

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Androgenrezeptor und Toll-like Rezeptoren 2 / 4
in testikulären peritubulären Zellen:
Charakterisierung und Funktionsanalyse

von Christine Julia Mayer
aus Tegernsee

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Wolf

Angefertigt an der Medizinischen Fakultät der LMU München
am Lehrstuhl für Anatomie III im Institut für Zellbiologie

Mentor: Prof. Dr. Artur Mayerhofer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

MEINEN ELTERN
UND
BASTI

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Morphologie des Hodens	1
1.1.1. Aufbau und Funktion des Hodens.....	1
1.1.2. Peritubuläres Kompartiment des Hodens.....	3
1.1.3. Veränderungen der peritubulären Zellen	5
1.2. Androgenrezeptor (AR) und Androgene	6
1.3. Toll-like Rezeptor (TLR)2 und TLR4	8
1.4. Ziele der Arbeit.....	11
2. MATERIAL	12
2.1. Material	12
2.2. Humane Hodenbiopsien	21
2.3. Hodenproben anderer Spezies	21
3. METHODEN	22
3.1. Zellbiologische Methoden	22
3.1.1. Isolierung humaner testikulärer peritubulärer Zellen (HTPCs)	22
3.1.2. Kultivierung und Kryokonservierung von HTPCs	22
3.1.3. Stimulation von HTPCs	23
3.1.4. Automatisierte Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung	23
3.2. Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1. Messenger Ribonukleinsäure (mRNA)- Isolierung	24
3.2.2. Reverse Transkription (RT)	24
3.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	25
3.2.4. Agarosegelelektrophorese	26
3.2.5. Sequenzierung	26
3.2.6. Quantitative real-time PCR (qPCR).....	26
3.3. Proteinbiochemische Methoden	29
3.3.1. Proteinisolierung	29
3.3.2. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	30
3.3.3. Immunhistochemie.....	31
3.3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
3.4. Statistik.....	33
4. ERGEBNISSE	34

4.1. AR Expression in testikulären peritubulären Zellen	34
4.1.1. AR mRNA Expression in HTPCs	34
4.1.2. AR Proteinexpression in HTPCs und Lokalisation des AR im humanen Hoden	35
4.1.3. Lokalisation des AR im Hoden verschiedener Spezies	36
4.1.4. Lokalisation von Calponin im Hoden verschiedener Spezies.....	37
4.2. Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf den Phänotyp von HTPCs.....	38
4.2.1. Zunahme der Proteinexpression von Calponin	38
4.2.2. Zunahme der Smooth Muscle Actin (SMA) Proteinexpression	39
4.2.3. Zunahme des AR Proteingehalts und Blockierung durch Flutamide.....	40
4.2.4. Effekte auf Zellzahl und Zellgröße	42
4.3. TLR2 und TLR4 Expression in HTPCs	43
4.3.1. mRNA Expression von TLR2 und TLR4	43
4.3.2. Regulation von TLR2 /4 mRNA durch Tumornekrosefaktor (TNF) α	43
4.4. Nachweis von TLR2 und TLR4 mittels spezifischer Agonisten.....	44
4.4.1. Zunahme der Interleukin (IL)6 mRNA- und Proteinexpression durch TLR Agonisten.....	44
4.4.2. Zunahme der Pentraxin 3 (PTX3) Proteinexpression durch Agonisten.....	46
4.4.3. Zunahme weiterer proinflammatorischer Faktoren auf mRNA- (MCP1 und ICAM1) und Proteinebene (IL8, IL12, MCP1) durch TLR Agonisten	47
5. DISKUSSION	49
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	54
7. WEITERE PROJEKTE WÄHREND DER DOKTORARBEIT	58
8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	59
9. DANKSAGUNG	65
10. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AP-1	Transkriptionsfaktor Activating protein-1
AR/ <i>AR</i>	Androgenrezeptor/ <i>Androgenrezeptor Gen</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Schwellenwert Zyklus (threshold cycle)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Δ	Differenz (Delta)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calve serum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
h	Stunde(n)
H1	Histamin Rezeptor-1
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	Heat shock protein
HTPCs	Humane Testikuläre Peritubuläre Zellen
ICAM1/ <i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1/ <i>Intercellular adhesion molecule 1 Gen</i>
IL6/ <i>IL6</i>	Interleukin 6/ <i>Interleukin 6 Gen</i>
IL8/ <i>IL8</i>	Interleukin 8/ <i>Interleukin 8 Gen</i>
IL12/ <i>IL12</i>	Interleukin 12/ <i>Interleukin 12 Gen</i>
IRAK	Interleukin-1-receptor-associated Kinase
kDa	Kilodalton
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated-protein Kinasen
MCP1/ <i>MCP1</i>	Monocyte chemoattractant protein 1/ <i>Monocyte chemoattractant protein 1 Gen</i>
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myleoid differentiation primary response gene 88
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
N	Normal
NF- κB	Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor kappa-B
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄ .3HCl
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAR2	Protease-activated receptor 2
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PRR	Pattern recognition receptors
PTX3	Pentraxin 3
qPCR	quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<i>RPL19</i>	<i>60S ribosomales Protein L19 Gen</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Fehler des Mittelwerts (standard error of means)
SMA	Smooth muscle actin
T	Testosteron
TAK1	Transforming growth factor b-aktiviert kinase
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)

IX

TLRs	Toll-like Rezeptor(en)
TLR2/ <i>TLR2</i>	Toll-like Rezeptor 2/ <i>Toll-like Rezeptor 2 Gen</i>
TLR4/ <i>TLR4</i>	Toll-like Rezeptor 4/ <i>Toll-like Rezeptor 4 Gen</i>
TNFR1/2	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1/2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
V	Volt
x g	x-fache Erdbeschleunigung (gravitation)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung (Abb) 1: Schematische Darstellung der testikulären Kompartimente	2
Abb 2: Schema des vereinfachten Androgenrezeptor Signalwegs	7
Abb 3: TLR4 Signaltransduktionsweg durch Aktivierung von NF- κ B und AP-1	10
Abb 4: AR mRNA Expression von HTPCs.....	34
Abb 5: AR Western Blot kultivierter HTPCs	35
Abb 6: AR Immunhistochemie einer Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese	35
Abb 7: AR Immunhistochemie aus Hodenproben verschiedener Spezies	36
Abb 8: Calponin Immunhistochemie aus Hodenproben verschiedener Spezies	37
Abb 9: Calponin Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot	38
Abb 10: SMA Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot.....	39
Abb 11: AR Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot.....	40
Abb 12: Western Blot zur Hemmung des DHT induzierten AR Proteinanstiegs in HTPCs.....	41
Abb 13: Effekte von DHT auf Zellzahl und Zellgröße der HTPCs	42
Abb 14: mRNA Expression von <i>TLR2</i> und <i>TLR4</i> in HTPCs	43
Abb 15: mRNA Expression von <i>TLR2</i> und <i>TLR4</i> nach Behandlung mit TNF α	43
Abb 16: <i>IL6</i> mRNA Expression nach PAM und LPS Stimulation in HTPCs	44
Abb 17: IL6 Proteinsekretion in das Zellkulturmedium nach PAM und LPS Stimulation	45
Abb 18: Western Blot zur PTX3 Protein Expression nach PAM und LPS Stimulation	46
Abb 19: MCP1 mRNA Expression nach Stimulation mit PAM und LPS	47
Abb 20: <i>ICAM1</i> mRNA Expression nach Stimulation mit PAM und LPS.....	47
Abb 21: IL8, IL12, MCP1 Proteinsekretion ins Zellmedium nach PAM und LPS Stimulation	48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....	12
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits	14
Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien	14
Tabelle 5: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen	16
Tabelle 6: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien	18
Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer.....	19
Tabelle 8: Liste der eingesetzten Primäantikörper	20
Tabelle 9: Liste der verwendeten Sekundäantikörper	20
Tabelle 10: 1 x Reaktionsansatz einer PCR	25
Tabelle 11: Standardprofil einer PCR.....	26
Tabelle 12: 1 x qPCR- Reaktionsansatz	27
Tabelle 13: Standardprofil einer qPCR.....	27
Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	30

1. EINLEITUNG

1.1. Morphologie des Hodens

1.1.1. Aufbau und Funktion des Hodens

Im Laufe der Evolution wurden bei allen Säugetierspezies die Spermatogenese, also die Produktion von Samenzellen, und die Synthese sowie Sekretion von männlichen Geschlechtshormonen (Androgene) im Organ Hoden vereint. Diese beiden Hauptaufgaben laufen jedoch in zwei lokal getrennten Bereichen ab, die funktionell über Signalwege miteinander verknüpft sind (Schlatt et al., 1997; de Kretser & Phillips, 1998).

Die Spermatogenese findet in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) statt, während die Testosteronbiosynthese im interstitiellen Kompartiment (Interstitium), dem Raum zwischen den Tubuli seminiferi, abläuft. Hier befinden sich die Androgenproduzierenden Leydig-Zellen in tierartsspezifischer Anzahl. Ein hoher Gehalt an glattem endoplasmatischem Retikulum (ER), zahlreiche tubuläre Mitochondrien sowie Lipidtröpfchen im Zytoplasma weisen bereits auf die steroidogene Aktivität der Leydig-Zellen hin. In den Mitochondrien wird Cholesterin zu Pregnenolon umgewandelt und schließlich im ER über Androstendion durch das Enzym 17 β Hydroxysteroiddehydrogenase in Testosteron umgewandelt. Leydig-Zellen befinden sich oft in unmittelbarer Nachbarschaft zu Blutgefäßen und können somit ihr Sekretionsprodukt endokrin sezernieren. Es findet auch eine parakrine Sekretion in das anliegende Hodengewebe statt. Daneben sind im Interstitium auch Bindegewebszellen, Gefäße, Nerven, vereinzelt Mastzellen und Makrophagen zu finden.

Die Wand der Samenkanälchen wird von konzentrisch geschichteten peritubulären Zellen, Proteinen der extrazellulären Matrix und einer Basalmembran gebildet. Im Samenkanälchen befindet sich das Keimepithel, bestehend aus den Keimzellen, welche sich in verschiedenen Stadien der Spermatogenese befinden, und den Sertolizellen (Abbildung 1).

Der Prozess der Spermatogenese beginnt mit der Teilung von den basal liegenden Stammzellen und kumuliert in der Bildung von Spermien. Es können mehrere Phasen der Keimzellreifung unterschieden werden. Am Anfang durchläuft die diploide Keimzelle (Spermatogonie) eine mitotische Teilung zum Spermatozyt. Es folgen meiotische Teilung zu haploiden Spermatisden und die als Spermio-genese bezeichnete Transformation zu Spermatisden. Schließlich können die Spermien aus dem Keimepithel in das tubuläre Lumen freigesetzt werden (Nieschlag et al., 2009).

Die verschiedenen Keimzellstadien sind in ein Netzwerk von Sertolizellen eingebettet, welche den Keimzellen als Nähr-, Ammen- und Stützzellen dienen. Letztere Funktion beinhaltet den lumenwärts gerichteten Transport der Keimzellen während der Spermatogenese. Somit sind die Sertolizellen an der Regulation der insgesamt Spermienausbeute beteiligt. Darüber hinaus sind sie zur Phagozytose z.B. von fehlentwickelten Spermien befähigt. Auf der Basallamina anheftend reichen die Sertolizellen mit ihrem hochprismatischen Zelleib bis ins Tubuluslumen und sind basal über tight-junctions mit den benachbarten Sertolizellen verbunden. Diese Verbindungen bilden die Blut-Hoden-Schranke aus, welche lumenwärts die Spermiden vor immunologischen Schäden schützt (Jiang et al., 2014).

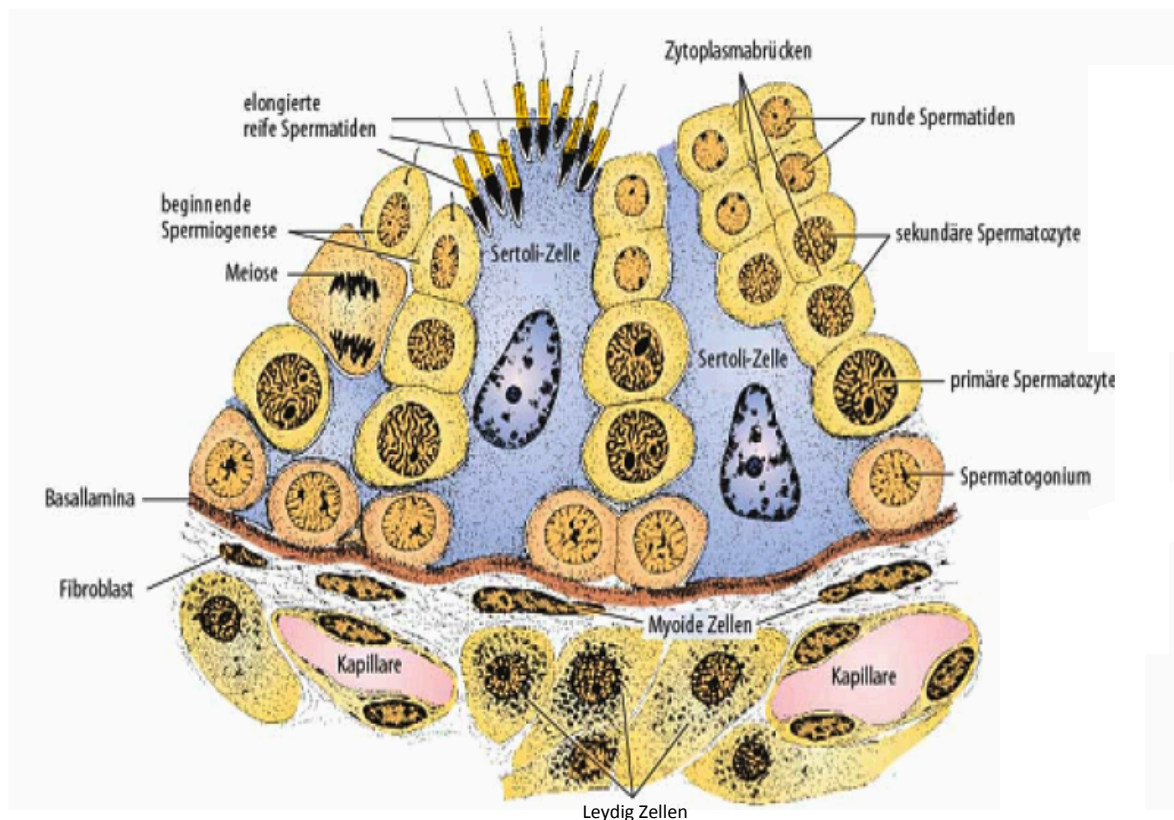


Abbildung (Abb) 1: Schematische Darstellung der testikulären Kompartimente

Dargestellt ist das Keimepithel bestehend aus Sertolizellen und heranreifenden Keimzellen, die peritubuläre Region mit Myoiden Zellen, als einschichtige Zellschicht wie man sie beim Nager findet, und das Interstitium mit Leydigzellen und Kapillaren (modifiziert nach Junqueira et al., 2004).

1.1.2. Peritubuläres Kompartiment des Hodens

Die Wand der Hodenkanälchen ist ein kleiner anatomischer Teil des Hodens, der bis heute am wenigsten erforscht wurde (Maekawa et al., 1996). Diese Wand wird beim Menschen aus mehreren Lagen (5 - 7) langgestreckter, sehr dünner, spindelförmiger, peritubulärer Zellen und extrazellulären Matrixproteinen gebildet (Davidoff et al., 1990). Im Gegensatz dazu besitzen Labornagetiere eine einschichtige peritubuläre Zelllage und eine beinahe vernachlässigbare extrazelluläre Matrixschicht.

Aufgrund ihres glattmuskelähnlichen Charakters wurden diese peritubulären Zellen auch als myoide Zellen bezeichnet. Mit der Etablierung des zellulären Modells von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs) erweiterte sich erstmals die Möglichkeit, das peritubuläre Kompartiment näher zu untersuchen (Albrecht et al., 2006). HTPCs exprimieren im Erwachsenenalter Glattmuskelmarker wie z.B. Smooth Muscle Actin (SMA; Albrecht et al., 2006). Ab der Pubertät scheint dieser Marker beim Primaten möglicherweise durch Androgenwirkung induziert zu werden. Die Expression von SMA bleibt auch nach Hormonentzug bestehen (Schlatt 1993).

Der Nachweis weiterer Glattmuskelmarker wie Desmin (Davidoff et al., 1990), Myosin Heavy Chain 11 und Calponin (Schell et al., 2010; Volkmann et al., 2011) bestätigte die Erkenntnis, dass die peritubuläre Region zu großen Teilen aus glatten Muskelzellen besteht, den Myofibroblasten. Die Expression von Calponin ist auf die Zellen des Glattmuskeltyps beschränkt und gilt daher als spezifischer Marker. Dieser Glattmuskelzell-Phänotyp befähigt die Zellen zu einem aktiven Transport der immobilen Spermien durch propulsive Wellen (Hargrove et al., 1977; Romano et al., 2005).

Die Synthese und Sekretion zahlreicher Produkte gehören zur weiteren Aufgabe der HTPCs. Die gebildeten Substanzen der HTPCs darunter Wachstumsfaktoren wie Nerve growth factor (NGF) und Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) sind dazu befähigt, die testikuläre Funktion zu modifizieren und in die Spermatogenese einzugreifen (Flenkenthaler et al., 2014; Spinnler et al., 2010). NGF und weitere Produkte der HTPCs, wie Interleukin (IL)6, Pentraxin 3 (PTX3), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) und intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), scheinen in unmittelbarer Beziehung zum Immunsystem zu stehen (Mayerhofer, 2013; Schell et al., 2008; Welter et al., 2014; Flenkenthaler et al., 2014).

Eine Schlüsselrolle für den Übergang vom angeborenem Immunsystem zum adaptierten Immunsystem nimmt das Zytokin IL6 ein (Jones, 2005). Eine *IL6* Expressionssteigerung in HTPCs zeigte sich sowohl durch Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α) als auch mit Angiotensin II, beides Mastzellenprodukte, welche vermehrt bei infertilen humanen Spendern gefunden werden (Schell et al., 2008; Welter et al., 2014).

PTX3 ist Teil des angeborenen Immunsystems und erkennt als löslicher Rezeptor bestimmte Strukturen und Muster von Antigenen, welche auch als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) bezeichnet werden. Deswegen wird PTX3 auch zu den Pattern-Recognition Rezeptoren gezählt. Der Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei Infektionen, Entzündungen und Autoimmunität (Baruah et al., 2006; Garlanda et al., 2002). Im männlichen Genitaltrakt konnte PTX3 bereits nachgewiesen werden (Doni et al., 2009) und kürzlich als Produkt der HTPCs identifiziert werden (Flenkenthaler et al., 2014).

MCP1 gehört zur Familie der chemotaktischen Zytokine, es wirkt also anlockend auf Immunzellen. MCP1 wird als Schlüsselzytokin bezeichnet, welches die Migration und die Infiltration von Monozyten und Makrophagen reguliert (Deshmane et al., 2009). Versuche an Ratten mit experimenteller Orchitis konnten einen erhöhten Gehalt an MCP1 in peritubulären Zellen zeigen (Guazzone et al., 2003; Iosub et al., 2006).

ICAM1 ist ein Mitglied der Immunoglobulin-Superagen-Familie, welcher in der Membran von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Eine Bindung von ICAM1 an Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), ein Rezeptor der auf Leukozyten gefunden wird, führt zur Aktivierung und zum Gewebeeintritt der Immunzellen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass HTPCs bereits unter basalen Bedingungen ICAM1 exprimieren (Magnanti et al., 2001). Die Präparation der Zellen wurde allerdings unter enzymatischen Bedingungen hergestellt. Andere Autoren konnten nur durch Stimulation mit $TNF\alpha$ eine massive Induktion von ICAM1 erreichen (Schell et al., 2008).

