proteinen (wie Kollagene) verstanden [68, 69].

Durch Induktion bzw. Aktivitätsbeeinflussung von MMPs kann TNF $\alpha$  in das Gleichgewicht des ECM Umsatzes eingreifen [70, 71]. In den durchgeführten ECM-Genarraystudien an HTPCs ergaben sich geringfügige Veränderungen, sowohl im Niveau von MMP-2, als auch von TIMP-1, die in der Summe einen mindernden Umsatz der ECM zur Folge hätten. In weiterführenden semiquantitative RT-PCR Studien

konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 15). Da nicht nur Expression, sondern auch Aktivierungszustand der MMP-2 entscheidend beeinflusst werden kann, wurden zudem Zymographien vorgenommen (Abbildung 16), die eine Visualisierung der jeweiligen Enzymaktivität ermöglichen. Hier zeigte sich in rund der Hälfte der untersuchten Patientenisolaten eine Beeinflussung der MMP-2 Aktivität (latent aktive Form), eine eindeutige Aussage zu Effekten von TNF $\alpha$  in HTPCs läßt sich jedoch bisher nicht treffen. Eine eventuelle Erklärung hierfür könnte in einer heterogenen Reagibilität der untersuchten Patientenisolaten liegen.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass *in vivo* eine Modulation des ECM Umsatzes im testikulären Mikromilieu durch TNF $\alpha$  vorliegt und weiterführende Untersuchungen zu dieser Thematik sind in Zukunft sicherlich noch nötig.

Ein weiteres wesentliches Erklärungskonzept zur Pathogenese von fibrotischen Umbauvorgängen ist ein gesteigertes Proliferationsverhalten der beteiligten Zellpopulationen [11]. Untersuchungen dieses Aspektes an HTPCs lieferte lediglich Hinweise auf einen die metabolische Aktivität mindernden Effekt von TNF $\alpha$  (Abbildung 17). Die Spezifität dieser Methodik ist jedoch sicherlich anderen Nachweismethoden (Caspase Assays, TUNEL) unterlegen, so daß vorläufig und auf den erhobenen Befunden beruhend nur von keinem wesentlichen proliferativen Effekt ausgegangen werden kann. Die Klärung der Frage, ob und inwieweit TNF $\alpha$  apoptotisch auf HTPCs wirken kann, bedarf abschließender Klärung, lag aber nicht im Hauptfokus dieser Arbeit.

Es ist nicht auszuschließen, dass bei Verwendung von Patientenisolaten mit einem anderen pathophysiologischen Hintergrund, beispielsweise einer vorliegenden Fertilitätsstörung, andere Reaktionsmuster zu beobachten wären. Solche Biopsien zur Generierung verschiedener Isolatslinien standen im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zur Verfügung. Nichtsdestotrotz bietet das Modell der HTPCs erstmalig die Möglichkeit peritubuläre Zellen *in vitro* zu charakterisieren und mögliche pathologisch relevante Mechanismen zu identifizieren.

#### **IV.1.3. Pro-inflammatorische Reaktion von HTPC's auf TNF $\alpha$ Stimulation**

Ein wesentlicher, weiterer Aspekt von TNF $\alpha$  Wirkungen umfasst die Regulation inflammatorische Geschehens. In einer Vielzahl verschiedenster Pathologien wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen [72], Asthma [73] sowie rheumatoide Arthritis [74] wurde TNF $\alpha$  als ein zentraler Regulator der inflammatorischen Reaktion identifiziert. Die therapeutische Relevanz dieses Zytokins wird einmal mehr durch den

bereits erfolgreich etablierten Gebrauch von TNF $\alpha$  neutralisierenden Antikörpern (z.B. Infliximab, Etanercept) untermauert [75].

Die Induktion von Intercellular-Adhesion-Molecule 1 (ICAM-1) durch TNF $\alpha$  in HTPCs zeigt in dieser Arbeit zum ersten Mal, die direkte proinflammatorische Beeinflussung von testikulären peritubulären Zellen. Mit der massiv induzierten Expression (Abbildung 22.a) sowie dem Nachweis von ICAM-1 Protein auf der Oberfläche von HTPCs (Abbildung 22.b), erscheinen diese als mögliche Adhäsionspartner für andere Immunzellen, die den entsprechenden Liganden (LFA-1) exprimieren. Diese Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 dient hierbei einerseits der Taxis, als auch der Migration von Leukozyten an den Ort entzündlichen Geschehens [76]. Weiterhin führt eine Aktivierung von ICAM-1 zur Modulation intrazellulärer Signaltransduktionswege, die MAP-Kinase Kaskaden, Sekretion von Zytokinen [77] oder Präsentation weiterer Membranproteine steuern kann [78]. Die Expression von Integrinen und ICAM-1 im Hoden wird laut Literatur mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen beschrieben, so findet sich in einer der ersten Arbeiten hierzu [79] kein relevanter Nachweis für ICAM-1, während spätere Arbeiten explizit ICAM-1 an der Population der humanen testikulären peritubulären Zellen beschreiben [80]. Diese Diskrepanz der Ergebnisse dürfte einerseits in der unterschiedlichen Aufbereitung der Organproben und andererseits in der Verfügbarkeit adäquater Antikörper begründet sein. Da sich auch in weiteren testikulären Zellpopulationen, wie Sertolizellen eine Expression von ICAM-1 [81] nachweisen lässt, kann von einer tatsächlichen Anwesenheit dieses Membranproteins im Hoden ausgegangen werden. In Hinblick auf die Pathologie der idiopathischen testikulären Infertilität könnte eine durch TNF $\alpha$  induzierte Expression von ICAM-1 im peritubulären Kompartiment, einerseits zur beobachteten Akkumulation von Immunzellen im Bereich der Tubuli seminiferii führen [20] und andererseits verschiedene Signalwege in PCs aktivieren, die letztlich zu vermehrter Proliferation oder aber Sekretion von Chemokinen beitragen können.

Eine weitere Beobachtung in der vorliegenden Arbeit war die schnelle Expressionregulation der Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2) in HTPCs durch TNF $\alpha$ . Als Schlüsselenzym in der Synthese von Prostaglandinen ist es maßgeblich an der Orchestrierung inflammatorischer Prozesse beteiligt [82]. Eine verstärkte Expression des Enzyms lässt sich auch bei infertilen Patienten im Bereich des Interstitiums beobachten [20, 83] (siehe Abbildung 37 - COX-2 im Interstitium) – über eine verstärkte Expression im peritubulären Kompartiment ist bisher noch nicht berichtet worden. Innerhalb des testikulären Milieus spielen Prostaglandine in der parakrinen Kommunikation und Regulation des Hodens eine wesentliche Rolle. Dazu zählt

einerseits Morphogenese und Entwicklung [84], andererseits Regulation der Steroidogenese [85] sowie Kontraktionskontrolle der Tubuli seminiferii [86, 87]. Die Konsequenz der hier beschriebenen COX-2 Expression in HTPCs könnte somit die Sekretion von Prostaglandinen durch HTPCs sein. Welche Prostaglandine von HTPCs letztlich produziert werden, ob und inwieweit signifikante Mengen in vivo sezerniert werden, ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden und bedarf weiterer Klärung. Untersuchungen an Tiermodellen (Ratte) konnten jedoch eine kausale Beziehung zwischen akuter Inflammationsinduktion (durch LPS) und Expression von COX-2 nachweisen, die letztlich zu eingeschränkter Spermatogenese, sowie derangierter Steroidogenese führte [88].

Neben der Induktion von ICAM-1, sowie verstärkter Expression des Enzyms COX-2, führt die Stimulation von HTPCs mit TNF $\alpha$  auch zu vermehrter Sekretion zweier Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren, nämlich MCP-1 und NGFb. Während ersteres ebenfalls ein Zytokin mit stark proinflammatorischer Funktion ist, sind die Effekte von NGFb divers und reichen von Morphogenese, Chemotaxis bis hin zu Expressionsänderungen [59, 89].

MCP-1 zählt zur sogenannten C-C Klasse der beta-Chemokin Familie und ist ein zentraler Regulator in der Initiation von Entzündungsreaktionen, indem es chemotaktisch wirkt und die Transmigration von Monozyten steuert [90]. Diese Funktionen werden im Wesentlichen durch Interaktion mit dem entsprechenden Chemokin Rezeptor CCR2 vermittelt, der v.a. auf der Oberfläche von Monozyten oder aber aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Lokalisationsstudien am Rattenhoden ergaben, dass v.a. peritubuläre Zellen eine MCP-1 Expression unter Basalbedingungen aufweisen und diese noch zusätzlich durch Stimulation mit LPS, IL-1 $\alpha$  oder TNF $\alpha$  maximiert werden konnten [91]. Sertolizellen oder Spermatiden wiesen in der erwähnten Studie keine Expression für MCP-1 auf und auch Leydigzellen zeigten nur unter IL-1 $\beta$  Stimulation eine Expression für MCP-1 [91]. Die funktionelle Rolle von MCP-1 wurde weiterhin an einem Modell experimentell induzierter Autoimmunorchitis (EAO) in der Ratte genauer charakterisiert: Hierbei zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Nachweis für MCP-1 im peritubulären und interstitiellen Kompartiment, sowie gleichzeitig eine starke Infiltration des Hodengewebes mit mononukleären Zellen [92]. Die Schlußfolgerung der Autoren in der erwähnten Arbeit von Guazzone wies MCP-1 v.a. eine wesentliche Rolle in der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen im Geschehen einer EAO zu. Ebenfalls verstärkte Expression von MCP-1 fand sich in einer Arbeit von Iosub et al, in der mittels intratestikulärer Trypsase Injektion ein EAO ähnliche, inflammatorische Reaktion erzielt werden konnte

[93]. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse unterstreichen, die speziesunabhängige Expression und Sekretion von MCP-1 durch testikuläre peritubuläre Zellen. So konnte ein klarer dosisabhängiger Effekt von TNF $\alpha$  auf die Sekretionsmenge von MCP-1 in HTPCs erstmals dargestellt werden (Abbildung 20). Die in den vorliegenden Experimenten gemessenen Konzentrationsbereiche (50-100 ng/ml MCP-1) liegen dabei im Vergleich zu Messungen an testikulärer Flüssigkeit (50-80 pg/ml MCP-1) von EAO Ratten [92] wesentlich höher. Dieser Unterschied kann durch Speziesunterschiede (Human vs. Ratte), sowie Ursprungsmaterialien (Zellkultur vs. testikuläre Flüssigkeit) hinreichend erklärt werden – maßgeblich in beiden Studien ist jedoch die deutliche Induktion von MCP-1 unter inflammatorischen Bedingungen. Klarerweise können die vorgestellten *in vitro* Ergebnisse nicht unreflektiert auf die *in vivo* Situation übertragen werden, aber in Zusammenschau mit vorliegenden, meist tierexperimentellen Studien (s.o.) dürfte MCP-1 auch in der humanen Situation eine chemotaktische Funktion ausüben und könnte somit in der beobachteten Akkumulation von Immunzellen in Fällen eingeschränkter Fertilität bzw. Spermatogenese eine wichtige Rolle spielen.

