

Aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF)
an der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Freimut Leidenberger

und

dem Department of Gynecology and Obstetrics, Andrology Unit,
Ben-Gurion-University of Beersheva, Israel

Head of Department: Prof. Eitan Lunenfeld, MD

INTERLEUKIN-1 UND DIE SERTOLI-ZELLE

- PRODUKTION UND INTERAKTION

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniel Zeyse
aus Hamburg

Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 10. Oktober 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

i.V. des Dekan: Prof. Dr. H.D. Jüde
Referent: Prof. Dr. F. Leidenberger
Korreferent: Prof. Dr. L.-W. Braendle

*„Alle Menschen sind klug,
die einen vorher, die anderen nachher.“*

Den anderen gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Anatomie und Funktion des Hodens	6
1.1.1	Aufgabe und Funktionsparameter der Sertoli-Zelle	7
1.2	Interleukin-1 (IL-1)	10
1.2.1	IL-1-Agonisten	10
1.2.2	IL-1-Antagonist	11
1.2.3	IL-1-Rezeptoren	12
1.3	Testikuläre IL-1-Produktion	13
1.4	Interaktionen zwischen IL-1 und der männlichen Reproduktionsfunktion	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Tiere	19
2.2	Isolierung und Kultur von Sertoli-Zellen	19
2.3	Untersuchung der Viabilität, Reinheit und Komposition von Sertoli-Zellkulturen	21
2.4	Isolierung und Kultur von Milz-Leukozyten	21
2.5	Immunzytochemische Färbungen	22
2.6	Enzymimmunoassays (ELISA)	22
2.6.1	mIL-1 alpha ELISA	23
2.6.2	mIL-1 beta ELISA	23
2.6.3	mIL-1 ra ELISA	23
2.6.4	Maus Transferrin ELISA	24
2.7	Extraktion der Gesamt-RNA	24
2.8	cDNA Synthese und RT-PCR	25
2.9	Verifizierung der PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymverdau	26
2.10	Statistische Auswertung	26

3	ERGEBNIS	27
3.1	Viabilität, Reinheit und Komposition von Sertoli-Zellkulturen	27
3.2	IL-1 Produktion in Sertoli-Zellen	29
3.2.1	IL-1 alpha	29
3.2.1.1	Immunzytochemie	29
3.2.1.2	ELISA	30
3.2.2	IL-1 beta	34
3.2.2.1	Immunzytochemie	34
3.2.2.2	ELISA	35
3.2.3	IL-1ra	36
3.2.3.1	Immunzytochemie	36
3.2.3.2	ELISA	37
3.3	IL-1 mRNA Expression in Sertoli-Zellen	40
3.4	Effekte von IL-1 und FSH auf die Transferrin-Sekretion von Sertoli-Zellkulturen	43
4	DISKUSSION	45
4.1	Maus Sertoli-Zellen in vitro	45
4.2	IL-1 und die Sertoli-Zelle - Produktion	46
4.3	IL-1 und die Sertoli-Zelle - Interaktion	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	LITERATURANGABEN	55
7	ABKÜRZUNGEN	64
	DANKSAGUNG	66
	LEBENS LAUF	67
	ERKLÄRUNG	68

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomie und Funktion des Hodens

Der Hoden ist ein paariges, beim Menschen etwa pflaumengroßes Organ. Der Hoden wird umgeben von der Tunica albuginea und durch feine bindegewebige Scheidewände, Septula testis, in Hodenläppchen unterteilt. Diese enthalten jeweils ein oder mehrere Samenkanälchen, Tubuli seminiferi, welche zum Hinterrand des Hodens in das Rete testis münden. Das Rete testis ist seinerseits durch Ductuli efferentes an den Nebenhoden und somit an die ableitenden Samenwege angeschlossen. Das Keimepithel, welches die Tubuli seminiferi auskleidet, besteht aus Zellen der Spermatogenese und Sertoli-Zellen. Interstitielles Gewebe setzt sich zusammen aus Blutgefäßen, Nerven, peritubulären Zellen, Leydig-Zellen und Makrophagen. Aufgabe des Hodens ist die Produktion der zur Fortpflanzung notwendigen Keimzellen, sowie die Produktion und Sekretion des männlichen Geschlechtshormons Testosteron (Schiebler 1997).

Die aus Spermatogenese und Spermiogenese bestehende Keimzellproduktion ist ein komplexer, bisher nur teilweise verstandener Prozeß. Dieser Prozeß ist angewiesen auf die adäquate Funktion mehrerer Zellarten. Die an diesem Prozeß beteiligten Zellen stehen nicht in jedem Fall in direktem Kontakt zueinander. Zwischen interstitiellen und basal lokalisierten tubulären Zellen und den basalmembranfern liegenden tubulären Zellen befindet sich die Blut-Hoden-Schranke, die ähnlich wie im Gehirn bei intaktem Zustand keine Zellmigration und nur einen limitierten metabolischen Austausch zulässt. Diese wird von den Sertoli-Zellen und den zwischen ihnen vorhandenen Zonulae occludentes (tight junctions) gebildet. So lässt sich die Wand der Hodenkanälchen in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilen. Das basale Kompartiment, in dem Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten zu finden sind, steht durch die Lamina limitans in Verbindung mit dem extratubulären Raum. Spermatozyten und Spermatisden, die adluminal lokalisiert sind, sind in ihrem Stoffwechsel komplett auf die ernährende Rolle der Sertoli-Zellen angewiesen, welche einzig von der Basis bis zur apikalen Oberfläche des Keimepithels reichen (Dym 1970, Junqueira 1996).

Die Kommunikation der an der Spermatogenese und Spermiogenese beteiligten Zellen stellt einen wichtigen Bestandteil für die Funktion des Hodens dar, um eine optimale Zusammenarbeit zu ermöglichen. Für direkt benachbarte Zellen ist diese erleichtert durch

membrangebundene Ligand-Rezeptor-Interaktionen, Connexine (gap junctions) oder extrazelluläre Matrixbestandteile. Nicht in direktem Kontakt stehende Zellen sind umso mehr auf ein Netzwerk aus Boten und Botenstoffen angewiesen. Innerhalb des Hodens bestehen multiple Wege und Möglichkeiten der Zell-Zell-Interaktion mittels Hormonen, Cytokinen oder anderen Mediatoren. Diese betreffen vorrangig die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen, peritubulären Zellen, Sertoli-Zellen und Keimzellen. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die derzeit verstandenen Prinzipien der hormonalen Aktion und Regulation im normalen erwachsenen Hoden (Griswold 1995, Lunenfeld 1999, Maddocks 1990, Pescovitz 1994, Pollänen 1990, Skinner 1991).

1.1.1 Aufgabe und Funktionsparameter der Sertoli-Zelle

Die Existenz einer speziell verzweigten Zelle in den Samenkanälchen des menschlichen Hodens wurde erstmalig 1865 von Enrico Sertoli beobachtet. Weitere Nachforschungen bis 1899 führten zu dem heute gültigen Konzept, dass diese Zellart im Keimepithel der Ernährung und Stützung der benachbarten Keimzellen dient (Peter 1899, Sertoli 1865).

Sertoli-Zellen haben durch die verzweigten Zellfortsätze die Möglichkeit, in Kontakt mit fünf weiteren Sertoli-Zellen und bis zu 47 Keimzellen zu stehen. Kontaktmöglichkeiten zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen stellen das interstitielle Medium, membrangebundene Ligand-Rezeptor-Interaktionen und sogenannte Desmosom-Gap junctions dar. Diese aus Desmosom und Connexin bestehenden Komplexe bilden sich im besonderen zwischen pachytänen Spermatozyten und Sertoli-Zellen, seltener zwischen Spermatiden und Sertoli-Zellen aus. Sie ermöglichen direkten zytoplasmatischen Austausch von Substanzen mit molekularer Masse kleiner als 600-700 mol wt (Pelletier 1983, Weber 1983).

Ihre Position als Blut-Hoden-Schranke-bildende Zelle überträgt der Sertoli-Zelle die Aufgabe der metabolischen Versorgung und Regulation der Keimzelle. Zur Bereitstellung metabolischer Substrate sind Sertoli-Zellen in der Lage, Glukose aus dem basalen Kompartiment aufzunehmen, zu Laktat und Pyruvat abzubauen und diese Metaboliten in das relativ Glukose-freie adluminale Kompartiment abzugeben. Die Aktivität der zur Glykolyse gehörenden Enzyme kann in diesen Zellen durch FSH gesteigert werden (Jutte 1983).

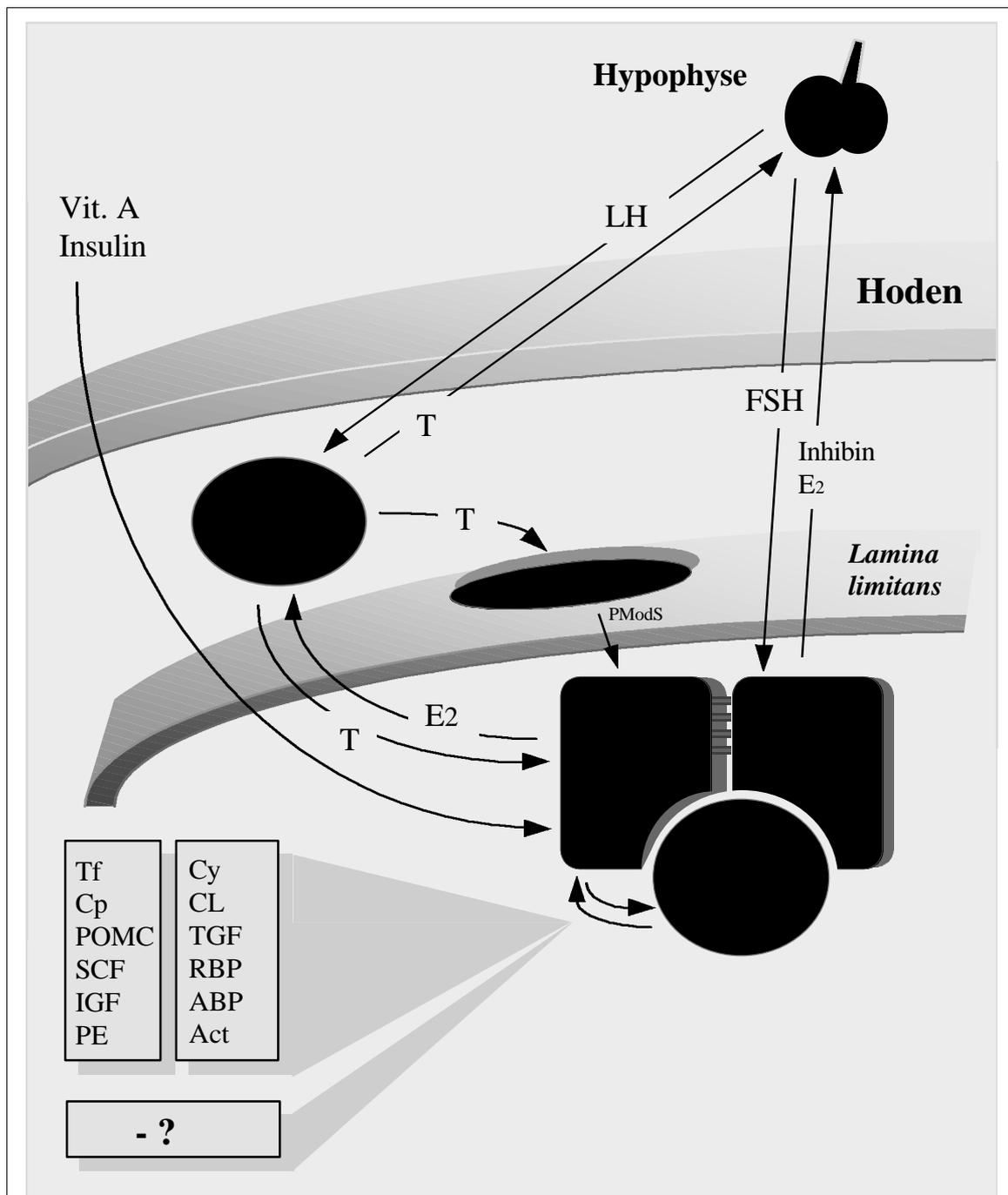


ABB. 1 Prinzipien der hormonalen Aktion und Regulation im erwachsenen Hoden.

ABP: Androgen-bindendes Protein; Act: Activin; CL: Cathepsin-L; Cp: Ceruloplasmin; Cy: Cystatin; E2: Östrogen; IGF: Insulin-like Growth Factor 1 und 2; LH: Luteinisierendes Hormon; PE: Pro-Enkephalin; PModS: Parakriner Modulator der Sertoli-Zellen; POMC: Pro-Opiomelanocortin; RBP: Retinoid-bindendes Protein; SCF: Stem Cell Factor; T: Testosteron; Tf: Transferrin; TGF: Transforming Growth Factor alpha und beta.

Großmolekulare Substanzen benötigen zum Transport durch die Blut-Hoden-Schranke, also durch die Sertoli-Zelle, einen Träger. Mehrere Trägerproteine (binding proteins) - Androgenbindendes Protein (ABP), Zelluläres Retinoid-bindendes Protein, Sulfatiertes Glykoprotein-1 (SGP-1), Transferrin und Coeruloplasmin – die im Serum entsprechende Transportfunktionen innehaben, konnten als Produkt der Sertoli-Zelle identifiziert werden (Dym 1970, Hagenäs 1975, Huggenvik 1981, Skinner 1980, Skinner 1983, Sylvester 1984).

Von Serum-Trägerproteinen transportierte Substanzen können als Komplex, meist rezeptorvermittelt, von basal in die Sertoli-Zelle eindringen. Nach Austausch mit einem von der Sertoli-Zelle neu synthetisiertem Trägerprotein kann eine weitere Sekretion adluminal stattfinden. Entsprechend werden Eisen und Kupfer durch die in der Leber synthetisierten Serumproteine Transferrin und Coeruloplasmin gebunden in die Sertoli-Zelle aufgenommen, dort auf die entsprechenden neusynthetisierten gleichnamigen Proteine transferiert und sezerniert. Die Regulation des Eisen- und Kupfertransports nach adluminal obliegt demzufolge der Produktionsrate der in der Sertoli-Zelle synthetisierten Trägerproteine (Skinner 1991).

Sowohl die Transferrin-Sekretion als auch die ABP-Sekretion können durch FSH stimuliert werden. Obwohl ABP demzufolge einen wichtigen Funktionsparameter der Sertoli-Zelle in vivo und in vitro darstellt, ist dieses Trägerprotein für den Transport von Androgenen und anderen Steroiden durch die Blut-Hoden-Schranke nicht obligat (Gunsalus 1978).

Mehrere regulatorisch agierende Mediatoren sind als Produkte der Sertoli-Zelle identifiziert worden. Activin, Inhibin, Insulin-like Growth Factor (IGF-1 und -2), Transforming Growth Factor (TGF alpha und beta), Stem Cell Factor (SCF), Östrogen und IL-1 gehören zu den bisher untersuchten Mediatorsubstanzen der Sertoli-Zelle. Ziele dieser Sertoli-Zell Hormon und Zytokin-Derivate reichen von benachbarten Keimzellen, peritubulären Zellen, interstitiellen Zellen, sowie nicht-testikulärem Gewebe bis hin zu den chromophilen und neuralen Zellen der Hypophyse und des Hypothalamus (Pescovitz 1994, Skinner 1991).

1.2 Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 ist ein multifunktionelles, hormon-ähnliches Polypeptid. Es wird vorrangig von Gewebs-Makrophagen, Monocyten, neutrophilen Granulocyten, Fibroblasten, Chondrocyten, Keratinocyten und Hepatocyten als Antwort auf Lipopolysaccharide (LPS) produziert. IL-1 wirkt auf nahezu jeden Zelltyp, lokal wie auch systemisch. Der Terminus Interleukin-1 wurde 1979 während des "International Lymphokine Workshop" in Ermatingen, Schweiz, vorgeschlagen. Zu diesem Zeitpunkt waren die heute zur IL-1-Familie gerechneten Moleküle noch nicht kloniert, infolgedessen wurde keine Unterscheidung vorgenommen (Dinarello 1996, Roux-Lombard 1998).

Die IL-1-Familie besteht derzeit aus drei Mitgliedern, die in Mensch und Maus existieren: IL-1 alpha, IL-1 beta und IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). Beim Menschen sind sämtliche dieser drei Gene auf dem langen Arm des Chromosom 2 lokalisiert. Die IL-1-Rezeptoren (IL-1R Typ I und II) werden im Zusammenhang mit der IL-1-Familie betrachtet, werden aber nicht zu derselben gezählt (Roux-Lombard 1998, Webb 1986).

1.2.1 IL-1-Agonisten

Die beiden zu den IL-1-Agonisten gerechneten Formen wurden 1984-85 isoliert, kloniert, exprimiert und unterschieden in eine Alpha- und eine Beta-Form (Auron 1984, Lomedico 1984, March 1985). IL-1 alpha und beta sind nicht nur auf genetischem Niveau höchst ähnlich (March 1985), auch ihre dreidimensionale molekulare Struktur zeigt häufige Homologien (Murzin 1992). Beide zeigen 12- bis 14-fache Beta-Faltblattstruktur und dieselbe relative Position des Arginin, welches für die Rezeptor-Bindung ausschlaggebend ist und damit äquivalente biologische Aktivität ermöglicht (Nanduri 1991). Weder die Alpha- noch die Beta-Form-Vorstufen (Precursor) enthalten Signalsequenzen, die eine Sekretion durchs raue Endoplasmatische Retikulum (rER) ermöglichen könnten (March 1985).

Stimulantien der Transkription von IL-1 alpha und beta sind im Rahmen infektiöser und entzündlicher Prozesse vorhandene oder freigesetzte Substanzen und Mediatoren: Blutgerinnungs- und Komplement-Kaskade-Proteine, Substanz P, Wachstumsfaktoren (granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF), Interferon-gamma (IFN gamma), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF alpha), virale oder bakterielle Bestandteile und

Produkte, insbesondere LPS (Dinarello 1994). Für IL-1 alpha und beta wurden jeweils sich selbst induzierende Eigenschaften in endothelialen Zellen und Monocyten nachgewiesen (Dinarello 1987, Warner 1987).

Mit dem vermehrten Auftreten von IL-1 alpha oder beta messenger RNA in monocytischen Zellen ist circa 15 min nach Inkubation mit LPS zu rechnen. Diese akkumuliert im Verlauf von vier Stunden und erlebt daraufhin einen schnellen Rückgang. Wird IL-1 selbst als Stimulus gewählt, zeigt sich eine vermehrte Transkription über mehr als 24 h (Roux-Lombard 1998).

IL-1 alpha- und beta-Vorstufen (Pro-IL-1 alpha und Pro-IL-1 beta) verbleiben nach Translation aufgrund der nicht vorhandenen Signal-Sequenz im Cytoplasma; eine Anhäufung in Zell-Organellen findet nicht statt. Im Gegensatz zu Pro-IL-1 beta besitzt Pro-IL-1 alpha gleiche biologische Aktivität wie die dementsprechende reife IL-1 alpha-Form (Mosley 1987). Der Wirkort des Pro-IL-1 alpha ist vorwiegend intrazellulär; Pro-IL-1 alpha oder das durch Calpain (Calcium-abhängige Membran-Protease) gespaltene IL-1 alpha werden selten in extrazellulären Media nachgewiesen (Roux-Lombard 1998). Es wird vermutet, dass ein Komplex aus Pro-IL-1 alpha zusammen mit dem IL-1 Rezeptor auf nuklearer Ebene seine Wirkung in der Zelle entfaltet (Weitzmann 1992). Ein geringer Teil des Pro-IL-1 alpha kann nach Konjugation mit Myristyl-Gruppen auch auf Zelloberflächen der produzierenden Zellen nachgewiesen werden (Stevenson 1993).

IL-1 beta entsteht aus dem biologisch nahezu unwirksamen Pro-IL-1 beta durch Spaltung mittels eines Enzyms aus der Gruppe der Cystein Proteasen. Das cytoplasmatische "IL-1 beta Converting Enzyme" (ICE) ist hochspezifisch, es schneidet Pro-IL-1 alpha nicht. IL-1 beta, nicht jedoch die unreife Vorstufe wird sezerniert. Der Wirkungsbereich des IL-1 beta liegt somit vorwiegend auf extrazellulärer Ebene (Roux-Lombard 1998).

1.2.2 IL-1-Antagonist

Einzigartig in der Familie des IL-1 ist das natürliche Vorkommen eines Rezeptor-Antagonisten. Die genetische Struktur des IL-1ra ist zu einem hohen Grade homolog mit derjenigen seiner Geschwister IL-1 alpha und IL-1 beta (Carter 1990, Eisenberg 1990). IL-1ra bindet an dieselben Rezeptoren, konkurriert mit IL-1 alpha und beta kompetitiv um dieselbe Bindungsstelle, jedoch ohne der Zelle ein Signal zu überbringen (Arend 1993, Hannum 1990).

