

**Neurotrophe Faktoren
in humanen testikulären peritubulären Zellen:
Einfluss von Mastzellprodukten**

Katrin Spinnler



Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München 2011

Neurotrophe Faktoren in humanen testikulären peritubulären Zellen:
Einfluss von Mastzellprodukten

Diese Dissertation wurde angefertigt
unter der Leitung von Prof. Dr. Artur Mayerhofer
am Institut für Zellbiologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Erstgutachter: PD Dr. Lars Kunz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Tag der Abgabe: 28.04.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2011

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit allein und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

München, den 28.06.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
BILDVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Morphologie des Hodens.....	1
1.1.1 Aufbau des Hodens.....	1
1.1.2 Regulation der spermatogonialen Stammzellen (SSZ).....	3
1.1.3 Peritubuläres Kompartiment des Hodens	5
1.1.4 Veränderungen des peritubulären Kompartiments von Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese	7
1.2 Interaktion der testikulären peritubulären Zellen mit Mastzellen.....	10
1.2.1 Tryptase	11
1.2.2 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	17
1.3 Rolle von Neurotrophenen im Hoden	20
1.3.1 Nervenwachstumsfaktor (NGF).....	21
1.3.2 Glial cell line derived neurotrophic Factor (GDNF).....	27
1.4 Ziele der Arbeit	31
2 MATERIAL UND METHODEN.....	33

2.1 Material.....	33
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	43
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	55
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	66
2.2.4 Radioimmunassay (RIA).....	73
2.2.5 Statistik.....	74
3 ERGEBNISSE.....	75
3.1 Expression von neurotrophen Faktoren durch HTPCs und HTPC-Fs	75
3.2 HTPCs und HTPC-Fs sind mögliche Zielzellen für Mastzelltryptase	77
3.2.1 Molekularbiologische Charakterisierung.....	77
3.2.2 Nachweis des Tryptase Rezeptors (PAR-2) mittels Immunfluoreszenz.....	78
3.2.3 Funktionalität des PAR-2 Rezeptors bei HTPCs und HTPC- Fs.....	78
3.3 Modulation des proNGF/NGF Mikromilieus durch Mastzelltryptase	80
3.3.1 HTPCs und HTPC-Fs produzieren NGF.....	80
3.3.2 Sezerniertes NGF von HTPCs und HTPC-Fs ist funktionell	81
3.3.3 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die NGF-Sekretion von HTPCs und HTPC-Fs.....	82
3.3.4 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die Vitalität.....	83
3.3.5 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die Expression von NGF	84
3.4 Detektion von NGF und proNGF in Zellen und ihrem Überstand	85
3.4.1 Nachweis von NGF und proNGF mittels Immunfluoreszenz ...	85

3.4.2 Nachweis von NGF und proNGF in Zelllysaten und - überständen mittels Western Blot	86
3.5 Tryptase schneidet proNGF	87
3.5.1 Nachweis der Spaltung von natürlichem proNGF durch Tryptase	87
3.5.2 Nachweis der Spaltung von synthetischem proNGF durch Tryptase	88
3.5.3 Charakterisierung der Schnittstellen von humanem proNGF ..	89
3.6 HTPC/-Fs tragen möglicherweise zur Stammzellnische bei	90
3.6.1 Detektion und Lokalisation von GFR- α 1 im humanen Hoden .	90
3.6.2 Identifizierung von GDNF in Kompartimenten des humanen Hodens.....	92
3.7 Einfluss von Mastzellprodukten auf die Sekretion von GDNF durch HTPC/-Fs	94
3.7.1 Expression von GDNF durch kultivierte HTPCs und HTPC-Fs	94
3.7.2 Sekretion von GDNF durch HTPCs und HTPC-Fs	94
3.7.3 Expression der Rezeptoren für TNF- α durch HTPCs und HTPC-Fs	95
3.7.4 Die Mastzellprodukte Tryptase und TNF- α beeinflussen nicht die GDNF-Sekretion von HTPCs und HTPC-Fs.....	96
4 DISKUSSION.....	98
4.1 Die peritubuläre Region und deren Bedeutung im Hoden	98
4.2 Wechselwirkung der Mastzelltryptase mit humanen testikulären peritubulären Zellen.....	100
4.3 Neuroimmunologische Rolle von Mastzelltryptase im Hoden.....	102
4.4 Enzymatische Aktivität von Tryptase auf proNGF und deren mögliche Auswirkung.....	104

4.5 Rolle von NGF im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen und dessen Funktion im Hoden	106
4.6 Möglicher Beitrag von humanen peritubulären Zellen zur Stammzellnische	109
4.7 Lokalisierung von GDNF im Hoden	111
4.8 Lokalisation der Zielzellen für GDNF	113
5 ZUSAMMENFASSUNG	115
6 WEITERE PROJEKTE WÄHREND DER DOKTORARBEIT.....	118
6.1 Der Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanal (BK_{Ca}) von Leydigzellen ist in die Testosteronproduktion involviert.....	118
6.2 Testikuläre peritubuläre Zellen und Steroide	119
7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	120
8 DANKSAGUNG	133
9 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	134

Bildverzeichnis

Bild 1: Übersicht des Keimepithels der Samenkanälchen.	3
Bild 2: Akkumulation von Mastzellen in Hodenbiopsien infertiler Patienten.	9
Bild 3: Struktur des Tryptase-Tetramers.	12
Bild 4: Aktivierung des PAR-2 durch Tryptase und SLIGKV.	14
Bild 5: Primärstruktur von humanem Prä-Pro-NGF.	23
Bild 6: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe für NGF und proNGF.	26
Bild 7: Modell der Selbsterneuerung von humanen SSZ durch GDNF.	30
Bild 8: mRNA Expression neurotropher Faktoren in HTPCs und HTPC-Fs.	76
Bild 9: Nachweis der mRNA Expression von PAR-2.	78
Bild 10: Nachweis des PAR-2 Rezeptors in immunzytochemischen Versuchen bei HTPCs und HTPC-Fs.	78
Bild 11: Tryptase und SLIGKV führen zu deutlich erhöhten Ca ²⁺ -Spiegeln bei HTPCs und HTPC-Fs.	80
Bild 12: Akkumulation von NGF im Medium als Maß der Sekretion durch HTPCs und HTPC-Fs.	81
Bild 13: Nachweis der Funktionalität von sezerniertem NGF.	82
Bild 14: Tryptase erhöht dosisabhängig die Menge von sezerniertem NGF.	83
Bild 15: Tryptase und SLIGKV haben keinen Einfluss auf die Vitalität von HTPC/-Fs.	84
Bild 16: Die mRNA Expression von NGF wird nicht durch Tryptase oder SLIGKV reguliert.	85
Bild 17: Nachweis von NGF und proNGF in immunzytochemischen Versuchen.	86
Bild 18: Nachweis von NGF und proNGF in Zellüberständen (Ü) und Zelllysaten (L).	87
Bild 19: Die immunreaktive proNGF-Bande wird durch Tryptase geschwächt.	88
Bild 20: Die immunreaktive Bande von proNGF wurde durch aktive Tryptase vermindert.	89
Bild 21: Darstellung der Aminosäuresequenz von proNGF.	90
Bild 22: Expression von GFR- α 1 im humanen Hoden.	91
Bild 23: Lokalisation von GFR- α 1 im humanen Hoden.	92
Bild 24: Identifikation von GDNF mRNA in einzelnen Regionen des humanen Hodens.	93
Bild 25: Expression von GDNF durch HTPCs und HTPC-Fs.	94
Bild 26: ELISA Messungen der GDNF-Sekretion durch HTPCs und HTPC-Fs.	95
Bild 27: Nachweis der mRNA Expression von TNFR1 und TNFR2.	96
Bild 28: Die GDNF-Sekretion wird weder durch Tryptase noch durch TNF- α reguliert.	97

Bild 29: Wechselwirkung von peritubulären Zellen mit Mastzellen und SSZ..... 100
Bild 30: Beitrag von Sertolizellen und peritubulärer Zellen zur Stammzellnische..... 110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologische Prozesse im Zusammenhang mit Tryptase.....	16
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.....	33
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits.....	36
Tabelle 5: Liste der verwendeten Reagenzien.....	36
Tabelle 6: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	38
Tabelle 7: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien.....	41
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer.....	41
Tabelle 9: Liste der verwendeten Primärantikörper.....	43
Tabelle 10: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	43
Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl.....	60
Tabelle 12: Temperaturprofil der PCR im Thermal Cycler.....	60
Tabelle 13: Mastermix für die Realtime PCR von NGF.....	64
Tabelle 14: Temperaturprofil der qRT-PCR im Engine Opticon system.....	64
Tabelle 15: Temperaturprofil für L19.....	65
Tabelle 16: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	68

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl6b	B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
bzw	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASY	Cell Counter and Analyzer System
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
Cp	Crossing-Point
cpm	Counts per Minute
c-Ret	Rearranged in transformation
CSF	Cytokine colony-stimulating factor
DAB	Diaminobenzidin
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>Etv5</i>	<i>Ets variant 5</i>
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm

GDNF	Glial cell line derived Neurotrophic Factor
GFR	GDNF-family-receptor
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCG	humanes Choriongonadotropin
HMMK	High molecular-Mass Kinogen
HRP	Horse radish peroxidase
HTPC	human testicular peritubular cells
IbTx	Iberitoxin
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IgE	Immunglobulin E, Immunglobulin E
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IZC	Immunzytochemie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LH	luteinisierendes Hormon
<i>Lhx1</i>	<i>LIM homeobox 1</i>
LIF	Leukemia-Inhibitory-Factor
LMD	Lasermikrodissektion
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
MYH	Myosin-Heavy-Chain
NFκB	Nuclear Factor κ of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NT	Neurotrophin
P	Prolin
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin-Rezeptor
pAb	polyklonaler Antikörper
PACE	Protein from Archaea Conserved in Eukarya
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
pg	Pikogramm
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Plzf	Promyelocytic leukemia zinc-finger
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
R	Arginin
Ras	Rat sarcoma
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROI	Regions of interest
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFK	Src family kinase
SMA	Smooth Muscle Actin
SSZ	spermatogoniale Stammzelle
TACE	Tumor necrosis factor- α converting enzyme
Taf	TATA box binding protein-associated factor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-associated Death domain
Trk	Tropomyosin-related Kinase

V	Volt
v. a.....	vor allem
VCAM.....	Vascular Cell Adhesion Molecule
WB.....	Western Blot
µl.....	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Morphologie des Hodens

1.1.1 Aufbau des Hodens

Die Hauptaufgaben der Hoden bestehen in der Produktion von Spermatozoen sowie der Synthese und Sekretion von Testosteron. Diese beiden Prozesse spielen sich in voneinander getrennten Kompartimenten ab. Während die Spermatogenese in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) abläuft, findet die Steroidsynthese im Interstitium, dem Zwischenraum der Samenkanälchen, statt (1,2).

Im Interstitium befinden sich Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern, Mastzellen, Makrophagen und Monozyten sowie die Leydigzellen. Diese produzieren Testosteron und differenzieren sich aus Zellen des Interstitiums unter Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH).

Das tubuläre Kompartiment ist von einer Wand umgeben, welche aus einer Basalmembran und den peritubulären Zellen besteht (3). Diese Zellen, welche artspezifisch eine Schicht von 1 - 7 konzentrischen Lagen um den Tubulus bilden, weisen kontraktile Eigenschaften auf, wobei ihre koordinierten Kontraktionen zu einer präpulsiven Welle entlang des Samenkanälchens führen, so dass im Tubuluslumen ein Transport der Spermien und der tubulären Flüssigkeit zum Rete testis erfolgen kann (4). Außerdem sind peritubuläre Zellen in der Lage Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) zu synthetisieren und sezernieren, worauf im Abschnitt 1.1.3 noch genauer eingegangen wird.

Der peritubulären Wand sitzen in den Tubuli die Sertolizellen auf, deren tight junctions die Blut-Hoden-Schranke bilden. Zwischen den bis zum Lumen der Tubuli reichenden Sertolizellen liegen die Keimzellen in verschiedenen Stufen ihrer Reifung. Die Sertolizellen besitzen für die heranreifenden Samenzellen eine Stütz- und Nährfunktion und werden durch das Follikel stimulierende Hormon (FSH) reguliert.

Die verschiedenen Vorstufen der Keimzellen sind im Keimepithel angeordnet. Am äußersten Rand liegen die Spermatogonien, welche sich in Spermatozyten, runde und elongierte Spermatiden und letztendlich zu Spermatozoen differenzieren. Bei der Spermatogenese, welche in drei Schritten abläuft, entwickeln sich die Spermatozoen aus den Spermatogonien. Zunächst proliferieren die Spermatogonien und es entstehen primäre Spermatozyten. Diese treten in die Meiose ein, wobei ihr Chromosomensatz halbiert wird. Diese Zellgruppen werden durch die tight junctions der Sertolizellen räumlich von einander getrennt. Im letzten Schritt differenzieren die Keimzellen zu Spermatozoen. Dieser letzte Schritt der Spermatogenese wird auch als Spermiogenese bezeichnet (Bild 1).

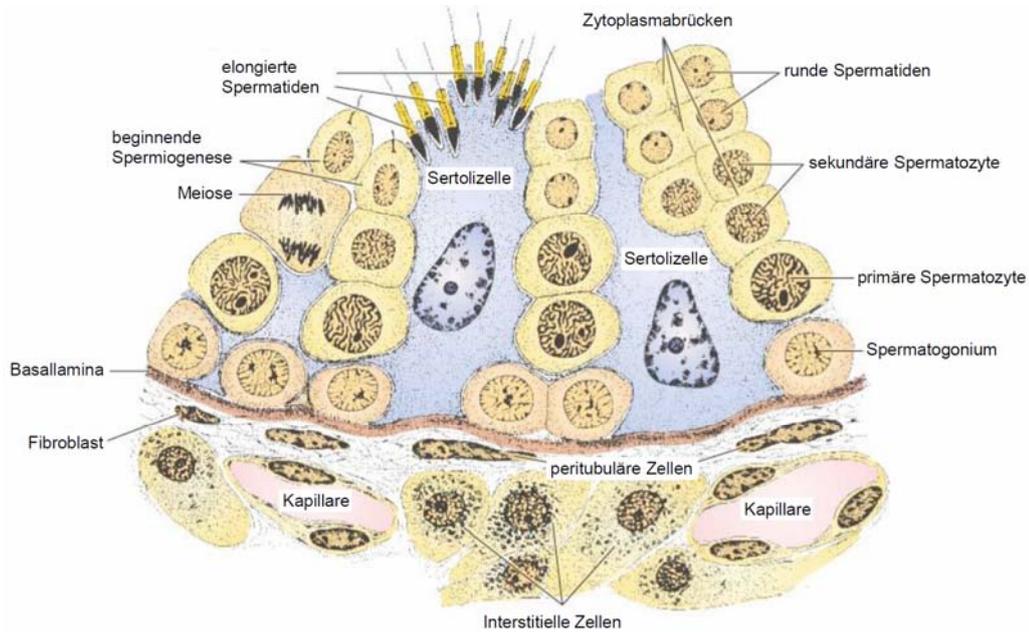


Bild 1: Übersicht des Keimepithels der Samenkanälchen.

Das Keimepithel wird durch die Sertolizellen gebildet und beherbergt die heranreifenden Keimzellen. Auf Grund der einschichtigen peritubulären Wand ist dies vermutlich eine Skizze des Keimepithels von Nagern. Verändert nach (5).

Der Aufbau des Hodens sowie der Ablauf der Spermatogenese weisen beim Nager im Vergleich zum Menschen räumliche und zeitliche Unterschiede auf. Auf Grund der in der bisherigen Forschung detaillierten Untersuchung des Hodens von Nagern (Maus, Ratte) werden im Folgenden, wenn nicht explizit erwähnt, die Situation im testikulären Milieu dieser Labortiere beschrieben. Der Hodenaufbau dieser Tiere ist sehr ähnlich, jedoch bleibt zu beachten, dass sich Maus und Ratte in der Anzahl der Stadien der Spermatogenese unterscheiden. Während sich die Spermatogenese der Maus in 14 Stadien unterteilen lässt, gibt es bei der Ratte zwei weniger.

1.1.2 Regulation der spermatogonialen Stammzellen (SSZ)

Die Spermatogenese beginnt in der basalen Region des Keimepithels mit den mitotischen Zellteilungen der Spermato-gonien, welche entsprechend

ihres Differenzierungsstadiums klassifiziert werden. Im humanen System werden spermatogoniale Stammzellen (SSZ) in A_{dark} -Spermatogonien, welche keine oder nur sehr geringe Proliferationsaktivität zeigen (6) und die teilungsaktiven A_{pale} -Spermatogonien klassifiziert. Aus A_{pale} -Spermatogonien entstehen durch Proliferation und Differenzierung eine große Anzahl von B-Spermatogonien (7), aus welchen sich nach mitotischer Teilung die primären Spermatozyten entwickeln.

Die Selbsterneuerung und Differenzierung von spermatogonialen Stammzellen wird über verschiedene Faktoren reguliert. Das spezifische Mikromilieu, welches zur Kontrolle der SSZ nötig ist, wird als Stammzellnische bezeichnet (8-10). Der von Maus-Sertolizellen sezernierte Glial cell line derived Neurotrophic Factor (GDNF) ist bisher der einzig bekannte parakrine Faktor, welcher *in vivo* und *in vitro* für die Aufrechterhaltung und Selbsterneuerung von SSZ verantwortlich ist (11-14), während die Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 und Epidermal Growth Factor (EGF) zwar *in vitro* die Proliferation von SSZ fördern (12), die *in vivo* Situation jedoch noch nicht aufgeklärt ist. Bei Mäusen ist die Expression von GDNF durch Sertolizellen und folglich die Proliferation von SSZ abhängig von FSH (15). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die GDNF-Produktion durch Sertolizellen von FGF-2, Tumor necrosis factor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 β reguliert werden kann (16).

GDNF wiederum aktiviert die Expression der Transkriptionsfaktor-Gene B-cell CLL/lymphoma 6 member B (*Bcl6b*), Ets variant 5 (*Etv5*) und LIM homeobox (*Lhx*)-1, welche Einfluss auf die Selbsterneuerung von SSZ haben (17). Des Weiteren sind die GDNF-unabhängigen Transkriptionsfaktoren Promyelocytic leukemia zinc-finger (Plzf) und TATA box binding protein-associated factor (Taf)-4b an der Selbsterneuerung von SSZ beteiligt (7,17).

Es wird vermutet, dass neben Sertolizellen auch Leydigzellen und peritubuläre Zellen durch Produktion des Cytokine colony-stimulating factor (CSF)-1 Einfluss auf die Selbsterneuerung von SSZ haben (17). Es ist jedoch zu beachten, dass die meisten Studien an Labornagern oder *in vitro* durchgeführt wurden und es fraglich bleibt, in wie weit sich diese Befunde auf das humane System übertragen lassen.

Da sich diese Arbeit mit der Regulation und parakrinen Wirkung von humanen testikulären peritubulären Zellen befasst, werden diese im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

1.1.3 Peritubuläres Kompartiment des Hodens

Die Tubuli seminiferi des Hodens sind von peritubulären Zellen umgeben. Sie haben eine polygonale Form mit ausgestrecktem Zytoplasma und bilden in Kultur flache Monolayer (18). Die Anzahl der Peritubulärzellschichten ist artspezifisch variabel. Dieser Zelltyp ist bislang hauptsächlich an Labornagern (Maus, Ratte, Hamster) untersucht worden, bei welchen nur eine Zellschicht zu finden ist, während beim Menschen 5 - 7 Schichten vorhanden sind (4,19-27). Humane peritubuläre Zellen exprimieren die typischen Glattmuskel- und Fibroblasten Zellmarker wie CD90/Thy-1, CD34, Smooth Muscle Actin (SMA), Myosin-Heavy-Chain (MYH)-11 und Calponin, wobei die myoiden Zellen, welche direkt am Keimepithel liegen, sich als Desmin und Vimentin positiv auszeichnen, während die nicht-myoiden Zellen, welche die myoiden Zellen umgeben, nur Vimentin exprimieren (19,28-32). Daraus lässt sich schließen, dass die äußeren Schichten vorwiegend von Fibroblasten gebildet werden (30).

Es wird angenommen, dass die peritubulären Zellen einen kontraktilen Ring um die Samenkanälchen bilden (33) und den Transport der reifen, aber noch immotilen Spermien und der testikulären Flüssigkeit durch peristaltische Kontraktionen und die dadurch entstehenden präpulsiven Wellen fördern (4,22,28,34). In einem knock-out Maus-Modell wurde in

einer aktuellen Studie die Bedeutung der Regulation der Kontraktionsfähigkeit von peritubulären Zellen für die männliche Fertilität nachgewiesen. Bei beeinträchtigter Kontraktilität dieser Zellen weisen die Tiere eine progrediente Sub- oder Infertilität mit verringerter Spermienzahl auf (4,22). Die Kontraktionen werden durch verschiedene Substanzen wie den Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) und Endothelin-1 in endokriner, parakriner und autokriner Weise beeinflusst (28,35-39).

Neben ihrer kontraktilen Funktion besitzen peritubuläre Zellen auch sekretorische Eigenschaften. An peritubulären Zellen der Ratte konnte die Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten wie Laminin, Kollagen Typ I und IV, Fibronektinen, Proteoglykanen (28,40,41) sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie Leukemia-Inhibitory-Factor (LIF), TGF- β , Aktivin-A, Insulin-like-Growth-Factor-(IGF)-1 und Erythropoetin gezeigt werden (28,42-47). Einige dieser Faktoren nehmen Einfluss auf andere benachbarte Zellen wie zum Beispiel die Sertolizellen (45), wodurch die Peritubulärzellen nicht nur für die Integrität der tubulären Struktur, sondern auch bei anderen Hodenfunktionen wie der Regulation der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielen. Hierzu ist der sekretorische Faktor PmodS (Peritubular Factor modifying Sertoli cells) hervorzuheben, welcher in der Ratte eine starke Expression von Transferrin durch Sertolizellen induziert und somit an deren Differenzierung beteiligt zu sein scheint (42). Da sich bei PmodS keine eindeutige Signalkaskade identifizieren ließ, ist anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um einen einzelnen Faktor, sondern um einen Cocktail mehrerer Signalmoleküle handelt (48-50). Es ist hierbei anzumerken, dass diese Untersuchungen vornehmlich an der Ratte durchgeführt wurden und weitere Experimente nötig sind, um herauszufinden, in wie weit sich diese Ergebnisse auf das humane testikuläre System übertragen lassen.

Einblicke in das sekretorische Profil humaner peritubulärer Zellen lieferte eine kürzlich veröffentlichte Studie, welche die Produktion des Nervenwachstumsfaktors (NGF), des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und des inflammatorischen Moleküls IL-6 beschrieb. Diese parakrinen Faktoren könnten durch das typische Mastzellprodukt TNF- α reguliert werden und über die vermehrte Produktion von MCP-1, Migration und Chemotaxis von Immunzellen sowie die Kollagensynthese verstärken (51). Beide Vorgänge stehen im Zusammenhang mit fibrotischen testikulären Prozessen, welche im Abschnitt 1.1.4 genauer erklärt werden. Im Falle des pleiotropen Wachstumsfaktor NGF könnte TNF- α proliferatorische Prozesse, sowohl von peritubulären Zellen als auch von Neuronen fördern, was zur Innervierung und Einwanderung von Immunzellen in das peritubuläre Kompartiment von infertilen Patienten beitragen könnte. Dabei ist zu beachten, dass in Hoden von Männern mit gestörter Spermatogenese eine erhöhte Anzahl von Nervenfasern und Immunzellen innerhalb des peritubulären Kompartiments zu verzeichnen ist (20).

1.1.4 Veränderungen des peritubulären Kompartiments von Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese

Bei Männern mit Störung der Spermatogenese wurde eine fibrotische Verdickung der peritubulären Region beschrieben (30,52-55). Bei einer Fibrose handelt es sich um eine krankhafte Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix. Bei Patienten mit pathologisch veränderter peritubulärer Region war die Lokalisation von Proteinen der Basalmembran wie Kollagen IV, Fibronectin oder Laminin nicht verändert, jedoch konnte eine verringerte Expression von Desmin sowie anderer Kontraktionsmarker durch die peritubulären Zellen festgestellt werden. Darauf hin wurde vermutet, dass sich diese Zellen zu hochaktiven Fibroblasten entwickeln, welche Komponenten der extrazellulären Matrix sezernieren, die sich zwischen die einzelnen peritubulären Schichten ablagern (30,56).

Ähnliche Befunde konnten auch bei Patienten mit Varikozele festgestellt werden, bei denen in Folge eines venösen Rückstaus die Tubuli stark sklerotisiert sind und einen verringerten Durchmesser aufweisen. Bei diesem Krankheitsbild ist die Lamina propria und die Basalmembran durch Kollagenablagerungen verdickt. Jedoch ist neben einer Abnahme der Desmin-Expression ein Anstieg von Vimentin-positiven peritubulären Zellen bei fortschreitender Sklerosierung beschrieben (57,58). Patienten mit altersbedingter Atrophie oder idiopathischer Infertilität weisen ähnliche phänotypische Veränderungen der peritubulären Zellen auf (52,53,59). Auch die Morphologie der peritubulären Zellen scheint bei Patienten mit Fertilitätsstörungen verändert zu sein. Neben einem Polaritäts- und Konfigurationsverlust der Zellen konnte eine Vakuolisierung und Fragmentierung des Zellkerns beobachtet werden. Außerdem bildeten sich übermäßig viele Phagolysosomen und Lipidtröpfchen innerhalb der Zellen (54).

Neben der peritubulären Fibrose konnte bei männlicher Infertilität häufig eine erhöhte Anzahl von Immunzellen (v. a. Mastzellen und Makrophagen) innerhalb der peritubulären Region festgestellt werden (60). Die Aufgaben von Immunzellen im männlichen Reproduktionstrakt sind unbekannt. Mastzellen können über ihre sekretorischen Produkte die Fibroblasten aktivieren sowie die Kollagensynthese über Wachstumsfaktoren fördern, weshalb diese Zellen an fibrotischen Veränderungen und bei der Modellierung von Geweben beteiligt zu sein scheinen (61-63). Fibroblasten können wiederum die phänotypische Variabilität, die Adhärenz und die funktionelle Aktivität der Mastzellen regulieren. Auf Grund dieser Fakten könnten die Mastzellen bei der Entstehung einer Organfibrose und Geweberemodellierung eine bedeutende Rolle spielen. Diese Hypothese scheint durch die erhöhte Anzahl von Mastzellen unter anderem bei idiopathischen Fertilitätsstörungen, die mit Fibrose der

Tubulummembranen einhergehen, untermauert zu sein. In Proben von Patienten mit Mixed Atrophy (64), welche innerhalb der selben Hodenbiopsie sowohl funktionelle Tubuli als auch fibrotisch veränderte bis hin zu Tubuli mit Sertoli-cell only Syndrom (keine Spermatogonien innerhalb der Samenkanälchen) aufweisen, wurde in pathologisch veränderten tubulären Regionen eine signifikante Erhöhung der Immunzellen wie Mastzellen oder Makrophagen, eine Veränderung der Morphologie und der topographischen Lage und außerdem eine erhöhte Anzahl von neuronalen Zellen und Nervenfasern festgestellt (Bild 2; (53,65)).

Ferner zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass viele dieser Mastzellen aktiviert und degranuliert erscheinen (53), so dass zu erwarten ist, dass ihre Produkte freigesetzt werden und lokal im Hoden wirken können. Die Zunahme der Anzahl Tryptase-positiver Mastzellen korreliert mit der gemessenen Dicke der Tubulummembran und einer Verschiebung der Mastzellen aus dem Interstitium in den peritubulären Raum (53,66,67).

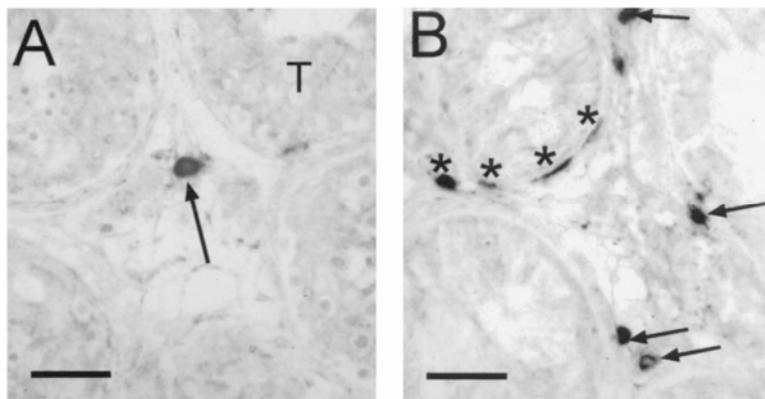


Bild 2: Akkumulation von Mastzellen in Hodenbiopsien infertiler Patienten.
(A) Wenige Tryptase aktivierte Mastzellen im Interstitium eines fertilen Patienten (Pfeil).
(B) Bei infertilen Patienten befinden sich Mastzellakkumulationen sowohl im Interstitium (Pfeile), als auch in der peritubulären Region (*) (53).

Besonders hervorzuheben ist, dass peritubuläre Zellen funktionelle Rezeptoren für die Mastzellprodukte Tryptase (PAR-2) und $\text{TNF-}\alpha$ (TNFR1/2) besitzen, was darauf hinweist, dass Mastzellen als Regulatoren

eine wichtige Rolle spielen können (20,32). Es ist bekannt, dass Tryptase die Zellteilungsaktivitäten von Fibroblasten fördert (68), was mit den pathologischen Veränderungen der Patienten mit Mixed Atrophy in Korrelation stehen könnte. Daneben steht auch TNF- α im Verdacht, die Ablagerung von extrazellulärem Matrixmaterial zu fördern und so Interaktionen zwischen peritubulären Zellen und dem Interstitium zu behindern (30,56). Auf Grund dessen werden im Folgenden die beiden Signalmoleküle Tryptase und TNF- α im Zusammenhang mit Veränderungen im Hoden genauer beschrieben.

1.2 Interaktion der testikulären peritubulären Zellen mit Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich aus CD 34+ multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen (69,70), welche den Stammzellen des Knochenmarks entstammen und ubiquitär im menschlichen Körper in großer Zahl vorkommen. Nach der Zirkulation von Mastzellvorläufern in der Blutbahn migrieren sie in das Bindegewebe und differenzieren sich unter Einfluss des hämatopoetischen Stammzellfaktors (SCF) zu funktionellen reifen Mastzellen (71,72). Die heranreifenden Mastzellen exprimieren neben dem SCF-Rezeptor (c-kit) die membranständigen Rezeptoren für IgE (Fc ϵ RI) und bilden charakteristische Sekretionsgranula aus (73). Sie finden sich überwiegend an den großen Körperbarrieren und in muskulären Organen wie Gefäßen, Herz, Uterus sowie in Nebenhoden und Hoden (66). Mastzellen spielen im humanen Immunsystem eine bedeutende Rolle, nicht nur als primäre Effektorzellen der IgE-vermittelten Immunreaktion, sondern auch bei der Initiierung und Modulation der Immunantwort, antimikrobieller Abwehrreaktionen und inflammatorischen Reaktionen (74,75). Außerdem wird ein Beitrag von Mastzellen zur Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen wie Psoriasis

oder Asthma sowie an Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose vermutet (76), bei denen es zu einer Zunahme der Anzahl und einer vermehrten Aktivierung der Mastzellen kommt (77).

Die Mastzellen speichern in ihren zahlreichen Granula präformierte Mediatoren wie die Serinprotease Tryptase, TNF- α , Heparin, Histamin, Chymase und Carboxypeptidase B (78,79). Die Degranulierung und die damit verbundene Freisetzung dieser Mediatoren können sowohl durch IgE-abhängige und -unabhängige Immunmechanismen als auch durch andere Faktoren erfolgen (80-82). Neben diesen gespeicherten werden verschiedene andere inflammatorisch wirksame Faktoren erst nach IgE-vermittelter Aktivierung der Mastzelle gebildet. Hierzu gehören zum Beispiel Prostaglandine, Zytokine, TNF- α oder Interleukin (IL)-4, -5 und -6.

1.2.1 Tryptase

Tryptasen sind die Hauptsekretionsprodukte von humanen Mastzellen (83). Sie umfassen eine Gruppe von sequenzzhomologen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, deren entsprechende Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 lokalisiert sind (84). Die Mitglieder der Familie lassen sich in drei Gruppen einteilen, die α -Tryptasen (α 1 und α 2), die β -Tryptasen (β 1a, β 1b, β 2 und β 3) sowie die γ -Tryptasen (γ 1, γ 2 und TMT), welche alle durch einen hydrophoben C-terminalen Bereich charakterisiert sind (85,86). In Mastzellen werden überwiegend β -Tryptasen exprimiert, in Basophilen dagegen fast nur α -Tryptasen (86,87). Während die α -Form konstitutiv von der Mastzelle als inaktives Molekül sezerniert wird, ist die aktive β -Form in den Granula der Mastzellen gespeichert (88,89). Die γ -Tryptase wird ebenfalls durch Abspaltung des Propeptids aktiviert, bleibt aber sowohl während der Speicherung an der Granulamembran als auch nach Freisetzung an der extrazellulären Oberfläche der Zellmembran membranständig gebunden (90).

1.2.1.1 Struktur und Rezeptor

Tryptase wird zunächst als Proenzym gebildet. Auf dem Weg vom trans-Golgi Apparat zu den Sekretionsgranula wird das lange Pro-Peptid von der eigentlichen Proteinasesequenz abgespalten (88,91). Die Tryptase besteht aus vier 34 - 37 kDa großen Untereinheiten, welche durch Heparin stabilisiert werden. Die vier Monomere sind so angeordnet, dass die Mastzelltryptase gegenüber Inaktivierung durch Inhibitoren wie Serinproteasen weitgehend resistent bleibt und im Falle von β -Tryptasen als aktives Tetramer in den Sekretionsgranula gelagert wird (Bild 3; (91-93)).

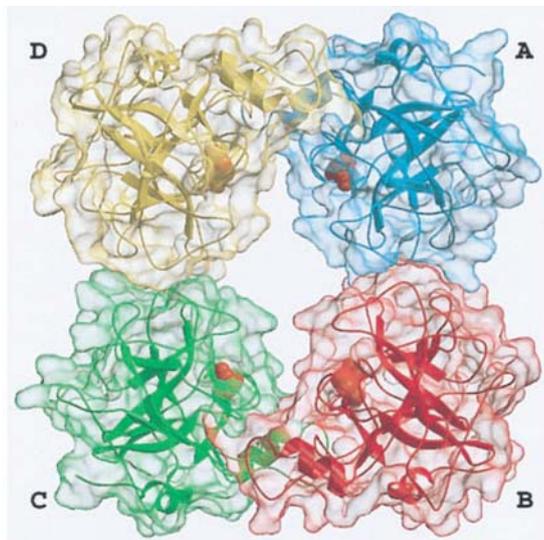


Bild 3: Struktur des Tryptase-Tetramers.
Die vier Monomere A, B, C und D sind in blau, rot, grün und gelb dargestellt. (93)

Tryptase aktiviert den G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptor (PAR-2), welcher sieben transmembrane Domänen besitzt (94). Die Expression des Tryptase-Rezeptors PAR-2 wurde in verschiedenen Geweben wie Herz, Lunge, Leber, Niere, Haut, Gehirn und Prostata nachgewiesen (95-97). Im Hoden wurde eine Expression von PAR-2 in Zellen des testikulären Keimepithels (98), auf Spermatozoen (99), im Interstitium (100) und peritubulären Zellen (32) festgestellt. Durch immun-

histochemische Studien an Ratten wurde der Rezeptor außerdem auf peritubulären Zellen und testikulären Makrophagen lokalisiert (101). Seine Aktivierung führt über die Aktivierung der Phospholipase C zur Hydrolyse des Phosphatidylinositol-bisphosphats und zur Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums (102). Ein Peptid mit der Sequenz SLIGKV kann als Agonist spezifisch an PAR-2 binden und die Ca^{2+} - oder cAMP-Freisetzung aktivieren (Bild 4; (103,104)).