HTPCs zeigen außerdem eine vielfältige Rezeptorausstattung, welche vom Tumornekrosefaktor Rezeptor 1/2 (TNFR1/2), Histamin Rezeptor 1 (H1), Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ($PPAR\gamma$), Protease-activated receptor (PAR2) bis hin zum - in dieser Arbeit beleuchteten - Androgenrezeptor (AR) reicht (Mayerhofer, 2013; Schell et al., 2008).

1.1.3. Veränderungen der peritubulären Zellen

Mit Einsetzen der Pubertät kommt es zu gravierenden Umstellungen im Hormonhaushalt. Beim männlichen Individuum kommt es zur Testosteronsekretion. Dies induziert beim Rhesusaffen die Ausbildung des Glattmuskelmarkers SMA in den peritubulären Zellen (Schlatt et al., 1993) und die damit verbundene Fähigkeit zur Kontraktion, welche essentiell für eine nun beginnende Fertilität ist.

Gegenteilig verhält sich die Situation bei beginnender idiopathischer Infertilität, Glattmuskelmarker verschwinden (Welter et al., 2013). Die bis heute nicht verstandenen Vorgänge wirken sich auch auf die peritubulären Zellen aus. Entzündliche Ereignisse sind nachweisbar durch eine vermehrte Anzahl von Makrophagen und Mastzellen im Hoden. Möglicherweise führen deren Produkte (v.a. ein Prostaglandinmetabolit) zu einem reversiblen Verlust von kontraktile Markern, wie Calponin und SMA (Schell et al., 2010; Welter et al., 2013).

Glattmuskelzellen sind für ihre plastischen Fähigkeiten bekannt („Phänotypwechsel“). Sie können ihre Glattmuskelmarker verlieren und dann vorwiegend sekretorisch aktiv sein. Da Glattmuskelzellen und testikuläre peritubuläre Zellen miteinander verwandt sind, ist zu vermuten, dass es einen vergleichbaren Phänotypwechsel geben könnte.

1.2. Androgenrezeptor (AR) und Androgene

Die Ausbildung des männlichen Phänotyps beruht auf der Wirkung von Androgenen über den AR. Von den vielfältigen Wirkungen von Androgenen seien hier nur die funktionelle Bedeutung für die Spermatogenese, Entwicklung und Funktionserhaltung der Samenwege, der Akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale (Kicman, 2008) genannt.

Der AR wird im humanen Hoden in Sertolizellen (Chang et al., 2004; De Gendt et al., 2004), peritubulären Zellen (Welsh et al., 2009) und Leydigzellen (Namiki et al., 1991) gefunden. Keimzellen besitzen keinen AR (Johnston et al., 2001), folglich geht man davon aus, dass die Regulation der Spermatogenese über die Sertolizellen, peritubulären Zellen und die Leydigzellen selber erfolgt.

Defekte des AR führen zu einer Feminisierung des männlichen Organismus beim Menschen (Quigley et al., 1995) und anderen Spezies wie Maus, Ratte, Hund und Katze (Bardin et al., 1970; Lyon & Hawkes, 1970; Meyers-Wallen et al., 1989; Schultz, 1962). Der Androgenrezeptor gehört zu der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren. Das AR-kodierende Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und besteht aus 8 Exonen, die ein Protein aus 919 Aminosäuren kodieren. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wandert dieser in den Zellkern und interagiert mit den Zielgenen (Abb 2). Der Androgenrezeptor liegt normalerweise frei im Cytoplasma vor, wo er an Chaperone, z.B. das Heat shock protein (HSP), gebunden ist. Durch die Ligandenbindung kommt es zur Dissoziation vom Chaperon, welches den Rezeptor im Zytosol hält. So kann der Rezeptor-Ligand-Komplex in den Zellkern wandern und mit den Zielgenen interagieren. Außerdem bewirkt die HSP Dissoziation am AR eine Konformitätsänderung und es erfolgt eine Dimerisierung mit einem zweiten AR. Die AR Dimerbildung ist für die spätere DNA Bindung nötig (Tindall & Lonergan, 2011). Deshalb wird der AR auch als Liganden aktivierender Transkriptionsfaktor bezeichnet.

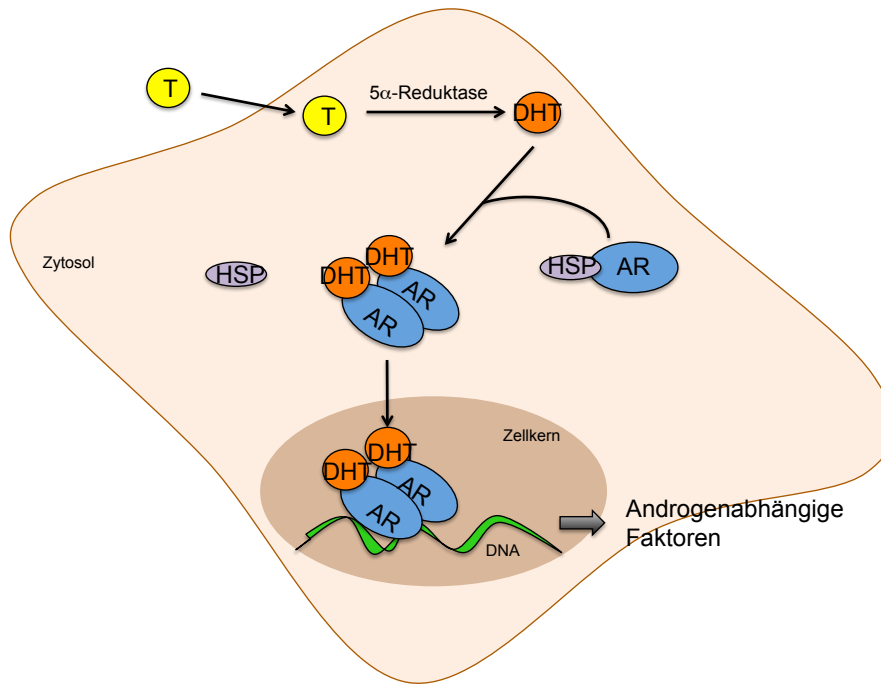


Abb 2: Schema des vereinfachten Androgenrezeptor Signalwegs

Testosteron (T) wird in die Zelle aufgenommen und vom Enzym 5α -Reduktase in DHT umgewandelt. Nach der Bindung von DHT an den AR kommt es zur Abspaltung von HSP und zur AR Dimerisierung und zur Translokation in den Zellkern, um die Zielgene zu binden und deren Expression zu regulieren (Abgeändert und vereinfacht nach Tindall & Lonergan, 2011).

Die Liganden des Androgenrezeptors sind vor allem Androgene. Testosteron (T) als Hauptvertreter, wird primär von Leydigzellen in den Hoden, aber auch in kleineren Mengen von den Nebennieren produziert (Wang et al., 2009). T kann entweder direkt auf die Zielzellen wirken oder durch das Enzym 5α -Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT), welches stärker als T wirkt, umgewandelt werden. Einige Zielgewebe sprechen stärker auf den Testosteronmetaboliten DHT an (Wright et al., 1996). T kann jedoch auch durch das Enzym Aromatase zu Estradiol katalysiert werden (Mason et al., 2004).

1.3. Toll-like Rezeptor (TLR)2 und TLR4

Das Erkennen von pathogenen Strukturen durch Zellen basiert auf besonderen Rezeptoren. Diese erkennen pathogenassoziierte Immunstimulantien (Pathogen associated microbial patterns, PAMP) bestehend aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinsäuren.

Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind eine Gruppe dieser Rezeptoren, die hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems aber auch auf einer Reihe anderer Zellen vorkommen. Sie zählen zu den Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) und erkennen verschiedenste Pathogene wie Teile von Bakterien, Pilzen, Parasiten, Viren, aber auch Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA). Zusätzlich können auch körpereigene Moleküle, die durch Zelltod, Verletzung oder Tumorzellen entstehen, von TLRs gebunden werden und diese aktivieren. Die Bindung ihrer Liganden führt zu einer Aktivierung der Immunzelle, einer gesteigerten Phagozytose und Zytokinproduktion (z.B. Interleukine, $TNF\alpha$, Interferone).

Die TLRs bestehen aus einem N-terminalen extrazellulären Anteil und einem C-terminalen zytoplasmatischen Anteil, welche durch einen kurzen transmembranären Anteil verbunden sind. Der extrazelluläre Anteil der TLRs enthält Rezeptor-abhängig unterschiedlich lange, leucinreiche Abschnitte. Bei einigen TLRs (TLR3, -7, -8 und -9) ist bekannt, dass sie sich hauptsächlich intrazellulär auf Endosomen befinden, während TLR1, -2, -4, -5 und -6 auf der Zelloberfläche gebunden sind.

Der Mensch besitzt mindestens 10 TLRs. Bei Mäusen konnten bis jetzt 13 TLRs identifiziert werden (Kawai & Akira, 2006). Evolutionär findet man bei allen Vertebraten verschiedene TLRs. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich um ein phylogenetisch konserviertes und bewährtes System handelt.

Für die Entdeckung des TLR4 war ein Stamm aus einer Mauszelllinie verantwortlich. Man fand heraus, dass dieser Stamm gegen die tödliche Wirkung des Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Anteil aus der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, resistent war. Die restlichen Stämme der Mauszelllinie zeigten Symptome eines Endotoxinschocks bei entsprechender LPS-Konzentration. Dies ließ vermuten, dass es sich um eine Punktmutation im Gen des früher noch so bezeichneten "LPS-Rezeptors" handele. Nach Sequenzierung des vermuteten Chromosoms 4, konnte eine einzelne Basenpaarveränderung im TLR4 Gen aufgezeigt werden, das für die Wirkung verantwortlich war (Poltorak et al., 1998). Somit wurde der "LPS-Rezeptor" als TLR4 identifiziert.

TLR2 ist ein plasmamembranständiger Rezeptor, welcher Peptidoglykane, Lipopeptide und Zymosan aus grampositiven und gramnegativen Bakterien, Hefen,

Pilzen, Parasiten und Viren erkennt. Der TLR2 kann mit anderen TLRs einen Komplex bilden, z.B. TLR1/ TLR2, und somit unterschiedliche Pathogene erkennen. Ein spezifischer Agonist für den Komplex TLR1/ TLR2 ist das synthetische Lipopeptid Pam₃ Cys-Ser-(Lys)₄.3HCl (PAM). Das bakterielle LPS ist ein spezifischer Agonist des TLR4.

Die Bindung von Pathogenen an die TLRs führt zu einer gesteigerten Transkription bestimmter Gene. Das Ausmaß der Transkription ist abhängig von den beteiligten TLRs und auch von der Zellart. Der Unterschied zwischen den von den TLRs aktivierten Signalkaskaden, im Folgenden nur vereinfacht und beispielhaft beschrieben, kann teilweise durch die verschiedenen beteiligten Adaptermoleküle erklärt werden.

Hat ein TLR (hier TLR4) ein bestimmtes PAMP (hier LPS) erkannt, bindet das Adapterprotein Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) an den TLR. Darauf wird die Interleukin-1-receptor-associated Kinase (IRAK) mit dem Rezeptorkomplex verbunden, autophosphoriliert und ein weiteres Adaptermolekül Tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) gebunden. Transforming growth factor β -aktiviert Kinase (TAK1) führt über Phosphorylierung zu einer zur Aktivierung von Mitogen-aktiviert-protein Kinasen (MAPK) und darüber schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Activating protein-1 (AP-1). TAK1 kann aber noch einen zweiten Signaltransduktionsweg einschlagen, nämlich über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklear Faktor kappa-B (NF- κ B). Beide, also AP-1 und NF- κ B, translozieren in den Zellkern, und regulieren dort die Expression von Zielgenen, wie die der Zytokine (Abb 3).

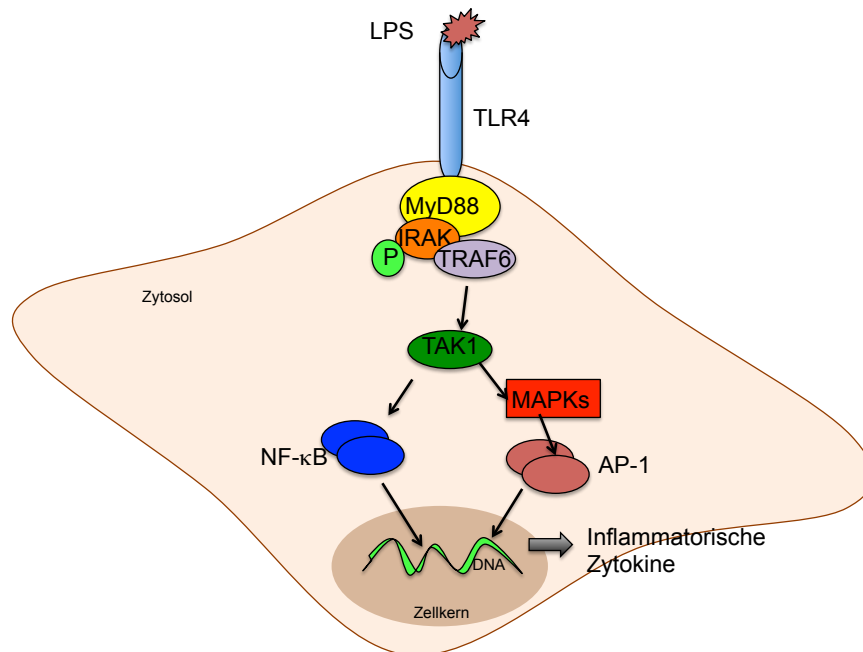


Abb 3: TLR4 Signaltransduktionsweg durch Aktivierung von NF-κB und AP-1

Die LPS-Bindung an TLR4 führt über mehrere Adaptermoleküle und verschiedenen Kinasen einerseits zur Aktivierung von NF-κB und andererseits zur Bildung von AP-1. Diese bewirken im Zellkern eine verstärkte Expression verschiedener Gene von inflammatorischen Zytokinen. (Abgeändert und vereinfacht nach Kawai & Akira, 2006).

Ein Zusammenspiel aus aktivierenden und inaktivierenden Mechanismen ist nötig, um eine adäquate Immunreaktion zu zeigen, diese wieder zu begrenzen und schließlich nach erfolgreicher Abwehr ganz zu beenden.

Im Hoden finden sich TLRs nicht nur auf Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, sondern auch in somatischen Zellen. Sertolizellen von Ratten (Winnall et al., 2011), Mäusen (Winnall et al., 2011; Wu et al., 2008) und des Huhns (Michailidis et al., 2014) exprimieren TLRs. Auch Leydig-Zellen von Mäusen (Shang et al., 2011) und spermatogoniale Stammzellen von Ratten (Bhushan et al., 2009; Chen et al., 2014) besitzen TLRs. Bhushan et al. (2008) konnte TLRs auch bei peritubulären Zellen der Ratte nachweisen. Nach bisherigem Kenntnisstand gibt es keine Studie zur Expression von TLRs in somatischen Hodenzellen des Menschen, bis auf eine mRNA Studie, die allerdings auf gepooltes Gesamthodengewebe zurückgreift (Nishimura & Naito, 2005).

1.4. Ziele der Arbeit

Während Sertolizellen, Keimzellen und Leydigzellen in ihrer Funktion gut untersucht sind, sind glattmuskelzell-ähnliche peritubuläre Zellen im Hoden bei Mensch und Tier funktionell weitgehend unbekannt. Bekannt ist aber, dass sie kontraktile sind, eine Vielzahl von Faktoren sezernieren, den Rezeptor für Androgene (AR) besitzen und dass sie sich während der Entwicklung phänotypisch verändern können. Vor diesem Hintergrund stellen sich Fragen zur Regulation der peritubulären Zellen, insbesondere ob kontraktile Proteine der HTPCs durch Androgene beeinflusst werden?

Bei männlicher Infertilität reagieren peritubuläre Zellen ebenfalls mit Phänotypveränderungen. Fibrose in der Wand der Samenkanälchen, ebenso wie das vermehrte Auftreten von Immunzellen (Mastzellen, Makrophagen) sind Hinweise auf einen entzündlichen Prozess, der vermutlich eng mit der verminderten Spermatogenese verbunden ist und der letztendlich zur Unfruchtbarkeit führt. Sezernierte Faktoren tragen vermutlich dazu bei. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Frage untersucht, ob peritubuläre Zellen funktionelle Toll-like Rezeptoren (TLRs) besitzen und über TLR-Aktivierung Infertilitäts-assoziierte Entzündungsreaktionen beeinflusst werden können.

Mit der Etablierung des zellulären Modells von humanen testikulären peritubulären Zellen erweiterte sich erstmals die Möglichkeit, die Wirkung von Androgenen, hier DHT, *in vitro*, an kultivierten Zellen zu untersuchen. Durch Einbeziehung von Untersuchungen an Katze, Hund, Rind und Pferd sollte schließlich die speziesübergreifende Relevanz dieser Ergebnisse betrachtet werden.

