

Die Rolle von EHD1 in der Spermatogenese – Untersuchungen zur Auswirkung der p.R398W- Mutation auf die männliche Fertilität

DISSERTATION



ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Katrin Meindl
aus Regensburg, Deutschland

im Jahr 2023

Promotionsgesuch eingereicht am: 06.04.2023

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herrn Prof. Dr. Richard Warth

Prüfungsausschuss:
Frau Prof. Dr. Christine Ziegler (Vorsitzende)
Herr Prof. Dr. Richard Warth (1. Gutachter)
Herr Prof. Dr. Christian Wetzel (2. Gutachter)
Herr Prof. Dr. Oliver Bosch (3. Gutachter)

Unterschrift

Katrin Meindl

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	7
1.1 Klinische Fallbeschreibung und Identifikation einer neuartigen Mutation im <i>Ehd1</i>-Gen	7
1.2 Grundlagen der Endozytose	9
1.3 Die EHD-Proteinfamilie	11
1.3.1 Struktureller Aufbau der EHD-Proteine	11
1.3.2 Rolle der EHD's in der Endozytose	12
1.3.3 EHD1 – Funktion und Bedeutung	14
1.4 Auswirkungen der p.R398W-Mutation auf die Ehd1-Funktion	17
1.5 Infertilität – ein globales Problem	19
1.5.1 Ätiologie und Definition	19
1.5.2 Männliche Infertilität	19
1.5.3 Bedeutung der Genetik für die männliche Infertilität	20
1.6 Die Spermatogenese - Grundlagen zur Keimzellreifung des Mannes	20
1.6.1 Makroskopische und zelluläre Architektur der männlichen Fortpflanzungsorgane	20
1.6.2 Der Spermatogenese-Zyklus	22
1.7 Schlüsselprozesse während der Spermiogenese	28
1.7.1 Akrosomenbiogenese	28
1.7.2 Kernformung & Kernkondensation	31
1.7.3 Spermienschwanz	32
1.8 Die Blut-Hoden-Schranke – eine spezielle Struktur der Sertoli-Zellen	35
1.9 Hormonelle Steuerung der Spermatogenese	35
1.10 Schicksal der Spermatozoa: Reifung und Speicherung im Nebenhoden	37
2. ZIELSETZUNGEN	39
3. MATERIAL UND METHODEN	41

3.1	Material	41
3.1.1	Geräte	41
3.1.2	Verbrauchsmaterial	41
3.1.3	Chemikalien & Enzyme	42
3.1.4	Kits	44
3.1.5	Software	44
3.1.6	Antikörper	44
3.1.7	Puffer & Lösungen	45
3.2	Methoden	47
3.2.1	Versuchstiere	47
3.2.1.1	Verwendete Mauslinien	47
3.2.1.2	Isolierung genomischer DNA (gDNA)	47
3.2.1.3	Geschlechtsbestimmung bei jungen Mäusen mittels PCR	47
3.2.1.4	Genotypisierung von <i>Ehd1</i> ^{R398W/R398W} -Mäusen	48
3.2.2	Fixierung des Hodengewebes	50
3.2.3	Aufbereitung von Bouin-fixiertem Gewebe, Paraffineinbettung und Schnittherstellung	50
3.2.4	Histologische Färbungen - Hämatoxylin/Eosin (H.E.)	51
3.2.5	Histologische Färbungen - Periodsäure-Schiff (PAS)	51
3.2.6	Immunfluoreszenzfärbungen	52
3.2.7	Richardson-Färbung von Epon-eingebetteten Semi-Dünnschnitten	53
3.2.8	Mikroskopie	53
3.2.9	Isolation reifer Spermien aus der Cauda epididymidis	54
3.2.10	Vorbereitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie	54
3.2.11	In-situ-Hybridisierung (RNAScope [®])	54
3.2.12	Zellkultur	55
3.2.12.1	Induzierbares LLC-PK1-Zellmodell	55
3.2.12.2	Immunfluoreszenzfärbung von induzierten LLC-PK1-Zellen	56
3.2.12.3	Mitochondrienfärbung an LLC-PK1-Zellen mittels MitoTracker™ Orange CMTMRos	56
3.2.13	DeadEnd™ Fluorometrisches TUNEL-System (Promega)	57
3.2.14	Statistik	57
4	ERGEBNISSE	58
4.1	Zuchtstatistik	58
4.2	Auswirkungen der <i>Ehd1</i>^{R398W/R398W}-Mutation auf die männlichen Geschlechtsorgane und die Spermato-genese	59
4.2.1	Gewichtsbestimmung von Hoden und Nebenhoden - Präparation von Hoden, Nebenhoden und Seminaldrüsen	59

4.2.2	Histologische Beurteilung der mutationsbedingten Defekte im Spermatogenesezyklus mittels H.E. Färbung _____	60
4.3	Beurteilung der mutationsbedingten Veränderung der Ehd1-Expression _____	63
4.3.1	Abhängigkeit der Ehd1-Expression im Samenepithel vom Spermatogenese-Stadium _____	63
4.3.2	Auswirkungen der Mutation auf die Ehd1-Expression _____	67
4.4	Charakterisierung isolierter Spermien aus der <i>Cauda epididymidis</i> _____	69
4.5	Gewichtsverlauf während der frühen, postnatalen Entwicklung _____	75
4.6	Zeitliche Eingrenzung des Einsetzens mutationsbedingter Beeinträchtigungen der Spermatogenese _____	77
4.7	Ultrastrukturelle Darstellung endozytose-abhängiger Prozesse während der Spermatogenese _____	80
4.7.1	Entwicklung des Akrosoms _____	82
4.7.2	Integrität der Blut-Hoden-Schranke _____	85
4.7.3	Entstehung des Spermischwanzes und akzessorischer, flagellarer Strukturen _____	86
4.8	Untersuchung der Interaktion zwischen Ehd1 und dem Retromer im Hodengewebe _____	89
4.9	Untersuchung der Interaktion zwischen EHD1 und dem Retromer im induzierbaren Zellmodell _____	90
4.10	Untersuchung des Ploiditätsstatus zur Beurteilung der meiotischen Aktivität _____	92
4.11	Ermittlung des Hormonstatus betroffener Patienten und nahe verwandter Personen _____	94
5	DISKUSSION _____	98
5.1	Fallbeschreibung _____	98
5.2	Physiologische Funktion von EHD1 _____	98
5.3	Lokalisation und Expression von Ehd1 im murinen Hoden _____	98
5.4	Beschreibung des Hodenphänotyps bei <i>Ehd1^{R398W/R398W}</i>-Mäusen _____	99
5.4.1	Veränderte Lokalisation im Samenepithel _____	99
5.4.2	Beeinträchtigte Kernkondensation _____	100
5.4.3	Akrosomale Malformationen _____	100
5.4.4	Fehlerhafter Zusammenbau der Spermischwänze _____	100
5.4.5	Beeinträchtigte BTB-Integrität _____	101
5.4.6	Einschränkung der Interaktion mit dem Retromer-Komplex _____	101
5.4.7	Veränderung membranöser Umgestaltungsprozesse _____	102
5.4.8	Verringerte meiotische Aktivität _____	102

5.5	<i>Loss-of-function vs. gain-of-function</i>	102
5.6	Relevanz für die männliche Fertilität beim Menschen	103
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	106
8	EIGENE PUBLIKATIONEN	117
9	KONGRESSBEITRÄGE	117
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
11	ERGÄNZENDES MATERIAL	119
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	132
13	DANKSAGUNG	133

1. Einleitung

1.1 Klinische Fallbeschreibung und Identifikation einer neuartigen Mutation im *Ehd1*-Gen

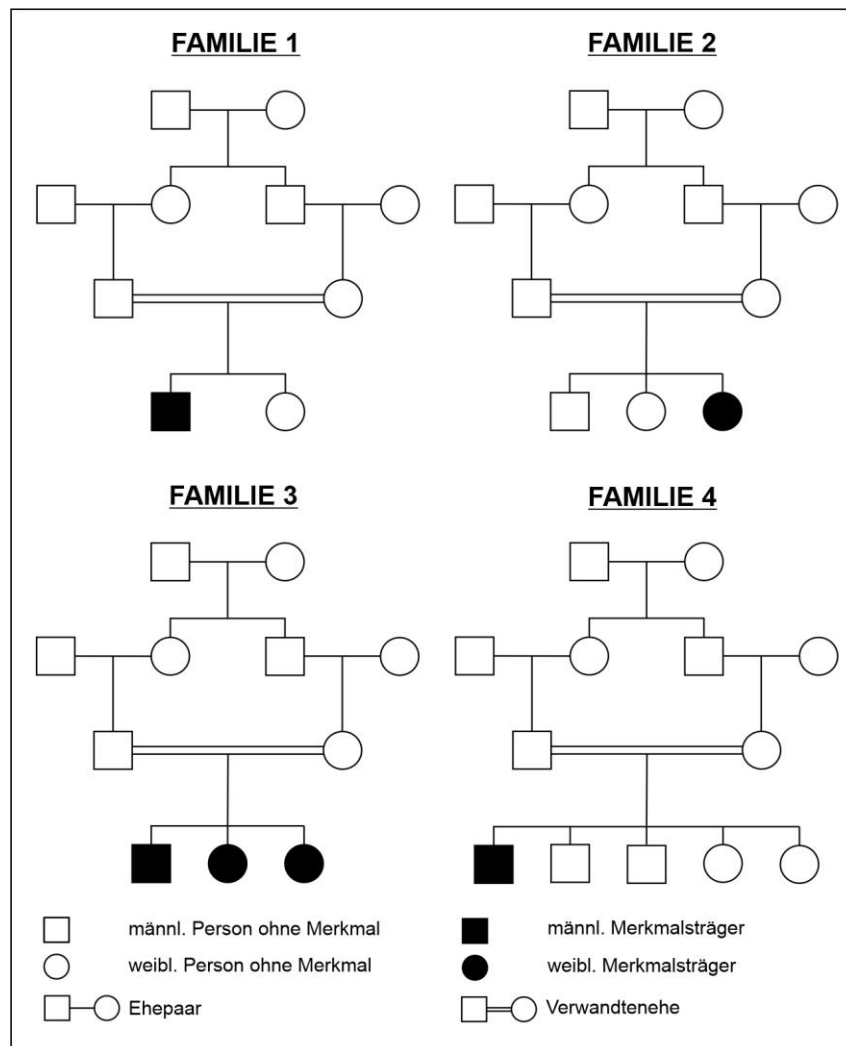


ABBILDUNG 1: Patientenstammbäume. Über Linkage-Analysen und Next-Generation-Sequencing wurde bei sechs Patienten aus vier drusischen Familien eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation im *Ehd1*-Gen festgestellt, die sich klinisch in Form einer ausgeprägten niedermolekularen Proteinurie in Kombination mit einem Hörverlust im Hochfrequenzbereich äußerte.

Diese Arbeit behandelt weiterführende Untersuchungen zu einem Projekt, das bereits vor einigen Jahren in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Robert Kleita und Dr. Naomi Issler (Royal Free Hospital – Centre for Nephrology, London) begonnen wurde. Bei sechs Patienten aus vier drusischen Familien konnte eine neuartige, autosomal-rezessiv vererbte Form einer niedermolekularen (low-molecular weight; LMW), tubulären Proteinurie von 1-2g/Tag festgestellt werden (Abbildung 1). Genauere Untersuchungen dieser Patienten ergaben, dass neben dem Nierenphänotyp zusätzlich ein sensorineuronaler Hörverlust im hohen Frequenzbereich (> 2000 Hz) vorlag. Es handelte sich um drei weibliche, sowie drei männliche

Patienten im Alter zwischen 12 und 32 Jahren, die aus Blutverwandten-Ehen heterozygoter Mutationsträger abstammten. Über Linkage-Analysen und Next-Generation-Sequencing konnte Prof. Kleta mit seinem Team eine missense-Mutation im Gen, das für das *C-terminal Eps15-homology domain containing protein 1 (EHD1)* codiert, identifizieren. Die Mutation konnte im Exon 5 an Stelle c.1192 lokalisiert werden. Dort zeigte die Gensequenz anstelle des Cytosins ein Thymin, was im resultierenden Protein den Austausch der Aminosäure Arginin (Arg, R) durch ein Tryptophan (Try, W) an Stelle p.398 (p.R398W) zur Folge hatte.