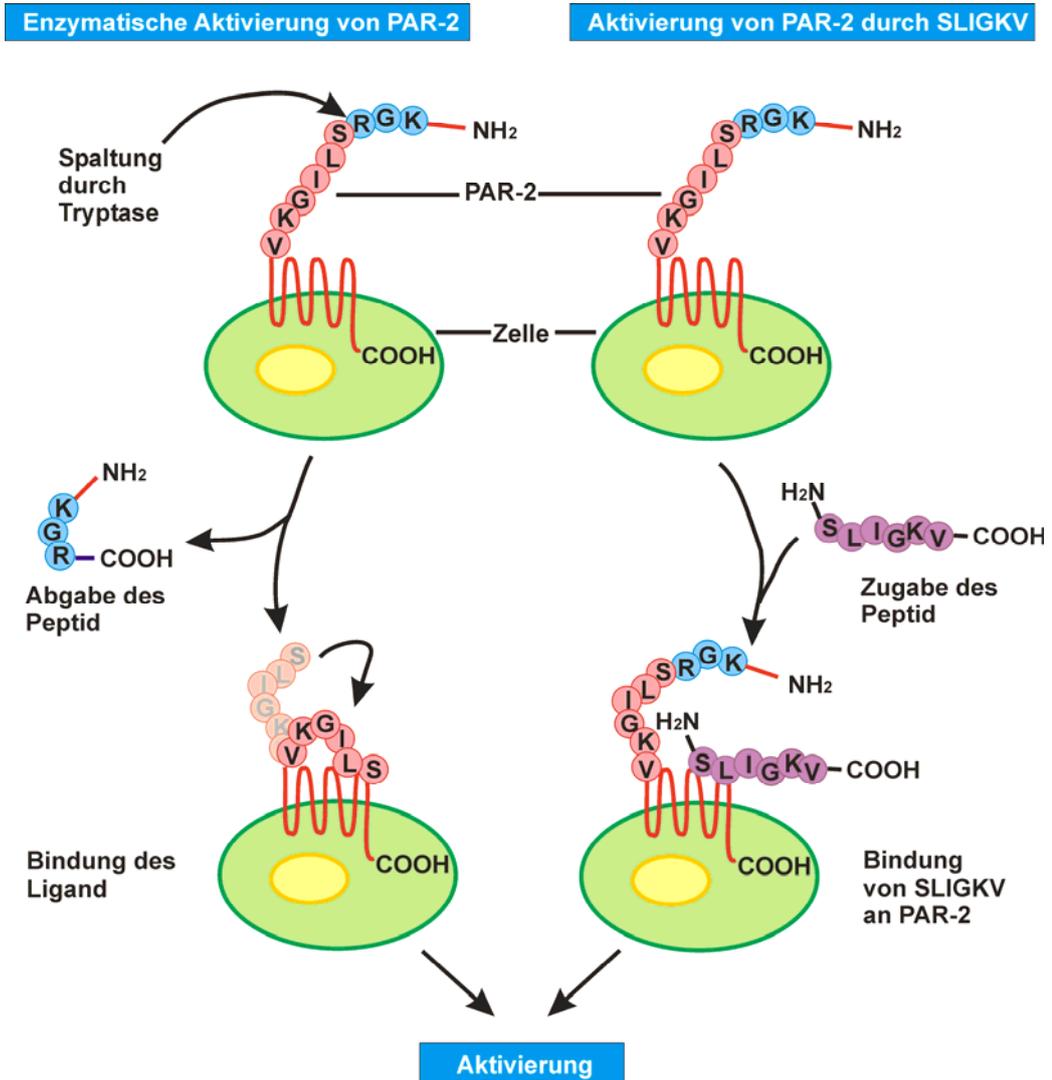


Bild 4: Aktivierung des PAR-2 durch Tryptase und SLIGKV. Tryptase spaltet das N-terminale Peptid von PAR-2, wonach das neue N-terminale Ende an den Rezeptor bindet und einen G-Protein gekoppelten Signalweg einleitet und über Aktivierung der PKC die Ca²⁺-Freisetzung auslöst. Das synthetische Peptid SLIGKV bindet direkt an den Rezeptor und bewirkt ebenfalls eine Aktivierung des PAR-2. Modifiziert nach (105).

1.2.1.2 Physiologische Rolle von Tryptase im Körper und Hoden

Tryptase wurde mit vielen Prozessen im menschlichen Körper in Zusammenhang gebracht, von denen einige mit Inflammation in Verbindung stehen. Dabei ist Tryptase im Fokus von Studien, welche in Korrelation mit

verschiedenen Krankheiten stehen. Bei Experimenten mit Tieren oder Geweben konnten durch Tryptase verschiedene biologische Prozesse ausgelöst werden, welche durch Tryptaseinhibitoren moduliert werden konnten. Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass Tryptase an der Pathogenese akuter und chronischer Entzündungen, insbesondere Asthma, beteiligt ist (106,107). Durch Spaltung aktiviert Tryptase neben PAR-2 auch Prostromelsin oder die Prourokinase (94,108,109) und inaktiviert Fibronectin oder HMMK (High molecular-Mass Kinogen). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Tryptase durch Spaltung der α -Kette des Fibrinogens gerinnungshemmend wirken kann (110-112) und somit zusammen mit der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Kommunikation zwischen entzündetem Gewebe und dem Blutkreislauf haben könnte (113). Andere Studien schrieben Tryptase die Fähigkeit zur Degradation von Neuropeptiden zu (114,115). Zudem wurde eine Beteiligung von Tryptase bei der Wundheilung nachgewiesen (116). Tryptase kann auch direkt zelluläre Effekte auslösen und zum Beispiel die Proliferation von Fibroblasten (61,62,68) anregen. Außerdem spielt Tryptase bei der Kontrolle der allergischen Inflammation eine bedeutende Rolle, da es nach der Aktivierung von Mastzellen IgE spalten kann (117). In manchen Fällen wurde Mastzelltryptase auch die Prozessierung von Pro-Formen einiger Proteasen wie (MMP-1, MMP-3) und damit deren Aktivierung zugeschrieben (108,118,119). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Tryptase an der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen beteiligt sein könnte, die sowohl durch eine Vermehrung der Mastzellen in den erkrankten Geweben als auch durch eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten bzw. Keratinozyten gekennzeichnet sind.

Ein Überblick von biologischen Prozessen, in welchen Tryptase involviert ist, liefert Tabelle 1:

Tabelle 1: Biologische Prozesse im Zusammenhang mit Tryptase. Verändert nach (120).

Biologischer Prozess	erhöhte Tryptase-Spiegel	Tryptase-induzierter Prozess	Tryptase Inhibitor reduziert Prozess	Referenzen
Atemwegs-Entzündung	+	+	+	(107,121-127)
Neutrophilen-Rekrutierung		+		(128-130)
Eosinophilen-Rekrutierung		+		(130)
Erhöhte vaskuläre Permeabilität		+		(131)
Fibrose	+			(132)
Ulcerative Colitis			+	(133)
Angiogenese		+		(116,134)
Arthritis	+			(135,136)
Multiple Sklerose	+			(137,138)
Plötzlicher Kindstod	+			(139)
Duchenne Muskeldystrophie	+			(134)
Psoriasis	+			(140,141)
Gelenkentzündung		+	+	(142)
Darmentzündung			+	(143)
Atopische Dermatitis	+			(132)
Tumor-Zellproliferation		+		(144)
Pruritus		+		(145)
Männliche Infertilität	+			(53)

Bei Patienten mit gestörter Spermatogenese wird vermutet, dass die erhöhte Anzahl aktiver Mastzellen mit einer vermehrten Produktion von Tryptase assoziiert ist, welche die Chemotaxis und Aktivierung von Fibroblasten steigern kann, was wiederum die Fibrose fördert. Die erhöhte Anzahl von Mastzellen scheint mit der gesteigerten Synthese von

Kollagenfasern und der daraus resultierenden fibrotischen Verdickung der Tubuluswand in Zusammenhang zu stehen (53,59,60,146).

Außerdem wird eine neuroimmunologische Rolle von Tryptase schon seit längerem diskutiert, nicht zuletzt basierend auf der räumlichen Nähe von Mastzellen zu Nervenfasern zum Beispiel in humanem Hautgewebe oder in Darmgewebe von Ratten (140,147).

1.2.2 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein pleiotropes proinflammatorisches Zytokin, das 1975 erstmalig von Carswell im Serum von mit Lipopolysacchariden (LPS) behandelten Mäusen nachgewiesen wurde und den Namen aufgrund nekrotisierender Effekte bei malignen Tumoren erhielt (148). Zehn Jahre später gelang es, TNF zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren (149).

Neben Immunzellen wie Mastzellen, Makrophagen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten können auch Strukturzellen wie Fibroblasten und Keratinozyten TNF- α produzieren (150).

1.2.2.1 Struktur und Rezeptoren

TNF- α bildet nach seiner Expression spontan homotrimere Strukturen aus. Der humane TNF- α Vorläufer ist 233 Aminosäuren lang und wird post-translational modifiziert (151). Die Signalsequenz des Propeptids ist 76 Aminosäuren lang und dient der Verankerung des Moleküls in der Zytoplasmamembran. Das modifizierte, reife, humane TNF-Molekül besteht aus 157 Aminosäuren, ist an Position 7 glykosyliert und besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa (152). Durch proteolytische Prozessierung der membranständigen pro-TNF-Extrazellulärsequenz vorwiegend durch die Metalloproteinase TACE/ADAM (TNF- α Converting Enzyme/A Disintegrin And Metalloproteinase)-17 kann eine lösliche Form von TNF entstehen (153,154). Die aktive, lösliche TNF-Form ist ein Homotrimer mit

52 kDa, welches aus drei identischen 17 kDa Untereinheiten besteht (155).

Es konnten zwei humane, membranständige Rezeptoren nachgewiesen und kloniert werden: TNFR1 mit 426 bp und TNFR2 mit 439 bp (156,157). Beide TNF-Rezeptoren werden als Homo-Multimere auf der Zellmembran exprimiert. Diese Membranproteinrezeptoren besitzen eine charakteristische Cystein-reiche Domäne im extrazellulären Bereich. Neben einer hydrophoben Transmembrandomäne sind unterschiedliche intrazelluläre Domänen vorhanden. Da keine signifikanten Homologien zwischen den intrazellulären Domänen von TNFR1 und TNFR2 bestehen, wird von zwei unterschiedlichen Signalwegen ausgegangen (158). Dabei führt die Interaktion mit TNF-Liganden zur Bildung von Clusterstrukturen, die spezifische Signalkaskaden in Gang bringen (159). Lösliches TNF bindet mit höherer Affinität an TNFR1, während hingegen für TNFR2 eine höhere Affinität für membranständiges TNF gezeigt werden konnte (160). Der TNFR1 weist intrazellulär eine Todesdomäne („Death Domain“) auf (161), welche nach Rezeptoraktivierung das spezifische bivalente Adapterprotein TRADD rekrutiert und sowohl Apoptose als auch den klassischen, anti-apoptotischen und pro-inflammatorischen NF κ B-Weg aktiviert. Der TNFR2 hingegen besitzt am C-terminalen Ende der Intrazellulärdomäne eine Bindungsstelle für TRAF-Moleküle. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des klassischen und auch des alternativen NF κ B-Signalwegs (Details siehe (162)).

1.2.2.2 Rolle von TNF- α im Hoden

Im testikulären Mikromilieu wird TNF- α von pachytänen Spermatozyten, runden Spermatiden (163), Mastzellen und interstitiellen Makrophagen exprimiert (164). Mögliche Effektorzellen für TNF- α stellen die Leydig- und Sertolizellen dar (163), bei denen die Expression von TNFR1 nachgewiesen wurde (165).

In Leydigzellen bewirkt TNF- α eine Hemmung der Testosteronsynthese, die vermutlich auf einer verminderten Expression steroidogener Enzyme beruht (166).

In Sertolizellen kann TNF- α indirekt die Spermatogenese fördern, indem es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B stimuliert (167,168). Des Weiteren kann das Zytokin Signalwege über die Aktivierung von JNK und p38 MAPK beeinflussen (169). Die Stimulation des MAPK Signalwegs führt zur Produktion von IL-6 und durch den JNK-Signalweg wird eine erhöhte Expression des Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und des Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) auf der Oberfläche gefördert (169). Durch die Stimulation des Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) kann TNF- α der Wirkung von IGF-1 auf die Bindung von FSH an Sertolizellen entgegenwirken (170).

Durch einen Konzentrationsanstieg von TNF- α durch Entzündung und/oder Infektion kann die Integrität der Blut-Hodenschranke vermindert werden, vermutlich durch Verminderung der Expression von Occludin, einem wichtigen Bestandteil der tight junctions zwischen den Sertolizellen (171-173).

TNF- α stimuliert in Keimzellen die Expression des Enzyms Aromatase, welches zur Östrogensynthese nötig ist (174). Pentikainen *et al.* konnten demonstrieren, dass TNF- α *in vitro* die Apoptose von Keimzellen im menschlichen Hodengewebe inhibiert, indem es die Expression des Fas-Liganden drosselt (175).

In humanen peritubulären Zellen stimuliert TNF- α neben der Induktion von ICAM-1 sowie verstärkter Expression des Enzyms COX-2 und des Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) auch die Sekretion des Zytokins MCP-1 (20,176). Das Vorkommen des Wachstumsfaktors NGF im Hoden von Ratten und Mäusen ist schon seit längerer Zeit beschrieben (177). Jedoch wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit sowohl eine

Produktion des Neurotrophins von humanen peritubulären Zellen als auch dessen Regulation durch das Mastzellprodukt $\text{TNF-}\alpha$ nachgewiesen (20,176). Auf Grund dieser Tatsache und da die Wirkung von neurotrophen Faktoren in verschiedensten Gewebekompartimenten wieder aktuell behandelt wird, sollte in dieser Arbeit die Interaktion von Mastzellen mit peritubulären Zellen im Hinblick auf neurotrophe Faktoren näher untersucht werden.

1.3 Rolle von Neurotrophen im Hoden

Basierend auf den strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten bilden Nervenwachstumsfaktor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4 (NT-4) die Familie der Neurotrophine (178). Diese Signalmoleküle regulieren neuronale Differenzierung, Überleben und Plastizität einer Zelle (179). Jedoch gibt es außerdem hinreichende Beweise für Aktivitäten dieser Faktoren in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben (178,180), worauf im Folgenden noch genauer eingegangen werden soll.

Reife Neurotrophine binden an zwei Klassen von Rezeptoren: den gemeinsamen p75^{NTR} (181,182) und einen Tropomyosin-related Kinase (Trk) Rezeptor (183). NGF und NT-3 binden beide an den TrkA Rezeptor, in Anwesenheit von p75^{NTR} kann jedoch nur NGF an den TrkA Rezeptor binden (184). In ähnlicher Weise verhalten sich BDNF, NT-4 und NT-3, welche an den TrkB Rezeptor binden können, jedoch wird in Anwesenheit des p75^{NTR} nur ein BDNF Signal gewährleistet (185). An den TrkC Rezeptor bindet nur NT-3 (186). TrkA aktiviert vornehmlich die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K), während TrkB sowohl den PI3-K als auch den Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Signalweg aktiviert (187).

Neurotrophine werden als Vorformen (pro-Neurotrophine) synthetisiert, welche proteolytisch zu reifen, biologisch aktiven Liganden gespalten werden können (188). Die pro-Regionen der Neurotrophine scheinen für die korrekte Faltung und Direktion zu ihrem Zielort verantwortlich zu sein (189,190). Auch wenn pro-Neurotrophine immer als inaktive Vorformen angesehen wurden, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass pro-Neurotrophine in heterologen Zellen durch Furin oder Prokonvertasen intrazellulär an hoch konservierten dibasischen Aminosäurestellen gespalten werden können (191,192). Pro-Formen von NGF und BDNF können sezerniert (192) und extrazellulär durch die Serinprotease Plasmin und selektive Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gespalten werden. Dabei kann proBDNF durch die Proteasen Plasmin, MMP-3 und MMP-7 gespalten werden. Dagegen wirken auf proNGF Plasmin, welches zu einer 13 kDa Form führt, und MMP-7, welches proNGF zu einer 17 kDa Form spaltet (193). NGF kann letztendlich durch MMP-9 degradiert werden (194).

1.3.1 Nervenwachstumsfaktor (NGF)

Im Jahre 1951 demonstrierte Rita Levi-Montalcini die Anwesenheit eines löslichen Wachstumsfaktors, der in das Sarkomgewebe eines Hühnerembryos sezerniert wurde und über Diffusion die sensorischen und sympathischen Nervenzellen zu schnellem Wachstum anregte. Dieser wurde 1952 als Nervenwachstumsfaktor beschrieben (195,196). Im Jahre 1986 wurden Levi-Montalcini und ihrem Kollegen Stanley Cohen für diese Entdeckung und die Erforschung von NGF der Nobelpreis für Medizin verliehen. Die Isolation von NGF gelang den Beiden zunächst aus Kulturen sympathischer Ganglien, doch dienten später Schlangengifte und submaxillare Speicheldrüsen männlicher Mäuse als Ausgangsmaterial zur Isolation von NGF, da diese eine hohe Konzentrationen dieses Faktors enthielten (197-200). Die zunehmende Verfügbarkeit von NGF aus

exokrinen Drüsen wie Giftdrüsen von Schlangen (199,201-203), Prostata von Meerschweinchen (204,205), Samen und Samenblasen von Bullen (206,207) und submaxillaren Speicheldrüsen der südafrikanische Ratte (*Mastomia natalensis*) (208,209) ermöglichte die weitere Charakterisierung von NGF.

1.3.1.1 Struktur und Rezeptoren

Der NGF Komplex setzt sich aus drei Untereinheiten (α , β , und γ) zusammen (210), von denen lediglich die β -Untereinheit biologisch wirksam ist. Reifer β -NGF ist ein nicht kovalent gebundenes Dimer, welches aus zwei identischen Polypeptidketten mit je 118 Aminosäuren besteht (211). Sowohl die Monomere als auch die Dimere sind biologisch aktiv (212,213). Die Primärsequenz von murinem NGF unterscheidet sich in nur 12 der 118 Aminosäurereste im Vergleich zu humanem NGF (214). In der Aminosäuresequenz jedes Monomers befinden sich sechs Cysteinreste, welche durch drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (215). Werden diese reduziert, ist das Molekül nicht mehr biologisch aktiv (211,216).

Die γ -Untereinheit des NGF-Komplexes ist an der C- und N-terminalen Prozessierung von proNGF (188). Das C-Ende dieses Vorläufers besteht aus den Aminosäure-Sequenzen Arg-Arg-Gly. Die γ -Einheit spaltet proNGF zwischen den beiden Arginin-Resten und bleibt am C-Ende von β -NGF gebunden (217,218).

Die α -Untereinheit besitzt keine proteolytische Aktivität (219). Es wird angenommen, dass sie β -NGF vor der Proteolyse schützt und seine biologische Aktivität reguliert.

Durch alternatives Spleißen des Prä-Pro-Protein entsteht das reife β -NGF ((214,217); Bild 5):

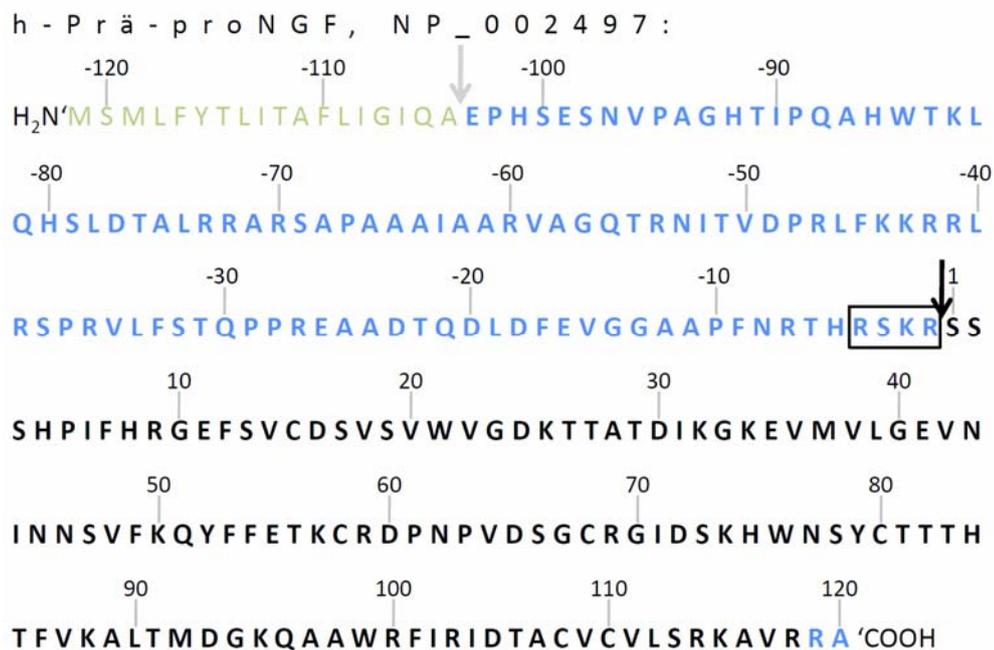


Bild 5: Primärstruktur von humanem Prä-Pro-NGF.

Der graue Pfeil kennzeichnet die Prozessierungsstelle der Signalpeptidase, die Spaltstelle der Furin-Protease ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die prä-Sequenz ist grün und die pro-Sequenz ist blau markiert. Die letzten beiden Aminosäuren (119 und 120) werden *in vitro* leicht durch Trypsin abgespalten.

Die 18 Aminosäuren umfassende Prä-Sequenz wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum abgespalten und es entstehen die proNGF-Formen mit 32 kDa und 25 kDa (188,214,220,221). Dort findet unter oxidativen Bedingungen die Ausbildung der Disulfidbrücken und N-Glycosylierung der pro-Sequenz statt, welche wahrscheinlich für die korrekte Faltung des Proteins und für dessen Austritt aus dem ER wichtig ist (222). ProNGF wird intrazellulär durch Furin oder bestimmte Prohormonkonvertasen (PACE4 und C5/6-B) im trans-Golgi Netzwerk prozessiert (222-224). Posttranslational erfolgt die Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren sowie des N-terminalen Pro-Peptids, wodurch das reife, biologisch aktive β -NGF entsteht (220).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass proNGF nur eine Vorstufe des biologisch aktiven NGF ist, jedoch konnte auch unprozessierter proNGF als Sekretionsprodukt in einer Vielzahl von Geweben wie Haarfollikeln, Prostata oder Spermien nachgewiesen werden (220,225,226). Es wurde vermutet, dass in vielen neuronalen, aber auch in nicht-neuronalen Geweben das Verhältnis der Sekretion von β -NGF und proNGF in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums erfolgt (227,228). Bei Alzheimer-Patienten wurde beispielsweise eine Akkumulation von proNGF im Gehirn nachgewiesen (229). Daher wäre möglich, dass proNGF nicht nur ein Vorläufer des reifen Neurotrophins darstellt, sondern auch selbst biologisch wirksam ist (229).

NGF bindet und aktiviert zwei Klassen von Transmembranrezeptoren: den hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA-Rezeptor ($K_D \sim 10^{-11}$ M), und den niedrigaffinen Neurotrophin-Rezeptor p75 ($p75^{NTR}$; $K_D \sim 10^{-9}$ M), ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie, an welchen alle Neurotrophine binden können (179,230,231). Beide Rezeptorklassen induzieren unabhängig voneinander unterschiedliche Signalkaskaden (232). Durch Bindung des Liganden an den TrkA Rezeptor wird dessen Dimerisierung induziert, was zur *trans*-Autophosphorylierung von drei Tyrosinresten der intrazellulären Aktivierungsschleife führt. Dadurch wird die Kinase-Domäne aktiviert, wodurch zwei weitere Tyrosinreste außerhalb dieser Schleife auto-phosphoryliert werden. Danach binden intrazelluläre Adaptorproteine an die phosphorylierten Tyrosinresten der intrazellulären Domäne und es werden so verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt (233,234): neben der Aktivierung von PI3-K und Akt (Proteinkinase B), wird das G-Proteins Ras aktiviert, welches das Signal auf die MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) überträgt und außerdem wird der PLC γ -PKC-Weg in Gang gesetzt (186).

In einigen Untersuchungsreihen wurde beobachtet, dass $p75^{NTR}$ als Co-Rezeptor für die Funktion der Trk-Rezeptoren fungiert, um die Bindung von NGF zu optimieren (235-238). Jedoch konnte in mit TrkA transfizierten Zellen auch eine Tyrosin-Kinase-Aktivität von TrkA ohne die Anwesenheit von $p75^{NTR}$ beobachtet werden (239,240). Der $p75$ -Rezeptor besteht aus einer transmembranären, extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Der Rezeptor kann neben der Interaktion mit dem Trk-Rezeptor auch eigenständig Signale weiterleiten. Seine intrazelluläre Domäne, die als „Death Domain“ bezeichnet wird, wirkt als apoptotischer Faktor (241-243). Darüber erfolgt die Aktivierung von NRIF (neurotrophin receptor interacting factor), von JNK, NF κ B, p53 und Ceramid (179,180,244-250). Neben der Induktion von Apoptose vermittelt $p75^{NTR}$ weitere biologische Aktivitäten, welche über andere Signalkaskaden reguliert werden. Die Bindung von NGF an TrkA und $p75^{NTR}$ induziert eine Konformationsänderung des TrkA Rezeptors, was zu einer Verstärkung der TrkA-Signalkaskade (251-254) und einer Inhibierung der apoptotischen Signalkaskade über $p75^{NTR}$ (255) führt. Wahrscheinlich besitzt TrkA nur in Verbindung mit $p75^{NTR}$ seine hochaffinen Bindungseigenschaften (237), weshalb die ursprüngliche Einteilung der Rezeptoren in hoch- und niedrigaffine Rezeptoren in Frage gestellt und in aktueller Literatur wenig verwendet wird.

Erst in den letzten Jahren wurde Sortilin (256) als weiterer Rezeptor identifiziert, welcher zusammen mit $p75^{NTR}$ an der Signaltransduktion von NGF bzw. proNGF beteiligt ist (Bild 6):

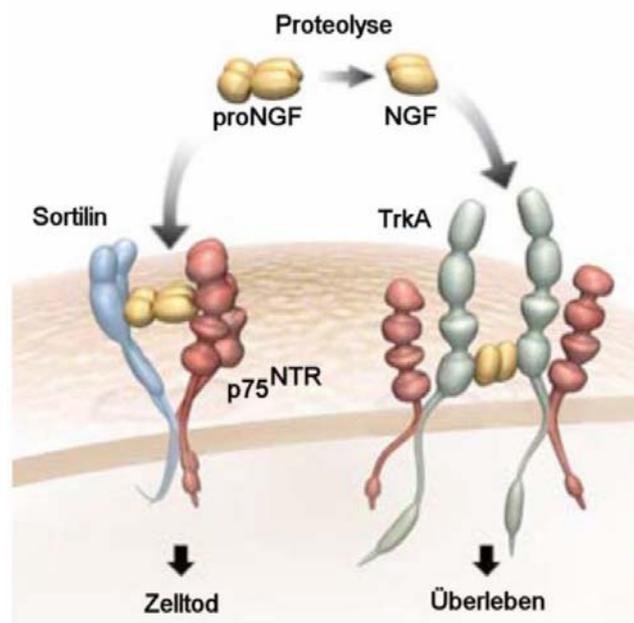


Bild 6: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe für NGF und proNGF. Modifiziert nach (257).

Dabei wurde für proNGF eine höhere Affinität zu Sortilin nachgewiesen als für NGF. Es wird vermutet, dass Sortilin zusammen mit p75^{NTR} einen Komplex bildet, welcher für die Induktion von Apoptose-Signalwegen durch proNGF verantwortlich ist (257). Dabei scheint das Verhältnis zwischen NGF und proNGF und die An- oder Abwesenheit der Rezeptoren (TrkA, p75^{NTR} und Sortilin) entscheidend für Zellüberleben oder Zelltod zu sein (258).

1.3.1.2 Neuronale und nicht-neuronale Rolle von NGF im Körper

NGF wird neben neuronalen Geweben wie sympathischen Neuronen oder dorsalen Ganglien (259,260) auch in verschiedenen anderen Geweben wie Ovar (261), Knochenmark (262), Haarfollikelzellen (226), Leber (263), Harnblase (264), Retina (265), Prostata (266) und Spermatozyten (225) exprimiert. Des Weiteren wird das Neurotrophin von Zellen des Immunsystems produziert und sezerniert, welche auch Rezeptoren für NGF exprimieren (267,268). Das NGF/TrkA System fördert sowohl die

Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (269) als auch die Proliferation und Degranulierung von Mastzellen (270,271) und steigert die Proliferation der T-Zellen sowie die Antikörpersynthese durch Plasmazellen (272-274). Auch bei der Angiogenese wird NGF eine wichtige Rolle zugeschrieben (275-277). Außerdem fördert NGF die Proliferation von Keratinozyten (278) und schützt diese Zellen vor Apoptose (279).

Mit immunhistochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem Keimzellen (280) und Leydigzellen (281) primäre NGF-Produzenten sind. Durch *in vitro* Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen wurde die wichtige Rolle von NGF im Hoden bei der parakrinen Kommunikation wie zum Beispiel der Regulation der IL-6 Sekretion von Sertolizellen deutlich (282). Nach der Entdeckung, dass NGF trophisch für synaptische Fasern ist (283), wurde dem Neurotrophin auch im Hoden hierfür eine Rolle zugeschrieben (284). Außerdem ist NGF an der Morphogenese der Tubuli seminiferi während der frühen Entwicklung (285) beteiligt. Perrard *et al.* beschrieben eine Involvierung von NGF in die Spermatogenese durch Modulation der meiotischen Teilungen von Spermatozyten bei Ratten. Dabei arretiert NGF intratestikulär die sekundäre Spermatozyten in der Metaphase II, wodurch es zur verringerten Bildung runder Spermatiden kommt (280,286)

1.3.2 Glial cell line derived neurotrophic Factor (GDNF)

Der Glial cell line derived Neurotrophic Factor (GDNF) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie, welcher ursprünglich aus einer von der Ratte stammenden glialen Zelllinie (B49) isoliert und als Überlebensfaktor sowohl für dopaminerge Neurone des Mittelhirns (287) als auch für spinale Motoneurone (288) identifiziert wurde. Wie bereits erwähnt, gelangte GDNF in den letzten Jahren in den Vordergrund der Wissenschaft, da es ein wichtiger Faktor der Stammzellnische ist.

1.3.2.1 Struktur und Rezeptoren

Die Vorstufe von GDNF umfasst 211 Aminosäuren und wird anschließend in ein 134 Aminosäuren langes Protein prozessiert und durch die Ausbildung zweier Disulfidbindungen dimerisiert (287). Reifes GDNF-Protein hat als Homodimer ein Molekulargewicht von 32 kDa bis 45 kDa.

GDNF bindet an dem stark affinen, über einen Glykosyl Phosphatidylinositol Anker (GPI) mit der Zelloberfläche verbunden GDNF-family-receptor- α 1 (GFR- α 1) und die Rezeptor-Tyrosin-Kinase „rearranged in transformation“ (c-Ret) (289-292).

Über die Bindung des Liganden wird c-Ret phosphoryliert und aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege wie den Ras / MAPK-Signalweg (293) oder auch PI3-K abhängige Signalwege (294). Daneben existiert auch eine Signalweiterleitung über den GFR- α 1, welche unabhängig von c-Ret ist (295,296). Dabei bewirken die Kinasen der Src-Familie eine Phosphorylierung der PLC- γ und über die Produktion von IP₃ eine Freisetzung von Ca²⁺ (295,297).

Neben der hochaffinen Bindung an seinen spezifischen Rezeptor GFR- α 1 ist GDNF in der Lage mit geringerer Affinität an den Rezeptor GFR- α 2 zu binden (298,299).

1.3.2.2 Physiologische Rolle von GDNF und GDNF-Rezeptoren im Hoden

GDNF ist in vielen verschiedenen Geweben gefunden worden (290), wie zum Beispiel in Nieren, Haut, Lunge, Knochen, Herz, Leber, Blut, Milz (300), peripheren Nervenzellen, Skelettmuskeln (301) und im Ovar (302).

Im Hoden wurde GDNF bei Mäusen und Ratten (12,303,304), Rindern (305) und bei Primaten (306,307) beschrieben. Bisher konnte noch keine Arbeitsgruppe das Vorkommen von GDNF im humanen Hoden feststellen. Jedoch lässt die Tatsache, dass murine (13), Primaten (307) und auch

humane (308) spermatogoniale Stammzellen (SSZ) GFR- α 1 exprimieren, vermuten, dass GDNF auch im menschlichen Hoden exprimiert wird.

Die Expression von GFR- α 1 ist ein Marker zur Identifizierung von spermatogonialen Stammzellen von Affen (307) und anderen Spezies. In vorherigen Arbeiten wurde GDNF *in vivo* und *in vitro* als der wahrscheinlich wichtigste Wachstumsfaktor für die Regulation der Selbsterneuerung und Proliferation von SSZ beschrieben, welcher von den benachbarten Sertolizellen sezerniert wird (11,17,309,310). Die Sekretion von GDNF durch Sertolizellen konnte bei post-natalen Mäusen durch FSH stimuliert werden (15). Des Weiteren wurde eine erhöhte GDNF Produktion durch Sertolizellen nach Stimulation mit TNF- α beschrieben (16). Eine Balance zwischen der Selbsterneuerung und Differenzierung von SSZ im adulten Hoden ist essentiell, um die Spermatogenese und damit auch die Fertilität aufrecht zu erhalten. Diese zwei Prozesse werden durch intrazelluläre Genexpression der SSZ und extrazelluläre Signale, welche von löslichen Faktoren oder Adhäsionsmoleküle des umgebenden Milieus (Stammzellnische) hervorgerufen werden, reguliert.

Wu *et al.* stellten eine Hypothese des durch GDNF hervorgerufenen Signalweges im humanen Hoden auf (Bild 7). Dabei bindet GDNF, welches von Sertolizellen sezerniert wird, an den Rezeptorkomplex von GFR- α 1 und c-Ret (290,292). So aktiviert es, möglicherweise über Proteinkinasesignalwege wie SFK und PI3-K/Akt, die Expression von spezifischen Genen wie *Etv5* und *Bcl6b*, welche in der Regulation der Zellerneuerung involviert sind (308,311):

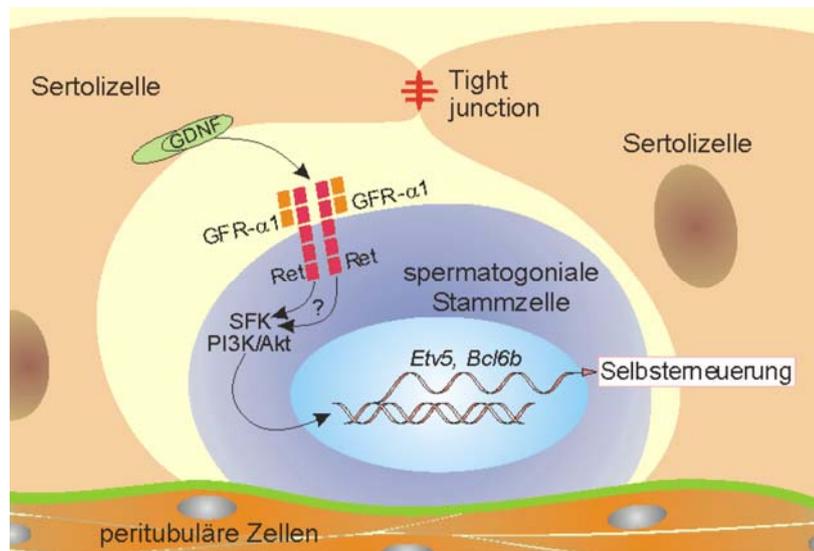


Bild 7: Modell der Selbsterneuerung von humanen SSZ durch GDNF.