2. MATERIAL

2.1. Material

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe	Chromaphor	Duisburg, Deutschland
Anwaage XS 205	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke BBD 6220	Heraeus	Osterode, Deutschland
CASY Cell counter	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
Chemi Smart 5000	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Count-Down Timer	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Duomax Schüttler 1030	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Einkanalpipetten	Gilson	Middleton, WI, USA
ELISA-Reader	Dynex Technologies	Guernsey, GB
Feinwaage	Satorius	Göttingen, Deutschland
Fluostar Optima	BGM Labtech	Offenburg, Deutschland
Gefriertruhe -80 °C	Sanyo	Bad Nenndorf, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Biorad	München, Deutschland
Handystep	Brand	Wertheim, Deutschland
IKA-Magnetrührer RCT	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS4	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
Aufsatzkamera vom Mikroskop	Visitron Systems	Puchheim, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr	Kirchdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus	Osterode, Deutschland
LightCycler® 96	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Mehrkanalpipette	Rainin	Giessen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss	München, Deutschland
Mikrotom Leica SM2000R	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle M690	Miele	Gütersloh, Deutschland
Mikrowellentopf	Nordic Ware	Mineapolis, USA
pH Meter 320	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
Power Pac 300	Biorad	München, Deutschland
SDS-PAGE Protean3	Biorad	München, Deutschland
Sterilbank	Holten LaminAir	Allerød, Dänemark
Stripettor	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Thermocycler PTC 200	Biorad	München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus	Osterode, Deutschland
Ultraschallprozessor 50H	Dr. Hielscher GmbH	Teltow, Deutschland
Vortex-Genie 2	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus	Osterode, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
96er- Well Multischalen	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Auslaufpipetten	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
CryoPure Gefäß	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
DEPC Water	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
EppendorfgeläÙe	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kulturschalen 60mm	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kulturflaschen	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Latexhandschuhe	Kimberly-Clark	Dallas, TX, USA
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
PAP-Pen	Kisker	Steinfurt, Deutschland
Parafilm	American National Can	Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten	NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH	Hess. Oldendorf, Deutschland
Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Urinbecher	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller	Ort
DAB Tablet Set	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
DC™ Protein Assay	Biorad	München, Deutschland
Human IL6 Platinum ELISA	eBioscience	Wien, Österreich
MULTI-Analyte ELISArray	Qiagen	Hilden, Deutschland
Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Quantifast SYBR Green PCR-Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Ort
β-Mercaptoethanol	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
5 x Green GoTaq-Reaction-Buffer	Promega	Mannheim, Deutschland
5 x First Strand Buffer	Promega	Mannheim, Deutschland
Acrylamid 2K – Lösung (30%)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Agarose Metaphor	Biozym	Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	München, Deutschland
Borsäure	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Serva	Heidelberg, Deutschland
BSA	PAA	Cölbe, Deutschland
CasyClean	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
CasyTon	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
DAB Tablet Set	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Dimethyl Sulphoxid	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
DMEM high Glucose	PAA	Cölbe, Deutschland
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Peqlab	Erlangen, Deutschland
DTT 0,1 M	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
EDTA x 2 H ₂ O	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Entellan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% p.a.	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Flutamide	Tocris bioscience	Bristol, UK
Fötales Kälber Serum (FCS)	PAA	Cölbe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem	Darmstadt, Deutschland
GoTaq DNA-Polymerase	Promega	Mannheim, Deutschland
H ₂ O ₂ , 30%	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Isopropanol	Klinikum Rechts der Isar	München, Deutschland

K ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS)	AdipoGen AG	Liesal, Schweiz
MassRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	Waltham; MA, USA
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Temed 100%)	Biorad	München, Deutschland
Na-III-citrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Merck	Darmstadt, Deutschland
Normalserum goat	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Pam3Cys-Ser-(Lys)4.3HCl (PAM)	AdipoGen AG	Liesal, Schweiz
Paraformaldehyd (Formalin)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Pipes	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Quanti-Fast-Mix (2 x)	Quiagen	Hilden, Deutschland
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega	Mannheim, Deutschland
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Super Script II	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Triton X-100	Biorad	München, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA	Cölbe, Deutschland
TNF α	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Tween 20	Sigma	Deißenhofen, Deutschland
Xylol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer	Einzelkomponenten
Bouinsche Lösung	15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure 5 ml Formalinlösung (35%) 1 ml Eisessig (kurz vor Gebrauch zugeben)
NPE-Puffer für Proteinlysate	4,4 g NaCl (150 mM) 1,5 g Pipes (10 mM) 0,15 g EDTA (1 mM) Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O bidest, pH 7,2
PBS Puffer (10mM)	319,5 mg Na ₂ HPO ₄ (4,5 mM) 171,2 mg KH ₂ PO ₄ (1,5 mM) 93,3 mg KCl (2,5 mM) 4,4 g NaCl (150 mM) Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O bidest, pH 7,5
1 x Probenpuffer für Proteinlysate	1,89 g Tris (62,5 mM) 5 g SDS (2%) 25 g Saccharose (10%) Auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest, pH 6,8
APS für SDS-PAGE (10%)	1 g APS Lösen in 10 ml H ₂ O bidest
Laemmlipuffer (10 x) für SDS-PAGE	30,28 g Tris (250 mM) 144,12 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1 %) Auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O bidest
Bromphenolblau	0,75 g Tris (62,5 mM) 10 g SDS (2%) 10 g Saccharose (10%) Auffüllen auf 100 ml mit H ₂ O bidest, pH 6,8
Sammelgelpuffer (4 x) für SDS-PAGE	15,2 g Tris (0,5 M) 0,75 g EDTA Auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest, pH 6,8 1 g SDS (10%) zugeben
SDS für SDS-PAGE (10%)	1 g SDS Lösen in 10 ml H ₂ O bidest

Trenngelbuffer (4 x) für SDS-PAGE	45,4 g Tris (1,5 M) 0,75 g EDTA Auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest, pH 8,8 1 g SDS (10%) zugeben
10 x Transferpuffer für Western Blot	144,1 g Glycin (1,92 M) 121,1 g Tris Base (250 mM) 100 ml Methanol (10%) 1 ml SDS (0,01%) Auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O bidest
20 x TBS-Tween	116,8 g NaCl (2 M) 12,1 g Tris Base 10 ml Tween 20 (1) Auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O bidest, pH 7,5
TBE-Puffer (5 x) für Agarose-Gelelektrophorese	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA (0,5 M) Auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O bidest, pH 8,0
Stammlösung A für Immunhistochemie (0,1 M)	21,01 g Zitronensäure in 1 l H ₂ O bidest lösen
Stammlösung B für Immunhistochemie (0,1 M)	29,41 g Na-III-citrat in 1 Liter H ₂ O bidest lösen

Tabelle 6: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien

Medium	Einzelkomponenten
Erstmedium zur Kultivierung von HTPCs	210 ml DMEM high Glucose 1,19 g HEPES (20 mM) 0,125 g NaHCO ₃ (0,5 g/l) 37,5 ml FCS (15%) 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin (1%)
DMEM high Glucose Kulturmedium für HTPCs	447,5 ml DMEM high Glucose 50 ml FCS (10%) 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin (1%)
Einfriermedium für HTPCs	DMEM high Glucose 10% DMSO

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer

Gen Sequenz-	Genbank-Nr. Sequenz (5' - 3')	Amplikongröße	Annealing- temperatur	identität
AR	NM_001011645	259 bp	56 °C	Verifiziert
forward reverse	CAT GCA CAA GTC CCG CAT G GGT GAG CTG GTA GAA GCG T			
ICAM1	NM_000201	190 bp	58 °C	Verifiziert
forward reverse	TTG AAC CCC ACA GTC ACC TAT CCT CTG GCT TCG TCA GAA TCA			
IL6	NM_000600	159 bp	62 °C	Verifiziert
forward reverse	AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG TCT GGC TTG TTC CTC ACT ACT			
MCP1	NM_002982	190 bp	54 °C	Verifiziert
forward reverse	CAG CCA GAT GCA ATC AAT GCC TGG AAT CCT GAA CCC ACT TCT			
RPL19	NM_000981	199 bp	59 °C	Verifiziert
forward reverse	AGG CAC ATG GGC ATA GGT AA CCA TGA GAA TCC GCT TGT TT			
TLR2	NM_003264.3	135 bp	62 °C	Verifiziert
forward reverse	CTG GAG CCC ATT GAG AAA AA CGC AGC TCT CAG ATT TAC CC			
TLR4	NM_138554.4	95 bp	60 °C	Verifiziert
forward reverse	AGT CCA TCG TTT GGT TCT GG CAA TGG TCA AAT TGC ACA GG			

Tabelle 8: Liste der eingesetzten Primärantikörper

Antikörper	Spezies/ Klonalität	Verdünnung	Hersteller/ Ort
Western Blot			
AR	Kaninchen/ monoklonal	1:2.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β-Aktin	Maus/ monoklonal	1:5.000	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Calponin	Kaninchen/ monoklonal	1:2.000	Epitomics, Burlingame, CA, USA
GAPDH	Maus/ monoklonal	1:1.000	Cell Biolabs, San Diego, USA
PTX3	Ratte/ monoklonal	1:200	Abcam, Cambridge, UK
SMA	Maus/ monoklonal	1:500	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Immunhistochemie			
AR	Kaninchen/ monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Calponin	Kaninchen/ monoklonal	1:250	Epitomics, Burlingame, CA, USA

Tabelle 9: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies/ Markierung	Verdünnung	Hersteller/ Ort
Western Blot			
anti-Kaninchen	Ziege/ Peroxidase	1:10.000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus	Ziege/ Peroxidase	1:10.000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Ratte	Ziege/ Peroxidase	1:10.000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Immunhistochemie			
anti-Kaninchen	Ziege/ biotinyliert	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus	Ziege/ biotinyliert	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.2. Humane Hodenbiopsien

Hodenbiopsien stammen von Patienten mit Fertilitätsstörungen oder von Patienten, die sich einer Religationsoperation des Samenleiters unterzogen haben. Um nach vorausgegangener Vasektomie des Samenleiters wieder eine vollständige Rekonstruktion und Funktion zu erhalten, erfolgte eine Religationsoperation der entsprechenden Anteile. Diese Hodenbiopsien wurden auf histomorphologische Veränderungen hin untersucht (Kooperation mit Prof. J.U. Schwarzer, München und Prof. F.M. Köhn, München). Die Ethikkommission der Technischen Universität München, sowie die teilnehmenden Spender gaben ihr Einverständnis zur Kultivierung der Hodenbiopsieanteile und zum weiteren experimentellen Arbeiten mit den humanen testikulären peritubulären Zellen.

2.3. Hodenproben anderer Spezies

Durch die Kooperation mit Frau Dr. Christiane Otzdorff (Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik; Klinik für Pferde, Innere Medizin und Reproduktion) konnten über das Reprozentrum München Hodenproben aus elektiven Kastrationen unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes gewonnen werden. Es wurden die Hodenproben von Katze, Hund, Rind und Pferd für diese Arbeit verwendet.

3. METHODEN

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Isolierung humaner testikulärer peritubulärer Zellen (HTPCs)

Die humanen testikulären peritubulären Zellen wurden nach dem Protokoll von Albrecht et al. (2006) isoliert. Direkt nach der Entnahme wurden die Anteile der Hodenbiopsien in Erstkulturmedium (Tabelle 6) überführt, unter sterilen Bedingungen mittels Pinzette in kleinere Explantate (1-2 mm³) zerkleinert und anschließend mit humanem Plasma, das mit Calciumchlorid versetzt wurde (1 mM), in einer 60 mm Zellkulturschale angeklebt. Damit ausreichend Luftfeuchtigkeit in der Kulturschale vorhanden war, wurden kleine Mediumtropfen zwischen den Hodenstückchen platziert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Somit konnte das Plasma vollständig gerinnen und dadurch hafteten die Explantate auf der Kulturschale fest. Nach circa 12 h wurden die Hodenstückchen mit Erstkulturmedium überschichtet und im Brutschrank weiter inkubiert.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 - 4 Tage. Nach circa einer Woche konnte ein Auswachsen der Zellen von den Explantaten im Lichtmikroskop beobachtet werden und nach ungefähr zwei Wochen wurden die Biopsiestückchen entfernt. Nun folgte eine Umstellung auf Kulturmedium (Tabelle 6).

3.1.2. Kultivierung und Kryokonservierung von HTPCs

Die Kultivierung aus Hodenbiopsien isolierter adhärenter Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden mit Kulturmedium (Tabelle 6) aus DMEM High Glucose mit L-Glutamin und zusätzlich 10% fetalem Kälberserum (FCS) überschichtet. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Ein Passagewechsel erfolgte spätestens bei vollständiger Konfluenz. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Kulturmedium ohne FCS zweimal gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mittels Überschichtung mit 1,5 ml Trypsin/ EDTA-Lösung für 4 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium (mit 10% FCS) gestoppt und die Zellsuspension bei 230 x g für 3 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in entsprechenden Kulturgefäßen weiterkultiviert.

Eine Langzeitlagerung der Zellen erfolgte durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (Tabelle 6) mittels Zellzählung in einer Endkonzentration von bis zu 2 x 10⁶ Zellen pro ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Einfrierröhrchen abgefüllt, im vorgekühlten Einfriercontainer über Nacht

bei - 80 °C eingefroren und dann zur Langzeitlagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei - 196 °C deponiert.

Zum Wiederauftauen der Zellen wurde das Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 230 x g für 3 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand des Einfriermediums wurde abgesaugt, das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät.

3.1.3. Stimulation von HTPCs

In einer 60 mm Kulturschale wurden 4×10^5 Zellen stimuliert.

Eine Vorinkubation mit einem Blocker oder eine Stimulation in serumfreiem Kulturmedium zur RNA-Gewinnung erfolgte je nach Anforderung. Die Zellzyklusarretierung erfolgte durch serumfreies Medium über Nacht. Am folgenden Morgen konnte mit der Stimulation in serumfreiem Medium begonnen werden. Überstieg die Stimulationsdauer 48 h, konnte das Optimum an Wachstumsbedingungen nicht mehr gewährleistet werden und somit wurde die Stimulation in serumhaltigem Kulturmedium durchgeführt.

Als Negativkontrolle erhielten unstimulierte Zellen das Lösungsmittel der jeweiligen Stimulationssubstanz in analoger Konzentration.

3.1.4. Automatisierte Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung

Mittels vollautomatischem Zellzählgerät Cell Counter + Analyzer (CASY, Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) wurde zusätzlich zur Zellzahl auch der Parameter Zellgröße bestimmt.

Die Messung erfolgt durch die elektrische Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messkapillare. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran zeigen einen größeren Widerstand als tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran, die nur mit ihrem Zellkernvolumen erfasst werden.

Im Gerät wurde ein Messprofil für HTPCs angelegt, in welchem geeignete Parametergrenzen für Zellgröße ($14,1 \mu\text{m} - 45,9 \mu\text{m}$), Zellkerngröße ($14,0 \mu\text{m} - 8,1 \mu\text{m}$) und Zelldebrisgröße ($< 8,1 \mu\text{m}$) festgelegt wurden.

Nach Stimulationsende wurden die Zellen trypsiniert, das Zellpellet in 1 ml DMEM resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:100 in der firmeneigenen Messlösung (CASYton) im Gerät gemessen.

Die erhaltenen Werte aus dem CASYsystems wurden mittels einer Software Graphpad Prism (Version 4.0a, La Jolla, CA, USA) mit der Kontrollgruppe verglichen, graphisch aufbereitet und auf statistische Signifikanz überprüft.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Messenger Ribonukleinsäure (mRNA)- Isolierung

Die Extraktion von mRNA aus den Zellen wurde mithilfe des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden in 600 μ l RLT-Puffer (+ 1% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließendem Vortexen für mindestens 30 Sekunden (s) konnte mit der Extraktion nach Angaben des Herstellers begonnen werden oder das Zelllysate bei - 80 °C zur späteren Bearbeitung weggefroren werden.

Die mRNA Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Durch den Quotienten aus der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) lässt sich eine Verunreinigung durch Proteine ermitteln. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,7 – 2,1 liegen, um die Reinheit der mRNA zu bestätigen. Eine OD_{260} von 1 entspricht einem Gehalt von 40 μ g/ml mRNA.

Durch die folgende Formel lässt sich die mRNA-Konzentration berechnen:

Konzentration (μ g/ml) = $OD_{260} \times 40 \mu$ g/ml \times Verdünnungsfaktor

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei - 80 °C gelagert.

3.2.2. Reverse Transkription (RT)

Die komplementäre DNA (cDNA)-Synthese wurde mittels RT durchgeführt. Hierzu wurden 200 ng mRNA mit 1,6 μ l Random 15-mer Primern versetzt und mit DEPC- H_2O auf ein Volumen von 11,5 μ l eingestellt. Zur Anlagerung der Primer an die mRNA wurde der Reaktionsansatz bei 70 °C für 10 min und bei 25 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde folgender Master Mix dazu pipettiert:

4 μ l 5 x first strand puffer

2 μ l 0,1 M DTT

1 μ l 10 mM dNTPs

0,5 μ l RNasin Plus RNase Inhibitor 40 units/ μ l

Gesamtvolumen = 19 μ l Reaktionsansatz

Eine weitere Inkubation erfolgte bei 25 °C für 10 min und anschließend bei 42 °C für 2 min. Danach wurde 1 μ l SuperScript II Reverse Transcriptase hinzugegeben und die RT bei 42 °C für 50 min durchgeführt. Zum Schluss wurde der RT Ansatz auf 70 °C für 15 min erhitzt und danach auf 4 °C für 10 min abgekühlt.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die gewonnene cDNA wurde durch genspezifische Primer in der PCR vervielfältigt. Mittels thermostabiler DNA-Polymerase Taq konnte durch zyklische Wiederholungen von Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Polymerisation eine selektive Amplifizierung des gewünschten doppelsträngigen DNA-Abschnitts erfolgen.

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Opensource Software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) erstellt. Dabei wurden die Primersequenzen möglichst intronspannend gewählt, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA detektieren zu können. Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer. Die Synthese der Primer erfolgte durch Metabion (Martinsried, Deutschland).

Die PCR wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) nach folgendem Ansatz (Tabelle 10) in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) mit dem in Tabelle 11 zusammengestellten Programm durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden den Ansätzen entweder DNase freies H₂O oder ein RNA-Pool von HTPCs anstelle von cDNA zugefügt.

Tabelle 10: 1 x Reaktionsansatz einer PCR

Reagenz	Volumen (μ l)
GoTaq-Puffer (5 x)	5,0
dNTPs (2 mM)	2,5
Primer forward (50 μ M)	0,5
Primer reverse (50 μ M)	0,5
DNase free H ₂ O	15,25
GoTaq-Polymerase	0,25
cDNA (10 ng)	1,0

Gesamtvolumen = 25 μ l Reaktionsansatz

Tabelle 11: Standardprofil einer PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	95 °C	2,5 min	1
2. Amplifikation: Denaturierung	95 °C	45 s	25 - 35
Annealing	siehe Primer Tabelle 7	45 s	
Extension	72 °C	45 s	
3. Finale Extension	72 °C	5 min	1

Die Proben wurden anschließend im PCR-Cycler auf 4 °C gekühlt und konnten dann direkt für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet werden oder aber bei - 20 °C zwischengelagert werden.

3.2.4. Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese können die PCR-Produkte durch ihre Größe verifiziert werden. Hierzu wurden Gele mit einer 2% Konzentration aus MetaPhor-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und 1 x TBE-Puffer (Tabelle 5) hergestellt und nach ausreichender Quellzeit (mindestens 15 min) bei 600 Watt in der Mikrowelle vollständig aufgeköcht. Das Gemisch wurde auf circa 60 °C abgekühlt, mit 0,01% Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt und zum Polymerisieren in vorbereitete Gelformen eingegossen. Anschließend wurden 10 µl PCR-Proben bzw.

6 µl Größenmarker F+ (Fermentas, Thermo scientific, Waltham, MA, USA) in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer (Tabelle 5) bei einer Spannung von 90 Volt (V) für die Dauer von 35 min. Durch anschließende Beleuchtung des Gels auf einem UV-Leuchttisch (Wellenlänge = 302 nm) fluoreszierten die mit Ethidiumbromid interkalierenden doppelsträngigen DNA-Banden und wurden in digitaler Form archiviert.

3.2.5. Sequenzierung

Die Identität eines PCR-Produkts konnte durch Sequenzierung bestätigt werden, indem das PCR-Reaktionsprodukt von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) aufgereinigt und mit Hilfe beider Primer sequenziert wurde.

Durch die Software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnten die Ergebnisse mit der gespeicherten originalen Sequenz verglichen und verifiziert werden.

3.2.6. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR mit zusätzlicher Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit.

Die Quantifizierung erfolgt über die Detektion des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR® Green, der dem PCR Ansatz zugegeben wird. SYBR® Green lagert sich wie Ethidiumbromid an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA an, erfährt dadurch eine Konformitätsänderung und zeigt damit eine vielfach gesteigerte Fluoreszenz. Die Zunahme der amplifizierten DNA entspricht so der Zunahme der Fluoreszenz.

Der qPCR-Verlauf wird wie bei der konventionellen PCR in drei Phasen aufgeteilt: in eine frühe Phase, in eine exponentielle Wachstumsphase und in eine Plateau-Phase. Lediglich in der exponentiellen Wachstumsphase, bei welcher optimale Bedingungen herrschen, kann eine korrekte Quantifizierung erfolgen. Nach einer bestimmten Zyklenzahl übersteigt hier die Fluoreszenz der gebildeten DNA die Hintergrundfluoreszenz. Die Zyklenzahl wird automatisch vom qPCR-Cycler als Ct-Wert (engl. „threshold cycle“: Schwellenwert Zyklus) angegeben. Über diesen Ct-Wert erfolgt die statistische Auswertung mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001).

Die qPCR wurde mit Hilfe eines Kits Quantifast SYBR Green PCR-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach folgendem Ansatz (Tabelle 12) in einem LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit dem in Tabelle 13 zusammengestellten Programm durchgeführt. Die Negativkontrolle besteht aus den für den Ansatz benötigten Reagenzien, wobei RNase free H₂O bzw ein RNA-Pool von HTPCs anstelle von cDNA hinzugefügt wurde.