Als weiteren, durch TNF $\alpha$  modulierten, sekretorischen Faktor konnte der sogenannte Nerve growth factor (NGF) identifiziert werden. NGF gilt gewissermaßen als Archetyp einer Familie verschiedener Neurotrophine, zu denen auch der Brain derived neurotrophic factor (BDNF) und eine Reihe weiterer Neurotrophine (NT3 und NT4) zählen [94]. Neben den ursprünglich beschriebenen Funktionen von NGF, nämlich Wachstumsinduktion und Differenzierung peripherer Neurone, hat sich im Laufe der Jahre zunehmend ergeben, dass NGF auch außerhalb des Nervensystems eine wesentliche Rolle spielt. Dies wurde daran deutlich, dass auch viele „nicht-neuronale“ Zelltypen, wie Immunzellen, Epithelzellen, Keratinozyten oder auch Glattmuskelzellen NGF produzieren und sezernieren können [89]. Die physiologische Funktion von NGF im Hoden erstreckt sich von basalen Vorgängen wie der Morphogenese der Tubuli seminiferii [59], bis hin zur Modulation der meiotischen Teilungen von Spermatozyten [61]. In immunhistochemischen Studien wurde NGF v.a. in Keimzellen [61], sowie Leydigzellen [60] detektiert und unterstreicht, wie an *in vitro* Untersuchungen isolierter Zellpopulationen gezeigt, die wichtige Rolle des Faktors in der testikulären parakrinen Kommunikation (beispielsweise Modulation der IL-6 Sekretion von Sertolizellen - [95]). Neben diesen vielfältigen physiologischen Funktionen von NGF, zeichnet sich zunehmend auch eine wesentliche Rolle in pathologischen Prozessen ab: Erhöhte Niveaus an NGF finden sich beispielsweise in der Gelenksflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis [96, 97], und weiterhin scheint dieser Faktor maßgeblich an der

Modulation chronischer Schmerzzustände beteiligt zu sein [98]. Vor allem in chronischen Krankheitszuständen wie allergischer Rhinitis [99] oder Asthma-Modellen [100, 101], wurden umfassende Konzepte zur Rolle von Neurotrophinen und im Speziellen zu NGF entwickelt [102]. Bestrebungen auch therapeutisch mit NGF neutralisierenden Antikörpern oder aber Antikörpern, die gegen Neurotrophin Rezeptoren (trkA/trkB/trkC) gerichtet sind, werden in den nächsten Jahren vermutlich im Rahmen translationaler klinischer Forschung umgesetzt werden können [98]. Studien zur Expressionsänderung, sowohl von Neurotrophinen als auch deren Rezeptoren, in testikulären Pathologien liegen in nur in eingeschränkter Zahl und Qualität vor [60]. Hierbei wurden lediglich immunhistochemische Studien an heterogenem Patientengut, vorrangig durch ein onkologisches Leiden charakterisiert, durchgeführt und ergaben in diesem Ansatz keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit erhaltener und eingeschränkter Spermatogenese. Ob und inwieweit Veränderungen in Niveaus - sowohl von Neurotrophinen, als auch deren Rezeptoren - in humanen testikulären Pathologien vorliegen, bedarf noch abschließender Klärung.

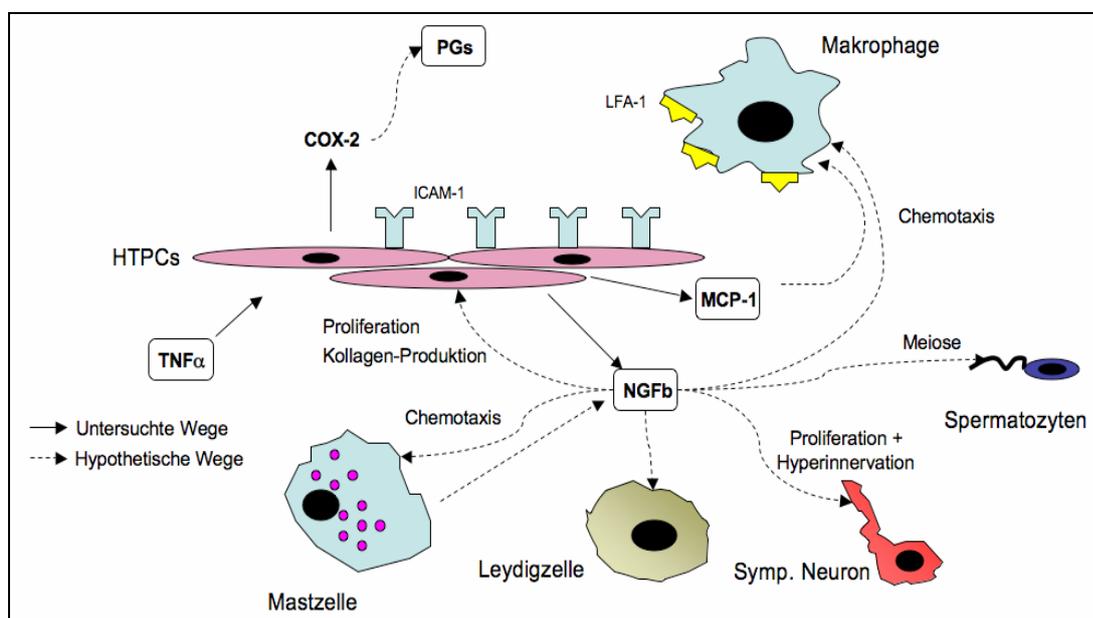
In den vorliegenden Experimenten konnte jedoch erstmals nachgewiesen werden, dass HTPCs sowohl basal, als auch unter TNF $\alpha$  Stimulation NGF sezernieren können (Abbildung 23 und 24). Alle bisherigen Untersuchungen zur Charakterisierung des sekretorischen Profils von peritubulären Zellen wurden innerhalb tierexperimenteller Studien durchgeführt (zumeist Ratte). Hier wurde als ein wesentlicher sekretorischer Faktor von PCs der Ratte, PmodS (peritubular secretory factor modifying sertoli cell functions) identifiziert. PmodS induziert in Sertolizellen der Ratte eine starke Expression von Transferrin und scheint somit in der Differenzierung dieses Zelltyps eine wesentliche Rolle zu spielen [103]. Nach der Identifikation von PmodS blieb jedoch lange unklar, welche Signaltransduktionswege durch den Faktor tatsächlich aktiviert werden [104], und in der Folge wurde v.a. in der Gruppe um Verhoeven et al Zweifel [105, 106] stark, dass es sich im Falle von PmodS nicht um einen einzigen, sondern evtl. um eine Gruppe verschiedener parakriner Faktoren handeln könnte (IGF-1, bFGF, Heregulin). Wie bereits zuvor dargestellt konnte NGF *in vitro* Sertolizellfunktionen beeinflussen, und somit ist nicht auszuschließen, dass auch NGF in die Gruppe der „PmodS“-Faktoren fällt.

In Hinblick auf das bereits oben erwähnte pathologische Konzept zur Rolle von NGF in bronchialen Erkrankungen (siehe oben), ergeben sich einige, denkbare Parallelen im Falle erhöhter NGF Sekretion durch HTPCs. Am Beispiel von Asthma Modellen der Maus ließ sich durch Verwendung NGF-blockender Antikörper eine Beeinflussung der Th-2 Zytokinmusters erzielen und damit der inflammatorische Stellenwert des Neurotrophins unter anderem beweisen [107]. Weiterhin zeigten Studien an

transgenen Mäusen, die eine Überexpression von NGF aufwiesen, eine Verdickung und Fibrosierung im subepithelialen Bereich der Atemwege [108]. Zellkulturarbeiten mit pulmonalen Fibroblasten konnten schließlich zeigen, dass NGF Stimulation eine Transdifferenzierung hin zu Myofibroblasten induzieren kann und weiterhin die Kontraktilität der untersuchten Zellpopulationen maßgeblich steigern konnte [109]. Für die Situation im Hoden wäre somit ein ähnliches Szenario denkbar: d.h. einerseits Beeinflussung und Chemotaxis inflammatorischer Zellen (MP, MC) im Interstitium [110], andererseits in einem autokrinen bzw. parakrinen Loop Modulation oder aber Induktion einer peritubulären Sklerose. Es gibt weiterhin Hinweise auf eine Rolle von NGF in der Entwicklung von bronchialer Hyperreagibilität [111], durch Einsprossen von Neuronen oder aber vermehrter Sekretion peptiderger Transmitter wie Substanz P – ähnliche Beobachtungen zu einer Zunahme sympathischer Fasern im Hoden sind ebenfalls beschrieben [112].