Während die Patienten sowohl einen Nieren-, als auch einen Innenohr-Phänotyp aufwiesen, konnte bei einem korrespondierenden *Ehd1*-knockout Mausmodell, bei welchem das *Ehd1*-Gen inaktiviert worden war, zusätzlich ein Hodenphänotyp festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Rainey-Gruppe, die im Jahr 2010 erstmals über ein *Ehd1*-knockout Mausmodell in Verbindung mit männlicher Infertilität berichteten, konnten unsere *Ehd1*^{-/-}-Männchen keine Nachkommen zeugen, während die weiblichen Mäuse in ihrer Fertilität nicht beeinträchtigt waren. Um sich der Situation beim Patienten noch weiter anzunähern, wurde in Ergänzung zum knockout-Mausmodell ein weiteres Mausmodell – ein sog. knockin-Mausmodell - generiert, bei dem das *Ehd1*-Gen auf dieselbe Weise mutiert wurde, wie es bei den Patienten der Fall war. Nach ersten Untersuchungen dieser Mäuse konnte ein übereinstimmender Nieren- und Innenohrphänotyp von Patienten, knockout und homozygoten knockin-Tieren bestätigt werden. Im Hinblick auf den Hodenphänotyp zeigten sich jedoch weitaus gravierendere Veränderungen im Hodenepithel der männlichen, homozygoten *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse im Vergleich zu jenen, denen das *Ehd1*-Gen gänzlich fehlte. Hinweise auf einen humanen Hodenphänotyp unter den männlichen Patienten lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht vor, weshalb hierzu keine Untersuchungen durchgeführt wurden. Eine erneute Kontaktaufnahme zu den Patienten gestaltete sich zudem schwierig, da sie in einer Krisenregion im Nahen Osten leben und aufgrund ihrer Glaubensrichtung sehr privaten und intimen Themen verschlossen gegenüberstehen.

Während der Nierenphänotyp bereits ausgiebig untersucht und von Sara Afonso im Rahmen ihrer Disseration, sowie einer Veröffentlichung publiziert wurde (Issler et al. 2022), lieferten die Auswirkungen der Mutation auf das Hörvermögen und die Fertilität Grundlagen für weitere Forschungsarbeiten.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der mutationsbedingten Infertilität männlicher, homozygoter *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse mit dem Ziel, die Bedeutung von EHD1 während der Spermatogenese, sowie die Auswirkungen einer Funktionsänderung, bzw. eines Funktionsverlustes dieses Proteins auf die Fertilität detailliert zu betrachten. Ein weiteres Ziel war es, anhand des massiv ausgeprägten Hodenphänotyps beeinträchtigte Vorgänge und in Verbindung damit auch mögliche Interaktionspartner von EHD1 zu identifizieren. Neben dem

knockin-Mausmodell wurde ein induzierbares Zellmodell von LLC-PK1-Zellen verwendet, die unter Tetrazyklin-Induktion entweder den Wildtyp oder das mutierte EHD1 exprimierten.

Das geringe Wissen über die Beteiligung genetischer Komponenten bei männlicher Infertilität macht die Identifizierung potentiell beteiligter Gene zu einem wichtigen Tool für neue Behandlungsansätze. EHD1 wurde bereits in der Vergangenheit mit der Thematik der männlichen Fertilität in Verbindung gebracht, jedoch fehlte bislang der Bezug zu einem humanen Phänotyp. Auch sind die Auswirkungen der Mutation auf die männlichen Patienten nicht bestätigt, allerdings liefert diese Arbeit eindeutige Hinweise darauf, dass EHD1 für eine normale und produktive Spermatogenese unverzichtbar ist.

1.2 Grundlagen der Endozytose

Endozytose beschreibt die Internalisierung von zellfremdem Material ins Innere einer Zelle durch Einstülpung der Zellmembran und unter Ausbildung von Vesikeln oder Vakuolen (Abbildung 2) (Conner und Schmid 2003). Dabei ist das aufgenommene Material zu groß, um direkt durch die Zellmembran zu diffundieren und/oder über Transportproteine oder Kanäle ins Zellinnere zu gelangen. Stattdessen bedarf es einer komplexen Endozytose-Maschinerie, welche nicht nur die Aufnahme, sondern auch die weitere Verarbeitung des aufgenommenen Materials koordiniert. Obwohl bereits einige beteiligte Proteine, Moleküle und Vorgänge aufgedeckt werden konnten, sind viele detaillierte Prozesse der Endozytose immer noch Gegenstand intensiver Forschung.

Neben der Internalisierung von größeren Molekülen und Oberflächenrezeptoren nimmt die Endozytose auch eine essentielle Funktion in der Aufnahme von Nährstoffen für Zellwachstum und – reparatur, der Regulation des Immunsystems und der Immunantwort im Kampf gegen Pathogene oder potentiell zellschädigende Substanzen ein. Auch im Rahmen der Zell-Homöostase, Eliminierungsprozesse, sowie der Zellentwicklung und Polarisierung spielt sie eine große Rolle (Conner und Schmid 2003; Di Fiore und Zastrow 2014).

Die Endozytose kann in zwei übergeordnete Gruppen unterteilt werden: Die Phagozytose – auch *cell eating* genannt – beschreibt die Internalisierung von großen Partikeln und kann nur von bestimmten Zelltypen bewerkstelligt werden, während die Pinozytose – auch als *cell drinking* bezeichnet – für die Aufnahme von kleinen, in Extrazellulärflüssigkeit gelösten Substanzen steht. Sie findet in allen Zellen statt und umfasst – je nach Größe der aufzunehmenden Partikel - vier grundlegende Mechanismen: Die Makropinozytose (Vesikelgröße $>1\mu\text{m}$), die Clathrin-vermittelte Endozytose (ca. 120 nm), die Caveolae-vermittelte Endozytose (ca. 60 nm), sowie die Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose (ca. 90 nm) (Conner und Schmid 2003). Unter Wirbeltieren stellt die hochkonservierte Clathrin-vermittelte Endozytose den Hauptweg der Rezeptorinternalisierung dar (Lampe et al. 2016). Clathrin-dekorierte Einstülpungen der Plasmamembran dehnen sich in

das Zellinnere aus, sobald Plasmamembranproteine durch Adapterproteine erkannt und Rezeptoren auf der Plasmamembran konzentriert werden. Schließlich wird das entstandene Vesikel mitsamt der Fracht durch Abschnürung in das Innere der Zelle eingebracht und weiter prozessiert. Dynamin - eine GTPase – unterstützt zusammen mit weiteren, akzessorischen Proteinen die Vesikelspaltung (Grant und Donaldson 2009; Doherty und McMahon 2009).

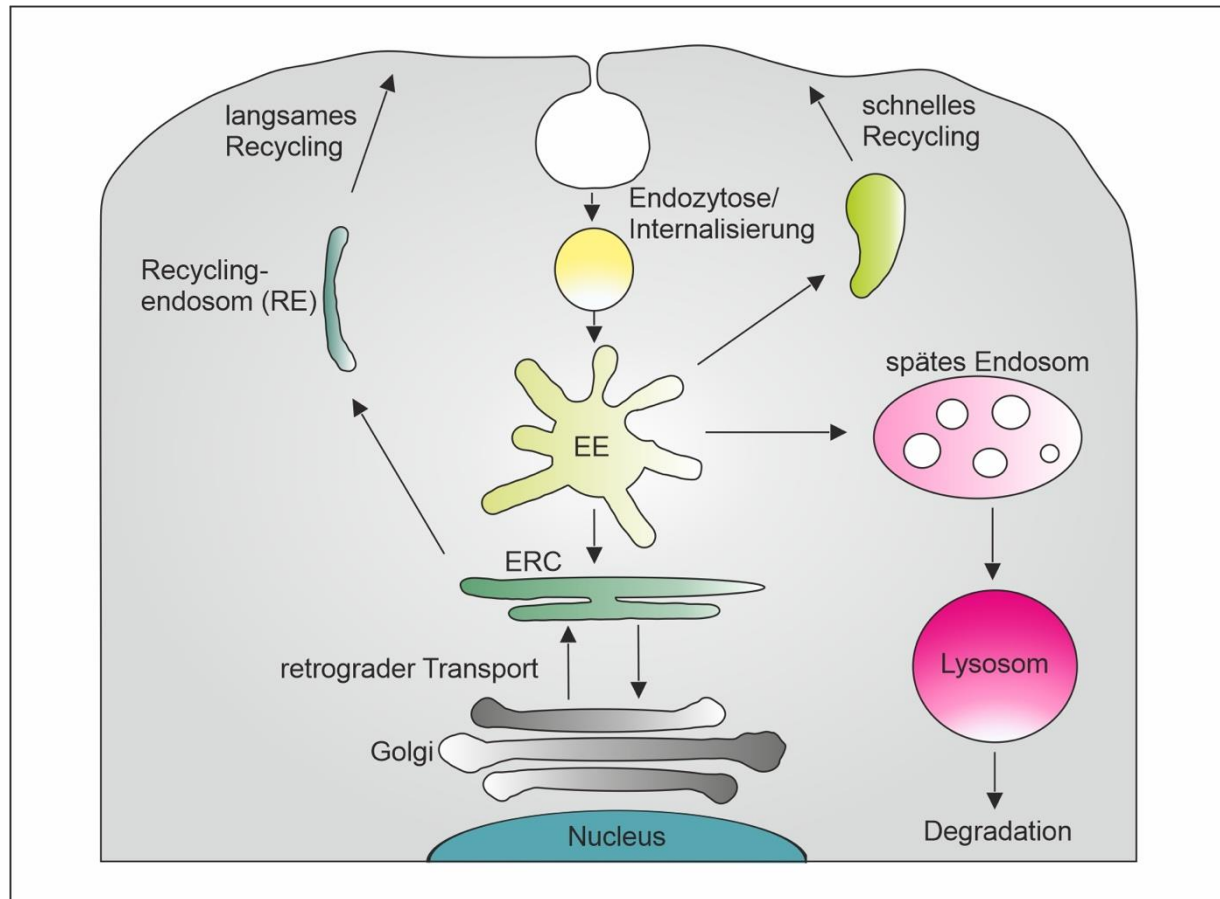


ABBILDUNG 2: Grundlagen der Endozytose. Rezeptoren auf der Plasmamembran unterstützen die Internalisierung der aufzunehmenden Fracht und werden gemeinsam mit ihr zunächst durch endozytotische Vesikel zum frühen Endosom (EE) transportiert. Hier trennt sich ihr Weg. Während abzubauenende Fracht über das späte Endosom zu Lysosomen transportiert und für die Degradation vorbereitet wird, können die Rezeptoren über einen schnellen Weg (direkt zurück zur Plasmamembran) oder über einen langsamen Weg (über das endosomale Recyclingkompartiment ERC und das Recyclingendosom RE) an ihren Herkunftsort – der Plasmamembran – zurückgeführt werden. Abbildung wurde erstellt nach der Vorlage von Allgood und Neunuebel 2018.

Unmittelbar nach dem Eintritt in die Zelle (Clathrin-vermittelt oder –unvermittelt) erreicht das aufgenommene Material das frühe Endosom (*early endosome, EE*). Von hier aus wird die enthaltene Fracht entweder für den Abbau in Lysosomen oder für die Wiederverwertung (Recycling) vorbereitet. Im Falle des Recyclings sind die Rezeptoren dazu bestimmt, entweder direkt oder aber über einen Umweg zu ihrem ursprünglichen Standort – der Plasmamembran - zurückgeführt zu werden. Dieser Umweg führt dabei zum endozytotischen Recycling-Kompartiment (*endocytic recycling compartment, ERC*), von dem aus eine erneute Sortierung stattfinden kann (Grant und Donaldson 2009). Voraussetzung für den zielgerichteten Transport innerhalb der Endozytosemaschinerie ist die Ausbildung von tubulären

Membranstrukturen, von welchen sich beladene Vesikel abschnüren und die enthaltene Fracht zum angedachten Ort transportiert werden kann. Diese Vorgänge erfordern ein großes und komplexes Netzwerk an verschiedenen Proteinen, die perfekt aufeinander abgestimmt sein müssen. Neben den EHD-Proteinen sind hier die Mitglieder der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen – die Rab-Proteine - von besonderer Bedeutung (Goldenring 2015; Zhang et al. 2012b).

1.3 Die EHD-Proteinfamilie

Säugetiere besitzen vier homologe EHD-Proteine (EHD1 – 4) und obwohl ihre Aminosäuresequenzen untereinander konserviert sind, sind die entsprechenden Gensequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen codiert. Während sich der Genlocus von *EHD1* auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q13) befindet, sind *EHD2*, *EHD3* und *EHD4* auf den Chromosomen 19, 2 und 15 zu finden (*EHD2*: 19q13.3, *EHD3*: 2p21, *EHD4*: 15q11.1) (Mintz et al. 1999). Die EHD-Proteine übernehmen wichtige Funktionen in einer Vielzahl an Geweben, darunter in Gehirn, Thymus, Herz, Muskelgewebe, Leber, Milz, Lunge, Niere, Auge und Innenohr (Blume et al. 2007; George et al. 2007; Sengupta et al. 2009; Arya et al. 2015). Interessanterweise wird EHD1 als einziges Mitglied der EHD-Familie zusätzlich stark im Hoden exprimiert, wodurch in diesem Gewebe bei einer beeinträchtigten EHD1-Funktion kompensatorische Effekte der anderen EHD-Mitglieder nahezu ausgeschlossen werden können. Entsprechend verheerend können die Auswirkungen einer Funktionsveränderung bzw. eines -verlustes sein.