Aktionen des IL-1ra sind somit inhibitorisch, mögliche Funktionen müssen im Zusammenhang mit IL-1-Signalen verstanden werden.

Bekannte Produzenten des IL-1ra sind Gewebsmakrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten und Hepatozyten. LPS, IL-1 alpha und beta, IL-3 und Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta), sowie die klassischerweise als anti-inflammatorisch geltenden Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 zeigten induzierenden und stimulierenden Effekt auf die Produktion von IL-1ra (Arend 1993, Roux-Lombard 1998).

Im Gegensatz zu den IL-1 alpha- oder beta-Genen ist im Gen des IL-1ra eine Signalsequenz vorhanden (Arend 1993). Diese ermöglicht dem translatierten Peptid einen Eingang ins raue endoplasmatische Retikulum (rER), anschließende Reifung im Golgi-Apparat und Sekretion durch vesikulären Transport. Interessanterweise existiert eine Splicing-Variante des IL-1ra, in welcher das Signalpeptid-kodierende Exon modifiziert ist. Diese Splicing-Variante, erstmals von Haskill et al. (1991) beschrieben, verhindert die Sekretion des IL-1ra; das Peptid verbleibt intrazellulär und wird infolgedessen als "intracellular IL-1ra" (icIL-1ra) bezeichnet. Der icIL-1ra wurde bisher in gastrointestinalen Epithelzellen und Keratinozyten nachgewiesen; dieselben Zellen, in denen auch große Mengen IL-1 alpha gefunden wurden (Hammerberg 1992, Haskill 1991). Keine Unterschiede konnten in der biologischen Wertigkeit des icIL-1ra und dessen glykosyliertem Gegenteil, IL-1ra, nachgewiesen werden (Roux-Lombard 1998).

1.2.3 IL-1-Rezeptoren

Die IL-1-Rezeptoren (IL-1R) bilden für sich eine Familie aus drei Molekülen: Zwei wahre Rezeptoren, IL-1RI und IL-1RII, und das sogenannte IL-1R-accessory protein (IL-1R-AcP). IL-1RI und IL-1RII existieren jeweils in einer transmembranären Form und einer löslichen Form (sIL-1RI und sIL-1RII). Die Existenz des IL-1R-AcP wurde bis dato nur in der Maus verifiziert, hypothetisch spielt dieses Molekül eine Rolle (Dinarello 1996).

Sämtliche drei Mitglieder der IL-1R-Familie gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Die Gene des IL-1RI und IL-1RII sind ebenso wie diejenigen der IL-1-Familie auf dem langen Arm des Chromosom 2 lokalisiert (Roux-Lombard 1998).

IL-1RI und IL-1RII sind transmembranäre monomerische Moleküle. IL-1RI hat im Vergleich zu IL-1RII eine große cytoplasmatische Domäne. So ist IL-1RI im Gegensatz zu IL-1RII funktional, nur ersterer ist in der Lage, ein Signal zu übertragen. Die Rolle des IL-1RII ist darauf beschränkt, ohne Signaltransmission freie Liganden zu binden, IL-1RII wird aus demselben Grunde "decoy receptor" (Köder-Rezeptor) genannt (Sims 1993). Bei vermehrter Expression des IL-1RI nimmt demzufolge die biologische Aktivität des IL-1 zu, vermehrte Expression des IL-1RII führt dahingegen zur Inhibition der biologischen IL-1-Aktivität (Re 1996).

Die Expression beider Rezeptor-Typen ist stimulierbar. Substanzen wie Prostaglandin-E₂ (PGE₂), Dexamethason, Vitamin D₃, IL-2 und IL-4 induzieren die Produktion des IL-1RI. IL-1RII-Expression wird hauptsächlich von denen als anti-inflammatorisch geltenden Mediatoren IL-4 und IL-13 und Dexamethason stimuliert (Roux-Lombard 1998).

Lösliche IL-1-Rezeptoren (sIL-1RI und sIL-1RII) haben die Eigenschaft, freies IL-1 zu binden, ihre Rolle in der Szenerie der IL-1-Signale ist inhibitorisch. Unterschiede zeigen sich in der Affinität der einzelnen Rezeptoren zu entsprechenden Liganden. Während IL-1 alpha und IL-1ra stärker IL-1RI- und sIL-1RI-affin sind, zeigt IL-1 beta größere Affinität zu IL-1RII und sIL-1RII (Arend 1993).

Das IL-1R-AcP, welches Homologien zum IL-1RI aufweist, stellt das jüngst gefundene Mitglied der IL-1-Rezeptor-Familie dar, wenig ist über dieses Molekül bekannt. Hypothetisch ist das IL-1R-AcP der Teil des IL-1RI, der nur bei Bindung eines IL-1-agonistischen Liganden in die Formation zu einem "High affinity complex" hereintritt und somit die Signaltransmission herstellt. Stellt hingegen der IL-1ra den IL-1RI-Ligand, so findet aufgrund fehlender IL-1R-AcP-Bindungsstelle am IL-1ra eine entsprechende Formation nicht statt, es kommt zu keiner Signaltransmission (Dinarello 1996).

1.3 Testikuläre IL-1-Produktion

Khan et al. haben bereits 1987 die Anwesenheit von IL-1 im Ratten-Hoden nachgewiesen (Khan 1987, Khan 1988). Weitere Untersuchungen führten zur Identifikation mehrerer IL-1 Produzenten im Hoden. Bekannte IL-1-Quellen im interstitiellen Kompartiment sind Leydig-Zellen (Cudicini 1997a, Wang 1991) und testikuläre Makrophagen (Kern 1995). Als tubuläre

IL-1-Produzenten sind Sertoli-Zellen (Cudicini 1997a, Gerard 1991, Stephan 1997, Wang 1998), Spermatogonien (Haugen 1994) und Spermien (Huleihel 1997, Huleihel 2000) identifiziert worden.

Leydig-Zellen sind in der Lage, sowohl die Alpha- als auch die Beta-Form von IL-1 zu produzieren und zu sezernieren (Cudicini 1997a). Humanes Choriongonadotropin (hCG) sowie LPS zeigten stimulierende Wirkungen auf die IL-1-Produktion von Leydig-Zellen (Cudicini 1997a). Interessanterweise zeigte IL-1 beta selbst eine signifikante Induktion der IL-1 alpha mRNA Expression in Leydig-Zellen (Wang 1991). Wie auch in fast allen bekannten IL-1-produzierenden Zellen, sezernieren Leydig-Zellen wesentlich größere Mengen IL-1 beta als IL-1 alpha (Cudicini 1997a).

Testikuläre Makrophagen zeigen im Vergleich zu Peritonealmakrophagen oder splenischen Makrophagen ein verändertes Reaktionsmuster in bezug auf die IL-1- und TNF-Produktion. Die Tatsache, dass die IL-1-Produktion und Sekretion in testikulären Makrophagen nicht durch LPS stimuliert werden kann (bei intakter Prostaglandin-Synthese), lässt vermuten, dass auch ihnen eventuell eine Rolle in der parakrinen Regulation der physiologischen testikulären Funktionen zukommt (Kern 1995).

Im Gegensatz zu den aufgeführten interstitiellen Zelltypen konnte bei unreifen und reifen Sertoli-Zellen ausschließlich die Produktion der Alpha-Form von IL-1 nachgewiesen werden (Cudicini 1997a, Gerard 1991, Stephan 1997). LPS, Latex-Beete, Residualkörper, Testosteron (nur in niedrigen Konzentrationen), FSH, sowie IL-1 alpha zeigten stimulierenden Effekt auf die IL-1 alpha-Produktion oder IL-1 alpha mRNA Expression in Sertoli-Zellen (Cudicini 1997a, Cudicini 1997b, Stephan 1997, Wang 1998).

Über die Produktion des IL-1ra im Hoden bestanden bis zu dieser Studie keine Daten.

1.4 Interaktionen zwischen IL-1 und der männlichen Reproduktionsfunktion

Die Verteilung von IL-1-Rezeptoren und deren mRNA wurde vor relativ kurzer Zeit von Gomez et al. studiert. Die Präsenz von IL-1RI und IL-1RII wurde in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und peritubulären Zellen beobachtet, keiner von beiden IL-1-Rezeptortypen konnte in Keimzellen identifiziert werden (Gomez 1997).

Untersuchungen zu Transferrin-Spiegeln in primären präpubertalen Sertoli-Zellkulturen zeigten, dass Media aktivierter monozytischer Zellen hohe Potenz besitzen, Sertoli-Zellen zu aktivieren. Die beobachteten Transferrin-Spiegel in präpubertalen Sertoli-Zellkulturen waren signifikant höher als diejenigen entsprechender Sertoli-Zellkulturen, die durch FSH, Testosteron, Insulin und Retinol in Kombination aktiviert wurden (Hoeben 1996). Weitere Untersuchungen deuteten an, dass der beobachtete Effekt zu einem Teil durch IL-1 erklärt werden kann, sehr wahrscheinlich in Kombination mit weiteren Zytokinen. Dabei zeigten IL-1, IL-6 und TNF einen additiven Effekt auf die Transferrin-Sekretion in primären präpubertalen Sertoli-Zellkulturen (Hoeben 1996, Hoeben 1997).

Khan et al. untersuchten die Aromatase-Aktivität in präpubertalen Sertoli-Zellen. Weder IL-1 alpha noch IL-1 beta ließen einen Einfluss auf die basale Aromatase-Aktivität erkennen, jedoch zeigte IL-1 beta einen inhibitorischen Effekt auf die FSH-stimulierte Aromatase-Umsatzrate in präpubertalen Sertoli-Zellkulturen (Khan 1991).

Werden erwachsene Sertoli-Zellkulturen mit IL-1 alpha inkubiert, lässt sich, im Gegensatz zu entsprechenden Kulturen aus präpubertalen Tieren, ein Rückgang der basalen Transferrin-Sekretion im Vergleich zu Kontrollen beobachten (Karzai 1992). Weitere Studien zum Effekt von IL-1 auf reife Sertoli-Zellkulturen bestanden bis dato nicht; die Isolation hochgereinigter erwachsener Sertoli-Zellen ist im Vergleich zur entsprechenden Prozedur mit präpubertalen Tieren deutlich erschwert und kostenintensiver, nur selten resultiert eine ausreichend reine Sertoli-Zellkultur.

Deutliche Unterschiede der Reaktion gegenüber IL-1 sind zwischen unreifen und reifen Leydig-Zellen nachweisbar. Aufgrund schneller methodischer Verfahren mittels Percoll-Gradient ist das Isolieren hochgereinigter Leydig-Zellen bei reifen und unreifen Tieren gleichermaßen erfolgreich.

Khan et al. verglichen 1992 die mitotische Aktivität reifer und unreifer Leydig-Zellen, die mit IL-1 beta inkubiert wurden, mittels der ³H-Thymidin-Aufnahmerate. Während sich kein Effekt von IL-1 beta auf die mitotische Aktivität erwachsener Zellen nachweisen ließ, zeigten Leydig-Zellkulturen, die aus 10- und 20 Tage alten Ratten isoliert worden waren, als Antwort auf IL-1 beta eine deutliche Steigerung der ³H-Thymidin-Aufnahme im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Khan 1992).

Ergebnisse von Afane et al. zeigten weitere Unterschiede im Vergleich reifer und unreifer Leydig-Zellen. Es wurde beobachtet, dass Media unstimulierter testikulärer Makrophagen in der Lage waren, die Steroidproduktion in erwachsenen, nicht jedoch in präpubertalen Ratten Leydig-Zellen zu inhibieren (Afane 1998).

Andere Studien hatten beobachtet, dass IL-1 beta in der Lage ist, die basale Testosteron-Produktion in unreifen Leydig-Zellen zu stimulieren. Dies war bei Leydig-Zellen, die aus erwachsenen Tieren isoliert wurden, nicht der Fall gewesen (Sun 1993, Verhoeven 1988).

Die aufgeführten Daten könnten den Schluss zulassen, dass IL-1 vor sexueller Reifung des Hodens als positiver parakriner Regulator der Leydig-Zelle agiert.

Zahlreiche Studien über die Interaktionen zwischen IL-1 und reifen Leydig-Zellen indizieren, dass sich die Richtung des regulatorischen Effekts von IL-1 während der sexuellen Reifung umkehrt.

Während IL-1 keine (Sun 1993) oder nur gering inhibitorische Wirkung (Calkins 1988, Hales 1992) auf die basale Testosteron-Produktionsrate beobachten lässt, zeigt es eine deutliche Potenz, die steroidogenische Aktivität stimulierter reifer Leydig-Zellen Dosis- und Zeitabhängig zu reduzieren (Lin 1991, Mauduit 1992). Interessanterweise war der Effekt von IL-1 bei hCG-stimulierten, 8-Bromo-cAMP-stimulierten und Forskolin-stimulierten reifen Leydig-Zellen gleichermaßen zu beobachten (Calkins 1990, Mauduit 1992). Unklar ist, welche der beiden agonistischen Formen des IL-1 größere regulatorische Wirkung auf die Leydig-Zelle ausübt, bisher beobachtete Unterschiede scheinen von der Art des verwendeten Tier-Systems abzuhängen (Calkins 1990, Mauduit 1992).

Obwohl wenig über die Herkunft des IL-1ra im Hoden bis zu dieser Studie bekannt war, ist die mögliche Wirkung im Hoden dieses natürlich vorkommenden Antagonisten in einer beispielhaften Untersuchung demonstriert worden. Es ließ sich beobachten, dass IL-1ra monozytischer Herkunft die Effekte von IL-1 beta auf LH-stimulierte Leydig-Zell-Steroidogenese vollständig rückgängig machen konnte (Lin 1991).

Bedenkend, dass IL-1 gleichermaßen potente Wirkung in hCG-stimulierten Kulturen als auch in Kulturen, in denen der cAMP-Spiegel manipulativ gehoben worden war, beobachten lässt, muss nach möglichen IL-1-Angriffspunkten flussabwärts der Adenylatcyclase gesucht werden. Ein wichtiges Kontrollmittel der Testosteron-Produktion ist das Steroidogenic Acute

Regulatory Protein (StAR), 1996 aus Maus Leydig-Tumorzellen von Stocco et al. kloniert und charakterisiert (Stocco 1996). Zwei Stunden nach hCG-Applikation steigt der Spiegel dieses Proteins circa 14-fach an und kann durch TNF herunterreguliert werden, interessanterweise jedoch nicht durch IL-1 (Lin 1998, Mauduit 1998). Untersuchungen von Hales deuteten an, dass der intrazelluläre Angriffsort von IL-1 primär in der steroidmodifizierenden Enzymkette zu suchen ist (Hales 1992).

Schließlich, wie beeinträchtigt IL-1 die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse? Rivier und Vale publizierten 1989 die Beobachtung, dass IL-1 eine Dosis-bezogene Inhibition der hypophysesealen LH-Sekretion verursacht (Rivier 1989). Weitere Studien untersuchten und verifizierten dieses Phänomen sowohl für IL-1 alpha als auch für die Beta-Form (Rivier 1990, Turnbull 1997). Ähnlicher Effekt zeigte sich auf Höhe des Hypothalamus, IL-1 war in der Lage, die hypothalamische GnRH-Sekretion deutlich zu senken (Kalra 1990). Keiner der beobachteten Effekte war mediiert durch eines der beiden inhibitorischen hypothalamischen peptidergen Systeme, Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) oder Endogene opioide Peptide (EOP), noch waren sie verbunden mit einer heruntergeregelten Sensitivität der Hypophyse gegenüber GnRH (Bonavera 1993).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen ist der Schluss zulässig, dass Mitglieder der Interleukin-Familie, insbesondere IL-1, an der Zell-Zell-Kommunikation der an Spermatogenese und Steroidogenese involvierten Zellen beteiligt sind. Es ist fernerhin denkbar, dass dieses, bisher primär als Familie immunregulatorisch agierender Mediatoren bekannte System eine wichtige Rolle im sexuellen Reifungsprozess des männlichen Reproduktionsorgans innehat.

Ziel der gegenwärtigen Studie war es, Daten, die im Rahmen der aufgeführten These erhoben worden sind, zu überprüfen und gegebenenfalls durch neue Beobachtungen zu ergänzen. Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Sind die bisher publizierten Daten zur Produktion von IL-1 alpha in Sertoli-Zellen reproduzierbar? Kann, auch intrazellulär, die Existenz von IL-1 beta ausgeschlossen werden?
2. Ist IL-1 in Sertoli-Zellen durch IL-1 induzierbar?
3. Existiert ein testikulärer Produzent des IL-1ra?
4. Sind die an Leydig-Zellen demonstrierten Effekte des IL-1ra auf Sertoli-Zellen übertragbar?
5. In welchen zellulären Kompartimenten können Mitglieder der IL-1 Familie nachgewiesen werden?
6. In welcher Form reguliert IL-1 die Aktivität präpubertaler Sertoli-Zellen? Bestehen Interaktionen zwischen IL-1 und FSH?
7. Können Aussagen über die Existenz von IL-1 Molekülen in Keimzellen gemacht werden?

Um spätere Vergleichbarkeit mit sogenannten "IL-1-Knock-Out-Mäusen" herstellen zu können und um die bisher meist an Ratten erhobenen Daten herauszufordern, wurden Mäuse als Versuchssystem gewählt. Zu diesem Zweck wurde das bisher etablierte System der Sertoli-Zellisolation und -kultur von Ratten modifiziert und ein entsprechendes Verfahren entwickelt, Sertoli-Zellen aus Mäusen zu isolieren und zu kultivieren.

Als Nachweismethoden wurden Techniken der Enzymimmunoassays und Immunhistochemie, des weiteren Techniken der Molekularbiologie gewählt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *Tiere*

Als Versuchsmodell wurden 15-tage alte männliche Balb/c Mäuse gewählt. Balb/c Mäuse erreichen die Pubertät im Alter von 17-21 Tagen. Die gewählten Tiere sind präpubertal. Herkunft der Tiere war das Harlan Laboratory in Jerusalem, Israel. Zum Zeitpunkt der Tötung wogen die Tiere zwischen 5,8 und 6,3 g.

2.2 *Isolierung und Kultur von Sertoli-Zellen*

Hochgereinigte Sertoli-Zellen wurden nach einer Modifikation und Kombination der Methoden von Toebusch et al. (1989) und Skinner et al. (1985) isoliert.

Zehn Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Hoden wurden entnommen, dekapsuliert und in 20 ml Eagle's Minimum Essential Medium (MEM; Beit Haemek Biological Industries, Israel) in einem 50 ml-Röhrchen suspendiert. Die Hoden wurden mechanisch durch mehrfache Aspiration durch Pipettenspitzen (8 Aspirationen durch 2 mm Öffnung gefolgt durch 10 Aspirationen durch 1 mm Öffnung) in eine 50 ml-Spritze verdaut. Der mechanische Verdau wurde fortgesetzt, bis die Tubuli komplett dissoziiert waren. Im Anschluß wurden die Tubuli sedimentiert und dreimal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS; Beit Haemek Biological Industries, Israel) gewaschen (keine Zentrifugation). Überstände, welche die interstitielle Zellfraktion enthielten, wurden verworfen. Die gesammelten Tubuli wurden in ein 50 ml-Kulturfläschen transferiert und einem Collagenase-Verdau unterzogen (8 mg Collagenase/ 20 ml PBS, 25 min bei 37°C). Die resultierenden Zellverbände und Tubulus-Fragmente wurden zweimal mit 40 ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300x g, 4 min), gefolgt von dreimaliger Aspiration durch eine 18G x 1,5 Kanüle in eine 10 ml Spritze, um die übriggebliebenen Tubulus-Fragmente aufzubrechen. Die resultierenden Zellverbände wurden mit Hyaluronidase inkubiert (20 mg/ 20 ml PBS, 30 min), im Anschluß durch sterile chirurgische Gaze gefiltert und dreimalig mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300x g, 6 min). Collagenase (Typ V; 359 U/mg) und Hyaluronidase (295 U/mg) wurden von Sigma Chemical Co. (St.Louis, USA) bezogen. Sämtliche Enzymverdauungen wurden in einem Schüttelwasserbad (120 Zyklen/ min) bei 37°C durchgeführt.