#### IV.1.4. Mögliches pathogenetisches Konzept von $\text{TNF}\alpha$ Wirkung auf HTPCs

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen am Beispiel des Modells der HTPCs erstmalig die direkte Induktion von ICAM-1, verstärkte Expression von COX-2, sowie die stark regulierte Sekretion von MCP-1 und NGFb. In Zusammenschau mit bereits bekannten und beschriebenen Veränderungen in der Pathologie der testikulären Infertilität können diese in vitro Ergebnisse mögliche Hinweise auf eine durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierte inflammatorische Kaskade geben. Die folgende Abbildung soll die möglichen Konzepte zusammenfassen.



**Abbildung 33: Mögliche pathogenetische Konsequenzen von TNF $\alpha$  Wirkungen auf HTPCs.** Die obige Abbildung zeigt in schematischer Weise mögliche Interaktionen und Konsequenzen von TNF $\alpha$  durch seine Wirkung auf HTPCs. So könnte beispielsweise eine verstärkte Expression der COX-2, seinerseits zu einer vermehrten Synthese von Prostaglandinen (PGs) beitragen. Die induzierte Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 wiederum bietet Interaktionspotential mit leukozytären Liganden wie LFA-1 und könnte somit Prozesse wie Migration und Chemotaxis positiv verstärken. In ganz ähnlicher Weise wäre ein Effekt von MCP-1 zu erwarten. NGFb, als pleiotroper Wachstumsfaktor, könnte einerseits Prozesse wie Proliferation (HTPCs, Neurone), andererseits auch die Kollagen-Synthese (HTPCs) sowie endokrine Funktionalität (Leydigzelle) oder meiotische Differenzierung (Spermatozyten) beeinflussen.

Verwendete Abkürzungen: COX-2 = Cyclooxygenase-2; PG's = Prostaglandine; ICAM-1 = Intercellular-adhesion-molecule-1; LFA= Leucocyte functioning antigen; MCP-1 = Macrophage chemoattractant protein-1; NGFb = Nerve growth factor-beta

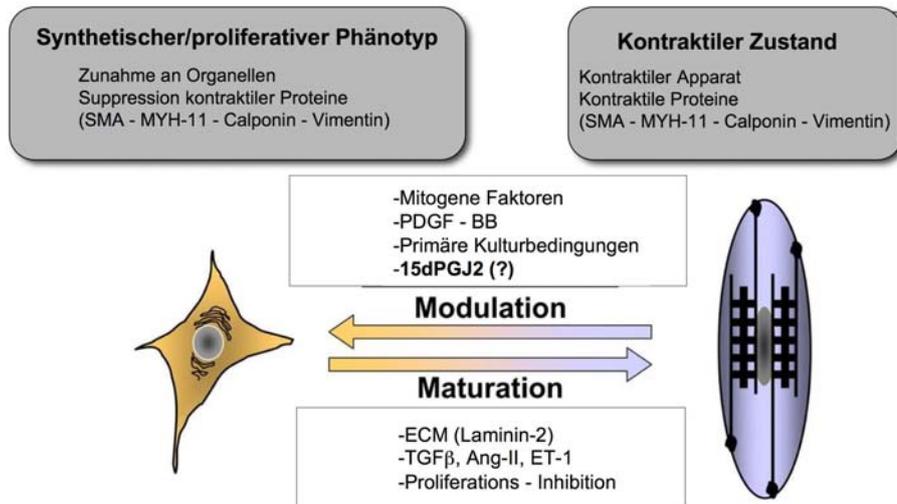
## IV. 2. Effekte von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) in HTPCs

Als ein zweites Teilprojekt wurden im Rahmen dieser Arbeit Effekte von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) auf HTPCs untersucht. In Fällen idiopathischer männlicher Infertilität bzw. Subfertilität findet sich eine nachweisbare Expression von COX-2, dem Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese. Es ist daher anzunehmen, dass im Rahmen dieser Expressionsänderung, unter pathologischen Bedingungen, eine konsekutive Erhöhung intratestikulärer Prostaglandinniveaus erfolgen könnte. Weiterhin ist in den eben erwähnten Zuständen auch eine Infiltration und Akkumulation von Mastzellen nachweisbar, die neben zahlreichen Mediatoren unter anderem auch Prostaglandin D<sub>2</sub> freisetzen können. Da dieses Prostaglandin in Zwischenschritten (nicht-enzymatisch) in den Endmetabolit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J<sub>2</sub> umgesetzt werden kann, fokussierten sich die Experimente der vorliegenden Arbeit auf dieses Prostaglandin. Die Diskussion dieser Ergebnisse wird im folgenden Abschnitt präsentiert:

### IV.2.1 15dPGJ<sub>2</sub> moduliert phänotypische Plastizität in HTPCs

Im Gegensatz zu anderen myogenen Zelllinien (beispielsweise Skelett- und Herzmuskulatur), zeichnen sich glatte Muskelzellen (SMCs) durch ein multifunktionales Repertoire an Funktionen aus. Dazu zählen unter anderem: Kontraktilität, Migration, Proliferation sowie Synthese von ECM-Bestandteilen und nicht zuletzt Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen [113]. Dieses Spektrum von Funktionen ist in einem

Kontinuum mit zwei gegensätzlich phänotypischen Ausprägungszuständen organisiert, nämlich einerseits der sog. kontraktile und andererseits der synthetisch aktive Phänotyp (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34: Phänotypische Plastizität von SMCs**

Mit dem Begriff der „Modulation“ wird der phänotypische Wandel von Glattmuskelzellen, hin zu einem synthetischen Phänotyp beschrieben. Verschiedene Faktoren wurden bereits identifiziert, die diesen Prozess regulieren, darunter PDGF-BB und beruhend auf den vorliegenden Ergebnissen auch 15dPGJ2. „Maturation“ wiederum beschreibt einen gegensätzlichen Vorgang, der v.a. gekennzeichnet ist, durch verstärkte Expression von glattmuskulären Markerproteinen, wie SMA und MYH11. (Modifiziert nach Halayko). *Verwendete Abkürzungen: SMA = smooth muscle actin; MYH11 = myosin heavy chain 11; PDGF-BB = Platelet derived growth factor BB; TGFbeta = Transforming growth factor beta; Ang-II = Angiotensin-2; ET-1 = Endothelin-1*

Der Wechsel zwischen diesen beiden Formen wird als sogenannte phänotypische Plastizität der Glattmuskelzelle beschrieben [113], wobei für die einzelnen Differenzierungsprozesse mitunter eine unterschiedliche Nomenklatur verwendet wird [114]. Die Steuerung dieser Plastizität, in der Literatur oftmals als „phenotypic switch“ bezeichnet, unterliegt wiederum einer komplexen Integration einer Vielzahl unterschiedlicher Signale, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Zellkontakte und Bestandteile der ECM [114]. Diese funktionelle Regulation spielt nicht nur für physiologische Vorgänge, sondern vor allem auch in zahlreichen Pathologien, wie Asthma, Bluthochdruck und am ausführlichsten charakterisiert für die Atherosklerose eine maßgebliche Rolle [115].

Testikuläre peritubuläre Zellen werden durch ihre phänotypischen Charakteristika als glattmuskuläre sowie fibroblastäre Zellen beschrieben, oder aber auch als

„myofibroblast-like cells“ bezeichnet [5]. Damit soll ihre Zwischenstellung als einerseits kontraktile, andererseits synthetisch aktiver Zelltypus definiert werden. Als Vergleich wird hierbei oftmals der Myofibroblast verwendet: ein gängiges Konzept der Genese dieses Zelltypus basiert darauf, dass heterogene Stimuli ortsständige Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren, die somit, ähnlich glatten Muskelzellen, zur Kontraktion befähigt sind [116].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse einer massiv induzierten Zellvolumenzunahme, sowie verstärkten MTS-Umsatzes als Zeichen erhöhter metabolischer Aktivität, beschreiben somit eine hypertrophe Zellantwort von HTPCs im Rahmen einer 15dPGJ2 Stimulation (Abbildung 26a&c). Reduziert auf diese beiden Parameter kann also von einem phänotypischen Wechsel, induziert durch 15dPGJ2, ausgegangen werden. Das geringere Ausmaß der Veränderungen für Größe und metabolische Aktivität durch den Vorläufer von 15dPGJ2, nämlich PGJ2, kann am ehesten durch eine evtl. insuffiziente nichtenzymatische Umsetzung und weiterhin durch die Instabilität des Endmetaboliten erklärt werden. 15dPGJ2 kann über eine Vielzahl von Signalwegen seine Effekte vermitteln (siehe Abschnitt Signaltransduktion), wobei dem nukleären Rezeptor PPAR $\gamma$  eine besondere Rolle zukommt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass weder spezifische Agonisten (Troglitazone), noch Antagonisten (BADGE) für den PPAR $\gamma$ -Rezeptor signifikante Effekte aufwiesen und somit muss von einem PPAR $\gamma$ -unabhängigen Signaltransduktionsweg ausgegangen werden (Abbildung 26b&25; und Kapitel Signaltransduktion – IV.2.3.).

Eine hypertrophe Reaktion, also eine Zunahme an Zellgröße und zellulärem Proteingehalt entspricht im Konzept glattmuskulärer Plastizität weitestgehend dem des synthetischen Phänotyps. Bereits in tierexperimentellen Studien konnten ähnliche Reaktionsmuster für testikuläre peritubuläre Zellen der Ratte nachgewiesen und als verantwortliche Mediatoren Endothelin-1 (ET-1) und Platelet-derived-growth-factor BB (PDGF-BB) identifiziert werden [117, 118]. Die hier durch 15dPGJ2 mediierte hypertrophische Reaktion an humanen testikulären peritubulären Zellen wurde jedoch bisher noch nicht beschrieben. Wie bereits zu Beginn erwähnt, spielt der „phenotypic switch“ in einer Reihe von Pathologien eine erhebliche Rolle (s.o.) – für die Situation im Hoden stellt sich die Frage inwieweit die phänotypische Modulation von PCs für physiologische und/oder pathologische Vorgänge relevant sein könnte?