1.3.1 Struktureller Aufbau der EHD-Proteine

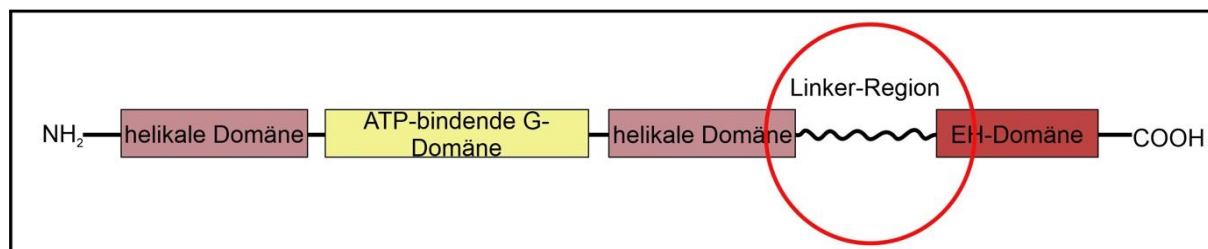


ABBILDUNG 3: Struktureller Aufbau der EHD-Proteine. Alle Mitglieder der EHD-Familie besitzen dieselbe Grundstruktur: Die N-terminale ATP-Bindungsdomäne wird zu beiden Seiten von helikalen Domänen flankiert, gefolgt von einer Linker-Region, welche die C-terminale EH-Domäne mit dem Rest des Proteins verbindet. Die beschriebene p.R398W-Mutation, die in den Patienten gefunden wurde, ist in der Linker-Region zwischen helikaler Domäne und C-terminaler EH-Domäne zu lokalisieren. Die Abbildung wurde angepasst nach Bahl et al. 2015.

Alle EHD-Proteine zeigen den gleichen strukturellen Aufbau (Abbildung 3): Eine N-terminale, ATP-bindende G-Domäne (Nukleotidbindungsdomäne) wird auf beiden Seiten von helikalen Regionen begrenzt, gefolgt von einer C-terminal gelegenen EH-Domäne, die über eine sogenannte Linker-Region mit dem Rest des Proteins verbunden ist. Je nachdem, um welches EHD-Protein es sich handelt, besteht es aus 534-543 Aminosäuren (Naslavsky und Caplan 2011). Die EH-Domäne wurde in Säugetieren in 11 Proteinen aus fünf unterschiedlichen

Proteinfamilien identifiziert, darunter Eps15, Intersectin, Reqs, γ -Synergien und EHD-Proteine (Polo et al. 2003). Alle EH-Domänen weisen eine Helix-Loop-Helix-Region auf, die auch als EF-Hand bezeichnet wird (Lewit-Bentley und Réty 2000). Manchen Proteinen dient sie als Bindestelle für Calcium, wie es beispielsweise bei EHD1 der Fall ist (Naslavsky et al. 2007). Die Hauptfunktion der EH-Domäne ist es jedoch, Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Erkennung einer festgelegten Aminosäure-Abfolge, die auch als NPF-Motiv (N-P-F; Asparagin-Prolin-Phenylalanin) bezeichnet wird, zu ermöglichen (Salcini et al. 1997; Paoluzi et al. 1998). Sie kann innerhalb der Proteinstruktur entweder N-terminal oder C-terminal angeordnet sein, was zu unterschiedlichen Proteineigenschaften führt: Zum einen zeigen sich Unterschiede in der Oberflächenladung der Domäne, denn während N-terminale EH-Domänen normalerweise eine negative Oberflächenladung besitzen, ist sie bei den C-terminalen EH-Domänen positiv geladen (Kieken et al. 2007; Paoluzi et al. 1998). EHD-Proteine besitzen eine solche C-terminal gelegene EH-Domäne. Zum anderen zeigen sich Veränderungen im Interaktionsverhalten: N-terminale EH-Domänen interagieren ausschließlich mit NPF-Motivhaltigen Zielproteinen, während C-terminale EH-Domänen in der Lage sind, auch andere Bindungsmotive (GPF- und DPF-Motive) zu erkennen – auch, wenn die Affinität für diese Motive vergleichsweise gering ist (Kieken et al. 2010; Kieken et al. 2009). Zu den NPF-haltigen Interaktionspartnern werden beispielsweise SNAP29 (Xu et al. 2004), Rabenosyn 5 (Naslavsky et al. 2004), Syndapin (Naslavsky et al. 2006) und MICAL-L1 (Kieken et al. 2010) gezählt, die allesamt Rollen in Endozytose- und Recyclingprozessen einnehmen. Die N-terminal gelegene Nukleotidbindungsdomäne der EHD-Proteine ähnelt jener der GTPasen der Ras- und Dynamin-Proteinfamilie (Caplan et al. 2002), obwohl sie eine höhere Affinität zu ATP als zu GTP zeigt (Kieken et al. 2009). Die Bindung des Nukleotids bewirkt eine Konformationsänderung der Proteinstruktur, die für eine Anlagerung an Membranen und damit zur Ausführung seiner vermuteten Funktion – nämlich dem Schneiden von Membranen, sowie der Abspaltung von Vesikeln – essentiell zu sein scheint.

1.3.2 Rolle der EHD's in der Endozytose

Für eine erfolgreiche Rekrutierung an Membranen, sowie die Abschnürung von Vesikeln ist eine Zusammenlagerung zweier EHD-Moleküle zu einem Dimer, sowie die Oligomerisierung mehrerer Dimere zu einer multimeren Proteinstruktur essentiell (Naslavsky et al. 2006). Die Dimerisierung von EHD-Proteinen kann stattfinden, sobald ATP an die nukleotidbindende G-Domäne des Moleküls gebunden hat. Es folgt zunächst eine Konformationsänderung des Dimers, wodurch eine Bindung an die zu schneidende Membran ermöglicht wird. Die Anwesenheit von Interaktionspartnern der EHD-Proteine, die ein NPF-Motiv aufweisen, stabilisiert ihre Membrananlagerung weiterhin (Naslavsky et al. 2004; Naslavsky et al. 2006; Sharma et al. 2009). Nach neuesten Erkenntnissen über die Kristallstruktur der EHD's und ihr

Dimerisierungsverhalten findet unter ATP-Spaltung (Hydrolyse) eine Konformitätsänderung der Dimer-Struktur statt, die eine Destabilisierung der tubulären Membran begünstigt und in der Abspaltung von Vesikeln resultiert (Daumke et al. 2007). Derartige Zusammenlagerungen können entweder zwischen verschiedenen („Heterodimerisierung“) oder gleichen („Homodimerisierung“) EHD-Proteinen stattfinden. So wird für den „aktivierten“, ATP-gebundenen Zustand eine offene, bindungsfähige Form angenommen, die durch ATP-Spaltung scherenartig schließt, Membranen „schneidet“ und die Dimere im „auto-inhibierten“ Zustand verweilen lässt (Abbildung 4).

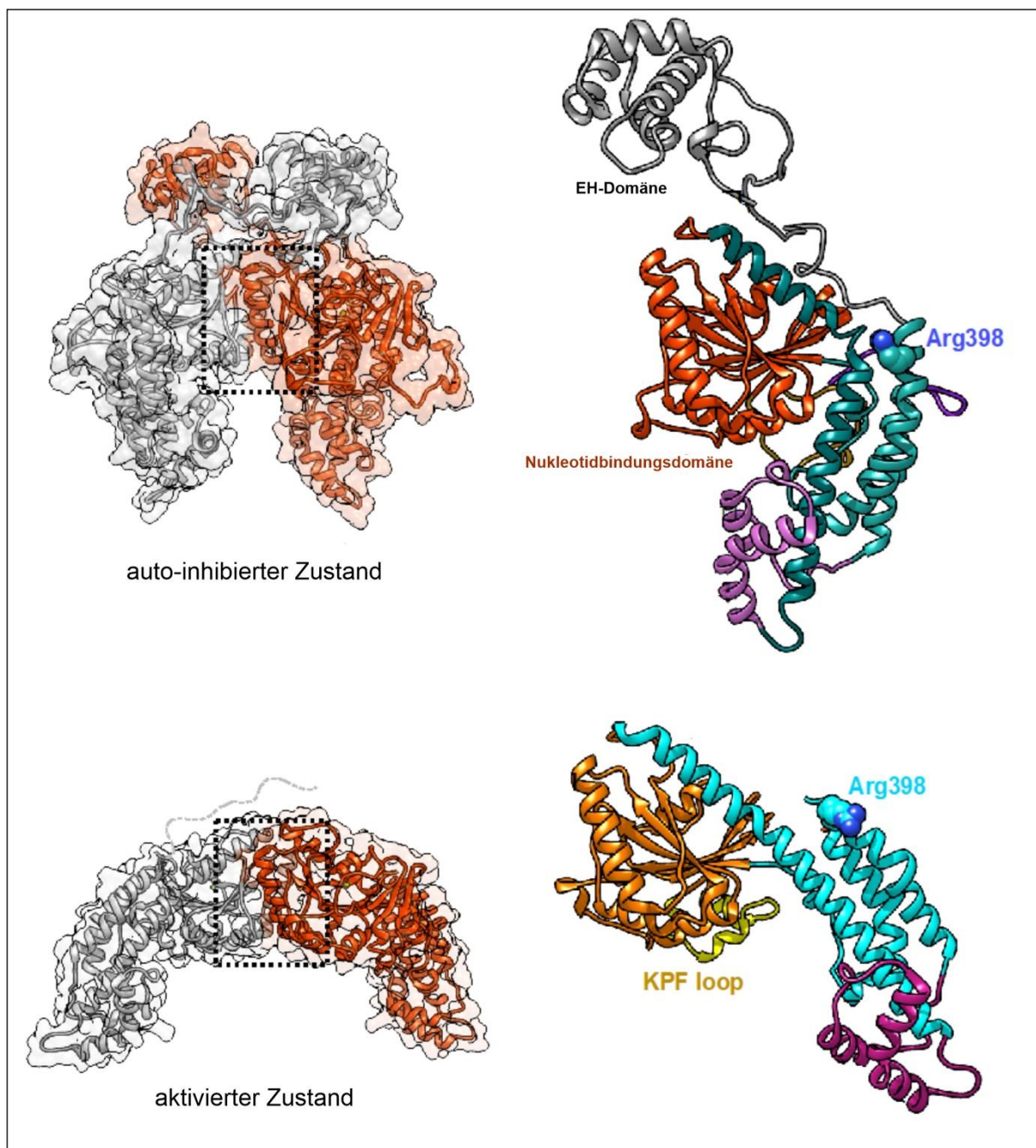


ABBILDUNG 4: In-silico Struktur des EHD1-Proteins. Computerbasierte Strukturanalysen von EHD1 wurden in Anlehnung an die bereits bekannte Kristallstruktur von EHD2 im autoinhibierten Zustand, sowie von EHD4 im

aktivierten Zustand von Frau Prof. Ziegler der Universität Regensburg durchgeführt. Wie auch bei anderen Mitgliedern der EHD-Familie wird davon ausgegangen, dass sich Monomere zunächst zu dimeren Proteinstrukturen zusammenlagern, die anschließend weiter oligomerisieren. Die dimeren Strukturen können sich in autoinhibiertem („geschlossenen“) oder aktiviertem („offenem“) Zustand befinden, wobei eine Anlagerung an zu schneidende Membranen nur in letzterem möglich ist. Die durch ATP-Spaltung induzierte Konformationsänderung führt schließlich zur scherenartigen Spaltung der Membran und zur Abspaltung von Vesikeln. Bildquelle: Issler et al. 2022.