Tabelle 12: 1 x qPCR- Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen (μl)
Quanti-Fast-Mix (2 x)	6,25
H ₂ O RNase-free	1,25
Primer forward (25 μM)	0,5
Primer reverse (25 μM)	0,5
cDNA (2 ng/Reaktion)	4,0
Gesamtvolumen = 12,5 μl	

Tabelle 13: Standardprofil einer qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
2. Amplifikation: Denaturierung Annealing+ Extension	95 °C siehe Primer Tabelle 7	10 s 30 s	35-40
3. Schmelzkurvengenerierung	60 – 95 °C	0,5 °C/s	1
4. Kühlen	20 °C	120 s	1

Zur Normalisierung der quantitativen Genexpressionsanalyse wurde das *humane 60S ribosomale Protein L19 (RPL19)* verwendet, um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen. *RPL19* ist als Referenzgen bekannt und soll daher unbeeinflusst von äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden. Die Bestimmung der Proben erfolgte in Triplikaten, der Mittelwert der Ct-Werte wurde ermittelt und es erfolgte eine Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, welche die Unterschiede der Proben als n-fache Expression zur Kontrolle angibt.

Hierzu wurde der Ct-Wert des Zielgens vom Ct-Wert des Referenzgens abgezogen (ΔCt). Danach wurde die Differenz aus den ΔCt -Werten der einzelnen Gruppen gebildet, also ΔCt -Wert der Kontrolle und ΔCt -Wert der Stimulation. Die erhaltene Differenz wurde in die Gleichung $n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Diese $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden mittels der Software Graphpad Prism (Version 4.0a, La Jolla, CA, USA) graphisch aufbereitet und auf statistische Signifikanz überprüft.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Proteinisolierung

Die Proteinisolierung erfolgte aus Zellen, die in 60 mm Kulturschalen gewachsen sind und mit einer anfänglichen Zellzahl von 4×10^5 Zellen/Schale ausgesät wurden. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS (Tabelle 5) gespült und bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Die folgenden Schritte wurden stets auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden 1,5 ml NPE Puffer (Tabelle 5) pro Kulturschale hinzugefügt, die Zellen mit einem Schaber abgekratzt und in ein 2 ml Gefäß überführt. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C mit $10.000 \times g$ für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml PBS resuspendiert und nochmal zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in $50 - 100\ \mu\text{l}$ 1 x Probenpuffer (Tabelle 5) inklusive Protease und Phosphatase Inhibitor (Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) entsprechend der Größe des Pellets aufgenommen und für circa 10 s mit Ultraschall aufgeschlossen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels *DC™* (detergent compatible) Protein Assay (Biorad, München, Deutschland) nach dem Prinzip von Lowry (Lowry et al., 1951).

Dazu wurde eine Arbeitslösung aus $20\ \mu\text{l}$ Reagenz S und 1 ml Reagenz A hergestellt. In eine durchsichtige 96-well Mikrotiterplatte wurden jeweils $5\ \mu\text{l}$ Standardlösung von einer definierten Proteinstandardeihe (0 bis $2,0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Proben in Duplikaten pipettiert. Hinzu wurden $25\ \mu\text{l}$ Arbeitslösung und $200\ \mu\text{l}$ Reagenz B in die Platte pipettiert und diese bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Absorption des Standards und der Proben wurden bei 750 nm in einem ELISA-Reader (Dynex Technologies, Guernsey, GB) gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde aus den Werten der Standardwerte berechnet. Am Schluss wurden die Proben mit 10% β -Mercaptoethanol versetzt, um die Disulfidbrücken aufzubrechen, und 10% Bromphenolblau als Ladehilfe hinzugefügt. Zur Langzeitlagerung wurden sie bei -20 °C weggefroren.

3.3.2. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Es wurde zuerst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nachdem dieses auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel darüber geschichtet. Die genaue Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Acrylamidgehalt	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
Acrylamid 30%	5,2 ml	0,9 ml
Trenngelpuffer pH 8,8 (Tabelle 5)	3,25 ml	---
Sammelgelpuffer pH 6,8 (Tabelle 5)	---	1,5 ml
H ₂ O bidest.	4,55 ml	3,55 ml
TEMED	26 µl	15 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	52 µl	25 µl

Die Erhitzung der Proteinproben auf 95 °C für 5 min führt zum Verlust der Tertiärstruktur. Dadurch werden antigene Strukturen für Antikörper optimal zugänglich. Pro Tasche wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Ein Molekulargewichtsmarker diente dem Größenabgleich. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer (Tabelle 5) nach Laemmli (Laemmli, 1970) bei 190 V für 90 min.

Nach Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden diese durch Transferblotting auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Unter Verwendung eines Wet-Blot-Systems in einer Mini Trans-Blot® Kammer (Biorad, München, Deutschland) verlief der Transfer bei 100 V 75 min im Transferpuffer (Tabelle 5).

Anschließend wurde die Membran für etwa 30 min in 5% Milchpulver in Tris gepufferter Salzlösung (TBS)-Tween (Tabelle 5) oder 5% Bovines Serum Albumin (BSA) in TBS-Tween bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper (Tabelle 8) in 0,5% Milchpulver mit Ausnahme von AR-Antikörper in 5% Milchpulver in TBS-Tween bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der Blot auf dem Schüttler 3 x für je 5 min in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 9) in 0,5% Milchpulver in TBS-Tween unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde erneut 3 x 5 min in TBS-Tween gewaschen.

Der Blot wurde mit dem Chemilumineszenz Substrat SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers versetzt und mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems Chemi-Smart 5000 und dem Programm ChemiCapt (PepLab, Erlangen, Deutschland) belichtet und digital dokumentiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte über das Programm ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Die Intensität der Banden wurde mit dem jeweiligen Referenzprotein der gleichen Probe abgeglichen. Hierfür wurde der Blot noch einmal mit einem Erstantikörper gegen die ausgewählten Referenzproteine β -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und folgenden Sekundärantikörper inkubiert und wie oben beschrieben belichtet und ausgewertet.

3.3.3. Immunhistochemie

Hierfür wurde humanes und tierartspezifisches (Katze, Hund, Rind, Pferd) Hodengewebe zeitnah nach der Entnahme in Bouinscher Lösung (Tabelle 5) fixiert, in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom Leica SM2000R (Leica, Wetzlar, Deutschland) in circa $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte geschnitten und auf Glasobjektträger aufgezogen. Danach wurden die Hodenschnitte in Xylol für 2 x 5 min entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe mit 2 x 100% Isopropanol und je 1 x 96%, 80%, 70% Isopropanol für 3 min rehydriert. Die Schnitte wurden in PBS für 10 min gewaschen, gefolgt von der Antigendemaskierung in einer Mikrowelle. Hierfür wurden 9 ml Stammlösung A, 41 ml Stammlösung B und 450 ml H_2O bidest in einen Mikrowellentopf mit Deckel gegeben und die Schnitte darin für 15 min bei 800 Watt (W) und für 10 min bei 400 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach einer 20 minütigen Abkühlung wurden die Hodenschnitte für 3 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde jeder einzelne Gewebeschnitt mit einem fetthaltigen Stift begrenzt, um den Schnitt während weiterer Inkubationen bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit den jeweiligen Lösungen benetzt zu halten.

Die Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte für 30 min mit einer PBS Lösung, die 9% Methanol und 3% H_2O_2 enthielt. Darauf folgten drei Waschschrte für 5 min in PBS. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Ziegennormalserum in PBS bei Raumtemperatur für 30 min abgesättigt. Danach wurde der in PBS mit 5% Ziegennormalserum verdünnte Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion wurde bei einem der Gewebeschnitte entweder der Primärantikörper durch PBS mit 5% Ziegennormalserum ersetzt oder durch eine korrespondierende IgG-Antikörper Verdünnung derselben Spezies wie der Primärantikörper ausgetauscht. Am nächsten Tag wurde 3 x mit PBS für 5 min gewaschen und dann für maximal 1 h mit 1:500 verdünntem biotinylierten Sekundärantikörper, welcher gegen das konstante

Fragment - den Fc-Teil - des Primärantikörper gerichtet ist und deswegen spezifisch bindet, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS wurden die Schnitte mit dem ABC-Reagenz (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) circa 1 h inkubiert. Es folgte ein Waschschrift 2 x für 5 min mit PBS und 1 x für 10 min mit Tris-Puffer/ HCl (50 mM, pH 7,6). Daraufhin wurden die Schnitte mit dem chromogenen Substrat Diaminobenzidin (DAB Tablet Set, Sigma, Deißenhofen, München) nach Angaben des Herstellers für circa 1 min bis maximal 10 min gefärbt, entsprechend der gewünschten Braunfärbung durch die Peroxidase, welche durch das Lichtmikroskop beobachtet wurde. Die Reaktion wurde durch H₂O bidest abgestoppt. Optional wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 10 s angefertigt mit anschließendem Wässern für 5 min unter fließendem Leitungswasser. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe in jeweils 70%, 80%, 96% und 2 x in 100% Isopropanol für jeweils 3 min wurden die Schnitte dehydriert. Nach 3 x Xylol für 5 min wurden die Gewebeschnitte mit Harz eingedeckt und konnten mikroskopisch beurteilt werden.

3.3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Detektion des von HTPCs sezernierten humanen IL6 Proteins wurde ein Ready-to-use Sandwich ELISA (Human IL6 Platinum ELISA, eBioscience, Wien, Österreich) durchgeführt. Die HTPC Sekretion von humanem IL8, IL12 und MCP1 Protein wurde mit einem Multi-Analyte ELISArray (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfasst.

Hierfür wurden die 4×10^5 Zellen pro 60 mm Kulturschalen mit Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄.3HCl (PAM) (10 µg/ml) und Lipopolysaccharid (LPS) (10 µg/ml) in 2 ml serumfreiem farblosen Medium für 24 h stimuliert. Darauffolgend wurde das Zellmedium bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert, um Messungenauigkeiten durch tote Zellen oder Zelldebris zu vermeiden, und nur der Überstand wurde bis zur weiteren Messung bei -20 °C weggefroren. Für die Auswertung wurde der Proteingehalt der Zellen bestimmt (siehe 3.3.1.).

Beide ELISA wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Im letzten Schritt wurde die Reaktion nach ausreichender Entwicklung des blauen Farbstoffes durch Zugabe von 1 N HCl abgestoppt und der gelbe Farbumschlag konnte in dem ELISA-Auslesegerät Fluostar Optima (BGM Labtech, Offenburg, Deutschland) bei 450 nm gemessen werden. Die Menge an humanem IL6 in den Proben ist proportional zur entstandenen Peroxidase katalysierten Farbintensität und kann durch die mitgeführte Standardkurve quantifiziert werden. Die Menge an humanem IL8, IL12 und MCP1 ist ebenfalls proportional zur entstandenen Peroxidase katalysierten Farbreaktion, wobei hier kein Standard mitgeführt wurde und die relativen Werte entsprechend zur Kontrolle gesehen werden müssen.

Die IL6 Konzentrationen wurden auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen relativiert und durch die Software Graphpad Prism (Version 4.0a, La Jolla, CA, USA) mit der Kontrollgruppe verglichen, graphisch aufbereitet und auf statistische Signifikanz überprüft (One way ANOVA, Posttest: Newman-Keuls Multiple Comparison). Die IL8, IL12 und MCP1 Werte wurden ebenfalls auf die jeweilige Proteinkonzentration relativiert und durch die Software Graphpad Prism (Version 4.0a, La Jolla, CA, USA) mit der Kontrollgruppe verglichen und graphisch aufbereitet. Eine Überprüfung der Signifikanz konnte nicht durchgeführt werden, weil nur Proben eines Spenders gemessen wurden.

3.4. Statistik

Alle vorliegenden Daten wurden aus Zellchargen von mindestens 3 verschiedenen Spendern produziert, mit Ausnahme des Multianalyte ELISAs (4.4.3.), welcher mittels Zellen eines Spenders durchgeführt wurde.

Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden mit der Software Graphpad Prism (Version 4.0a, La Jolla, CA, USA) graphisch dargestellt. Mittels ONE-WAY-ANOVA-Test und anschließend Posttest (Newman-Keuls Multiple Comparison) wurden die Ergebnisse der Western Blots (4.2.1. - 4.2.3., 4.4.2.), der qPCR (4.4.1., 4.4.3.) und des IL6 ELISAs (4.4.1.) mit der Kontrollgruppe verglichen und auf statistische Signifikanz überprüft. Die Auswertung der Zellzahl und Zellgröße (4.2.4.) wurde mittels paired t-Test durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. AR Expression in testikulären peritubulären Zellen

4.1.1. AR mRNA Expression in HTPCs

Zum Nachweis des *AR* in HTPCs wurde eine RT-PCR durchgeführt. Diese zeigte bei sechs unterschiedlichen, von individuellen Spendern stammenden HTPCs eine deutliche mRNA Expression nach 35 Zyklen. Alle Kontrollexperimente waren negativ. Die Sequenzierung und ein Sequenzvergleich bestätigte die Produktidentität.



Abb 4: AR mRNA Expression von HTPCs

Die mRNA Expression von *AR* (259 bp) konnte in HTPCs von sechs unterschiedlichen Spendern (1 - 6) durch RT-PCR gezeigt werden. Als Kontrolle wurde hier cDNA durch RNA oder Wasser (H₂O) ersetzt.

4.1.2. AR Proteinexpression in HTPCs und Lokalisation des AR im humanen Hoden

Im Western Blot konnte das AR Protein (Größe: 110 kDa) im Zellkulturmodell (HTPCs) von drei individuellen Spendern nachgewiesen werden.

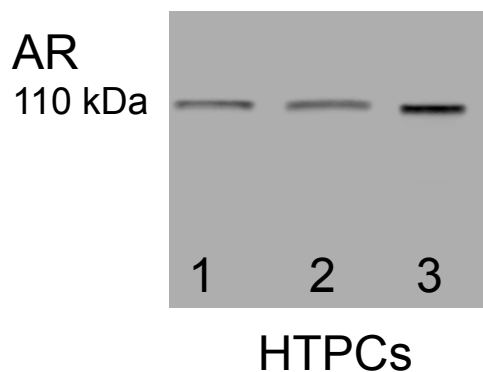


Abb 5: AR Western Blot kultivierter HTPCs

Western Blot Experimente zeigten basale Level von AR in kultivierten HTPCs von drei individuellen Spendern (1 – 3).

Um die Lokalisation des AR zu untersuchen, wurden immunhistochemische Versuche an humanen Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese von drei verschiedenen Spendern durchgeführt.

Zellen der peritubulären Region zeigten sich AR positiv durch kernständige Färbung (schwarze Pfeile). Außerdem färbten sich auch Sertolizellen (weißer Pfeil) positiv an (Abb 6).

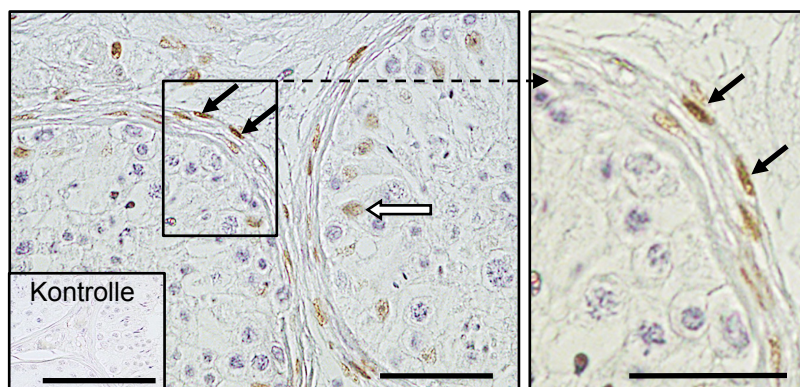


Abb 6: AR Immunhistochemie einer Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese

Durch AR Immunhistochemie zeigten HTPCs (schwarze Pfeile) und Sertolizellen (weißer Pfeil) eine kernständige Färbung in einer exemplarischen Hodenbiopsie mit normaler Spermatogenese. Für die gezeigte Kontrolle wurde der Erstantikörper durch Puffer ersetzt. Skalierungsbalken entsprechen 50 μm .

4.1.3. Lokalisation des AR im Hoden verschiedener Spezies

Es wurden Hodenschnitte verschiedener Spezies (Katze, Hund, Rind, Pferd) immunhistochemisch auf die Lokalisation des AR untersucht. AR positive Zellen mit kernständiger Färbung fanden sich in der peritubulären Region (schwarze Pfeile). Es färbten sich wie erwartet auch Sertolizellen (weiße Pfeile) positiv an (Abb 7). Alle Kontrollexperimente waren negativ.

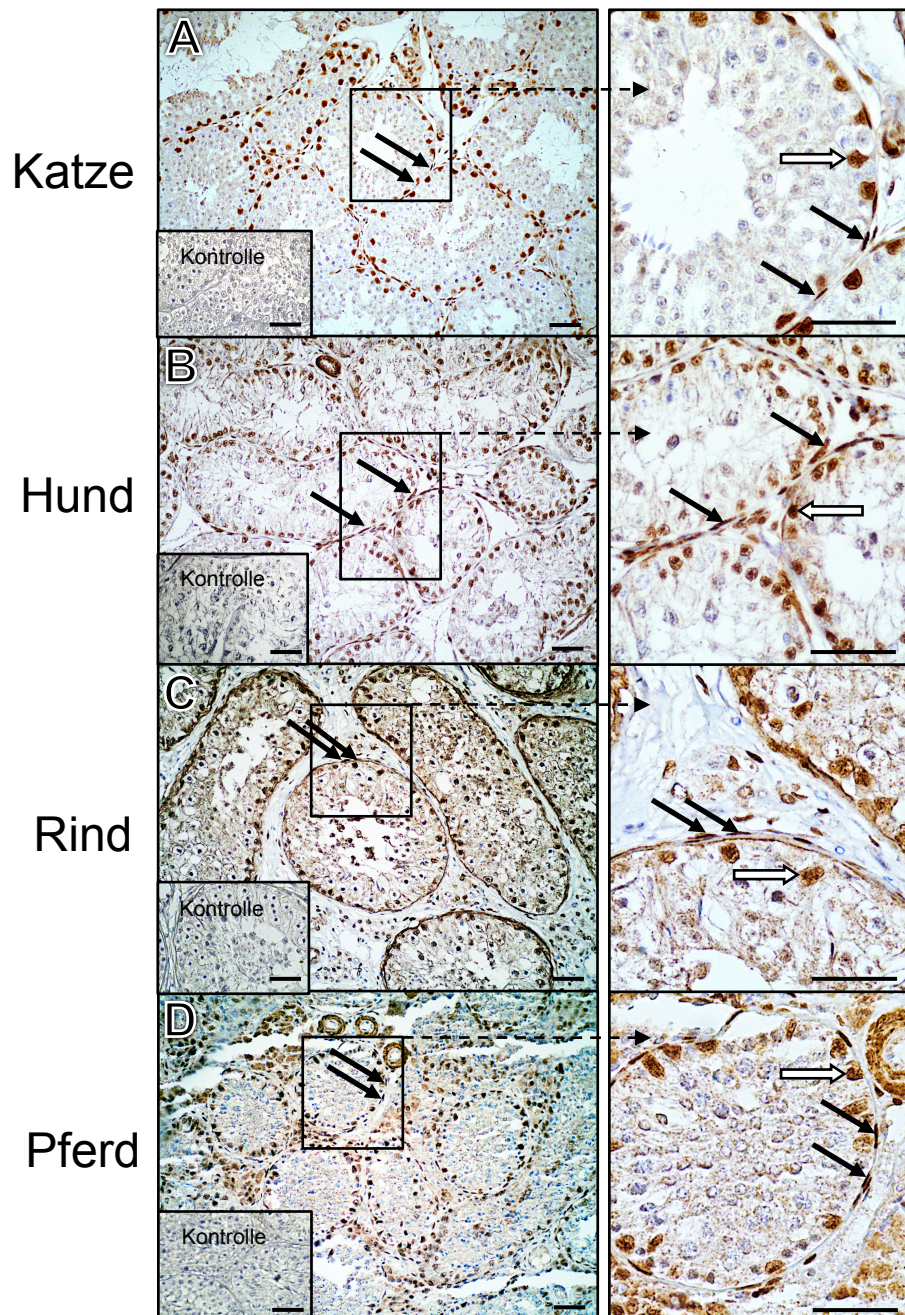


Abb 7: AR Immunhistochemie aus Hodenproben verschiedener Spezies

AR Immunhistochemie zeigte bei peritubulären Zellen (schwarze Pfeile) und Sertolizellen (weiße Pfeile) eine kernständige Färbung in Hodenproben verschiedener Spezies: Katze (A), Hund (B), Rind (C), Pferd (D). Für die gezeigte Kontrolle wurde der Erstantikörper durch Puffer ersetzt. Das markierte Feld in A-D wird rechts davon vergrößert dargestellt. Skalierungsbalken entsprechen 50 μm .