Die durch dieses Verfahren gewonnenen, fast vollständig dissoziierten Sertoli-Zellen und spermatogonischen Stammzellen wurden unter dem Phasenkontrast-Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Sertoli-Zellen wurden anhand ihrer Größe und den von Lipshultz et al. (1982) beschriebenen typischen vielzahligen, unterschiedlich großen Granula und Vakuolen identifiziert. Die Zellen wurden in MEM, inklusive Streptomycin (100 mg/l) und Penicillin (10^5 IU/l; PenStrept, Beit Haemek Biological Industries, Israel), 1% L-Glutamin und 7% fötales Kälberserum (FCS; Beit Haemek Biological Industries, Israel) in 96-Well-Kulturplatten oder 6-Well-Kulturplatten in einer Zelldichte zu jeweils $1,3 \times 10^5$ oder $3,2 \times 10^6$ Sertoli-Zellen pro Röhrchen eingesäht ($3,3$ - $3,4 \times 10^5$ Sertoli-Zellen/ cm^2). Des Weiteren wurden Zellen in geringerer Dichte auf Permaxox® 4-Kammer Kulturobjektträger (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA) eingesäht. Sämtliche der aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach einer Vorinkubationsperiode von 48 h bei 36°C und 5% CO_2 wurden die übriggebliebenen spermatogonischen Stammzellen durch 2,5 min andauernde hypotonische Schockbehandlung mittels 10% MEM in Aqua dest entfernt und dreimal mit MEM gewaschen, wobei die Kulturplatten in horizontaler Richtung heftigen Schüttelbewegungen ausgesetzt wurden. Die Zellkultur wurde weitere zwei Tage mit frischem Medium inklusive 0,5% bovinem Serum-Albumin (BSA; ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) fortgesetzt (ohne FCS). Nach Ende der viertägigen Vorinkubationszeit wurden die nun hochgereinigten Sertoli-Zellen für verschiedene Zeiten mit MEM (0,3% BSA) inkubiert in An- oder Abwesenheit von rekombinantem humanen (rh) FSH (Gonal-F®; Ares Serono Group, Genf, Schweiz), LPS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), rhIL-1 alpha, rhIL-1 beta oder rhIL-1ra (Genzyme, Cambridge, MA, USA). Nach Inkubation wurden die Überstände gesammelt und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden gewaschen und frisches Medium wurde in gleicher Menge hinzugegeben. Zell-Lysate wurden durch dreimaliges Frieren und Tauen erstellt. RNA-Extraktionen wurden direkt im Anschluß an die Inkubationsperiode durchgeführt. Kulturobjektträger wurden mit Methanol fixiert (absolut, 10 min, -20°C) und bis zur immunzytochemischen Verarbeitung luftgetrocknet.

2.3 Untersuchung der Viabilität, Reinheit und Komposition von Sertoli-Zellkulturen

Die Viabilität wurde zu Ende der Inkubationszeiten mit Trypan-Blau-Färbung ermittelt.

Um die Reinheit der Sertoli-Zell Präparationen zu untersuchen, wurden fixierte und luftgetrocknete Kulturobjektträger mit Mayers Hämatoxylin (1 min) und Eosin (1,5 min) angefärbt oder einer immunzytochemischen Färbung gegen die schwere Kette (200 kD) des intrazellulären Neurofilament (NF) mittels polyklonaler Kaninchen Anti-NF-200 Antikörper (Sigma, Rehovot, Israel) in 1:1000-Endverdünnung unterzogen. Einzelheiten zur Immunzytochemie sind in Kapitel 2.5. aufgeführt. Sertoli-Zellen wurden anhand der von Lipshultz et al. (1982) beschriebenen Charakteristika identifiziert. Diese sind: 1.) Irregulär geformter Nukleus, dichter Nukleolus. 2.) Perinukleoläre Sphären, bekannt als Satelliten-Karyosome. 3.) Vielzählige, heterochromatöse Granula verschiedener Größen.

Die Anwesenheit peritubulärer Zellen wurde untersucht durch eine von Oonk et al. (1985) beschriebene Methode. Dabei wurde ein Teil des aus der Zellisolierung gewonnen Zellpellets in einer Mischung aus Ethanol und Essigsäure (3:1, v/v) fixiert und auf Objektträgern luftgetrocknet. Nach Hinzufügen eines Tropfens Essigsäure (45%, v/v) wurden die Objekte unter dem Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Zellkerne peritubulärer Zellen wurden anhand ihrer charakteristischen gebogenen, schlanken Form identifiziert (Oonk 1985).

Kontamination von Leydig-Zellen in der Sertoli-Zell-angereicherten Fraktion wurde zum Zeitpunkt der Isolation mittels Phasenkontrast-Mikroskopie ausgewertet. Dabei präsentieren Leydig-Zellen die charakteristische von Schumacher et al. (1978) beschriebene Illumination.

2.4 Isolierung und Kultur von Milz-Leukozyten

Milz-Lymphozyten wurden durch mechanische Verdauung einer Mausmilz gewonnen. Zellen wurden durch chirurgische Gaze filtriert, zweimal mit MEM gewaschen und in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in 6-er Kulturplatten oder in niedrigerer Dichte in Permanox® 4-Kammer Kultur-Objektträger eingesäht. Die Zellen wurden 2 oder 24 h mit LPS (5 µg/ml) stimuliert. Nach Stimulation wurden Überstände gesammelt und Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die gesamte RNA wurde unmittelbar nach Stimulation mittels Tri-Reagent® extrahiert (Einzelheiten in Kapitel 2.7.). Zellen und Überstände wurden bis zum Gebrauch als

Positivkontrollen in IL-1 ELISA's bei -20°C gelagert. Kultur-Objektträger wurden mit PBS gewaschen, durch Methanol fixiert (absolut, -20°C , 10 min) und luftgetrocknet bis zur Verwendung als Positivkontrollen in IL-1 immunzytochemischen Färbungen.

2.5 Immunzytochemische Färbungen

Immunreaktives Maus-IL-1 (mIL-1 alpha, -beta und -ra) in Sertoli-Zellen wurde immunzytochemisch durch spezifische polyklonale Antikörper koloriert. Methanol-fixierte und luftgetrocknete Permanox® Kulturobjektträger wurden für 15 min in Xylol inkubiert und anschließend rehydriert. Nichtspezifischer Hintergrund wurde durch PBS inklusive 2,5%-igem normalen Serum desjenigen Tieres, aus dem die Zweitantikörper gewonnen wurden, blockiert. Polyklonale Hasen Anti-mIL-1 alpha-Antikörper (1:200 Endverdünnung; Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA), polyklonale Hasen Anti-mIL-1 beta-Antikörper (1:80 Endverdünnung; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) und polyklonale Gans Anti-mIL-1ra-Antikörper (1:10 Endverdünnung; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurden als Erstantikörper verdünnt in PBS inklusive 2,5%-igem normalen Serum eingesetzt. Die biotinylierten Zweitantikörper (Gans Anti-Hase für IL-1 alpha und beta und Hase Anti-Gans für IL-1ra) sowie das Streptavidin-Peroxidase Konjugat wurden nach Instruktionen des Herstellers angewandt (Zymed, San Francisco, CA, USA). Endogene Peroxidase wurde durch 3% H_2O_2 in 80% Methanol für 15 min blockiert, bevor mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat inkubiert wurde. Die Entwicklung wurde mit 0,06% Diamino-Benzidin Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma, Israel) durchgeführt. Negative Kontrollen wurden parallel mit PBS inklusive normalem Serum anstelle der Erstantikörper durchgeführt. Um Zellen erkennbar zu machen, wurde eine anschließende Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin für 30 s durchgeführt, Abweichungen davon sind indiziert.

2.6 Enzymimmunoassays (ELISA)

Enzymimmunoassays (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA) wurden nach Instruktionen der Hersteller durchgeführt. Sämtliche der verwendeten ELISA-Systeme basierten auf dem sogenannten "Sandwich-ELISA"-Prinzip: Die Platten wurden mittels monoklonalem Erstantikörper belegt, nach Blockung und Inkubation der zu messenden

Proben wurde die Detektion mit polyklonalem Zweitantikörper vorgenommen. Zweitantikörper wurden anschließend mit Streptavidin Horseradish-Peroxidase (Streptavidin-HRP; Biotest, Tel Aviv, Israel) konjugiert. Nach Entwicklung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; Biotest, Tel Aviv, Israel) wurden die Proben durch 1N H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm gelesen (Bio-Tek EL 311 Microplate Autoreader).

2.6.1 *mIL-1 alpha ELISA*

Immunreaktives mIL-1 alpha aus Sertoli-Zellkultur Überständen und Lysaten wurde quantifiziert mittels eines spezifischen ELISA (Serotec, Oxford, UK und Biodesign International, Kennebunk, ME, USA). Die Sensitivität des ELISA war 4 pg/ml Maus IL-1 alpha.

Laut Angaben des Herstellers existiert keine Kreuzreaktivität zwischen humanem IL-1 alpha und beta, IL-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -13, -15, mIL-1 beta, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Interferon (IFN)-alpha und -gamma, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-alpha und -beta, Vascular Endothelium-derived Growth Factor (VEGF) und mIL-1 alpha ELISA.

2.6.2 *mIL-1 beta ELISA*

Immunreaktives mIL-1 beta aus Sertoli-Zellkultur Überständen und Lysaten wurde quantifiziert mittels eines spezifischen ELISA (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Die Sensitivität das ELISA war 15 pg/ml mIL-1 beta.

Laut Angaben des Herstellers existiert keine Kreuzreaktivität zwischen mIL-1 alpha und mIL-1 beta ELISA.

2.6.3 *mIL-1ra ELISA*

Immunreaktives mIL-1ra aus Sertoli-Zellkultur Überständen und Lysaten wurde quantifiziert mittels eines spezifischen ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Sensitivität das ELISA war 120 pg/ml mIL-1ra.

Keine Kreuzreaktivität existierte zwischen humanem IL-1 alpha, IL-1 beta, mIL-1 alpha mIL-1 beta und mIL-1ra ELISA. Humanes IL-1ra war zu 30-50% kreuzreaktiv mit dem

verwendeten mIL-1ra ELISA.

2.6.4 Maus Transferrin ELISA

Maus Transferrin (mTf) aus Sertoli-Zellkultur Überständen wurde quantifiziert mittels eines spezifischen ELISA (ICN Pharmaceuticals Inc., Biochemical Division, Aurora, OH, USA). Die Sensitivität des ELISA war 0,5 ng/ml mTf.

Laut Angaben des Herstellers existiert keine Kreuzreaktivität zwischen anderen Serumproteinen und mTf ELISA.

2.7 Extraktion der Gesamt-RNA

Gesamt-RNA von Milz-Leukozyten und Sertoli-Zellkulturen wurde unmittelbar im Anschluß an Inkubation, Stimulation und dreimaligen Waschen mit PBS mittels Tri Reagent®-Protokoll durchgeführt (MRC, Cincinnati, OH, USA).

Circa 8×10^6 Zellen wurden durch Überschichten mit 1 ml Tri Reagent® und mehrfacher Aspiration homogenisiert. Die Phasentrennung wurde mit 0,2 ml Chloroform und anschließender Zentrifugation ($12.000 \times g$, 15 min, RT) vorgenommen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und RNA wurde durch Mischen mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach weiterer Zentrifugation ($12.000 \times g$, 10 min, 4°C) wurde das resultierende RNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und nochmals zentrifugiert ($7.500 \times g$, 8 min, 4°C). Eine Lösung der RNA wurde mit 50 μl DEPC-Wasser bei 60°C für 15 min durchgeführt.

Die Menge der RNA und Reinheitsgrad wurden photometrisch bestimmt. Der Reinheitsquotient OD 260/280 lag immer zwischen 1,6 und 2,0.

2.8 *cDNA Synthese und RT-PCR*

Komplementäre DNA (cDNA) wurde synthetisiert aus 2 µg Gesamt-RNA mit 0,5 µg Random Oligonucleotide Primer (Böhringer Mannheim, Deutschland) und 200 U Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase (M-MLV-RT; GibcoBRL Life Technologies, Paisley, Schottland) in einem Gesamtvolumen von 20 µl Tris-HCl-MgCl-Reaktionspuffer inklusive DTT, dNTPs (0,5 mmol/l; Böhringer Mannheim, Deutschland) und RNase-Inhibitor (40 U; Böhringer Mannheim, Deutschland). Die Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion wurde 1 h bei 37°C durchgeführt, 10 min bei 75°C gestoppt und anschließend mit 30 µl Aqua dest auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Negative Kontrollen für die RT-Reaktion (RT-) wurden parallel durchgeführt, derselbe Reaktionspuffer mit entsprechenden Proben wurde ohne M-MLV-RT inkubiert.

Die nonquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR), im Anschluß durchgeführt, beinhaltete cDNA-Proben in einer Endverdünnung von 1:15 mit vier Paaren von Oligonukleotid-Primern (0,9 pmol/µl; 5'GGGTCAGAAGGATTCCTATB3' und 5'GGTCTCAAACATGATCTGGG3' für die Maus Beta-Actin cDNA-Sequenz, 5'CAGTTCTGCCATTGACCATC3' und 5'TCTCACTGAAACTCAGCCGT3' für die mIL-1 alpha cDNA-Sequenz entsprechend den Positionen 123/142 und 321/340, 5'TTGACGGACCCCAAAGATG3' und 5'AGAAGGTGCTCATGTCCTCA3' für die mIL-1 beta cDNA-Sequenz entsprechend den Positionen 151/170 und 335/354, und 5'GGCAGCCTGCCGCCCTTCTGGG3' und 5'CTCAAAGCTGGTGGTGGGGCC3' für die mIL-1ra cDNA-Sequenz entsprechend den Positionen 117/137 und 442/462; Institute of Biotechnology, Ben-Gurion-University of the Negev, Beersheva, Israel). Um die Abwesenheit genomischer DNA in RNA-Präparationen und DNA-Kontamination in weiteren Schritten zu ermitteln, wurden PCR-Reaktionen mit negativen Kontrollen der RT-Reaktion (RT-) und in Abwesenheit von cDNA-Proben (cDNA-) durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Delta Cycler II System Thermal Cycler (Ericomp, San Diego, CA, USA) durchgeführt (94°C, 5 min; gefolgt von 35 Zyklen, 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 1,5 min; schließlich 72°C, 10 min). Zehn Microliter jedes PCR-Produkts wurden in einem 2%-igem Agarose-Gel inklusive Ethidiumbromid der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

2.9 Verifizierung der PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymverdau

Um die Spezifität zu ermitteln, wurden die amplifizierten PCR Produkte gereinigt (Concert®, GibcoBRL Life Technologies, Paisley, Schottland) und einem spezifischem enzymatischen Verdau mittels Restriktionsendonukleasen unterzogen. Das 220 bp mIL-1 alpha-Produkt und das 204 bp mIL-1 beta-Produkt wurden durch ScrF I (Böhringer Mannheim, Deutschland) geschnitten, das 346 bp mIL-1ra-Produkt wurde durch EcoR V (Böhringer Mannheim, Deutschland) geschnitten. Wie durch Restriktionskarten-Analyse ersichtlich ist, haben die gewählten Enzyme jeweils eine Schnittstelle im amplifizierten mIL-1 alpha und mIL-1ra-Produkt und zwei Schnittstellen im mIL-1 beta-Produkt (National Center for Biotechnology Information, National Institute of Health, USA). Die erwarteten Schnittprodukte aus dem mIL-1 alpha Amplifikat sind 150 und 70 bp lang, 135, 44 und 25 bp aus dem mIL-1 beta Amplifikat und 233 und 113 bp aus dem mIL-1ra Amplifikat.

2.10 Statistische Auswertung

Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung von Triplikaten ausgedrückt, soweit nicht anders angemerkt. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Student t-Test wurde verwendet, um P-Werte zu ermitteln, nachdem Varianzen mittels ANOVA bestimmt waren. Signifikanz wurde definiert als $P < 0,05$.

3 ERGEBNIS

3.1 *Viabilität, Reinheit und Komposition von Sertoli-Zellkulturen*

Die Viabilität der Sertoli-Zellkulturen zu Ende der fünf- bis sechstägigen Inkubationszeiten betrug stets >95%.

Nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode ohne hypotonischen Schock, wurden Kontaminationen von Keimzellen und Leukozyten zwischen jeweils 25-30% und 0,5-1% beobachtet (Abb. 2 A). Hypotonische Schockbehandlung, durchgeführt wie in Kapitel 2.2. beschrieben, verringerte die Kontamination von Keimzellen und Leukozyten auf weniger als jeweils 1% und 0,5% (Abb. 2 B).

Der Anteil peritubulärer Zellen, ermittelt durch die von Oonk et al. (1985) vorgestellte Methode, betrug zum Zeitpunkt der Isolation stets weniger als 0,5%. Zum selben Zeitpunkt wurden unter 1% Leydig-Zellen in der Sertoli-Zell-angereicherten Fraktion unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet.

Sertoli-Zellen zeigen positive immunzytochemische Anfärbungen für das Neurofilament-200 Antigen unter basalen Kulturbedingungen. Die Färbung ist begrenzt auf zytoplasmatische Bereiche, keine Anfärbbarkeit zeigte sich im Nukleus der Zellen (Abb. 3). Keine Unterschiede der Farbintensität konnten zwischen entsprechenden Kontrollen und LPS-, FSH- oder IL-1-stimulierten Zellkulturen beobachtet werden.

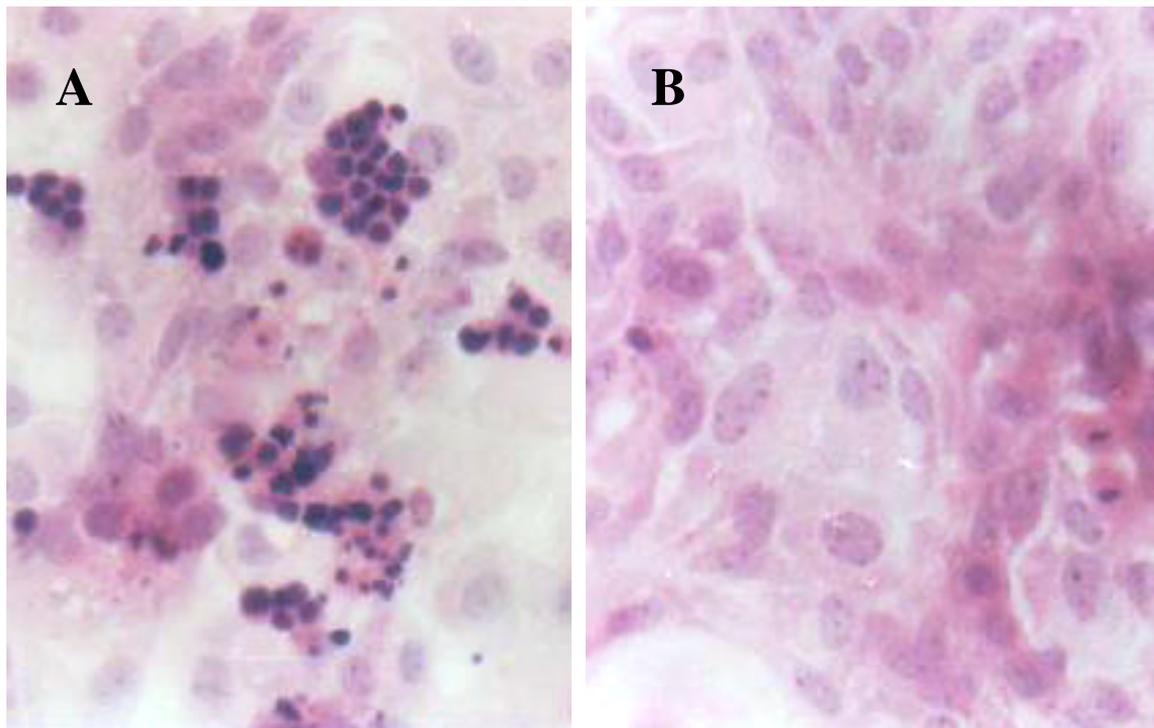


ABB. 2. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Maus Sertoli-Zellen nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode. Zellen wurden isoliert und inkubiert wie beschrieben in Kapitel 2.2. ohne (A) und mit hypotonischer Schockbehandlung (B). Zu beachten ist die Abwesenheit von Keimzellen nach hypotonischem Schock. Eine Telophase der Mitose ist erkennbar (B). (HE; x400)

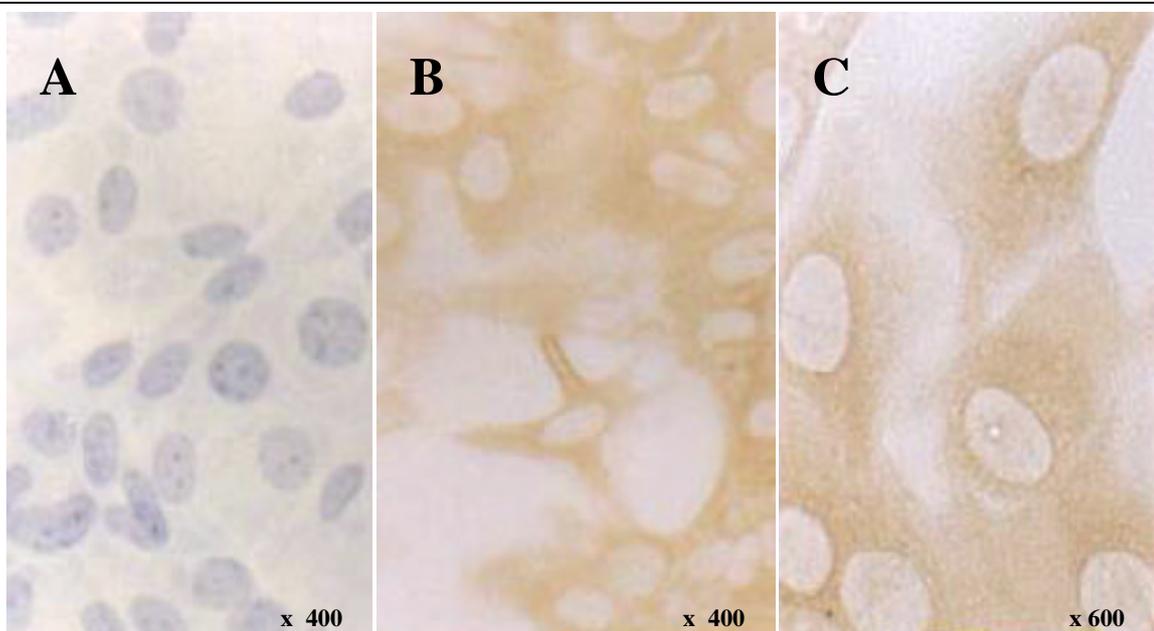


ABB. 3. Immunzytochemische Färbung von NF-200 in unstimulierten Maus Sertoli-Zellen (B und C; keine Gegenfärbung). Negative Kontrollen wurden parallel ohne NF-200-Antikörper durchgeführt (A; mit Hämatoxylin-Gegenfärbung).