GDNF bindet an Ret und GFR- α 1 und aktiviert möglicherweise Signalkaskaden, welche über SFK oder Akt/PI3-K die Expression von Genen wie *Etv5* und *Bcl6b* aktivieren, welche in die Selbsterneuerung von SSZ involviert sind. SSZ sind an der Basalmembran (grün) lokalisiert, welche zwischen Sertolizellen und peritubulären Zellen liegt. Modifiziert nach (308).

SSZ sind an der Basalmembran der Tubuli seminiferi lokalisiert. Die räumliche Nähe der SSZ zu den peritubulären Zellen lässt vermuten, dass auch diese möglicherweise zur Stammzellnische beitragen könnten (13,17).

1.4 Ziele der Arbeit

Neurotrophine haben neben ihrer gut untersuchten Rolle im Nervensystem auch multiple Funktionen in nicht-neuronalen Geweben. In dieser Arbeit sollten humane testikuläre peritubuläre Zellen auf die Expression und Sekretion von neurotrophen Faktoren und deren mögliche Regulation untersucht werden.

Mit der Etablierung eines Modells zur Kultivierung von humanen peritubulären Zellen aus Hodenbiopsien von gesunden Männern als auch von Patienten mit gestörter Spermatogenese bestand die Möglichkeit diese Zellen erstmals näher zu charakterisieren. Da bei Männern mit idiopathischer Infertilität eine Fibrotisierung der peritubulären Wand und gleichzeitig eine Infiltration und Akkumulation von Immunzellen beschrieben ist, war es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die Wechselwirkung von Mastzellen oder Makrophagen und peritubulären Zellen zu untersuchen.

In vorhergehenden Studien konnte eine Expression und Sekretion von NGF durch testikuläre peritubuläre Zellen fertiler Patienten sowie dessen Regulation durch TNF- α , welches vor allem von Immunzellen (Mastzellen und Makrophagen) lokal produziert wird, gezeigt werden. Darauf beruhend stand eine Untersuchung der Regulation der NGF-Produktion von peritubulären Zellen fertiler und infertiler Patienten durch Tryptase, dem Hauptsekretionsprodukt von Mastzellen, im Vordergrund der aktuellen Arbeit.

Da GDNF im testikulären Milieu durch seine Involvierung in die Stammzellnische Gegenstand aktueller Forschung ist und auf Grund der räumlichen Nähe zu spermatogonialen Stammzellen wurde der Fokus im zweiten Teil dieser Arbeit auf das Sekretionsprofil dieses weiteren neurotrophen Faktors gelegt. Im Speziellen standen dabei die

Untersuchung eines Beitrages von peritubulären Zellen zur Stammzellnische und eine eventuelle Regulation durch die Mastzellprodukte Tryptase und TNF- α im Vordergrund.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe Sue 30	Chromaphor	Duisburg, Deutschland
Agarosegelelektrophoresekammer	Biorad	München, Deutschland
Anwaage XS 205	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke BBD 6220	Heraeus	Osterode, Deutschland
Bunsenbrenner Fireboy plus	Integra Biosciences	Wallisellen, Schweiz
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	Middieton, WI, USA
ELISA Washer	Dynex Technologies	Guernsey, GB
ELISA-Reader	Dynex Technologies	Guernsey, GB
Engine Opticon system	MJ Research, Inc	Waltham, MA, USA
Feinwaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzlampe HBO 100 W	Zeiss	München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss	München, Deutschland
Fluostar Optima	BMG Labtech	Offenburg, Deutschland
Gefriertruhe -80 °C	Sanyo	Bad Nenndorf, Deutschland
Handystep	Brand	Wertheim, Deutschland

IKA-Magnetrührer RCT	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS4	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
Kamera ProgRes CT3 (Axiovert 135)	Jenoptik	Jena, Deutschland
Kamera vom Fluoreszenzmikroskop	Visitron Systems	Puchheim, Deutschland
Konfokales Mikroskop mit Laser und Scanner	Leica	Heidelberg, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr	Kirchdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus	Osterode, 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
Mr Frosty	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer Improved	Neolab	Heidelberg, Deutschland
PALM MicroBeam-System	Zeiss	München, Deutschland
pH Meter 320	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
Power Pac 300	Biorad	München, Deutschland
Pumpe	Chromaphor	Duisburg, 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
UV-Tisch	MWG-Biotech	Ebersberg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
Wasserbad WB-24	MEDAX Nagel	Kiel, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus	Osterode, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
24-Well Multischale	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
96-Well Multischale	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
AdhesiveCap 500	Zeiss	München, Deutschland
Amicon Ultra Säulen	Milipore	Billerica, MA, USA
Auslaufpipetten	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
CryoPure Gefäß	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
DEPC-Treated Water	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Eppendorfgefäß	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kulturflaschen	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Latexhandschuhe puderfrei	Kimberly-Clark	Dallas, TX, USA
Maxisorp 96Well Platte	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Messkammer Delta TPG Dish	Bioptechs Inc.	Heidelberg, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Whatman	Dassel, Deutschland
PAP-Pen	Kisker	Steinfurt, Deutschland
Parafilm	American National Can	Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten	NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Rainin	Giessen, Deutschland
Reservoirs	VWR	Darmstadt, Deutschland
Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Skalpelle	Klinikum Rechts der Isar	München, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Urinbecher	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellfilter	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Zellschaber 24cm	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller	Ort
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
NGF E _{max} ® Immuno-Assay	Promega	Mannheim, Deutschland
GDNF E _{max} ® Immuno-Assay	Promega	Mannheim, Deutschland
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Mannheim, Deutschland
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
Prolong Antifade Kit	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin - Tablet Set	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Mycoplasmentest	Minerva	Berlin, Deutschland

Tabelle 5: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Ort
β-Mercaptoethanol	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
β-NGF, Human Recombinant	R&D Systems	Mineapolis, MN, USA
5 x Green GoTaq-Reaction-Buffer	Promega	Mannheim, Deutschland
5 x First Strand Buffer	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid 2K - Lösung (30%)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Agarose Metaphor	Biozym	Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	München, Deutschland
Aprotonin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Borsäure	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Serva	Heidelberg, Deutschland
BSA	PAA	Cölbe, Deutschland
CasyClean	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
CasyTon	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
Chorionic gonadotrophin, human	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
DAB - Tablet Set	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Dc Protein Assay Reagent A	Biorad	München, Deutschland
Dc Protein Assay Reagent B	Biorad	München, Deutschland
Dc Protein Assay Reagent S	Biorad	München, Deutschland
Dimethyl Sulphoxid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland

DMEM high Glucose, w Phenolrot w L-Glutamine	PAA	Cölbe, Deutschland
DMEM high Glucose, w/o Phenolrot w L-Glutamine	PAA	Cölbe, Deutschland
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Peqlab	Erlangen, Deutschland
DTT 0,1M	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
EDTA x 2H ₂ O	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Entellan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% p.a.	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
FCS	PAA	Cölbe, Deutschland
Fluo-4 AM	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Forskolin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Full Range Mol Weigth Marker	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Rainbow		
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem	Darmstadt, Deutschland
GoTaq DNA-Polymerase	Promega	Mannheim, Deutschland
H ₂ O ₂ , 30%	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Iberiotoxin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Isopropanol	Klinikums Rechts der Isar	München, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
MassRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED 100%)	Biorad	München, Deutschland
Na-III-citrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
NH ₄ Cl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Normalserum goat	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
PBS (Pulver)	Biochrom	Berlin, Deutschland
peqGOLD dNTP-Set	Peqlab	Erlangen, Deutschland

Percoll	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
pH Kalibrierlösung pH 10	Roth	Karlsruhe, Deutschland
pH Kalibrierlösung pH 4	Roth	Karlsruhe, Deutschland
pH Kalibrierlösung pH 7	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pipes	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
PMSF	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Pro-Nerve Growth Factor, Human Recombinant	Biozol	Eching, Deutschland
RNAsin Plus RNase Inhibitor	Promega	Mannheim, Deutschland
RPMI	PAA	Cölbe, Deutschland
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Skin β -Tryptase, Human Recombinant	Promega	Mannheim, Deutschland
SLIGKV	NeoMPS	Strasbourg, Frankreich
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Super Script II 10000UN	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
TNF- α	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Tris Base	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Triton X100	Biorad	München, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA	Cölbe, Deutschland
Tween 20	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Xylol mind.99%	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer	Einzelkomponenten
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 für Proteinlysate (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
Proteinaseninhibitorcocktail für Proteinlysate	10 µl PMSF (10 mg/ml) 10 µl Aprotinin 10 µl Leupeptin (10 mM) 0,5 µl Natriumorthovanadat (1 M) 1 ml 1 x Probenpuffer
APS für SDS-PAGE (10%)	1 g APS lösen in 10 ml H ₂ O bidest
10 x Laemmli-puffer (10x) für SDS-PAGE	30,28 g Tris (250 mM) 144,12 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1 %) auffüllen auf 1 l 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 für SDS-PAGE	15,2 g Tris (0,5 M) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest, pH 6,8
SDS für SDS-PAGE (10%)	1 g SDS in 10 ml H ₂ O bidest lösen
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	45,4 g Tris (1,5 M) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O dest, pH 8,8
10 x Transferpuffer für Westernblot	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 l mit H ₂ O bidest

10 x Ponceau S	1 g Ponceau S lösen in 500 ml 3%ige Trichloressigsäure
20 x TBS-Tween	116,8 g NaCl (2 M) 12,1 g Tris Base 10 ml Tween 20 (1 %) auffüllen auf 1 l mit H ₂ O bidest, pH 7,5
Carbonate Coating Buffer für ELISA	0,025 M Natrium Bicarbonat 0,025 M Natrium Carbonat pH 9,7 (NGF), pH 8,2 (GDNF)
TBST Waschpuffer für ELISA	20 mM Tris-Hcl (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
TBE-Puffer (5x) für Agarose-Gelelektrophorese	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA (0,5 M) auffüllen auf 1 l mit H ₂ O bidest, pH 8
Ethidiumbromid für Agarose-Gelelektrophorese	10 mg/ml in H ₂ O bidest lösen Für Gebrauch 1 : 10 verdünnen
Stammlösung A für Immunhistochemie (0,1 M)	21,01 g Zitronensäure in 1 l H ₂ O dest lösen
Stammlösung B für Immunhistochemie (0,1 M)	29,41 g Na-III-citrat in 1 l H ₂ O bidest lösen
KPBS für Immunzytochemie (0,12 M)	1,47 g KH ₂ PO ₄ 8,59 g K ₂ HPO ₄ 27 g NaCl auffüllen auf 0,5 l mit H ₂ O bidest, pH 7,4
LKPBS für Immunzytochemie	48,85 ml KPBS 1 ml Serum 0,15 ml Triton X100

Tabelle 7: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien

Medium	Einzelkomponenten
Erstmedium für Kultivierung von HTPC/-Fs	210 ml DMEM high Glucose 1,19 g HEPES (20 mM) 0,125 g NaHCO ₃ (0,5 g/l) 37,5 ml FBS (15 %) 2,5 ml pen/strep (1 %)
DMEM high Glucose Kulturmedium für HTPC/-Fs	500 ml DMEM high Glucose 10 % FCS
Einfriermedium für HTPC/-Fs	500 ml DMEM high Glucose 10 % DMSO
M199 Medium für Leydigzellen	11 g M199 10 ml HEPES 1 M 10 ml ATB/ATM 2,2 g NaHCO ₃ auffüllen auf 1 l mit H ₂ O bidest, pH 7,2 - 7,4, steril filtrieren
M199+ Kulturmedium für Leydigzellen	1 l M199 0,1 % BSA
F10 10X Medium für Percollgradient	4,905 g F10 auffüllen auf 20 ml mit H ₂ O bidest pH 7,2, steril filtrieren
RPMI Kulturmedium für PC12 Zellen	500 ml RPMI Medium 10 % Pferdeserum 10 % FCS 1 nM Natriumpyruvat

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer

Gen	Sequenz (5'-3')	Genbank-Nr./ Amplikongröße	T _a
<i>BDNF</i>		NM_001709.4	56 °C
forward	ATC GGA ACC ACG ATG TGA CT	170 bp	
reverse	ACC TTG TCC TCG GAT GTT TG		
<i>Cyclophilin</i>		NM_021130	56 °C
forward	CTC CTT TGA GCT GTT TGC AG	325 bp	
reverse	CAC CAC ATG CTT GCC ATC C		

<i>NT-3</i>		NM_001102654	56 °C
forward	TAC GCG GAG CAT AAG AGT CAC	333 bp	
reverse	GGC ACA CAC ACA GGA CGT GTC		
<i>PAR-2</i>		NM_005242	52 °C
forward	CAT CCT GCT AGC AGC CTC	376 bp	
reverse	ACC TCT GCA CAC TGA GGC		
<i>NT-4</i>		NM_006179	58 °C
forward	GCC ACC TGT GTC CTC CAC	142 bp	
reverse	GAG GAA AAG GAG GAG GAT GG		
<i>CNTF</i>		NM_000614	59 °C
forward	CAG GTG CAT TTT ACC CCA ACC	128 bp	
reverse	TTG CGG GGG ATC TTG TAT TCC		
<i>GDNF</i>		NM_000514	60 °C
forward	TGG CAG TGC TTC CTA GAA GAG	161 bp	
reverse	AAG ACA CAA CCC CGG TTT TTG		
sn forward	GTC TGC CTG GTG CTG CTC	138 bp	60 °C
<i>GFR-α1</i>		NM_005264	56 °C
forward	TGG AGG ATT CCC CAT ATG AA	160 bp	
reverse	TTC TTG CAA ATG TCG TCG AG		
<i>TNFR1</i>		NM_001065	59 °C
forward	ACC GGC ATT ATT GGA GTG AAA A	198 bp	
reverse	GGG GTA GGC ACA ACT TCG TG		
<i>TNFR2</i>		NM_001066	60 °C
forward	CGC TCT TCC AGT TGG ACT GAT	105 bp	
reverse	CAC AAG GCC TTC TTT TTC A CCC T		
<i>Lif</i>		NM_002309	59 °C
forward	GTA CCG CAT AGT CGT GTA CCT	112 bp	
reverse	CAC AGC ACG TTG CTA AGG AG		
<i>NGFb</i>		NM_002506	59 °C
forward	AGG GAG CAG CTT TCT ATC CTG	185 bp	
reverse	GGC AGT GTC AAG GGA ATG C		
<i>RPL19</i>		NM_000981	58 °C
forward	AGG CAC ATG GGC ATA GGT AA	199 bp	
reverse	CCA TGA GAA TCC GCT TGT TT		

T_a = Annealingtemperatur

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies, Klonalität	Hersteller
GFR- α 1	1 : 200 (IHC)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
PAR-2	1 : 100 (IZC)	Maus, monoklonal	Invitrogen, Karlsruhe
proNGF	1 : 50 (IZC), 1 : 400 (WB)	Kaninchen, polyklonal	Alomone, Jerusalem, Israel
NGFb	1 : 100 (IZC), 1 : 500 (WB)	Kaninchen, polyklonal	Chemicon, Temecula, CA

Tabelle 10: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies/Markierung	Hersteller
α -Kaninchen	1 : 500	Ziege, Biotin	Dianova, Hamburg
α -Maus	1 : 500	Ziege, Biotin	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen	1 : 5000	Ziege, POX	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen	1 : 200	Ziege, FITC	Dianova, Hamburg
α -Maus	1 : 200	Ziege, FITC	Dianova, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 *Isolation von HTPCs aus humanen Hodenbiopsien*

Patienten mit Spermatogenesestörungen oder mit einer Vasektomie, welche sich einer Religationsoperation unterzogen, wurden mittels diagnostischer Hodenbiopsien auf histomorphologische Veränderungen untersucht. Die Refertilisierungsoperation diente der vollständigen Rekonstruktion der zuvor in einer Vasektomie unterbundenen Samenleiter (Ductus deferentes). Die diagnostische Hodenbiopsie soll vor der Rekonstruktionsoperation ausschließen, dass sich manifeste Fertilitätsstörungen entwickelt haben, die durch Autoantikörperbildung und Fibrosierung entstehen können (312,313).

Vor Beginn der durchgeführten Experimente gab die Ethikkommission der Technischen Universität München sowohl für die Kultivierung als auch für das weitere experimentelle Arbeiten an diesen humanen peritubulären Zellen ihr Einverständnis. Die gewonnenen Hodenbiopsien wurden teils fixiert und für Gewebeuntersuchungen weiterverarbeitet oder direkt nach der Entnahme in Erstkulturmedium (Tabelle 7) überführt. Die Biopsiestücke wurden unter sterilen Bedingungen mit Pinzetten in 6 - 8 kleinere Explantate zerkleinert und anschließend mit kalzifiziertem humanem Plasma (835 µl humanes Plasma + 167 µl 0,5 M CaCl₂) auf den Boden von Kulturschalen festgeklebt. Nach ca. 12 h wurden die Stückchen mit Erstkulturmedium überschichtet und bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

In der folgenden Kulturperiode wurde jeweils alle 3 - 4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle konnte das Auswachsen der Zellen am Rande der Biopsien beobachtet werden und nach etwa drei Wochen Kultivierungsdauer erfolgte das Entfernen der Biopsiestückchen und eine Umstellung auf Kulturmedium (Tabelle 7, DMEM Medium + 10 % FCS). Die so gewonnenen Zellen wurden nach einem kommerziellen Mycoplasmentest entweder weiter passagiert und für folgende Versuche verwendet, oder für spätere Experimente in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (2.2.1.4).

2.2.1.2 Kultivierung von HTPC/-Fs

Die Kultivierung der aus den Hodenbiopsien isolierten adhären Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung in entsprechenden Kulturgefäßen, überschichtet mit DMEM High Glucose Medium mit L-Glutamin Zusatz. Um die Wachstumsbedingungen für diese Zellen optimal zu gestalten wurde dem Standardmedium zusätzlich 10 % FCS (fetales Kälberserum) zugesetzt. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei bis vier Tage. Alle Arbeiten mit den

Zellen fanden unter keimarmen Bedingungen statt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium (+ 10 % FCS) abgesaugt und die Zellen wurden dann zwei Mal mit DMEM-Medium gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes mit 1,5 ml (je 60 mm Schale) bzw. 5 ml (je 75 cm² Flasche) Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 4 min wurde die Trypsinreaktion mit der jeweils doppelten Menge Kulturmedium (+ 10 % FCS) gestoppt und bei 1000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf weiter kultiviert, in entsprechende Kulturschalen oder Mikrotiterplatten für Versuche ausgesät, oder für spätere Versuche eingefroren (2.2.1.4)

2.2.1.3 Test auf Mycoplasmenkontamination

Dieser Test läuft auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion ab und dient der Überprüfung der Zellkulturen auf Infektionen durch Mycoplasmen. Diese intrazellulären Parasiten können Einfluss auf die Genexpression und das Verhalten der Zellen nehmen. Die verwendeten Zellen wurden mit spezifischen Primern für einen Abschnitt der 16S rRNA-Region des Mycoplasmen-genoms standardmäßig auf Kontaminationen mit Mycoplasmen untersucht. Nachdem die Zellen eine 90 - 100 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und mit einem kommerziellen Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 270 bp und konnte mittels Gelelektrophorese (2.2.2.7) sichtbar gemacht werden.

2.2.1.4 Das Einfrieren und Auftauen der HTPC/-Fs

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte durch Kryokonservierung und Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie zuvor beschrieben trypsiniert und gezählt, das Medium wurde durch Zentrifugation (1000 rpm, 3 min)

abgetrennt und entfernt. Die Zellen wurden in Einfriermedium in einer Endkonzentration von 2×10^6 bis 2×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen mit Schraubdeckel abgefüllt und invertiert. Die Röhrchen wurden im vorgekühlten Mr Frosty über Nacht bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und anschließend zur Lagerung in den flüssigen Stickstoff überführt.

Nach Entnahme der Zellen aus dem Stickstoff wurde das Zellaliquot möglichst schnell bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 1000 rpm für 3 min abzentrifugiert, um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf vorbereitete Schalen oder Flaschen ausgesät.

2.2.1.5 Stimulation der HTPC/-Fs

Die Stimulation der Zellen erfolgte in 60 mm Schalen. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Einen Tag vor Beginn der Stimulation wurde das Kulturmedium (+ 10 % FCS) gegen ein Phenolrot-freies Medium ohne FCS ausgetauscht. Durch das serumfreie Medium befinden sich alle Zellen im gleichen Zellzyklusstadium und es ist so kein Störfaktor für die Assays vorhanden. Am darauf folgenden Tag erfolgte dann die Stimulation mit den jeweiligen Substanzen für einen festgelegten Zeitraum. Unstimulierte Zellen erhielten als Kontrolle das jeweilige Lösungsmittel der eingesetzten Substanz in entsprechender Konzentration.

2.2.1.6 Isolation von Hamster-Leydigzellen

Die Leydigzellen wurden nach einem etablierten Verfahren von syrischen Hamstern (*Mesocricetus auratus*) isoliert (100). Zunächst wurden die Hoden von Fettgewebe und Nebenhoden getrennt und die Kapsel entfernt. Jeweils acht der so präparierten Hoden wurden dann zum Lösen des Hodengewebes mit 0,2 mg/ml Kollagenase in 3 ml Medium M199+ für

10 min bei 34 °C inkubiert. Um die Kollagenasereaktion zu stoppen wurden 30 ml M199+ zugegeben und 1 - 2 min gewartet, bis sich die Tubuli vom Interstitium abgesetzt haben. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch einen Zellfilter in ein neues Gefäß überführt, um die Tubuli endgültig von den interstitiellen Zellen abzutrennen. Die so erhaltene Suspension interstitieller Zellen wurde nun für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet wurde zum Erythrozytenverdau in 3 ml NH₄Cl (in Tris-HCl 1,7 mM, pH 7,2) für 7 min bei 34 °C inkubiert und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurden dann in 2 ml M199+ resuspendiert, mit 100 µl DNase (1,25 mg/ml M199+) versetzt, und auf einen vorbereiteten Percollgradienten (unten: 3 ml 90 % Percoll in F10 10X, oben: 3 ml 40 % Percoll) mit dem gesamten Volumen überschichtet und der Ansatz für 30 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach dieser Behandlung befanden sich die Leydigzellen in der 1,06 - 1,12 g/ml Dichtefraktion. Der Überstand wurde nun verworfen und dann die Leydigzellschicht aus der Interphase abgetragen und in ein neues Gefäß überführt. Die Zellen wurden nun in 15 ml M199+ aufgenommen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden von mehreren Ansätzen gepoolt und in 1 ml M199+ resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt (2.2.1.7).

2.2.1.7 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl von isolierten Leydigzellen sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und 1 : 25 mit M199+ verdünnt.

Bei der hier verwendeten Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, auf dessen Oberfläche neun jeweils 1 mm² große Quadrate eingraviert sind. Die vier Eckquadrate sind wiederum in je 16 Kleinquadrate unterteilt. Die Kammertiefe zwischen Objektträger und

Deckglas hat einen Abstand von 0,1 mm. Das Volumen jedes der vier Eckquadrate beträgt also $\frac{1}{10^4}$ ml. Von der verdünnten Zellsuspension wird nun ein Tropfen an den Rand des Deckglases gegeben, Kapillarkräfte saugen die Flüssigkeit in die Kammer. Ausgezählt werden alle vier großen Eckquadrate, und aus den Zählungen wird der Durchschnitt gebildet.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl = Mittelwert · Kammerfaktor · 10^4 · Verdünnungsfaktor · Ausgangsvolumen

2.2.1.8 Kultur und Stimulation von adulten Hamster-Leydigzellen

Die isolierten Leydigzellen wurden in 24-Well Platten in M199+ (pH 7,2) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach der Isolierung wurden die Zellen nach einer Absetzungsphase von 30 min für 3 h mit Iberiotoxin (100 mM), hCG (100 mIU/ml) oder einer Kombination beider Stimulanzen in M199+ stimuliert. Anschließend wurde der Überstand zur Testosteronmessung entnommen, um Zellen zu entfernen für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert, in ein neues Gefäß überführt und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.2 beschrieben zur RNA Extraktion weiterverarbeitet und in cDNA (2.2.2.4) umgeschrieben.

2.2.1.9 Kultivierung und Stimulation von PC12 Zellen

PC12 Zellen werden genau wie HTPC/-Fs im Stickstoff gelagert. Nach schnellem Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C werden sie in 5 ml RPMI aufgenommen und bei 1000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Danach wird das Zellpellet in RPMI (+ 10 % Pferdeserum, 1 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat) resuspendiert und auf vorbereitete Schalen oder Flaschen dünn ausgesät.

Zur Stimulation der Zellen wurden 50 % RPMI-Kulturmedium mit 50 % DMEM-Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben. Dabei wurde

für die zu behandelten Zellen DMEM-Medium verwendet, mit welchem HTPC/-Fs für 3 Tage überschichtet waren.

2.2.1.10 CASY - automatische Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

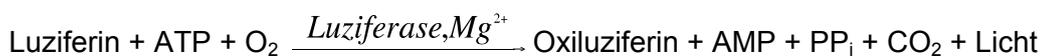
Um Veränderungen auf Zellebene und Proliferationsänderungen zu erfassen, wurde ein automatisches Zellzahlgerät verwendet. Das CASY-System ist ein automatisiertes Verfahren, das auf Basis von elektrischen Widerstandsänderungen durch die Lipidmembran sowohl Integrität der Zellmembran, Zellvolumenmessungen als auch Zellzahlbestimmungen in einem Messschritt bestimmen kann. In einer feinen Kapillare verdrängen intakte Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung. Zusätzlich entsteht bei jedem Zelldurchtritt durch die Kapillaröffnung ein elektrischer Impuls. Die resultierende Widerstandsänderung ist ein Maß für die Zellgröße.

In Vorversuchen wurde ein Profil typischer HTPC-Parameter (Zelldurchmesser, Kerngröße und Zelldebrisgröße) bestimmt, anhand dessen eine Aussage über die Anzahl toter Zellen, Debris, vitale Zellpopulationen, Volumen und Durchmesser getroffen werden.

Für die Messung wurden die Zellen nach erfolgter Stimulation trypsinisiert und das dabei gewonnene Zellpellet wurde daraufhin in 1 ml DMEM Medium resuspendiert. Ein Volumen von 100 µl dieser Suspension wurde in 10 ml Casyton (Messlösung) verdünnt. Die Messungen wurden von dem Gerät selbsttätig wiederholt, automatisch für den entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert und die gemittelten Werte in Form eines Messdiagramms wiedergegeben. Unterschiede zwischen unbehandelten (Kontrolle) und behandelten Proben wurden mit der Software Graphpad Prism (Version 4.0a) graphisch dargestellt und auf statistische Signifikanz überprüft.

2.2.1.11 ATP-Assay

Der CellTiter-Glo[®]-Test quantifiziert die Menge ATP, die bedingt durch metabolische Aktivität in vitalen Zellen zu dem Zeitpunkt des Tests im Well vorhanden ist. Nach Lyse der Zellen und Freisetzung des ATP wird dieses in einer Luziferase-katalysierten-Reaktion mit Luziferin zu Oxyluziferin umgesetzt, was die Bildung eines Lumineszenzsignals bewirkt, welches mit einem Luminometer erfasst und quantifiziert werden kann:



Der Assay wurde als funktioneller Test eingesetzt, um die Wirkung von Tryptase und SLIGKV auf HTPC/-Fs zu ermitteln.

Hierfür wurde jeweils eine feste Zellzahl in 200 µl Medium pro 24-Well-Platte ausgesät. Parallel wurden Hintergrundkontrollen angesetzt, die nur Medium ohne Zellen enthielten. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit den entsprechenden Reagenzien stimuliert. Nach 24 h Inkubation mit den Stimulanzien wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Testreagenz und 100 µl Medium pro Well lysiert und die Luziferase-Reaktion gestartet. Nach Zugabe des Testreagenz wurde die 24-Well Platte für zwei Minuten auf einen Schüttler gestellt und anschließend zur Stabilisierung des Chemolumineszenz-Signals 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Inhalte der 24-Well Platten wurden anschließend in eine 96-Well Platte überführt und die Lumineszenz am Fluostar gemessen. Jede einzelne Probe wurde viermal angesetzt und gemessen. Aus den sich ergebenden Vierfach-Werten wurde ein Mittelwert gebildet, nachdem von allen Einzelwerten die Hintergrundlumineszenz abgezogen wurde. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu Kontrollwerten, welche aus Zellen bestimmt wurden, die nur mit Kulturmedium inkubiert wurden.

2.2.1.12 Ca^{2+} -Imaging

Qualitative Änderungen intrazellulärer Ca^{2+} -Niveaus nach Verabreichung von Stimulanzen wurden in HTPC/-Fs mit Hilfe des Ca^{2+} -bindenden Farbstoffs Fluo-4 AM gemessen. Die Zellen wurden am Tag vor der Messung auf runden, unbeschichteten Deckgläschen von 12 mm Durchmesser ausgesät und bis zur Adhäsion in DMEM High Glucose Medium (+ 10 % FCS) kultiviert. Zur Beladung der Zellen wurde das Glasplättchen in ein 30 mm Kulturschälchen überführt und mit Kulturmedium (+ 10 % FCS), das 5 μ M Fluo-4 AM (0,1 % DMSO) enthielt, überschichtet. Nach Inkubation der Zellen mit dem Pentaacetoxy-Methylester (Fluo-4 AM) gelangt die Verbindung in die Zellen und wird dort hydrolysiert. Die Hydrolyse verhindert einerseits das Wiederaustreten des Farbstoffes und ist andererseits notwendig, damit er durch Bindung von Ca^{2+} zur Fluoreszenz befähigt wird. Fluo-4 zeigt nach Bindung an Ca^{2+} ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 516 nm. Die Intensität der Emission ist abhängig von der Menge an gebundenem Ca^{2+} und eignet sich daher als Indikator für intrazelluläre Kalziumkonzentrationen. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase bei 37 °C im Begasungs-Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend in eine Messkammer, welche bereits 1 ml Medium enthielt, umgesetzt. Die Kammer wurde anschließend auf dem Trägertisch des konfokalen Mikroskops befestigt. Nach dem Start der Messung wurde gewartet bis die Zellen ein gleichmäßiges Signal zeigten, bevor das entsprechende in Medium gelöste Stimulanz mit Hilfe eines Mikropumpensystems angespült wurde. Alle Lösungen, mit denen die Kulturen überspült wurden, waren auf 37 °C vortemperiert. Unter Nutzung des Durchlichtes wurde bei 20-facher Vergrößerung ein Areal (Gesichtsfeld von 10 - 100 Zellen)

ausgewählt und von diesem wurde mit einem luftgekühlten Argon-Laser-System bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm über einen Zeitraum von ca. 15 min alle 2 s von einem Scanner-System bei 500 - 540 nm ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Die Anregungsintensität, der Durchmesser der Lochblende, die Sensitivität des Detektors und sonstige Einstellungen des Konfokalmikroskops wurden für alle Experimente konstant gehalten. Veränderungen der Fluoreszenzsignale wurden mit der Leica Confocal Software v2.6.1 ausgewertet. Um die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen zu ermitteln, erfolgte hierzu eine Analyse der Pixelintensitäten in ausgewählten Arealen einzelner Zellen (Regions of interest, ROIs). Die so gewonnenen Datensätze wurden anschließend in das Programm Graphpad Prism exportiert und visualisiert.

2.2.1.13 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie dient dem qualitativen Nachweis von intrazellulär gebildeten Proteinen, welche sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär vorliegen können. Zu diesem Zweck werden die zuvor auf Deckgläschen oder Objektträgern fixierten Zellen mit den entsprechenden Antikörpern überschichtet und die Antikörper-Protein-Bindungen anschließend durch fluoreszierende oder biotinylierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Die HTPC/-Fs wurden hierfür zunächst abtrypsiniert und auf runde Deckgläschen ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurden diese mit DMEM Kulturmedium überschichtet und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen 2 x mit PBS gespült und mit 4 % Formaldehyd (pH 6,8) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen 3 x für jeweils 5 min mit PBS (pH 7,4) und anschließend 3 x für je 10 min mit KPBS gewaschen. Die 10-minütige Inkubation mit LKPBS diente der Permeabilisierung der Zellmembran durch das nichtionische Detergenz Triton-X100 und der Absättigung unspezifischer

Bindungsstellen durch Zusatz von 2% Ziegenerum. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in LKPBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am darauf folgenden Tag wurden die Deckgläschen 3 x für 10 min mit KPBS gespült und für 10 min mit LKPBS überschichtet. Danach erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit dem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper (1 : 200 verdünnt in LKPBS) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach 3 x Waschen mit KPBS und 1 x mit H₂O bidest jeweils für 10 min wurden die Deckgläschen mit dem ProLong antifade Kit auf Objektträgern aufgebracht und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

Um ein unspezifisches Signal des Zweitantikörpers unter dem Mikroskop auszuschließen, wurden als Negativkontrollen Zellen mitgeführt, welche anstatt mit Primärantikörpern mit LKPBS inkubiert waren.

2.2.1.14 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode zur spezifischen Markierung von Proteinen mittels Antikörper (AK), welche mit einem Detektionssystem kombiniert werden, so dass lichtmikroskopisch erkennbar wird, ob bzw. wo in diversen Zellarten und Geweben ein fragliches Protein vorhanden ist. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Affinität des Primärantikörpers zu verschiedenen Antigen determinanten auf dem Gewebeschnitt. Als Grundlage der ABC-Färbemethode dient die Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden, wodurch der so genannte Avidin-Biotin-Komplex entsteht. Meist lagern sich jedoch weniger als vier Moleküle Biotin an, so dass am Komplex in der Regel noch Biotin-Bindungsstellen unbesetzt bleiben. Der Sekundärantikörper, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet, ist an seinem Fc-Teil mit Biotin konjugiert. An dieses bindet schließlich der Avidin-Biotin-Komplex mit seinen freien Biotin-Bindungsstellen. Schließlich

wird ein Chromogen hinzugefügt, welches sich an das Enzym anlagert und präzipitiert. Dadurch kommt es zu einer Farbreaktion an der Stelle des Antigens, dessen Intensität von der Menge des vorhandenen Antigens abhängig ist und unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden kann.