Beobachtungen einer massiven Verdickung des peritubulären Kompartiments in Fällen des Klinefelter Syndroms und schwerer Oligozoospermie lassen somit eine Assoziation von hypertrophischen Veränderungen als möglich erscheinen [18, 23]. Eine

Akkumulation extrazellulärer Matrixbestandteile, wie in Fällen tubulärer Sklerose im Rahmen eingeschränkter Fertilitätssituation, wiederum könnte mit einem erhöhten synthetischen Potential dedifferenzierter glattmuskulärer Zellen bzw. Myofibroblasten verbunden sein [28].

#### **IV.2.2. Phänotypische Dedifferenzierung und Verlust kontraktile Eigenschaften**

Die am Beispiel von peritubulären testikulären Zellen der Ratte beschriebene hypertrophische Reaktion war in allen Fällen von einer Zunahme an kontraktile Proteinen begleitet [117, 118]. So konnte beispielsweise für eine chronische Stimulation mit ET-1 ein signifikanter Zuwachs an SMA, Calponin und MYH-11 beobachtet werden, allesamt Proteine, die essentielle Funktionen im Vorgang der glattmuskulären Kontraktion besitzen. Der Gehalt bzw. das Expressionsniveau von Strukturproteinen oder ECM-Bestandteilen wurde in den erwähnten Studien nicht untersucht [117], womit sich letztlich keine Aussage über das synthetische Potential der behandelten Zellen treffen lässt.

Die Kontrolle der Kontraktilität in peritubulären Zellen dürfte auch maßgeblich für die Fertilitätssituation relevant sein. Schon seit Beschreibung der peritubulären Zellen als „myoide Zellen“ mit der Fähigkeit zu kontrahieren [5] wird angenommen, dass der Transport immotiler Spermatozyten aus den Tubuli seminiferii durch eine von PCs medierte Propulsionsbewegung gesteuert wird [119]. Anhand von Studien an transgenen Tiermodellen konnte diese These erst vor kurzem äußerst elegant, in weiten Teilen bewiesen werden [9].

Die chronische Stimulation von HTPCs mit 15dPGJ2 resultierte in erster Linie in einer massiven hypertrophischen Reaktion (Abbildung 26 und s.o.). Im Gegensatz jedoch zu den zuvor erwähnten Wachstumsfaktoren ET-1 und PDGF-BB (Platelet-derived-growth-factor BB) an PCs der Ratte, führte die Behandlung nicht zu einer Zunahme kontraktile Markergene, sondern zu deren Suppression (Abbildung 27). Die Analyse fibroblastärer Marker, wie CD90 und KollagenIV, zeigte weitestgehend stabile Niveaus an, so dass von einem selektiven Verlust kontraktile Differenzierungsmarker ausgegangen werden muss. Schließlich konnte mithilfe funktioneller Kollagenassays gezeigt werden, dass diese Veränderungen auf Expressionsniveau auch in einer eingeschränkten Kontraktilitätsfähigkeit resultieren, und somit eine phänotypischen De-Differenzierung vorliegt. Ähnliche Prozesse einer Suppression kontraktile Markergene in vaskulären Glattmuskelzellen sind für den Wachstumsfaktor PDGF-BB beschrieben [120, 121]. Interessanterweise scheint PDGF-BB in vaskulären SMCs nicht nur eine

Suppression des kontraktiven Phänotyps zu induzieren, sondern gleichzeitig auch eine verstärkte Proliferation und Migration [122]. Die Reaktion testikulärer PCs der Ratte erscheint hier jedoch vollkommen gegensätzlich [118], da derselbe Wachstumsfaktor (PDGF-BB) zu verstärkter Expression kontraktiver Marker und zudem zu einem Proliferationsstopp führt. Weiterhin scheint es speziesspezifische Unterschiede im Verhalten peritubulärer testikulärer Zellen zu geben, da HTPCs, im Gegensatz zu peritubulären Zellen der Ratte, auf eine Stimulation mit PDGF-BB hin proliferieren (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Mayerhofer). Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass SMCs zwar organunabhängig viele Eigenschaften und Funktionen teilen, jedoch gewisse Reaktionsmuster durchaus zelltyp-, sowie speziesspezifisch organisiert zu sein scheinen und dies die Notwendigkeit organnaher Modelle unterstreicht.

Als pathogenetische Konsequenz der zuvor vorgestellten Konzepte wäre also denkbar, dass erhöhte COX-2 Expression in der Situation eingeschränkter Fertilität zu einer konsekutiven intratestikulären Erhöhung von Prostaglandinen, darunter auch 15dPGJ2, führt und dieses wiederum eine phänotypische De-Differenzierung in HTPCs induziert. Ein Verlust glattmuskulärer Marker (Desmin) in der peritubulären Region findet sich tatsächlich auch *in vivo*, wie zahlreiche Studien an verschiedenen testikulären Pathologien zeigen konnten [6, 123]. Die auch in dieser Arbeit untersuchten glattmuskulären Marker, wie SMA und MYH-11, wiesen erhebliche Unterschiede in ihren Expressionsniveaus zwischen fertilen und infertilen Biopsieproben auf (Abbildung 28). Diese *in vivo* Ergebnisse an adulten humanen Proben unterstreichen einmal mehr die wichtige Funktion der peritubulären Kontraktilität in der Physiologie der Fertilität.

### **IV.2.3. Signaltransduktion und mögliche therapeutische Implikationen für die männliche Fertilität**

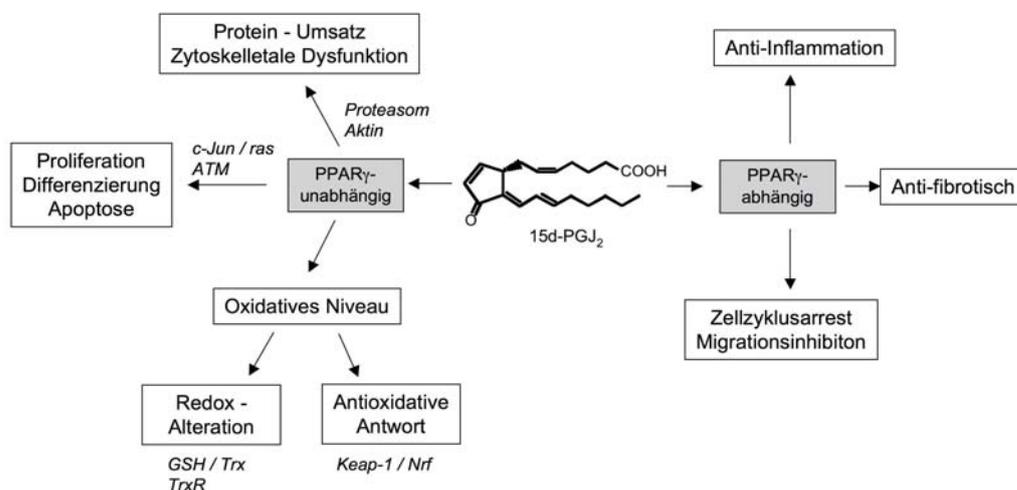
In den zuvor diskutierten Punkten blieb bislang gänzlich offen, auf welche Weise 15dPGJ2 seine Effekte letztlich vermittelt. Im Folgenden Abschnitt sollen diese Aspekte genauer erläutert und aufgegriffen werden, um daran anschließend mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeiten aufzuzeigen.

Als Endmetabolit der PGJ2 Reihe erscheint 15dPGJ2 als ein äußerst komplexer Faktor, da das gesamte Wirkungsspektrum über eine Vielzahl verschiedener Signalkaskaden vermittelt wird (welches darüberhinaus zelltyp- bzw. auch organspezifisch organisiert ist). 15dPGJ2 zählt zur Gruppe der sogenannten Cyclopentenon-Prostaglandine, die allesamt durch Dehydratation aus ihrer Vorstufe, dem PGD2 entstehen [49]. Diese Gruppe von Prostaglandinen wird durch aktive

transzelluläre Transportmechanismen innerhalb des Kerns akkumuliert und vermitteln dort ihre spezifischen Effekte [49]. Charakteristikum dieser PG's ist eine elektrophile  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Carbonyl Gruppe innerhalb des gruppentypischen Cyclopentenon Rings. Dieses reaktive Zentrum ermöglicht eine kovalente Michael-Additionsreaktion mit nukleophilen Gruppen, wie Sulfhydryl Gruppen des Glutathions oder Cystein-Resten an weiteren zellulären Proteinen, und kann somit wichtige zelluläre Signalwege in der oxidativen Homöostase beeinflussen [53, 124].

Neben dieser kovalenten Modifikationsmöglichkeit, besitzt 15dPGJ2 auch die Bindungsfähigkeit als endogener Ligand für den nukleären Peroxisomen-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ). Dieser Rezeptor ist maßgeblich an der Induktion von Differenzierungsprozessen von Adipozyten und zahlreichen weiteren Prozessen beteiligt [51, 125, 126].

Diese Vielfalt verschiedenster Signalkaskaden, die durch 15dPGJ2 aktiviert werden können, lässt eine einfache Wirkungsbeschreibung sehr komplex erscheinen und soll skizzenhaft anhand einer Übersicht dargestellt werden (siehe Übersichtsbild 35). Die für diese Arbeit wesentlich erscheinenden Signalwege sollen im Folgenden im Detail beschrieben werden:



**Abbildung 35: Signaltransduktionswege von 15dPGJ2**

In der obigen Darstellung sind die unterschiedlichen Signaltransduktionswege von 15dPGJ2 zusammengefasst. Allgemein wurde hier eine Darstellung gewählt, die zwischen PPAR $\gamma$ -abhängigen und unabhängigen Effekten unterscheidet. Für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse waren v.a. auch die Beeinflussung des oxidativen Niveaus durch 15dPGJ2, und hier im Speziellen die Redox-Alteration durch kovalente Modifikation von Glutathion (GSH) und Thioredoxin (Trx), die letztlich in einer Zunahme des ROS-Niveaus resultieren.