1.3.3 EHD1 – Funktion und Bedeutung

Das *Eps15 homology domain containing protein 1* – kurz EHD1 – ist unter den EHD-Proteinen bisher am besten erforscht. Ihm wird eine zentrale Rolle im Recycling von internalisiertem Material vom frühen Endosom zum endosomalen Recyclingkompartiment bzw. direkt zurück zur Plasmamembran über den schnellen Recycling-Weg zugeschrieben (Caplan et al. 2002). Die bereits erwähnte weitgestreute Expression von EHD1 in verschiedenen Geweben und Organsystemen lässt jedoch vermuten, dass dieses Protein mehr als nur eine einzige bedeutende Funktion einnimmt. Zur Bewerkstelligung der zentralen Aufgaben in der Endozytose konnten bereits mehrere Interaktionspartner von EHD1 identifiziert werden. Dazu gehörten u.a. MICAL-L1 (Sharma et al. 2009), Rabenosyn-5 (Naslavsky et al. 2004), Rab11-FIP2 (Naslavsky et al. 2006), SNAP29 (Rapaport et al.), SNX1 und VPS-Proteine, welche zusammen den Retromer-Komplex ausbilden (Gokool et al. 2007), sowie auch EHD3 (Galperin et al. 2002) und EHD4 (Jones et al. 2020). Weiterhin ist bekannt, dass zwischen Endosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk rege Transportvorgänge, die als retrograder Transport bezeichnet werden, stattfinden. Dieser Transport erfolgt mithilfe der Unterstützung einer Vielzahl an Regulatoren, wobei der sog. Retromer-Komplex einen der wichtigsten supportiven Partner darstellt. EHD1 als zentrales Protein im endozytotischen Recycling soll mit den Retromer-Komponenten Vps26 und Vps35 interagieren, wobei die detaillierten Mechanismen dieser Interaktion und andere, möglicherweise beteiligte Faktoren noch nicht ausreichend erforscht sind (Zhang et al. 2012a). Nichtsdestotrotz wurde bereits vor einigen Jahren eine Verbindung zwischen EHD1 und dem Retromer-Komplex hergestellt (Zhang et al. 2012a) und als mögliche Ursache für u.a. die Alzheimer-Krankheit identifiziert. Bei Säugetieren ist der Retromer-Komplex essentiell für die Regulierung des retrograden Transports, der das endosomale System mit dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) kommunizieren lässt. Weiterhin weiß man, dass der Retromer-Komplex auch den Transport von frühen Endosomen zum lysosomalen Weg vermittelt (McKenzie et al. 2012). Es handelt sich um einen Multiproteinkomplex, der bei Säugetieren in zwei Teilkomplexe unterteilt werden kann: Komplex 1 besteht aus drei Vps-Orthologen (Vps35, Vps26 und Vps29), welche die zu transportierende Fracht binden, während Komplex 2 die Sortierenzyme 1 und 2 (SNX1 & 2) umfasst und für eine Tubulierung der Membranen sorgt (Gokool et al. 2007). Gokool et al. berichteten über eine direkte Interaktion der Vps26-Komponente des Retromer-Komplexes mit EHD1, sowie über eine Destabilisierung SNX1-positiver Tubuli und über eine Beeinträchtigung

der Rückführungsprozesse vom Endosom zum Golgi-Netzwerk unter einem Verlust der EHD1-Expression (Gokool et al. 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EHD1 eine wichtige regulatorische Funktion für das Retromer einnimmt.

Weiterhin scheint EHD1 unterstützend auf die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase zu wirken. Mitochondrien werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da in ihnen über oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) Energie in Form von ATP (Adenosin-Triphosphat) produziert wird. Ein mitochondriales Gleichgewicht nimmt entscheidenden Einfluss auf die Zellgesundheit und –Funktionalität (Farmer et al. 2017). Das mitochondriale Netzwerk steht unter kontinuierlichen Fusions- und Spaltungsvorgängen und es wird vermutet, dass EHD1 – erneut in Verbindung mit dem Retromerkomplex - möglicherweise an diesen Prozessen beteiligt sein könnte. Weiterhin wird vermutet, dass die EHD1-Funktion für den Erhalt der Plastizität und für die Zellgesundheit von besonderer Bedeutung sein könnte (Farmer et al. 2017).

Auch in Bezug auf membranbildende Prozesse, die in Zusammenhang mit der Ziliogenese stehen, wird eine Funktion von EHD1 angenommen. Die Ziliogenese ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der die Entstehung und den Aufbau von Zilien beschreibt. Ein Zilium ist eine fingerartige und hochspezialisierte Struktur, deren Rückgrat durch einen mikrotubulären Kern gebildet wird. Es werden verschiedene Arten an Zilien definiert, die unterschiedliche Funktionen einnehmen und sich hinsichtlich ihres Aufbaus voneinander abgrenzen. In Säugern trägt nahezu jede Zelle ein einziges, primäres ("unbewegliches") Zilium, welches in den extrazellulären Raum hineinreicht, um Umweltsignale zu erfassen, auf deren Grundlage die Modulation zellulärer, physiologischer Prozesse in Gang gesetzt wird. Bewegliche Zilien hingegen dienen der Fortbewegung und der Erzeugung von Strömungen auf verschiedenen Oberflächen. Der dritte Typ - die nodalen Zilien - sind vermutlich für die Embryonalentwicklung von Bedeutung (Pala et al. 2018). Alle drei Arten besitzen Gemeinsamkeiten in der Entstehung, unterscheiden sich aber hinsichtlich der axonemalen Struktur, d.h. der Anordnung der Mikrotubuli im Inneren des Ziliums, sowie der akzessorischen Strukturen, welche für die Beweglichkeit der motilen Zilien verantwortlich sind (Dynein-Arme, radiäre Speichen) (Pala et al. 2018). In Anbetracht seiner Komplexität ist es nicht verwunderlich, dass der Prozess der Zilienentstehung noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Es werden jedoch zwei unterschiedliche Entstehungsprozesse vermutet (Abbildung 5): Ein extrazellulärer Weg, bei dem die Mutterzentriole des Zentrosoms direkt an die Plasmamembran andockt und das Zilium parallel zu einer Einstülpung der Plasmamembran in den extrazellulären Raum auswächst, sowie ein intrazellulärer Weg, bei dem es zunächst zu Interaktionen zwischen einem primären, ziliären Vesikel und der Mutterzentriole kommt, das Axonem in Richtung Plasmamembran auswächst und schließlich mit ihr fusioniert (Yee und Reiter 2015; Molla-Herman et al. 2010).

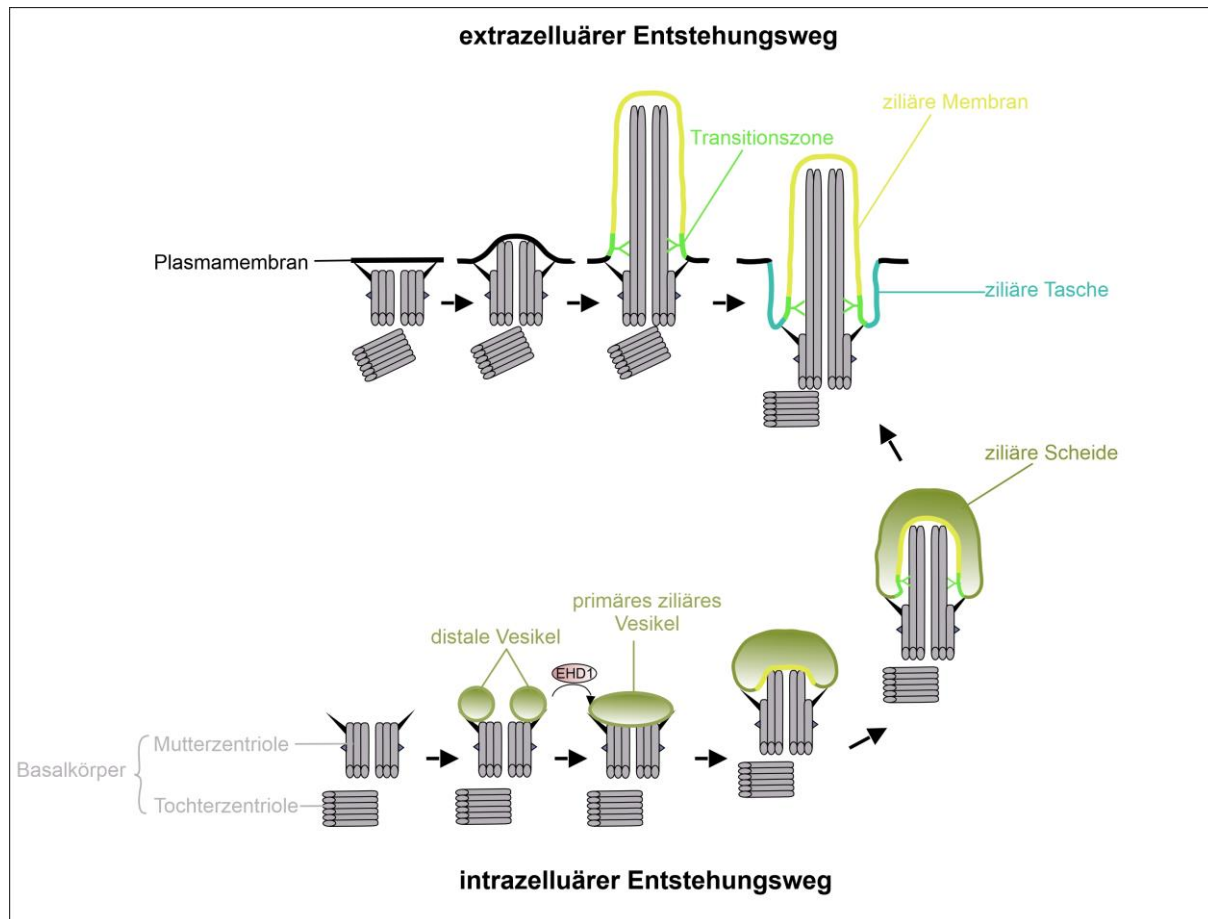


ABBILDUNG 5. Mechanismen der Ziliogenese. Es wird angenommen, dass eine jede Säugerzelle ein Zilium besitzt – eine fingerartige Ausstülpung, deren Funktionen vielfältig und noch nicht vollends aufgeklärt sind. Zilien können auf zwei unterschiedliche Art und Weisen entstehen. Während der Basalkörper – bestehend aus Mutter- und Tochterzentriole – beim extrazellulären Entstehungsweg direkt in Kontakt mit der Plasmamembran tritt und ein Zilium auswächst, kommt es beim intrazellulären Weg zu einer Fusion kleiner, distaler Vesikel zu einem primären, ziliären Vesikel, das letztlich eine ziliäre Scheide formt. In ihr wächst das Zilium aus und fusioniert schließlich mit der Plasmamembran. EHD1 soll eine Rolle im intrazellulären Entstehungsweg einnehmen. Die Abbildung wurde angepasst nach Ganga et al. 2021.

Es gibt Hinweise, dass EHD1 wohl eine Rolle im intrazellulären Entstehungsweg der Ziliogenese zugeschrieben werden kann, indem es die Fusion von kleinen, distalen Vesikeln zu einem großen, primären, ziliären Vesikel unterstützt. Lu et al. entdeckten, dass sowohl EHD1, als auch EHD3 an präziliären Membranen zu finden sind, was die Annahme bekräftigt, dass eine EHD-gestützte Bildung von tubulären Strukturen bedeutend für die Ziliogenese ist (Lu et al. 2015; Bhattacharyya; Bhattacharyya et al. 2016).

Rainey et al. waren die ersten, die ein *Ehd1*-Knockout-Mausmodell beschrieben haben und herausfanden, dass *Ehd1* eine wesentliche Rolle in der murinen Spermatogenese spielt. Männliche, *Ehd1*-defiziente Mäuse überlebten in einem submendel'schen Verhältnis, waren unfruchtbar, hatten kleinere Hoden und wiesen multiple Defekte in der spermatogenen Keimzellreifung auf: Unter anderem beobachteten sie Verzögerungen im Reifungsprozess von Spermatogonien, pachytenen Spermatozyten und elongierender Spermatozyten, abnormale Meiosefiguren, sowie eine veränderte Orientierung, Form und Chromatinkondensation reifer, elongierter Spermatozyten. Des Weiteren berichteten sie über ein Versagen des

Spermiationsprozesses, sodass reife, aber abnormal-geformte Spermatozoa von den Sertoli-Zellen phagozytiert und im Bereich der Plasmamembran detektiert wurden. Die Abscheidung des überschüssigen Zytoplasmas – ein Ereignis, welches den Spermiationsprozess maßgeblich kennzeichnet – schien zu scheitern. Es resultierte eine drastisch reduzierte Spermienzahl (Rainey et al. 2010).

1.4 Auswirkungen der p.R398W-Mutation auf die Ehd1-Funktion

Erst kürzlich von Issler et al. publizierte in-silico Strukturanalysen von EHD1, die in Anlehnung an die bereits bekannten Kristallstrukturen von EHD2 (Daumke et al. 2007) und EHD4 erstellt wurden, zeigten, dass sich die p.R398W-Mutation in der α -Helix 12 innerhalb der Linker-Region des EHD1-Proteins befindet. Es wird vermutet, dass dieser Anteil des Proteins unter normalen Umständen eine stabilisierende Funktion in der Oligomerisierung von EHD1-Dimeren übernimmt (Issler et al. 2022). Der durch die Mutation verursachte Aminosäureaustausch des Arginins durch ein Tryptophan an Stelle p.398 des Proteins könnte eine geschwächte Wechselwirkung zwischen den EHD1-Dimeren zur Folge haben, was wiederum die Oligomerisierung beeinträchtigen könnte. Die Umstrukturierung von Membranen, sowie die weitere Verarbeitung von Rezeptoren und anderer Fracht wird unterbrochen, da die zur Spaltung vorgesehenen Membranen nicht geschnitten werden können (Abbildung 6) (Issler et al. 2022). Weiterführende Untersuchungen von Issler et al. zeigten zudem eine verringerte Proteinstabilität und schnellere Eliminierung des mutierten EHD1-Proteins innerhalb der Zelle.