Paraffinschnitte von Hoden-Gewebe wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkohol-Reihe (4 x Xylol, 2 x Isopropanol 100 %, Isopropanol 96 % / 80 % / 70 %; jeweils 3 min) entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 2 x für 10 min in PBS gewaschen. Da eine Fixierung von Gewebeproben in Formalin und die anschließende Einbettung in Paraffin zu Aldehydvernetzungen, Denaturierungsvorgängen und Bildung von Hydroxymethylenbrücken zwischen den basischen Aminosäuren der Epitope führen kann, wurde eine Demaskierung der Antigene durch 20 minütiges Kochen in Citratpuffer in einer Mikrowelle durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte in einem Gemisch aus 9 ml Stammlösung A, 41 ml Stammlösung B und 450 ml H₂O bidest in einem mikrowellengeeigneten Plastikgefäß mit Deckel für 15 Minuten bei 800 W und für 10 Minuten bei 400 W in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Präparate für 20 Minuten in der Flüssigkeit abgekühlt hatten, wurden sie 3 x für je 5 min in PBS gewaschen. Die Objekte wurden anschließend mit einem Fettstift umrandet und die Lösungen tropfenweise auf den Schnitt aufgetragen, wobei so viele Tropfen verwendet wurden, dass der gesamte Schnitt bedeckt war. Die Inkubationen erfolgten bei RT in einer Feucht-Kammer, um ein Austrocknen zu vermeiden. Sämtliche Waschschrte erfolgten in Glasküvetten.

Die irreversible Hemmung der endogenen Peroxidase zur Verhinderung einer übermäßigen Hintergrundfärbung erfolgte über die 30 minütige Inkubation der Schnitte unter Schütteln in einer PBS Lösung, welche 3 % H₂O₂ und 9 %iges Methanol enthielt. Anschließend wurde für 3 x 5 min mit

PBS-Puffer gewaschen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden mit 5 % Ziegen-Normalserum bei Raumtemperatur in PBS für 30 min blockiert. Nach Abkippen der Blockier-Lösung wurde über Nacht bei 4 °C mit dem verdünnten Primärantikörper (in PBS mit 5 % Normalserumerum) inkubiert, welcher spezifisch an verschiedene Antigen-determinanten auf dem Gewebeschnitt bindet. Um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zu überprüfen wurde bei einem der Schnitte der Antikörper weggelassen. Nach 3-maligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Schnitte für 2 h mit 1 : 500 verdünntem biotinyliertem Sekundärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet. Anschließend wurde 3 x für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Nun erfolgte für 30 min eine Inkubation mit dem ABC-Reagenz. Nach 2 x Waschen für jeweils 5 min in PBS und 1 x für 10 min mit Tris-Puffer/HCl (50 mM, pH 7,6) wurden die Schnitte mit dem chromogenen Substrat Diaminobenzidin (DAB) für höchstens 10 min gefärbt. Dabei wurde die durch die Peroxidase bewirkte braune Färbung unter dem Mikroskop beobachtet und bei gewünschter Intensität wurde die Reaktion durch Abwaschen des Objektträgers mit H₂O bidest abgestoppt.

Die Dehydrierung wurde mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe in 70 %-, 80 %-, 96 %- und 2 x in 100 %igem Isopropanol für jeweils 3 min und 3 x in Xylol für jeweils 5 min durchgeführt. Eingedeckt wurden die Schnitte mit Entellan.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Lasermikrodissektion

Das PALM MicroBeam-System ist ein Mikroskop, das mit Hilfe eines gepulsten UV-Lasers der Wellenlänge 337 nm präzise und mechanisch kontaktfreie Separation einzelner Zellen und definierter Gewebekompartimente aus histologischen Gewebeschnitten ermöglicht. Dieses Verfahren zeichnet sich durch ein hohes Maß an Kontaminationsfreiheit

der generierten Proben aus. Das Dissektieren der Gewebekompartimente erfolgt durch Fokussierung des Laserstrahls auf den Gewebeschnitt. Die gewünschte Schnittlinie des Lasers im Gewebeschnitt wird mit Hilfe einer geeigneten Software in dem vom Mikroskop erzeugten Bild eingezeichnet. Der Probentisch des Mikroskops bleibt dabei statisch, nur der Laser wird durch eine entsprechende Optik im Mikroskop bewegt. Die dissektierten Gewebeteile werden anschließend mit einem Laserimpuls in ein den mit adhäsivem Material benetztem Deckel eines Eppendorfgefäß katapultiert, welcher sich unmittelbar über dem Objektträger befindet.

Sind genügend Gewebekompartimente gesammelt, können diese bis zur Extraktion der RNA bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.2.2.2 Isolierung von Total-RNA

Zur Extraktion von Total-RNA aus HTPCs wurde das RNeasy Plus Mini Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Je nach Schalengröße wurden die Zellen in 350 µl oder 600 µl RLT-Puffer (+ 1 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mehrmals durch eine Spritze mit feiner Nadel gezogen, um eine bessere Auflösung der Zellmembran zu gewährleisten. Zur Herstellung optimaler Bindungsbedingungen wurden dem Lysat 70 % Ethanol im Volumenverhältnis 1 : 1 beigemischt, auf eine RNeasy-Spinsäule überführt und bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert. Dabei bindet die enthaltene RNA selektiv an eine sich in der Säule befindende Silicagel-Membran, an die RNA-Moleküle von über 200 Basenpaaren Länge nichtkovalent und pH-abhängig binden. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, folgen drei Waschschriffe um die RNA aufzureinigen, wobei als erstes mit 700 µl RW1-Waschpuffer 15 s bei 10.000 rpm, dann zwei Mal mit jeweils 500 µl RPE-Waschpuffer für 15 s und beim letzten für 2 min gewaschen wird. Der Durchfluss wird nach jedem Waschschrift verworfen und die Säule danach auf ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt. Die Säule wurde danach für 1 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert, auf ein neues 1,5 ml

Reaktionstube gesetzt und die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm eluiert. Die Konzentration der gewonnenen RNA-Lösung wird danach photometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verarbeitung im -80 °C Tiefkühlschrank gelagert.

2.2.2.3 Photometrische Vermessung der RNA-Konzentration

Das Absorptionsmaximum von Ribonukleinsäuren liegt bei 260 nm. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurden im Biophotometer Spectrophotometer 2 µl von jeder Probe vermessen. Dabei wurde der BLANK-Wert mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Außerdem wird darauf geachtet, dass das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm eine Ratio von 1,9 - 2,1 hat, was auf die Reinheit der RNA hinweist. Liegt der ermittelte Wert darunter, ist die Probe durch Proteine verunreinigt, liegt der Wert darüber, liegen Phenol-Verunreinigungen vor.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts war nötig, um in der anschließenden reversen Transkription jeweils die gleiche Ausgangsmenge an RNA zu verwenden, was vor allem für die semiquantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse von Bedeutung war.

2.2.2.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR lassen sich hochspezifisch RNA-Transkripte nachweisen, um die Genexpression in Kulturzellen über die Synthese von cDNA zu messen. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Dafür werden Random-Primer mit verschiedenen Nucleotidabfolgen eingesetzt, welche zufällig an die gesamte RNA binden. Nach dem Annealing der Primer bindet die Reverse Transkriptase und synthetisiert zunächst ein DNA/RNA-Hybridmolekül. Durch die zusätzliche RNaseH-Aktivität der Reversen Transkriptase wird der RNA-Anteil dieses Hybrids degradiert und die nun einzelsträngige DNA zum Doppelstrang komplettiert.

Für die cDNA-Synthese wurden alle Pipettierschritte auf Eis durchgeführt. Als erstes wurden 400 ng mRNA mit 1,6 µl Random 15-mer Primern versetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 23 µl gebracht. Nach Annealing der Primer an die mRNA-Stränge für 10 min bei 70 °C und Inkubation der Probe für 5 min bei 25 °C wurde folgender Ansatz für die cDNA-Synthese hinzu pipettiert:

- 8 µl 5 x first strand buffer
- 4 µl 0,1 M DTT
- 2 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl RNasin Plus RNase Inhibitor 40 units/µl

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend auf 42 °C erhitzt. Mit der Zugabe von 2 µl des Enzyms SuperScript II RNase wurde die reverse Transkription für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt und danach für 10 min auf 4 °C abgekühlt.

Die cDNA konnte anschließend für bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Entdeckung und Isolierung der thermostabilen DNA-Polymerase Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (314) wurde die Voraussetzung geschaffen, um bestimmte cDNA-Sequenzen mit hoher Spezifität und Ausbeute bei einer stringenten Temperatur von 72 °C mit der PCR zu amplifizieren. In der Polymerasen-Kettenreaktion wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase genutzt, matrizenabhängig neue DNA-Stränge zu synthetisieren durch Katalysieren einer schrittweisen Addition von frei vorliegenden Desoxyribonukleotid-Einheiten (dNTPs) an eine DNA-Kette.

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die selektive Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente, wobei nach einem Denaturierungs-

schritt zwei synthetische einzelsträngige Oligonukleotide aus 20 - 30 bp an komplementäre Sequenzen der Matrize binden. Ausgehend von den freien 3'-Enden der Oligonukleotide hängt dann eine thermostabile Polymerase in 5'-3'-Richtung freie Desoxyribonukleotide an den neuen Doppelstrang. Durch das zyklische Wiederholen von Denaturierung, Hybridisieren neuer Oligonukleotide und Polymerisation erfolgt eine exponentielle Amplifikation des Ausgangsmaterials.

Die durch RNA-Extraktion (2.2.2.2) und RT-PCR (2.2.2.4) gewonnene cDNA wurde mit Hilfe spezifischer Primer in der PCR untersucht. Diese entstammen entweder der Harward Primerdatenbank (www.pga.mgh.harward.edu/primerbank) oder wurden mit Hilfe der Opensource Software Primer3 (www.frodo.wi.mit.edu) hergestellt. Einen Überblick über die verwendeten Primer, welche von der Firma Metabion (Martinsried, München) gereinigt und lyophilisiert zur Verfügung gestellt wurden, zeigt die Tabelle 8. Dabei wurden die Sequenzen so gewählt, dass alle Primer intronspannend sind, um genomische Verunreinigungen ausschließen zu können.

Als Positivkontrollen dienten cDNA aus Hoden und Gehirn, welche bei der Firma ClonTech käuflich erworben wurden, als Negativkontrolle wurde DEPC-H₂O bzw. ein RNA-Pool von HTPCs und HTPC-Fs anstatt cDNA verwendet. Die PCR Reaktion wurde mit einem Kit der Firma Promega durchgeführt und der Mastermix nach folgendem Ansatz pipettiert:

Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl

Reagenz	Volumen
5 x GoTaq-Buffer	5 μl
dNTPs [2 mM]	5 μl
Primer forward [μM]	1 μl
Primer reverse [μM]	1 μl
DEPC-H ₂ O	31,75 μl
cDNA	1 μl
GoTaq-Polymerase	0,25 μl

Sämtliche Amplifikationsschritte erfolgten in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler und wurden mit dem in Tabelle 12 zusammengestellten Programm ausgeführt:

Tabelle 12: Temperaturprofil der PCR im Thermal Cycler

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	2 min
Amplifikation	25 - 35	95 °C	1 min
		52 - 61 °C	30 s
		72 °C	1 min
Finale Extension	1	72 °C	5 min

Die Proben wurden danach auf 4 °C heruntergekühlt und konnten nun für Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.7) verwendet werden. Überschüssige PCR-Produkte wurden bei -20 °C gelagert und konnten später zur Sequenzierung (2.2.2.8) benutzt werden.

2.2.2.6 Semiquantitative PCR

Die densitometrische Auswertung der Intensität der PCR-Banden erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ (Image J 1.36b, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Dabei wurde mit den selben Proben

eine PCR mit Primern für das Housekeeping-Gen Cyclophilin durchgeführt, dessen Protein für ein Mitglied der Familie der Peptidylprolyl trans-Isomerasen codiert. Diese Cyclosporin-Bindeproteine hemmen die T-Zell-vermittelte Immunantwort, katalysieren die Isomerisierung der cis-trans-Konformation und beschleunigen die Proteinfaltung (315,316). Die Intensitäten der jeweiligen PCR-Produkte wurden mit dem Programm ImageJ bestimmt, auf die des entsprechenden Cyclophilin-Produkts bezogen und anschließend mit dem sich auf diese Weise ergebenden Kontrollwert verglichen.

2.2.2.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und so analytische Aussagen treffen zu können wurde das Verfahren der Gelelektrophorese angewandt. DNA- und RNA-Moleküle bewegen sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, da ihre Phosphatgruppen im Rückgrat der Nucleinsäuren ionisiert sind und sie somit als Polykationen vorliegen.

In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2 % verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde die Metaphor-Agarose in 1 x TBE-Puffer eingewogen und nach 15 minütiger Quellzeit in der Mikrowelle bei 600 Watt aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach der Abkühlung des Gels auf 60 °C wurden 0,01 % Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugefügt, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und die DNA unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) durch Fluoreszenz ($\lambda = 590 \text{ nm}$) sichtbar macht. Nach vollständiger Auspolymerisierung des Gels wurden jeweils 10 μl der DNA-Proben in die Taschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden jeweils 6 μl Größenmarker aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer, bei einer Spannung von 90 V und einer Laufzeit von 35 min. Die durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz

der mit Ethidiumbromid angereicherten DNA-Banden wurde anschließend mit einem Kamerasystem detektiert und digitalisiert.

2.2.2.8 Sequenzierung

Bei jedem positiven PCR-Ergebnis wurde außerdem die Identität des Amplifikationsproduktes durch direkte Sequenzierung des restlichen PCR-Produktes oder durch Elution der DNA-Fragmente aus dem Gel und anschließender Aufreinigung von der Firma GATC mit Hilfe eines oder beider Primer sequenziert.

DNA-Fragmente, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können wieder mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von DNA an eine Silicanmembran in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Alle Verunreinigungen werden durch Waschen der Membran entfernt und die DNA mit Lösungen niedriger Salzkonzentration eluiert. Die verwendeten Puffer und Materialien wurden dem von Qiagen erworbenen Kit entnommen.

Die DNA wurde nach der PCR (2.2.2.5) auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt (2.2.2.7) und die Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen, in ein Eppendorfgesäß überführt, mit drei Volumina Puffer QG (1 g Gel \approx 1 ml) bei 50 °C im Heizblock gelöst und dabei einige Male gemischt. Nachdem sich das Gel vollständig gelöst hatte, wurde zum Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol gegeben und vorsichtig gemischt. Die DNA-haltige Lösung wurde auf eine Qiagen-Säule mit Silicagel pipettiert und diese 1 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Um die an das Silicagel gebundene DNA zu waschen, wurde die Säule zunächst mit 0,5 ml Puffer QG und anschließend mit 0,75 ml Puffer PE mittels Zentrifugation (je 1 min, RT-, 13.000 rpm) gespült. Es folgte eine weitere Zentrifugation (1 min, RT, 13.000 rpm), um den restlichen Puffer zu entfernen, bevor die DNA mit

50 µl Puffer EB durch Zentrifugation eluiert und in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen wurde.

Die Ergebnisse aller Sequenzierungen wurden mittels der BLAST-Software (basic local alignment search tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/seq/BlastGen) mit der in der Nukleotid-Datenbank GenBank gespeicherten Sequenzen verglichen.

2.2.2.9 Quantitative real-time PCR

Die quantitative Realtime PCR dient der hochspezifischen Quantifizierung von PCR-Produkten. Nach jedem Zyklus wird die Menge an gebildetem PCR-Produkt gemessen.

Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit Gelelektrophorese erfolgt hier die Detektion während der Amplifikation und nicht erst nach Abschluss der gesamten PCR. Das Kontaminationsrisiko ist geringer, da Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System stattfinden. Für die Detektion wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green verwendet, welcher sich unspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA während der Amplifikation einlagert. Der gebundene Farbstoff fluoresziert nach Anregung etwa 1000 Mal stärker als der nicht gebundene Farbstoff. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes, nach Anlagerung des Farbstoffes an die doppelsträngige DNA, gemessen. Da jedes PCR-Produkt aufgrund der Länge und des GC-Gehaltes bei einer charakteristischen Temperatur denaturiert, kann anhand einer Schmelzkurve zwischen verschiedenen PCR-Produkten differenziert werden. Dazu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam schrittweise bis auf ca. 95 °C erhöht, so dass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Diese Denaturierung hat den Abfall des Fluoreszenzsignals beim Schmelzpunkt zur Folge. Durch die Messung dieses Schmelzpunktes kann auf das vervielfältigte Produkt geschlossen werden. Die Wellenlänge zur

Anregung von SYBR Green liegt bei 480 nm (Blaulicht), das Emissionsmaximum bei 537 nm.

Zur Auswertung sollte eine Positivkontrolle, mit Referenzmaterial, und Negativkontrollen mitgeführt werden. Die Negativkontrolle enthält nur die für den Vorgang der Amplifikation benötigten Reagenzien.

Tabelle 13: Mastermix für die Realtime PCR von NGF

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Forward Primer [10 pmol]	1 µl	[0,5 pM]
Reverse Primer [10 pmol]	1 µl	[0,5 pM]
<i>SYBR Green Mix</i>	10 µl	[1x]

In eine Probenplatte wurden 12 µl Mastermix (s. Tabelle 13) zusammen mit 8 µl cDNA (1 : 50 mit DEPC-H₂O verdünnt) pipettiert. Die Proben wurden bei 2.000 rpm für 15 s zentrifugiert, um die Reaktionsansätze in den unteren Teil der Probenplatte zu bringen und Luftblasen zu eliminieren. Nach Einsetzen der Platte wurde in das Engine Opticon system, wurde das Amplifikationsprogramm gestartet (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Temperaturprofil der qRT-PCR im Engine Opticon system

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation	40	94 °C	10 s
		62 °C	30 s
		72 °C	30 s
		78 °C	1 s
		72 °C	10 min
Finale Extension	1	72 °C	10 min
Kühlen	1	10 °C	for ever

Zur Normalisierung der quantitativen Analyse der Genexpression diene das humane 60S ribosomale Protein L19. Dieses codiert für ein House-keeping-Gen, dessen Expression unabhängig von äußeren Einflüssen konstant bleibt.

Hierzu wurden ebenfalls 12 µl Mastermix (s. Tabelle 15) zusammen mit 8 µl cDNA (1 : 50 verdünnt) in ein Well gegeben.

Die PCR des Housekeeping-Gens lief unter folgenden Bedingungen ab:

Tabelle 15: Temperaturprofil für L19

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation	40	94 °C	10 s
		58 °C	30 s
		72 °C	30 s
		78 °C	1 s
		72 °C	10 min
Finale Extension	1	72 °C	10 min
Kühlen	1	10 °C	for ever

Der PCR-Verlauf lässt sich in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase) und eine Plateau-Phase. In der frühen Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. Nach einer bestimmten Zyklenzahl heben sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts signifikant von den Hintergrundsignalen ab. Diese Überschreitung der Schwelle wird von der Software als Crossing Point (Cp) erkannt. Somit lassen sich über die Crossing Points vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an cDNA gemacht werden.

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte automatisch über die Fluoreszenzdaten. Diese Analyse erfolgte über den so genannten Ct-Wert

("threshold cycle"). Dieser drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen ermittelt wird. Das Programm gibt automatisch die Menge der amplifizierten cDNA an. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmungen vermessen woraus der Mittelwert berechnet wurde und mit den Mittelwerten des Housekeeping-Gens ins Verhältnis gesetzt wurde. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 4.0a.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinisolation

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (317). Hierbei bindet SDS Proteine zu einem vielfach negativ geladenen SDS-Protein-Komplex. Zusätzlich denaturiert SDS die Proteine und verhindert die Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Somit ist eine Auftrennung der Proteine im Netzwerk des Acrylamidgels von Kathode zu Anode möglich, die nur vom Molekulargewicht der Proteine abhängig ist. Hochmolekulare Proteine werden hierbei in einem niedrigprozentigen Acrylamidgel aufgetrennt, niedrigmolekulare in einem höher prozentigen Gel. Ein niedrigprozentiges Sammelgel, in dem die Proteine räumlich gesammelt werden, überschichtet das Trenngel, in dem dann die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

HTPCs in Petrischalen (Ø 60 mm) wurden nach abgelaufener Stimulation bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Zur Gewinnung des Proteins wurden die Zellen mit 1,5 ml NPE-Puffer unter Verwendung eines Zellschabers von den Petrischalen gekühlt abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 4 °C und 10000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml PBS (1 x) resuspendiert und

erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Inhibitorcocktail aufgenommen und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen.

Um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen, wurde der DC Protein Assay verwendet, der auf der Bradford-Methode basiert. Die Absorption einer Standardreihe von Lösungen mit definierter Proteinkonzentration und der Proben wurden bei 650 - 750 nm in einem Elisa-Reader gemessen. Anschließend wurden die Proben mit 10 % β -Mercaptoethanol und 10 % Bromphenolblau versetzt und für 5 min auf 95 °C erwärmt, um Disulfidbrücken der Proteine zu spalten.

2.2.3.2 Proteinisolation aus Zellkulturüberständen

Die Überstände von HTPC/-Fs wurden nach 24 stündiger Inkubation mit farblosem Medium abgenommen und für weitere 24 h mit 1000 ng/ml Tryptase versetzt oder direkt weiterverarbeitet. Zur Aufkonzentrierung des in den Überständen vorhandenen Proteingemisches wurden 4 ml des Überstandes auf Amicon Ultra Säulen gegeben und bei 3500 x g für 45 min zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben mit 10 % β -Mercaptoethanol und 10 % Bromphenolblau versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Disulfidbrücken der Proteine zu spalten.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander gegossen und setzen sich wie folgt zusammen:

Tabelle 16: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
Acrylamid 30 % [μ l]	2700	4000	540
Sammelgelpuffer [μ l]	-	-	1250
Trenngelpuffer [μ l]	2500	2500	-
H ₂ O bidest [μ l]	4500	3200	3000
Ammoniumpersulfat [μ l]	75	75	38
Natriumdodecylsulfat [μ l]	100	100	50
N,N,N',N',Tetramethylenethylendiamin [μ l]	12,5	12,5	6,5

15 μ g Protein wurden auf das Gel aufgetragen bzw. bis zum Auftrag bei -20 °C gelagert. Überstieg auf Grund einer geringen Proteinkonzentration das Probenvolumen die maximale Füllmenge der Geltasche von 20 μ l, so wurde die Probe durch Erhitzen auf 95 °C in einem offenen Eppendorfgefäß eingengt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x Laemmlipuffer bei 120 V für etwa 1 h. Ein gleichzeitig auf das Gel aufgetragener Molekulargewichtsmarker diente zur Identifizierung der gesuchten Proteinbande.

2.2.3.4 Transferblotting und Antikörperinkubation

Im Western Blot Verfahren wurden nun die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch nachgewiesen. Dazu werden die in der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert. Auf dieser Membran können dann durch Zugabe spezifischer Primärantikörper und Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper einzelne Proteine aus dem Proteingemisch sichtbar gemacht werden (318,319).

Vor dem Aufbau des Blots wurden Membran und Gel für 15 min in Transfer-Puffer bei Raumtemperatur äquilibriert. Der gesamte Blot wurde

luftblasenfrei in die Blotkammer gestellt, die Kammer mit Transfer-Puffer gefüllt und anschließend wurden die Proteine im elektrischen Feld bei 100 V für 1 h auf eine Nitrocellulosemembran in Transfer-Puffer transferiert. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine reversible Färbung des Gels mit Ponceau S Lösung kontrolliert. Anschließend wurde die Membran für 30 min Stunde bei Raumtemperatur in Milchpulver (5 % in TBS-Tween) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper in Milchpulver (0,5 % in TBS-Tween) erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zu überprüfen, wurde der Erstantikörper durch das Peptid, das zur Immunisierung verwendet worden war, präadsorbiert. Hierzu wurde der Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur mit der gleichen Menge an Peptid inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 5 Minuten mit der abzentrifugiert. Der Überstand wurde wie der entsprechende Antikörper verdünnt.

Am nächsten Tag wurde der Blot für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt und die Membran 3 x für je 5 min in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1 : 5000 in Milchpulver (0,5 % in TBS-Tween) unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen (3 x 5 min in TBS-Tween).

2.2.3.5 ECL-Detektion

Die Visualisierung des Signals erfolgte mit dem „SuperSignal West Femto“-Kit nach Angaben des Herstellers und mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems Chemi-Smart 5000 und des Programms ChemiCapt.

2.2.3.6 Enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA)

Ein ELISA ist ein serologischer Test, bei dem Antikörper-gebundene Antigene nach Farbumsatz einer zunächst farblosen Lösung durch ein

gekoppeltes Enzym nachgewiesen werden. Eine 96 Loch Mikrotiterplatte wird dazu mit dem jeweiligen „capture“-Antikörper beschichtet und anschließend werden die noch bindungsaktiven Areale durch eine proteinhaltige Pufferlösung für unspezifische Bindungen blockiert. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung bzw. den jeweiligen Standards und anschließendem, sorgfältigem Waschen der Platte wird das an den „capture“-Antikörper gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem „detection“-Antikörper, nachgewiesen. Bei unmarkierten „detection“-Antikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den „detection“-Antikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Die Menge an gebundenem, enzym-markiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt. Durch die Erstellung einer Standardkurve mithilfe eines in definierten Konzentrationen eingesetzten Standards ist es möglich, die Konzentration der vermessenen Proben in ng/ml zu bestimmen.

2.2.3.6.1 NGF-ELISA

Zur spezifischen Detektion des Gehaltes an freiem NGF wurde von Zellkulturüberständen ein E_{max} NGF ELISA durchgeführt. Hierfür wurden Zellen mit Tryptase (10, 100, 1000 ng/ml) bzw. SLIGKV (10, 100 μ M) für jeweils 24 h in 60 mm Kulturschalen serumfrei stimuliert und die Überstände bei -20 °C bis zur Durchführung des Assays gelagert. NGF-Werte wurden später mit den Kontrollproben ohne das jeweilige Stimulanz verglichen. Aus den Zellen wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben das Protein präpariert und dessen Konzentration bestimmt. Diese Werte wurden später in der Auswertung als Referenzgröße verwendet.

Zuerst wurden die Vertiefungen einer 96-Well Maxisorp Platte mit dem in Coating-Buffer gelösten Anti-NGF polyklonalen Antikörper (pAb)

beschichtet, welcher gelöstes NGF bindet. Dazu wurden je 100 µl in die 96-Well-Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Tag darauf wurde die Platte mit 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl des Block & Sample 1x Puffers für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 400 µl TBST-Waschpuffer. Nachfolgend wurden die Standardreihe (250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml) und 100 µl der unverdünnten Proben mit unbekanntem NGF-Gehalt aufgetragen. Danach wurde für 6 h unter Schütteln (500 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Durch nachfolgende Dekantierung und fünfmaliges Waschen mit TBST-Waschlösung wurde nicht-gebundenes NGF aus dem Assay vollständig entfernt. Es erfolgte die Applikation des sekundären spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb) durch Pipettieren von 100 µl NGF-mAb (gelöst in Block & Sample 1x Puffer) pro Vertiefung und Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach fünf weiteren Waschschriften mit TBST-Waschpuffer wurde die Menge an spezifisch gebundenem mAb innerhalb 2,5 h unter Schütteln bei Raumtemperatur durch ein spezie-spezifisches Antikörperkonjugat aus horse radish peroxidase (HRP) als tertiäres Reaktant des Sandwich-Komplex gebunden. Das ungebundene Antikörperkonjugat wurde durch Waschen in TBST-Waschpuffer entfernt. Im Anschluss an eine 10 minütige Inkubation mit einem chromogenen Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N HCl gestoppt. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zum Farbumschlag von blau (630 nm) nach gelb (450 nm). Die Menge an spezifisch gebundenen NGF konnte indirekt durch die HRP-Konjugat-katalysierte Farbentwicklung von TMB im Fluostar innerhalb 30 min vermessen werden. Die Menge an NGF in den Proben ist proportional der entstandenen Farbintensität in der gekoppelten Oxidation-Reduktionsreaktion und wurde über eine im Test

mitgeführte Standardkurve mit bekannten Mengen von NGF quantifiziert. Die Standardkurve und die NGF-Konzentrationen, welche auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen relativiert wurden, wurden rechnerisch mit dem Computerprogramm Graphpad Prism ermittelt. Insgesamt wurden jeweils fünf Patienten mit HTPCs und HTPC-Fs vermessen, wobei von jeder Probe Doppelbestimmungen gemacht wurden, woraus der Mittelwert berechnet wurde. Statistische Unterschiede zwischen behandelten und Kontrollzellen wurden mit dem Repeated Measures ANOVA Test untersucht. Mit diesem ELISA kann eine NGF-Konzentration zwischen 3,9 - 250 pg/ml ermittelt werden, wobei es maximal zu 3 % Kreuzreaktion mit anderen Neurotrophinen kommt.

2.2.3.6.2 GDNF-ELISA

In dieser Arbeit wurde auch der neurotrophe Faktor GDNF in Zellkulturüberständen von HTPCs und HTPC-Fs, welche zuvor für 24 h mit Tryptase (100 ng/ml) bzw. TNF- α (5 ng/ml) stimuliert wurden, in einem Sandwich-ELISA untersucht. Die bei -20 °C eingefrorenen Überstände wurden kurz vor der Messung aufgetaut und als unverdünnte Proben verwendet.

Zur Vorbereitung wurden 96-Well Mikrotiter Platten über Nacht bei 4 °C mit einem Antikörper spezifisch gegen humanes GDNF (mAb), gelöst in Carbonatpuffer, gecoatet. Am nächsten Tag wurden die nicht-spezifische Bindungsstellen mit 200 μ l Block & Sample 1x Buffer für 1 h blockiert. Danach wurde die Standardkurve direkt in der ELISA-Platte angesetzt (500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml) und je 100 μ l der Proben zügig aufgetragen. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln (500 rpm) für 6 h und anschließendem fünfmaligem Waschen wurden die Platten mit einem sekundären biotinyliertem anti-human-GDNF Detektionsantikörper (pAb) über Nacht inkubiert und erneut fünf Mal mit TBST-Puffer gewaschen.

Anschließend wurde für 2 h bei Raumtemperatur und 500 rpm mit dem sekundären Anti-IgY-HRP Antikörper inkubiert. Nach erneuten fünf Waschschritten wurde für 15 min das Peroxidase Substrat TMB aufgetragen und dann die Reaktion mit 1 N HCl abgestoppt. Die Optische Dichte jedes Wells wurde bei 450 nm mit dem Fluostar bestimmt und die GDNF-Proteinkonzentration mit der Software Prism in Anlehnung an die Standardkurve kalkuliert und statistisch mit dem Mann-Whitney Test ausgewertet. Sezerniertes GDNF kann in einem Messbereich von 15,6 - 1000 pg/ml bestimmt werden. Laut Herstellerangaben weisen die Antikörper höchstens 3 % Kreuzreaktionen mit anderen Neurotrophinen auf.

2.2.4 Radioimmunassay (RIA)

Die Testosteron Spiegel wurden in den Inkubationsmedien, der primären adulten Hamster-Leydigzellen, mit Hilfe eines Radioimmunoassays mit einem spezifischen Antikörper, der gegen Testosteron-7 α -butyrat-BSA gerichtet ist, bestimmt (320-323). Dieser Antikörper zeigt 35 % Kreuzreaktivität mit Dihydrotestosteron (DHT). Die Minimalkonzentration an Testosteron, die vom Assay noch detektiert werden kann beträgt 0,215 pmol/ml.

Für die Messung der Testosteronspiegel Gehaltes wurden die bei -80 °C gelagerten Überstände von zuvor stimulierten Leydigzellen benutzt.

Hierfür wurden jeweils 100 μ l der acht verschiedenen Standards (125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml, 2000 pg/ml, 4000 pg/ml, 8000 pg/ml Testosteron) und verschiedene Volumina der Proben mit RIA-Puffer zu einem Endvolumen von 300 μ l aufgefüllt. Dann wurden 100 μ l Testosteron-7 α -butyrat-BSA Antikörper mit 100 μ l 3 H-markiertem Testosteron (3 H-Testosteron 7000 cpm/100 μ l) versetzt und anschließend zu jeder Probe gegeben. Nun wurden diese Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zur Trennung der Antigen-Antikörper-

Komplexe vom freien Antigen den Serumproben je 200 µl einer Mischung aus 0,5 g Aktivkohle, 0,05 g Dextran und 100 ml RIA Puffer zugegeben und diese Ansätze für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Proben, wiederum bei 4 °C, für 10 min bei 35000 rpm zentrifugiert, dann die Überstände entnommen und in einem neuen Röhrchen mit 200 µl Dioxan vermischt. Nun wurde 2,5 ml des Szintilationscocktails OptiPhase HiSafe 2 hinzugefügt und die Aktivität des freien Antigens mit einem Geigerzähler bestimmt. Aus den Messwerten der Standards konnte dann die Menge an Testosteron in den Proben kalkuliert werden.

2.2.5 Statistik

Alle vorliegenden Daten wurden mindestens als $n = 3$ produziert. Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden graphisch mit dem Programm Graphpad Prism 4.0a dargestellt. Mit Hilfe des ONE-WAY-ANOVA-Tests und anschließendem Posttest (Bonferroni) wurden die Ergebnisse des ATP-Assays (2.2.1.11), der semiquantitativen PCR (2.2.2.6), der quantitativen real time PCR (2.2.2.9) auf statistische Signifikanz überprüft. Bei dem NGF-ELISA (2.2.3.6.1) wurde ein Repeated Measures ANOVA und bei dem GDNF-ELISA (2.2.3.6.2) wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von neurotrophen Faktoren durch HTPCs und HTPC-Fs

Um festzustellen, welche neurotrophen Faktoren von HTPCs und HTPC-Fs exprimiert werden, wurde RNA aus mindestens drei verschiedenen Patientenchargen gewonnen und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die PCR erfolgte unter Verwendung spezifischer Primer (Tabelle 8), wobei zur Kontrolle jeweils kommerziell erhältliche cDNA aus Gehirn mitgeführt wurde, in welchem das Vorkommen der getesteten neurotrophen Faktoren beschrieben ist. Die Proben wurden nach der Gelelektrophorese (Bild 8) aufgereinigt und unter Verwendung der entsprechenden Primer sequenziert. Mit dem Programm BLAST konnte die Identität der PCR-Produkte gezeigt werden. Die Expression von NGF, BDNF, NT-3, Lif, CNTF und GDNF, jedoch nicht von NT-4, wurde so auf mRNA Ebene nachgewiesen.

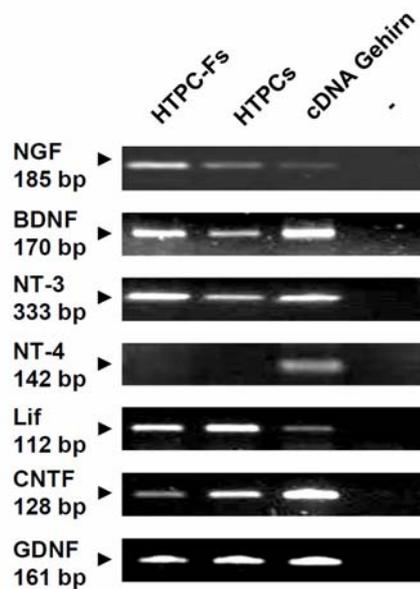


Bild 8: mRNA Expression neurotropher Faktoren in HTPCs und HTPC-Fs. Die Validierung wurde mit kommerziell erwerblicher cDNA aus dem Gehirn durchgeführt. Als Kontrolle (-) wurde Wasser statt cDNA verwendet.