### IV.2.3.1 PPAR- $\gamma$ und 15dPGJ2

PPAR- $\gamma$  gehört neben weiteren Subtypen (alpha, beta und delta) zu einer Familie nukleärer Rezeptoren, die einerseits von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (inklusive Prostaglandin-Derivaten) und/oder der pharmakologischen Gruppe der Thiazolidindione (Troglitazone, Pioglitazone) aktiviert werden können [125, 127]. Seit seiner Charakterisierung als wesentlicher Faktor in der Differenzierung von Adipozyten wurden zunehmend mehr Prozesse, darunter Zellproliferation und inflammatorische Prozesse, identifiziert in die PPAR- $\gamma$  als Teil der Signalkaskade involviert ist [128].

Die Erkenntnisse über die Funktion von PPAR- $\gamma$  in Physiologie und Pathologie des Hodens sind im Allgemeinen sehr spärlich und zudem oft widersprüchlich [128, 129]. Für den Aspekt der Expression konnte zumindest eine verstärkte PPAR- $\gamma$  Expression an humanen Hodenkarzinombiopsien im Vergleich mit Proben gesunder Patienten aufgezeigt werden [130], wobei die pathogenetische Bedeutung dieser Befunde bislang offen bleibt. Detaillierte Studien zur zellulären Distribution des Rezeptors an humanen Proben fehlen und bisher durchgeführte tierexperimentelle Arbeiten weisen oft uneindeutige Ergebnisse auf [129].

Zahlreiche Arbeiten an glattmuskulären Zellen konnten zeigen, dass die Aktivierung des PPAR- $\gamma$  Rezeptors zu einer Inhibition von Proliferation und Migration führt, und somit die Modulation mittels Thiazolidindionen einen therapeutischen Ansatz in Pathologien wie Atherosklerose oder Hypertension bietet [131, 132]. Neuere Arbeiten konnten zudem das „anti-fibrotische“ Potential von PPAR- $\gamma$  nachweisen: so schwächt eine Aktivierung des Rezeptors pro-fibrotische Signale des TGF- $\beta$  Wachstumsfaktors in Fibroblasten [133, 134]. Ausgehend von diesen und ähnlichen anderen Ergebnisse stehen PPAR- $\gamma$  Aktivatoren wie Thiazolidindione mittlerweile auch in der Diskussion als „anti-fibrotische“ Therapeutika [135, 136].

15dPGJ2 gilt neben den bereits erwähnten Thiazolidindionen als ein natürlicher Ligand von PPAR- $\gamma$ , kann jedoch auch (s.o.) seine Effekte unabhängig von diesem vermitteln. In den mit 15dPGJ2 durchgeführten Untersuchungen an HTPCs zeigt sich deutlich, dass Veränderungen wie Zellgröße und Stoffwechselaktivität mit großer Wahrscheinlichkeit PPAR- $\gamma$  unabhängig reguliert werden. Die Verwendung von spezifischen Agonisten sowie von Antagonisten konnte nämlich nicht die beobachtete Wirkung von 15dPGJ2 imitieren (s. Abbildung 26). Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass eventuell komplexe Vorgänge, wie die Suppression glattmuskulärer Differenzierungsmarker, einer umfassenden Integration verschiedenster Signalwege unterliegen und somit PPAR- $\gamma$  in dieses Geschehen involviert sein könnte (abschließende Untersuchungen hierzu an HTPCs stehen bislang noch aus).

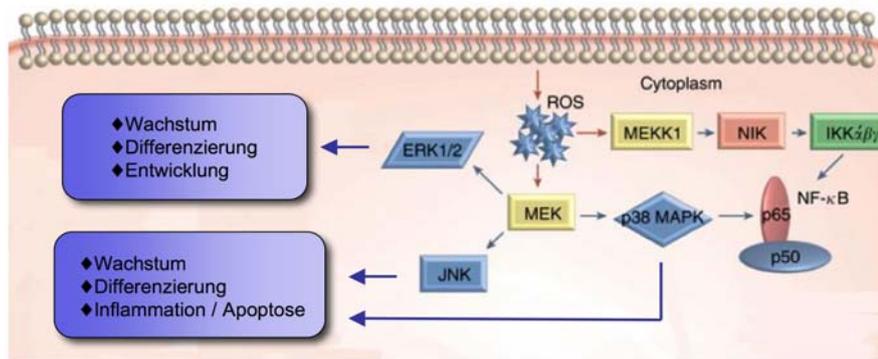
### IV.2.3.2 Reactive Oxygen Species (ROS) und 15dPGJ2

Beruhend auf Ergebnissen dieser Arbeit, erscheint die Alteration des zellulären oxidativen Niveaus bzw. des Redox-Zustandes in der Vermittlung von Effekten durch 15dPGJ2 entscheidender zu sein, als der zuvor beschriebene Signalweg mittels PPAR- $\gamma$ .

Der Redox-Zustand einer Zelle wird allgemein durch die spezifische Konzentration an Elektronen und Radikalen (Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxide, Stickstoffmonoxide) beschrieben, die in den verschiedenen zellulären Kompartimenten gespeichert sind [137]. Diese intrazelluläre Konzentration wird hierbei, ähnlich wie der pH, in engen Grenzen gehalten und durch ein System verschiedenster Antioxidantien kontrolliert. Diese „oxidative Pufferkapazität“ zellulärer Antioxidantien, die erhöhten Konzentrationen von Oxidantien bzw. ROS entgegenwirkt, wird im Wesentlichen durch zwei Faktoren und ihre entsprechenden Reduktasen vermittelt: Glutathion (GSH) und Thioredoxin (Trx).

ROS, als heterogene Gruppe oxidativer Metabolite, entstehen sowohl in physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Atmungskette innerhalb der Mitochondrien, können jedoch in vermehrtem Maß auch im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen, durch Zytokine oder aktivierte Leukozyten beispielsweise, produziert werden [138].

Die Konsequenz dieser Änderung im Redox-Niveau einer Zelle ergibt sich unter anderem durch die Eigenschaft der ROS als potente Signalmoleküle. So regulieren sie unter anderem die Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Kinase-Kaskaden (ERK1/2, p38) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), und greifen damit in grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung ein [139]. Forschungsergebnisse der letzten Jahre schreiben dieser heterogenen und gleichsam multifunktionalen Gruppe (ROS) somit zunehmend eine wichtige Rollen in einer Vielzahl von Pathologien zu (Tumorigenese, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes - [140, 141]).



**Abbildung 36: Überblick über Signaltransduktionswege der ROS**

Durch Einflußnahme auf die sogenannte Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) Kaskade können ROS vielfältige verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen. So wirkt die ERK1/2 v.a. auf Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung, wohingegen JNK und p38MAPK (über Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-kappa-b) vielfach in inflammatorische Prozesse oder der Induktion von Apoptose involviert sind. Das vereinfachende Schema soll letztlich die komplexe Signalintegration von ROS als Modulator der MAPK-Kaskade illustrieren. Verwendete Abkürzungen: ERK1/2 = extracellular-signal related kinase 1/2; MEK = MAP Kinase Kinase; p38 MAPK = p38 Mitogen-aktivierte-Protein Kinase; JNK = c-Jun-N-terminale Kinase; NF-kappa-B = nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B; modifiziert nach Bickers und Athar, Journal of Investigative Dermatology 2006.

Neben der bereits beschriebenen Interaktion von 15dPGJ2 mit dem PPAR-γ Rezeptor (s.o.), ist als ein weiterer möglicher Signaltransduktionsweg die Alteration des zellulären Redox-Niveaus durch Induktion von ROS beschrieben. Die wesentlichen Mechanismen hierbei sind kovalente Reaktionen mit Thioredoxin bzw. der spezifischen Reduktase (TrxR - [49]). Durch diese kovalente Modifikation (Michael-Additionsreaktion) wird der Wirkungsradius des antioxidativen Systems eingeschränkt und das diffizile Gleichgewicht zugunsten eines oxidativen Milieus verschoben. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass 15dPGJ2 zudem gleichzeitig die Induktion antioxidativer Mechanismen beeinflussen kann (über die Transkriptionsfaktoren Keap-1/Nrf [54]). Anhand dieses funktionalen Dualismus (pro- vs. anti-oxidativ) wird einmal mehr die Komplexität der 15dPGJ2 mediierten Wirkungen illustriert.