3.2 *IL-1 Produktion in Sertoli-Zellen*

Daten zur Produktion von IL-1 in Maus Sertoli-Zellen sind primär nach Familienmitgliedern der IL-1-Familie gegliedert worden, sekundär nach methodischer Herkunft.

3.2.1 *IL-1 alpha*

3.2.1.1 *Immunzytochemie*

Immunzytochemische Färbungen von Sertoli-Zellkulturen und Sertoli-Zell/Keimzell-Cokulturen zeigten die Präsenz von IL-1 alpha in präpubertalen Maus Sertoli-Zellen und Keimzellen. Eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung von IL-1 alpha war zu beobachten (Abb. 4).

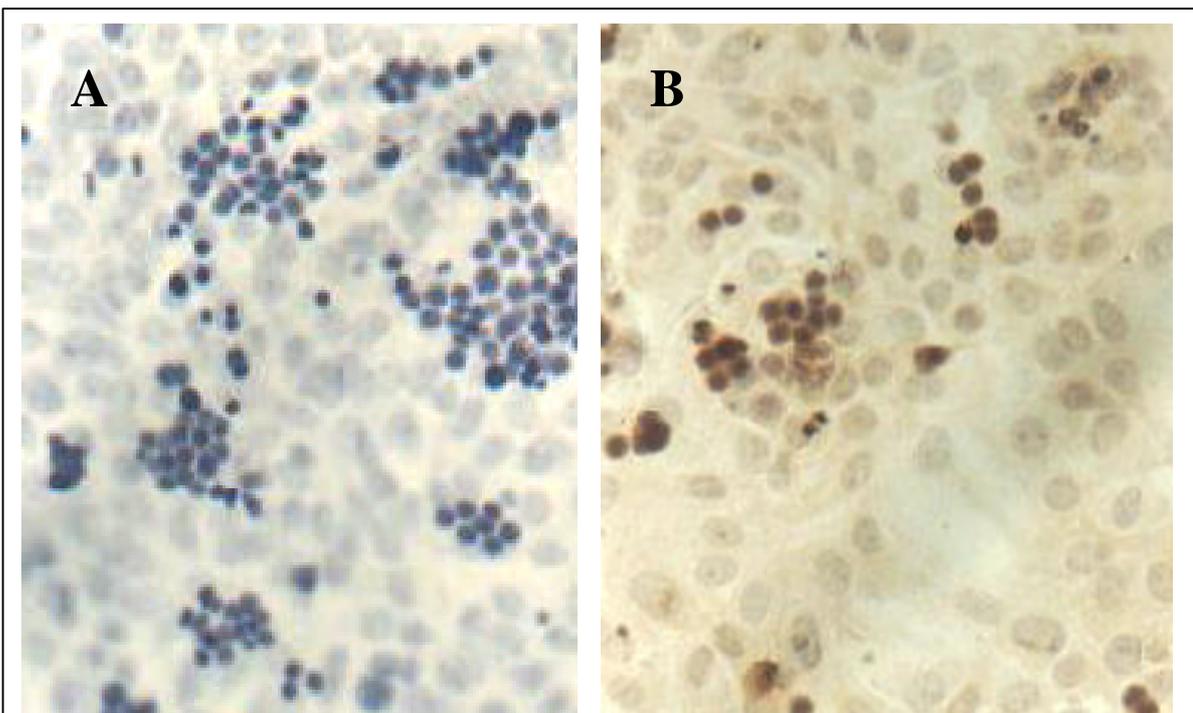


ABB. 4. Immunzytochemische Färbung von mIL-1 alpha in Maus Sertoli-Zell/ Keimzell-Cokulturen.

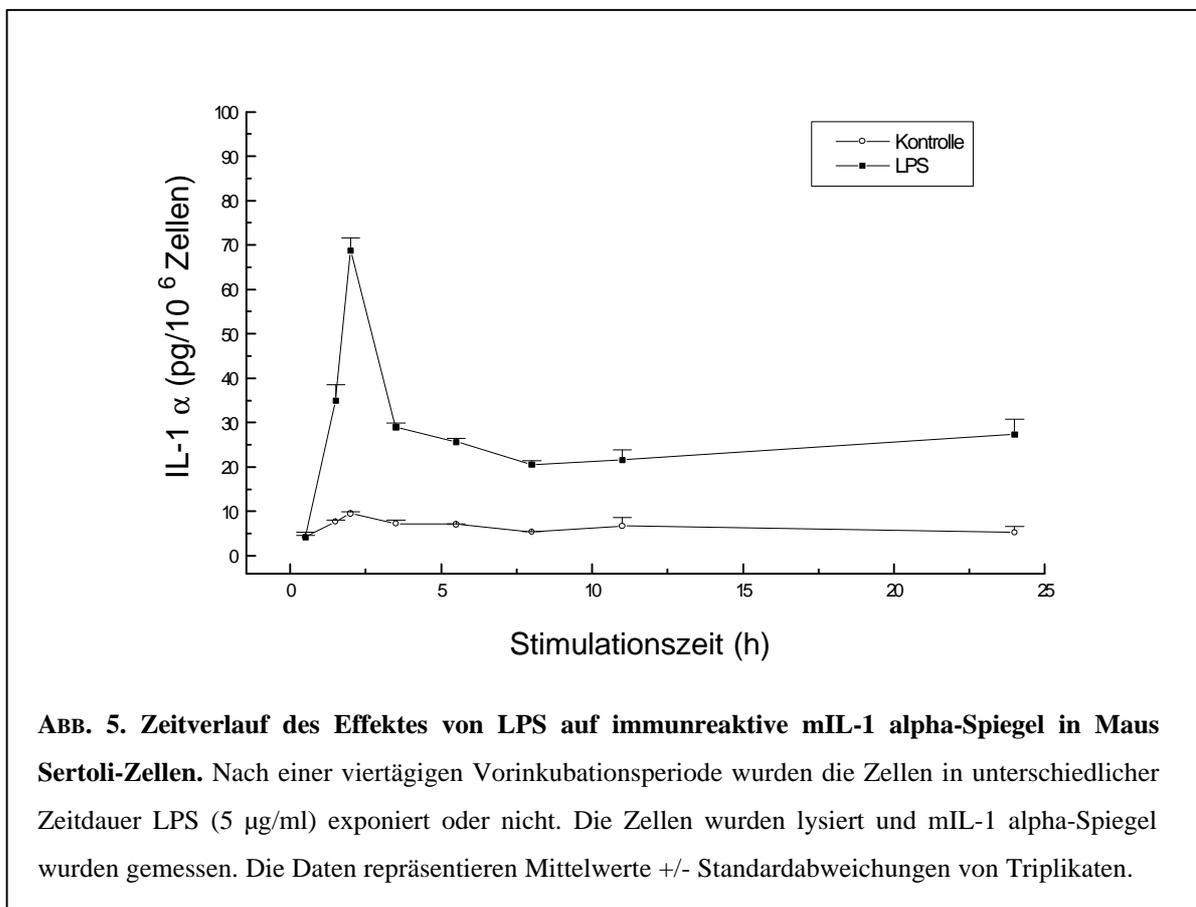
Zellen wurden isoliert und ohne hypotonische Schockbehandlung vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen 2 h mit LPS (5 µg/ml) stimuliert (B; Immunzytochemie mit Hämatoxylin-Gegenfärbung x400). Negative Kontrollen wurden parallel ohne mIL-1ra-Antikörper durchgeführt (A; x400, mit Hämatoxylin-Gegenfärbung).

3.2.1.2 ELISA

Untersuchungen durch Enzymimmunoassays zeigten, dass präpubertale Maus Sertoli-Zellen unter basalen Kulturbedingungen immunreaktives IL-1 alpha produzieren (3,5-9,5 pg/10⁶ Zellen). Die Inkubation der Sertoli-Zellkulturen mit LPS (5 µg/ml) resultierte ab 30 min nach Inkubationsbeginn in erhöhter intrazellulärer IL-1 alpha-Produktion. Maximale intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel wurden 2 h nach Stimulationsbeginn mit LPS beobachtet. LPS-stimulierte IL-1 alpha-Produktion blieb mindestens 24 h signifikant erhöht (P <0,001) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Abb. 5).

Der Effekt von LPS auf die IL-1 alpha-Produktion in Maus Sertoli-Zellen zeigte eine Dosis-abhängige Wirkung. Signifikant erhöhte (P <0,001) intrazelluläre IL-1 alpha-Werte waren schon bei LPS-Konzentrationen im Kulturmedium ab 0,625 µg/ml zu beobachten (Abb. 6).

Keine immunologische Aktivität von IL-1 alpha, gemessen durch ELISA, wurde in unstimulierten oder stimulierten Sertoli-Zellmedia (Überständen) beobachtet.



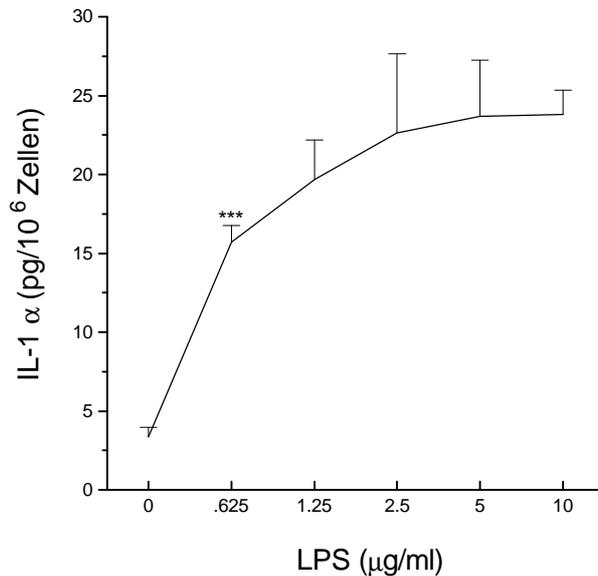


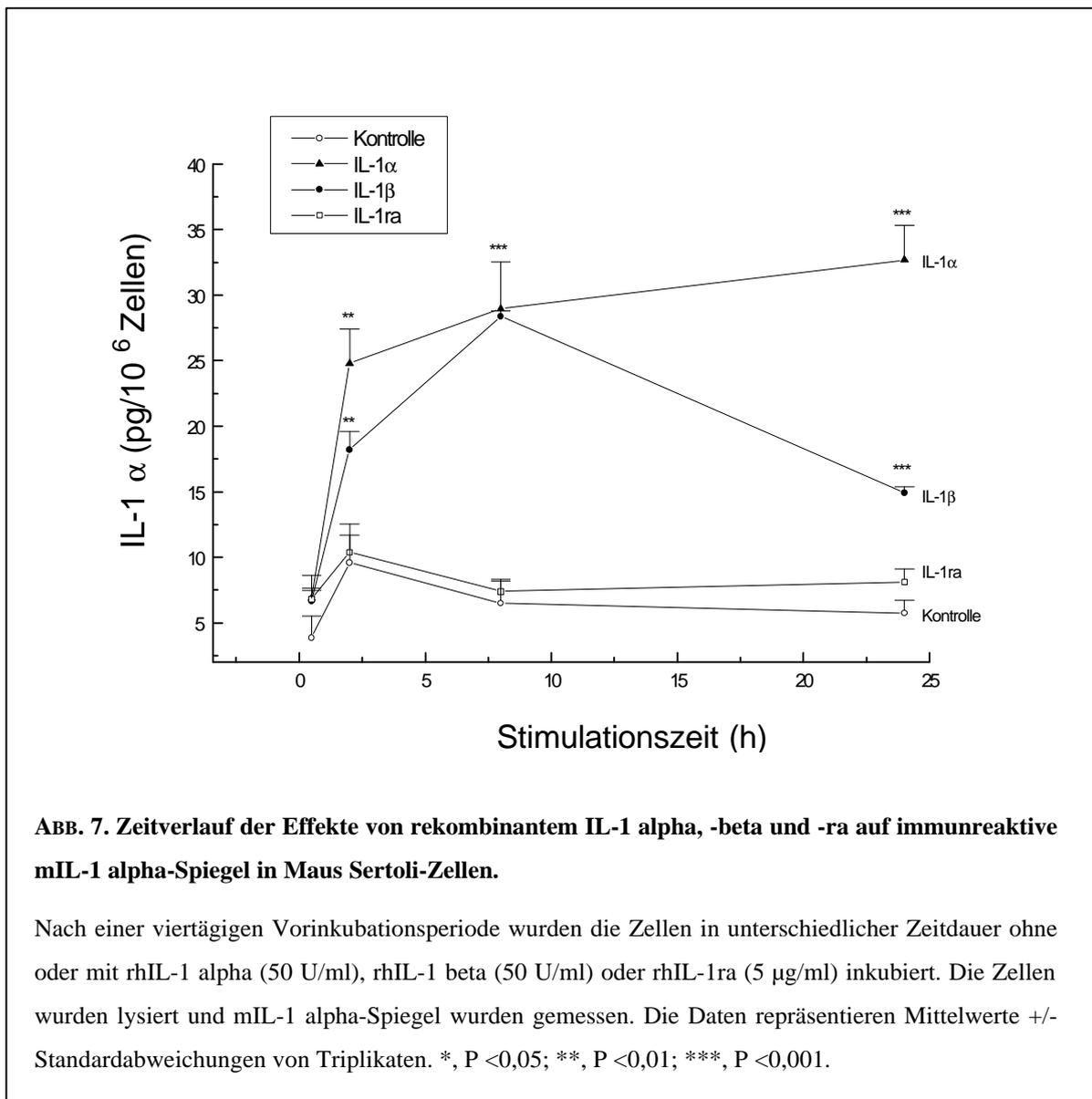
ABB. 6. Effekt von LPS auf immunreaktive intrazelluläre mIL-1 alpha Produktion von Maus Sertoli-Zellen. Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPS 24 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mIL-1 alpha-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Triplikaten. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001.

Sertoli-Zellkulturen, deren Media rekombinantes IL-1 alpha (50 U/ml) oder IL-1 beta (50 U/ml) zugesetzt worden war, antworteten mit einer signifikanten Steigerung der intrazellulären IL-1 alpha-Produktion im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (P <0,01). Beide, IL-1 alpha und IL-1 beta, induzierten erhöhte intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel innerhalb von 2 h nach Stimulationsbeginn. IL-1 alpha-Spiegel in IL-1 alpha-stimulierten Sertoli-Zellkulturen stiegen kontinuierlich an, maximale Werten waren 24 h nach Stimulationsbeginn zu beobachten. Hingegen induzierte IL-1 beta einen Gipfel der intrazellulären IL-1 alpha-Produktion in Sertoli-Zellkulturen circa 8 h nach Inkubationsbeginn (Abb. 7).

Sertoli-Zellkulturen, deren Media rekombinantes IL-1ra in verschiedenen Konzentrationen (1-5000 ng/ml) zugesetzt worden war, zeigten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied der intrazellulären IL-1 alpha-Spiegel im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Abb. 7).

Der Effekt von rekombinantem IL-1 alpha auf die intrazelluläre IL-1 alpha-Produktion in Maus Sertoli-Zellkulturen war Dosis-abhängig (Abb. 8).

FSH zeigte zu keinem der beobachteten Zeitpunkte (0,5-24 h) einen signifikanten Effekt auf intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel in Maus Sertoli-Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen.



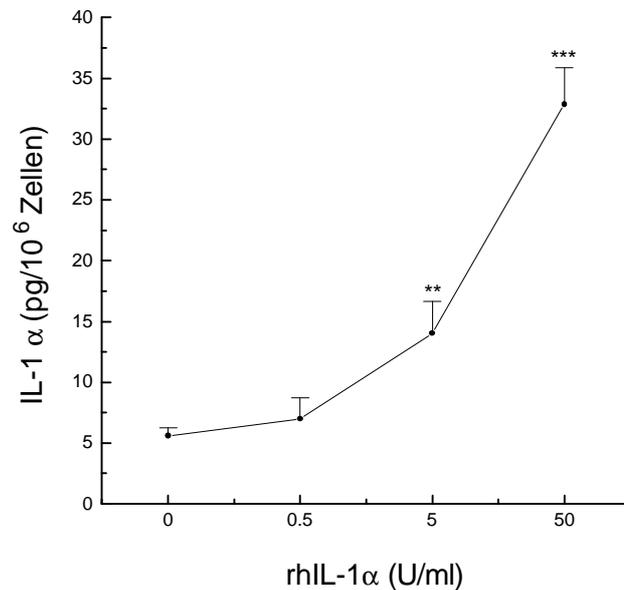


ABB. 8. Effekt von rekombinantem IL-1 alpha auf immunreaktive intrazelluläre mIL-1 alpha Produktion von Maus Sertoli-Zellen.

Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von rhIL-1 alpha 24 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mIL-1 alpha-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Triplikaten. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

Experimente mit gleichzeitiger Inkubation von Maus Sertoli-Zellkulturen mit rekombinantem IL-1 alpha und rekombinantem IL-1ra zeigten, dass IL-1ra den stimulierenden Effekt von rekombinantem IL-1 alpha auf die intrazelluläre IL-1 alpha-Produktion in Sertoli-Zellen dosisabhängig rückgängig machen kann. Der Effekt von 50 U/ml rhIL-1 alpha auf die intrazelluläre IL-1 alpha-Produktion konnte durch gleichzeitiges Hinzufügen von 5 μ g/ml rhIL-1ra vollständig aufgehoben werden, das heißt, intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel entsprachen denen unstimulierter Kontrollen (Abb. 9).

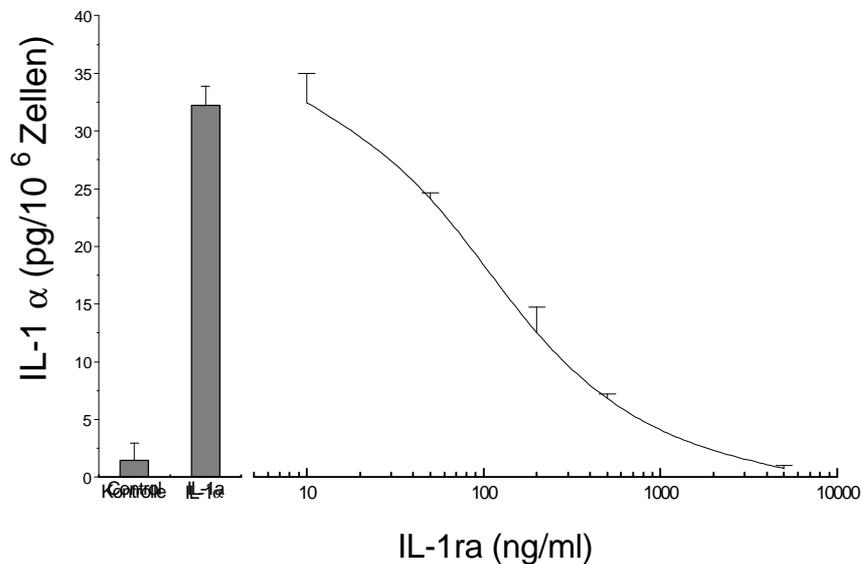


ABB. 9. Effekt von rekombinatem IL-1ra auf die IL-1 alpha-stimulierte IL-1 alpha-Produktion in Maus Sertoli-Zellen.

Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen 24 h ohne oder mit rhIL-1 alpha (50 U/ml) und verschiedenen Konzentrationen von rhIL-1ra inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mIL-1 alpha-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Triplikaten.