4.1.4. Lokalisation von Calponin im Hoden verschiedener Spezies

Analog zur bereits bekannten Calponinexpression im humanen Hoden wurden immunhistochemische Färbungen an Hodenproben verschiedener Spezies (Katze, Hund, Rind, Pferd) durchgeführt. Eine deutliche und gleichmäßige Färbung zeigte sich in der peritubulären Region (schwarze Pfeile) bei allen Spezies. Auch zeigten die Glattmuskelzellen in den Blutgefäßen (weiße Pfeile) eine starke Färbung (Abb 8). Alle Kontrolllexperimente waren negativ.

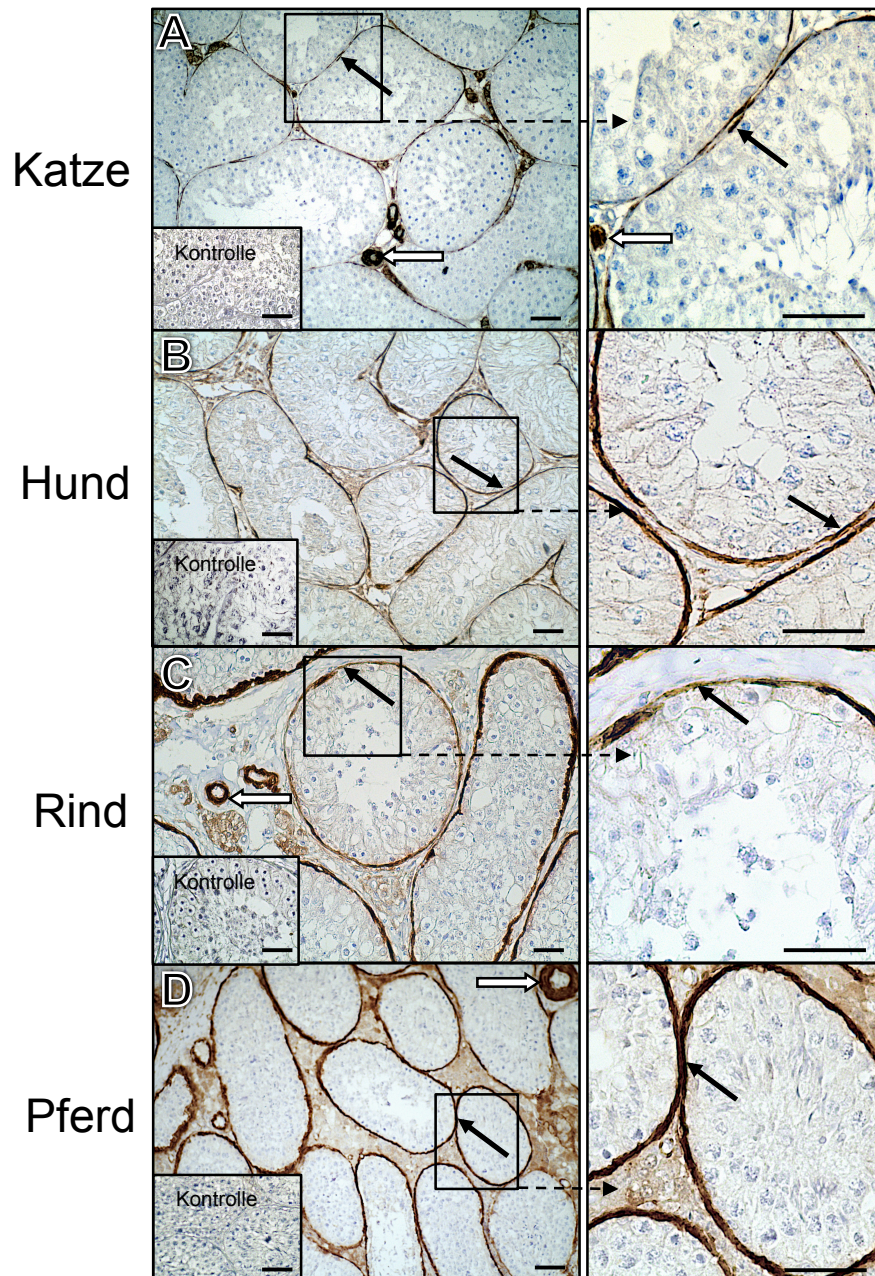


Abb 8: Calponin Immunhistochemie aus Hodenproben verschiedener Spezies

Hodenproben verschiedener Spezies, Katze (A), Hund (B), Rind (C), Pferd (D), zeigten eine deutliche und gleichmäßige Calponin-Färbung in peritubulären Zellen (schwarze Pfeile) und Blutgefäßen (weiße Pfeile; hier in A, C, D). Für die gezeigte Kontrolle wurde der Erstantikörper durch Puffer ersetzt. Das markierte Feld in A-D wird rechts davon vergrößert dargestellt. Skalierungsbalken entsprechen 50 μm .

4.2. Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf den Phänotyp von HTPCs

4.2.1. Zunahme der Proteinexpression von Calponin

Durch Stimulation kultivierter HTPCs mit verschiedenen Konzentrationen von DHT (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) über 3 Tage war ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von Calponin (Größe: 34 kDa) im Western Blot bei einer Konzentration von 10 μ M DHT zu beobachten. Keinen Effekt zeigte die Stimulation mit 100 nM und 1 μ M DHT (Abb 9). Aufgrund dieser Tatsache wurden alle weiteren Versuche mit 10 μ M DHT stimuliert.

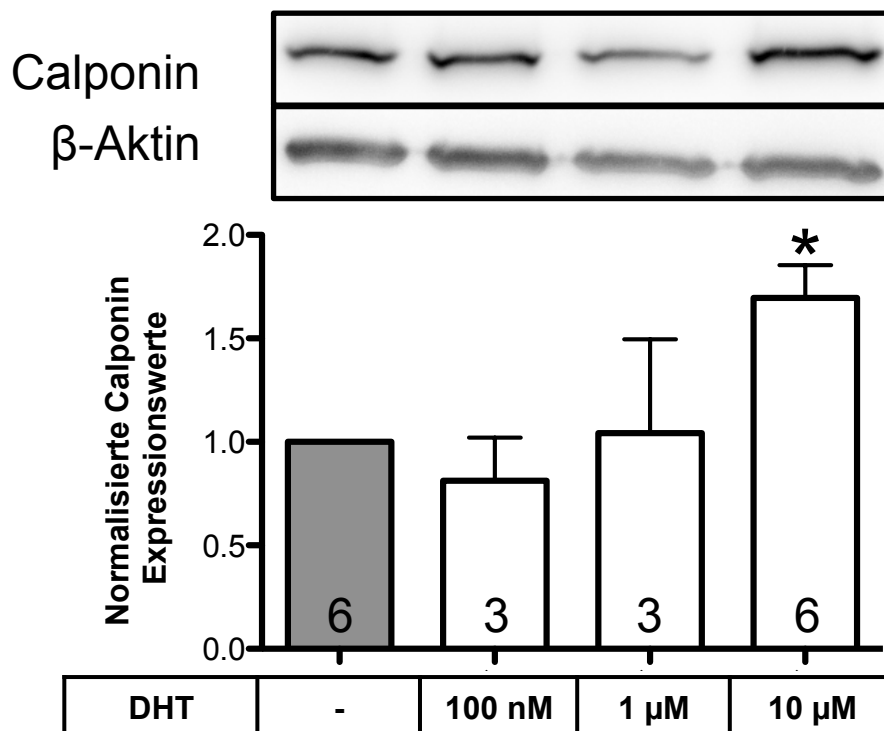


Abb 9: Calponin Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot

Einen signifikanten Anstieg des Proteingehalts von Calponin war bei Stimulation mit 10 μ M DHT nach über 3 Tagen bei 6 verschiedenen Spendern zu beobachten. Keinen Effekt zeigten die Konzentrationen 100 nM und 1 μ M DHT. Banden eines exemplarischen Western Blot Experiments sind oben dargestellt. Im Balkendiagramm sind die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu β -Aktin und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.2. Zunahme der Smooth Muscle Actin (SMA) Proteinexpression

Im Gegensatz zu Calponin konnte eine signifikante Steigerung der SMA Proteinexpression (Größe: 42 kDa) durch DHT Stimulation bei allen Konzentrationen (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) über 3 Tage erreicht werden (Abb 10).

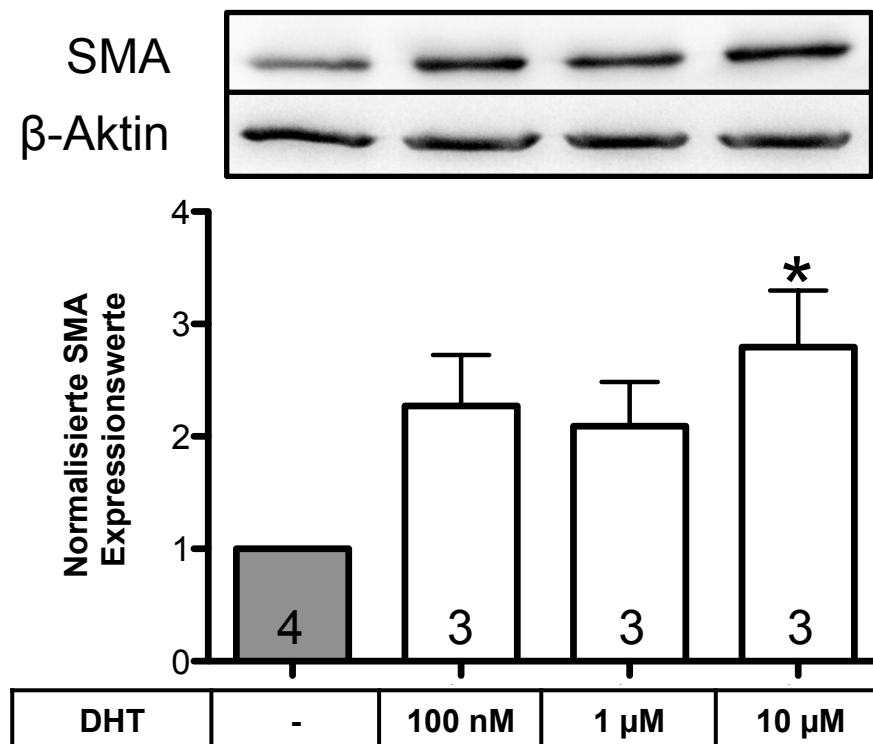


Abb 10: SMA Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot

Stimulation mit DHT (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) über 3 Tage führte zu einem signifikanten Anstieg des Proteins SMA in HTPCs. Banden eines exemplarischen Western Blot Experiments sind oben dargestellt. Im Balkendiagramm sind die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu β -Aktin und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.3. Zunahme des AR Proteingehalts und Blockierung durch Flutamide

Die Stimulation mit DHT in verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) über 3 Tage führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der AR Proteinexpression in HTPCs. Die Stimulationen mit DHT 1 μ M und 10 μ M zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg (Abb 11).

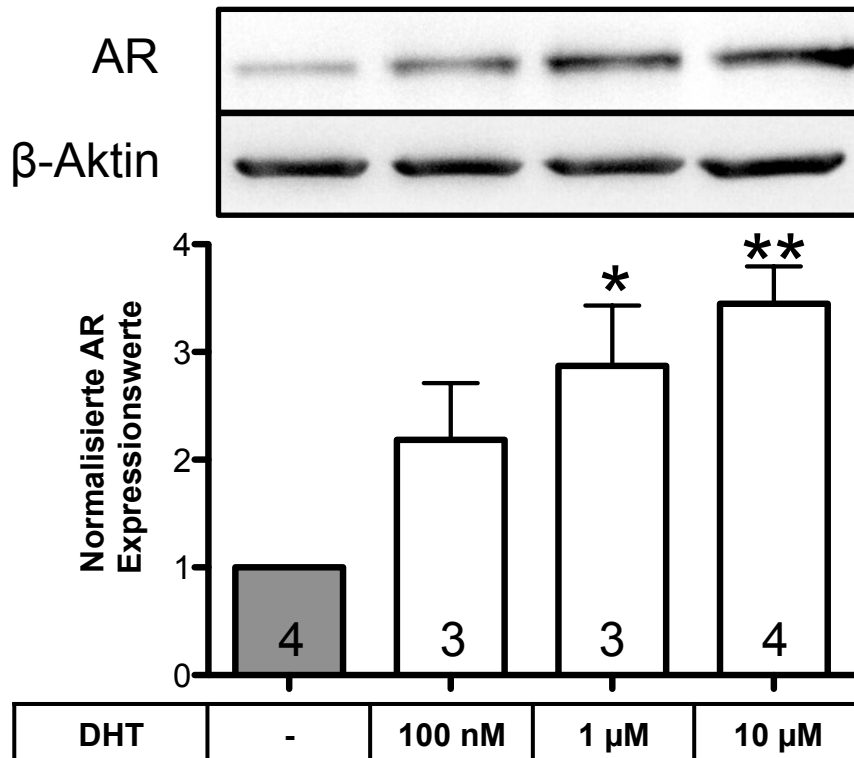


Abb 11: AR Proteinexpression in HTPCs nach DHT Stimulation im Western Blot

DHT (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) erhöhte das AR Proteinlevel im Western Blot konzentrationsabhängig und statistisch signifikant nach 3 Tagen Stimulation. Banden eines exemplarischen Western Blot Experiments sind oben dargestellt. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu β -Aktin und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. *p < 0,05 und **p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Der AR-Blocker Flutamide hemmte den DHT abhängigen AR Proteinanstieg. Es erfolgte eine Vorinkubation (30 min) der HTPCs mit Flutamide ($50 \mu\text{M}$). Anschließend wurden HTPCs wie bei den vorausgegangenen Versuchen mit der höchsten Konzentration DHT ($10 \mu\text{M}$) über 3 Tage stimuliert (Abb 12).

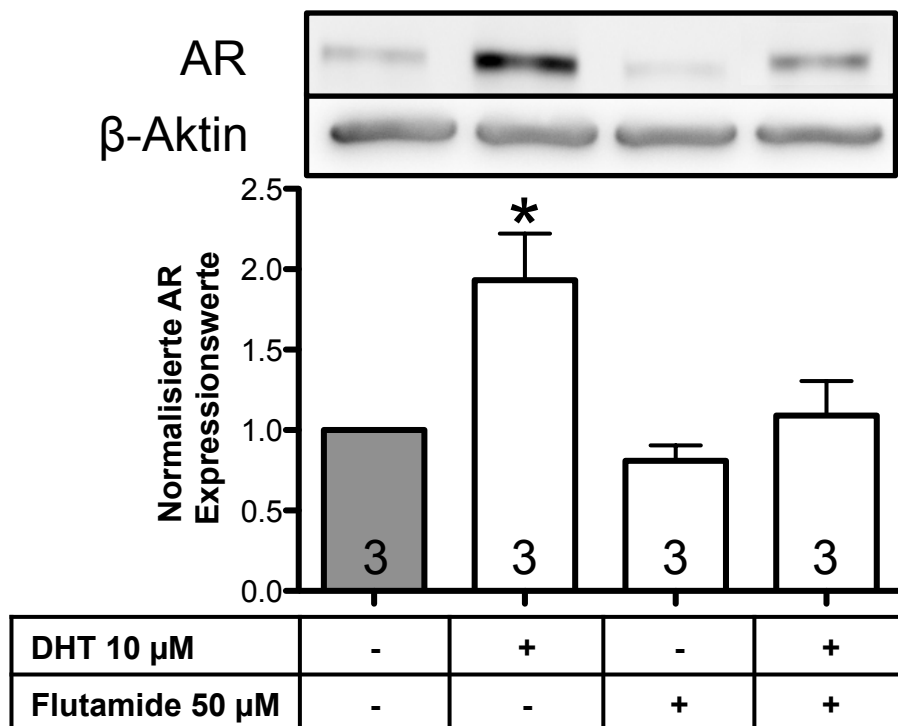


Abb 12: Western Blot zur Hemmung des DHT induzierten AR Proteinanstiegs in HTPCs

Flutamide ($50 \mu\text{M}$) blockierte einen Anstieg des AR Proteins in HTPCs induziert durch DHT ($10 \mu\text{M}$) Stimulation über 3 Tage. Die Banden eines exemplarischen Western Blot Experiments sind oben dargestellt. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu β -Aktin und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.4. Effekte auf Zellzahl und Zellgröße

Wie in Abb 13 zu erkennen ist, zeigte DHT (10 μM) Stimulation über 3 Tage keinen Einfluss auf Zellzahl oder Zellgröße der HTPCs von drei verschiedenen Spendern im Zell-Zählsystem (Casy) im Vergleich zu Kontrolle.

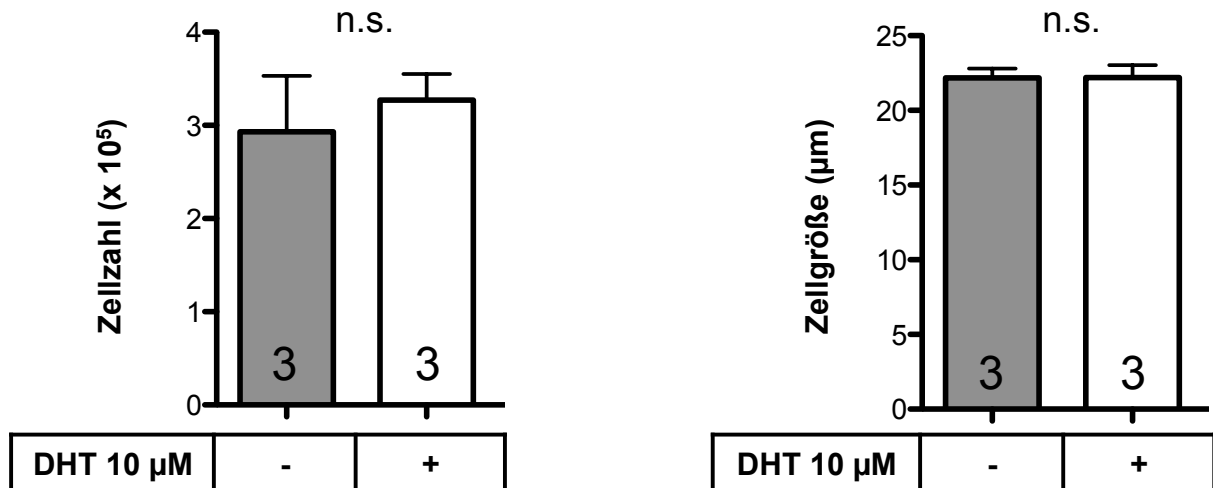


Abb 13: Effekte von DHT auf Zellzahl und Zellgröße der HTPCs

DHT (10 μM) Stimulation über 3 Tage zeigte bei HTPCs keinen Einfluss auf die Zellzahl oder die Zellgröße. Die Spenderanzahl ist im Balkendiagramm angegeben. Die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM. n.s. = nicht signifikant.