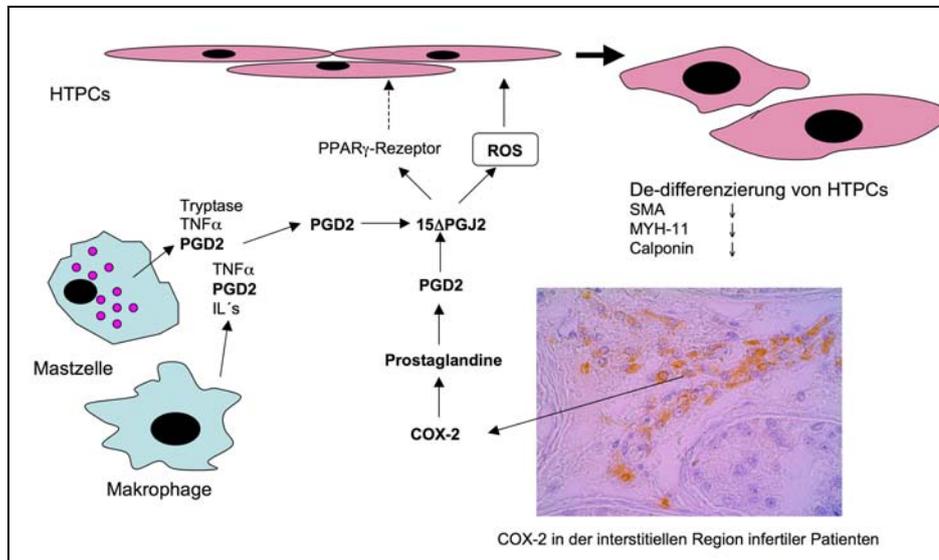
Bei der Behandlung von HTPCs mit 15dPGJ2 konnte klar gezeigt werden, dass ROS in der Signalvermittlung der beobachteten De-Differenzierung eine wesentliche Rolle spielen (Abbildung 31a&b). Eine vergleichbare Reaktion an ähnlichen Phänotypen (glattmuskuläre Zellen oder Myofibroblasten) ist bisher nicht beschrieben worden. Im Fall von glattmuskulären Zellen der Gefäßwand (VSMCs) wurde gezeigt, dass in nicht

proliferierenden Populationen ein gewisses Niveau an ROS sogar notwendig ist, um eine De-Differenzierung, d.h. einen spezifischen Verlust glattmuskulärer Marker, zu verhindern [142, 143]. Somit erscheint die an HTPCs beobachtete glattmuskuläre De-Differenzierung durch ROS eine zell- bzw. organspezifische Reaktion zu sein.

Darüberhinaus steuern ROS durch die Aktivierung weiterer Signalkaskaden (ERK1/2 – p38) auch ECM-Synthese, Migration und Kontraktion von VSCMs und somit erscheint, wie in älteren Studien postuliert, eine pauschale Kategorisierung dieser Gruppe als rein krankheitsfördernde Mediatoren überholt [142, 144].

Für die Physiologie bzw. pathophysiologische Rolle von ROS im Hoden ergeben sich ganz ähnliche Schlußfolgerungen, wie sie in anderen Organsystemen bislang beschrieben wurden. So wurde beispielsweise für Spermatozoen ein positiver Effekt auf Akrosomenreaktion, Kapazitation und Oozyt-Spermium-Interaktion durch ROS beschrieben [145]. Das pathologische Potential von ROS im testikulären Milieu ist hingegen bislang am intensivsten für die Varikozele (daneben auch für urogenitale Infektionen) untersucht und diskutiert [146, 147]. Hier fanden sich einerseits massiv erhöhte Niveaus an ROS im Seminalplasma von infertilen Patienten mit Varikozelen im Vergleich zu gesunden Probanden und darüberhinaus in testikulären Biopsien eine verstärkte Expression von Hemoxygenase-1 (HO-1) in Leydigzellen, als Zeichen einer funktionalen antioxidativen Antwort [148, 149]. Welche Mechanismen letztlich für die Veränderungen im ROS Niveau verantwortlich sind, ist bislang ungeklärt – potentielle Quellen für ROS sind aber mit Sicherheit intratestikuläre Leukozyten, wie sie im Rahmen von urogenitalen Infektionen oder aber auch in Zuständen eingeschränkter Spermatogenese beobachtet und beschrieben wurden [146]. Vor allem die Tatsache, dass eine Aktivierung von Leukozyten deren Potenz ROS zu produzieren vergrößert, schreibt dieser Zellpopulation in der Modulation des intratestikulären Redox-Niveaus eine außerordentlich wichtige Rolle zu [150]. Versuche mittels Antioxidantien positive Effekte im Rahmen eingeschränkter Fertilität zu erzielen, wurden bislang zumeist innerhalb nicht kontrollierter Studien durchgeführt und/oder die Bedingungen (d.h. Dosis, Behandlungsdauer, Wahl des Antioxidans) erlauben keine direkte Vergleichbarkeit der vorhandenen Studien [151]. Eine erst kürzlich publizierte Arbeit hierzu konnte erneut nachweisen, dass eine Therapie mittels Antioxidantien die Konzentration von ROS im untersuchten Sperma reduzieren konnte und weiterhin die DNA-Integrität der Spermien im Vergleich zu unbehandelten Patienten erhöhen konnte, jedoch übliche Qualitätsparameter des Ejakulats (Spermienzahl, Motilität, Morphologie) von dieser Therapie unbeeinflusst blieben [152].

Berücksichtigt man die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse bisheriger Studien, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt lediglich der Schluss ziehen, dass ROS mit dem Grad eingeschränkter Fertilität (v.a. geminderter Spermaqualität) korrelieren, vielerlei intra- sowie extratestikuläre Quellen identifiziert werden konnten, allerdings noch kein abschließendes Urteil zur Praktikabilität einer antioxidativen Therapie zu fällen ist.



**Abbildung 37: Mögliche pathogenetische Effekte von 15dPGJ2 durch Induktion von ROS**

In der obigen Darstellung finden sich mögliche Konsequenzen einer durch 15dPGJ2 induzierten Zunahme von ROS in HTPCs. Als Quellen für 15dPGJ2 kommen einerseits erhöhte Dichte an intratestikulären Leukozyten und andererseits die verstärkte Expression von COX-2 im interstitiellen Kompartiment in Frage.

## V. Zusammenfassung:

Fälle von Sub- bzw. Infertilität des Mannes sind histomorphologisch durch eine Reihe von Veränderungen charakterisiert: so findet sich einerseits ein fibrotischer Umbau und Hyalinose im Bereich der peritubulären Region. Andererseits läßt sich eine Infiltration und Akkumulation von Immunzellen (Mastzellen und Makrophagen) im testikulären Milieu beobachten, assoziiert mit einer nachweisbaren Expression von COX-2 im Interstitium. Die *in vitro* Untersuchung testikulärer peritubulärer Zellen, als wesentliche, strukturgebende Komponente der Tubuli seminiferii, war bislang nur in Tiermodellen (Ratte, Maus) etabliert und bedingt durch wesentliche histomorphologische Unterschiede ist die Übertragbarkeit dieser Studien nur eingeschränkt auf die humane Situation möglich. Mit der Etablierung der Zellkultur von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs) aus diagnostischen Hodenbiopsien steht nun erstmals ein geeignetes Modell zur detaillierten Charakterisierung dieses Zelltypus zur Verfügung. Hintergrund der vorliegenden Arbeit war die Annahme einer ein- bzw. auch wechselseitigen Beeinflussung der erwähnten Zellpopulationen (peritubuläre Zellen und Immunzellen) die letztlich in den pathologischen Veränderungen, d.h. der beobachteten fibrotischen Umbaureaktion, resultieren könnten. Dabei sollten folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

- 1.) führt  $\text{TNF}\alpha$ , als sekretorisches Produkt von Mastzellen und Makrophagen, zu einer solitär fibrotischen Reaktion der HTPCs, oder aber besitzen diese darüberhinaus ein proinflammatorisches und auch sekretorisches Potential?
- 2.) wirkt das Prostaglandin  $15\text{dPGJ}_2$ , als potentielles Endprodukt der Prostaglandinsynthese in Gegenwart nachweisbarer COX-2 Expression, über seinen Rezeptor  $\text{PPAR}\gamma$  proliferativ auf HTPCs, oder bestehen weitere  $\text{PPAR}\gamma$ -unabhängige Effekte?

Ad 1.): In einem ersten Schritt konnte an HTPCs mittels molekularbiologischer und immunologischer Methoden die Expression funktioneller  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren nachgewiesen und als Konsequenz einer Aktivierung dieser, ein pleiotropes Spektrum an zellulären Antworten beobachtet werden. So zeigte sich einerseits eine massive Induktion des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1, sowie eine transient verstärkte Expression des Enzyms COX-2 (Schlüsselenzym in der Synthese von Prostaglandinen). Beide Veränderungen erscheinen als prototypische Reaktionen in inflammatorischen Zuständen und korrelieren weitestgehend mit *in vivo* Befunden eingeschränkter Spermatogenesezustände. Darüberhinaus konnten HTPCs als sekretorische Zellen identifiziert werden, die bereits basal den neurotrophen Wachstumsfaktor NGFb produzieren. Eine Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  schließlich konnte

dosisabhängig die Sekretion beeinflussen; ebenso konnte ein solcher Zusammenhang für das Chemokin MCP-1 gezeigt werden. Eine signifikante Beeinflussung des Umsatzes von extrazellulärer Matrix (ECM) konnte hingegen, durch molekularbiologische Untersuchungen und funktionelle Aktivitätsanalyse beteiligter Enzyme (MMP-2/TIMP-1), weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch Veränderungen in der metabolischen Aktivität, als Maß proliferativer Kapazität, konnten in HTPCs nicht beobachtet werden. Somit weisen die vorliegenden Ergebnisse daraufhin, dass TNF $\alpha$  in HTPCs ein pro-inflammatorisches Repertoire, sowie Produktion und Sekretion proinflammatorische Signalmoleküle provoziert, jedoch keine signifikante Auswirkung in Hinblick auf ECM-Umsatz oder proliferative Kapazität zu haben scheint.

Ad 2.): Es konnte hierbei erstmals mit zellbiologischen Methoden ein durch 15dPGJ2 induzierter phänotypischer Wandel von HTPCs beobachtet werden. Dieser, auch als „phenotypic switch“ bezeichnete, Wechsel war gekennzeichnet durch eine hypertrophische Reaktion der HTPCs, der gleichzeitig von einer selektiven Suppression glattmuskulärer Marker begleitet war. Diese Suppression des kontraktiven Phänotyps wiederum wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methodik im Detail charakterisiert und schließlich anhand funktioneller Kontraktionsassays validiert. Als maßgeblicher Signaltransduktionsweg konnten reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in dem beobachteten Geschehen identifiziert werden und eine weitestgehende Unabhängigkeit dieser Prozesse vom nukleären Rezeptor PPAR $\gamma$  bestätigt werden. Eine glattmuskuläre De-Differenzierung testikulärer peritubulärer Zellen konnte weiterhin auch anhand von *in vivo* Befunden dokumentiert werden und die an HTPCs erhobenen *in vitro* Ergebnisse erlauben somit die Annahme von Parallelen in der gemeinsamen Pathophysiologie und einer zentralen Rolle für das Prostaglandin 15dPGJ2 in diesen Prozessen.