3.2.2 *IL-1 beta*

3.2.2.1 *Immunzytochemie*

Immunzytochemische Präparationen von unstimulierten und LPS-stimulierten (5 µg/ml) Sertoli-Zellkulturen mit Anti-mIL-1 beta-Antikörpern zeigten keine Unterschiede in der Anfärbung im Vergleich zu entsprechenden negativen Kontrollen (Abb. 10 A+B). Maus Milz-Leukozyten, isoliert, vorinkubiert und 2 h stimuliert (5 µg/ml LPS) entsprechend der in Kapitel 2.4 beschriebenen Methodik, wurden parallel immunzytochemisch präpariert und als Positivkontrolle herangezogen (Abb. 10 C+D).

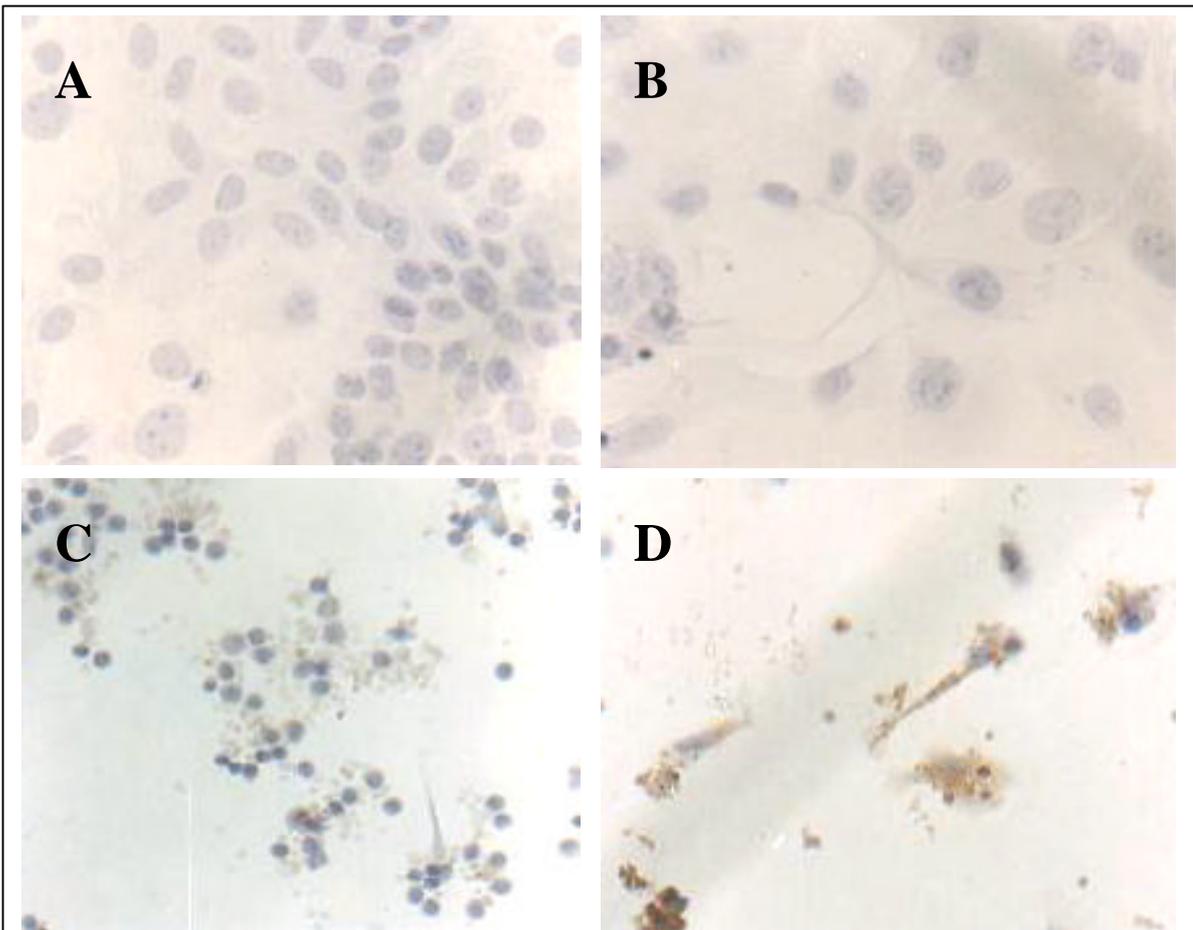


ABB. 10. Immunzytochemische Färbung von mIL-1 beta in Maus Sertoli-Zellkulturen. Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen 2 h mit LPS (5 µg/ml) stimuliert (B; x400; mit Hämatoxylin-Gegenfärbung). LPS-stimulierte (5 µg/ml) Maus Milz-Leukozyten wurden als Positivkontrolle verwendet (D; x400; mit Hämatoxylin-Gegenfärbung). Entsprechende negative Kontrollen wurden parallel ohne mIL-1 beta-Antikörper durchgeführt (A und C; x400; mit Hämatoxylin-Gegenfärbung).

3.2.2.2 ELISA

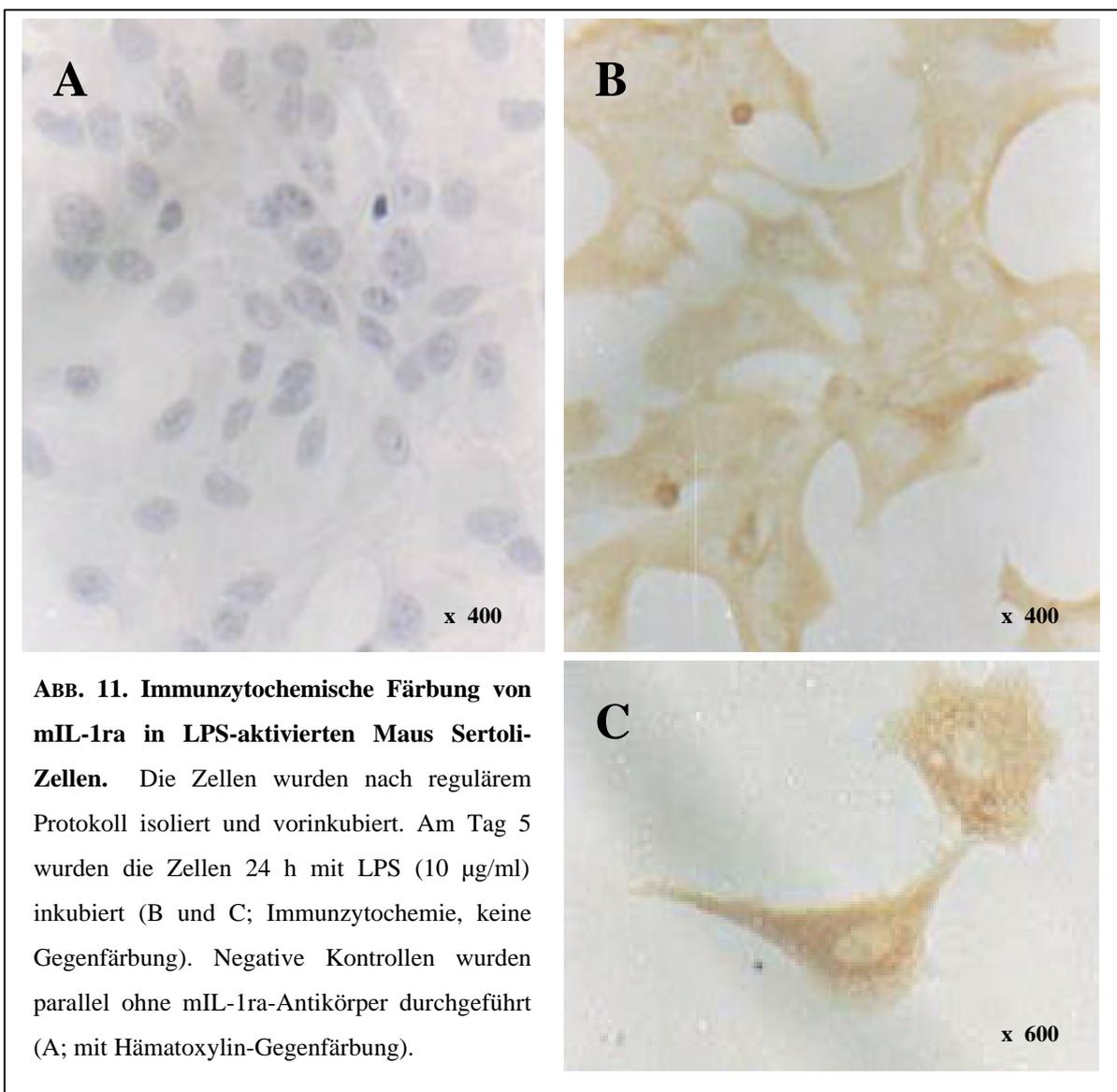
Keine immunologisch nachweisbare Aktivität von IL-1 beta, gemessen durch ELISA, wurde in unstimulierten oder stimulierten (5 µg/ml LPS; 50 U/ml rhIL-1 alpha; 50 U/ml rhIL-1 beta, jeweils 24 h) Sertoli-Zellkulturen (Überstände und Lysate) beobachtet. Dabei wurden Überstände aus LPS-stimulierten Maus Milz-Leukozytenkulturen als Positivkontrolle verwendet, diese produzierten $184,6 \pm 16,32$ pg mIL-1 beta/ 10^6 Zellen. Sertoli-Zellmedia (unstimuliert und stimuliert), welche um den Faktor 5 konzentriert wurden (entsprechend $11,8 \times 10^6$ Zellen/ml), zeigten gleichfalls keine immunologisch nachweisbare IL-1 beta-Aktivität.

3.2.3 *IL-1ra*

3.2.3.1 *Immunzytochemie*

Immunzytochemische Färbungen von Sertoli-Zellkulturen zeigten die Präsenz von IL-1ra in präpubertalen Maus Sertoli-Zellen. Es war eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung von IL-1ra zu beobachten, Zellkerne ließen keine Anfärbbarkeit erkennen (Abb. 11). Die Intensität der Anfärbbarkeit nahm bei LPS-stimulierten Kulturen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen zu.

Immunzytochemische Färbungen von unstimulierten Sertoli-Zell/ Keimzell-Cokulturen offenbarten die Anwesenheit von IL-1ra in Keimzellen (Abb. 12).



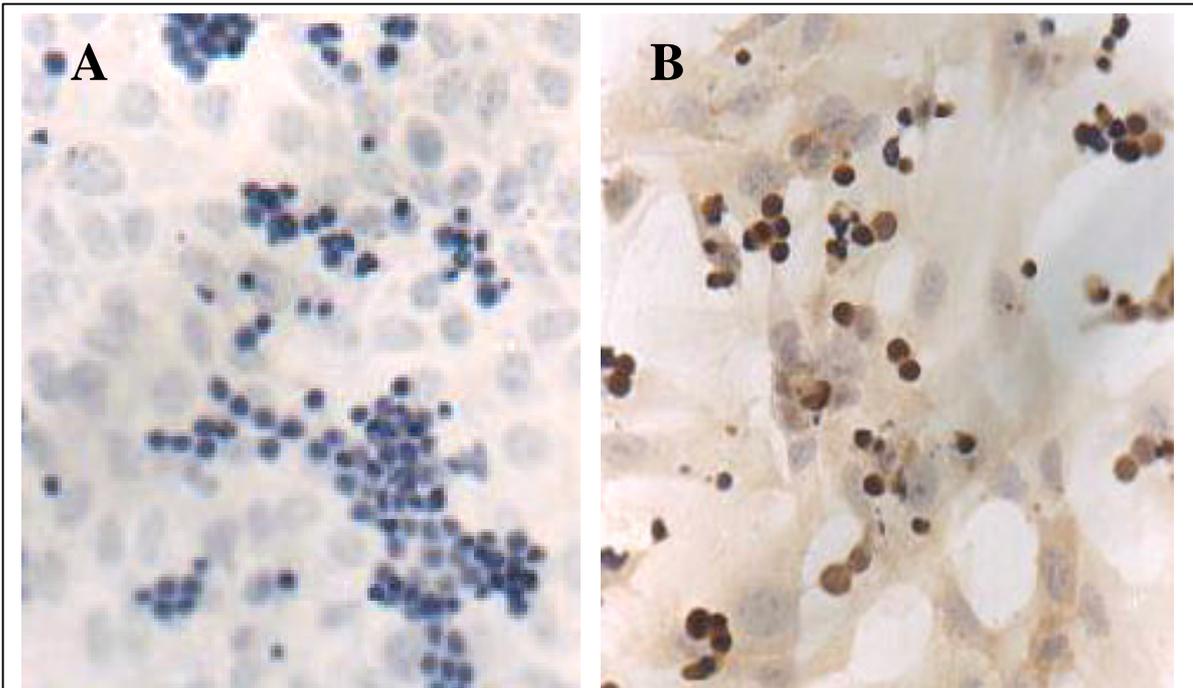


ABB. 12. Immunzytochemische Färbung von mIL-1ra in Maus Sertoli-Zell/ Keimzell-Cokulturen.

Die Zellen wurden isoliert und ohne hypotonische Schockbehandlung vorinkubiert. (B; Immunzytochemie mit Hämatoxylin-Gegenfärbung; x400). Negative Kontrollen wurden parallel ohne mIL-1ra-Antikörper durchgeführt (A; mit Hämatoxylin-Gegenfärbung; x400).

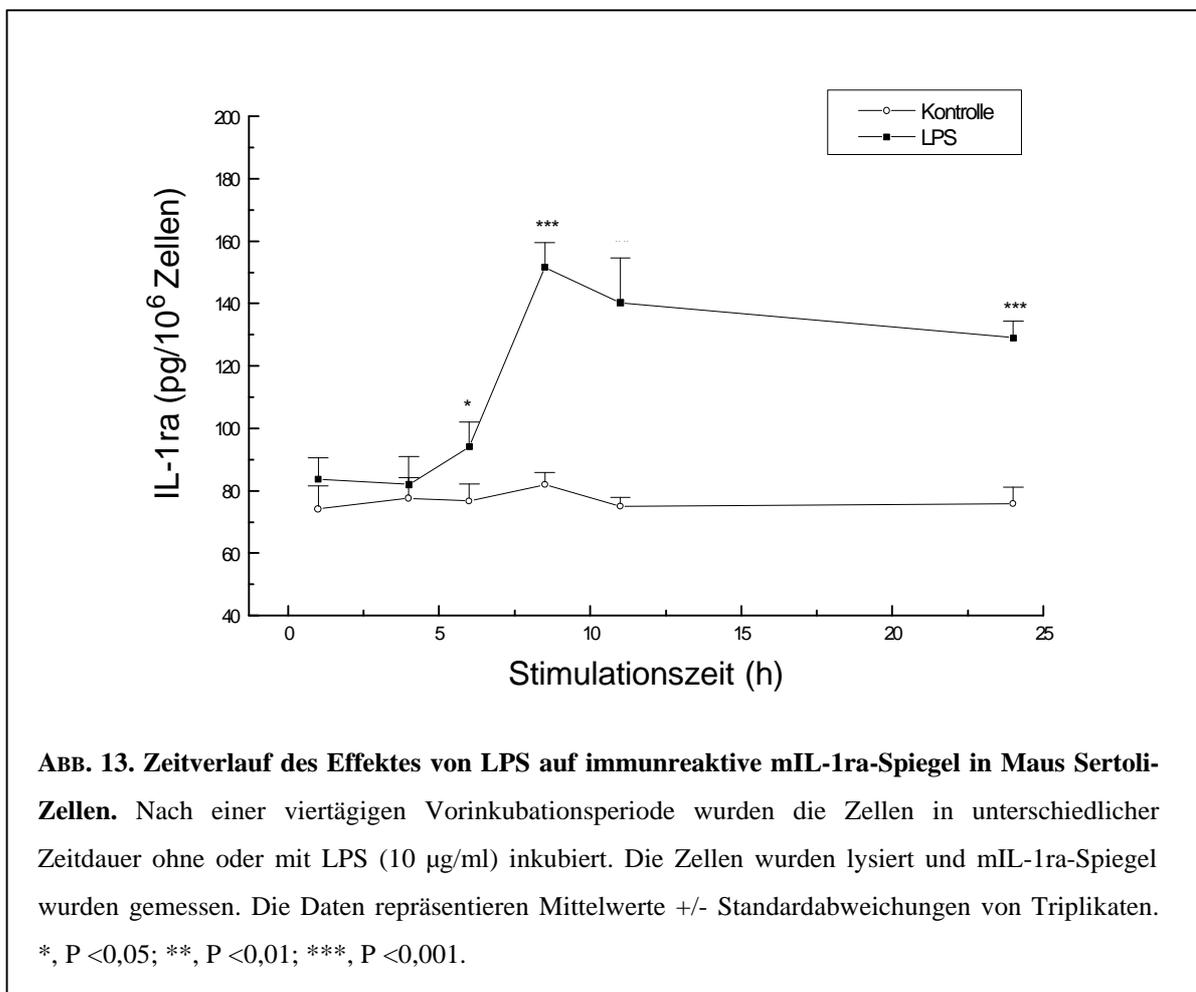
3.2.3.2 ELISA

Auswertungen durch ELISA demonstrierten die Kapazität von Maus Sertoli-Zellen, immunreaktives IL-1ra zu produzieren. Basale IL-1ra-Produktionsspiegel in Sertoli-Zellen variierten zwischen 75 und 85 pg/10⁶ Zellen. Die Inkubation von Sertoli-Zellkulturen mit 10 µg/ml LPS resultierte in signifikant (P <0,001) erhöhter intrazellulärer IL-1ra Produktion innerhalb von 6 bis 8 h Stimulationszeit. Die beobachteten Konzentrationen von immunreaktivem IL-1ra hatten sich 8 h nach Stimulationsbeginn verdoppelt und blieben nach 24 h im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen circa 1,6-fach erhöht (Abb. 13).

Keine immunologische Aktivität von IL-1ra, gemessen durch ELISA, wurde in unstimulierten oder stimulierten Sertoli-Zellmedia (Überständen) beobachtet. Unstimulierte und stimulierte Sertoli-Zellmedia, welche um den Faktor 5 konzentriert wurden (entsprechend 11,8 x10⁶ Zellen/ml), zeigten gleichfalls keine immunologisch nachweisbare IL-1ra-Aktivität.

Nach Inkubation von Maus Sertoli-Zellkulturen mit 5 IU/ml rekombinantem FSH zeigten sich signifikant ($P < 0,001$) erhöhte intrazelluläre IL-1ra-Spiegel (Abb. 14). Die Steigerung der intrazellulären IL-1ra Produktion als Antwort auf FSH wurde 5-10 h nach Stimulationsbeginn beobachtet, entsprechend derjenigen Steigerung der intrazellulären IL-1ra Produktion als Antwort auf LPS. 10 h nach Stimulation mit FSH lagen immunreaktive IL-1ra-Spiegel bei $168 \pm 11,3 \text{ pg}/10^6$ Zellen, es war keine weitere signifikante Steigerung 24 h nach Stimulationsbeginn zu beobachten. Geringere Konzentrationen an FSH im Kulturmedium offenbarten einen dosisabhängigen Effekt von FSH auf die IL-1ra-Produktion in Maus Sertoli-Zellen ($P < 0,05$) (Abb. 14).

Eine signifikant erhöhte IL-1ra Produktion war auch zu beobachten, wenn Sertoli-Zellkulturen IL-1 exponiert waren, wobei IL-1 alpha eine höhere Potenz als IL-1 beta zeigte ($P < 0,05$) (Abb. 15).



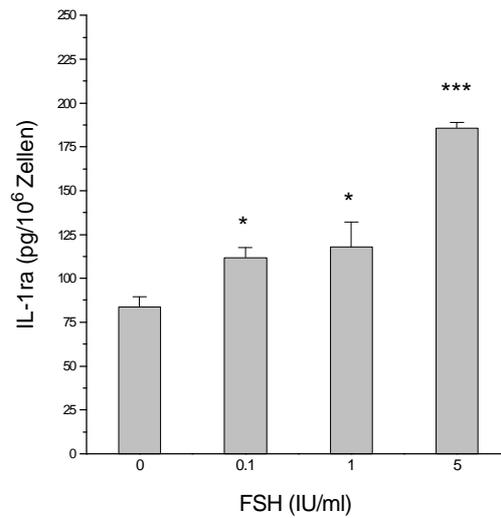


ABB. 14. Effekt von FSH auf immunreaktive intrazelluläre mIL-1ra Produktion von Maus Sertoli-Zellen. Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von FSH inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mIL-1ra-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Triplikaten. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001.