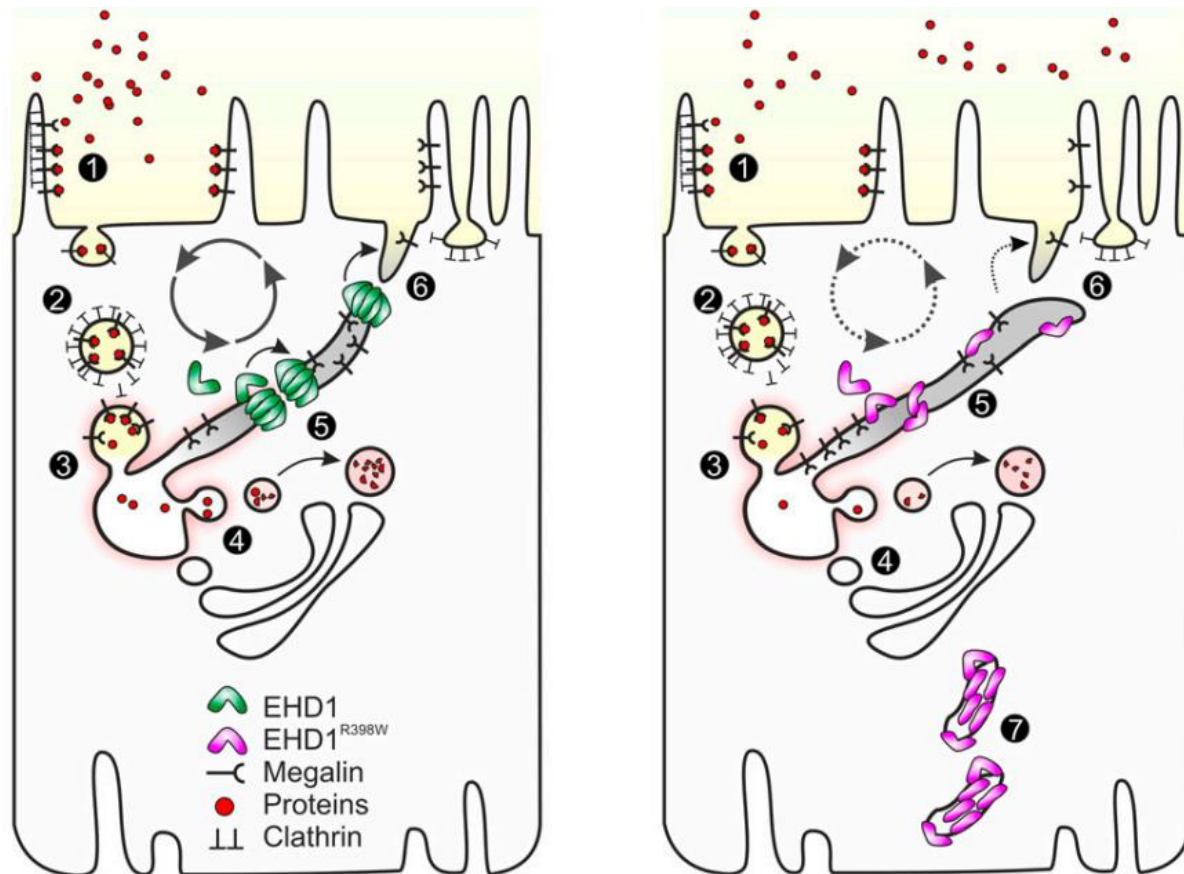


ABBILDUNG 6: Auswirkungen der p.R398W-Mutation auf die EHD1-Funktion. Dieses vereinfachte Schema einer proximalen Tubuluszelle der Niere soll die Funktionsänderung von EHD1 aufgrund der p.R398W-Variante verdeutlichen. Sobald Liganden an ihre Rezeptoren (1) an der Oberfläche der Zelle gebunden haben, kommt es über Einstülpungen der Plasmamembran zur Internalisierung und endozytotischen Aufnahme (2) (hier: Clathrin-vermittelt) der Fracht ins Innere der Zelle. Die endosomalen Vesikel verschmelzen anschließend mit dem frühen Endosom (3). Hier werden Rezeptoren und Fracht voneinander getrennt und das weitere Schicksal des internalisierten Materials beschlossen. Im Falle der Degradation findet eine Weiterleitung zu multivesikulären Körperchen (nicht gezeigt) und schließlich zu Lysosomen statt (4). Die recycelten Rezeptoren werden indes zurück in Richtung der Plasmamembran dirigiert, indem sich ausgehend vom frühen Endosom bzw. endosomalen Recycling-Kompartiment tubuläre Strukturen ausbilden. EHD1-Dimere bzw. Oligomere sind vermutlich an der Fission dieser endosomalen Tubuli beteiligt (5) und unterstützen so die Rückführung der Rezeptoren zu ihrem Ursprungsort über abgespaltene Vesikel (6). Mutiertes EHD1 (EHD1^{R398W}) ist nicht mehr im Stande, die tubulären, endosomalen Strukturen zu schneiden, weshalb die Rückführung von Rezeptoren zur Membran stark beeinträchtigt wird. Stattdessen verbleibt das mutierte Protein in Form von tubulären Aggregaten im Zytosol (7), bis es schließlich eliminiert wird. Bildquelle: Issler et al. 2022.

Eine detaillierte Funktion von EHD1 während der Spermatogenese konnte zwar bisher nicht eindeutig adressiert werden, jedoch stellt der Hoden ein Organ dar, in dem sowohl Endozytoseprozesse eine zentrale Rolle spielen, als auch Ziliogenese insbesondere zur Ausbildung des Spermienschwanzes stattfindet. Entsprechend groß könnten die Auswirkungen der Funktionsänderung oder des -verlustes eines Proteins sein, das in diesen beiden Abläufen von zentraler Bedeutung ist. Es ist durchaus denkbar, dass die Bedeutung von EHD1 für die männliche Keimzellreifung größer ist, als bisher angenommen. Möglicherweise kann *EHD1* sogar als Infertilitäts-Gen gesehen werden.

1.5 Infertilität – ein globales Problem

1.5.1 Ätiologie und Definition

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leiden weltweit 48 Millionen Paare oder 186 Millionen Menschen an Unfruchtbarkeit (Mascarenhas et al. 2012; Boivin et al. 2007; Rutstein, Shea O. and Iqbal H. Shah 2004). Unfruchtbarkeit wird grundsätzlich als eine *Erkrankung des männlichen oder weiblichen Fortpflanzungssystems definiert, die dadurch gekennzeichnet ist, dass nach >12 Monaten von regelmäßigem und ungeschütztem Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt* (Zegers-Hochschild et al. 2009). Darüber hinaus umfasst der Begriff Unfruchtbarkeit eine primäre und eine sekundäre Unfruchtbarkeit: Während die primäre Unfruchtbarkeit den Zustand beschreibt, in dem nie eine Schwangerschaft erreicht wurde, setzt die sekundäre Unfruchtbarkeit mindestens eine erfolgreiche Schwangerschaft voraus (Larsen 2005).

Ein unerfüllter Kinderwunsch stellt nicht nur eine schwere emotionale, psychische und soziale Belastung für die Betroffenen dar, sondern führt auch zu wirtschaftlichen, finanziellen und gesundheitlichen Auswirkungen für die Bevölkerung (Rutstein, Shea O. and Iqbal H. Shah 2004). Obwohl das Hauptaugenmerk immer noch auf den Frauen liegt, können die Ursachen für Kinderlosigkeit jedoch bei beiden Geschlechtern liegen. Auch erhebliche, demografische Unterschiede zeichnen sich ab: Während Unfruchtbarkeit in den westlichen Ländern und Industrienationen dank des medizinischen Fortschritts und der immer weiterentwickelten assistierten Reproduktionstechnologien in vielen Fällen behandelt und überwunden werden kann, so bleibt den Menschen in weniger weit entwickelten Ländern der Zugang zu ausreichend guter medizinischer Betreuung und technologischem Fortschritt oft verwehrt. Daher sind die negativen Folgen der Unfruchtbarkeit in wirtschaftlich schwachen und unterentwickelten Ländern besonders weit verbreitet (Ombelet et al. 2008).

1.5.2 Männliche Infertilität

Bisher konzentrierte sich die Forschung größtenteils auf die Frau. Wie statistische Auswertungen jedoch zeigen, betrifft die Infertilität nicht nur das weibliche Geschlecht, sondern es können 20-40 % der Unfruchtbarkeitsfälle auf männliche Faktoren zurückgeführt werden (Kumar und Singh 2015). Obwohl verschiedene Ursachen für männliche Unfruchtbarkeit bekannt sind, wie z. B. hormonelle Störungen, strukturelle Veränderungen der Fortpflanzungsorgane, Exposition gegenüber toxischen Substanzen, sexuell übertragbare Infektionen und einige genetische Faktoren, lässt sich mehr als die Hälfte der Fälle keiner eindeutigen Ursache zuordnen (Babakhanzadeh et al. 2020). Dieser Mangel an Wissen über die Beteiligung männlicher Faktoren an der Problematik der Kinderlosigkeit ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass nicht alle Prozesse und Faktoren, die bei der Spermatogenese eine Rolle spielen, vollständig verstanden sind.

1.5.3 Bedeutung der Genetik für die männliche Infertilität

Etwa 10 % aller Gene im männlichen Genom können mit der Spermatogenese in Verbindung gebracht werden und es wird angenommen, dass genetische Faktoren zu 15-30 % der Fälle von Unfruchtbarkeit männlichen Ursprungs beitragen (Shamsi et al. 2011). Dazu werden Chromosomenanomalien (numerisch und strukturell), monogenetische Erkrankungen, die das Y-Chromosom oder autosomale Gene betreffen, z. B. BAX, BCL16, Acrosin, DNA11 oder CFTR, sowie multifaktorielle und endokrine Störungen genetischer Ätiologie gezählt. Auch epigenetische Faktoren werden hier mit einbezogen (Shamsi et al. 2011). Angesichts des hochkomplexen Zusammenspiels einer Vielzahl an Genen während der Spermatogenese sowie der großen Zahl ungeklärter Fälle von Unfruchtbarkeit wird der Bedarf weiterer Forschung in diesem Bereich deutlich.

1.6 Die Spermatogenese - Grundlagen zur Keimzellreifung des Mannes

1.6.1 Makroskopische und zelluläre Architektur der männlichen Fortpflanzungsorgane

Die Spermatogenese – die Keimzellreifung des Mannes – umfasst eine Vielzahl komplexer, aufeinanderfolgender und streng-kontrollierter Prozesse mit dem Ziel, kontinuierlich reife, perfekt-geformte und bewegliche Spermien zu produzieren, die am Ende der langen Entstehungs- und Reifungsphase im Stande sind, eine weibliche Eizelle (Oozyte) zu befruchten und neues Leben zu schaffen. Anders als bei der Frau, die ihre Fruchtbarkeit im Zuge der Menopause verliert, beginnt die Spermienproduktion beim Mann während der Pubertät und hält unter normalen Umständen bis zum Tod an. Bei mehr als 85 Millionen Spermien, die von einem gesunden Mann pro Tag und über viele Jahrzehnte hinweg produziert werden (Johnson et al. 1980), kann hier durchaus von einem Hochleistungsorgan gesprochen werden, dessen Abläufe streng kontrolliert und koordiniert sein wollen.