Zusammenfassend können anhand der erarbeiteten Ergebnisse an dem Kulturmodell primärer humaner peritubulärer Zellen (HTPCs) zwei wesentliche Aussagen getroffen werden: TNF $\alpha$  als Zytokin mit pleiotropen Effekten führt in HTPCs zu einer pro-inflammatorischen Zellantwort. Darüberhinaus konnte das Prostaglandin 15dPGJ2 als wesentlicher Faktor einer glattmuskulären De-Differenzierung von HTPCs identifiziert werden und zudem ein ROS involvierender Signalweg charakterisiert werden. Auch diese Befunde unterstreichen bisherige Beobachtungen in Pathologien wie eingeschränkter Spermatogenese und damit einhergehender Sub- bzw. Infertilität. Speziell die durch 15dPGJ2 induzierten Änderungen des Redox-Niveaus könnten interessante Anknüpfungspunkte für zukünftige antioxidativen Therapien liefern. Ob

und inwiefern die, hier größtenteils *in vitro*, erhobenen Befunde tatsächlich übertragbar sind auf die oftmals komplexere *in vivo* Situation bedarf sicherlich weiterer experimenteller Forschungsanstrengungen. Insbesondere die Fragen, ob inflammatorische Prozesse tatsächlich fibrotischen Umbau der peritubulären Region bedingen und welche Rolle hierbei sekretorische Faktoren wie NGFb spielen, wären interessante und mitunter auch therapeutisch relevante Ansatzpunkte.

## VI. Literaturverzeichnis

## Literaturverzeichnis

1. Huleihel, M. and E. Lunenfeld, *Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors*. Asian J Androl, 2004. **6**(3): p. 259-68.
2. Schlatt, S., A. Meinhardt, and E. Nieschlag, *Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function*. Eur J Endocrinol, 1997. **137**(2): p. 107-17.
3. de Kretser, D.M. and D.J. Phillips, *Mechanisms of protein feedback on gonadotropin secretion*. J Reprod Immunol, 1998. **39**(1-2): p. 1-12.
4. Davidoff, M.S., et al., *Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules*. Cell Tissue Res, 1990. **262**(2): p. 253-61.
5. Maekawa, M., K. Kamimura, and T. Nagano, *Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function*. Arch Histol Cytol, 1996. **59**(1): p. 1-13.
6. Virtanen, I., et al., *Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments*. Anat Rec, 1986. **215**(1): p. 10-20.
7. Tung, P.S. and I.B. Fritz, *Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: alpha-smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker*. Biol Reprod, 1990. **42**(2): p. 351-65.
8. Martin, R., et al., *The peritubular myofibroblasts in the testes from normal men and men with Klinefelter's syndrome. A quantitative, ultrastructural, and immunohistochemical study*. J Pathol, 1992. **168**(1): p. 59-66.
9. Zhang, C., et al., *Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17718-23.
10. Albrecht, M., et al., *Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(5): p. 1956-60.
11. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.
12. Thompson, E.W., A.W. Blackshaw, and S.S. Raychoudhury, *Secreted products and extracellular matrix from testicular peritubular myoid cells influence androgen-binding protein secretion by Sertoli cells in culture*. J Androl, 1995. **16**(1): p. 28-35.
13. Skinner, M.K. and I.B. Fritz, *Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 114-8.
14. Wang, R.S., et al., *Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice*. Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 119-32.
15. Howl, J., et al., *Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation*. Endocrinology, 1995. **136**(5): p. 2206-13.
16. Rossi, F., et al., *Testicular peritubular myoid cells are a target for adrenomedullin*. Arch Androl, 2000. **44**(2): p. 103-7.
17. Gomez, E., et al., *Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes*. Biol Reprod, 1997. **56**(6): p. 1513-26.
18. Santamaria, L., et al., *The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study*. Histopathology, 1992. **21**(5): p. 423-33.
19. Arenas, M.I., et al., *Immunocytochemical and quantitative study of actin, desmin and vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men*. J Reprod Fertil, 1997. **110**(1): p. 183-93.

20. Meineke, V., et al., *Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men*. *Fertil Steril*, 2000. **74**(2): p. 239-44.
21. Apa, D.D., et al., *Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility*. *Arch Androl*, 2002. **48**(5): p. 337-44.
22. Gulkesen, K.H., et al., *Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study*. *Asian J Androl*, 2002. **4**(1): p. 55-60.
23. Haider, S.G., J. Talati, and G. Servos, *Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis*. *Tissue Cell*, 1999. **31**(1): p. 90-8.
24. Hussein, M.R., et al., *Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis*. *Fertil Steril*, 2005. **83**(5): p. 1447-53.
25. Agarwal, S., M. Choudhury, and A. Banerjee, *Mast cells and idiopathic male infertility*. *Int J Fertil*, 1987. **32**(4): p. 283-6.
26. Nagai, T., et al., *Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility*. *Fertil Steril*, 1992. **57**(6): p. 1331-6.
27. Yamanaka, K., et al., *Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility*. *Hum Reprod*, 2000. **15**(7): p. 1543-7.
28. Frungieri, M.B., et al., *Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(23): p. 15072-7.
29. Godfrey, H.P., et al., *Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases*. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(8): p. 852-6.
30. Pesci, A., et al., *Mast cells in fibrotic lung disorders*. *Chest*, 1993. **103**(4): p. 989-96.
31. Pesci, A., et al., *Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(5): p. 1311-6.
32. Balazs, M., G. Illyes, and G. Vadasz, *Mast cells in ulcerative colitis. Quantitative and ultrastructural studies*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1989. **57**(6): p. 353-60.
33. Raithel, M., et al., *Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **108**(2): p. 127-33.
34. Toth, T., et al., *Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(7): p. 1498-505.
35. Akers, I.A., et al., *Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **278**(1): p. L193-201.
36. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(8): p. 1403-8.
37. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 45-65.
38. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(9): p. 372-7.
39. De, S.K., et al., *Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells*. *Endocrinology*, 1993. **133**(1): p. 389-96.
40. Hutson, J.C., *Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages*. *J Reprod Immunol*, 1993. **23**(1): p. 63-72.
41. Mauduit, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **224**(3): p. 631-7.

42. Delfino, F.J., et al., *NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **201**(1-2): p. 1-12.
43. Lysiak, J.J., *The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 9.
44. Yule, T.D. and K.S. Tung, *Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor*. Endocrinology, 1993. **133**(3): p. 1098-107.
45. Suescun, M.O., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2114-21.
46. Miller, S.B., *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(1): p. 37-49.
47. Kis, B., J.A. Snipes, and D.W. Busija, *Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(1): p. 1-7.
48. Herlong, J.L. and T.R. Scott, *Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme*. Immunol Lett, 2006. **102**(2): p. 121-31.
49. Uchida, K. and T. Shibata, *15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 138-44.
50. Oguma, T., K. Asano, and A. Ishizaka, *Role of prostaglandin D(2) and its receptors in the pathophysiology of asthma*. Allergol Int, 2008. **57**(4): p. 307-12.
51. Forman, B.M., et al., *15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma*. Cell, 1995. **83**(5): p. 803-12.
52. Brown, J.D. and J. Plutzky, *Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 518-33.
53. Rossi, A., et al., *Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 103-8.
54. Kim, E.H. and Y.J. Surh, *15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1516-28.
55. Schell, C., et al., *A prostaglandin D2 system in the human testis*. Fertil Steril, 2007. **88**(1): p. 233-6.
56. Kanaoka, Y. and Y. Urade, *Hematopoietic prostaglandin D synthase*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(2-3): p. 163-7.
57. Frungieri, M.B., et al., *Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men*. Fertil Steril, 2002. **78**(2): p. 298-306.
58. Doronzo, G., et al., *C-reactive protein increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cells*. J Lab Clin Med, 2005. **146**(5): p. 287-98.
59. Cupp, A.S., G.H. Kim, and M.K. Skinner, *Expression and action of neurotrophin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development*. Biol Reprod, 2000. **63**(6): p. 1617-28.
60. Muller, D., et al., *The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(2): p. 199-211.
61. Perrard, M.H., et al., *beta-Nerve growth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes*. J Cell Physiol, 2007. **210**(1): p. 51-62.
62. Frungieri, B., et al., *Male factor*. Fertility and Sterility, 2002. **78**(2).
63. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
64. Starace, D., et al., *Peculiar subcellular localization of Fas antigen in human and mouse spermatozoa*. Microsc Res Tech, 2009. **72**(8): p. 573-9.