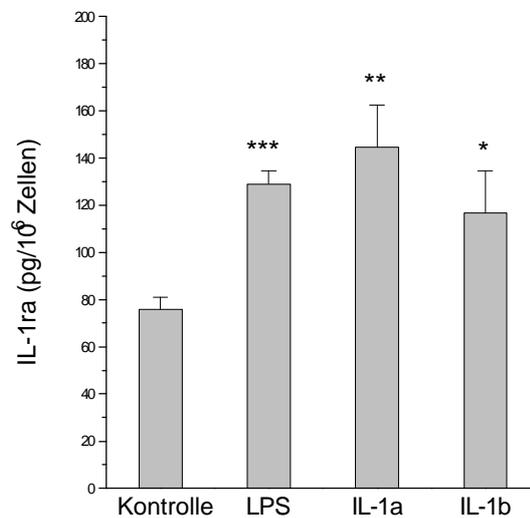


ABB. 15. Effekte von LPS und IL-1 auf immunreaktive intrazelluläre mIL-1ra Produktion von Maus Sertoli-Zellen. Die Zellen wurden nach regulärem Protokoll isoliert und vorinkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen 24 h ohne oder mit LPS (10 µg/ml), rhIL-1 alpha (IL-1a; 50 U/ml) oder rhIL-1 beta (IL-1b; 50 U/ml) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mIL-1ra-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Triplikaten. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001.

3.3 *IL-1 mRNA Expression in Sertoli-Zellen*

RT-PCR-Experimente mit den in Kapitel 2.8 aufgeführten Primer-Paaren demonstrierten die Präsenz von IL-1 alpha mRNA, IL-1 beta mRNA und IL-1ra mRNA. Die amplifizierten cDNA-Fragmente zeigten die erwarteten Längen nach Auftrennung im 2%-igen Agarose-Gel (mIL-1 alpha: 220 bp; mIL-1 beta: 204 bp; mIL-1ra: 346 bp). Die Integrität der RNA-Präparationen und der synthetisierten cDNA's wurde durch die Amplifizierung der beta-Actin-kodierenden cDNA-Fragmente (237 bp) in Milz-Leukozytenkulturen und Sertoli-Zellkulturen, demonstriert. Kontroll-RT-PCRs, durchgeführt ohne Reverse Transcriptase (RT-) oder ohne cDNA (cDNA-), waren immer negativ (Abb. 16).

Um die Identität der amplifizierten cDNA-Fragmente zu überprüfen, wurden Analysen der DNA-Fragmentlängen nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Der spezifische enzymatische Verdau des amplifizierten und gereinigten mIL-1 alpha PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuklease ScrF I generierte zwei DNA-Fragmente (150 und 70 bp), der Verdau des mIL-1 beta PCR-Produktes mit ScrF I generierte drei DNA-Fragmente (135, 44 und 25 bp; letztere sind auf UV-Photografien nur schwach/ nicht zu erkennen). Das gereinigte mIL-1ra PCR-Produkt zeigte nach Behandlung mit der Restriktionsendonuklease EcoR V zwei DNA-Fragmente (233 und 113 bp). Die Längen der generierten DNA-Fragmente entsprachen den aus Restriktionskarten-Analysen erwarteten Schnittprodukt-Längen (Abb. 17).

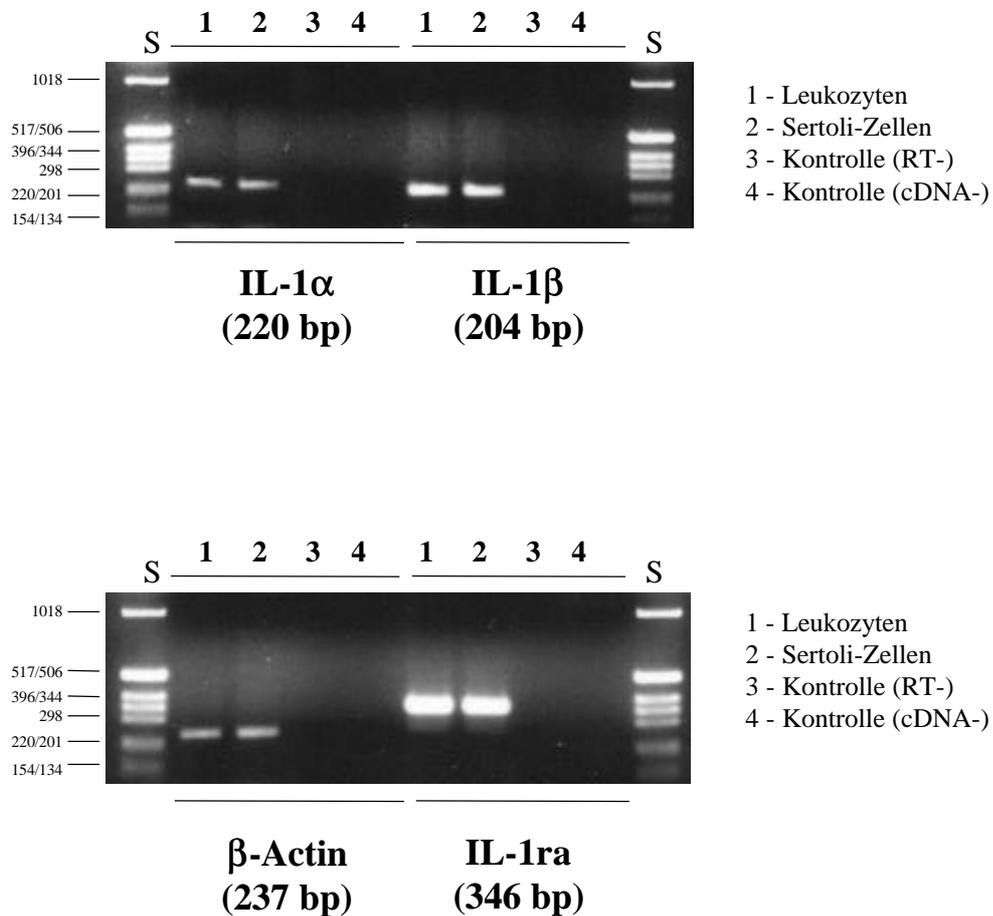


ABB. 16. Expression von mIL-1 alpha, mIL-1 beta, mIL-1ra und mβ-Actin mRNA in Maus Sertoli-Zellkulturen (2).

Nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode inklusive hypotonischem Schock wurden die Zellen mehrfach gewaschen, Gesamt-RNA wurde extrahiert und mRNA-Expression durch RT-PCR-Analyse untersucht. Aktivierte Milz-Leukozytenkulturen wurden als Positivkontrolle verwendet (1). RT-PCR, durchgeführt entweder ohne M-MLV-Reverse Transcriptase (3) oder ohne cDNA (4) repräsentieren negative Kontrollen. PCR-Produkte und DNA-Fragmentlängen-Standard (S) wurden in 2%-igem Agarose-Gel inklusive Ethidiumbromid der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

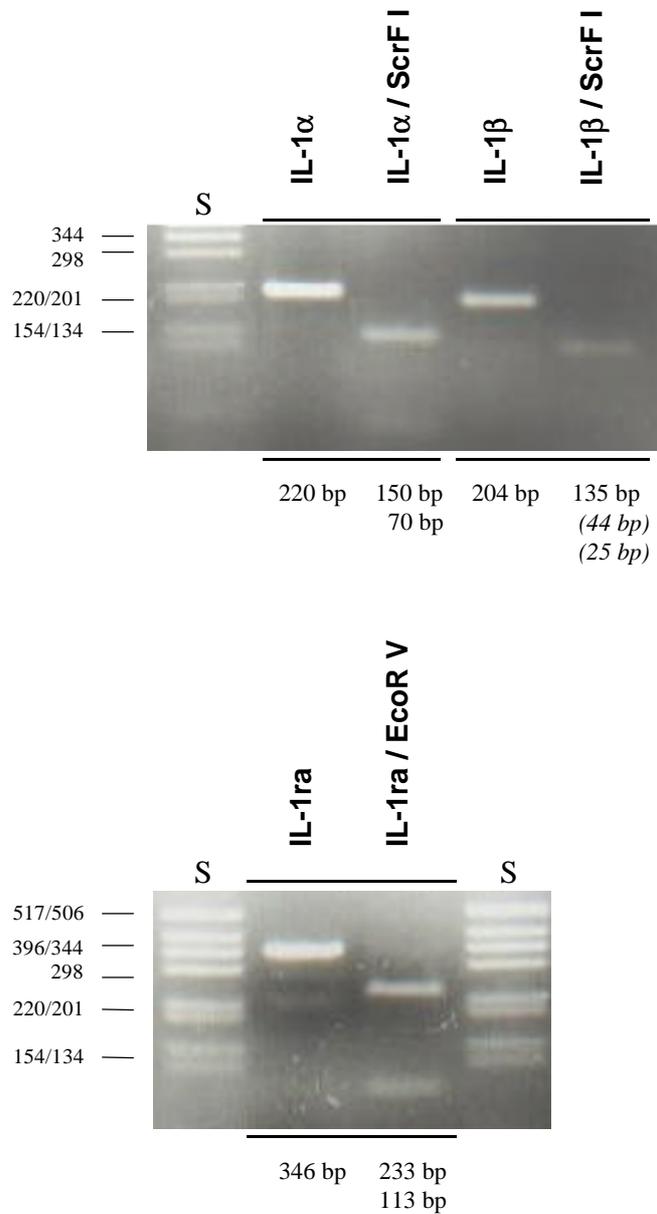


ABB. 17. Restriktionsfragmentlängen-Analyse von mIL-1 alpha, mIL-1 beta und mIL-1ra PCR-Produkten, aus Maus Sertoli-Zellkulturen amplifiziert.

mIL-1 alpha, geschnitten durch ScrF I, generierte zwei Fragmente von 150 und 70 bp; mIL-1 beta, geschnitten durch ScrF I, generierte drei Fragmente von 135, 44 und 25 bp; mIL-1ra, geschnitten durch EcoR V, generierte zwei Fragmente von 233 und 113 bp. Unverdaute, verdaute PCR-Produkte und DNA-Fragmentlängen-Standard (S) wurden in 4%-igem Agarose-Gel mit Ethidiumbromid der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

3.4 Effekte von IL-1 und FSH auf die Transferrin-Sekretion von Sertoli-Zellkulturen

Basale Transferrin-Spiegel in Überständen von Maus Sertoli-Zellkulturen lagen zwischen 5 und 10 ng/10⁶ Zellen nach 5 h, zwischen 15 und 19 ng/10⁶ Zellen nach 10 h und zwischen 21 und 28 ng/10⁶ Zellen nach 24 h. Wurden Sertoli-Zellkulturen mit rekombinantem humanen IL-1 alpha inkubiert, zeigten sich nach 10 h signifikant erhöhte Transferrin-Konzentrationen in den Überständen, die Steigerung betrug circa 22% im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (P <0,01). Der beobachtete Effekt war 24 h nach Stimulationsbeginn stärker ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt waren IL-1 alpha-stimulierte Transferrin-Spiegel in Maus Sertoli-Zellkulturen um 77% höher als entsprechende unstimulierte Kontrollen (P <0,001). Auf die Transferrin-Sekretion war kein signifikanter Effekt zu beobachten, wenn Maus Sertoli-Zellkulturen rekombinantem humanen IL-1 beta exponiert waren (Abb. 18).

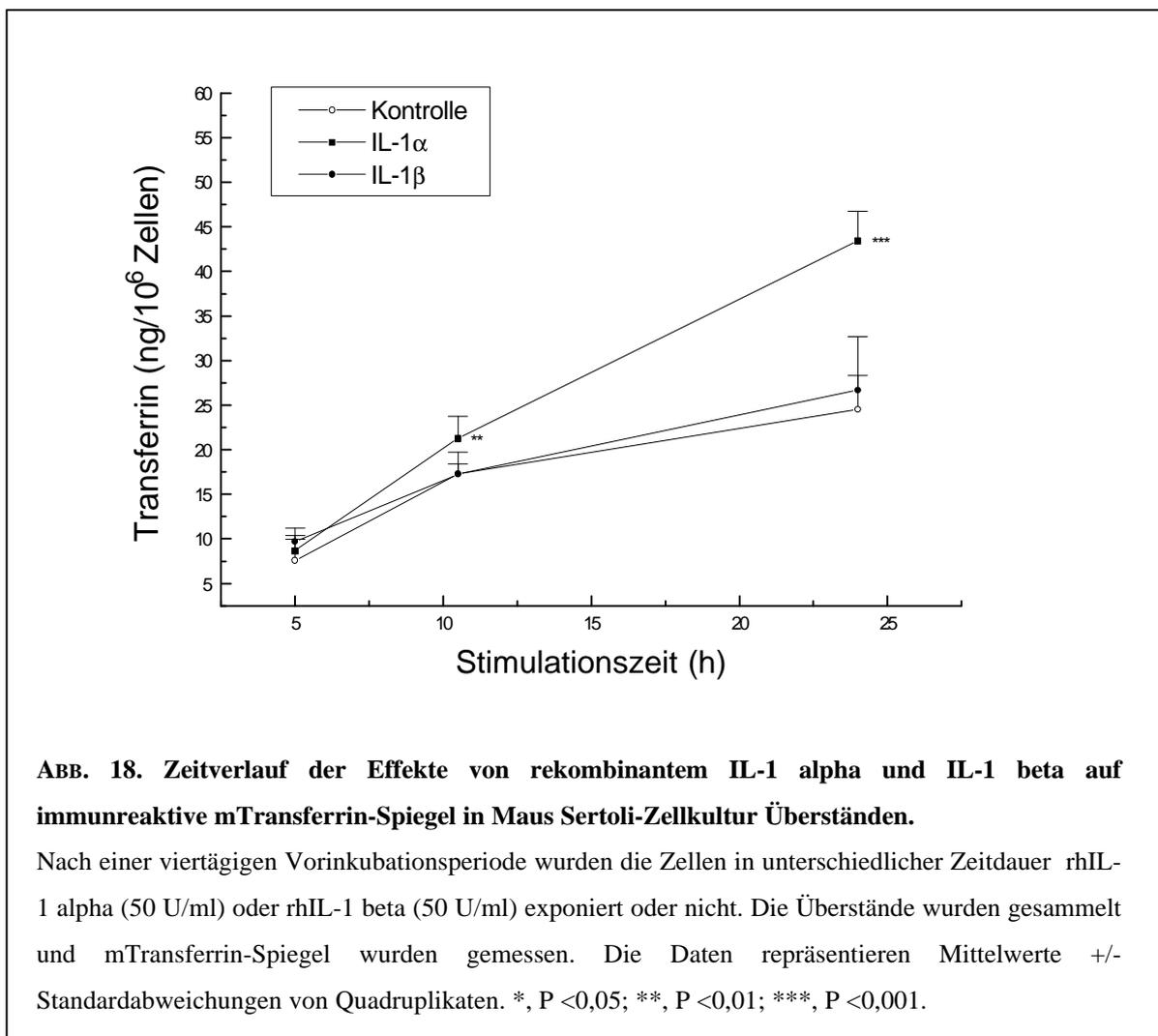


ABB. 18. Zeitverlauf der Effekte von rekombinantem IL-1 alpha und IL-1 beta auf immunreaktive mTransferrin-Spiegel in Maus Sertoli-Zellkultur Überständen.

Nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode wurden die Zellen in unterschiedlicher Zeitdauer rhIL-1 alpha (50 U/ml) oder rhIL-1 beta (50 U/ml) exponiert oder nicht. Die Überstände wurden gesammelt und mTransferrin-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Quadruplikaten. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001.

In Sertoli-Zellkulturen, deren Media rekombinantes IL-1ra (5 µg/ml) zugesetzt worden war, ließ sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied der Transferrinkonzentrationen in Überständen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen nachweisen.

Rekombinantes humanes FSH zeigte einen stimulierenden Effekt auf die Transferrinsekretion in Maus Sertoli-Zellkulturen. Keine synergistischen oder additiven Effekte waren zwischen FSH (5 IU/ml) und IL-1 alpha auf die Transferrinsekretion in Maus Sertoli-Zellkulturen zu beobachten (Abb. 19).

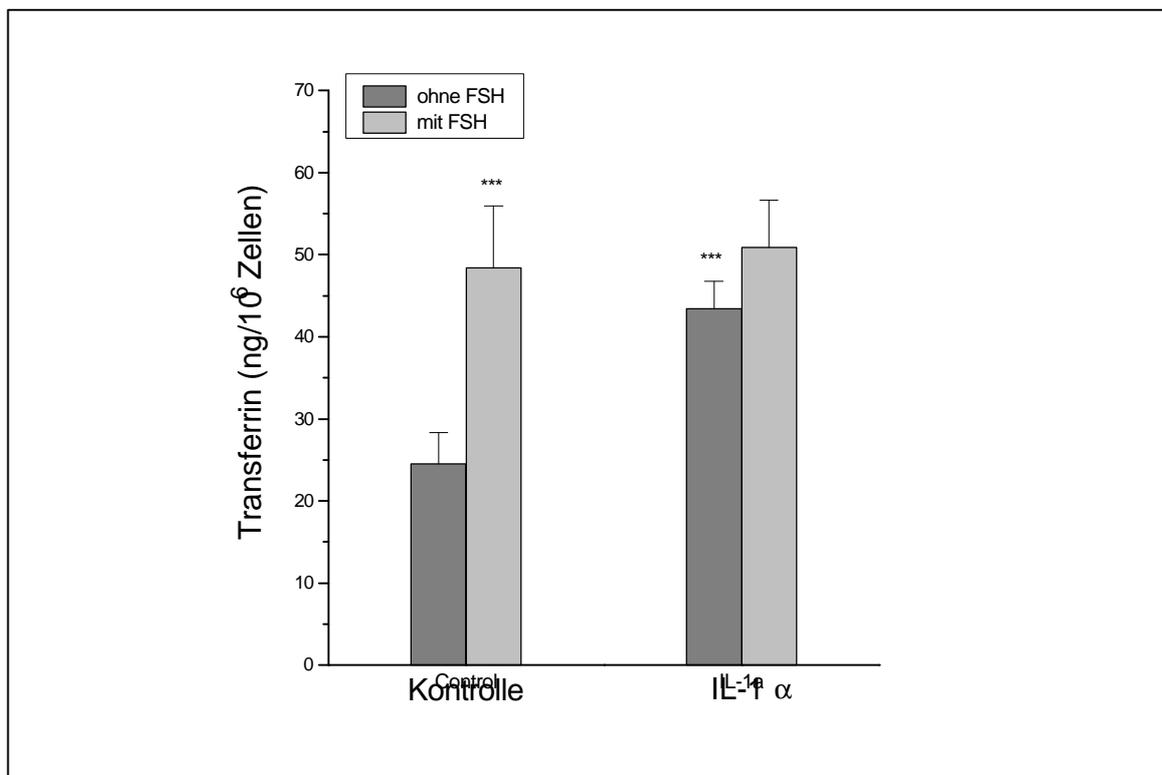


ABB. 19. Effekte von rekombinantem FSH und IL-1 alpha auf immunreaktive mTransferrin-Spiegel in Maus Sertoli-Zellkultur Überständen.

Nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode wurden die Zellen ohne oder mit rhFSH (5 IU/ml), rhIL-1 alpha (50 U/ml) oder beiden 24 h inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und mTransferrin-Spiegel wurden gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichungen von Quadruplikaten. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001 im Vergleich zu entsprechendem Kontrollwert (,mit FSH' jeweils zu ,ohne FSH'; ,mit IL-1 alpha ohne FSH' zu ,Kontrolle ohne FSH').

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine standardisierte Prozedur zur Isolation, Reinigung und Kultur präpubertaler Maus Sertoli-Zellen vorgestellt.

Mittels immunhistochemischer Färbungen, Enzymimmunoassays und RT-PCR wurde demonstriert, dass präpubertale Maus Sertoli-Zellen *in vitro* IL-1 alpha, nicht jedoch IL-1 beta produzieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass präpubertale Sertoli-Zellen eine testikuläre Quelle des IL-1ra darstellen. Die Produktion von IL-1 alpha und IL-1ra in Sertoli-Zellen ließ sich jeweils durch verschiedene Substanzen in jeweils unterschiedlicher Kinetik stimulieren.

In einem weiteren Schritt konnte demonstriert werden, dass Mitglieder der IL-1-Familie stimulatorische Wirkung auf die Transferrin-Produktion in präpubertalen Sertoli-Zellen ausüben. Dabei entsprachen IL-1 alpha-induzierte Transferrin-Spiegel in Sertoli-Zellmedia denen FSH-stimulierter Sertoli-Zellmedia.

4.1 *Maus Sertoli-Zellen in vitro*

Wie die Analyse mittels verschiedener histologischer und histochemischer lichtmikroskopischer Techniken zeigte, sind die in dieser Studie isolierten Sertoli-Zellkulturen nahezu frei von Kontamination sowohl interstitieller Zellen, namentlich testikulärer Makrophagen und Leydig-Zellen, als auch peritubulärer und spermatogener Zellen.

Die erzielte Reinheit der Maus Sertoli-Zellkultur-Präparationen könnte einen Vorteil der gewählten Spezies im Vergleich zu ähnlichen Prozeduren mit Ratten oder menschlichem Gewebe darstellen. Ein Vergleich ist in Tab.1 dargestellt.