4.3. *TLR2* und *TLR4* Expression in HTPCs

4.3.1. mRNA Expression von *TLR2* und *TLR4*

Der Nachweis von *TLR2* und *TLR4* mRNA von unstimulierten HTPCs gelang durch RT-PCR nach 35 Zyklen (Abb 14). Alle Kontrollexperimente waren negativ. Eine Sequenzierung bestätigte die Identität der Transkripte.

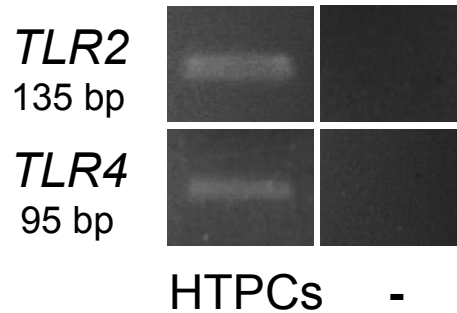


Abb 14: mRNA Expression von *TLR2* und *TLR4* in HTPCs

Die mRNA Expression von *TLR2* (135 bp) und *TLR4* (95 bp) konnte in einer HTPCs-Probe durch RT-PCR gezeigt werden. Für die gezeigte Kontrolle (-) wurde hier cDNA durch Wasser ersetzt.

4.3.2. Regulation von *TLR2/4* mRNA durch Tumornekrosefaktor (*TNF*) α

Eine deutliche Expressionssteigerung von *TLR2* und *TLR4* mRNA konnte durch Stimulation der HTPCs über 24 h mit *TNF* α (5 ng/ml) bei drei verschiedenen Spendern (1 - 3) durch konventionelle PCR gezeigt werden (Abb 15).

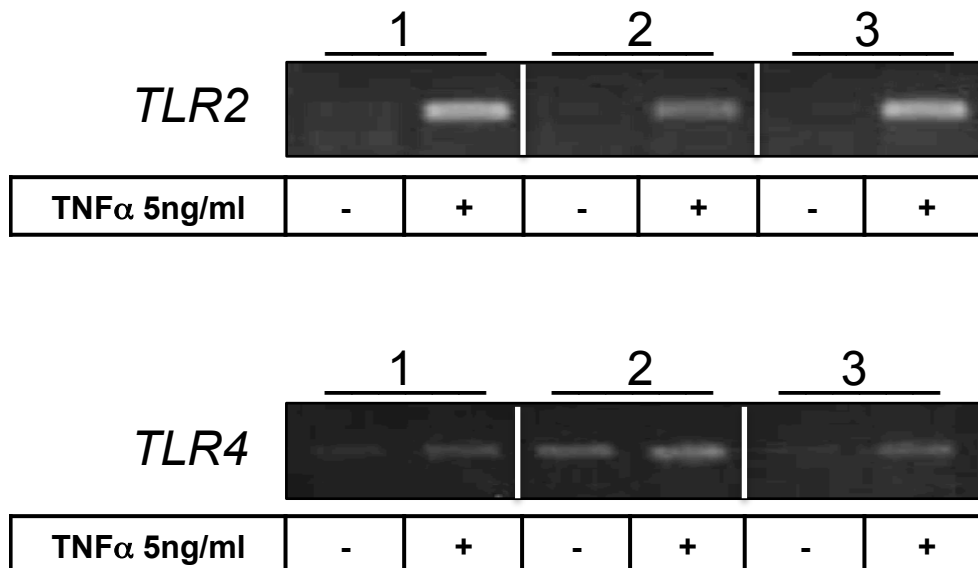


Abb 15: mRNA Expression von *TLR2* und *TLR4* nach Behandlung mit *TNF* α

Stimulation über 24 h mit *TNF* α (5 ng/ml) zeigte gegenüber der unstimulierten Zellkontrolle (-) mittels RT-PCR eine deutliche mRNA Expressionssteigerung von *TLR2* und *TLR4* in HTPCs von drei verschiedenen Spendern (1 - 3).

4.4. Nachweis von TLR2 und TLR4 mittels spezifischer Agonisten

Die Proteine des TLR2 und TLR4 konnten durch kommerzielle Antikörper sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie nicht eindeutig in humanen und tierischen Geweben nachgewiesen werden. Deswegen wurde die Funktionalität der TLRs mittels spezifischer Agonisten überprüft. Für den TLR2 war dies der spezifische bakterielle Ligand PAM und für TLR4 der spezifische bakterielle Ligand LPS. Als Readout wurde die *IL6* mRNA Expression, die IL6 Protein Sekretion und der PTX3 Proteingehalt der HTPCs gewählt.

4.4.1. Zunahme der Interleukin (*IL*)6 mRNA- und Proteinexpression durch TLR Agonisten

Zum Nachweis der *IL6* mRNA Expressionsunterschiede mittels qPCR wurden die HTPCs für 6 h mit PAM (10 μ g/ml) und LPS (10 μ g/ml) inkubiert. Eine Stimulation mit PAM zeigte nach 6 h einen 3-fach signifikanten Anstieg der *IL6* mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle. LPS zeigte keinen Effekt (Abb 16).

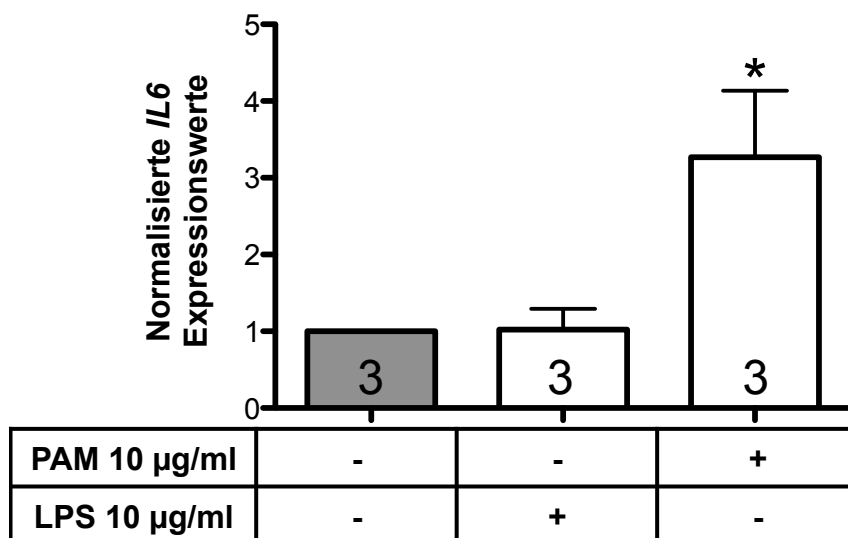


Abb 16: *IL6* mRNA Expression nach PAM und LPS Stimulation in HTPCs

Der spezifische TLR2 Agonist (PAM 10 μ g/ml) führte zu einer 3-fachen signifikanten Erhöhung der *IL6* mRNA Expression. Der spezifische Ligand für TLR4 (LPS 10 μ g/ml) zeigte keinen signifikanten Unterschied in qPCR Studien. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu *RPL19* und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Das mRNA Ergebnis wurde in einem IL6 ELISA-Experiment aus Zellkulturüberständen bestätigt und komplementiert. Nach 24 h Behandlung der Zellen fand sich ein signifikanter 1,5-facher Anstieg bei LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) und ein hoch signifikanter 4-facher Anstieg bei PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation verglichen zu basalen Kontrollbedingungen (Abb 17).

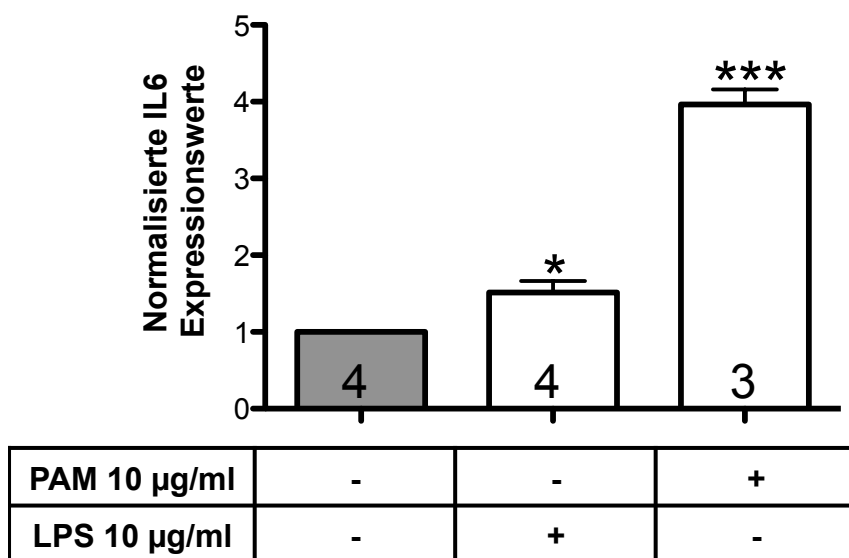


Abb 17: IL6 Proteinsekretion in das Zellkulturmedium nach PAM und LPS Stimulation

LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) Behandlung über 24 h führte zu einem 1,5-fachen Anstieg und PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) Behandlung zu einem 4-fachen Anstieg der IL6 Proteinsekretion im Zellkulturüberstand mittels ELISA Experiment. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die IL6 Sekretionswerte normalisiert zum Gesamtproteingehalt und relativiert zur Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM. *p < 0,05 und ***p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.2. Zunahme der Pentraxin 3 (PTX3) Proteinexpression durch Agonisten

Ein weiterer Faktor, der lösliche Rezeptor, Pentraxin 3 (PTX3) wurde durch 24 h Stimulation mit dem spezifischen TLR2 Agonisten PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) statistisch signifikant erhöht (5-fach). Bei LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation via TLR4 konnte unter gleichen Bedingungen keine Wirkung gezeigt werden (Abb 18).

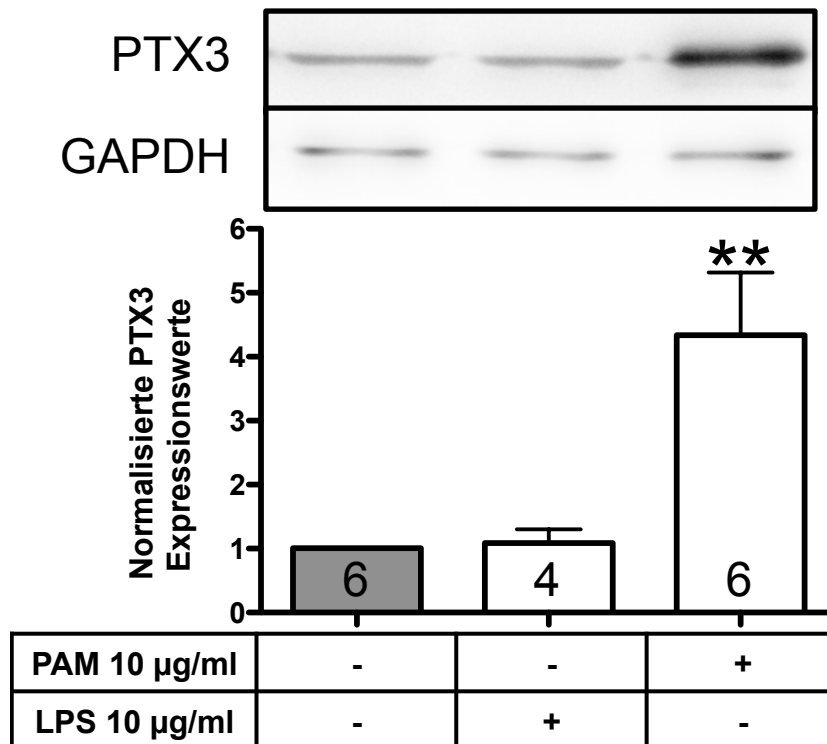


Abb 18: Western Blot zur PTX3 Protein Expression nach PAM und LPS Stimulation

Der TLR2 Agonisten PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) zeigte einen 5-fachen Anstieg des PTX3 Proteingehalts nach 24 h Stimulation im Western Blot. TLR4 Agonist LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) zeigte keinen Effekt. Die Banden eines exemplarischen Western Blot Experiments sind oben dargestellt. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu GAPDH und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.3. Zunahme weiterer proinflammatorischer Faktoren auf mRNA- (*MCP1* und *ICAM1*) und Proteinebene (*IL8*, *IL12*, *MCP1*) durch TLR Agonisten

Auf mRNA Ebene konnte in der qPCR gezeigt werden, dass die Expression weitere proinflammatorische Faktoren, wie *MCP1* in Abb 19 und *ICAM1* in Abb 20, nach 6 h Stimulation durch PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) signifikant gesteigert wurden. Unter LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) konnte ein tendenzieller Anstieg der *MCP1* und *ICAM1* mRNA beobachtet werden.

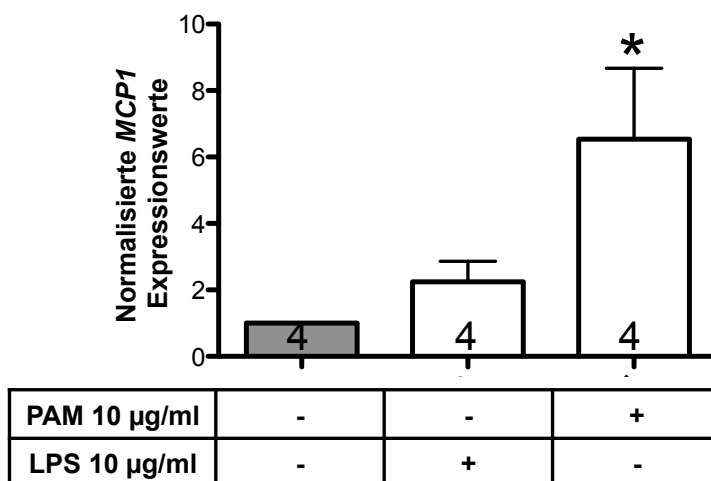


Abb 19: MCP1 mRNA Expression nach Stimulation mit PAM und LPS

PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation zeigte einen signifikanten Anstieg und LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) eine leichte Steigerung der *MCP1* mRNA Expression nach 6 h in qPCR Versuchen. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu *RPL19* und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

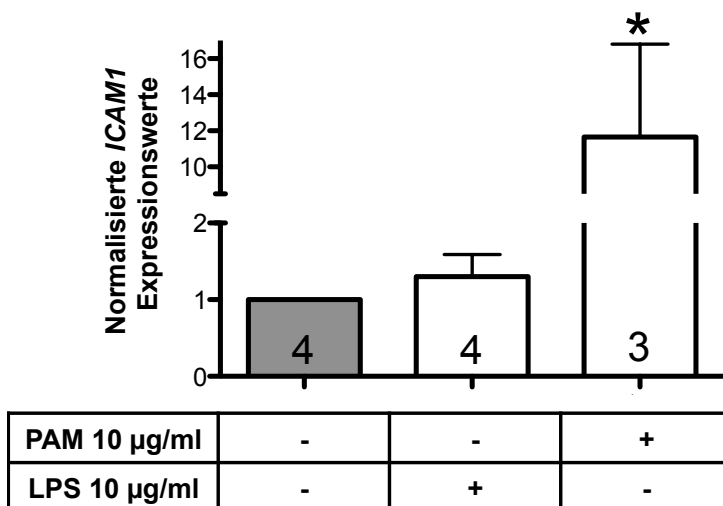


Abb 20: ICAM1 mRNA Expression nach Stimulation mit PAM und LPS

PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation zeigte einen signifikanten Anstieg und LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) eine tendenzielle Steigerung der *ICAM1* mRNA Expression nach 6 h in qPCR Versuchen. Im Balkendiagramm werden die Spenderanzahl angegeben und die Ergebnisse normalisiert zu *RPL19* und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Auf Proteinebene ergaben sich weitere Hinweise auf Faktoren, die durch Stimulation mit beiden TLR Agonisten vermehrt sezerniert werden. Im ELISA konnte an einem Spender gezeigt werden, dass IL8, IL12 und MCP1 im Zellkulturüberstand der HTPCs durch Stimulation über 24h mit PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) und LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) auf das 1,5-bis 4-fache gesteigert werden konnte (Abb 21).

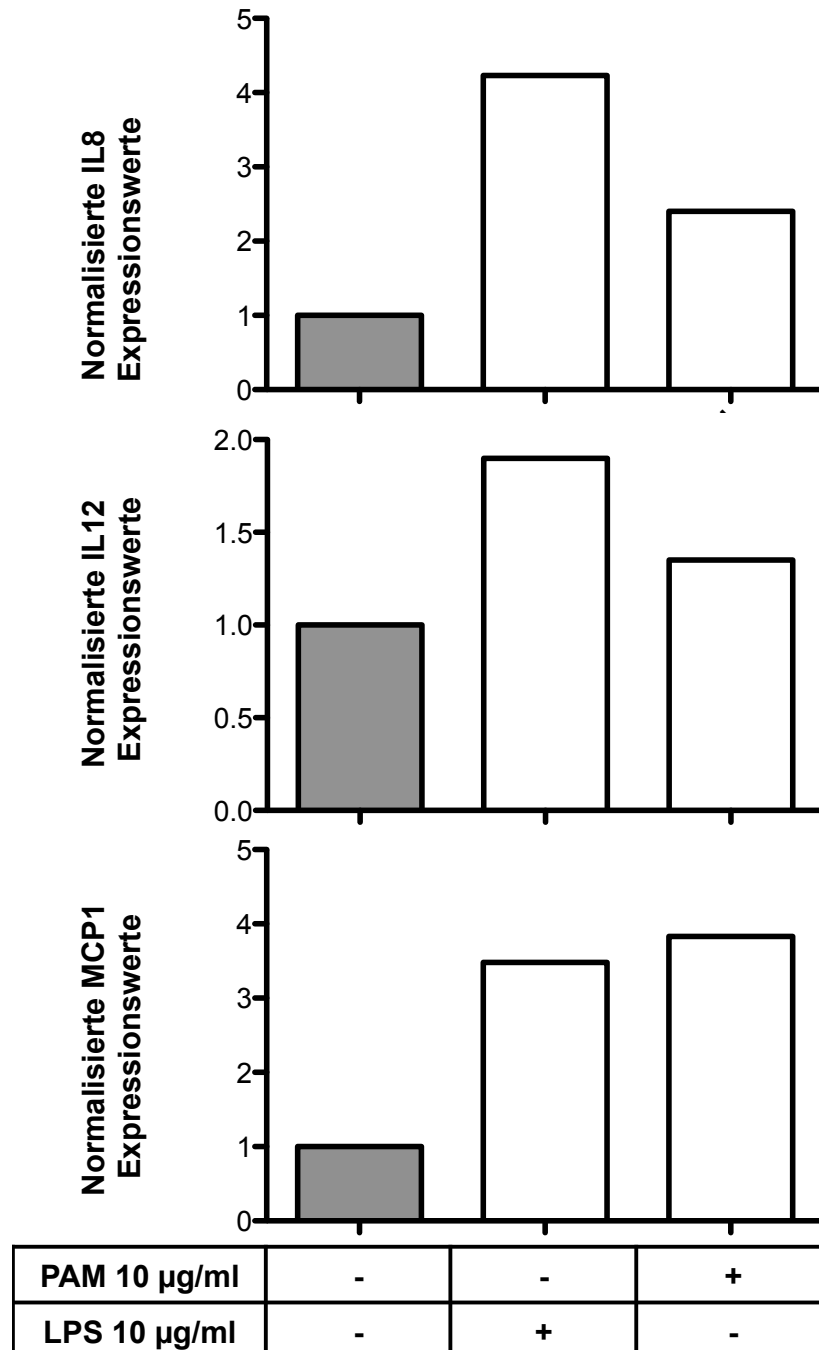


Abb 21: IL8, IL12, MCP1 Proteinsekretion ins Zellmedium nach PAM und LPS Stimulation

Nach 24 h Behandlung der HTPCs von einem Spender mit PAM (10 $\mu\text{g/ml}$) und LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) konnte im Zellkulturmedium eine gesteigerte Proteinsekretion von IL8, IL12 und MCP1 im ELISA gemessen werden. Im Balkendiagramm werden die Ergebnisse normalisiert zum Gesamtproteingehalt und relativiert zur Kontrolle, welche auf 1 gesetzt wurde, gezeigt.