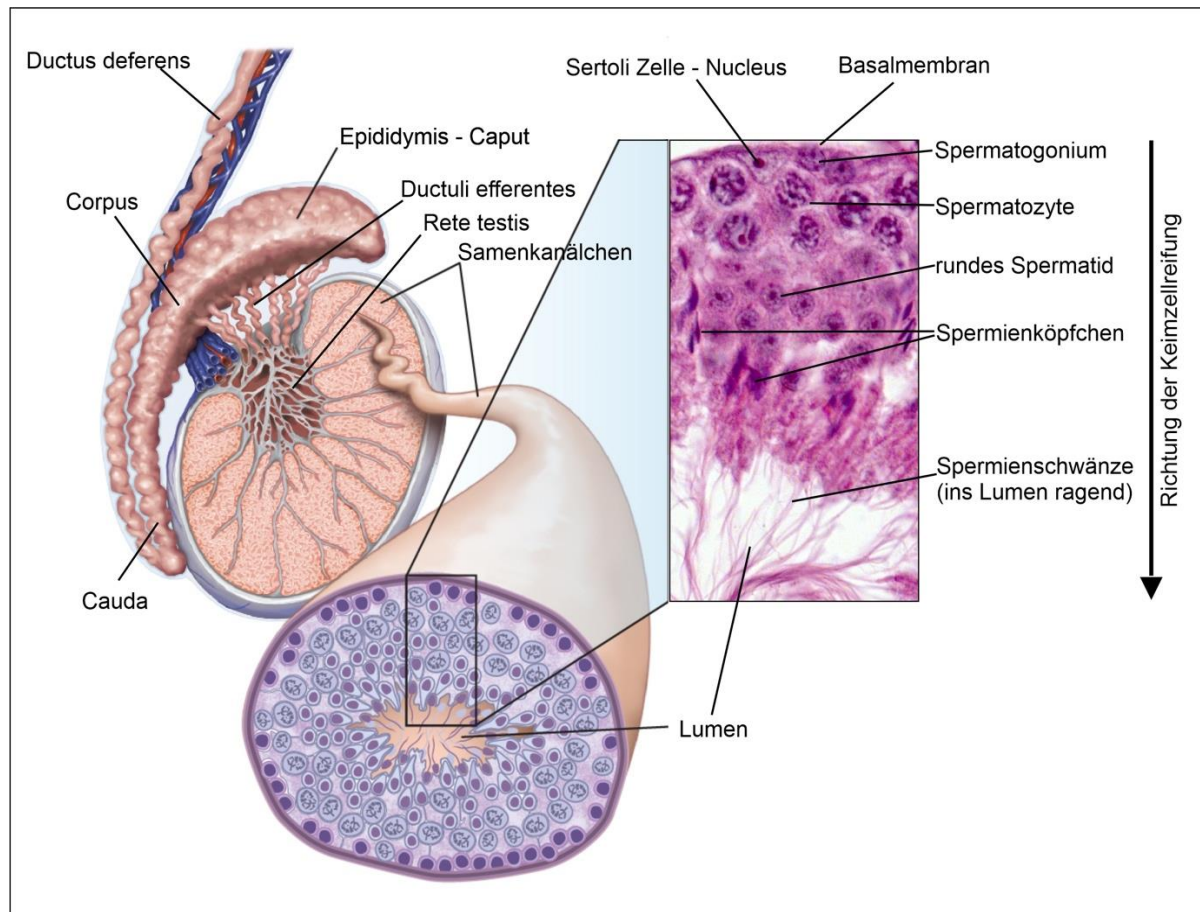


ABBILDUNG 7: Grundlagen der Spermatogenese. Die Spermatogenese (Keimzelleifung) findet in der kleinsten, funktionellen Einheit des Hodengewebes statt – den Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*). Die „Wand“ der Samenkanälchen besteht aus einem Epithel, dessen „Gerüst“ aus Sertoli-Zellen – den Stützzellen – gebildet wird. In diesem Epithel reifen die Keimzellen ausgehend von der Basalmembran, in deren unmittelbarer Umgebung die Spermatogonien als Stammzellpool lokalisiert sind, in Richtung Lumen heran. Dieser Reifungsprozess umfasst mehrere Teilschritte: Durch Mitosen, zwei meiotische Reifeteilungen und zahlreiche Differenzierungsprozesse, werden aus den ursprünglichen Spermatogonien erst Spermatozyten, dann runde Spermatiden und schließlich reife Spermatozoen, die sich aus dem Epithel lösen und für weitere Modifikationen und Lagerung über die *ductuli efferentes* in die Nebenhoden transportiert werden. Die Darstellung wurde angepasst nach einem Eintrag in der Encyclopaedia Britannica Inc. Quelle: <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>.

Die Spermatogenese findet in der kleinsten funktionellen Einheit des Hodens – den Samenkanälchen (auch Hodenkanälchen oder *Tubuli seminiferi* genannt) – statt (Abbildung 7). In den Samenkanälchen sind die heranreifenden Keimzellen in ein Epithel eingebettet, das von den Stützzellen, den Sertoli-Zellen, gebildet wird. Ausgehend von der Basalmembran, in deren unmittelbaren Umgebung die ursprünglichen, „undifferenzierten“ Keimzellen – auch Spermatogonien genannt - lokalisiert sind, setzt sich der Reifungsprozess über mehrere Zellstadien in Richtung Tubuluslumen fort. Dort angekommen werden die reifen, aber noch unbeweglichen und noch nicht befruchtungsfähigen Spermien-Vorläufer als Spermatozoa aus dem Epithel der Samenkanälchen ausgeschieden und über das Hodennetz (*Rete testis*) und die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden transportiert. Erst während ihrer Nebenhodenpassage erhalten die Spermien die Fähigkeit zur gezielten Fortbewegung, sowie weitergehende Modifikationen, bevor sie schließlich im caudalen Teil des Nebenhodens

gelagert werden. Befruchtungsfähig sind sie jedoch erst nach einem letzten Schritt, nämlich der erfolgreichen Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt.

1.6.2 Der Spermatogenese-Zyklus

Der Begriff der Spermatogenese umfasst mehrere Teilschritte, die im Folgenden genauer definiert und erläutert werden.

Spermatogenese = Mitose + Meiose I & II + Spermiogenese + Spermiation

Grundlegend beginnt der Spermatogenese-Zyklus mit mehreren mitotischen Teilungen der undifferenzierten Spermatogonien, die auch als A-Spermatogonien bezeichnet werden. Hin und wieder differenzieren manche von ihnen, um sich über die Stadien der intermediären Spermatogonien und B-Spermatogonien in Spermatozyten umzuwandeln. Es folgen zwei meiotische Reduktionsteilungen, sowie vielschichtige Differenzierungsprozesse, die unter dem Begriff Spermiogenese zusammengefasst werden (Hogarth und Griswold 2010). Je nach Definition wird auch die Ablösung der Spermatozoen aus dem Epithel - die sog. Spermiation - als eigenständiger Abschnitt zur Spermatogenese hinzugezählt.

Die Spermatogenese kann – je nach Komposition der unterschiedlichen Zelltypen im Epithel – in spezifische Stadien eingeteilt werden. Diese Stadien werden mit römischen Ziffern betitelt. Bei der Maus werden insgesamt zwölf Stadien (I-XII) unterschieden, beim Menschen hingegen nur sechs Stadien (I-VI) (Winters und Huhtaniemi 2017).

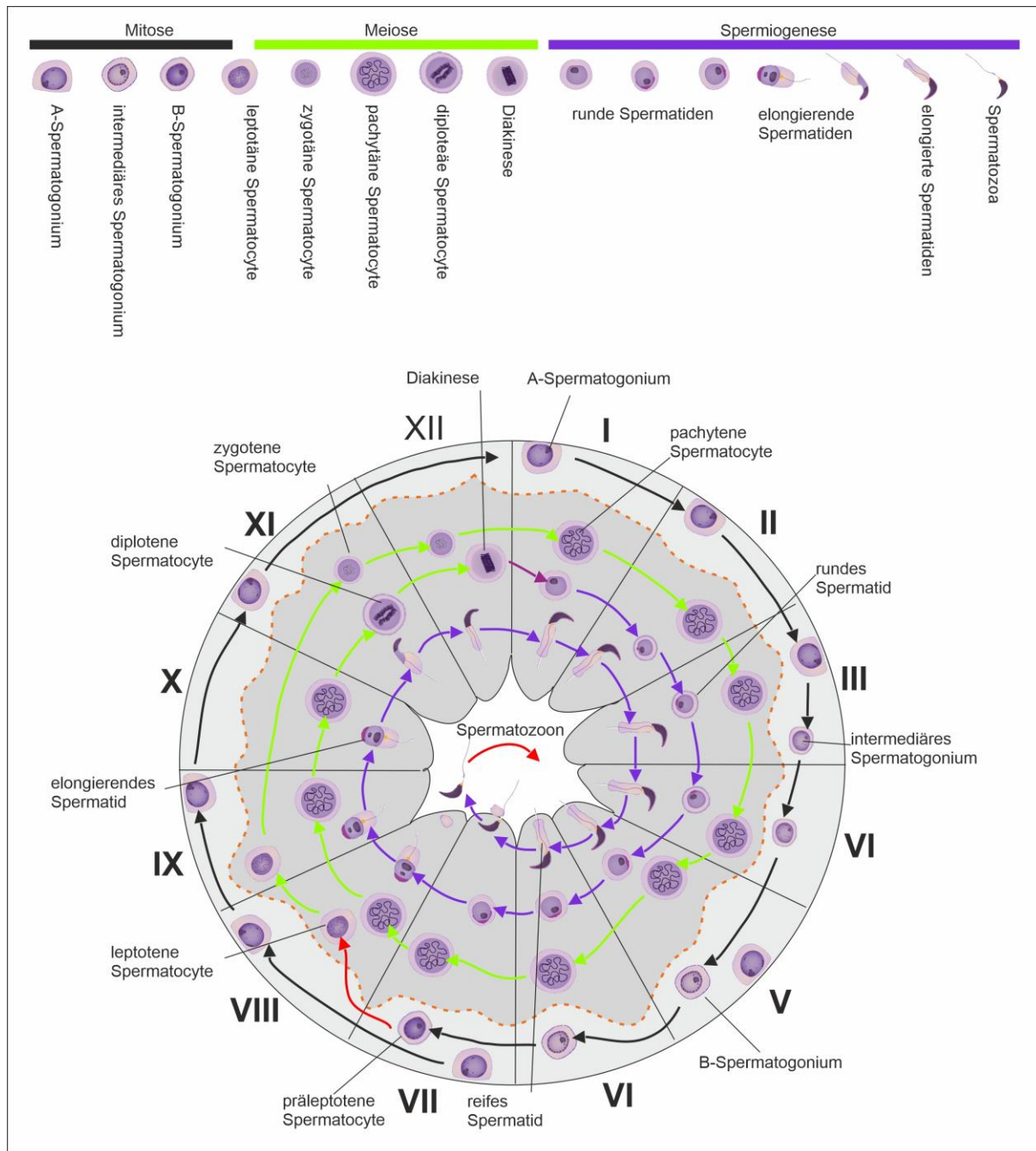


ABBILDUNG 8: Der Spermatogenese-Zyklus. Schematische Darstellung eines kompletten spermatogenen Reifungsprozesses in der Maus. Die zu unterscheidenden Stadien sind durch die römischen Ziffern I-XII gekennzeichnet. A-Spermatogonien durchlaufen zahlreiche mitotische Teilungen, aus welchen genetisch-identische Tochterzellen hervorgehen. Manche dieser Tochterzellen beginnen, über ein intermediäres Stadium zu B-Spermatogonien zu differenzieren (siehe Stadium V), aus denen sich wiederum präleptotene Spermatozyten bilden (VII). Spermatozyten durchlaufen insgesamt zwei reduktive, meiotische Teilungen, in welchen sich ihr Chromosomensatz halbiert. Mit Vollendung der Diakinese – dem abschließenden Schritt der Meiose im Stadium XII - wandeln sich die ehemaligen Spermatozyten zu runden, nicht mehr teilungsfähigen Spermaticiden, die in den nachfolgenden, hoch-komplexen Reifungsprozessen zu stromlinienförmigen Spermatozoa ausdifferenzieren und schließlich im Stadium VII-VIII im Zuge der Spermiation das Epithel verlassen. Schwarze Pfeile zeigen Zellstadien während der Mitose an, grüne während der Meiose und lila Pfeile die Zellstadien, welche die Differenzierungsprozesse der Spermiogenese durchlaufen. Die Blut-Hoden-Schranke ist als gestrichelte, rote Linie dargestellt. Die Grafik wurde in Anlehnung an Ernst et al. 2019 erstellt und modifiziert.

Auch morphologisch lassen sich die unterschiedlichen Zelltypen im Samenepithel bestimmten Abschnitten der Spermatogenese zuordnen, wie Abbildung 8 zeigt:

1. Mitotische Teilungen (schwarze Pfeile) dienen der Zellerhaltung, sowie der Expansion der Zellzahl, wobei der doppelte (diploide) Chromosomensatz der zwei entstehenden Tochterzellen im Vergleich zur Ursprungszelle unverändert bleibt. Spermatogonien teilen sich mitotisch. Dabei behält eine Tochterzelle den Stammzellcharakter, um den Stammzellpool aufrecht zu erhalten, während die andere in Richtung Meiose differenziert.
2. Meiotische Reifeteilungen (grüne Pfeile) sind die Grundlage der Vererbung des genetischen Materials, wobei aus einer Ursprungszelle vier Tochterzellen mit einfachem (haploidem) Chromosomensatz hervorgehen. Während der Spermatogenese finden im Stadium der Spermatozyten insgesamt zwei meiotische Reduktionsteilungen statt.
3. Nach Vollendung der zweiten, meiotischen Reifeteilung finden keine weiteren Teilungsprozesse mehr statt. Im Zuge der Spermiogenese (lila Pfeile) kommt es stattdessen zu tiefgreifenden Ausdifferenzierungs- und Umbauprozessen der heranreifenden, haploiden Keimzellen. Am Ende der Spermiogenese gehen aus den runden Spermatiden reife Spermatozoa hervor, die sich am Tubuluslumen anreihen. Zu diesem Zeitpunkt sind sie noch nicht befruchtungsfähig.
4. Im Zuge der Spermiation werden die reifen Spermatozoa aus dem Epithel abgegeben und über das *rete testis* und die *Ductuli efferenti* zum Nebenhoden transportiert. Hier werden sie weiter modifiziert und gespeichert.