TAB. 1. Erzielte Reinheiten diverser Prozeduren zur Isolation von Sertoli-Zellen.*

Referenz	Spezies	Reinheit	PZ (%)	KZ (%)	LZ (%)
Lipshultz 1982	Mensch	> 95%	n.v.	n.v.	n.v.
Oonk 1985	Ratte	> 94%	n.v.	n.v.	n.v.
Toebusch 1989	Ratte	n.v.	< 0,5	1-3	n.v.
Syed 1993	Ratte	n.v.	< 7	ca. 2	n.v.
Le Magueresse-Batt. 1995	Ratte	ca. 95%	< 5	n.v.	n.v.
Cudicini 1997 a	Mensch	n.v.	n.v.	1-5	3-6
Cudicini 1997 b	Ratte	n.v.	ca. 0,5	ca. 2	n.v.
Wang 1998	Ratte	n.v.	n.v.	< 2	n.v.
Zeyse 2000 **	Maus	n.v.	< 0,5	< 1	< 1

* Die aufgeführten Studien verwendeten sequentiellen enzymatischen Verdau mittels Hyaluronidase, Collagenase, Trypsin oder Kombinationen dieser Enzyme. Variabel sind Reihenfolge und Auswahl der durchgeführten Enzymschritte sowie die Spezies des verwendeten Hodengewebes. Aufgeführt wurden lediglich veröffentlichte Daten, soweit vorliegend (n.v.: nicht vorliegend).

Reinheit: Anzahl der Sertoli-Zellen pro Anzahl aller Zellen in Kultur; **PZ:** Kontamination durch peritubuläre Zellen; **KZ:** Kontamination durch Keimzellen; **LZ:** Kontamination durch Leydig-Zellen.

** Teile der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg bereits im Jahre 2000 vorveröffentlicht (Zeyse 2000a, Zeyse 2000b).

4.2 *IL-1 und die Sertoli-Zelle - Produktion*

Der Agonist

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass präpubertale Sertoli-Zellen in der Lage sind, IL-1 alpha, nicht jedoch IL-1 beta zu produzieren. Es wurde gezeigt, dass die IL-1 alpha-Produktion in präpubertalen Sertoli-Zellen durch rekombinantes IL-1 alpha und beta stimuliert werden kann. Des weiteren offenbaren die vorgelegten Daten, dass Sertoli-Zellen in der Lage sind, IL-1 alpha in spezifischen Zeit- und Konzentrations-Mustern nach Behandlung mit diversen Stimuli zu produzieren. LPS induziert maximale intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel in Sertoli-Zellen kurz (2 Stunden) nachdem es hinzugefügt worden ist. IL-1 alpha und beta zeigen als Stimuli maximale Effekte im Vergleich zu LPS wesentlich später (8 Stunden). Diese

Daten legen nahe, dass LPS und IL-1 verschiedene Rollen in der Szenerie der autokrinen IL-1-Signale der Sertoli-Zelle innehaben. Die Tatsache, dass LPS die IL-1 alpha-Produktion in Sertoli-Zellen vor IL-1 (alpha/ beta) induziert und die abrupte anschließende Deklination der IL-1 alpha-Spiegel könnten indizieren, dass die von LPS induzierte intrazelluläre Signaltransduktions-Kaskade unabhängig von entsprechenden IL-1 alpha-induzierten Strecken abläuft.

IL-1 alpha ist in erster Linie ein intrazellulärer Regulator, der von den meisten ihn produzierenden Zellen nicht sezerniert wird (Roux-Lombard 1998). Reife Sertoli-Zellen sind in der Lage, IL-1 alpha zu produzieren und zu sezernieren (Jegou 1995). Es ist bekannt, dass in Sertoli-Zellen, die aus Ratten-Hoden isoliert wurden, die Menge des sezernierten IL-1 alpha während des Prozesses der sexuellen Reifung stetig zunimmt (Jegou 1995). Während Sertoli-Zellen, die aus 45-Tage alten Ratten isoliert wurden, doppelt soviel IL-1 alpha sezernieren wie vergleichbare Kulturen, welche von 35-Tage alten Tieren präpariert wurden, findet sich keine nachweisbare Spur von IL-1 alpha in Sertoli-Zell Medium von präpubertalen (20-Tage alten) Tieren (Jegou 1995). Die im Rahmen dieser Arbeit am murinen System durchgeführten Experimente bestätigen die von Jegou et al. (1995) festgestellten Sachverhalte, dass unreife Sertoli-Zellen IL-1 alpha produzieren, nicht jedoch sezernieren. Daher müssen mögliche Wirkorte des von Sertoli-Zellen produzierten IL-1 alpha in der Zelle selbst, als autokriner Regulator, vermutet werden.

Ein geringer Teil des Pro-IL-1 alpha kann, nachdem eine Konjugation mit Myristyl-Gruppen stattgefunden hat, auch auf Zelloberflächen der produzierenden Zellen nachgewiesen werden (Stevenson 1993). Die Möglichkeit, dass IL-1 alpha, welches in Sertoli-Zellen produziert worden ist, auf direkt benachbarte Keimzellen einwirkt, sollte aus diesem Grunde miteinbezogen werden.

Es wurde von Cudicini et al. (1997a) beschrieben, dass die Produktion und Sekretion von IL-1 alpha in reifen humanen Sertoli-Zellen durch FSH stimuliert werden kann, wenn entsprechende Zellkulturen einer hypotonischen Schockbehandlung unterzogen wurden. Demgegenüber zeigen die Daten der vorliegenden Studie keine Hinweise, die die von Cudicini et al. 1997 erhobenen Befunde diesbezüglich unterstützen. Es bleibt aus diesem Grunde zu untersuchen, ob die Sensitivität gegenüber FSH in bezug auf die IL-1 alpha-Produktion in Sertoli-Zellen dem Regulierungsprozess der sexuellen Reifung unterliegt.

Obwohl die hochsensitive Methode der RT-PCR den Nachweis von IL-1 beta mRNA in primären präpubertalen Sertoli-Zellkulturen erlaubt, ließ sich kein translatiertes Protein durch immunzytochemische Zellfärbung oder Enzymimmunoassay nachweisen. Entsprechender Sachverhalt, der bereits von Cudicini et al. (1997a) beschrieben wurde, könnte durch Regulationsprozesse innerhalb der Translation erklärt werden. Da Pro-IL-1 beta als Vorstufe des sezernierten IL-1 beta im Gegensatz zum Pro-IL-1 alpha weder biologisch aktiv ist noch immunologisch durch die verwendeten Antikörper nachgewiesen werden kann, sollten Herauf- und Herabregulationen des IL-1 beta-konvertierenden Enzyms (ICE) als entscheidender Faktor der tatsächlich stattgefundenen IL-1 beta-Produktion genauso berücksichtigt werden.

Der Antagonist

Auf der Suche nach einer testikulären Quelle des IL-1 Rezeptor-Antagonisten konnte die vorliegende Arbeit erstmalig demonstrieren, dass Sertoli-Zellen die Kapazität innehaben, IL-1ra konstitutiv in hohen Mengen zu produzieren, dass dessen Produktion innerhalb von 6 bis 8 Stunden Stimulationszeit signifikant erhöht wird und bis zu 16 Stunden auf stimulierten Werten verbleibt. Induktoren, die im Rahmen dieser Studie identifiziert werden konnten, sind LPS, FSH und IL-1 alpha und beta.

Die vorliegenden Daten zeigen keinen Hinweis darauf, dass IL-1ra aus präpubertalen Maus Sertoli-Zellen sezerniert wird.

IL-1ra bindet an denselben Rezeptor wie IL-1 alpha und beta ohne eine reguläre Signal-Transduktion zu induzieren (Dinarello 1996). Die Wirkung des IL-1ra ist inhibitorisch. Mögliche Funktionen dieses Moleküls liegen in der Modulation der IL-1-agonistischen Signale innerhalb des Hodens.

Anders als die IL-1 alpha- und beta-Gene besitzt das IL-1ra-Gen eine Signal-Sequenz, die es dem primären Peptid erlaubt, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) translatiert zu werden. Nach Reifung im Golgi-Komplex wird es mittels Vesikeln aus der Zelle sezerniert (Arend 1993). Es ist interessant zu beobachten, dass keine Spur von IL-1ra in Kultur-Media unreifer Maus Sertoli-Zellen in dieser Studie nachzuweisen war. Des weiteren konnten keine Verdichtungen des IL-1ra an ER und Golgi-Apparat in immunzytochemischen Anfärbungen beobachtet werden. Es ist daher naheliegend zu spekulieren, dass IL-1ra mRNA in unreifen

Sertoli-Zellen einem alternativen Splicing unterzogen wird. Solch eine Splicing-Variante, erstmalig von Haskill et al. (1991) beschrieben, modifiziert die Sequenz, welche das Signal-Peptid kodiert, und führt zu einem IL-1ra-Protein, das intrazellulär verbleibt, demzufolge icIL-1ra genannt. Dieses Phänomen wurde bislang in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und Keratinozyten nachgewiesen (Haskill 1991, Hammerberg 1992). Dieselben Zellen konnten als Produzenten großer Mengen intrazellulären IL-1 alpha identifiziert werden - ein weiterer Befund, der kongruent ist mit den Ergebnissen unreifer Maus Sertoli-Zellen dieser Arbeit. Demzufolge könnte die Rolle des IL-1ra in präpubertalen Sertoli-Zellen beschränkt sein auf intrazelluläre, autokrine Funktionen, wie das Antagonisieren und Modifizieren parakriner oder autokriner IL-1-Signale.

Es wurde bereits in dieser Arbeit angeführt, dass Sertoli-Zellen während des Prozesses ihrer sexuellen Reifung die Menge des sezernierten IL-1 alpha stetig erhöhen (Jegou 1995). Die Mechanismen, die zu den beobachteten Änderungen im Sekretions-Muster führen, sind bisher noch nicht verstanden. Um zu prüfen, ob auch IL-1ra zu dem Zeitpunkt der sexuellen Reife des Hodens aus Sertoli-Zellen sezerniert wird, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Experimente der vorgelegten Arbeit zeigen, dass präpubertale Sertoli-Zellen sowohl IL-1-agonistisch als auch antagonistisch wirkende Moleküle produzieren. Es ist nun interessant, Daten der IL-1 alpha-Produktion und Daten der IL-1ra-Produktion aus derselben Zellherkunft in Verbindung zu bringen, um die resultierende Aktivität des IL-1 ermitteln zu können. Aus diesem Grunde wurden intrazelluläre IL-1 alpha-Spiegel mit intrazellulären Spiegeln von IL-1ra zu bestimmten Zeitpunkten nach Zugabe von LPS miteinander verglichen. Aus den vorgelegten Daten ist zu entnehmen, dass die Menge intrazellulären IL-1 alpha einen Gipfel zwei Stunden nach Stimulation mit LPS aufweist. Zwischen 7 und 9 Stunden nach Stimulation erreicht die intrazelluläre IL-1ra-Produktion ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt sind die intrazellulären Konzentrationen von IL-1 alpha bereits auf ein Viertel des initial beobachteten Gipfels gesunken. Das Verhältnis des intrazellulären IL-1ra zu IL-1 alpha zu diesem Zeitpunkt wird auf etwa 8-10 geschätzt (Abb. 20). Wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, ist rekombinantes IL-1ra in der Lage, die Effekte von IL-1 alpha auf Sertoli-Zellen komplett rückgängig zu machen. Lin et al. (1991) führten eine ähnliche Serie von Experimenten zu den Effekten von rekombinantem IL-1ra auf die IL-1 beta-inhibierte Steroidogenese in Leydig-Zellen durch. Es wurde dort demonstriert, dass ein IL-1ra/ IL-1 beta-Quotient von 8-10

ausreichend sein kann, um 80% der Effekte eines IL-1-Agonisten umzukehren (Lin 1991). Die Verbindung dieser Ergebnisse lässt Spekulationen zu, dass die Aktionen von IL-1 alpha in der präpubertalen Sertoli-Zelle auf ein 4-5 Stunden dauerndes „Fenster IL-1-agonistischer Aktivität“ (Abb. 20) limitiert sind.

An diesem Punkt wäre es tatsächlich interessant zu untersuchen, ob die IL-1ra-Produktion wie die IL-6-Produktion in Sertoli-Zellen durch IL-1 alpha getriggert und vermittelt wird, da IL-1ra und IL-6 ähnliche Zeit-Kinetiken präsentieren (siehe auch: Syed 1995).

Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass IL-1 alpha und IL-1ra eine mögliche Rolle in der autokrinen Regulation der Sertoli-Zellfunktionen innehaben. Beide, IL-1 alpha und IL-1ra sollten im Zusammenhang und in ihren spezifischen zeitlichen Expressions-Mustern gesehen werden, um Aussagen über resultierende IL-1-agonistische Effekte treffen zu können.

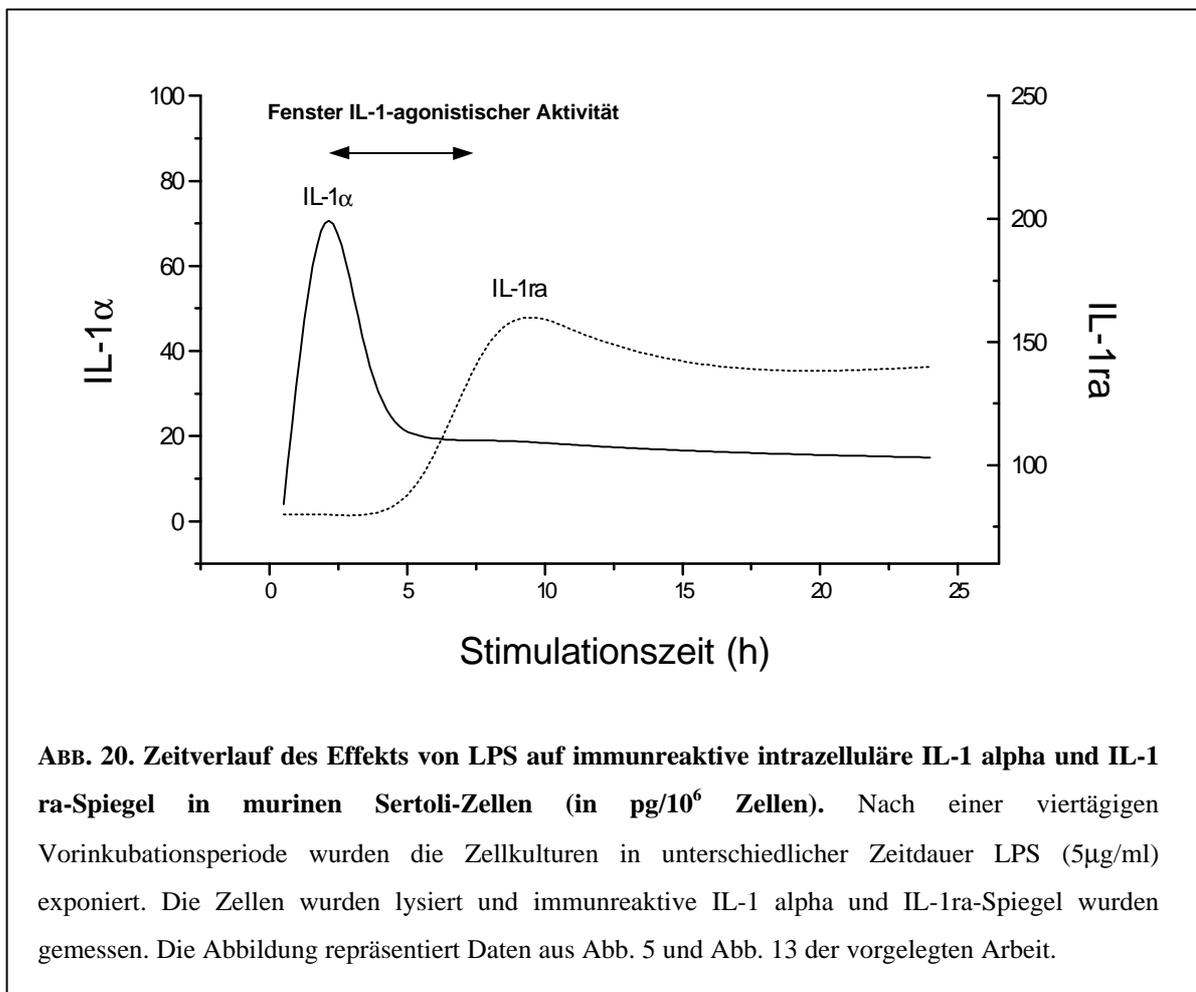


ABB. 20. Zeitverlauf des Effekts von LPS auf immunreaktive intrazelluläre IL-1 alpha und IL-1 ra-Spiegel in murinen Sertoli-Zellen (in $\text{pg}/10^6$ Zellen). Nach einer viertägigen Vorinkubationsperiode wurden die Zellkulturen in unterschiedlicher Zeitdauer LPS ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) exponiert. Die Zellen wurden lysiert und immunreaktive IL-1 alpha und IL-1ra-Spiegel wurden gemessen. Die Abbildung repräsentiert Daten aus Abb. 5 und Abb. 13 der vorgelegten Arbeit.

4.3 *IL-1 und die Sertoli-Zelle - Interaktion*

Das Vorhandensein von IL-1-Rezeptoren in der Zellmembran von Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und Peritubulären Zellen wurde 1997 von Gomez et al. demonstriert. IL-1 ist in der Lage, die Blut-Hoden-Schranke zu passieren (Banks 1992), Keimzellen des adluminalen Kompartiments, Sertoli-Zellen und interstitielle Zellen können demzufolge mittels IL-1 interagieren.

Es bestehen zahlreiche Hinweise, dass die Sertoli-Zellaktivität, welche durch Transferrin- oder Inhibin-Sekretion oder der intrazellulären Aromatase-Aktivität quantifiziert werden kann (Skinner 1991), durch IL-1 beeinflusst wird. Durch Ermittlung der Transferrin-Spiegel in primären Sertoli-Zellkulturen kann festgestellt werden, dass Kulturmedium aus aktivierten humanen mononukleären Zellkulturen weit höhere Potenz besitzt, unreife Sertoli-Zellen zu aktivieren, als eine Kombination aus FSH, Testosteron, Insulin und Retinol (Hoeben 1996). Ein Teil der beobachteten stimulatorischen Wirkung wurde bislang dem IL-1 beta zugeschrieben (Hoeben 1996, Hoeben 1997).

Die vorliegende Arbeit konnte demonstrieren, dass die Alpha-Form des IL-1 in etwa gleicher Potenz wie FSH die Transferrin-Sekretion in primären präpubertalen Sertoli-Zellkulturen zu stimulieren in der Lage ist. Dabei ließen sich weder additive noch synergistische Effekte zwischen FSH und IL-1 alpha nachweisen. Hinweise auf eine stimulatorische Wirkung des IL-1 beta auf die Transferrin-Sekretion unreifer Sertoli-Zellen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Transferrin stellt ein wichtiges Protein des Eisen-Metabolismus der Zelle dar. Zellen benötigen Eisen als Bausteine der Cytochrome, die die Atmungskette aufrecht erhalten. Transferrin ist ein Eisen-bindendes Serum-Protein, welches den Transport des Eisens zur Zielzelle bewerkstelligt. Primärer Produktionsort des Transferrin im menschlichen Körper ist die Leber (Stryer 1994). Die Bereitstellung des Transferrins innerhalb des adluminalen Kompartiments der Tubuli seminiferi ist Aufgabe der Sertoli-Zelle. Aufgabe des von Sertoli-Zellen sezernierten Transferrins ist der Transport jeglichen benötigten Eisens von der Sertoli-Zelle zur Keimzelle (Skinner 1991).

Es lässt sich bemerken, dass die Transferrin-Sekretion in Sertoli-Zellkulturen erst nach circa 24 Stunden deutliche Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Werten aufweist. Dies entspricht der Rolle der Sertoli-Zelle, in erster Linie für ein stabiles interzelluläres Milieu im Tubulus seminiferus zu sorgen. Rapide Änderungen der Transferrin-Konzentration im Tubulus seminiferus durch stark wechselnde Sertoli-Zellaktivität könnten den Prozeß der Spermato- und Spermiogenese empfindlich stören.

Die vorliegenden Daten indizieren, dass IL-1 in ähnlicher Potenz wie FSH stimulatorisch auf präpubertale Maus Sertoli-Zellen einwirkt. Durch Veränderung der Transferrin-Sekretion ist IL-1 alpha in der Lage, in den Stoffwechsel der unreifen Keimzelle einzugreifen und somit indirekt den Prozeß der Spermatogenese zu beeinflussen.

Eine direkte Wirkung von IL-1 auf Keimzellen wurde 1991 von Parvinen et al. demonstriert. Es wurde gezeigt, dass IL-1 alpha die meiotische DNA-Synthese in Spermatogonien stimuliert (Parvinen 1991, Söder 1991).

Werden erwachsene Sertoli-Zellkulturen mit IL-1 alpha behandelt, lässt sich, im Gegensatz zu entsprechenden Kulturen aus präpubertalen Tieren, ein Rückgang der basalen Transferrin-Sekretion im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen beobachten (Karzai 1992). Im Zusammenhang mit der beobachteten Steigerung der IL-1 alpha-Sekretion aus Sertoli-Zellen während der sexuellen Reifung (Jegou 1995; siehe oben) findet sich hier ein weiterer Hinweis darauf, dass IL-1 an den Regulationsprozessen der sexuellen Reifung beteiligt ist.