In weiteren Untersuchungen wurden die Expression und eine mögliche Regulation ausgewählter Faktoren auf Proteinebene untersucht. Für NT-3, BDNF, NGF und GDNF erlaubten geeignete Verfahren quantitative Protein-Messungen durchzuführen. Dabei lag die Menge von NT-3 unterhalb der Detektionsgrenze des kommerziellen ELISA (Daten nicht gezeigt). BDNF konnte in geringen Mengen mit bis zu 5,12 pg (pro mg Protein) gemessen werden (Daten nicht gezeigt). NGF und GDNF waren mit Hilfe von ELISA Messungen eindeutig im Medium nachweisbar. Zusätzlich konnte erstmals der NGF-Vorläufer (proNGF) durch Western Blot Analysen in HTPC/-Fs detektiert werden.

Da für BDNF im Hoden bislang keine Funktion bekannt ist, wurde der Fokus auf den neurotrophen Faktor GDNF gelegt (3.6 - 0), welcher auf Grund seiner bedeutenden Verbindung zu SSZ im Vordergrund aktueller Studien steht. Des Weiteren wurden NGF genauer untersucht (3.3 - 3.5), dessen Sekretion durch HTPCs kürzlich nachgewiesen wurde. Da dieses

Neurotrophin in HTPCs durch TNF- α stimuliert werden kann (20), war auch eine Interaktion mit dem Hauptmastzellprodukt Tryptase nicht auszuschließen.

3.2 HTPCs und HTPC-Fs sind mögliche Zielzellen für Mastzelltryptase

3.2.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Zur Untersuchung der molekularen Expression des Tryptase Rezeptors PAR-2 in HTPC-Fs wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Für HTPCs konnte dies bereits gezeigt werden (32). Die mRNA wurde hierfür aus je drei verschiedenen Patientenchargen gewonnen und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für PAR-2 (Tabelle 8). Um die Primer und die PCR-Bedingungen zu überprüfen, wurde zusätzlich kommerziell erhältliche cDNA aus dem Gesamthoden mitgeführt, in dem das Vorkommen von PAR-2 beschrieben ist. Im Anschluss an die Gelelektrophorese (Bild 9) wurden die Proben aufgereinigt und mit Hilfe der entsprechenden Primer sequenziert und mittels des Programms BLAST konnte durch die Sequenzen die Identität des PCR-Produkts als PAR-2 bestätigt werden.

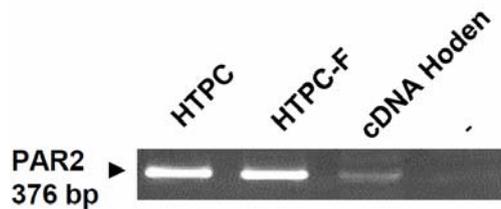


Bild 9: Nachweis der mRNA Expression von PAR-2.
Die Validierung erfolgte mit kommerziell erwerblicher cDNA aus dem humanen Hoden.
(-) Einsatz von Wasser an Stelle von cDNA.

3.2.2 Nachweis des Tryptase Rezeptors (PAR-2) mittels Immunfluoreszenz

In immunzytochemischen Versuchen wurde das Vorkommen des PAR-2-Rezeptors in kultivierten HTPC/-Fs (je $n = 2$) auch auf Proteinebene bestätigt (Bild 10). Im Vergleich zu den Zellen, welche ohne Erstantikörper (Kontrolle) behandelt wurden, konnten nahezu alle Zellen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Tabelle 9) gegen PAR-2 angefärbt werden. Die Ergebnisse aus den vorhergehenden PCR-Experimenten konnten auch auf Proteinebene gezeigt werden.

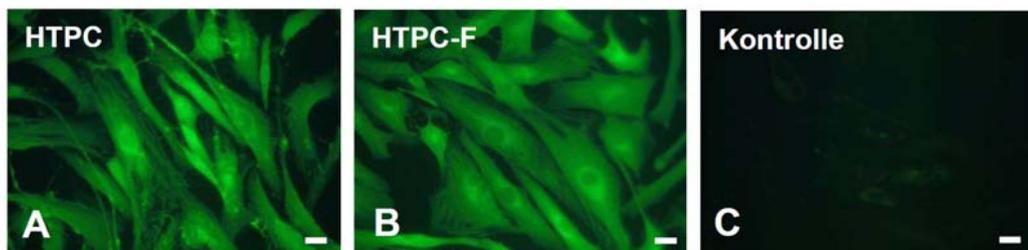


Bild 10: Nachweis des PAR-2 Rezeptors in immunzytochemischen Versuchen bei HTPCs und HTPC-Fs.
Die Übersicht von HTPCs (A) und HTPC-Fs (B) zeigt eine deutliche Färbung des Tryptase Rezeptors im Gegensatz zu der Kontrolle (C), welche ohne Erstantikörper behandelt wurde. Skalierungsbalken entsprechen 15 μm .

3.2.3 Funktionalität des PAR-2 Rezeptors bei HTPCs und HTPC-Fs

Zur Untersuchung der Funktionalität des PAR-2-Rezeptors wurden Messungen von intrazellulärem Ca^{2+} durchgeführt. Hierfür wurden

kultivierte HTPC/-Fs mit dem Farbstoff Fluo-4 AM beladen und mit den Zellen wurde eine Messreihe unter einem konfokalen Mikroskop gestartet, wobei ein Bild pro 2 Sekunden aufgenommen wurde. Tryptase (100 ng/ml) und SLIGKV (100 μ M) wurden mit einem Applikationssystem an die Zellgruppen gespült und es konnten reversible Ca^{2+} -Signale bei 50 - 80 % der Zellen festgestellt werden (Bild 11). Dabei war die Reihenfolge, in welcher beide Antagonisten amplifiziert wurden, austauschbar. Um die Vitalität der Zellen und die Funktionalität des Farbstoffes am Ende der Messung sicher zu stellen, wurde Histamin angespült (hier nicht gezeigt), dessen funktionelle Rezeptoren schon in vorherigen Versuchen beschrieben wurden (32). Darauf reagierten alle Zellen mit einer transienten Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Die Intensität des Ca^{2+} -Signals wurde mit dem Programm Leica Confocal Software analysiert. Bei den Versuchen wurden mindestens drei Patientenchargen pro Zellgruppe (HTPC und HTPC-F) vermessen und graphisch dargestellt.

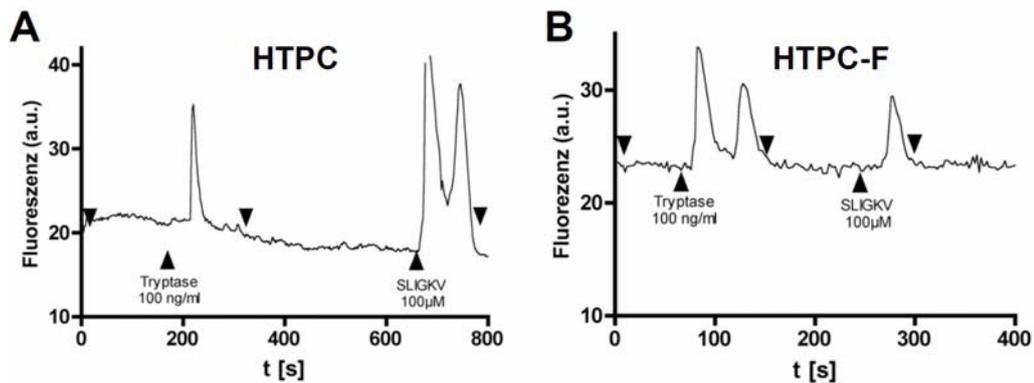


Bild 11: Tryptase und SLIGKV führen zu deutlich erhöhten Ca^{2+} -Spiegeln bei HTPCs und HTPC-Fs.

HTPCs (A) und HTPC-Fs (B) wurden hier mit Medium umspült und nach Applikation von Tryptase (100 ng/ml) oder SLIGKV (100 μM) reagierten die Zellen mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen. Pfeilköpfe nach unten zeigen jeweils den Zeitpunkt der Applikation von Medium. Die Graphen zeigen jeweils eine repräsentative Zelle aus einer Versuchsreihe.

3.3 Modulation des proNGF/NGF Mikromilieus durch Mastzelltryptase

3.3.1 HTPCs und HTPC-Fs produzieren NGF

Um die sezernierten Mengen von NGF zu quantifizieren, wurde von je fünf verschiedenen Patienten (HTPCs und HTPC-Fs) die NGF-Produktion mittels eines kommerziellen ELISA ermittelt. In Zellkulturüberständen konnte nach 24 h die NGF-Konzentrationen nach Herstellerangaben in Doppelbestimmungen vermessen werden (Bild 12). Die statistische Analyse der basalen NGF-Produktion von HTPCs und HTPC-Fs ergab keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$, Mittelwert + SEM), weshalb die verschiedenen Zellgruppen in Folgeexperimenten nicht getrennt aufgeführt wurden.

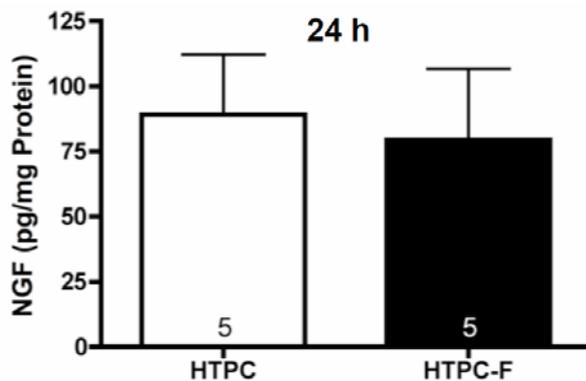


Bild 12: Akkumulation von NGF im Medium als Maß der Sekretion durch HTPCs und HTPC-Fs.

3.3.2 Sezerniertes NGF von HTPCs und HTPC-Fs ist funktionell

Als Testsystem wurde die PC12-Zelllinie verwendet, welche auf extrazelluläres NGF mit der Ausbildung von Neuriten reagiert. Die PC12-Zellen wurden hierfür mit Medium überschichtet, welches zuvor für 72 h in Kulturschalen mit HTPCs (n = 2) oder HTPC-Fs (n = 2) war (Bild 13). Einige PC12-Zellen (ca. 10 %) reagierten daraufhin mit dem Auswachsen von Neuriten, welches nach ca. 72 h lichtmikroskopisch deutlich erkennbar war. Kontrollzellen wurden mit frischem Medium behandelt und veränderten sich nicht über den Beobachtungszeitraum.

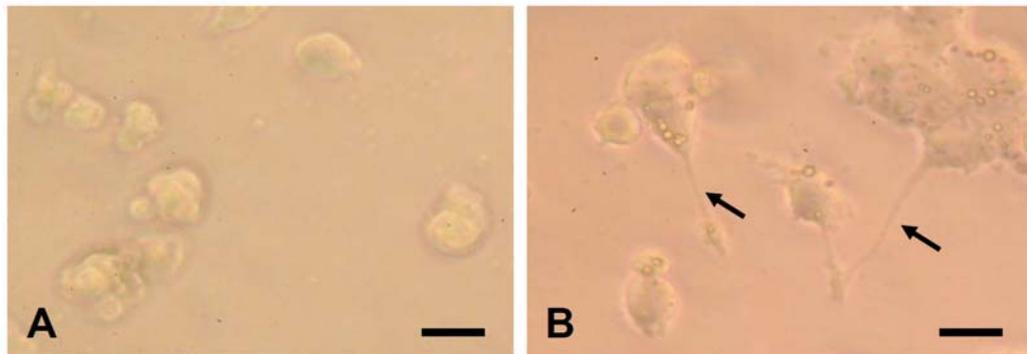


Bild 13: Nachweis der Funktionalität von sezerniertem NGF.

(A) Unbehandelte PC12-Zellen wiesen keine Veränderungen auf. (B) PC12-Zellen reagierten auf Medium, welches sezerniertes NGF von HTPCs oder HTPC-Fs enthielt, mit einem Auswachsen von Ausläufern (Pfeile). Skalierungsbalken entsprechen 10 μm .

3.3.3 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die NGF-Sekretion von HTPCs und HTPC-Fs

Um die regulatorischen Einflüsse von Tryptase und des PAR-2-Agonisten SLIGKV auf die NGF-Sekretion zu quantifizieren, wurden HTPCs ($n = 5$) und HTPC-Fs ($n = 5$) mit verschiedenen Konzentrationen von Tryptase (10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) und SLIGKV (10 μM und 100 μM) für 24 h behandelt. Hierbei wurden Konzentrationen verwendet, welche sich bei Ca^{2+} -Messungen mit HTPCs als funktionell erwiesen (32). Danach wurden die Mengen an sezerniertem NGF mit einem kommerziellen NGF-ELISA bestimmt. Die basale Produktion von NGF ließ sich eindeutig dosisabhängig durch die Zugabe von 100 ng/ml ($P < 0,05$) und 1000 ng/ml Tryptase ($P < 0,01$) um bis zu 100 % steigern (Bild 14). Interessanterweise erhöhte das Peptid SLIGKV, welches den PAR-2-Rezeptor direkt aktivieren kann, nicht die Sekretion von NGF ($P > 0,05$). HTPCs und HTPC-Fs wurden nicht in getrennten Graphen dargestellt, da sich die Sekretionsmuster nicht unterschieden.

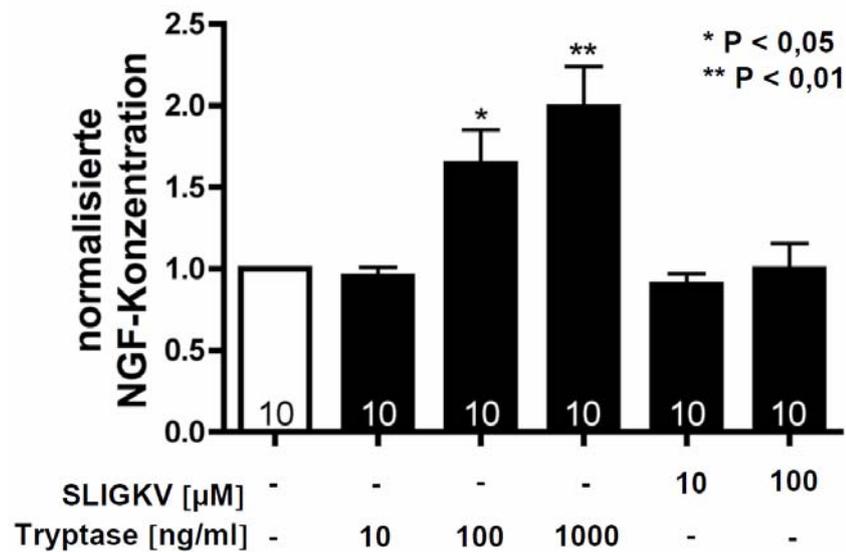


Bild 14: Tryptase erhöht dosisabhängig die Menge von sezerniertem NGF. HTPC/-Fs sezernieren NGF, wobei die NGF Menge durch Tryptase, nicht aber durch den Agonist SLIGKV nach 24 h Inkubationszeit gesteigert werden konnte (n = 10). Die Ergebnisse wiesen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf. *P < 0,05, **P < 0,01, Mittelwert + SEM.

3.3.4 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die Vitalität

Um zu ermitteln, ob Tryptase das Überleben von Zellen fördert oder SLIGKV apoptotisch wirkt, wurde ein ATP-Assay durchgeführt. Hierfür wurden HTPC/-Fs (n = 7) in gleicher Zahl ausgesät und mit Tryptase (1000 ng/ml) oder SLIGKV (100 μ M) für 24 h stimuliert. Danach wurde ein ATP-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt, um eine mögliche Toxizität der Stimulanzien zu überprüfen. Es konnte jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen kein signifikanter Einfluss von Tryptase oder SLIGKV auf die ATP-Produktion festgestellt werden (Bild 15).

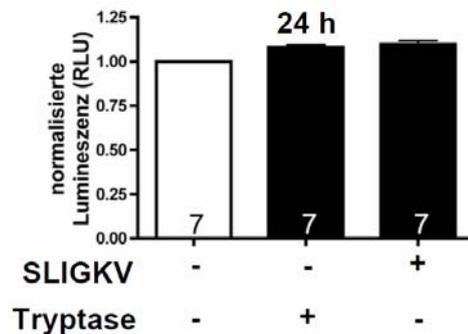


Bild 15: Tryptase und SLIGKV haben keinen Einfluss auf die Vitalität von HTPC/-Fs. Nach einer Stimulationsdauer von 24 h mit Tryptase (1000 ng/ml) oder SLIGKV (100 μ M) wurde die Vitalität von HTPC/-Fs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mittels ATP-Assay bestimmt (n = 7). Es konnte kein Einfluss der beiden Stimulantien auf die Zellen im Hinblick auf die Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt werden. Die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM.

3.3.5 Einfluss von Tryptase und SLIGKV auf die Expression von NGF

HTPC/-Fs wurden mit Tryptase (100 ng/ml) und SLIGKV (100 μ M) für 24 h behandelt und die cDNA in semiquantitativen (n = 5) und quantitativen (n = 4) RT-PCR-Experimenten untersucht. Dabei wurde bei der semiquantitativen PCR mit dem „Housekeeping-Gen“ Cyclophilin und bei der quantitativen real time PCR mit dem „Housekeeping-Gen“ L19 abgeglichen. In diesen Experimenten konnte die Expression der NGF mRNA weder durch Tryptase noch durch SLIGKV beeinflusst werden (Bild 16).

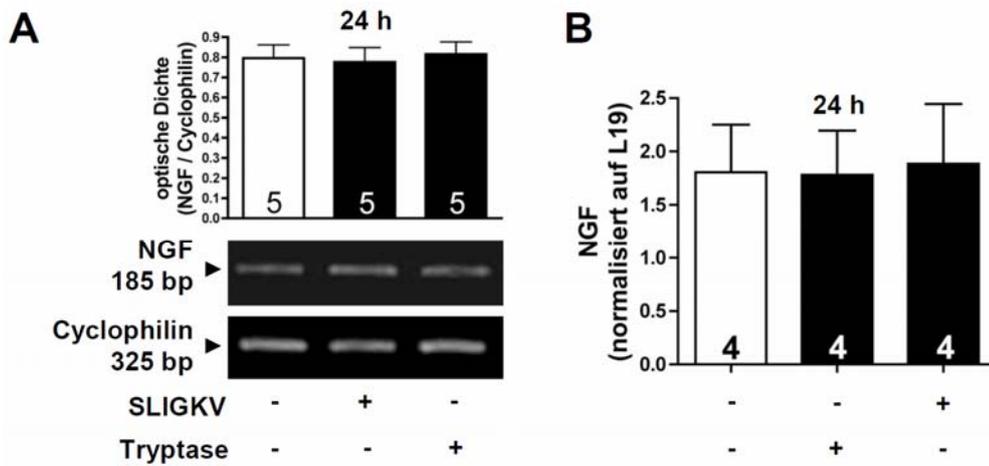


Bild 16: Die mRNA Expression von NGF wird nicht durch Tryptase oder SLIGKV reguliert.

Die Expression der NGF mRNA, welche durch semiquantitative PCR (A) und quantitative real time PCR (B) bestimmt wurde, konnte weder durch die 24 stündige Stimulation mit Tryptase (100 ng/ml) noch durch SLIGKV (100 μ M) reguliert werden. Bei der semiquantitativen PCR wurden fünf, bei der quantitativen real time PCR vier Patientenchargen untersucht. Die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM.

3.4 Detektion von NGF und proNGF in Zellen und ihrem Überstand

3.4.1 Nachweis von NGF und proNGF mittels Immunfluoreszenz

Um die Expression von NGF und dessen Vorläufer proNGF auf Proteinebene in HTPC/-Fs zu überprüfen, wurden die Proteine innerhalb der Zellen mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern sichtbar gemacht (Bild 17). Hierfür wurden Zellen von jeweils zwei Patientenchargen untersucht. Ein Vergleich im Durchlichtbild ergab, dass mindestens 90 % der Zellen eine positive Färbung zeigten. HTPC/-Fs, die ohne Erstantikörper behandelt wurden, zeigten keine Färbung.

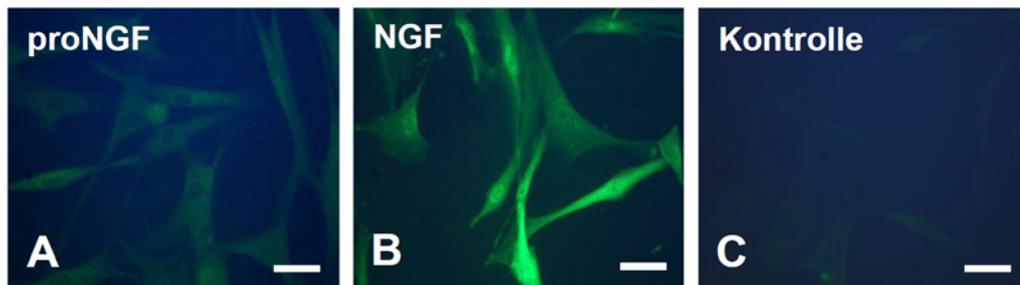


Bild 17: Nachweis von NGF und proNGF in immunzytochemischen Versuchen. Die Zellen zeigen eine positive Fluoreszenz-Färbung von proNGF (A) und NGF (B) im Gegensatz zu der Kontrolle (C), welche ohne Erstantikörper behandelt wurde. Skalierungsbalken entsprechen 15 μm .

3.4.2 Nachweis von NGF und proNGF in Zelllysaten und -überständen mittels Western Blot

Mit Hilfe von Western Blot-Experimenten wurde die Expression von NGF und proNGF in HTPCs und HTPC-Fs auf Proteinebene bestätigt. Das Protein wurde dafür sowohl aus den Zellkulturüberständen ($n = 6$) als auch aus humanen peritubulären Zellen ($n = 12$) gewonnen und mittels spezifischer Antikörper gegen proNGF und NGF auf einem Western Blot nachgewiesen (Bild 18). Eine Bande, die von beiden Antikörpern detektiert wurde und etwa auf der Höhe von 35 kDa lag, wurde durch Präadsorption des proNGF-Antikörpers mit dessen spezifischem Peptid, welches zur Immunisierung verwendet wurde, als proNGF identifiziert. Mit dem Antikörper gegen NGF konnte noch eine weitere Bande bei ca. 17 kDa detektiert werden. Zwei weitere Banden unterhalb von 35 kDa konnten durch beide Antikörper sichtbar gemacht werden. Dabei handelt es sich vermutlich um Nebenprodukte, welche durch Hydrolyse oder Proteolyse entstanden sind und durch den Antikörper detektiert werden können.

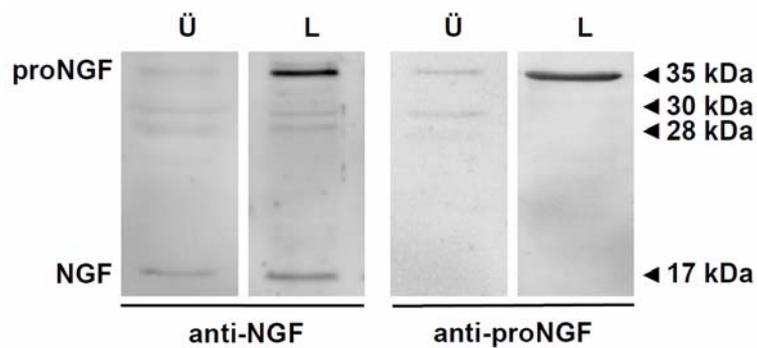


Bild 18: Nachweis von NGF und proNGF in Zellüberständen (Ü) und Zelllysaten (L). Die Zellen (n = 12) und Überstände (n = 6) zeigen bei beiden Antikörpern eine Bande bei ca. 35 kDa (proNGF), während der Antikörper gegen NGF zusätzlich eine Bande bei ca. 17 kDa sichtbar macht.

3.5 Tryptase schneidet proNGF

3.5.1 Nachweis der Spaltung von natürlichem proNGF durch Tryptase

Die Menge von NGF im Überstand konnte nur durch das Enzym Tryptase, nicht aber durch den Agonist SLIGKV gesteigert werden. Daher lag der Verdacht auf eine mögliche enzymatische Spaltung des NGF-Vorläuferproteins und eine damit verbundene erhöhte Konzentration von NGF nahe. Dies sollte mittels Western Blot Analysen von Überständen aus insgesamt drei verschiedenen Patientenchargen, welche für 24 h mit Tryptase (1000 ng/ml) behandelt wurden, überprüft werden (Bild 19). Mit einem spezifischen Antikörper gegen proNGF wurde bei ca. 35 kDa eine deutlich schwächere Bande (13 - 52 %) bei allen mit Tryptase behandelten Proben detektiert.

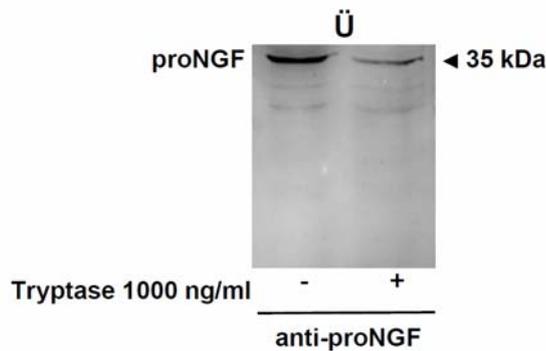


Bild 19: Die immunreaktive proNGF-Bande wird durch Tryptase geschwächt. In Western Blot Experimenten an Zellkulturüberständen (n = 3) nach einer 24 stündigen Behandlung mit Tryptase.

3.5.2 Nachweis der Spaltung von synthetischem proNGF durch Tryptase

Um die Hypothese der enzymatischen Spaltung weiterhin zu überprüfen, wurden 500 ng/ml synthetisches proNGF mit Tryptase (1000 ng/ml, n = 9), mit Hitze inaktivierter Tryptase (1000 ng/ml, 15 min, 95 °C, n = 8) und mit SLIGKV (100 µM; n = 9) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Banden in Western Blot Experimenten mit einem spezifischen Antikörper gegen proNGF sichtbar gemacht (Bild 20). Bei Proben, welche mit aktiver Tryptase behandelt wurden, konnte eine deutliche Abnahme der Bandendicke bei ca. 25 kDa detektiert werden. Die unterschiedliche Bandengröße zu dem natürlichen proNGF der HTPC/-Fs kommt vermutlich durch Glycosylierung des Proteins zu stande. Während die Bande bei Proben mit SLIGKV nicht schwächer als die Kontrollzellen war, zeigte ein Vergleich der Proben mit hitze-deaktivierter Tryptase eine schwächere proNGF-Bande. Die Spezifität des proNGF Antikörpers wurde durch Präadsorption mit dem Peptid, das für die Immunisierung verwendet worden war, bewiesen (n = 2).

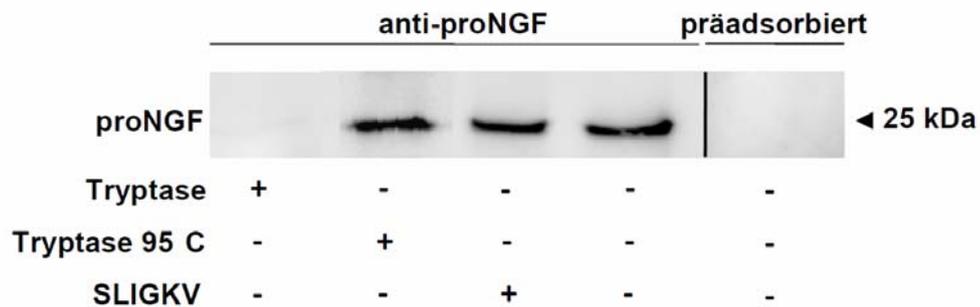


Bild 20: Die immunreaktive Bande von proNGF wurde durch aktive Tryptase vermindert.

In Western Blot Experimenten an Proben mit synthetischem proNGF, welche für 24 h mit Tryptase (1000 ng/ml, n = 5), hitze-deaktivierter Tryptase (1000 ng/ml, n = 4) und SLIGKV (100 μ M, n = 5) versetzt wurden, konnte eine Abnahme der proNGF-Bande nach Behandlung mit Tryptase beobachtet werden. Die Spezifität des Antikörpers wurde mittels Präadsorption mit dem spezifischen Peptid, welches zur Immunisierung verwendet wurde (n = 2), gezeigt.

3.5.3 Charakterisierung der Schnittstellen von humanem proNGF

Die Aminosäuresequenz von humanem proNGF (NP_002497) wurde auf mögliche, in der Literatur beschriebene Tryptase-Schnittstellen untersucht (120,324). Während Tryptase ihre Produkte C-terminal von Lysin (K) oder Arginin (R) an Position 1 schneidet, werden von dem Enzym außerdem Sequenzen mit einem Lysin- oder Arginin-Rest an Position 3 oder Prolin (P) an Position 4 bevorzugt. Diese potentiellen Schnittstellen wurden in Bild 21 dargestellt, wobei die pro-Sequenz blau und die Sequenz des reifen NGF in schwarzen Buchstaben dargestellt wurden. Die bekannte Spaltungsstelle von Furin wurde mit einem schwarzen Rahmen markiert. Sequenzen, welche möglicherweise von Tryptase erkannt und anschließend gespalten werden können, sind orange unterstrichen.

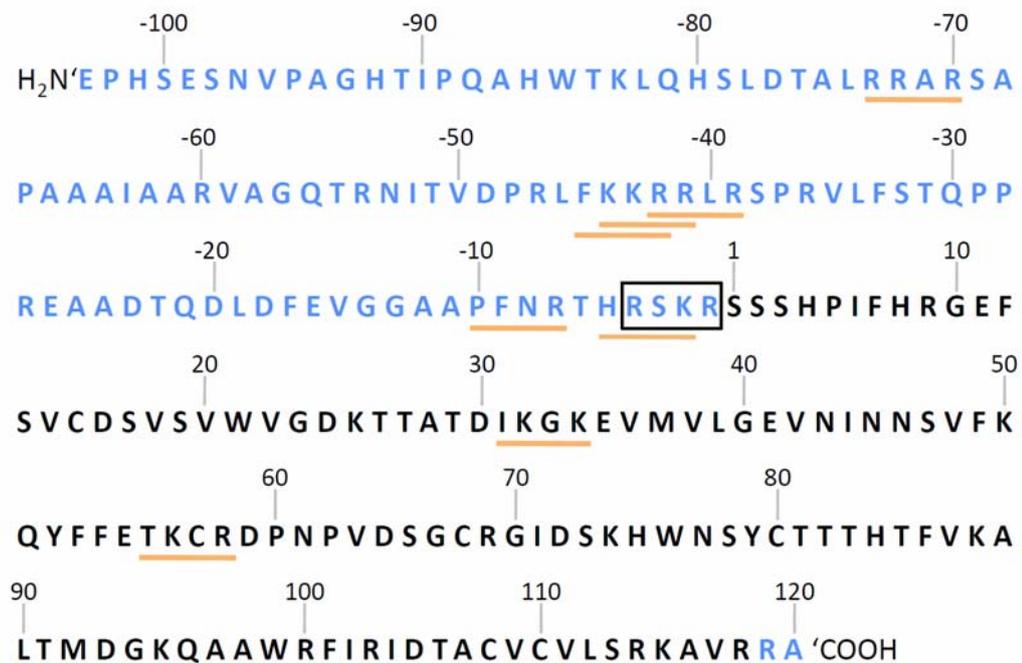


Bild 21: Darstellung der Aminosäuresequenz von proNGF.

Die pro-Sequenz ist blau markiert, die Sequenz des reifen NGF ist schwarz dargestellt. Die Stelle, welche bekannterweise von Furin zur Spaltung von proNGF zu reifem NGF erkannt wird, ist schwarz eingerahmt. Potentielle Sequenzabschnitte, welche durch Trypsin erkannt und gespalten werden können, sind orange unterstrichen.

3.6 HTPC/-Fs tragen möglicherweise zur Stammzellnische bei

3.6.1 Detektion und Lokalisation von GFR- α 1 im humanen Hoden

GFR- α 1 ist bei Nagern ein oft benutzter Marker für spermatogoniale Stammzellen. Wie zu erwarten war, konnte die Expression dieses Rezeptorgens durch RT-PCR, anschließender Sequenzierung und Identifikation mit Hilfe des Programms BLAST in kommerzieller cDNA aus humanem Hodengewebe illustriert werden (Bild 22).

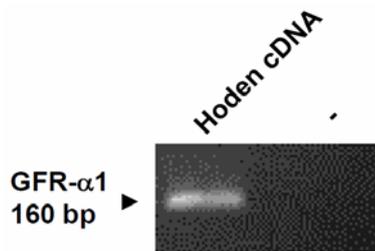


Bild 22: Expression von GFR- α 1 im humanen Hoden. Mittels RT-PCR konnte die Expression von GFR- α 1 (160 bp) im humanen Hoden bestätigt werden. (-) Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA mitgeführt.

Zur Evaluierung der Expression von GFR- α 1 im humanen Hoden wurden immunhistologische Studien mit einem spezifische Antikörper gegen GFR- α 1 durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten Biopsienproben von Patienten mit Mixed Atrophy (n = 10). GFR- α 1 positive Zellen befanden sich an der Basalmembran, welche an die peritubuläre Region angrenzt (Bild 23). Biopsien, die ohne Erstantikörper (Kontrolle) und solche, die mit Normalserum (Spezies des Erstantikörpers, Kaninchen) behandelt wurden, zeigten keine Färbung.

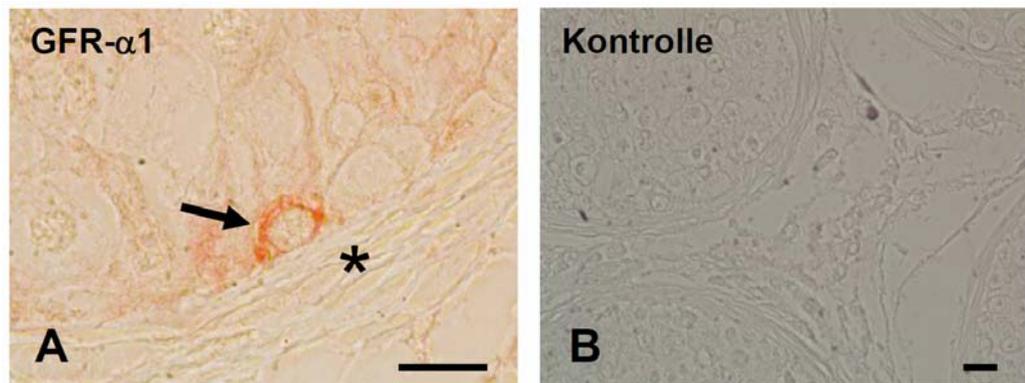


Bild 23: Lokalisation von GFR- α 1 im humanen Hoden.

(A) Immunhistochemische Färbungen zeigten GFR- α 1 positive Zellen (Pfeil) in der Nachbarschaft von peritubulären Zellen (*). Keine andere Zellgruppe im Hoden konnte mit diesem Antikörper gefärbt werden. (B) In Kontrollen wurde der Erstantikörper weggelassen oder nur Normalserum verwendet (nicht gezeigt). Skalierungsbalken entsprechen 10 μ m.

3.6.2 Identifizierung von GDNF in Kompartimenten des humanen Hodens

Um festzustellen, in welchen Regionen des humanen Hodens GDNF exprimiert wird, wurden mittels LMD einzelne Zellkompartimente gewonnen und mittels RT-PCR auf die Expression von GDNF mRNA überprüft (Bild 24). Nach der Sequenzierung und anschließender Verifizierung mit dem Programm BLAST konnte die Identität des PCR-Produkts bestätigt werden. Wie erwartet, exprimieren Zellen des tubulären Kompartiments (TK), welches Sertolizellen enthält, den Faktor. Jedoch wurde auch eine deutliche Expression der GDNF mRNA im peritubulären testikulären Kompartiments (PTK) beobachtet, nicht aber in der interstitiellen Region (IK). Als Positivkontrolle diente cDNA, welche aus abgekratzten Gesamthodenschnitten (H) gewonnen wurde.