Der Weg von einem diploiden Spermatogonium zu einem reifen, haploiden Spermatozoon benötigt insgesamt vier Spermatogenese-Zyklen. In der Maus beträgt die Dauer eines Zyklus 8,6 Tage (d), sodass reife Spermatozoa nach ca. 34 Tagen ($4 \times 8,6d$) hervortreten (Griswold 2016; Oakberg 1956). Im Vergleich dazu dauert der epitheliale Zyklus der Spermatogenese beim Menschen doppelt so lange wie bei der Maus und nimmt 16 Tage in Anspruch. Entsprechend sind nach ca. 64 Tagen ($4 \times 16d$) aus einem Spermatogonium reife Spermatozoa entstanden (Winters und Huhtaniemi 2017). Dieser Vergleich erweckt zunächst den Anschein, dass nur alle paar Wochen oder sogar Monate neue Spermien nachproduziert werden. Dies ist allerdings nicht der Fall: Die Verteilung der Spermatogenesestadien über die Länge eines Samenkanälchens wird als „Spermatogenese-Welle“ bezeichnet. Diese Welle verläuft in den Tubuli des Hodengewebes asynchron, wodurch sich benachbarte Tubuli, sowie verschiedene Abschnitte eines Tubulus in unterschiedlichen Spermatogenese-Stadien befinden können. Die Induktion des Meioseintritts der Spermatogonien, die zeitlich-koordiniert bei Mäusen alle 8,6 Tage bzw. alle 16 Tage beim Menschen stattfindet, bedingt diese Kontinuität. Schematisch könnte dies – gesehen auf die Länge eines einzelnen Tubulus – wie in Abbildung 9 dargestellt werden:

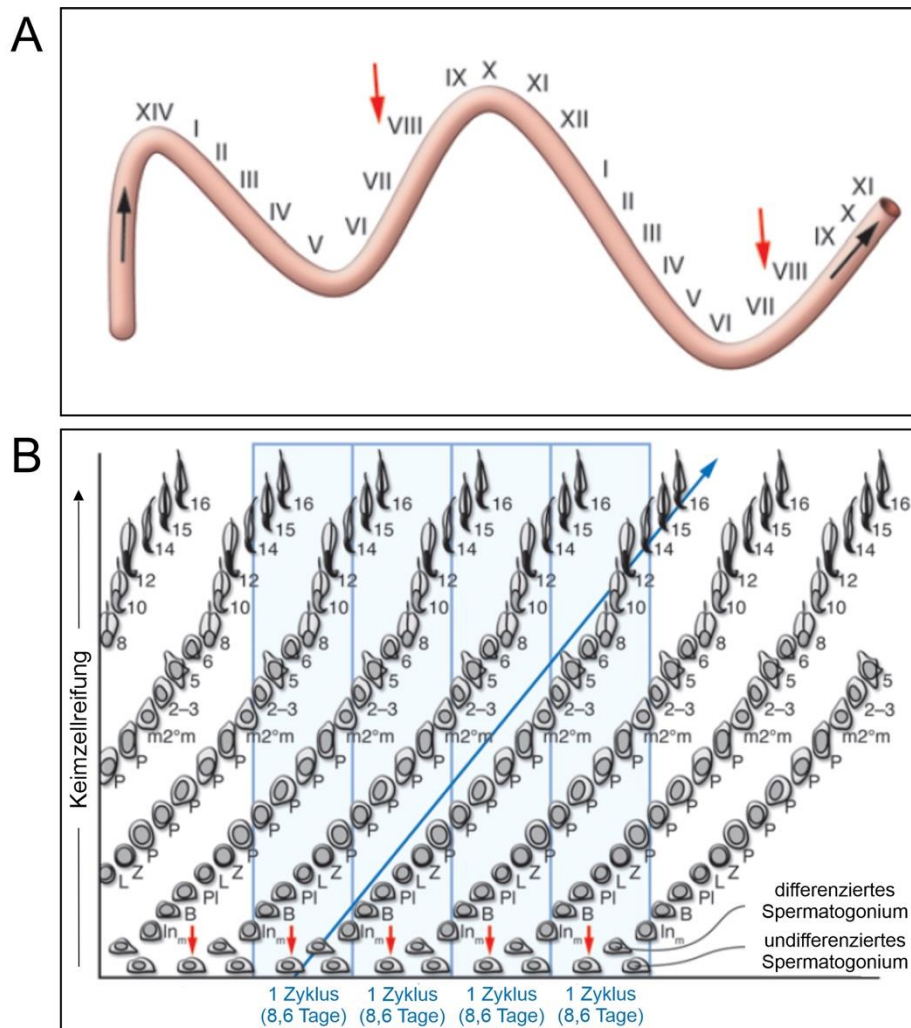


ABBILDUNG 9: Grundlagen zur Kontinuität der Spermienproduktion. (A) Die Spermatogenese schreitet entlang der Samenkanälchen wellenförmig in Richtung der schwarzen Pfeile voran, was die Grundlage für die kontinuierliche Spermienproduktion bildet. Die Initiation der Meiose ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. (B) Die Darstellung mehrerer, aufeinanderfolgender Zyklen der Spermatogenese verdeutlicht die Kontinuität der Keimzellproduktion. Mitotisch-expandierende Spermatogonien treten zu definierten Zeitpunkten in die Meiose ein (rote Pfeile) und beginnen, zu differenzieren. Über das Stadium der primären (PI, L, Z, P) und sekundären Spermatozyten ($m2^m$) wandeln sie sich zu Spermatischen (2-3,5,6,8,10,12,14,15,16) und werden schließlich als Spermatozoen aus dem Epithel abgegeben. Insgesamt 4 Zyklen werden benötigt, bis aus einem Spermatogonium reife Spermatozoa hervorgehen. Da ein muriner Spermatogenese-Zyklus 8,6 Tage in Anspruch nimmt, umfasst die gesamte Reifungszeit bis zur Abscheidung aus dem Epithel ca. 34 Tage (4 x 8,6d). In_m : Intermediäres Spermatogonium; B: B-Spermatogonium; PI: präleptotene Spermatozyte; L: leptotene Spermatozyte; Z: Zygotene Spermatozyte; P: Pachytene Spermatozyte; $m2^m$: Sekundäre Spermatozyte; runde und elongierte Spermatischen (2-16). Die Abbildung wurde modifiziert nach Hogarth und Griswold 2010.

Die roten Pfeile kennzeichnen den Eintritt in die erste meiotische Reifeteilung, der im Stadium VII-VIII des murinen Spermatogenese-Zyklus stattfindet und vermutlich durch Retinolsäure (RA), auch bekannt als Vitamin A, induziert wird (Hogarth und Griswold 2010). Während die Bedeutung der hormonellen Regulation der Spermatogenese durch die Gonadotropine und Steroidhormone bereits sehr gut erforscht ist, ist über weitere regulatorische Mechanismen relativ wenig bekannt. Obwohl bereits im Jahr 1925 entdeckt wurde, dass die Spermatogenese bei Mäusen und Ratten maßgeblich von Vitamin A abhängt, konnten die zu Grunde liegenden Mechanismen bisher nicht vollends aufgedeckt werden (Livera et al. 2002). Es wurde beobachtet, dass in Mäusen mit Vitamin A-Mangel die Differenzierung von Spermatogonien

im Hodenepithel beeinträchtigt war (Hogarth und Griswold 2010). Neuere Studien zeigen indes, dass Retinolsäure (RA) – wie Vitamin A auch genannt wird – die Expression von STRA8, einem RA-reaktiven Gen, im Zellkern induziert. STRA8 wiederum scheint essentiell für den Meiose-Eintritt der Keimzellen zu sein, da eine Deletion von STRA8 in einer Blockade der Meiose resultierte (Anderson et al. 2008).

Die beteiligten Zelltypen, sowie die Reifungsprozesse während der Spermatogenese sind zwischen Mensch und Maus größtenteils konserviert und somit vergleichbar (Hogarth und Griswold 2010). Die Komposition der unterschiedlichen Zelltypen, die im Epithel an einer bestimmten Stelle und zu einem bestimmten Zeitpunkt zu finden sind, ist ausschlaggebend für die Zuordnung zu einem spezifischen Stadium der Spermatogenese (Abbildung 10).

Grundlegend kann das Epithel der Samenkanälchen in zwei Kompartimente eingeteilt werden, deren Grenze durch die Blut-Hoden-Schranke (BTB) gebildet wird. Als basales Kompartiment wird der Bereich zwischen Basalmembran und BTB verstanden, welcher Spermatogonien und erste Spermatozyten beherbergt, während das apikale (adluminale) Kompartiment für den Bereich zwischen BTB und Tubuluslumen steht. Die Keimzellreifung schreitet ausgehend von der Basalmembran in Richtung Lumen voran (Meistrich und Hess 2013).

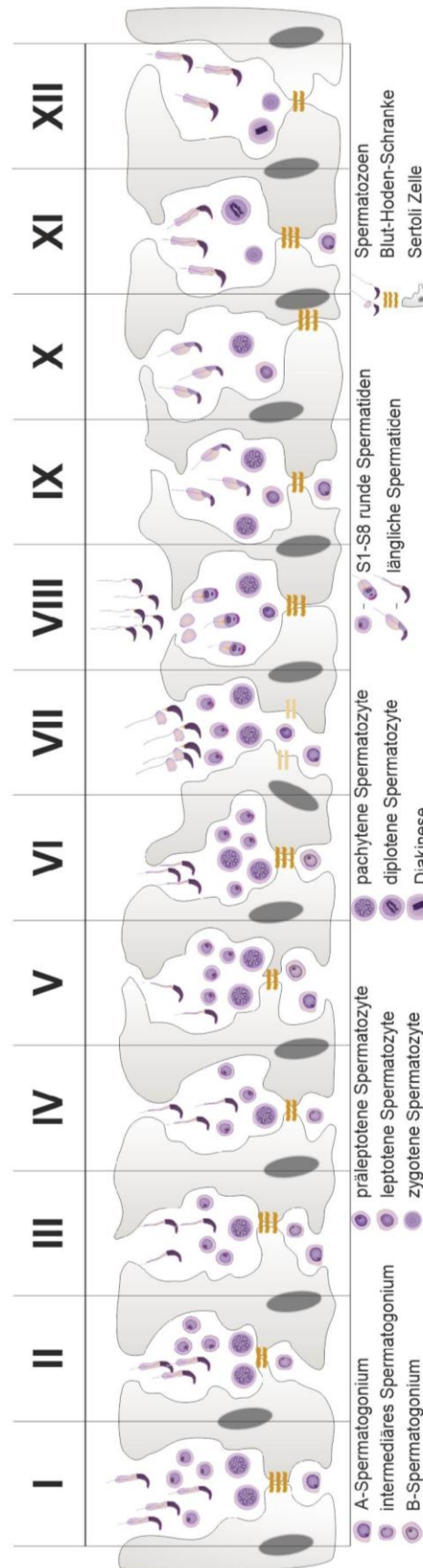


ABBILDUNG 10: Die 12 Stadien der murinen Spermatogenese. Die murine Spermatogenese kann in 12 Stadien eingeteilt werden, welche durch die spezifische Zusammenstellung verschiedener Reifungsstadien der Keimzellen

definiert sind. Die Abbildung wurde auf Grundlage des Schemas zur Stadienidentifikation von Meistrich & Hess, 2010 angefertigt.

1.7 Schlüsselprozesse während der Spermiogenese

Im Rahmen der Spermiogenese können an den runden, haploiden Spermatiden grundlegende, morphologische Veränderungen festgestellt werden, u.a. die Formation des Akrosoms, die Entstehung des Spermischwanzes, sowie die Kernformung und Kernkondensation in Kombination mit einer drastischen Reduktion des umliegenden Zytoplasmas (Azhar et al. 2021). Es gehen in ihrem Aussehen stark veränderte Spermatozoa hervor, die jedoch erst nach finalen Modifikationen im Nebenhoden und dem weiblichen Genitaltrakt ihre Motilität erwerben und in der Lage sind, eine Eizelle zu befruchten. Störungen dieser Differenzierungsprozesse resultieren meist in einer Beeinträchtigung oder einem vollständigen Verlust der Fruchtbarkeit (O'Donnell 2014).