Unterschiede der Reaktion unreifer und reifer Leydig-Zellen gegenüber IL-1 bieten Anhalte zu der Vermutung, dass sich die Richtung des regulatorischen Effekts von IL-1 während der sexuellen Reifung umkehrt. Während IL-1 beta in der Lage ist, die basale Testosteron-Produktion in unreifen Leydig-Zellen zu stimulieren, zeigt es keine signifikanten Einflüsse auf die basale Testosteron-Produktion reifer Leydig-Zellen (Sun 1993, Verhoeven 1988). Vielmehr ließ sich beobachten, dass IL-1 beta eine deutliche Potenz besitzt, die steroidogene Aktivität hCG-stimulierter reifer Leydig-Zellen dosis- und zeitabhängig zu inhibieren (Lin 1991, Mauduit 1992).

Die Mechanismen, die eine vermehrte IL-1 alpha-Produktion in Sertoli-Zellen während der sexuellen Reifung induzieren und im Zuge derselben die Wirkung des IL-1 auf Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen umkehren, sind derzeit unbekannt.

Die vorliegende Arbeit liefert zahlreiche Hinweise, dass IL-1 an der Regulation physiologischer und pathologischer Prozesse im Hoden beteiligt ist. Sowohl IL-1-agonistische Moleküle als auch IL-1-Antagonisten, deren Existenz innerhalb des Hodens im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert wurden, sollten in ihren spezifischen zeitlichen Expressions-Mustern einzeln und miteinander kombiniert betrachtet werden, um den Einfluss des IL-1-Systems auf die männliche Reproduktionsfähigkeit beurteilen zu können.

Die aktuelle Datenlage lässt Behauptungen zu, dass Mitglieder der IL-1-Familie an diversen Streckenabschnitten der endokrinen, parakrinen und autokrinen Achsen zwischen Hypothalamus, Hypophyse, interstitiellen und tubulären testikulären Zellen regulatorisch intervenieren (siehe auch Kap. 1.4; Afane 1998, Bonavera 1993, Calkins 1988, Gomez 1997, Hales 1992, Hoeben 1996, Hoeben 1997, Kalra 1990, Karzai 1992, Khan 1991, Khan 1992, Lin 1991, Lin 1998, Lunenfeld 1999, Mauduit 1992, Mauduit 1998, Rivier 1989, Rivier 1990, Sun 1993, Turnbull 1997, Verhoeven 1988).

Die Möglichkeit besteht nun zu rekonstruieren, wie infektiöse Agentien indirekt und direkt auf die Mechanismen der Reproduktion einwirken. Dabei sind nicht nur Spermatogenese und Spermio-genese, auch über Leydig-Zellen, Hypophyse und Hypothalamus vermittelte psychoneuro-endokrine Reaktionsmuster als Hauptangriffspunkte der IL-1-vermittelten Effekte in Betrachtung zu ziehen.

Die aktuellen Daten ermöglichen einen weiteren Einblick in die physiologischen Regulationsmechanismen der männlichen Fortpflanzungsfähigkeit vor und nach der Pubertät, indem die Szenerie der Signalvermittlung intratestikulär und entlang der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse nun um die Dimension der Interleukin-1-Familie erweitert werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Studien haben angedeutet, dass das IL-1-System eine Rolle in den Zell-Zell-Interaktionen im Hoden innehat. Um eine testikuläre zelluläre Quelle von IL-1 zu identifizieren, wurden Sertoli-Zellen aus präpubertalen Mäusen isoliert, gereinigt und in vitro kultiviert. Es wurde untersucht, ob murine Sertoli-Zellen in der Lage sind, IL-1 (alpha, beta und ra) zu produzieren. Um einen möglichen Effekt des IL-1-Systems auf präpubertale Sertoli-Zellen nachzuweisen, wurde die Transferrin-Sekretion in Sertoli-Zellkulturen in Abhängigkeit von IL-1 bestimmt. Immunhistochemische Färbungen, Enzymimmunoassays und RT-PCR wurden als Nachweismethoden gewählt.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass präpubertale Maus Sertoli-Zellen in vitro IL-1 alpha, nicht jedoch IL-1 beta produzieren. Die Produktion von IL-1 alpha in Sertoli-Zellen kann durch LPS, IL-1 alpha und beta, nicht jedoch durch FSH, in jeweils unterschiedlicher Kinetik stimuliert werden. Dabei ließ sich demonstrieren, dass der stimulatorische Effekt von IL-1 alpha auf die IL-1 alpha-Produktion der Sertoli-Zellen durch Zugabe von IL-1ra zu Sertoli-Zell-Media vollständig reversibel ist.

Des weiteren zeigte diese Arbeit, dass präpubertale Sertoli-Zellen eine testikuläre Quelle des IL-1ra darstellen. IL-1ra-Spiegel in Sertoli-Zellkulturen konnten sowohl durch FSH, LPS, IL-1 alpha, als auch durch IL-1 beta in präpubertalen Sertoli-Zellen gesteigert werden.

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass weder IL-1 alpha noch IL-1ra aus präpubertalen Maus Sertoli-Zellen sezerniert werden.

Allein IL-1 alpha, nicht jedoch IL-1 beta oder IL-1ra, zeigte stimulatorische Effekte auf die Transferrin-Produktion in präpubertalen Sertoli-Zellen. Die IL-1 alpha-induzierten Transferrin-Spiegel entsprachen denen FSH-stimulierter Sertoli-Zellen. FSH und IL-1 alpha zeigten weder additive noch synergistische Effekte auf die Transferrin-Produktion in Sertoli-Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können helfen, die Aktivität von IL-1 im Hoden zu evaluieren und die Rolle dieses bislang als immunmodulatorisch bekanntem Peptid im männlichen Reifungsprozess zu bestimmen.

6 LITERATURANGABEN

Afane M, Dubost JJ, Sauvezie B, Issoual D, Dosgilbert A, Grizard G, Boucher D (1998) Modulation of Leydig cell testosterone production by secretory products of macrophages. *Andrologia* 30: 71-78

Arend W (1993) Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54:167-226

Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7907-7911

Banks WA, Kastin AJ (1992) Human Interleukin-1 alpha crosses the blood-testis barriers of the mouse. *J Androl* 13:254-259

Bonavera JJ, Kalra SP, Kalra PS (1993) Mode of action of interleukin-1 in suppression of pituitary LH release in castrated male rats. *Brain Res* 612:1-8

Calkins JH, Sigel MM, Nankin HR, Lin T (1988) Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* 123:1605-1610

Calkins JH, Guo H, Sigel MM, Lin T (1990) Differential effects of recombinant Interleukin-1 alpha and beta on Leydig cell function. *Bioch Biophys Res Comm* 167:548-553

Carter DB, Deibel MR jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, Mc Ewan RN (1990) Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344:633-638

Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jegou B (1997 a) Human Leydig Cells and Sertoli Cells are Producers of Interleukin-1 and -6. *J Clin Endocr Met* 82:1426-1433

Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jegou B (1997 b) Vectorial production of Interleukin-1 and Interleukin-6 by rat Sertoli cells cultured in Dual chamber compartment system. *Endocrinology* 1638:2863-2870

-
- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P (1987) Interleukin-1 induces interleukin-1. I. Induction of circulating interleukin-1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139:1902-1910
- Dinarello CA (1994) The Interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8:1314
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147
- Dym M, Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326
- Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343:341-346
- Gerard N, Syed V, Bardin W, Genetet N, Jegou B (1991) Sertoli cells are the site of interleukin-1 alpha synthesis in rat testis. *Mol Cel Endocrinol* 82:R13-R16
- Gomez E, Morel G, Cavalier A, Lienard MO, Haour F, Courtens JL, Jegou B (1997) Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes. *Biol Reprod* 56:1513-1526
- Griswold MD (1995) Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Repr* 52:211-216
- Gunsalus GL, Musto NA, Bardin W (1978) Immunoassay of androgen-binding protein in blood: a new approach for study of the seminiferous tubule. *Science* 200:65-66
- Hagenäs L, Ritzen EM, Plöen L, Hansson V, French FS, Nayfeh SN (1975) Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cel Endocrinol* 2:339-350
- Hales DB (1992) IL-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17-alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* 131:2165-2172
- Hammerberg C, Arend WP, Fisher GJ, Chan LS, Berger AE, Haskill JS, Voorhees JJ, Cooper KD (1992) Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *J Clin Invest* 90:571-583

-
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343:336-340
- Haskill S, Martin G, van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe CJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S (1991) cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin-1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3681-3685
- Haugen TB, Landmark BF, Josefsen GM, Hansson V, Hogset A (1994) The mature form of interleukin-1 alpha is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. *Mol Cell Endocrinol* 105:R19-R23
- Hoeben E, Van-Damme J, Put W, Swinnen JV, Verhoeven G (1996) Cytokines derived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 137:514-521
- Hoeben E, Wuyts A, Proost P, Van-Damme J, Verhoeven G (1997) Identification of IL-6 as one of the important cytokines responsible for the ability of mononuclear cells to stimulate Sertoli cells functions. *Mol Cell Endocrinol* 132:149-160
- Huggenvik J, Griswold MD (1981) Retinol binding protein in rat testicular cells. *J Reprod Fertil* 61:403-408
- Huleihel M, Levy A, Lunenfeld E, Horowitz S, Potashnik G, Glezerman M (1997) Distinct expression of cytokines and mitogenic inhibitory factors in semen of fertile and infertile men. *Am J Reprod Immunol* 37:304-309
- Huleihel M, Lunenfeld E, Horowitz S, Levy A, Potashnik G, Mazor M, Glezerman M (2000) Involvement of serum and LPS in the production of interleukin-1- and interleukin-6-like molecules by human sperm cells. *Am J Reprod Immunol* 43:41-46
- Jegou B, Cudicini C, Gomez E, Stephan JP (1995) Interleukin-1, interleukin-6 and the germ cell-Sertoli cell cross-talk. *Reprod Fertil Dev* 7:723-730
- Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH (1996) Histologie. Vierte, korrigierte und aktualisierte Auflage. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*

-
- Jutte NHPM, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HJ (1983) FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 68:219-226
- Kalra PS, Sahu A, Kalra SP (1990) Interleukin-1 inhibits the ovarian steroid-induced LH surge and release of hypothalamic LH-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 126:2145-2152
- Karzai AW, Wright WW (1992) Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cycl.protein-2/cathepsin L by mature rat Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 47:823-831
- Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S (1995) Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Repr* 53:1407-1416
- Khan S, Soder O, Syed V, Gustafsson K, Lindh M, Ritzen EM (1987) The rat testis produces large amounts of interleukin-1-like factor. *Int J Androl* 10:494-503
- Khan SA, Schmidt K, Hallin P, DiPauli R, Ge Geyter Ch, Nieschlag E (1988) Human testis cytosol and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleukin-1-like factors. *Mol Cell Endocrinol* 58:221-230
- Khan SA, Nieschlag E (1991) Interleukin-1 inhibits follitropin aromatase activity in immature rat Sertoli-cells in vitro. *Mol Cel Endocrinol* 75:1-7
- Khan SA, Khan SJ, Dorrington JH (1992) Interleukin-1 stimulates DNA synthesis in immature rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology* 131:1853-1857
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Benahmed M (1995) In vitro regulation of rat Sertoli cell inhibin messenger RNA levels by transforming growth factor-beta 1 and tumor necrosis factor alpha. *J Endocrinol* 146:501-508
- Lin T, Guo H, Calkins JH, Wang D, Chi R (1991) Recombinant monocyte derived Interleukin-1receptor antagonist reverses inhibitory effects of Interleukin-1 on Leydig cell steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 78:205-209
- Lin T, Wang D, Stocco DM (1998) Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis without affecting steroidogenic acute regulatory protein mRNA or protein levels. *J Endocrinol* 156:461-467

-
- Lipshultz LI, Murthy L, Tindall DJ (1982) Characterization of human Sertoli cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 56:228-237
- Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YC, Collier K, Semionow R, Chua AO, Mizel SB (1984) Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature* 312:458-462
- Lunenfeld E, Zeyse D, Huleihel M (1999) Cytokines in the human testis, sperm cells, and semen. *Ass Reprod* 9:157-165.
- Maddocks S, Parvinen M, Soeder O, Punnonen J, Pollanen P (1990) Regulation of the testis. *J Repr Immunol* 18:33-50
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNA's. *Nature* 315:641-647
- Mauduit C, Chauvin MA, Hartmann DJ (1992) Interleukin-1 alpha as a potent inhibitor of gonadotropin action in porcine Leydig cells: sites of action. *Biol Reprod* 46:1119-1126
- Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin M-A, Stocco DM, Louisot P, Benahmed M (1998) Tumor-Necrosis-Factor alpha inhibits Leydig cell steroidogenesis through a decrease in Steroidogenic Acute Regulatory protein expression. *Endocrinology* 139:2863-2864
- Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* 262:2941-2944
- Murzin AG, Lesk AM, Chothia C (1992) Beta-Trefoil folding patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukin-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J Mol Biol* 223:531-543
- Nanduri VB, Hulmes JD, Pan YC, Kilian PL, Stern AS (1991) The role of arginine residues in interleukin-1 receptor binding. *Biochem Biophys Acta* 1118:25-35
- Oonk R, Grootegoed JA, van der Molen HJ (1985) Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 42:39-48

-
- Parvinen M, Söder O, Mali P, Fröysa B, Ritzen M (1991) In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* 129:1614-1620
- Pelletier RM, Friend DS (1983) The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am J Anat* 168:213-219
- Pescovitz OH, Srivastava CH, Breyer PR, Monts BA (1994) Paracrine control of Spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 5:126
- Peter K (1899) Die Bedeutung der Nährzelle im Hoden. *Arch Mikrosk Anat* 53:180
- Poellänen P, von Euler M, Soeder O (1990) Testicular immunoregulatory factors. *J Repr Immunol* 18:51-76
- Re F, Sironi M, Muzio M, Matteucci C, Introna M, Orlando S, Penton-Rol G, Dower SK, Sims JE, Colotta F, Mantovani A (1996) Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. *J Exp Med* 183:1841-1850
- Rivier C, Vale W (1989) In the rat, interleukin-1 alpha acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. *Endocrinology* 124:2105-2109
- Rivier C, Vale W (1990) Cytokines act within the brain to inhibit LH secretion in the rat. *Endocrinology* 127:849-856
- Roux-Lombard P (1998) The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw* 9:565-567
- Schumacher M, Schafer G, Holstein AF, Hilz H (1978) Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. *FEBS Lett* 91:333
- Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1997) Anatomie. Siebte, korrigierte Auflage. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*
- Sertoli E (1865) Über die Existenz von speziell verzweigten Zellen in den Tubuli seminiferi des menschlichen Hoden. (Ital.) *Morgagni* 7:31

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK (1993) Interleukin-1 signaling occurs exclusively via type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6155-6159

Skinner MK, Griswold MD (1980) Sertoli-cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. *J Biol Chem* 255:9523-9525

Skinner MK, Griswold MD (1983) Sertoli-cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biol Reprod* 28:1225-1229

Skinner MK, Fritz IB (1985) Testicular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:114-118

Skinner MK (1991) Cell-cell-interactions in the testis. *Endocr Rev* 12:45-77

Soeder O, Syed V, Callard GV, Toppari J, Pollanen P, Parvinen M, Froysa D, Ritzen EM (1991) Production and secretion of an interleukin-1-like factor is stage-dependent and correlates with spermatogonial DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Int J Androl* 14:223-231

Stephan JP, Syed V, Jegou B (1997) Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 134:109-118

Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH (1993) The 31 kDa precursor of interleukin-1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16 kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7245-7249

Stocco DM, Clark BJ (1996) Role of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51:197-205

Stryer L (1994) Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York*

Sun XR, Hedger MP, Risbridger GP (1993) The effect of testicular macrophages and interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under in vitro maintenance conditions. *Endocrinology* 132: 186-192

Syed V, Stephan J-P, Gerard N, Legrand A, Parvinen M, Bardin CW, Jegou J (1995) Residual bodies activate Sertoli cell Interleukin-1a (IL-1a) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway. *Endocrinology* 136:3070-3078

-
- Sylvester SR, Skinner MK, Griswold MD (1984) A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biol Reprod* 31:1087-1101.
- Toebusch AMW, Robertson DM, Klaij IA, De Jong FH, Grootegoed JA (1989) Effects of FSH and testosterone on highly purified rat Sertoli cells: inhibin alpha-subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH but not by testosterone. *J Endocr* 122:757-762
- Turnbull AV, Rivier C (1997) Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology* 138:1008-1013
- Verhoeven G, Cailleau J, Van-Damme J, Billiau A (1988) Interleukin-1 stimulates steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 57:51-60
- Wang DL, Nagpal ML, Calkins JH (1991) Interleukin-1 beta induces Interleukin-1 alpha messenger RNA expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* 129:2862-2866
- Wang JE, Josefsen GM, Hansson V, Haugen TB (1998) Residual bodies and IL-1alpha stimulate expression of mRNA for IL-1alpha and IL-1 receptor type I in cultured rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 137:139-144
- Warner SJ, Auger KR, Libby P (1987) Interleukin-1 induces interleukin-1. II. Recombinant human interleukin-1 induces interleukin-1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 139:1911-1917
- Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley WM, Shows TB (1986) Interleukin-1 gene assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 5:77-85
- Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN (1983) Three dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am J Anat* 167:163-179

Weitzmann MN, Savage N (1992) Nuclear internalisation and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1/receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1166-1171

Zeyse D, Lunenfeld E, Beck M, Prinsloo I, Huleihel M (2000 a) Interleukin-1 receptor antagonist is produced by Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* 141:1521-1527

Zeyse D, Lunenfeld E, Beck M, Prinsloo I, Huleihel M (2000 b) Induction of Interleukin-1 alpha production in murine Sertoli-cells by Interleukin-1. *Biol Reprod* 62:1291-1296

7 ABKÜRZUNGEN

Aqua dest	Doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithioreit
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
(x) g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormone
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IU	Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	Messenger-RNA
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mol wt	molekulare Masse
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
rh	rekombinant human
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
TAE	Tris-gepufferte Salzlösung
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

DANKSAGUNG

Sehr herzlich und an erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Freimut A. Leidenberger, der diese Arbeit ermöglicht hat. Durch seine Unterstützung konnte dieses Unternehmen in einem unkonventionellem Rahmen stattfinden.

Sehr verbunden bin ich Herrn Prof. Eitan Lunenfeld, MD, und Herrn Dr. Mahmoud Huleihel, PhD, für die persönliche, herzliche und intensive wissenschaftliche Betreuung während meines Aufenthaltes an der Ben-Gurion-University, Israel.

Herrn Dr. Amal Mukhopadhyay danke ich für die fachkundige und interessierte Begleitung von Beginn der experimentellen Planung an bis zum letzten Satz der vorliegenden Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an die Herren Dr. Isebrand Prinsloo und Dr. Jacov Gopas und seiner `Arbeitsgruppe Onkologische Molekularbiologie´ der Ben-Gurion-University für kritisches Mitdenken, technische Unterstützung und ein allzeit offenes Ohr, nicht nur in wissenschaftlichen Dingen.

Herrn Prof. Charles Dinarello, MD, danke ich für einen entscheidenden Hinweis an entscheidender Stelle.

Unentbehrlich waren die vielen praktischen Tips und die freundliche Vermittlung technischer Fähigkeiten von Frau Monika Kistler, unentbehrlich waren auch die vielen hilfreichen Hinweise und die Korrektur dieser Arbeit von Herrn Dr. Hans-Joachim Paust.

Meinen Eltern Hannelore und Alfred Zeyse und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die finanzielle Ermöglichung, diese Arbeit an der Ben-Gurion-University durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Melanie, sie war jederzeit dabei.

LEBENS LAUF

Daniel Zeyse

geboren am 19. April 1974 in Hamburg

verheiratet

SCHULISCHER WERDEGANG

1980-84	Grundschule in Hamburg
1984-90	Albert-Schweitzer-Gymnasium Hamburg, Musikalischer Zweig
1990-91	Schüleraustausch an der Findlay-High-School, Ohio, USA
1991-93	Albert-Schweitzer-Gymnasium Hamburg, Abitur

ZIVILDIENTST

1993-94	Albertinen-Krankenhaus Hamburg, krankenpflegerische Tätigkeit in der Anästhesie-Abteilung
---------	--

STUDIUM

1994-96	Vorklinisches Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg
1996	Ärztliche Vorprüfung
1996-2000	Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1997	1. Staatsexamen
2000	2. Staatsexamen
2001	3. Staatsexamen
1998-99	Forschungsaufenthalt an der Ben-Gurion-University Beer-Sheva, Israel Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
2000-01	Praktisches Jahr am Westküstenklinikum Heide, Lehrkrankenhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Wahlfach Neurochirurgie

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.