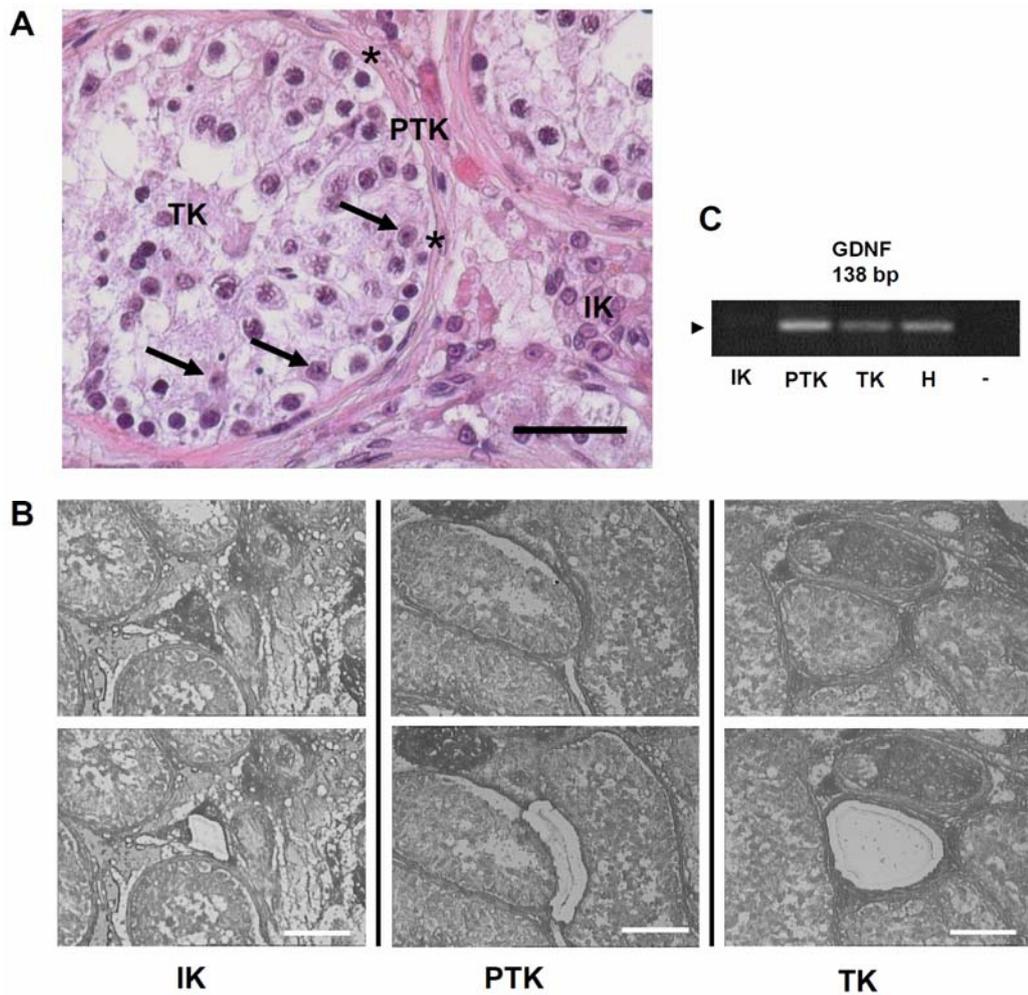


Bild 24: Identifikation von GDNF mRNA in einzelnen Regionen des humanen Hodens. (A) Übersicht eines typischen Hoden-Ausschnitts, welche für die LMD verwendet wurden. Sertolizellen können auf Grund ihrer Nucleoli (Pfeile) eindeutig identifiziert werden. TK: Tubuläres Kompartiment, PTK: Peritubuläres Kompartiment (*), IK: Interstitielles Kompartiment. Skalierungsbalken entsprechen 25 μm . (B) Zellgruppen des interstitiellen Kompartiments (IK), des peritubulären Kompartiments (PTK) und des tubulären Kompartiments wurden mittels LMD ausgeschnitten. Skalierungsbalken entsprechen 100 μm . (C) Das Ethidiumbromidgel zeigt das Resultat der RT-PCR. GDNF konnte nicht im IK detektiert werden, jedoch im PTK, im TK und im Gesamthoden (H). (-) Einsatz von Wasser und RNA statt cDNA.

3.7 Einfluss von Mastzellprodukten auf die Sekretion von GDNF durch HTPC/-Fs

3.7.1 Expression von GDNF durch kultivierte HTPCs und HTPC-Fs

RT-PCR Experimente bestätigten die Expression von GDNF mRNA durch HTPCs (n = 6) und HTPC-Fs (n = 8), welche ebenfalls in kommerzieller cDNA aus dem Hoden gefunden wurde (Bild 25). Nach Sequenzierung des PCR Produkts konnte das Ergebnis mit Hilfe des Programms BLAST verifiziert werden.

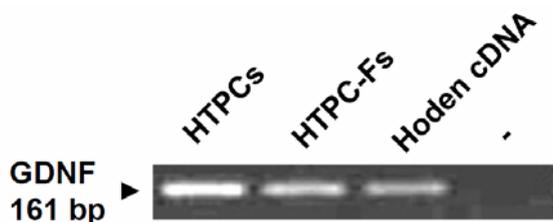


Bild 25: Expression von GDNF durch HTPCs und HTPC-Fs. Mittels RT-PCR konnte die Expression von GDNF (161 bp) in HTPCs und HTPC-Fs gezeigt werden. Die Validierung erfolgte mit kommerziell erwerblicher cDNA aus dem humanen Hoden. (-) Einsatz von Wasser statt cDNA.

3.7.2 Sekretion von GDNF durch HTPCs und HTPC-Fs

Um zu testen, ob HTPCs und HTPC-Fs auch in der Lage sind, GDNF freizusetzen und in den Überstand abzugeben, wurden Zellkulturüberstände, welche für 24 h oder 72 h auf den Zellen waren, gesammelt und mit einem kommerziellen GDNF-ELISA wurden die Konzentrationen des abgegebenen Proteins bestimmt (Bild 26). Basal produziertes GDNF akkumulierte zeitabhängig im Zellkulturmedium (Tabelle 7), was auf eine konstitutive Expression und Sekretion des Proteins hindeutet. Nach 72 h konnten Konzentrationen von bis zu 300 - 400 pg GDNF/mg Protein gemessen werden, wobei sich die GDNF-Sekretionsprofile von HTPCs nicht von den HTPC-Fs unterschieden.

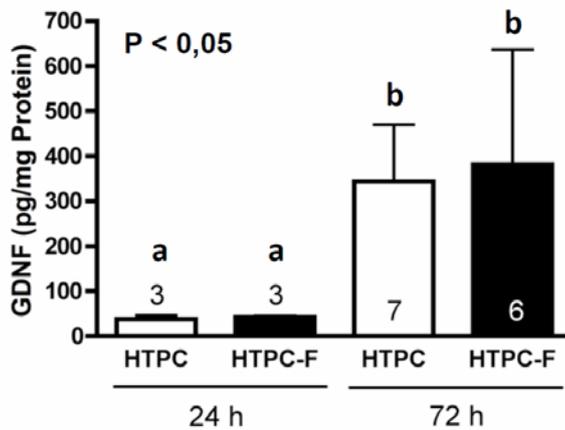


Bild 26: ELISA Messungen der GDNF-Sekretion durch HTPCs und HTPC-Fs. Die Menge an ausgeschüttetem GDNF im Zellkulturüberstand von HTPCs und HTPC-Fs nahm mit der Zeit zu (24 h - 72 h). Nach 72 h konnte ein signifikanter (~ 10-facher) Anstieg der sezernierten GDNF Mengen auf einem Niveau von $P < 0,05$ gemessen werden (markiert durch Kleinbuchstaben). Die Anzahl der Patienten ist innerhalb oder über den Säulen verzeichnet. Die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM.

3.7.3 Expression der Rezeptoren für $TNF-\alpha$ durch HTPCs und HTPC-Fs

Zur Untersuchung der mRNA Expression der Rezeptoren für $TNF-\alpha$ wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Die mRNA wurde hierfür aus je drei verschiedenen Patientenchargen gewonnen und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für TNFR1 und TNFR2 (Tabelle 8). Um die Primer und die PCR-Bedingungen zu überprüfen, wurde zusätzlich kommerziell erhältliche cDNA aus dem Gesamthoden mitgeführt, in dem das Vorkommen beider Rezeptoren beschrieben ist. Im Anschluss an die Gelelektrophorese (Bild 27) wurden die Proben aufgereinigt und mit Hilfe der entsprechenden Primer sequenziert und mittels des Programms BLAST konnte durch die Sequenzen die Identität der PCR-Produkte als TNFR1 bzw. TNFR2 bestätigt werden.

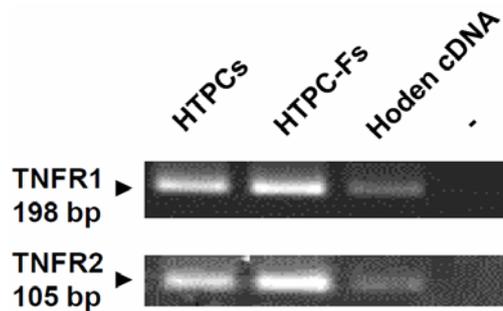


Bild 27: Nachweis der mRNA Expression von TNFR1 und TNFR2. Mittels RT-PCR konnte die Expression von TNFR1 und TNFR2 in HTPCs und HTPC-Fs gezeigt werden. Die Validierung erfolgte mit kommerziell erwerblicher cDNA aus dem humanen Hoden. In (-) wurde im PCR-Ansatz keine cDNA eingesetzt.

3.7.4 Die Mastzellprodukte Tryptase und TNF- α beeinflussen nicht die GDNF-Sekretion von HTPCs und HTPC-Fs

Um mögliche regulatorische Effekte der Mastzellprodukte Tryptase und TNF- α auf die GDNF-Sekretion durch HTPCs und HTPC-Fs zu überprüfen, wurden weitere ELISA Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Überstände von 24 h (Daten nicht gezeigt) und 72 h behandelten HTPCs und HTPC-Fs entsprechend den Herstellerangaben gemessen (Bild 28). Die basale Produktion von GDNF ließ sich jedoch weder durch Tryptase (100 ng/ml) noch durch TNF- α (5 ng/ml) signifikant modulieren ($P > 0,05$).

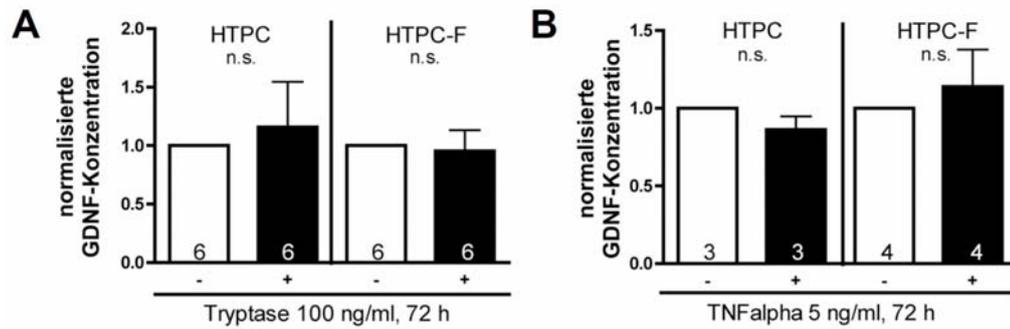


Bild 28: Die GDNF-Sekretion wird weder durch Tryptase noch durch TNF- α reguliert. (A) Tryptase reguliert nicht die GDNF Sekretion, wobei eine Konzentration verwendet wurde, in der das Enzym den PAR-2 Rezeptor von HTPC/-Fs aktiviert. (B) TNF- α verändert nicht die GDNF-Spiegel, wobei in vorigen Untersuchungen gezeigt wurde, dass das Zytokin in dieser Konzentration die Rezeptoren TNFR1/2 von HTPCs aktiviert (20). Die Abkürzung n.s. über den Säulen steht für „nicht signifikant“. Die Stichprobenanzahl wird innerhalb der jeweiligen Säulen angegeben, die Balken entsprechen dem Mittelwert + SEM.

4 Diskussion

4.1 Die peritubuläre Region und deren Bedeutung im Hoden

Peritubuläre Zellen umgeben die Tubuli seminiferi und üben dort parakrine sowie kontraktile Funktionen aus. In den meisten Fällen weisen Patienten mit Störungen der Spermatogenese unter anderem eine durch fibrotische Umbauvorgänge veränderte peritubuläre Wand auf (30,52-55). Bestandteile der extrazellulären Matrix werden, während diesem in ihrem Ablauf nicht bekannten Vorgang, sezerniert und lagern sich zwischen den einzelnen Schichten der peritubulären Zellen ab (30,56). Sowohl durch pathologische Veränderung der peritubulären Wand als auch durch ein verändertes ein- oder auch wechselseitiges Sekretionsprofil mit Nachbarzellen wie Mastzellen oder Makrophagen, kann die Kontraktionsfähigkeit, welche für die Spermienmotilität wichtig ist, beeinträchtigt werden (4,22).

Weiterhin konnte bei männlicher Infertilität häufig eine Infiltration von Immunzellen, wie Mastzellen und Makrophagen, innerhalb der peritubulären Region beobachtet werden (60). Hinsichtlich ihrer unmittelbaren Nähe zu peritubulären Zellen und ihrer Eigenschaft, Fibroblasten über parakrine Signalwege zu aktivieren, wird ein Zusammenhang zwischen Immunzellen und der fibrotischen Veränderung der peritubulären Wand vermutet.

Es ist noch sehr wenig über die peritubulären Zellen des humanen Hoden bekannt, jedoch wurde vor kurzem durch die Möglichkeit der

Kultivierung von humanen peritubulären Zellen ein Modell geschaffen (32), mit dem es möglich ist, diese, bislang „forscherfeindlichen“, dünnen Zellen im humanen System näher zu charakterisieren. Peritubuläre Zellen exprimieren die typischen Marker von Glattmuskelzellen (z.B. SMA, Details siehe (21,32)) und sie sezernieren verschiedene Signalmoleküle wie MCP-1, IL-6 oder das Neurotrophin NGF.

Expressionsanalysen in HTPCs und HTPC-Fs zeigten ein großes Repertoire an neurotrophen Faktoren. Dabei konnten in beiden Zelltypen NGF, NT-3, BDNF, GDNF, CNTF und LIF detektiert werden, deren Rolle im Hoden weitgehend unbekannt ist. Der Fokus wurde in dieser Arbeit auf zwei dieser Faktoren (GDNF und NGF) gelegt. GDNF sollte Gegenstand dieser Studie werden, da dieser neurotrophe Faktor in aktueller Forschung diskutiert wird. Dabei wurde ein möglicher Beitrag peritubulärer Zellen zur Stammzellnische nicht ausgeschlossen (13,17). Des Weiteren wurde NGF genauer untersucht, da diesem Neurotrophin erst kürzlich eine Involvierung in die Spermatogenese durch Modulation der meiotischen Teilungen von Spermatozyten zugeschrieben wurde (280,286) sowie auf Grund der Entdeckung des Sortilin Rezeptors und der biologischen Funktion des Vorläuferproteins proNGF (257). Basierend auf der schon beschriebenen basalen Produktion und Sekretion von NGF durch HTPCs, welche durch das Mastzellprodukt TNF- α stimuliert werden kann, wurde eine Interaktion des Mastzellprodukts Tryptase mit dem von peritubulären Zellen sezernierten NGF vermutet. Einen Überblick der in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse der Wechselwirkungen testikulärer peritubulärer Zellen mit Mastzellen und spermatogonialen Stammzellen soll Bild 29 geben:

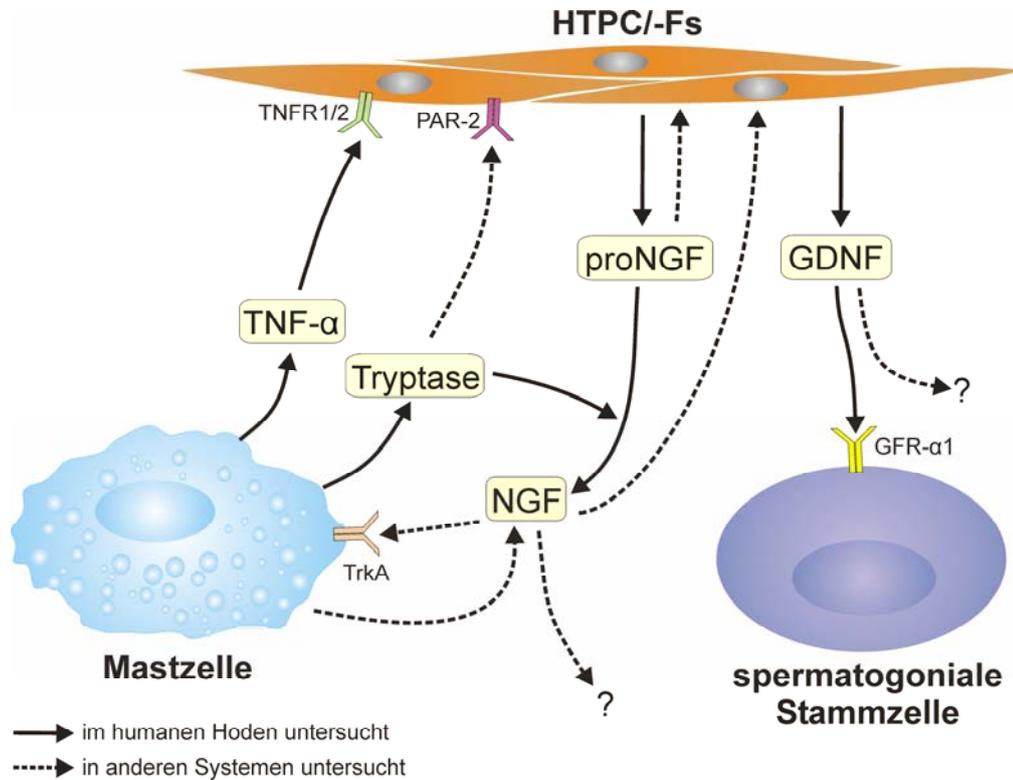


Bild 29: Wechselwirkung von peritubulären Zellen mit Mastzellen und SSZ.

HTPC/-Fs exprimieren Rezeptoren für die Mastzellprodukte Tryptase (PAR-2) und TNF- α (TNFR1/2). Während TNF- α möglicherweise über dessen Rezeptor die NGF-Sekretion von HTPCs reguliert, prozessiert Tryptase das von HTPC/-Fs sezernierte proNGF zu NGF. NGF und proNGF könnten als pleiotrope Faktoren sowohl autokrin, als auch über parakrine Signalwege auf Nachbarzellen wie Leydigzellen, Spermatozyten oder die Mastzellen wirken. Das von HTPC/-Fs sezernierte GDNF könnte den spezifischen Rezeptor (GFR- α 1) benachbarter SSZ aktivieren.

4.2 Wechselwirkung der Mastzelltryptase mit humanen testikulären peritubulären Zellen

Tryptase ist das vorherrschende Protein der Mastzelle, welches bis zu 25 % des gesamten Proteingehaltes dieser Zellen ausmacht (325). Es ist bekannt, dass das Enzym die Proliferation von Fibroblasten anregen kann (61,62,68). Dies lässt vermuten, dass Tryptase maßgeblich an der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen beteiligt sein könnte, die sowohl durch eine Vermehrung der Mastzellen in den erkrankten

Gewebe als auch durch eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten gekennzeichnet sind (77). Auf Grund dessen und basierend auf der Tatsache, dass bei der idiopathischen Infertilität eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Fibrosierung des interstitiellen Bindegewebes sowie der Anzahl der Mastzellen besteht (53,326), wurde der Fokus auf Tryptase gelegt. Fibrotische Umbauvorgänge im Hoden sind häufig mit gestörter Spermatogenese assoziiert, unabhängig von der Ursache der Infertilität. Daher wurde der Einfluss der Serinprotease auf die zur Fibrose neigende testikuläre peritubuläre Wand untersucht.

Anhand des Modellsystems konnte gezeigt werden, dass nicht nur die kultivierten HTPCs (32), sondern auch die von fibrotisch veränderten Tubuli stammenden HTPC-Fs den Rezeptor für Tryptase exprimieren. Dabei wiesen die immunocytochemischen Färbungen verstärkte Signale im Bereich des Zellkerns auf. Da in der Literatur nichts über eine nukleäre Lokalisation des PAR-2 Rezeptors beschrieben wurde, wird von einer unspezifischen Färbung auf Grund von Ladungen oder einer verwandten Sequenz eines im Zellkern verstärkt exprimierten Proteins ausgegangen. In weiteren Experimenten konnte durch Ca^{2+} -Messungen dessen Funktionalität bei beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Da neben Tryptase auch das Rezeptor-spezifische Signalpeptid SLIGKV eine reversible Ca^{2+} -Induktion auslöst, kann von einer Aktivierung des Rezeptors und der damit zusammenhängenden intrazellulären Ca^{2+} -Induktion ausgegangen werden. Für PAR-2 ist bekannt, dass der Rezeptor in inflammatorische Prozesse involviert ist (327-329). Beispielsweise wurde im Hoden von Ratten eine auf die Ca^{2+} -Ausschüttung folgende Aktivierung der PKC und Phosphorylierung der MAPK beschrieben, was zur Freisetzung der inflammatorischen Moleküle MCP-1 und TGF- β 2 und Rekrutierung von Monozyten führt (101).

4.3 Neuroimmunologische Rolle von Mastzelltryptase im Hoden

Kürzlich konnte an humanen peritubulären Zellen nachgewiesen werden, dass $\text{TNF-}\alpha$ eine Stimulation von NGF hervorruft, welches von HTPCs sezerniert wird (20). Dabei konnte sowohl eine zeit- als auch dosisabhängige Regulation beobachtet werden. Da schon seit längerem eine neuroimmunologische Rolle des Mastzellprodukts Tryptase diskutiert wird, nicht zuletzt basierend auf der räumlichen Nähe von Mastzellen zu Nervenfasern (140,147), untersuchten wir mögliche Regulationsmechanismen des Enzyms im Bezug auf das Neurotrophin NGF.

In den vorliegenden Experimenten konnte die lokale Regulation des durch HTPC/-Fs produzierten NGF durch das Enzym Tryptase gezeigt werden. Jedoch scheint dieses Mastzellprodukt auf eine andere Weise als $\text{TNF-}\alpha$ den Spiegel von NGF erhöhen zu können. Gegen eine PAR-2-abhängige Regulation spricht, dass SLIGKV, welches als Agonist der Tryptase den Rezeptor aktiviert, nicht die Menge von NGF im Überstand erhöht. Deshalb vermuten wir einen Einfluss der Tryptase auf enzymatischer Ebene. Auch die Tatsache, dass NGF nicht auf mRNA Ebene durch Tryptase oder SLIGKV reguliert wird, spricht für diese Hypothese. Dabei konnte durch einen Vitalitätstest ausgeschlossen werden, dass Tryptase oder SLIGKV in den verwendeten Konzentrationen apoptotisch oder überlebensfördernd auf die peritubulären Zellen wirkt.

Die basale Sekretion von NGF durch HTPCs wurde bereits beschrieben (20). Untersuchungen an HTPC-Fs zeigten, dass diese von Patienten mit Fertilitätsstörungen und fibrotisch verdickter peritubulärer Wand stammenden Zellen, auf gleichem Niveau NGF produzieren und sezernieren. Jedoch spiegelt dieses Modell nur die *in vitro* Situation wieder. Auf Grund der fibrotisch verdickten peritubulären Wand bei Männern mit Fertilitätsstörungen und der damit verbundenen erhöhten

Anzahl peritubulärer Zellen, könnte *in vivo* eine höhere NGF-Konzentration vorhanden sein, als bei gesunden Männern. Durch Versuche mit PC12 Zellen konnte die biologische Funktionalität des Neurotrophins nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie aus Nebennieren-Tumoren der Ratte, welche nach Zugabe von NGF beginnen sich zu teilen und verstärkt Ausläufer zu bilden (330). Die Induktion von Neuritenwachstum durch Medienüberstände von HTPC/-Fs zeigt, dass sezerniertes NGF Signalkaskaden aktivieren und so auf benachbarte Zielzellen wirken kann.

Neben der Expression von NGF konnte in HTPC/-Fs auch proNGF sowohl in den Zellen als auch in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Die Funktion der Neurotrophin-Vorläufer und ihrer Zwischenprodukte ist bisher noch nicht gut verstanden. Zunächst wurde angenommen, dass proNGF lediglich eine Vorstufe in der Entstehung von NGF ist und keinerlei biologische Aktivität besitzt. Aber im Laufe vieler Untersuchungsreihen stellte sich heraus, dass proNGF und seine Zwischenprodukte durchaus biologisch wirksam sein können. Dies zeigte sich auch in pathologischen Prozessen wie Morbus Alzheimer. Bei dieser Krankheit degenerieren cholinerge Neurone, die NGF internalisieren und axoplasmatisch transportieren. Folglich müsste reifes NGF akkumulieren. Jedoch wurden erhöhte Konzentrationen von proNGF gefunden, während NGF nicht nachweisbar war (229). In Bioassays mit PC12 Zellen und sympathischen Neuronen steigerte auch rekombinantes spaltungsresistentes proNGF das Neuritenwachstum und konnte ihr Überleben bewirken (331). Dabei war die biologische Aktivität im Vergleich zu NGF um ca. das Fünffache niedriger. Andere Arbeitsgruppen fanden die neurotrophe Aktivität von proNGF ähnlich ausgeprägt wie beim reifen NGF (189,225). Chen *et al.* gewannen aus runden Spermatozoen der Ratte proNGF in der Molekülgröße von 31 kDa und 22 kDa (225). Der größere Vorläufer

förderte das Neuritenwachstum bei PC12 Zellen und zusätzlich auch das Überleben von Sertolizellen. Der kleinere Precursor war biologisch weniger wirksam. Lee *et al.* wiesen bei ihrem rekombinierten proNGF eine vermehrte Apoptose bei primären sympathischen zervikalen Ganglion-Neuronen und glatten Muskelzellen nach (193). Dieses proNGF hatte eine deutlich höhere Affinität zum p75-Rezeptor als NGF, konnte aber keine Bindung mit TrkA eingehen. Welche Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen NGF und proNGF bestehen und wie sich die Balance beider bezüglich Apoptose und Überleben von Zellen verhält, ist noch offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Enzymatische Aktivität von Tryptase auf proNGF und deren mögliche Auswirkung

In weiterführenden Versuchen wurde der enzymatische Einfluss von Tryptase auf proNGF untersucht. In manchen Prozessen initiiert Tryptase durch Spaltung ihrer Substrate sowohl deren Degradation und damit die Zerstörung ihrer biologischen Aktivität als auch deren Aktivierungsprozess, zum Beispiel durch Abspaltung eines pro-Peptides (120).

Durch Western Blot Studien konnte nachgewiesen werden, dass funktionelle Tryptase, nicht aber das Peptid SLIGKV, die proNGF-Mengen reduzieren kann. Hierbei diente sowohl proNGF, welches von Zellen sezerniert wurde, als auch kommerzielles synthetisches proNGF. Daher suchten wir in der Aminosäuresequenz nach potenziellen Abschnitten, welche von Tryptase erkannt und gespalten werden können.

Um die Substratspezifität der Tryptase zu evaluieren, wurden von Huang *et al.* rekombinante Tryptasemoleküle generiert. Die Analyse einer Tryptase-spezifischen Phagen-Peptidbibliothek ergab eine Präferenz der folgenden Schnittstelle: H₂N - P - R/K - X - K/R - COOH, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt (120,332). Da Tryptase ihre Substrate ausschließlich C-terminal der basischen Aminosäuren Lysin oder Arginin

schneidet, für die restlichen Positionen jedoch nur Präferenzen zeigt, sind Sequenzabschnitte, welche einen Lysin- oder Argininrest an Position 1, einen Lysin- oder Argininrest an Position 3 haben oder einen Prolinrest an Position 4 aufweisen in Bild 21 orange unterstrichen und werden als potentielle Schnittstellen für Tryptase definiert. Auf diese Weise konnten mehrere mögliche Tryptase-Schnittstellen ausfindig gemacht werden. Dabei ist zu beachten, dass eine der Sequenzen um nur eine Aminosäure versetzt zu der Erkennungssequenz von Furin liegt, von welchem bekannt ist, dass es proNGF in reifes NGF spaltet. Jedoch sind auch andere Schnittstellen möglich, welche sowohl in der pro-Sequenz, als auch in der Aminosäuresequenz NGF liegen, weshalb davon auszugehen ist, dass durch die Spaltung von Tryptase neben reifem NGF weitere prozessierte Nebenprodukte entstehen können. Die neben den im Western Blot detektierten 35 kDa großen Banden, können jedoch nicht als Spaltprodukte identifiziert werden, da diese sowohl bei unbehandelten Proben als auch bei Proben, welche mit Tryptase behandelt wurden auftauchen. Bei den 28 kDa und 30 kDa großen Banden handelt es sich vermutlich um Produkte, welche durch Hydrolyse oder Proteolyse der proNGF Moleküle entstanden sind. Weder mit dem NGF-Antikörper, noch mit dem proNGF-Antikörper konnten zusätzliche Banden bei Tryptase behandelten Proben detektiert werden. Auch eine Silberfärbung des Gels zeigte kein verändertes Bandenmuster. Auf Grund dessen sollen in weiteren Experimenten massenspektrometrische Versuche mit proNGF, welches für 24 h mit Tryptase inkubiert wurde, durchgeführt werden, um die Schnittstellen des Enzyms so genauer charakterisieren zu können.

Eine vermehrte Anzahl von Mastzellen bei Patienten mit Spermatogenesestörungen kann einen erhöhten Spiegel von Tryptase zur Folge haben, welche wiederum das proNGF/NGF Milieu verändern kann. Dies kann sich auch auf die Signalwege auswirken, da proNGF eine höhere Affinität zu

Sortilin hat als das reife NGF Protein. In der Literatur ist das Vorkommen des Sortilin Rezeptors im Hoden bislang nicht beschrieben worden, jedoch konnte in eigenen immunhistochemischen Untersuchungen an humanen Hodenbiopsien und Westernblot Analysen an Zelllysaten von HTPCs und HTPC-Fs der Sortilinrezeptor und dessen Corezeptor p75^{NTR} auf humanen testikulären Zellen und interstitiellen Zellen, bei welchen es sich vermutlich um Leydigzellen handelt, detektiert und lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch Präadsorption mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid konnte dessen Anwesenheit im testikulären Milieu und im Speziellen auf humanen testikulären peritubulären Zellen belegt werden. Durch Stimulation von HTPC/-Fs mit NGF (5 ng/ml, 50 ng/ml) oder proNGF (5 ng/ml, 50 ng/ml) konnten weder Auswirkungen auf deren Vitalität (ATP-Assay, Caspase-Assay), noch auf die Zellmorphologie (CASY-Messungen) festgestellt werden. Um die funktionelle Rolle dieses Rezeptorkomplexes im testikulären Milieu und auf den peritubulären Zellen herauszufinden, bedarf es daher noch weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus sollte außerdem geklärt werden, in wie fern ein verändertes Verhältnis von proNGF/NGF mit der fibrotisch verdickten tubulären Wand in Zusammenhang stehen könnte. Anzunehmen ist, dass durch die Akkumulation von Mastzellen eine erhöhte Konzentration von Tryptase bedeutet, was eine verringerte proNGF-Konzentration zur Folge hat. Ob sich dadurch jedoch *in vivo* die NGF-Konzentration erhöht bleibt offen und bedarf weiterer Forschung.

4.5 Rolle von NGF im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen und dessen Funktion im Hoden

Die Effekte von NGF gehen über die ursprüngliche Funktion als neuronaler Wachstumsfaktor hinaus. Die biologischen Funktionen sind komplex und reichen von Morphogenese, Chemotaxis bis hin zu Expressionsänderungen (285,333), weshalb das Neurotrophin als pleio-

tropher Faktor angesehen wird. Neben der Funktion als Bindeglied zwischen Zellen des Nerven- und des Immunsystems, verdeutlichte sich in den letzten Jahren der modulierende Einfluss im Rahmen immunologischer Erkrankungen.

NGF ist in peripheren Geweben während inflammatorischer Prozesse erhöht (267,334-337). Dabei ist das Neurotrophin in verschiedene Aktionen allergischer Inflammation, wie Infiltration von Eosinophilen und Lymphozyten, Rekrutierung und Zytokinausschüttung von Mastzellen, Differenzierung von Plasmazellen oder Produktion und Sekretion von IgE involviert (338-340). Die Tatsache, dass Mastzellen neben TrkA auch NGF produzieren und sezernieren, spricht für eine autokrine Neurotrophin-Wirkung auf diese Zellen. Im testikulären Milieu könnten neben Mastzellen auch peritubuläre Zellen die Quellen für NGF sein. Sowohl im Tiermodell als auch *in vitro* konnte nachgewiesen werden, dass NGF über die TrkA-Rezeptoren der Mastzellen (341,342) deren Degranulierung (271,343) bewirkt. Die Regulation der NGF-Konzentration durch die von Mastzellen sezernierte Tryptase könnte auch Auswirkungen auf die Mastzellen und deren weitere Ausschüttung von Mediatoren haben. Spaltet Tryptase den NGF-Vorläufer zu reifem NGF, bedeutet mehr Tryptase also eine durch positive Rückkopplung bewirkte erhöhte NGF-Konzentration. NGF wiederum würde die weitere Freisetzung von Mastzellmediatoren auslösen. Wirkt Tryptase jedoch degradierend auf NGF, indem es an den potentiellen Schnittstellen innerhalb des reifen NGF Moleküls spaltet, würde es zu einer negativen Rückkopplung von Tryptase auf die NGF-Konzentration und damit zur verringerten Degranulierung kommen. Dies ist jedoch rein spekulativ und bedarf genaueren Untersuchungen. Mastzellen kommen in vielen Geweben vor, doch sind dies sehr heterogene Zellen. Humane Mastzellen, welche aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden, sezernieren NGF im einstelligen

Pikogrammbereich pro 3×10^5 Zellen (344), vergleichbar mit der Menge, welche von peritubulären Zellen produziert wird. Ob und in welchen Mengen testikuläre Mastzellen NGF sezernieren ist bisher noch nicht untersucht worden. In vielen Studien wurde die Synthese und Freisetzung von NGF mit einer Zunahme von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α assoziiert (345-348). Es ist nicht auszuschließen, dass NGF auch im Hoden die Chemotaxis inflammatorischer Zellen beeinflusst.

Neben der inflammatorischen Rolle wird NGF auch eine reparative Funktion zugeschrieben. Durch ihren lokalen Anstieg spielen Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle bei der Steuerung von Wundheilungsprozessen (349,350). NGF wird von vielen Strukturzellen, einschließlich Fibroblasten (351), Keratinozyten (352) und Endothelzellen (353) produziert. Dabei können erhöhte NGF-Spiegel während chronischer Inflammation zur Wundheilung oder Geweberemodellierung Einfluss auf die Kontraktion oder Konnektivität haben (333). Der Beitrag von NGF könnte hierbei direkt bei der Steuerung struktureller Zellen, der Infiltrierung von Immunzellen oder indirekt durch die Stimulation anderer pro-fibrogener Faktoren liegen (340,351,354). Mäuse, welche NGF überexprimieren, wiesen eine Verdickung im subepithelialen Bereich der Atemwege auf (355). Auch im testikulären Milieu, vor allem im Bereich der peritubulären Wand, wäre eine solch fibrotische Wirkung von NGF durchaus denkbar.