5. DISKUSSION

Peritubuläre Zellen in Hoden sind Zellen, die zur Kontraktion fähig sind und eine Vielzahl von Faktoren sezernieren können. Diese Eigenschaften weisen auf eine wichtige, aber zum Teil noch unbekannt Rolle dieser Zellen bei der männlichen Fertilität hin.

Die Untersuchung der Ausstattung der peritubulären Zellen mit Androgen-Rezeptoren und TLRs und die Analyse der Konsequenzen ihrer Aktivierung standen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Das zelluläre Model der HTPCs wurde genutzt. Des Weiteren wurden humane und verschiedene Tierhoden untersucht. In einer Pilotstudie in Kooperation mit dem Reozentrum München (Frau Dr. Otzdorff) wurde ein Versuch gestartet, peritubuläre Zellen aus einer Hodenprobe eines Bullen mit Verdacht auf Infertilität zu kultivieren. Leider konnten aber keine vitalen Zellen daraus gewonnen werden, so dass die Untersuchungen an Tierhoden auf immunhistochemische Nachweise beschränkt blieben.

Auf eine entscheidende Rolle der Androgene in der Differenzierung zu glattmuskelähnlichen Zellen wurde bei peritubulären Zellen in zwei früheren Studien an Knock-out-Maus Modellen (Welsh et al., 2009; Zhang et al., 2006) und einer Entwicklungsstudie an nicht-humanen Primaten (Schlatt et al., 1993) hingewiesen. Sie zeigen, dass Androgene für die normalerweise im Zuge der Pubertät stattfindenden Differenzierung der peritubulären Zellen zu glattmuskelähnlichen Zellen wichtig sind. Die Daten der vorliegenden Arbeit stammen von HTPCs, welche aus Hodengewebe von erwachsenen Männern isoliert wurden. Diese Zellen exprimieren - wie die entsprechenden Zellen im erwachsen Hoden - AR und die Glattmuskelmarkerproteine SMA und Calponin. Die Expression bleibt bei HTPCs erhalten, selbst wenn man sie ohne Androgenzugabe im Medium kultiviert. Dies bestätigt die Beobachtung von Schlatt et al., (1993), dass der Glattmuskelphänotyp nach (peripubertärer) Induktion grundsätzlich stabil bleibt. Allerdings kann das Ausmaß der Expression von Glattmuskelmarkern deutlich beeinflusst werden. Unter Zugabe von DHT zu kultivierten HTPCs waren kontraktile Marker und überraschenderweise auch AR verstärkt exprimiert. DHT ist ein potenter Agonist am AR, dessen Wirkung durch den AR Blocker Flutamide verhindert wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass die durchgeführte Androgenzugabe über den AR eindeutig diese Veränderungen an kultivierten Zellen bewirkt. Hervorzuheben ist, dass Androgene direkt Glattmuskelmarker erhöhen und diese Wirkung weiter verstärkt wirkt durch die vermehrte Expression von AR. Es könnte sich um Zell-spezifische Wirkungen handeln, denn bei Glattmuskelzellen des Corpus Cavernosum

des Penis sind gegenteilige Effekte beschrieben und hier scheinen erniedrigte Testosteronwerte die Kontraktionsfähigkeit zu steigern (Zhang et al., 2011).

Die Ergebnisse der *in vitro* Studien an humanen Zellen, HTPCs, wurden durch eine Pilotstudie über systemische, *in vivo* Beobachtungen von immunhistochemischen Färbungen an Affenhodenproben weiter unterstützt (nicht gezeigt). Die Affenproben stammen von Tieren unterschiedlichen Alters. Deren Analyse zeigt u.a., dass die Expression des Glattnuskelmarkers SMA der peritubulären Zellen in direkter Beziehung zu den Testosteronwerten steht, die zur Pubertät ansteigen. Androgene regulieren somit auch *in vivo* den Glattnuskelphänotyp der peritubulären Zelle.

Demnach ist die Verfügbarkeit von Androgenen für die testikulären peritubulären Zellen untrennbar mit dem glattnuskelzell-ähnlichen Phänotyp und möglicherweise dem intratestikulären Spermientransport verbunden (Palombi et al., 2002; Romano et al., 2005; Welsh et al., 2009; Zhang et al., 2006). Ob AR-Aktivierung zusätzliche Veränderungen verursacht, beispielsweise die sezernierten Produkte der HTPCs beeinflusst (Flenkenthaler et al., 2014), muss in weiteren Studien geklärt werden.

AR-Aktivierung hat eine erhöhte Expression des AR bei HTPCs zur Folge. Diese Art von Regulation des AR ist nicht ungewöhnlich, aber in vielen beschriebenen Fällen führen Androgene auch zu einer Verminderung des AR (Burnstein, 2005). Androgene üben einen positiven Feedback-Mechanismus auf ihren Rezeptor aus, beispielsweise im Knochen (Takeuchi et al., 1994; Wiren et al., 1997), in der Prostata bei Nagern (Takeda et al., 1991), im Herzen (Golden et al., 2002; Li et al., 2006) aber nicht in vaskulären Glattnuskelzellen (Lopes et al., 2012). Beim männlichen Hamster führte DHT Behandlung zur Senkung des AR mRNA Levels in Motoneuronen (Drengler et al., 1996). Angesichts der vielfältigen Wege, über welche AR mRNA Level und AR reguliert werden können, spielt offenbar die organ- und gewebespezifische Umgebung eine entscheidende Rolle und muss zusätzlich beachtet werden (Coffey & Robson, 2012; Koryakina et al., 2014; Mills, 2014).

In der Prostata des Menschen spielt die Aktivierung des AR durch Androgene eine fördernde Rolle im Zellwachstum der Stromazellen und der Epithelzellen und dadurch wird die Entwicklung einer benignen Prostatahyperplasie unterstützt (Izumi et al., 2013). In der vorliegenden Studie konnten allerdings bei HTPCs keine Unterschiede durch DHT Behandlung, weder in der Zellzahl noch in der Zellgröße, festgestellt werden.

Das vor kurzem etablierte Zellkulturmodell der HTPCs erleichtert es, die spezielle humane testikuläre Situation näher zu untersuchen, denn es ermöglicht Einblicke in

die Mikroumgebung des adulten humanen Hodens (Flenkenthaler et al., 2014; Mayerhofer, 2013). Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Wichtigkeit der intra-testikulären Androgene für die peritubuläre Zellfunktion im Mann und ergänzt frühere Arbeiten, die sich ebenfalls mit der plastischen Natur der HTPCs in Hinsicht auf Glattmuskelcharakteristika und Kontraktionsfähigkeit beschäftigten. Bei infertilen Männern werden im Hoden vermehrt Prostaglandine gebildet und ein Prostaglandinmetabolit (15-deoxy- Δ^{12-14} -prostaglandin-J2) war in Zellkulturstudien an HTPCs in der Lage, den Glattmuskelphänotyp reversibel zu verändern (Schell et al., 2010). Dabei spielten reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle. Es bleibt zu ermitteln, ob die DHT/ AR-Signalkaskade auch ROS involviert, wie es bei jüngsten Studien zum Beispiel bei Gefäßerkrankungen gezeigt wurde (Lopes et al., 2012).

Im Tierreich sind Vorgänge im Hoden vor allem beim Nager gut untersucht. Einblicke in das Geschehen bei größeren Säugetieren sind rudimentär. Es ist aber bekannt, dass beim Hengst in den peritubulären Zellen AR zu finden ist (Bilinska et al., 2005). Ob er auch hier im Zuge der Pubertät vermehrt exprimiert wird, wie an Sertolizellen untersucht, ist noch zu klären (Almeida et al., 2012). In immunhistologischen Studien an Hunden konnte in peritubulären Zellen ebenfalls eine positive AR Färbung gezeigt werden. Interessanterweise blieben durch Implantation eines Gonadotropin-Releasing-Hormon Agonisten (chemische Kastration) und die damit verbundene Desensibilisierung durch Dauerapplikation die mRNA Werte von AR unbeeinflusst. Die Autoren vermuten eine Blockierung der AR-Translation, denn es wurden immunhistochemisch weniger AR-positive Sertolizellen im Vergleich zur Kontrolle gefunden. Im juvenilen caninen Hoden war der mRNA Gehalt des AR signifikant niedriger (Goericke-Pesch et al., 2013). Eine weitere Studie zeigte die Ähnlichkeit des caninen Androgenrezeptors zu anderen Säugetierspezies und konnte mit einem Antikörper, der gegen humanen AR gerichtet war (wie auch in dieser Arbeit verwendet) eine spezifische Färbung erreichen (Lu et al., 2001). Der spezifische Glattmuskelmarker Calponin wurde bereits beim Hund in der Prostata (Lean et al., 2014), in Blutgefäßen (Isayama et al., 2013) und bei caninen (Rasotto et al., 2014) und felines Myoepithelien im Milchdrüsengewebe (Martín de las Mulas et al., 2004) nachgewiesen. In der letzten Studie benutzen die Autoren einen Maus-anti-human-Antikörper gegen Calponin (wie auch in dieser Arbeit verwendet). Beim Rind wurde Calponin bis jetzt nur in der Aorta nachgewiesen (Takeuchi, 1992). Es lässt sich somit feststellen, dass der AR bereits beim Pferd und beim Hund in der peritubulären Region gefunden wurde. Zum heutigen Kenntnisstand konnten bis jetzt keine Studien über das Vorkommen des AR im Hoden bei der Katze und beim Rind aufklären. Die in dieser Arbeit erbrachten immunhistochemischen Nachweise von AR und kontraktile Markern in den Peritubulärzellen vom adulten Bulle, Hengst, Kater und

Rüde ergänzen das bisherige Bild und weisen auf gemeinsame, Speziesgrenzen-übergreifende Eigenschaften hin.

Intratestikuläre Prozesse bei idiopathischer männlicher Infertilität und eingeschränkter Spermatogenese involvieren Entzündungsvorgänge. Mehrere Studien beschreiben bei infertilen Männern in der Wand der humanen Samenkanälchen eine stark vermehrte Anzahl an Immunzellen, wie Makrophagen und Mastzellen (Apa et al., 2002; Hashimoto et al., 1988; Hussein et al., 2005; Nagai et al., 1992; Roaiah et al., 2007). Diese Immunzellen sind Ausdruck eines wenig verstandenen entzündlichen Prozesses im Hoden, der vermutlich zu einer verminderten Spermatogenese und letztendlich zur Unfruchtbarkeit führt. Peritubuläre Zellen reagieren dabei mit einer Phänotypveränderung. Es kommt zur Fibrose im tubulären Bereich des Hodens, gekennzeichnet durch die Ablagerungen von Extrazellulärer Matrix in der Tubuluswand bis hin zur Hyalinisierung der Tubuli (Haider et al., 1999). Von Veränderungen einschließlich zellulärer Hypertrophie berichten zudem mehrere Studien (Haider et al., 1999; Schell et al., 2010; Welter et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob peritubuläre Zellen TLRs besitzen, die eine infertilitäts-assoziierte Entzündungsreaktion möglicherweise beeinflussen können. In peritubulären Zellen der Ratte konnte bereits eine schwache Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden. TLR4 Aktivierung mit LPS erhöhte die IL6 Sekretion im ELISA. Zusätzlich konnte ebenfalls eine erhöhte *MCP1* mRNA Expression gezeigt werden (Bhushan et al., 2008). Im Hinblick auf die sekretorischen Fähigkeiten der HTPCs (Flenkenthaler et al., 2014) und deren in früheren Studien gezeigte Fähigkeit Zytokine wie IL6 zu bilden (Schell et al., 2008), richtete sich das Augenmerk bei der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf IL6 und weitere sezernierte Faktoren dieser Zellen.

TLR2 und *TLR4* konnten unter basalen Zellkulturbedingungen in HTPCs nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit $TNF\alpha$ konnte aber eine deutliche Expressionssteigerung beobachtet werden. Dieser proinflammatorische Faktor kann bei Infertilität durch testikuläre Immunzellen vermehrt sezerniert werden (Schell et al., 2008) und ist somit als ein wichtiger Faktor im Entzündungsgeschehen des Hodens anzusehen. In der vorliegenden Studie wurden die spezifischen TLR Agonisten PAM für TLR2 und LPS für TLR4 verwendet. Beide führten in HTPCs ebenfalls zu einer erhöhten Sekretion des proinflammatorischen IL6. Darüber hinaus wurde der lösliche Rezeptor PTX3 untersucht, der eine wichtige Rolle im Immunsystem zu spielen scheint. PTX3 soll unter anderem durch TLR-Aktivierung von einer Vielzahl von

Zellen sezerniert werden können, unter anderem in der humanen Lunge (Balhara et al., 2013). Dieser Faktor wurde auch im männlichen Genitaltrakt näher studiert (Doni et al., 2009). In der vorliegenden Studie führte PAM Stimulation bei den HTPCs zu einem hochsignifikanten Anstieg dieses Rezeptors. Außerdem ergaben sich weitere Hinweise auf gesteigerte Zytokinexpression von IL8, IL12, MCP1 und ICAM1 unter Stimulation beider TLR Agonisten. Demnach könnten Immunzellen über $TNF\alpha$ die TLR2 und TLR4 von peritubulären Zellen erhöhen und dadurch in diesen proinflammatorische Faktoren freisetzen.

In der Tiermedizin gibt es zahlreiche Arbeiten über die Untersuchung zu TLRs, vor allem bei spezies-spezifischen Erkrankungen. Die Wirkmechanismen ähneln dabei den beim Menschen und bei HTPCs gefundenen Wegen. Beispielsweise sei eine Studie beim Pferd genannt, bei der Erkrankungen des Respirationstrakts im Mittelpunkt stehen. Makrophagen, gewonnen aus einer broncheoalveolären Lavage, wurden mit LPS aktiviert und unter anderem konnte eine Sekretion von IL6 nachgewiesen werden (Hansen et al., 2014). Bei Hunden mit Pyometra zeigte sich eine Expressionssteigerung des *TLR4* (Chotimanukul & Sirivaidyapong, 2011). *TLR2* und *TLR4* waren bei Katzen mit feliner chronischer Gingivostomatitis signifikant erhöht und der TLR-Aktivierung folgte eine gesteigerte IL6 Sekretion. Bei der bovinen Mastitis ist in mehreren Untersuchungen die Expressionssteigerung von *TLR2* und *TLR4* (Yang et al., 2008) und die daraus resultierende Zytokinexpression, unter anderem *IL6* (Günther et al., 2011), gezeigt. Bis heute gibt es jedoch keine Arbeit über die Expression oder Lokalisation von TLR im Hoden bei den genannten Spezies. Eine Lokalisation der TLR im testikulären Gewebe vom Mensch und von verschiedenen größeren Säugerspezies war auch in dieser Arbeit durch unspezifische Antikörper-Reaktionen in der Immunhistochemie leider nicht möglich. Ob die Ergebnisse zu TLRs an HTPCs daher auf das Tierreich zu übertragen sind, bleibt zu untersuchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Hoden wird die Wand der Samenkanälchen durch peritubuläre Zellen gebildet, die bis heute wenig untersucht sind. Diese besitzen beim erwachsenen Mann einen glattmuskelzell-ähnlichen Phänotyp und sind zur Kontraktion befähigt. Daneben sezernieren sie eine Vielzahl von Faktoren, die für das Geschehen im Hoden von großer Bedeutung sein können. Der glattmuskelzell-ähnliche Phänotyp und die Kontraktibilität stellen sich zunehmend als wichtig für den Spermientransport und somit für die Fruchtbarkeit heraus. Der kontraktile Apparat der peritubulären Zellen ist jedoch vor der Pubertät, zumindest beim Primaten und zudem bei männlicher Infertilität, nicht vorhanden oder reduziert und unterliegt somit einer Regulation.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob Androgene für den Glattmuskelphänotyp der peritubulären Zellen eine Rolle spielen. Da der Androgenrezeptor (AR) im Zellkultursystem der humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs) erhalten bleibt, konnten Wirkungen von Dihydrotestosteron (DHT) untersucht werden. DHT kann nicht aromatisiert werden und wirkt ausschließlich über den AR. DHT erhöhte Calponin, einen spezifischen Marker für Glattmuskelkontraktibilität und Smooth Muscle Actin (SMA). Darüber hinaus steigerte DHT über eine AR-Aktivierung auch den AR signifikant. Durch den AR-Blocker Flutamide konnte diese Wirkung unterbunden und die Spezifität untermauert werden. Die Zellzahl und die Zellgröße wurden durch DHT nicht beeinflusst.

AR und Calponin konnten auch bei Katze, Hund, Rind und Pferd in der peritubulären Region des Hodens gefunden werden. Deswegen kann man annehmen, dass diese Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit der Samenkanälchen und deren Regulation und somit auf die Fruchtbarkeit der männlichen Tiere haben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle eines weiteren Rezeptorsystems untersucht, welches bei Infertilität eine Rolle spielen könnte, Toll-like Rezeptoren (TLRs). Es wurde untersucht, ob peritubuläre Zellen TLRs besitzen, diese funktionstüchtig sind und an einer Entzündungsreaktion beteiligt sein könnten, die oft bei männlicher Infertilität zu beobachten ist. Unter basalen Zellkulturbedingungen konnten *TLR2* und *TLR4* in HTPCs nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit Tumornekrosefaktor (TNF) α , der bei Infertilität vermehrt aus testikulären Immunzellen freigesetzt werden kann, wurde die TLR Expression deutlich gesteigert. Die Funktionalität der TLRs wurde durch selektive Agonisten Pam₃ Cys-Ser-(Lys)₄.3HCl (PAM) als selektiver Ligand für TLR2 und Lipopolysaccharid (LPS) als selektiver

Ligand für TLR4 untersucht. Beide führten zu einer Sekretionssteigerung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)6. Darüber hinaus wurde der lösliche Rezeptor Pentraxin 3 (PTX3) untersucht, der eine wichtige Rolle im Immunsystem spielt. PAM Stimulation führte zu einem hoch signifikanten Anstieg dieses Rezeptors. Es ergaben sich weitere Hinweise auf gesteigerte Zytokinexpression von IL8, IL12, Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) und Intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM1*) unter Stimulation mit beiden TLR Agonisten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass AR an der Differenzierung der peritubulären Zellen zum Glattmuskeltyp beteiligt ist. Diese Fähigkeit zur Kontraktion ist wichtig für den Spermientransport im Hoden und somit für die männliche Fruchtbarkeit. Darüber hinaus ermöglicht die TLR-Ausstattung den HTPCs einen Beitrag zu einem proinflammatorischen Milieu im Hoden zu leisten und damit am Entzündungsgeschehen und an Unfruchtbarkeit Anteil zu haben.