65. Rodriguez, M.G., et al., *Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord*. Asian J Androl, 2006. **8**(5): p. 576-83.
66. Bryniarski, K., et al., *Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function*. Am J Reprod Immunol, 2004. **52**(1): p. 27-35.
67. Goto, K., et al., *Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Induces Upregulation of RhoA via NF-kappaB Activation in Cultured Human Bronchial Smooth Muscle Cells*. J Pharmacol Sci, 2009. **110**(4): p. 437-44.
68. Hewitson, T.D., *Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(6): p. F1239-44.
69. Demedts, I.K., et al., *Matrix metalloproteinases in asthma and COPD*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(3): p. 257-63.
70. Migita, K., et al., *TNF-alpha-mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 553-7.
71. Han, Y.P., et al., *Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22341-50.
72. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Biological therapies for inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1182-97.
73. Lykouras, D., et al., *Role and pharmacogenomics of TNF-alpha in asthma*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(9): p. 934-42.
74. Ranganathan, P., *An update on pharmacogenomics in rheumatoid arthritis with a focus on TNF-blocking agents*. Curr Opin Mol Ther, 2008. **10**(6): p. 562-7.
75. Brennan, F.M. and I.B. McInnes, *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3537-45.
76. Lawson, C. and S. Wolf, *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
77. Koyama, Y., et al., *Cross-linking of intercellular adhesion molecule 1 (CD54) induces AP-1 activation and IL-1beta transcription*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 5097-103.
78. Hubbard, A.K. and R. Rothlein, *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1379-86.
79. Smith, M.E. and J.A. Thomas, *Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue*. J Clin Pathol, 1990. **43**(11): p. 893-900.
80. Magnanti, M., et al., *Integrin pattern and effect on contraction in cultured testicular peritubular myoid cells*. Am J Reprod Immunol, 2001. **45**(1): p. 21-7.
81. Ozturk, H., et al., *The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion*. J Pediatr Surg, 2003. **38**(11): p. 1621-7.
82. Salinas, G., et al., *The cyclooxygenase 2 (COX-2) story: it's time to explain, not inflame*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2007. **12**(2): p. 98-111.
83. Schell, C., et al., *Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1678-86.
84. Wilhelm, D., et al., *SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10553-60.
85. Steele, G.L. and P.C. Leung, *Intragonadal signalling mechanisms in the control of steroid hormone production*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **41**(3-8): p. 515-22.
86. Ellis, L.C., et al., *Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male*. Arch Androl, 1981. **6**(4): p. 283-94.

87. Farr, C.H. and L.C. Ellis, *In-vitro contractility of rat seminiferous tubules in response to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4'-dibromoacetophenone*. J Reprod Fertil, 1980. **58**(1): p. 37-42.
88. Reddy, M.M., et al., *Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats*. Reprod Toxicol, 2006. **22**(3): p. 493-500.
89. Micera, A., et al., *New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 369-74.
90. Melgarejo, E., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 998-1001.
91. Aubry, F., et al., *Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary culture*. Biol Reprod, 2000. **62**(5): p. 1427-35.
92. Guazzone, V.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis*. J Reprod Immunol, 2003. **60**(2): p. 143-57.
93. Iosub, R., et al., *Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 686-98.
94. Micera, A., et al., *Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 245-56.
95. Stephan, J.P., V. Syed, and B. Jegou, *Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro*. Mol Cell Endocrinol, 1997. **134**(2): p. 109-18.
96. Barthel, C., et al., *Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. R82.
97. Seidel, M.F., et al., *Nerve Growth Factor in Rheumatic Diseases*. Semin Arthritis Rheum, 2009.
98. Watson, J.J., S.J. Allen, and D. Dawbarn, *Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential?* BioDrugs, 2008. **22**(6): p. 349-59.
99. Bonini, S., et al., *Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10955-60.
100. Kassel, O., et al., *Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(9): p. 1432-40.
101. Olgart Hoglund, C., et al., *Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi*. Eur Respir J, 2002. **20**(5): p. 1110-6.
102. Freund-Michel, V. and N. Frossard, *The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(1): p. 52-76.
103. Skinner, M.K., R.I. McLachlan, and W.J. Bremner, *Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS*. Mol Cell Endocrinol, 1989. **66**(2): p. 239-49.
104. Norton, J.N., J.L. Vigne, and M.K. Skinner, *Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of common signal transduction pathways*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 149-57.
105. Verhoeven, G., E. Hoeben, and K. De Gendt, *Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity*. Andrologia, 2000. **32**(1): p. 42-5.
106. Hoeben, E., et al., *Heregulins or neu differentiation factors and the interactions between peritubular myoid cells and Sertoli cells*. Endocrinology, 1999. **140**(5): p. 2216-23.
107. Braun, A., et al., *Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma*. Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3240-51.
108. Hoyle, G.W., et al., *Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(2): p. 149-57.

109. Micera, A., et al., *Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6162-7.
110. Sawada, J., et al., *Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2052-8.
111. Glaab, T., et al., *Effect of anti-nerve growth factor on early and late airway responses in allergic rats*. Allergy, 2003. **58**(9): p. 900-4.
112. Frungieri, M.B., et al., *Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells*. Neuroendocrinology, 2000. **71**(1): p. 43-50.
113. Halayko, A.J. and J. Solway, *Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells*. J Appl Physiol, 2001. **90**(1): p. 358-68.
114. Iyemere, V.P., et al., *Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification*. J Intern Med, 2006. **260**(3): p. 192-210.
115. Kawai-Kowase, K. and G.K. Owens, *Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C59-69.
116. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
117. Romano, F., et al., *Endothelin induces functional hypertrophy of peritubular smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 264-73.
118. Chiarenza, C., et al., *Platelet-derived growth factor-BB stimulates hypertrophy of peritubular smooth muscle cells from rat testis in primary cultures*. Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2971-81.
119. Romano, F., et al., *The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility*. Contraception, 2005. **72**(4): p. 294-7.
120. Holycross, B.J., et al., *Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation*. Circ Res, 1992. **71**(6): p. 1525-32.
121. Yoshida, T., et al., *Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C886-95.
122. Dandre, F. and G.K. Owens, *Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(6): p. H2042-51.
123. Santamaria, L., et al., *Immunohistochemical quantitative study of the peritubular lamina propria after induction of testicular atrophy induced by epinephrine*. Int J Androl, 1995. **18**(6): p. 295-306.
124. Fukushima, M., *Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1992. **47**(1): p. 1-12.
125. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
126. Kliewer, S.A., et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-9.
127. Escher, P. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions*. Mutat Res, 2000. **448**(2): p. 121-38.
128. Froment, P., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition*. J Endocrinol, 2006. **189**(2): p. 199-209.

129. Corton, J.C. and P.J. Lapinskas, *Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract?* Toxicol Sci, 2005. **83**(1): p. 4-17.
130. Hase, T., et al., *Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists.* Urology, 2002. **60**(3): p. 542-7.
131. Tontonoz, P. and B.M. Spiegelman, *Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma.* Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 289-312.
132. Varga, T. and L. Nagy, *Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* Eur J Clin Invest, 2008. **38**(10): p. 695-707.
133. Wu, M., et al., *Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Am J Pathol, 2009. **174**(2): p. 519-33.
134. Ghosh, A.K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator.* FASEB J, 2009. **23**(9): p. 2968-77.
135. Rockey, D.C., *Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease.* Clin Liver Dis, 2008. **12**(4): p. 939-62, xi.
136. Lakatos, H.F., et al., *The Role of PPARs in Lung Fibrosis.* PPAR Res, 2007. **2007**: p. 71323.
137. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.* Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
138. Filippin, L.I., et al., *Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis.* Clin Exp Immunol, 2008. **152**(3): p. 415-22.
139. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
140. Wu, W.S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression.* Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 695-705.
141. Suvorava, T. and G. Kojda, *Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(7): p. 802-10.
142. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *Redox signaling in hypertension.* Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 247-58.
143. Su, B., et al., *Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation.* Circ Res, 2001. **89**(1): p. 39-46.
144. Wang, Z., M.R. Castresana, and W.H. Newman, *Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(1): p. 49-56.
145. de Lamirande, E. and C. O'Flaherty, *Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 106-15.
146. Makker, K., A. Agarwal, and R. Sharma, *Oxidative stress & male infertility.* Indian J Med Res, 2009. **129**(4): p. 357-67.
147. Marmar, J.L., *The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information.* Hum Reprod Update, 2001. **7**(5): p. 461-72.
148. Mostafa, T., et al., *Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele.* Andrologia, 2009. **41**(2): p. 125-9.
149. Shiraishi, K. and K. Naito, *Increased expression of Leydig cell haem oxygenase-1 preserves spermatogenesis in varicocele.* Hum Reprod, 2005. **20**(9): p. 2608-13.
150. Tremellen, K., *Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective.* Hum Reprod Update, 2008. **14**(3): p. 243-58.
151. Kefer, J.C., A. Agarwal, and E. Sabanegh, *Role of antioxidants in the treatment of male infertility.* Int J Urol, 2009. **16**(5): p. 449-57.

152. Tunc, O., J. Thompson, and K. Tremellen, *Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy*. *Reprod Biomed Online*, 2009. **18**(6): p. 761-8.

## VII. Danksagung:

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für Ihre Geduld, immerwährende Motivation und Ihr Verständnis bedanken. Ohne diesen Rückhalt wäre diese Arbeit sicherlich nur schwerlich, wenn überhaupt entstanden.

Herrn Prof. Dr. Artur Mayerhofer gilt weiterhin mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die fördernde Unterstützung und die umfassende Betreuung dieser Arbeit. In einer kreativen Atmosphäre weckte er den Forschergeist in mir und bot den notwendigen Freiraum eigene Ideen zu formulieren und diesen nach zu spüren.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Martin Albrecht, der mit seiner stets optimistischen Sichtweise so manches Problem lösbar werden ließ und immer mit hilfreichen Vorschlägen zur Stelle war.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Lars Kunz für seine hilfreichen Ratschläge bei methodischen und auch konzeptionellen Problemfragen, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit. Sein kritischer Blick schärfte das Bewußtsein für die wesentlichen Dinge.

Christine Mayer, Simone Spillner, Sandra Raffael, Astrid Tiefenbacher, Gabriele Terfloth und Barbara Zschesche möchte ich danken für Ihre wertvolle Unterstützung und kompetenten Ratschläge, die mir den Laboralltag wesentlich erleichtert haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ehemaligen Anatomischen Instituts bedanken, die stets für eine angenehme und kreative Atmosphäre gesorgt haben: Matthias Traut, Johanna Richter, Karin Metzrath, Dr. Axel Reinhardt, Dr. Veronica Rey, Dr. Monica Frungieri, Katrin Spinnler, Marion Adam, Julia Merz, sowie Dr. Sabine Saller.