Bislang wurde die peritubuläre Region im Bezug auf Expressionsänderungen von Neurotrophinen und deren Rezeptoren vornehmlich bei Labornagern (Maus, Ratte, Hamster), vor allem in immunhistochemischen Studien, untersucht (281). Bei neugeborenen Ratten wurde festgestellt, dass sich die Expressionsmuster von p75^{NTR} und TrkA je nach Entwicklungsstadium unterscheiden. Dabei konnte TrkA auf Leydigzellen und Sertolizellen lokalisiert werden. Dagegen war p75^{NTR} sowohl bei

neugeborenen als auch adulten Ratten im Bereich der peritubulären Wand und bei Spermatogonien zu finden (356). Für den humanen Hoden liegen nur eingeschränkte Studien vor, welche sich auf immunhistochemische Studien beschränken. Der p75-Rezeptor wurde im peritubulären und im interstitiellen Kompartiment lokalisiert, wobei weder Sertolizellen noch Keimzellen eine positive Immunfärbung aufwiesen (281,357,358). Ob und in wie weit auch im humanen System eine Expressionsänderung der Neurotrophinrezeptoren stattfindet, bedarf noch einer weiteren Klärung.

4.6 Möglicher Beitrag von humanen peritubulären Zellen zur Stammzellnische

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass peritubuläre Zellen im humanen Hoden GDNF exprimieren. Da sich in der Nachbarschaft der peritubulären Wand GFR- α 1 positive Zellen befinden vermuten wir einen möglichen Beitrag der humanen testikulären peritubulären Zellen zur spermatogonialen Stammzellnische (Bild 30). Da es sich bei GDNF um ein relativ kleines Molekül von 32 – 45 kDa handelt, kann es die Basallamina, welche die SSZ von den peritubulären Zellen abgrenzt, passieren. GDNF aktiviert Signalkaskaden, nach Bindung an den Rezeptorkomplex von GFR- α 1 und c-Ret.

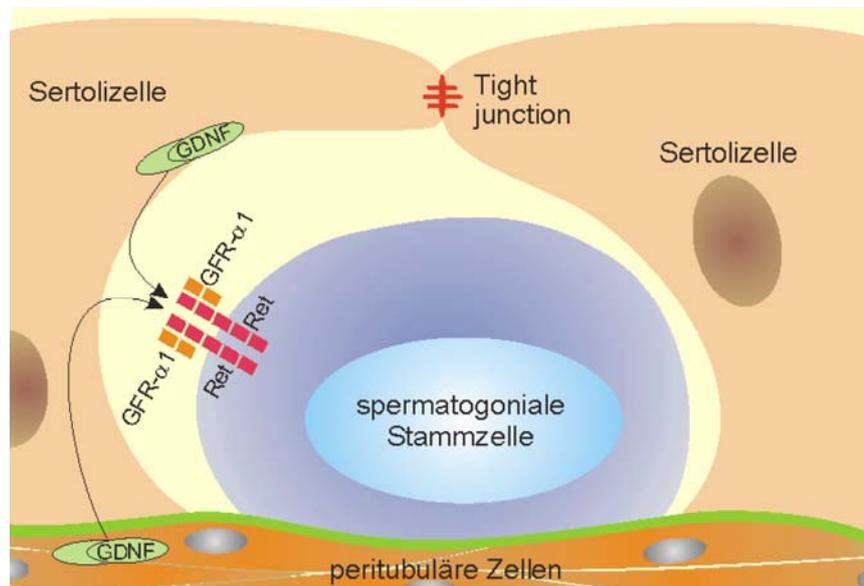


Bild 30: Beitrag von Sertolizellen und peritubulärer Zellen zur Stammzellnische. Neben Sertolizellen tragen möglicherweise auch peritubuläre testikuläre Zellen im humanen System zur Stammzellnische bei. Modifiziert nach (308).

In einer weiteren testikulären Zellpopulation, den Sertolizellen, wurde bei Mäusen (11,13,359) eine Expression von GDNF nachgewiesen, wonach von einer tatsächlichen Anwesenheit des neurotrophen Faktors im testikulären Milieu ausgegangen werden kann. Sertolizellen wurden als die Hauptproduzenten von GDNF im Hoden beschrieben. Da durch LMD und anschließender RT-PCR im tubulären Kompartiment von humanem Hoden die Expression von GDNF mRNA festgestellt werden konnte, schließen wir daraus, dass auch humane Sertolizellen diesen neurotrophen Faktor exprimieren. Jedoch konnte dies mit dieser Methode nicht genauer analysiert werden, da die Zellen nur einen kleinen Bestandteil des Tubulus bilden und davon ausgegangen werden muss, dass Keimzellen dieses Kompartiments mit extrahiert werden.

4.7 Lokalisierung von GDNF im Hoden

Da keine geeigneten spezifischen Antikörper gegen GDNF für humane Paraffinschnitte kommerziell erwerblich waren, war es uns nicht möglich, diesen Faktor immunhistochemisch im humanen Hoden zu lokalisieren. In einer älteren Arbeit mit Ratten (359) wurde GDNF in Sertolizellen beschrieben, doch waren bei den immunhistochemischen Versuchen auch eindeutige Färbungen von peritubulären Zellen neugeborener Ratten zu erkennen (siehe Bild 4 in (359)), was von den Autoren nicht jedoch nicht diskutiert wurde. In der vorliegenden Arbeit legten wir den Fokus auf die peritubulären Hodenzellen, welche im Gegensatz zu den interstitiellen Zellen GDNF mRNA exprimierten, was durch die LMD/RT-PCR Versuche deutlich wurde.

Es ist noch sehr wenig über die peritubulären Zellen des humanen Hoden bekannt, jedoch ist es uns seit kurzem möglich durch die Kultivierung diese Zellen genauer zu charakterisieren. Peritubuläre Zellen exprimieren die typischen Marker von Glattmuskelzellen (z.B. SMA, Details siehe (21,32)) und sie sezernieren verschiedene Signalmoleküle wie MCP-1, IL-6 oder das Neurotrophin NGF. Peritubuläre Zellen produzieren schon basal große Mengen von NGF, wobei diese durch die Mastzellprodukte TNF- α (20) oder Tryptase noch erhöht werden können. Durch ELISA Experimente konnte herausgefunden werden, dass sowohl HTPCs als auch HTPC-Fs den neurotrophen Faktor GDNF konstitutiv produzieren und sezernieren. Aus den LMD/RT-PCR und den ELISA Experimenten mit den kultivierten Zellen können wir schließen, dass humane peritubuläre Zellen GDNF *in vivo* und *in vitro* exprimieren und sezernieren.

HTPCs und HTPC-Fs produzieren GDNF konstitutiv in ähnlichem Maße. Während HTPCs von Patienten mit funktioneller Spermatogenese stammen, wurden HTPC-Fs aus Hoden von Männern mit gestörter

Spermatogenese und fibrotisch veränderter peritubulärer Wand isoliert. In den LMD/RT-PCR-Experimenten wurden peritubuläre Kompartimente von funktionellen und fibrotisch veränderten Tubuli isoliert, wobei auch hier keine Unterschiede in der Expression der GDNF mRNA festgestellt werden konnte. Es ist also offensichtlich, dass sich peritubuläre Zellen von Gesunden und Kranken im Bezug auf die GDNF-Produktion nicht unterscheiden, jedoch bedarf es weiterer Forschung um einen Zusammenhang von GDNF und der fibrotischen Veränderung der Tubuli auszuschließen.

Eine mögliche Kontamination der kultivierten peritubulären Zellen durch Sertolizellen oder Leydigzellen kann auf Grund der Abwesenheit von FSH-Rezeptoren oder LH-Rezeptoren ausgeschlossen werden. HTPCs exprimieren aber Rezeptoren für Tryptase (PAR-2; (32)) und TNF- α (TNFR1/2; (20)), wobei im Zuge dieser Arbeit gleiches auch für HTPC-Fs nachgewiesen werden konnte. So können peritubuläre Zellen durch von benachbarten Immunzellen sezernierten parakrinen Faktoren beeinflusst werden. Dies ist ein interessanter Aspekt hinsichtlich der Tatsache, dass die Anzahl von Mastzellen und Makrophagen, welche Tryptase und TNF- α ausschütten, bei Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese erhöht ist (53,67,360). Aus diesem Grund untersuchten wir mögliche Einflüsse dieser Faktoren auf HTPC/-Fs. Es ist bekannt, dass TNF- α und Tryptase die NGF-Mengen von HTPCs erhöhen können (20), jedoch haben diese beiden Mastzellprodukte keinen Einfluss auf die Sekretion von GDNF. So weisen HTPCs und HTPC-Fs auch Unterschiede hinsichtlich der GDNF Stimulation von Maus-Sertolizellen auf, bei welchen kürzlich ein stimulatorischer Effekt von TNF- α bezüglich der GDNF Produktion wurde (16). Weitere Studien sind nötig, doch die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Immunzellprodukte TNF- α und Tryptase keinen

regulatorischen Einfluss auf das von peritubulären Zellen sezernierte GDNF haben.

4.8 Lokalisation der Zielzellen für GDNF

In dieser Arbeit konnte die Lokalisation der Zielzellen für GDNF im humanen System bestätigt werden. GFR- α 1 ist mittlerweile ein oft verwendeter Marker für SSZ bei Nagern und Teil der Signalkaskade, welche von GDNF in allen Spezies, einschließlich Mensch und Primaten, ausgelöst wird (307,308,361). GFR- α 1 wurde immunhistochemisch in humanen Zellen nahe der Basalmembran detektiert, welche vermutlich spermatogoniale Stammzellen sind. Sie sind am Rand der Tubuli sowohl in der Nachbarschaft von Sertolizellen, von welchen schon bekannt ist, dass sie GDNF exprimieren und sezernieren, als auch in der Nähe der peritubulären Wand zu finden. Jedoch wurde in dieser Arbeit mit keinem weiteren Stammzellmarker die Identität der Stammzellen bewiesen. Die Position der SSZ lässt vermuten, dass Sertolizellen und nach unseren Erkenntnissen auch peritubuläre Zellen am GFR- α 1/GDNF-System beteiligt sind. Dennoch bedarf es weiterer Analysen, um die Expression des gesamten, funktionellen Rezeptorkomplexes, einschließlich c-Ret und der damit verbundenen, durch GDNF ausgelösten Signalkaskade, aufzuklären. Die konstitutive GDNF Sekretion der peritubulären Zellen konnte zumindest *in vitro* nicht durch die Immuneffektoren TNF- α und Trypsin reguliert werden. Humane testikuläre peritubuläre Zellen scheinen zusammen mit Sertolizellen an der Bereitstellung von GDNF für die Stammzellnische beteiligt zu sein.

Es ist zu beachten, dass die meisten deskriptiven Befunde dieser Arbeit zwar an humanem Material, jedoch *in vitro* an nur begrenzt zur Verfügung stehendem Patientenmaterial durchgeführt wurden. Inwieweit sich die zum größten Teil *in vitro* durchgeführten Versuche auf das komplexere *in vivo*

System übertragen lassen bleibt offen und bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen. Jedoch wurde immer darauf geachtet, die Eckdaten der Untersuchungen mit der Situation *in vivo* anhand von Paraffinmaterial zu verifizieren.

5 Zusammenfassung

Im humanen Hoden bilden glattmuskelzell-ähnliche peritubuläre Zellen in mehreren Schichten die Wand der Samenkanälchen. Bei infertilen Männern mit Spermatogenesestörungen sind fibrotisch verdickte Tubuluswände durch Umbauvorgänge der peritubulären Region und eine Akkumulation von Immunzellen (Mastzellen und Makrophagen) typischerweise zu beobachten. Mastzellen wird auf Grund ihrer Eigenschaft, die Fibroblasten und Glattmuskelzellen durch ihre sekretorischen Produkte zu aktivieren sowie die Kollagensynthese über Wachstumsfaktoren zu fördern eine Schlüsselrolle bei fibrotischen Veränderungen und bei der Modellierung von Geweben zugeschrieben (61-63). Mit Hilfe eines erst kürzlich etablierten Modells konnten sowohl humane testikuläre peritubuläre Zellen gesunder Männer mit funktioneller (HTPC) als auch solche von Männern mit gestörter Spermatogenese und peritubulärer Fibrose (HTPC-F) isoliert und kultiviert werden. Da Studien der testikulären peritubulären Zellen bis vor kurzem nur an Tiermodellen (Maus, Ratte) durchgeführt wurden, gab das Modellsystem der peritubulären Zellen die Möglichkeit die Sekretionsprofile im humanen System genauer zu charakterisieren. Dabei wurde im speziellen der Einfluss von Mastzellprodukten auf die Sekretion von neurotrophen Faktoren untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HTPCs und HTPC-Fs neben den Neurotrophen NGF, BDNF und NT-3 die neurotrophen Faktoren GDNF, Lif und CNTF exprimieren. Auf Grund des

schon beschriebenen Vorkommens von NGF und GDNF im testikulären Milieu wurde der Fokus der folgenden Untersuchungen auf diese beiden Faktoren gelegt. Eine basale Expression und Sekretion von funktionell aktivem NGF durch HTPCs wurde vor kurzem beschrieben (20) und konnte nun auch für HTPC-Fs gezeigt werden. Durch das Hauptmastzellprodukt, der Protease Tryptase, deren funktioneller Rezeptor (PAR-2) von beiden Zelltypen exprimiert wird, nicht aber durch den Agonist SLIGKV, ließ sich die Sekretion von NGF durch HTPCs und HTPC-Fs im gleichen Umfang signifikant steigern. Da Tryptase und SLIGKV weder die Vitalität der Zellen noch NGF auf mRNA Ebene veränderten, wurden Rezeptor-unabhängige Regulationsmechanismen von NGF durch das Enzym Tryptase in Betracht gezogen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass HTPC/-Fs neben NGF auch dessen biologisch aktives Vorläuferprotein proNGF in substantiellen Mengen bilden und freisetzen. In Anwesenheit von Tryptase konnten die Mengen sowohl von natürlichem, als auch von synthetischem proNGF signifikant reduziert werden. Nach Untersuchung der Aminosäuresequenz kamen mehrere Sequenzabschnitte als potentielle Schnittstellen für Tryptase in Frage, was bedeutet, dass dieses Enzym das proNGF/NGF Milieu durch Spaltung und eventuell auch Degradierung von proNGF verändern kann.

Des Weiteren sollte die Sekretion des neurotrophen Faktors GDNF durch HTPC/-Fs untersucht werden. Bislang wurden im Hoden Sertolizellen als die Hauptproduzenten des Liganden GDNF beschrieben, jedoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass peritubuläre Zellen, welche ebenfalls in räumlicher Nähe zu den spermatogonialen Stammzellen liegen, GDNF konstitutiv sezernieren. Die Sekretion dieses Faktors konnte *in vitro* nicht durch die Mastzellprodukte Tryptase oder TNF- α beeinflusst werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass im humanen System eine Zellpopulation

nahe der Basalmembran den für spermatogoniale Stammzellen typischen Rezeptor GFR- α 1 exprimieren. Aus diesen Erkenntnissen ist somit zu schließen, dass neben den Sertolizellen auch die benachbarten peritubulären Zellen mit der Sekretion von GDNF einen Beitrag zur Stammzellnische im Hoden leisten.

Zusammenfassend konnten an Hand der vorliegenden Ergebnisse mit humanen testikulären peritubulären Zellen wesentliche Aussagen über HTPC/-Fs getroffen werden: Die Zellen exprimieren ein breites Spektrum von neurotrophen Faktoren, wobei *in vitro* keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen festgestellt werden konnten. Tryptase, das Hauptsekretionsprodukt von Mastzellen, kann proNGF spalten und somit das Verhältnis von proNGF/NGF verändern. Dies könnte auch in vielen anderen Geweben eine wesentliche Rolle spielen, wo Mastzellen und proNGF-sezierende Zellen colokalisiert sind. Darüber hinaus konnte die Sekretion des neurotrophen Faktors GDNF durch HTPCs und HTPC-Fs und somit deren möglicher Beitrag zur spermatogonialen Stammzellnische beschrieben werden.

6 Weitere Projekte während der Doktorarbeit

Neben den Untersuchungen der neurotrophen Faktoren im humanen Hoden habe ich an weiteren Projekten mitgearbeitet:

6.1 Der Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanal (BK_{Ca}) von Leydigzellen ist in die Testosteronproduktion involviert

Leydigzellen sind Androgen-produzierende Zellen des Hodens. In dieser Studie sollten die Zellen auf die Expression von Ca^{2+} - und Spannungs-aktivierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}) und dessen Regulationsmechanismen untersucht werden. Der Strom dieses Kanals kann selektiv und mit hoher Affinität durch den spezifischen Blocker Iberitoxin (IbTx) inhibiert werden (362).

Durch immunhistochemische und immunzytochemische Studien konnte die Anwesenheit des BK_{Ca} in Leydigzellen bei Hamstern und beim Menschen nachgewiesen werden. Die Involvierung dieses Kanals in die Testosteronproduktion wurde an Leydigzellen von Hamstern erforscht. Humanes Choriongonadotropin (hCG, 100 mIU/ml, 3 h) erhöhte signifikant die basale Testosteron Sekretion. In Anwesenheit von IbTx (100 nM, 3 h) konnte die Testosteron Produktion noch weiter gesteigert werden, was jedoch nicht mit den signifikant veränderten mRNA-Mengen von StAR oder dem Enzym 17β -HSD in Zusammenhang zu stehen scheint. Allerdings konnte durch hCG vermutlich über erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel eine Hyperpolarisation der Leydigzellen hervorgerufen werden, welche in Anwesenheit von IbTx (100 nM, 60 min) nicht detektierbar

waren, was einen Zusammenhang zwischen der Steroidproduktion und dem veränderten Membranpotential vermuten lässt.

6.2 Testikuläre peritubuläre Zellen und Steroide

Da HTPCs und HTPC-Fs weder den LH-Rezeptor noch den FSH-Rezeptor exprimieren, konnte ausgeschlossen werden, dass diese Kulturen mit Sertolizellen oder Leydigzellen kontaminiert sind.

Durch qRT-PCR und Western Blot Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der Enzyme StAR und P450_{SCC}, welche typisch für Steroidbildende Zellen sind, auf mRNA Ebene sowie auf Proteinebene durch Forskolin (50 µM, 4 h) stimuliert werden können. Dabei aktiviert Forskolin die Adenylatzyklase und katalysiert so die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu dem Signalprotein zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Hierbei bedarf es noch weiterer Untersuchungen, bei welchen es ein vergleichbares physiologisches Stimulanz zu Forskolin herauszufinden gilt.

ELISA Messungen wiesen auf eine Produktion von Progesteron durch HTPC/-Fs hin. Auf Grund der durch RT-PCR nachweisbaren Expression des Progesteron-Rezeptors ist eine auto- und/oder parakrine Wirkung von Progesteron und damit eine Involvierung von peritubulären Zellen in die Steroidogenese nicht auszuschließen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Schlatt, S., Meinhardt, A., and Nieschlag, E. (1997) *Eur J Endocrinol* **137**, 107-117
2. de Kretser, D. M., and Phillips, D. J. (1998) *J Reprod Immunol* **39**, 1-12
3. Bustos-Obregon, E., and Holstein, A. F. (1973) *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **141**, 413-425
4. Zhang, C., Yeh, S., Chen, Y. T., Wu, C. C., Chuang, K. H., Lin, H. Y., Wang, R. S., Chang, Y. J., Mendis-Handagama, C., Hu, L., Lardy, H., and Chang, C. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17718-17723
5. Junqueira L. C. U., C. J., Gratzl M. (2004) Männliche Geschlechtsorgane. in *Histologie* (M., G. ed.), 6 Ed., Springer. pp 370-384
6. Schlatt, S., and Weinbauer, G. F. (1994) *Int J Androl* **17**, 214-222
7. Dadoune, J. P. (2007) *Folia Histochem Cytobiol* **45**, 141-147
8. Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001) *Nature* **414**, 98-104
9. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E., and Spradling, A. (2004) *Curr Opin Cell Biol* **16**, 693-699
10. Morrison, S. J., and Spradling, A. C. (2008) *Cell* **132**, 598-611
11. Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M., and Sariola, H. (2000) *Science* **287**, 1489-1493
12. Kubota, H., Avarbock, M. R., and Brinster, R. L. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16489-16494
13. Hofmann, M. C. (2008) *Mol Cell Endocrinol* **288**, 95-103
14. Hofmann, M. C., Braydich-Stolle, L., and Dym, M. (2005) *Dev Biol* **279**, 114-124
15. Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002) *Mech Dev* **113**, 29-39
16. Simon, L., Ekman, G. C., Tyagi, G., Hess, R. A., Murphy, K. M., and Cooke, P. S. (2007) *Exp Cell Res* **313**, 3090-3099
17. Oatley, J. M., and Brinster, R. L. (2008) *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 263-286
18. Anthony, C. T., and Skinner, M. K. (1989) *Biol Reprod* **40**, 811-823
19. Maekawa, M., Kamimura, K., and Nagano, T. (1996) *Arch Histol Cytol* **59**, 1-13
20. Schell, C., Albrecht, M., Mayer, C., Schwarzer, J. U., Frungieri, M. B., and Mayerhofer, A. (2008) *Endocrinology* **149**, 1678-1686
21. Schell, C., Albrecht, M., Spillner, S., Mayer, C., Kunz, L., Kohn, F. M., Schwarzer, U., and Mayerhofer, A. (2010) *Endocrinology* **151**, 1257-1268
22. Welsh, M., Saunders, P. T., Atanassova, N., Sharpe, R. M., and Smith, L. B. (2009) *FASEB J* **23**, 4218-4230
23. Holstein, A. F., Maekawa, M., Nagano, T., and Davidoff, M. S. (1996) *Arch Histol Cytol* **59**, 109-125
24. Filippini, A., Tripiciano, A., Palombi, F., Teti, A., Paniccia, R., Stefanini, M., and Ziparo, E. (1993) *Endocrinology* **133**, 1789-1796
25. Ailenberg, M., Tung, P. S., and Fritz, I. B. (1990) *Biol Reprod* **42**, 499-509

26. Yamamoto, M., Hashimoto, J., Takaba, H., and Miyake, K. (1987) *J Urol* **137**, 345-348
27. Niemi, M., and Korman, M. (1965) *Ann Med Exp Biol Fenn* **43**, 40-42
28. Rossi, F., Ferraresi, A., Romagni, P., Silvestroni, L., and Santemma, V. (2002) *Endocrinology* **143**, 3096-3104
29. Galdieri, M., and Ricci, G. (1998) *Differentiation* **63**, 13-19
30. Davidoff, M. S., Breucker, H., Holstein, A. F., and Seidl, K. (1990) *Cell Tissue Res* **262**, 253-261
31. Virtanen, I., Kallajoki, M., Narvanen, O., Paranko, J., Thornell, L. E., Miettinen, M., and Lehto, V. P. (1986) *Anat Rec* **215**, 10-20
32. Albrecht, M., Ramsch, R., Kohn, F. M., Schwarzer, J. U., and Mayerhofer, A. (2006) *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1956-1960
33. Chiarenza, C., Filippini, A., Tripiciano, A., Beccari, E., and Palombi, F. (2000) *Endocrinology* **141**, 2971-2981
34. Middendorff, R., Muller, D., Wichers, S., Holstein, A. F., and Davidoff, M. S. (1997) *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4154-4161
35. Tung, P. S., and Fritz, I. B. (1991) *J Cell Physiol* **146**, 386-393
36. Santemma, V., Beligotti, F., Magnanti, M., Palleschi, S., Silvestroni, L., and Fabbrini, A. (1996) *Biol Reprod* **54**, 583-590
37. Harris, G. C., and Nicholson, H. D. (1998) *J Endocrinol* **157**, 251-257
38. Tripiciano, A., Peluso, C., Morena, A. R., Palombi, F., Stefanini, M., Ziparo, E., Yanagisawa, M., and Filippini, A. (1999) *J Cell Biol* **145**, 1027-1038
39. Barone, F., Genazzani, A. A., Conti, A., Churchill, G. C., Palombi, F., Ziparo, E., Sorrentino, V., Galione, A., and Filippini, A. (2002) *FASEB J* **16**, 697-705
40. Tung, P. S., and Fritz, I. B. (1994) *J Cell Physiol* **161**, 77-88
41. Ricci, G., Catizone, A., Scarcella, M. F., and Galdieri, M. (1999) *Exp Cell Res* **249**, 102-108
42. Skinner, M. K., McLachlan, R. I., and Bremner, W. J. (1989) *Mol Cell Endocrinol* **66**, 239-249
43. Skinner, M. K., and Moses, H. L. (1989) *Mol Endocrinol* **3**, 625-634
44. de Winter, J. P., Vanderstichele, H. M., Verhoeven, G., Timmerman, M. A., Wesseling, J. G., and de Jong, F. H. (1994) *Endocrinology* **135**, 759-767
45. Gnessi, L., Fabbri, A., and Spera, G. (1997) *Endocr Rev* **18**, 541-609
46. Magnanti, M., Gimondi, A., Gandini, O., Rossi, F. M., Michetti, P. M., Santemma, V., and Morrone, S. (2001) *Am J Reprod Immunol* **45**, 21-27
47. Piquet-Pellorce, C., Dorval-Coiffec, I., Pham, M. D., and Jegou, B. (2000) *Endocrinology* **141**, 1136-1141
48. Norton, J. N., Vigne, J. L., and Skinner, M. K. (1994) *Endocrinology* **134**, 149-157
49. Hoeben, E., Swinnen, J. V., Heyns, W., and Verhoeven, G. (1999) *Endocrinology* **140**, 2216-2223
50. Verhoeven, G., Hoeben, E., and De Gendt, K. (2000) *Andrologia* **32**, 42-45
51. Yamamoto, T., Hartmann, K., Eckes, B., and Krieg, T. (2001) *J Dermatol Sci* **26**, 106-111
52. Arenas, M. I., Bethencourt, F. R., Fraile, B., and Paniagua, R. (1997) *Histochem Cell Biol* **107**, 469-477
53. Meineke, V., Frungieri, M. B., Jessberger, B., Vogt, H., and Mayerhofer, A. (2000) *Fertil Steril* **74**, 239-244
54. Haider, S. G., Talati, J., and Servos, G. (1999) *Tissue Cell* **31**, 90-98
55. Santamaria, L., Martin, R., Codesal, J., and Paniagua, R. (1995) *Int J Androl* **18**, 13-22
56. Gulkesen, K. H., Erdogru, T., Sargin, C. F., and Karpuzoglu, G. (2002) *Asian J Androl* **4**, 55-60

57. Santoro, G., Romeo, C., Impellizzeri, P., Gentile, C., Anastasi, G., and Santoro, A. (2000) *Fertil Steril* **73**, 699-705
58. Santamaria, L., Martin, R., Nistal, M., and Paniagua, R. (1992) *Histopathology* **21**, 423-433
59. Apa, D. D., Cayan, S., Polat, A., and Akbay, E. (2002) *Arch Androl* **48**, 337-344
60. Hussein, M. R., Abou-Deif, E. S., Bedaiwy, M. A., Said, T. M., Mustafa, M. G., Nada, E., Ezat, A., and Agarwal, A. (2005) *Fertil Steril* **83**, 1447-1453
61. Hartmann, T., Ruoss, S. J., Raymond, W. W., Seuwen, K., and Caughey, G. H. (1992) *Am J Physiol* **262**, L528-534
62. Cairns, J. A., and Walls, A. F. (1997) *J Clin Invest* **99**, 1313-1321
63. Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. (1997) *Physiol Rev* **77**, 1033-1079
64. Jezek, D., Banek, L., Hittmair, A., Pezerovic-Panijan, R., Goluza, T., and Schulze, W. (1999) *Andrologia* **31**, 203-210
65. Mayerhofer, A., Frungieri, M. B., Fritz, S., Bulling, A., Jessberger, B., and Vogt, H. J. (1999) *J Androl* **20**, 341-347
66. Yamanaka, K., Fujisawa, M., Tanaka, H., Okada, H., Arakawa, S., and Kamidono, S. (2000) *Hum Reprod* **15**, 1543-1547
67. Frungieri, M. B., Calandra, R. S., Lustig, L., Meineke, V., Kohn, F. M., Vogt, H. J., and Mayerhofer, A. (2002) *Fertil Steril* **78**, 298-306
68. Ruoss, S. J., Hartmann, T., and Caughey, G. H. (1991) *J Clin Invest* **88**, 493-499
69. Kirshenbaum, A. S., Goff, J. P., Kessler, S. W., Mican, J. M., Zsebo, K. M., and Metcalfe, D. D. (1992) *J Immunol* **148**, 772-777
70. Kirshenbaum, A. S., Kessler, S. W., Goff, J. P., and Metcalfe, D. D. (1991) *J Immunol* **146**, 1410-1415
71. Furitsu, T., Saito, H., Dvorak, A. M., Schwartz, L. B., Irani, A. M., Burdick, J. F., Ishizaka, K., and Ishizaka, T. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10039-10043
72. Valent, P., Spanblochl, E., Sperr, W. R., Sillaber, C., Zsebo, K. M., Agis, H., Strobl, H., Geissler, K., Bettelheim, P., and Lechner, K. (1992) *Blood* **80**, 2237-2245
73. Galli, S. J. (2000) *Curr Opin Hematol* **7**, 32-39
74. Henz, B. M., Maurer, M., Lippert, U., Worm, M., and Babina, M. (2001) *Exp Dermatol* **10**, 1-10
75. Marshall, J. S., and Jawdat, D. M. (2004) *J Allergy Clin Immunol* **114**, 21-27
76. Benoist, C., and Mathis, D. (2002) *Nature* **420**, 875-878
77. Temann, U. A., Geba, G. P., Rankin, J. A., and Flavell, R. A. (1998) *J Exp Med* **188**, 1307-1320
78. Dvorak, A. M. (2002) *Int Arch Allergy Immunol* **127**, 100-105
79. Payne, V., and Kam, P. C. (2004) *Anaesthesia* **59**, 695-703
80. Ishizaka, T. (1981) *J Allergy Clin Immunol* **67**, 90-96
81. Leal-Berumen, I., Conlon, P., and Marshall, J. S. (1994) *J Immunol* **152**, 5468-5476
82. Stassen, M., Muller, C., Arnold, M., Hultner, L., Klein-Hessling, S., Neudorfl, C., Reineke, T., Serfling, E., and Schmitt, E. (2001) *J Immunol* **166**, 4391-4398
83. Schwartz, L. B., Irani, A. M., Roller, K., Castells, M. C., and Schechter, N. M. (1987) *J Immunol* **138**, 2611-2615
84. Schwartz, L. B. (2001) *Leuk Res* **25**, 553-562
85. Pallaoro, M., Fejzo, M. S., Shayesteh, L., Blount, J. L., and Caughey, G. H. (1999) *J Biol Chem* **274**, 3355-3362
86. Caughey, G. H., Raymond, W. W., Blount, J. L., Hau, L. W., Pallaoro, M., Wolters, P. J., and Verghese, G. M. (2000) *J Immunol* **164**, 6566-6575
87. Xia, H. Z., Kepley, C. L., Sakai, K., Chelliah, J., Irani, A. M., and Schwartz, L. B. (1995) *J Immunol* **154**, 5472-5480

88. Sakai, K., Ren, S., and Schwartz, L. B. (1996) *J Clin Invest* **97**, 988-995
89. Schwartz, L. B., Sakai, K., Bradford, T. R., Ren, S., Zweiman, B., Worobec, A. S., and Metcalfe, D. D. (1995) *J Clin Invest* **96**, 2702-2710
90. Caughey, G. H. (2006) *J Allergy Clin Immunol* **117**, 1411-1414
91. Ren, S., Sakai, K., and Schwartz, L. B. (1998) *J Immunol* **160**, 4561-4569
92. Pereira, P. J., Bergner, A., Macedo-Ribeiro, S., Huber, R., Matschiner, G., Fritz, H., Sommerhoff, C. P., and Bode, W. (1998) *Nature* **392**, 306-311
93. Sommerhoff, C. P., Bode, W., Pereira, P. J., Stubbs, M. T., Sturzebecher, J., Piechottka, G. P., Matschiner, G., and Bergner, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10984-10991
94. Molino, M., Barnathan, E. S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J. A., Schechter, N., Woolkalis, M., and Brass, L. F. (1997) *J Biol Chem* **272**, 4043-4049
95. Ossovskaya, V. S., and Bunnett, N. W. (2004) *Physiol Rev* **84**, 579-621
96. Hollenberg, M. D., and Compton, S. J. (2002) *Pharmacol Rev* **54**, 203-217
97. Noorbakhsh, F., Vergnolle, N., Hollenberg, M. D., and Power, C. (2003) *Nat Rev Neurosci* **4**, 981-990
98. D'Andrea, M. R., Derian, C. K., Leturcq, D., Baker, S. M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A. L., Santulli, R. J., Brass, L. F., and Andrade-Gordon, P. (1998) *J Histochem Cytochem* **46**, 157-164
99. Weidinger, S., Mayerhofer, A., Frungieri, M. B., Meineke, V., Ring, J., and Kohn, F. M. (2003) *Hum Reprod* **18**, 2519-2524
100. Frungieri, M. B., Weidinger, S., Meineke, V., Kohn, F. M., and Mayerhofer, A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15072-15077
101. Iosub, R., Klug, J., Fijak, M., Schneider, E., Frohlich, S., Blumbach, K., Wennemuth, G., Sommerhoff, C. P., Steinhoff, M., and Meinhardt, A. (2006) *J Pathol* **208**, 686-698
102. Matsushima, R., Takahashi, A., Nakaya, Y., Maezawa, H., Miki, M., Nakamura, Y., Ohgushi, F., and Yasuoka, S. (2006) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L385-395
103. Kawabata, A., and Kuroda, R. (2000) *Jpn J Pharmacol* **82**, 171-174
104. Berger, P., Tunon-De-Lara, J. M., Savineau, J. P., and Marthan, R. (2001) *J Appl Physiol* **91**, 995-1003
105. Kawabata, A. (2002) *Expert Rev Mol Med* **4**, 1-17
106. Johnson, P. R., Ammit, A. J., Carlin, S. M., Armour, C. L., Caughey, G. H., and Black, J. L. (1997) *Eur Respir J* **10**, 38-43
107. Molinari, J. F., Scuri, M., Moore, W. R., Clark, J., Tanaka, R., and Abraham, W. M. (1996) *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 649-653
108. Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H., and Ramamurthy, N. S. (1989) *J Clin Invest* **84**, 1657-1662
109. Stack, M. S., and Johnson, D. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 9416-9419
110. Lohi, J., Harvima, I., and Keski-Oja, J. (1992) *J Cell Biochem* **50**, 337-349
111. Little, S. S., and Johnson, D. A. (1995) *Biochem J* **307 (Pt 2)**, 341-346
112. Schwartz, L. B., Bradford, T. R., Littman, B. H., and Wintroub, B. U. (1985) *J Immunol* **135**, 2762-2767
113. Thomas, V. A., Wheeless, C. J., Stack, M. S., and Johnson, D. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 2291-2298
114. Caughey, G. H., Leidig, F., Viro, N. F., and Nadel, J. A. (1988) *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 133-137
115. Tam, E. K., and Caughey, G. H. (1990) *Am J Respir Cell Mol Biol* **3**, 27-32
116. Blair, R. J., Meng, H., Marchese, M. J., Ren, S., Schwartz, L. B., Tonnesen, M. G., and Gruber, B. L. (1997) *J Clin Invest* **99**, 2691-2700