Summary

Androgen receptor and toll-like receptors 2 / 4 on testicular peritubular cells: characterisation and functional analysis

Peritubular cells form the wall of the seminiferous tubules in the testis. These cells have received little scientific attention to the very day. In the adult, peritubular cells express markers for smooth-muscle-like cells and are able to contract. In addition, human peritubular cells secrete a plethora of factors, which are likely to be important for testicular regulatory events. The smooth-muscle-phenotyp and the ability of peritubular cells to contract are increasingly being recognized as important for sperm transport and thus for male fertility. The contractile abilities of the peritubular cells do not exist before puberty, at least in primates, and are reduced in infertility patients and thus they are subject to regulation.

The first part of this work examined, whether androgens are involved in the smooth-muscle-phenotyp of peritubular cells. Androgen receptor (AR) expression by peritubular cells in vivo is retained in a cellular model of human testicular peritubular cells (HTPCs) and consequences of dihydrotestosterone exposure (DHT) could be studied. DHT cannot be aromatized and acts solely via AR. It significantly increased the protein levels of calponin, a protein important for smooth muscle cell contractility. Smooth muscle actin (SMA) levels were likewise increased. DHT also significantly increased the level of AR protein via AR-action. Flutamide, an AR blocker, effectively prevented these actions. Cell size and cellular proliferation rate were not influenced.

AR and calponin were also located in the peritubular region of the testis in cat, dog, cattle and horse. For this reason these factors are expected to be likewise crucial for contraction of the seminiferous tubules and its regulation and hence possibly for fertility of male animals.

The second part of this work focused on a further system of receptors, which may contribute to male infertility, toll-like receptors (TLRs). Expression of TLRs, and their functionality were studied to explore whether they may be involved in inflammatory events, which often accompany male infertility. *TLR2* and *TLR4* were expressed in the HTPCs under basal conditions. Stimulation with tumor necrosis factor (TNF) α , secreted from testicular immune cells increasing in male infertility, augmented expression levels of the *TLRs*.

Selective ligands, namely Pam₃ Cys-Ser-(Lys)₄.3HCl (PAM) for TLR2 and Lipopolysaccharide (LPS) for TLR4, were used to test their functionality. Both ligands increased the pro-inflammatory cytokine interleukin 6 (IL6). The soluble receptor

pentraxin 3 (PTX3), which plays an important role in the immune system, was increased upon stimulation with PAM. Preliminary evidence for increased production of further cytokines was provided, including IL8, IL12 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) and intracellular adhesion molecule 1 (*ICAM1*). They increased upon stimulation of HTPCs with both TLR agonists.

In summary, AR are involved in the differentiation of peritubular cells of the testis towards smooth-muscle cells. This is related to sperm transport in the testis and male fertility. TLRs of HTPCs enable peritubular cells of the testis to play an essential role in inflammatory events of the testis and male infertility.

7. WEITERE PROJEKTE WÄHREND DER DOKTORARBEIT

Neben den Untersuchungen des Androgenrezeptors und der Toll-like Rezeptoren 2/4 in peritubulären Zellen habe ich an folgendem Projekt mitgearbeitet:

Angiotensin II reguliert die Funktion der testikulären peritubulären Zellen via Angiotensin-1-Rezeptor: Eine besondere Situation bei männlicher Unfruchtbarkeit

Peritubuläre myoide Zellen zeigten im humanen Hoden eine positive immunhistochemische Färbung für Angiotensin-1-Rezeptor. Daraufhin wurde die Wirkung von Angiotensin II auf kultivierten humanen peritubulären Zellen (HTPCs) untersucht:

Es konnte gezeigt werden, dass die HTPCs innerhalb von Minuten nach Angiotensin II Stimulation kontrahieren. Der Angiotensin-1-Rezeptor Blocker Losartan konnte diese Wirkung verhindern. Dies lässt eine Beteiligung von Angiotensin II und dem Angiotensin-1-Rezeptor am intratestikulären Spermientransport vermuten.

Interessanterweise erhöht Angiotensin II signifikant die *IL6* mRNA Expression sowie die IL6 Proteinsekretion. Losartan konnte diese Wirkung ebenfalls blockieren. Dies lässt eine Beteiligung an entzündlichen Prozesse erkennen, welche eine wichtige Rolle bei männlicher Infertilität spielen könnten.

Angiotensin II kann lokal durch Chymase, einem speziellen Mastzellprodukt, aus Angiotensin I konvertiert werden. In Hodenbiopsien von infertilen Männern konnten eine erhöhte Anzahl Mastzellen, die Chymase exprimieren, in der Wand der Samenkanälchen gefunden werden. Im Gegensatz dazu waren im Hoden von fertilen Männer kaum Chymase positive Mastzellen vorhanden.

Testikuläre Entzündungsgeschehen könnten Prozessen verstärken, welche zu verminderter Spermatogenese führen. Therapeutische Ansatzpunkte sind möglicherweise bei Mastzellen, Chymase und dem Angiotensin-1-Rezeptor zu finden.

Publikation: Welter H, Huber A, Lauf S, Einwang D, **Mayer C**, Schwarzer JU, Köhn FM, Mayerhofer A. *Angiotensin II regulates testicular peritubular cell function via AT1 receptor: a specific situation in male infertility*. Mol Cell Endocrinol. 2014 Aug 5;393(1-2):171-8.

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Albrecht, M. et al. 2006. Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **91**(5),pp.1956–1960.
- Almeida, J. et al. 2012. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. *Theriogenology*. **77**(5),pp.847–857.
- Apa, D.D. et al. 2002. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Archives of Andrology*. **48**(5),pp.337–344.
- Balhara, J. et al. 2013. Pentraxin 3: an immuno-regulator in the lungs. *Frontiers in Immunology*. **4**,p.127.
- Bardin, C.W. et al. 1970. Pseudohermaphrodite rat: end organ insensitivity to testosterone. *Science (New York, N. Y.)*. **167**(3921),pp.1136–1137.
- Baruah, P. et al. 2006. The pattern recognition receptor PTX3 is recruited at the synapse between dying and dendritic cells, and edits the cross-presentation of self, viral, and tumor antigens. *Blood*. **107**(1),pp.151–158.
- Bhushan, S. et al. 2009. Testicular innate immune defense against bacteria. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **306**(1–2),pp.37–44.
- Bhushan, S. et al. 2008. Uropathogenic Escherichia coli block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. **180**(8),pp.5537–5547.
- Bilinska, B. et al. 2005. Immunoexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1040**,pp.227–229.
- Burnstein, K.L. 2005. Regulation of androgen receptor levels: Implications for prostate cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. **95**(4),pp.657–669.
- Chang, C. et al. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(18),pp.6876–6881.
- Chen, Q. et al. 2014. Toll-like receptor 11-initiated innate immune response in male mouse germ cells. *Biology of Reproduction*. **90**(2),p.38.
- Chotimanukul, S. and Sirivaidyapong, S. 2011. Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. *Theriogenology*. **76**(6),pp.1152–1161.
- Coffey, K. and Robson, C.N. 2012. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *The Journal of Endocrinology*. **215**(2),pp.221–237.
- Davidoff, M.S. et al. 1990. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell and Tissue Research*. **262**(2),pp.253–261.
- Deshmane, S.L. et al. 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. **29**(6),pp.313–326.

- Doni, A. et al. 2009. The long pentraxin 3 is a soluble and cell-associated component of the human semen. *International Journal of Andrology*. **32**(3),pp.255–264.
- Drengler, S.M. et al. 1996. Regulation of androgen receptor mRNA expression in hamster facial motoneurons: differential effects of non-aromatizable and aromatizable androgens. *Brain Research. Molecular Brain Research*. **41**(1-2),pp.8–15.
- Flenkenthaler, F. et al. 2014. Secretome analysis of testicular peritubular cells: a window into the human testicular microenvironment and the spermatogonial stem cell niche in man. *Journal of Proteome Research*. **13**(3),pp.1259–1269.
- Garlanda, C. et al. 2002. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. **420**(6912),pp.182–186.
- De Gendt, K. et al. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(5),pp.1327–1332.
- Goericke-Pesch, S. et al. 2013. Status of the down-regulated canine testis using two different GnRH agonist implants in comparison with the juvenile testis. *Reproduction (Cambridge, England)*. **146**(6),pp.517–526.
- Golden, K.L. et al. 2002. Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. *Endocrine*. **19**(3),pp.339–344.
- Guazzone, V.A. et al. 2003. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology*. **60**(2),pp.143–157.
- Günther, J. et al. 2011. Comparative kinetics of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that S. aureus elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity*. **79**(2),pp.695–707.
- Haider, S.G. et al. 1999. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue & Cell*. **31**(1),pp.90–98.
- Hansen, S. et al. 2014. A comparison of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in equine bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **158**(3-4),pp.238–243.
- Hargrove, J.L. et al. 1977. Testicular contractile cells and sperm transport. *Fertility and Sterility*. **28**(11),pp.1146–1157.
- Hashimoto, J. et al. 1988. Increased mast cells in the limiting membrane of seminiferous tubules in testes of patients with idiopathic infertility. *Urologia Internationalis*. **43**(3),pp.129–132.
- Hussein, M.R. et al. 2005. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility*. **83**(5),pp.1447–1453.
- Iosub, R. et al. 2006. Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *The Journal of Pathology*. **208**(5),pp.686–698.

- Isayama, N. et al. 2013. Comparison of vascular smooth muscle cells in canine great vessels. *BMC veterinary research*. **9**,p.54.
- Izumi, K. et al. 2013. Androgen receptor roles in the development of benign prostate hyperplasia. *The American Journal of Pathology*. **182**(6),pp.1942–1949.
- Jiang, X.-H. et al. 2014. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian Journal of Andrology*. **16**(4),pp.572–580.
- Johnston, D.S. et al. 2001. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*. **142**(6),pp.2405–2408.
- Jones, S.A. 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology*. **175**(6),pp.3463–3468.
- Junqueira, L.C.U. et al. 2004. *Histologie*. Springer.
- Kawai, T. and Akira, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*. **13**(5),pp.816–825.
- Kicman, A.T. 2008. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*. **154**(3),pp.502–521.
- Koryakina, Y. et al. 2014. Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocrine-Related Cancer*. **21**(4),pp.T131–145.
- De Kretser, D.M. and Phillips, D.J. 1998. Mechanisms of protein feedback on gonadotropin secretion. *Journal of Reproductive Immunology*. **39**(1-2),pp.1–12.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259),pp.680–685.
- Lean, F.Z.X. et al. 2014. Expression of β -catenin and mesenchymal markers in canine prostatic hyperplasia and carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*. **150**(4),pp.373–381.
- Li, X. et al. 2006. Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology*. **147**(3),pp.1271–1277.
- Lopes, R.A.M. et al. 2012. Testosterone and vascular function in aging. *Frontiers in Physiology*. **3**,p.89.
- Lowry, O.H. et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. **193**(1),pp.265–275.
- Lu, B. et al. 2001. Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **226**(1-2),pp.129–140.
- Lyon, M.F. and Hawkes, S.G. 1970. X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature*. **227**(5264),pp.1217–1219.
- Maekawa, M. et al. 1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*. **59**(1),pp.1–13.

- Magnanti, M. et al. 2001. Integrin pattern and effect on contraction in cultured testicular peritubular myoid cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. **45**(1),pp.21–27.
- Martín de las Mulas, J. et al. 2004. Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*. **2**(1),pp.24–35.
- Mason, J.I. et al. 2004. Promiscuous 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases: testosterone 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities of mouse type I and VI 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Research*. **30**(4),pp.709–714.
- Mayerhofer, A. 2013. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction*. **145**(5),pp.R107–R116.
- Meyers-Wallen, V.N. et al. 1989. Testicular feminization in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **195**(5),pp.631–634.
- Michailidis, G. et al. 2014. Activation of innate immune system in response to lipopolysaccharide in chicken Sertoli cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. **148**(3),pp.259–270.
- Mills, I.G. 2014. Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nature Reviews. Cancer*. **14**(3),pp.187–198.
- Nagai, T. et al. 1992. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility*. **57**(6),pp.1331–1336.
- Namiki, M. et al. 1991. Evidence for the presence of androgen receptors in human Leydig cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **38**(1),pp.79–82.
- Nieschlag, E. et al. 2009. *Andrologie*. Springer-Verlag.
- Nishimura, M. and Naito, S. 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **28**(5),pp.886–892.
- Palombi, F. et al. 2002. Cell-cell interactions in the local control of seminiferous tubule contractility. *Contraception*. **65**(4),pp.289–291.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. **29**(9),p.e45.
- Poltorak, A. et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*. **282**(5396),pp.2085–2088.
- Quigley, C.A. et al. 1995. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews*. **16**(3),pp.271–321.
- Rasotto, R. et al. 2014. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial Basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *Journal of Comparative Pathology*. **151**(2-3),pp.166–180.
- Roaiha, M.M.F. et al. 2007. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia*. **39**(5),pp.185–189.

- Romano, F. et al. 2005. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception*. **72**(4),pp.294–297.
- Schell, C. et al. 2010. 15-Deoxy-delta 12-14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: implications for human male fertility. *Endocrinology*. **151**(3),pp.1257–1268.
- Schell, C. et al. 2008. Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. **149**(4),pp.1678–1686.
- Schlatt, S. et al. 1993. Appearance of α -Smooth Muscle Actin in Peritubular Cells of Monkey Testes Is Induced by Androgens, Modulated by Follicle-Stimulating Hormone, and Maintained after Hormonal Withdrawal. *Journal of Andrology*. **14**(5),pp.340–350.
- Schlatt, S. et al. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*. **137**(2),pp.107–117.
- Schultz, M.G. 1962. Male pseudohermaphroditism diagnosed with aid of sex chromatin technique. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **140**,pp.241–244.
- Shang, T. et al. 2011. Toll-like receptor-initiated testicular innate immune responses in mouse Leydig cells. *Endocrinology*. **152**(7),pp.2827–2836.
- Spinnler, K. et al. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction (Oxford, England)*. **25**(9),pp.2181–2187.
- Takeda, H. et al. 1991. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **177**(1),pp.488–496.
- Takeuchi, K. 1992. Calponin in bovine aorta smooth muscle. *Japanese Journal of Pharmacology*. **58 Suppl 2**,p.264P.
- Takeuchi, M. et al. 1994. Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **204**(2),pp.905–911.
- Tindall, D. and Lonergan, P. 2011. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*. **10**(1),p.20.
- Volkman, J. et al. 2011. Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Human Reproduction*. **26**(6),pp.1450–1461.
- Wang, R.-S. et al. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*. **30**(2),pp.119–132.
- Welsh, M. et al. 2009. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal*. **23**(12),pp.4218–4230.

- Welter, H. et al. 2014. Angiotensin II regulates testicular peritubular cell function via AT1 receptor: A specific situation in male infertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **393**(1-2),pp.171–178.
- Welter, H. et al. 2013. Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology*. **1**(2),pp.318–324.
- Winnall, W.R. et al. 2011. Differential responses of epithelial Sertoli cells of the rat testis to Toll-like receptor 2 and 4 ligands: implications for studies of testicular inflammation using bacterial lipopolysaccharides. *Innate Immunity*. **17**(2),pp.123–136.
- Wiren, K.M. et al. 1997. Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells. *Endocrinology*. **138**(6),pp.2291–2300.
- Wright, A.S. et al. 1996. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *The Journal of Clinical Investigation*. **98**(11),pp.2558–2563.
- Wu, H. et al. 2008. Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology*. **149**(9),pp.4402–4412.
- Yang, W. et al. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology*. **45**(5),pp.1385–1397.
- Zhang, C. et al. 2006. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(47),pp.17718–17723.
- Zhang, X.-H. et al. 2011. Update on corpus cavernosum smooth muscle contractile pathways in erectile function: a role for testosterone? *The Journal of Sexual Medicine*. **8**(7),pp.1865–1879.

9. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Artur Mayerhofer für die Möglichkeit der Promotion am Lehrstuhl für Anatomie III im Institut für Zellbiologie bedanken. Dabei muss ich die konstante Unterstützung, das produktive Miteinander und die angenehmen Rahmenbedingungen betonen, durch welche man einer wissenschaftlichen Laufbahn fast nicht entkommen kann.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Christiane Otzdorff von der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik und Pferdeklinik der LMU München für die fruchtbare Kooperation über das Reozentrum München und vor allem für die Bereitstellung der Tierhodenproben.

Des Weiteren gilt mein spezieller Dank Herrn Dr. Harald Welter für die stetigen und hilfreichen Verbesserungsvorschläge. Ein großes Dankeschön an das fantastische TA-Team Kim Dietrich, Stefanie Gruschka, Daniel Einwang und vor allem Astrid Tiefenbacher. Vielen Dank an meine schicksalsteilenden Doktoranden und Kollegen Steffi Windschüttl, Jan Blohberger, Dr. Verónica Rey, Sabine Ströbl, Karin Metzrath, Fraziska Sandner und Kerstin Schubert: Happy LÄB!!!

Merci an meine Blitzkorrekturleseecousinen Agnes und Dorothea Berg!

Für den zeitlebens unabänderlichen und unbeirrbaren Beistand danke ich meiner Lieblingsfreundin Steffi Zellinger.

Der innigste Dank gilt denen, die mich ernährt, gepflegt und gestützt haben:

Meinen Eltern. Ihr seid die besten Sertolizellen, die ich mir hätte wünschen können. Aber wie jeder weiß, ist man längst noch nicht fertig, wenn man das Keimepithel erst einmal verlassen hat. Ohne dich, Basti, würde ich mich nicht mehr weiterentwickeln und wäre längst irgendwo in den Weiten des Lumens hängen geblieben. Bis zum heutigen Kenntnisstand habe ich in der Literatur keine Zelle gefunden, die solch außergewöhnliche Fähigkeiten zeigt und die vor allem für mich (und diese Arbeit) so essentiell (war) ist und bleibt: Danke!

Für die wahrscheinlich selbstloseste Hilfe muss ich mich zum Schluss noch kurz bei meinem Hund Doggi bedanken. Er verzichtete, ich denke freiwillig, auf freiverfügbare Wiesen, auf kilometerlange Gassigänge in unberührter Natur, auf Nachbars Katzen und hat mich in der großen Stadt mit einer täglichen Selbstverständlichkeit an den Schreibtisch begleitet, wie dies nur die Spezies *Canis lupus familiaris* zu tun vermag.

10. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten:

- Welter H, Huber A, Lauf S, Einwang D, **Mayer C**, Schwarzer JU, Köhn FM, Mayerhofer A. *Angiotensin II regulates testicular peritubular cell function via AT1 receptor: a specific situation in male infertility*. Mol Cell Endocrinol. 2014 Aug 5;393(1-2):171-8.
- Schell C, Albrecht M, Spillner S, **Mayer C**, Kunz L, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. *15-Deoxy-delta 12-14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: implications for human male fertility*. Endocrinology. 2010 Mar;151(3):1257-68.
- Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, **Mayer C**, Mayerhofer A, Ojeda SR. *Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans*. Endocrinology. 2009 Jun;150(6):2906-14.
- Schell C, Albrecht M, **Mayer C**, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A. *Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha*. Endocrinology. 2008 Apr;149(4):1678-86.

Poster/ Kongressbeiträge:

- **Mayer C**, Welter H, Adam M, Strauss L, Köhn FM, Schwarzer JU, Poutanen M, Mayerhofer A: „Human testicular peritubular cells express functional TLRs: A role in male infertility?“ European Testis Workshop, Dänemark, 13. - 17.5. 2014
- Welter H, Huber A, Lauf S, **Mayer C**, Einwang D, Schwarzer JU, Köhn FM, Mayerhofer A. „Angiotensin (Ang) II regulates human testicular peritubular cell (HTPC) functions via Ang1 receptor (AT1R).“ ESHRE Meeting, München, 29.6. - 2.7.2014