117. Rauter, I., Krauth, M. T., Westritschnig, K., Horak, F., Flicker, S., Gieras, A., Repa, A., Balic, N., Spitzauer, S., Huss-Marp, J., Brockow, K., Darsow, U., Behrendt, H., Ring, J., Kricek, F., Valent, P., and Valenta, R. (2008) *J Allergy Clin Immunol* **121**, 197-202
118. Gruber, B. L., Schwartz, L. B., Ramamurthy, N. S., Irani, A. M., and Marchese, M. J. (1988) *J Immunol* **140**, 3936-3942
119. Saunders, W. B., Bayless, K. J., and Davis, G. E. (2005) *J Cell Sci* **118**, 2325-2340
120. Hallgren, J., and Pejler, G. (2006) *FEBS J* **273**, 1871-1895
121. Jarjour, N. N., Calhoun, W. J., Schwartz, L. B., and Busse, W. W. (1991) *Am Rev Respir Dis* **144**, 83-87
122. Clark, J. M., Abraham, W. M., Fishman, C. E., Forteza, R., Ahmed, A., Cortes, A., Warne, R. L., Moore, W. R., and Tanaka, R. D. (1995) *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 2076-2083
123. Sylvin, H., Dahlback, M., Van Der Ploeg, I., and Alving, K. (2002) *Clin Exp Allergy* **32**, 967-971
124. Berger, P., Compton, S. J., Molimard, M., Walls, A. F., N'Guyen, C., Marthan, R., and Tunon-De-Lara, J. M. (1999) *Clin Exp Allergy* **29**, 804-812
125. Wright, C. D., Havill, A. M., Middleton, S. C., Kashem, M. A., Dripps, D. J., Abraham, W. M., Thomson, D. S., and Burgess, L. E. (1999) *Biochem Pharmacol* **58**, 1989-1996
126. Oh, S. W., Pae, C. I., Lee, D. K., Jones, F., Chiang, G. K., Kim, H. O., Moon, S. H., Cao, B., Ogbu, C., Jeong, K. W., Kozu, G., Nakanishi, H., Kahn, M., Chi, E. Y., and Henderson, W. R., Jr. (2002) *J Immunol* **168**, 1992-2000
127. Rice, K. D., Wang, V. R., Gangloff, A. R., Kuo, E. Y., Dener, J. M., Newcomb, W. S., Young, W. B., Putnam, D., Cregar, L., Wong, M., and Simpson, P. J. (2000) *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 2361-2366
128. Huang, C., Friend, D. S., Qiu, W. T., Wong, G. W., Morales, G., Hunt, J., and Stevens, R. L. (1998) *J Immunol* **160**, 1910-1919
129. Hallgren, J., Karlson, U., Poorafshar, M., Hellman, L., and Pejler, G. (2000) *Biochemistry* **39**, 13068-13077
130. He, S., Peng, Q., and Walls, A. F. (1997) *J Immunol* **159**, 6216-6225
131. He, S., and Walls, A. F. (1997) *Eur J Pharmacol* **328**, 89-97
132. Jarvikallio, A., Naukkarinen, A., Harvima, I. T., Aalto, M. L., and Horsmanheimo, M. (1997) *Br J Dermatol* **136**, 871-877
133. Tremaine, W. J., Brzezinski, A., Katz, J. A., Wolf, D. C., Fleming, T. J., Mordenti, J., Strenkoski-Nix, L. C., and Kurth, M. C. (2002) *Aliment Pharmacol Ther* **16**, 407-413
134. Nico, B., Marzullo, A., Corsi, P., Vacca, A., Roncali, L., and Ribatti, D. (2004) *Neuroscience* **123**, 585-588
135. Buckley, M. G., Walters, C., Wong, W. M., Cawley, M. I., Ren, S., Schwartz, L. B., and Walls, A. F. (1997) *Clin Sci (Lond)* **93**, 363-370
136. Buckley, M. G., Gallagher, P. J., and Walls, A. F. (1998) *J Pathol* **186**, 67-74
137. Rozniecki, J. J., Hauser, S. L., Stein, M., Lincoln, R., and Theoharides, T. C. (1995) *Ann Neurol* **37**, 63-66
138. Pedotti, R., De Voss, J. J., Steinman, L., and Galli, S. J. (2003) *Trends Immunol* **24**, 479-484
139. Buckley, M. G., Variend, S., and Walls, A. F. (2001) *Clin Exp Allergy* **31**, 1696-1704
140. Naukkarinen, A., Harvima, I. T., Aalto, M. L., and Horsmanheimo, M. (1994) *Int J Dermatol* **33**, 361-366
141. Namazi, M. R. (2005) *Autoimmunity* **38**, 449-452

142. Kelso, E. B., Lockhart, J. C., Hembrough, T., Dunning, L., Plevin, R., Hollenberg, M. D., Sommerhoff, C. P., McLean, J. S., and Ferrell, W. R. (2006) *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1017-1024
143. Cenac, N., Coelho, A. M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W. K., Wallace, J. L., Hollenberg, M. D., Bunnett, N. W., Garcia-Villar, R., Bueno, L., and Vergnolle, N. (2002) *Am J Pathol* **161**, 1903-1915
144. Yoshii, M., Jikuhara, A., Mori, S., Iwagaki, H., Takahashi, H. K., Nishibori, M., and Tanaka, N. (2005) *J Pharmacol Sci* **98**, 450-458
145. Ui, H., Andoh, T., Lee, J. B., Nojima, H., and Kuraishi, Y. (2006) *Eur J Pharmacol* **530**, 172-178
146. Temkin, V., Kantor, B., Weg, V., Hartman, M. L., and Levi-Schaffer, F. (2002) *J Immunol* **169**, 2662-2669
147. Stead, R. H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G. T., Felten, S. Y., and Bienenstock, J. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2975-2979
148. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670
149. Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., and Harkins, R. N. (1985) *J Biol Chem* **260**, 2345-2354
150. Baud, V., and Karin, M. (2001) *Trends Cell Biol* **11**, 372-377
151. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S. D. (1988) *Cell* **53**, 45-53
152. Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A., and Goeddel, D. V. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6060-6064
153. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) *Nature* **385**, 729-733
154. Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., and et al. (1994) *Nature* **370**, 555-557
155. Jones, E. Y., Stuart, D. I., and Walker, N. P. (1989) *Nature* **338**, 225-228
156. Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. (1990) *Cell* **61**, 351-359
157. Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., and Goodwin, R. G. (1990) *Science* **248**, 1019-1023
158. Feldman, A. M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y., and McTiernan, C. (2000) *J Am Coll Cardiol* **35**, 537-544
159. Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000) *Science* **288**, 2351-2354
160. Grell, M. (1995) *J Inflamm* **47**, 8-17
161. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993) *Cell* **74**, 845-853
162. Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003) *Cell Death Differ* **10**, 45-65
163. De, S. K., Chen, H. L., Pace, J. L., Hunt, J. S., Terranova, P. F., and Enders, G. C. (1993) *Endocrinology* **133**, 389-396
164. Moore, C., and Hutson, J. C. (1994) *Endocrinology* **134**, 63-69
165. Mauduit, C., Besset, V., Caussanel, V., and Benahmed, M. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 631-637
166. Xiong, Y., and Hales, D. B. (1993) *Endocrinology* **132**, 2438-2444
167. Delfino, F., and Walker, W. H. (1998) *Mol Endocrinol* **12**, 1696-1707
168. Delfino, F. J., Boustead, J. N., Fix, C., and Walker, W. H. (2003) *Mol Cell Endocrinol* **201**, 1-12

169. De Cesaris, P., Starace, D., Riccioli, A., Padula, F., Filippini, A., and Ziparo, E. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7566-7571
170. Besset, V., Le Magueresse-Battistoni, B., Collette, J., and Benahmed, M. (1996) *Endocrinology* **137**, 296-303
171. Comhaire, F. H., Mahmoud, A. M., Depuydt, C. E., Zalata, A. A., and Christophe, A. B. (1999) *Hum Reprod Update* **5**, 393-398
172. Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2000) *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**, 2085-2090
173. Hedger, M. P., and Meinhardt, A. (2003) *J Reprod Immunol* **58**, 1-26
174. Bourguiba, S., Chater, S., Delalande, C., Benahmed, M., and Carreau, S. (2003) *Biol Reprod* **69**, 592-601
175. Pentikainen, V., Erkkila, K., and Dunkel, L. (1999) *Am J Physiol* **276**, E310-316
176. Le Magueresse-Battistoni, B., Pernod, G., Kolodie, L., Morera, A. M., and Benahmed, M. (1997) *Endocrinology* **138**, 1097-1105
177. Ayer-LeLievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Hallbook, F., and Persson, H. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2628-2632
178. Sariola, H. (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**, 1061-1066
179. Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2000) *Curr Opin Neurobiol* **10**, 381-391
180. Chao, M. V. (2003) *Nat Rev Neurosci* **4**, 299-309
181. Dechant, G., and Barde, Y. A. (2002) *Nat Neurosci* **5**, 1131-1136
182. Bothwell, M. (1995) *Annu Rev Neurosci* **18**, 223-253
183. Lewin, G. R., and Barde, Y. A. (1996) *Annu Rev Neurosci* **19**, 289-317
184. Benedetti, M., Levi, A., and Chao, M. V. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7859-7863
185. Yano, H., and Chao, M. V. (2000) *Pharm Acta Helv* **74**, 253-260
186. Patapoutian, A., and Reichardt, L. F. (2001) *Curr Opin Neurobiol* **11**, 272-280
187. Atwal, J. K., Massie, B., Miller, F. D., and Kaplan, D. R. (2000) *Neuron* **27**, 265-277
188. Edwards, R. H., Selby, M. J., Garcia, P. D., and Rutter, W. J. (1988) *J Biol Chem* **263**, 6810-6815
189. Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., and Rudolph, R. (2001) *Eur J Biochem* **268**, 3296-3303
190. Suter, U., Heymach, J. V., Jr., and Shooter, E. M. (1991) *EMBO J* **10**, 2395-2400
191. Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., and Murphy, R. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12660-12666
192. Heymach, J. V., Jr., and Shooter, E. M. (1995) *J Biol Chem* **270**, 12297-12304
193. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001) *Science* **294**, 1945-1948
194. Bruno, M. A., and Cuello, A. C. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6735-6740
195. Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1951) *J Exp Zool* **116**, 321-361
196. Levi-Montalcini, R. (1952) *Ann N Y Acad Sci* **55**, 330-344
197. Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954) *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1014-1018
198. Cohen, S., and Levi-Montalcini, R. (1956) *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**, 571-574
199. Cohen, S. (1959) *J Biol Chem* **234**, 1129-1137
200. Cohen, S. (1960) *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 302-311
201. Angeletti, R. H. (1968) *J Chromatogr* **37**, 62-69
202. Bailey, G. S., Banks, B. E., Pearce, F. L., and Shipolini, R. A. (1975) *Comp Biochem Physiol B* **51**, 429-438
203. Hogue-Angeletti, R. A., Frazier, W. A., Jacobs, J. W., Niall, H. D., and Bradshaw, R. A. (1976) *Biochemistry* **15**, 26-34
204. Rubin, J. S., and Bradshaw, R. A. (1981) *J Neurosci Res* **6**, 451-464

205. Chapman, C. A., Banks, B. E., Vernon, C. A., and Walker, J. M. (1981) *Eur J Biochem* **115**, 347-351
206. Harper, G. P., Glanville, R. W., and Thoenen, H. (1982) *J Biol Chem* **257**, 8541-8548
207. Hofmann, H. D., and Unsicker, K. (1982) *Eur J Biochem* **128**, 421-426
208. Aloe, L., Cozzari, C., and Levi-Montalcini, R. (1981) *Exp Cell Res* **133**, 475-480
209. Darling, T. L., and Fahnstock, M. (1988) *Biochemistry* **27**, 6686-6692
210. Silverman, R. E., and Bradshaw, R. A. (1982) *J Neurosci Res* **8**, 127-136
211. Thoenen, H., and Barde, Y. A. (1980) *Physiol Rev* **60**, 1284-1335
212. Frazier, W. A., Boyd, L. F., and Bradshaw, R. A. (1973) *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2931-2935
213. Stach, R. W., and Shooter, E. M. (1974) *J Biol Chem* **249**, 6668-6674
214. Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., and Dull, T. J. (1983) *Nature* **303**, 821-825
215. Angeletti, R. H., and Bradshaw, R. A. (1971) *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2417-2420
216. Greene, L. A., and Shooter, E. M. (1980) *Annu Rev Neurosci* **3**, 353-402
217. Berger, E. A., and Shooter, E. M. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3647-3651
218. Bothwell, M. A., and Shooter, E. M. (1978) *J Biol Chem* **253**, 8458-8464
219. Greene, L. A., Shooter, E. M., and Varon, S. (1969) *Biochemistry* **8**, 3735-3741
220. Darling, T. L., Petrides, P. E., Beguin, P., Frey, P., Shooter, E. M., Selby, M., and Rutter, W. J. (1983) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 1**, 427-434
221. Selby, M. J., Edwards, R., Sharp, F., and Rutter, W. J. (1987) *Mol Cell Biol* **7**, 3057-3064
222. Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M., and Murphy, R. A. (1996) *Biochem J* **314 (Pt 3)**, 951-960
223. Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J., and Thomas, G. (1990) *J Cell Biol* **111**, 2851-2859
224. Farhadi, H., Pareek, S., Day, R., Dong, W., Chretien, M., Bergeron, J. J., Seidah, N. G., and Murphy, R. A. (1997) *J Histochem Cytochem* **45**, 795-804
225. Chen, Y., Dicou, E., and Djakiew, D. (1997) *Mol Cell Endocrinol* **127**, 129-136
226. Yardley, G., Relf, B., Lakshmanan, J., Reinshagen, M., and Moore, G. P. (2000) *Exp Dermatol* **9**, 283-289
227. Hasan, W., Pedchenko, T., Krizsan-Agbas, D., Baum, L., and Smith, P. G. (2003) *J Neurobiol* **57**, 38-53
228. Lobos, E., Gebhardt, C., Kluge, A., and Spanel-Borowski, K. (2005) *Endocrinology* **146**, 1922-1929
229. Fahnstock, M., Michalski, B., Xu, B., and Coughlin, M. D. (2001) *Mol Cell Neurosci* **18**, 210-220
230. Barbacid, M. (1994) *J Neurobiol* **25**, 1386-1403
231. Dechant, G., and Barde, Y. A. (1997) *Curr Opin Neurobiol* **7**, 413-418
232. Miller, F. D., and Kaplan, D. R. (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**, 1045-1053
233. Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (1997) *Curr Opin Cell Biol* **9**, 213-221
234. Baxter, R. M., Cohen, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Downes, C. P., and Doza, Y. N. (1995) *Eur J Biochem* **234**, 84-91
235. Barker, P. A., and Shooter, E. M. (1994) *Neuron* **13**, 203-215
236. Hantzopoulos, P. A., Suri, C., Glass, D. J., Goldfarb, M. P., and Yancopoulos, G. D. (1994) *Neuron* **13**, 187-201
237. Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 6884-6891
238. Verdi, J. M., Birren, S. J., Ibanez, C. F., Persson, H., Kaplan, D. R., Benedetti, M., Chao, M. V., and Anderson, D. J. (1994) *Neuron* **12**, 733-745

239. Klein, R., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991) *Cell* **65**, 189-197
240. Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L. F. (1991) *Science* **252**, 554-558
241. Casaccia-Bonnel, P., Carter, B. D., Dobrowsky, R. T., and Chao, M. V. (1996) *Nature* **383**, 716-719
242. Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y. A. (1996) *Nature* **383**, 166-168
243. Majdan, M., Lachance, C., Gloster, A., Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Bhakar, A., Belliveau, D., Fawcett, J., Miller, F. D., and Barker, P. A. (1997) *J Neurosci* **17**, 6988-6998
244. Aloyz, R. S., Bamji, S. X., Pozniak, C. D., Toma, J. G., Atwal, J., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (1998) *J Cell Biol* **143**, 1691-1703
245. Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., and Miller, F. D. (1998) *J Cell Biol* **140**, 911-923
246. Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F. X., Green, D. R., and Karin, M. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 751-763
247. Casademunt, E., Carter, B. D., Benzel, I., Frade, J. M., Dechant, G., and Barde, Y. A. (1999) *EMBO J* **18**, 6050-6061
248. Brann, A. B., Tcherpakov, M., Williams, I. M., Futerman, A. H., and Fainzilber, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 9812-9818
249. Roux, P. P., and Barker, P. A. (2002) *Prog Neurobiol* **67**, 203-233
250. Linggi, M. S., Burke, T. L., Williams, B. B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B. L., Yoon, S. O., and Carter, B. D. (2005) *J Biol Chem* **280**, 13801-13808
251. Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991) *Nature* **350**, 678-683
252. Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1995) *Trends Neurosci* **18**, 321-326
253. Ryden, M., Hempstead, B., and Ibanez, C. F. (1997) *J Biol Chem* **272**, 16322-16328
254. Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R., and Hempstead, B. L. (2001) *J Biol Chem* **276**, 32687-32695
255. Yoon, S. O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., and Chao, M. V. (1998) *J Neurosci* **18**, 3273-3281
256. Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H. H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S. K. (1997) *J Biol Chem* **272**, 3599-3605
257. Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., and Petersen, C. M. (2004) *Nature* **427**, 843-848
258. Clewes, O., Fahey, M. S., Tyler, S. J., Watson, J. J., Seok, H., Catania, C., Cho, K., Dawbarn, D., and Allen, S. J. (2008) *J Neurochem* **107**, 1124-1135
259. Reinshagen, M., Geerling, I., Eysselein, V. E., Adler, G., Huff, K. R., Moore, G. P., and Lakshmanan, J. (2000) *J Neurochem* **74**, 2127-2133
260. Fahnestock, M., Yu, G., and Coughlin, M. D. (2004) *Prog Brain Res* **146**, 101-110
261. Dissen, G. A., Garcia-Rudaz, C., Paredes, A., Mayer, C., Mayerhofer, A., and Ojeda, S. R. (2009) *Endocrinology* **150**, 2906-2914
262. Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F. X., Ferrer, J., Parrens, M., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J. P. (1999) *Am J Pathol* **154**, 405-415
263. Kendall, T. J., Henedige, S., Aucott, R. L., Hartland, S. N., Vernon, M. A., Benyon, R. C., and Iredale, J. P. (2009) *Hepatology* **49**, 901-910
264. Girard, B. M., Malley, S. E., and Vizzard, M. A. (2011) *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F345-355

265. Chakrabarti, S., Sima, A. A., Lee, J., Brachet, P., and Dicou, E. (1990) *Brain Res* **523**, 11-15
266. Delsite, R., and Djakiew, D. (1999) *Prostate* **41**, 39-48
267. Aloe, L. (2001) *Arch Physiol Biochem* **109**, 354-356
268. Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T., and Henz, B. M. (2000) *Immunology* **99**, 418-426
269. Ehrhard, P. B., Ganter, U., Stalder, A., Bauer, J., and Otten, U. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5423-5427
270. Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. (1977) *Brain Res* **133**, 358-366
271. Bruni, A., Bigon, E., Boarato, E., Mietto, L., Leon, A., and Toffano, G. (1982) *FEBS Lett* **138**, 190-192
272. Manning, P. T., Russell, J. H., Simmons, B., and Johnson, E. M., Jr. (1985) *Brain Res* **340**, 61-69
273. Otten, U., Ehrhard, P., and Peck, R. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10059-10063
274. Thorpe, L. W., and Perez-Polo, J. R. (1987) *J Neurosci Res* **18**, 134-139
275. Cantarella, G., Lempereur, L., Presta, M., Ribatti, D., Lombardo, G., Lazarovici, P., Zappala, G., Pafumi, C., and Bernardini, R. (2002) *FASEB J* **16**, 1307-1309
276. Emanuelli, C., Salis, M. B., Pinna, A., Graiani, G., Manni, L., and Madeddu, P. (2002) *Circulation* **106**, 2257-2262
277. Turrini, P., Gaetano, C., Antonelli, A., Capogrossi, M. C., and Aloe, L. (2002) *Neurosci Lett* **323**, 109-112
278. Wilkinson, D. I., Theeuwes, M. J., and Farber, E. M. (1994) *Exp Dermatol* **3**, 239-245
279. Pincelli, C., Haake, A. R., Benassi, L., Grassilli, E., Magnoni, C., Ottani, D., Polakowska, R., Franceschi, C., and Giannetti, A. (1997) *J Invest Dermatol* **109**, 757-764
280. Perrard, M. H., Vigier, M., Damestoy, A., Chapat, C., Silandre, D., Rudkin, B. B., and Durand, P. (2007) *J Cell Physiol* **210**, 51-62
281. Muller, D., Davidoff, M. S., Bargheer, O., Paust, H. J., Pusch, W., Koeva, Y., Jezek, D., Holstein, A. F., and Middendorff, R. (2006) *Histochem Cell Biol* **126**, 199-211
282. Stephan, J. P., Syed, V., and Jegou, B. (1997) *Mol Cell Endocrinol* **134**, 109-118
283. Levi-Montalcini, R. (1987) *Science* **237**, 1154-1162
284. Frungieri, M. B., Urbanski, H. F., Hohne-Zell, B., and Mayerhofer, A. (2000) *Neuroendocrinology* **71**, 43-50
285. Cupp, A. S., Kim, G. H., and Skinner, M. K. (2000) *Biol Reprod* **63**, 1617-1628
286. Perrard, M. H., and Durand, P. (2009) *Microsc Res Tech* **72**, 596-602
287. Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993) *Science* **260**, 1130-1132
288. Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C., and et al. (1994) *Science* **266**, 1062-1064
289. Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., and Davies, A. M. (1995) *Neuron* **15**, 821-828
290. Trupp, M., Ryden, M., Jornvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E., and Ibanez, C. F. (1995) *J Cell Biol* **130**, 137-148
291. Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J. C., Hu, S., Altrock, B. W., and Fox, G. M. (1996) *Cell* **85**, 1113-1124
292. Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2000) *Curr Opin Neurobiol* **10**, 103-110

293. Worby, C. A., Vega, Q. C., Zhao, Y., Chao, H. H., Seasholtz, A. F., and Dixon, J. E. (1996) *J Biol Chem* **271**, 23619-23622
294. Besset, V., Scott, R. P., and Ibanez, C. F. (2000) *J Biol Chem* **275**, 39159-39166
295. Trupp, M., Scott, R., Whittemore, S. R., and Ibanez, C. F. (1999) *J Biol Chem* **274**, 20885-20894
296. Sariola, H., and Saarma, M. (2003) *J Cell Sci* **116**, 3855-3862
297. Pezeshki, G., Franke, B., and Engele, J. (2001) *J Neurosci Res* **66**, 390-395
298. Sanicola, M., Hession, C., Worley, D., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Walus, L., Robinson, S., Jaworski, G., Wei, H., Tizard, R., Whitty, A., Pepinsky, R. B., and Cate, R. L. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6238-6243
299. Baloh, R. H., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Leitner, M. L., Araki, T., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1998) *Neuron* **21**, 1291-1302
300. Suter-Crazzolara, C., and Unsicker, K. (1994) *Neuroreport* **5**, 2486-2488
301. Springer, J. E., Seeburger, J. L., He, J., Gabrea, A., Blankenhorn, E. P., and Bergman, L. W. (1995) *Exp Neurol* **131**, 47-52
302. Widenfalk, J., Parvinen, M., Lindqvist, E., and Olson, L. (2000) *Cell Tissue Res* **299**, 409-415
303. Buageaw, A., Sukhwani, M., Ben-Yehudah, A., Ehmcke, J., Rawe, V. Y., Pholpramool, C., Orwig, K. E., and Schlatt, S. (2005) *Biol Reprod* **73**, 1011-1016
304. Ryu, B. Y., Kubota, H., Avarbock, M. R., and Brinster, R. L. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14302-14307
305. Oatley, J. M., Reeves, J. J., and McLean, D. J. (2004) *Biol Reprod* **71**, 942-947
306. Hermann, B. P., Sukhwani, M., Lin, C. C., Sheng, Y., Tomko, J., Rodriguez, M., Shuttleworth, J. J., McFarland, D., Hobbs, R. M., Pandolfi, P. P., Schatten, G. P., and Orwig, K. E. (2007) *Stem Cells* **25**, 2330-2338
307. Maki, C. B., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Pascual, M., Pham, J., Kinjo, J., Anorve, S., and Izadyar, F. (2009) *Hum Reprod* **24**, 1480-1491
308. Wu, X., Schmidt, J. A., Avarbock, M. R., Tobias, J. W., Carlson, C. A., Kolon, T. F., Ginsberg, J. P., and Brinster, R. L. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21672-21677
309. Viglietto, G., Dolci, S., Bruni, P., Baldassarre, G., Chiariotti, L., Melillo, R. M., Salvatore, G., Chiappetta, G., Sferratore, F., Fusco, A., and Santoro, M. (2000) *Int J Oncol* **16**, 689-694
310. Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006) *Biol Reprod* **74**, 314-321
311. Oatley, J. M., Avarbock, M. R., Telaranta, A. I., Fearon, D. T., and Brinster, R. L. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9524-9529
312. Flickinger, C. J. (1985) *N Engl J Med* **313**, 1283-1285
313. Chavez-Badiola, A., Drakeley, A. J., Finney, V., Sajjad, Y., and Lewis-Jones, D. I. (2008) *Fertil Steril* **89**, 723 e725-727
314. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) *Science* **239**, 487-491
315. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989) *Nature* **337**, 473-475
316. Willenbrink, W., Halaschek, J., Schuffenhauer, S., Kunz, J., and Steinkasserer, A. (1995) *Genomics* **28**, 101-104
317. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
318. Burnette, W. N. (1981) *Anal Biochem* **112**, 195-203
319. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354
320. Frungieri, M. B., Gonzalez-Calvar, S. I., and Calandra, R. S. (1996) *J Androl* **17**, 683-691

321. Frungieri, M. B., Gonzalez-Calvar, S. I., Chandrashekar, V., Rao, J. N., Bartke, A., and Calandra, R. S. (1996) *Int J Androl* **19**, 164-170
322. Frungieri, M. B., Gonzalez-Calvar, S. I., Rubio, M., Ozu, M., Lustig, L., and Calandra, R. S. (1999) *Neuroendocrinology* **69**, 299-308
323. Suescun, M. O., Gonzalez, S. I., Chiauzzi, V. A., and Calandra, R. S. (1985) *J Androl* **6**, 77-82
324. Huang, C., Morales, G., Vagi, A., Chanasyk, K., Ferrazzi, M., Burklow, C., Qiu, W. T., Feyfant, E., Sali, A., and Stevens, R. L. (2000) *J Biol Chem* **275**, 351-358
325. Smith, T. J., Hougland, M. W., and Johnson, D. A. (1984) *J Biol Chem* **259**, 11046-11051
326. Passia, D., Behrendt, H., Hilscher, B., Hilscher, W., Hofmann, N., and Haider, S. G. (1983) *Acta Histochem Suppl* **28**, 303-308
327. Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., and Plevin, R. (2001) *Pharmacol Rev* **53**, 245-282
328. Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S. H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H. S., Trevisani, M., Hollenberg, M. D., Wallace, J. L., Caughey, G. H., Mitchell, S. E., Williams, L. M., Geppetti, P., Mayer, E. A., and Bunnett, N. W. (2000) *Nat Med* **6**, 151-158
329. Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T. A., and Hollenberg, M. D. (2005) *Endocr Rev* **26**, 1-43
330. Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976) *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2424-2428
331. Fahnestock, M., Yu, G., Michalski, B., Mathew, S., Colquhoun, A., Ross, G. M., and Coughlin, M. D. (2004) *J Neurochem* **89**, 581-592
332. Harris, J. L., Niles, A., Burdick, K., Maffitt, M., Backes, B. J., Ellman, J. A., Kuntz, I., Haak-Frendscho, M., and Craik, C. S. (2001) *J Biol Chem* **276**, 34941-34947
333. Micera, A., Puxeddu, I., Aloe, L., and Levi-Schaffer, F. (2003) *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 369-374
334. Chien, C. C., Fu, W. M., Huang, H. I., Lai, Y. H., Tsai, Y. F., Guo, S. L., Wu, T. J., and Ling, Q. D. (2007) *J Pain* **8**, 161-167
335. Dmitrieva, N., Shelton, D., Rice, A. S., and McMahon, S. B. (1997) *Neuroscience* **78**, 449-459
336. Friess, H., Zhu, Z. W., di Mola, F. F., Kulli, C., Graber, H. U., Andren-Sandberg, A., Zimmermann, A., Korc, M., Reinshagen, M., and Buchler, M. W. (1999) *Ann Surg* **230**, 615-624
337. Dmitrieva, N., and McMahon, S. B. (1996) *Pain* **66**, 87-97
338. Lambiase, A., Micera, A., Sgrulletta, R., and Bonini, S. (2004) *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 425-430
339. Vega, J. A., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Perez-Perez, M., and Germana, A. (2003) *J Anat* **203**, 1-19
340. Micera, A., Lambiase, A., Stampaciacchiere, B., Bonini, S., and Levi-Schaffer, F. (2007) *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 245-256
341. Mazurek, N., Weskamp, G., Erne, P., and Otten, U. (1986) *FEBS Lett* **198**, 315-320
342. Tal, M., and Liberman, R. (1997) *Neurosci Lett* **221**, 129-132
343. Horigome, K., Pryor, J. C., Bullock, E. D., and Johnson, E. M., Jr. (1993) *J Biol Chem* **268**, 14881-14887
344. Xiang, Z., and Nilsson, G. (2000) *Clin Exp Allergy* **30**, 1379-1386
345. Friedman, W. J., Larkfors, L., Ayer-LeLievre, C., Ebendal, T., Olson, L., and Persson, H. (1990) *J Neurosci Res* **27**, 374-382
346. Gadiant, R. A., Cron, K. C., and Otten, U. (1990) *Neurosci Lett* **117**, 335-340
347. Gasser, U. E., Weskamp, G., Otten, U., and Dravid, A. R. (1986) *Brain Res* **376**, 351-356

348. Hattori, A., Tanaka, E., Murase, K., Ishida, N., Chatani, Y., Tsujimoto, M., Hayashi, K., and Kohno, M. (1993) *J Biol Chem* **268**, 2577-2582
349. Werner, S., and Grose, R. (2003) *Physiol Rev* **83**, 835-870
350. Mast, B. A., and Schultz, G. S. (1996) *Wound Repair Regen* **4**, 411-420
351. Micera, A., Vigneti, E., Pickholtz, D., Reich, R., Pappo, O., Bonini, S., Maquart, F. X., Aloe, L., and Levi-Schaffer, F. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6162-6167
352. Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P. C., Cancedda, R., and De Luca, M. (1993) *J Biol Chem* **268**, 22838-22846
353. Raychaudhuri, S. K., Raychaudhuri, S. P., Weltman, H., and Farber, E. M. (2001) *Arch Dermatol Res* **293**, 291-295
354. Kawamoto, K., and Matsuda, H. (2004) *Prog Brain Res* **146**, 369-384
355. Hoyle, G. W., Graham, R. M., Finkelstein, J. B., Nguyen, K. P., Gozal, D., and Friedman, M. (1998) *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**, 149-157
356. Levanti, M. B., Germana, A., de Carlos, F., Ciriaco, E., Vega, J. A., and Germana, G. (2006) *J Anat* **208**, 373-379
357. Robinson, L. L., Townsend, J., and Anderson, R. A. (2003) *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3943-3951
358. Koeva, Y., Davidoff, M., and Popova, L. (1999) *Folia Med (Plovdiv)* **41**, 53-58
359. Katoh-Semba, R., Tsuzuki, M., Miyazaki, N., Yoshida, A., Nakajima, H., Nakagawa, C., Kitajima, S., and Matsuda, M. (2007) *Neurosci Res* **59**, 277-287
360. Spiess, A. N., Feig, C., Schulze, W., Chalmel, F., Cappallo-Obermann, H., Primig, M., and Kirchhoff, C. (2007) *Hum Reprod* **22**, 2936-2946
361. Gassei, K., Ehmcke, J., Dhir, R., and Schlatt, S. (2010) *J Med Primatol* **39**, 83-91
362. Candia, S., Garcia, M. L., and Latorre, R. (1992) *Biophys J* **63**, 583-590

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Artur Mayerhofer gilt mein besonderer Dank für die Auswahl des sehr interessanten Themas, für die fördernde Unterstützung und umfassende wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertation. Durch seine immerwährende optimistische Sichtweise und mit vielen hilfreichen Tipps war er immer unterstützend und motivierend am Fortgang dieser Arbeit interessiert.

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Lars Kunz für die Übernahme der Begutachtung und konstante Betreuung dieser Arbeit. Seine kritische Betrachtung meiner Ergebnisse sowie seine konstruktiven Ideen und Anregungen haben sowohl neue Fragen aufkommen lassen, aber auch so manches Problem lösbar gemacht.

Außerdem möchte ich mich bei Marion Adam, Julia Merz-Lange, Sabine Ströbl, Christoph Schell, Christoph Merz, Cristina Jarrin-Francko, Catherina Lücke, Karin Metzrath, Simone Spillner, Daniel Einwang, Sandra Raffael, Astrid Tiefenbacher, Gabriele Terfloth, PD Dr. Martin Albrecht, Dr. Cornelia Kampfer, Dr. Sabine Saller, Dr. Silvana Siebert, Dr. Harald Welter, Dr. Thomas Winkle sowie Dr. Thomas Schmidt für die Diskussionen, die stetige Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Prof. Dr. Ricardo Calandra, Dr. Mónica Frungieri und Eugenia Matzkin danke ich für die gute Zusammenarbeit während meiner Aufenthalte in Buenos Aires.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Matti Poutanen und Dr. Leena Strauss für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit in Finnland bedanken.

Ganz besonderen Dank verdient meine Familie: meinen Eltern, die mich all die Jahre hindurch in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und nie an meinen Fähigkeiten zweifelten und meinem Bruder Christian, der sich mit meinen Computerproblemen stets mit viel Geduld auseinandersetzte.

9 Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Spinnler K, Kunz L, Mayerhofer A. Human mast cell tryptase cleaves proNGF: Hints of a local, mast cell-dependent regulation of NGF/proNGF action in human tissues. Submitted.

Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. 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. Hum Reprod. 2010; 25: 2181-7

Poster:

Spinnler K, Adam M, Schwarzer U, Mayerhofer A. Mast cells and human testicular peritubular cells: Role in production of NGF. International Workshop of Molecular Andrology, Giessen, 2009.

Adam M, Spinnler K, Schwarzer U, Köhn FM, Strauss L, Poutanen L, Mayerhofer A. Mast cells and human testicular peritubular cells: Role in regulation of testicular decorin. International Workshop of Molecular Andrology, Giessen, 2009.

Spinnler K, Schwarzer U, Köhn FM, Mayerhofer A. Identification of NGF and p75 in human testicular peritubular cells: Regulation by the mast cell product tryptase. 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, München, 2010.

Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. GDNF is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Hamburg, 2010.

Siebert S & Spinnler K, Matzkin E, Kunz L, Calandra R, Frungieri M, Mayerhofer A. A Ca²⁺-activated potassium channel (BK_{Ca}) in Leydig cells is involved in testosterone production. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Hamburg, 2010.

Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Kunz L, Mayerhofer A. Mast cell tryptase cleaves proNGF: Hints of a local regulation of NGF/proNGF action. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Bonn, 2011.