1.7.1 Akrosomenbiogenese

Einer der ausschlaggebenden Schritte während der der Befruchtung einer Eizelle (Fertilisation) ist die Akrosomenreaktion. Hierbei werden aus dem Akrosom des Spermiums – einer glykoproteinreichen Struktur, die dem Spermienköpfchen angelagert ist - proteolytische und hydrolytische Enzyme freigesetzt, die essentiell für dessen Fusion mit der weiblichen Oozyte sind (Ikawa et al. 2010). Die Entstehung des Akrosoms findet hauptsächlich während der Spermiogenese statt und nimmt bei der Maus 14 Tage in Anspruch, obwohl die Synthese von akrosomalen Proteinen wie Proacrosin und Acrogranin bereits im Stadium der pachytenen Spermatozyten beginnt (Moreno und Alvarado 2006). Die Morphologie dieser Struktur variiert speziesspezifisch: Während es bei der Maus als sichelförmig bezeichnet werden kann, besitzt im Vergleich dazu das menschliche Akrosom eine ovale Form (Abbildung 11). Weiterhin lassen sich zwei Anteile, die Kappe und das Äquatoralsegment, unterscheiden, obwohl die Grenzen meist fließend verlaufen. Unabhängig von seiner Form nimmt das Akrosom eine essentielle Funktion im Zuge der Fortpflanzung ein, sodass jegliche strukturelle oder funktionale Veränderung zu Unfruchtbarkeit führen kann (Khawar et al. 2019).

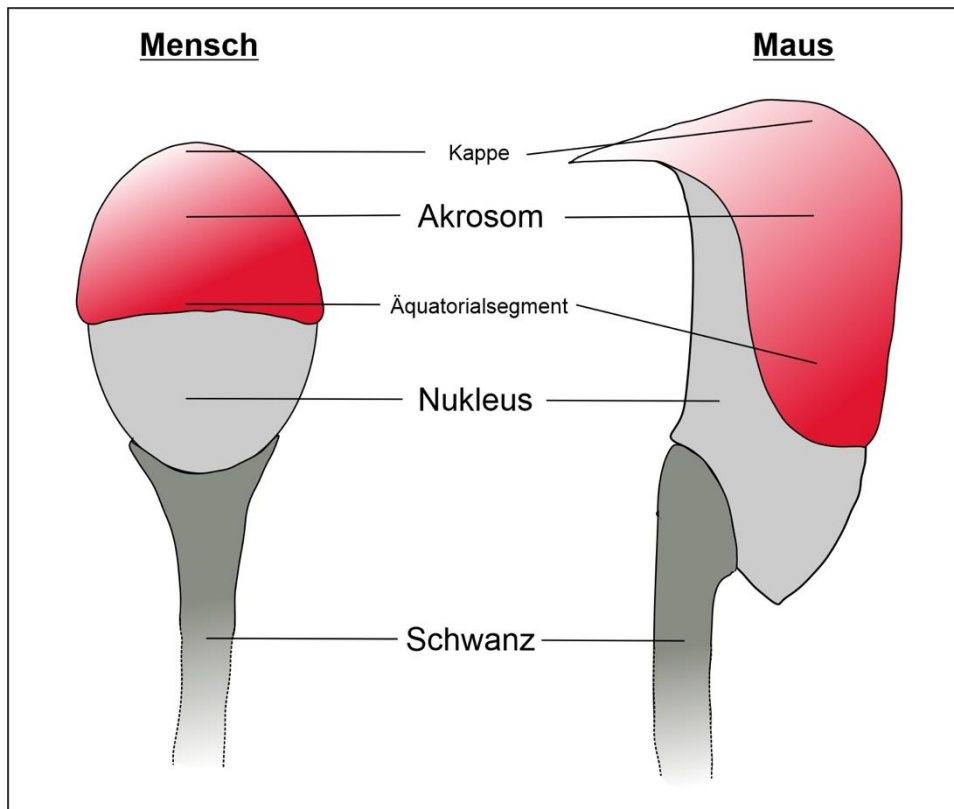


ABBILDUNG 11: Das Akrosom. Die Form des Akrosoms unterscheidet sich speziesspezifisch: Während humane Spermien einen ovalen Kopf mit ovalem Akrosom besitzen (links), zeigen die murinen Spermienköpfchen ein sichelförmiges Akrosom. Morphologisch kann das Akrosom in eine Kappe und ein Äquatoralsegment untergliedert werden, obwohl die Grenzen meist fließend verlaufen.

Als Schlüsselprozesse der Akrosomenbiogenese werden Vesikelbildung, Vesikeltransport und Vesikelfusion (Khawar et al. 2019) gesehen. Grundlegend kann die Entstehung in vier Phasen eingeteilt werden: Die Golgi-Phase, die Kappen-Phase, die Akrosomen-/ bzw. Elongationsphase und die Reifungsphase (Abbildung 12). Jeder dieser Phasen kann außerdem morphologisch unterschieden und spezifischen Entwicklungsstadien der runden Spermatiden zugeordnet werden.

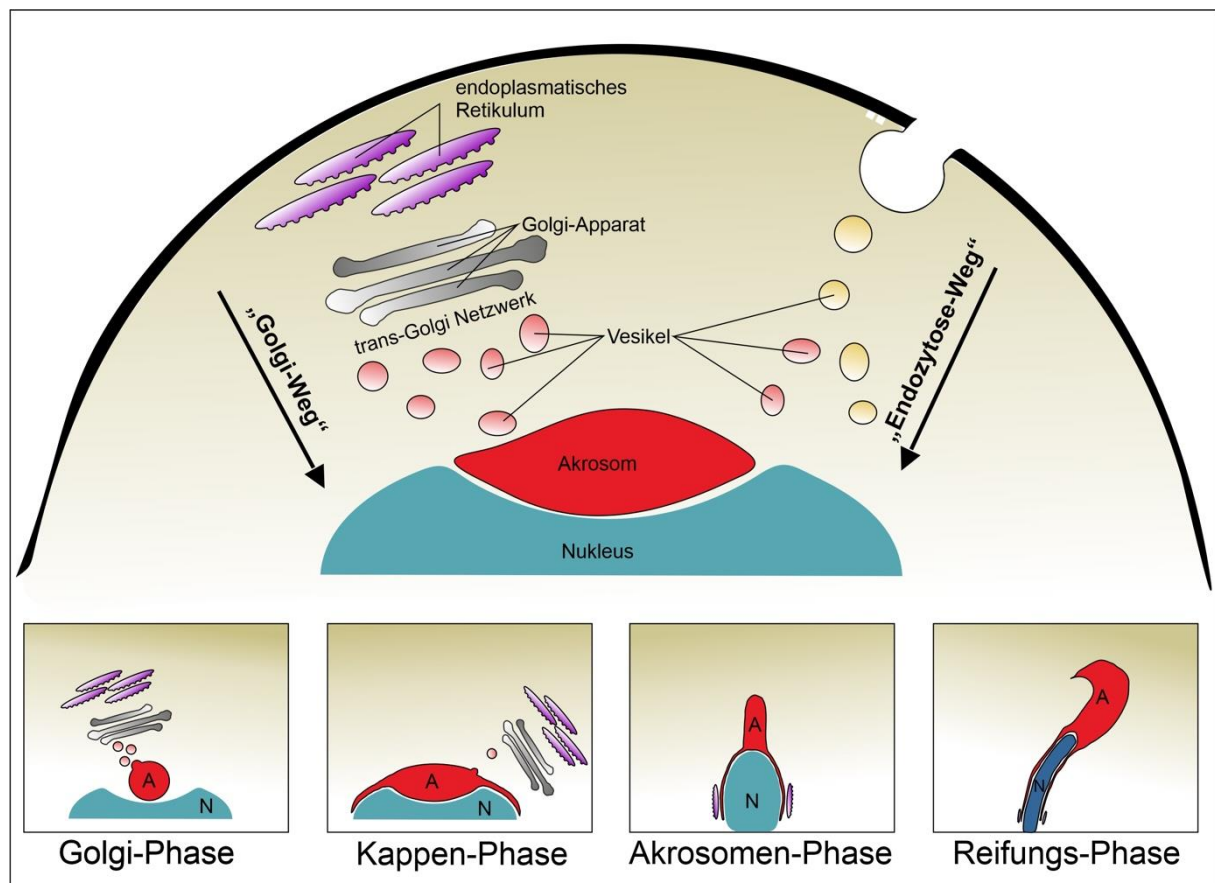


ABBILDUNG 12: Die Phasen der Akrosomenbiogenese. Die Akrosomenbiogenese beruht maßgeblich auf vesikulären Prozessen: Die Bildung, der Transport und die Fusion von Vesikeln bilden die Grundlage für ein adäquates Wachstum dieser hochspezialisierten Struktur, deren Ursprung immernoch umstritten ist. Über den „Golgi-Weg“ und den „Endozytose-Weg“ wird benötigtes Material herangeschafft, welches das stetig wachsende Akrosom speist. Die Akrosomenentstehung kann in vier Stadien eingeteilt werden: Während in der Golgi- und der Kappen-Phase das Wachstum im Vordergrund steht, sind die Akrosomen- und die Reifungsphase hauptsächlich durch strukturelle Veränderungen gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt nach Vorlagen von Dunleavy et al. 2019; Khawar et al. 2019; Yoshinaga und Toshimori 2003.

Die Golgi-Phase findet an runden Spermatisden im Stadium S1-S3 statt, also sehr früh im Verlauf der Spermio-genese. Hierbei werden pro-acrosomale Granula über Endozytose von der Plasmamembran und das Trans-Golgi-Netzwerk in Richtung Kernmembran des runden Spermatisden transportiert, wo sie schließlich zu einem großen, akrosomalen Vesikel fusionieren, das dem Zellkern angelagert ist (Moreno und Alvarado 2006). In Phase 2 – der Kappenphase – wird weiterhin kontinuierlich glykoproteinreiches Material zum Akrosom transportiert, sodass stetiges Wachstum stattfinden kann. Doch wie der Begriff „Kappe“ schon vermuten lässt, verändert sich auch die Form: Das anfangs runde Fusionsvesikel beginnt abzuflachen, vermehrt mit der Kernmembran in Kontakt zu treten und sich schließlich wie eine Kappe darüber zu erstrecken. Morphologisch sichtbar wird dieses Stadium an S4-S7 runden Spermatisden. In der Akrosomen- bzw. Elongationsphase kommt es zur Ausdehnung dieser Struktur über die ventralen Seiten des Zellkerns, während sich die Form des Akrosoms in der anschließenden Reifungsphase nochmal grundlegend ändert. Abschließend zeigt das Akrosom seine speziesspezifische, charakteristische Form (S13-S16).

Über die strukturelle Abstammung des Akrosoms, sowie die detaillierten, molekularen Abläufe der Akrosomenbiogenese wird immernoch spekuliert (Khawar et al. 2019). Während bestimmte Quellen das Akrosom als Derivat des Golgi-Apparats ansehen (Friend und Fawcett 1974; Moreno et al. 2000), vertreten andere die Meinung, dass es sich aufgrund des sauren pH-Werts und den enthaltenen lysosomalen Enzymen wie Cathepsin D und Cathepsin H um eine spezialisierte, lysosomale Struktur handelt (Moreno und Alvarado 2006; Allison und Hartree 1970). Auch eine nicht-lysosmale Herkunft (Martínez-Menárguez et al.) und eine Abstammung von sekretorischer Granula werden diskutiert (Moreno 2003). In entstehenden Akrosomen der Maus konnten die Rab-Proteine Rab5 und Rab7 nachgewiesen werden, die in somatischen Zellen mit frühen und späten Endosomen assoziiert sind (Moreno und Alvarado 2006). Die Endozytosemaschinerie scheint eine bedeutende Rolle in der Akrosomenbiogenese einzunehmen. EHD1 als bedeutende Komponente der Endozytosemaschinerie könnte ebenfalls beteiligt sein.

1.7.2 Kernformung & Kernkondensation

Runde Spermatiden wandeln sich im Zuge der Spermiogenese zu stromlinienförmigen Spermatozoa, bis sie schließlich in Stadium VII-VIII der Spermatogenese aus dem Epithel abgestoßen werden (Meistrich und Hess 2013). Dabei kommt es u.a. zu grundlegenden Veränderungen des Zellkerns. Eine Reduktion der Zellkerngröße wird maßgeblich durch die Kondensation des Chromatins erzielt, indem die Histone – nukleäre Proteine im Zellkern, um die die DNA „aufgewickelt“ ist – durch Protamine ersetzt werden. Protamine stabilisieren die DNA und lassen eine weitaus kompaktere Verpackung des Erbmaterials zu. Eine derartige Verdichtung des Chromatins im Zellkern zieht Konsequenzen für die Möglichkeit zur aktiven Transkription von Genen nach sich: So sind runde Spermatiden angehalten, in ihren frühen Stadien – zu denen das Erbgut noch gut zugänglich ist - zahlreiche mRNA's zu produzieren, von denen viele jedoch erst zu späteren Zeitpunkten der Spermiogenese benötigt werden. Sie unterliegen einer sog. Translationsverzögerung. (Braun 1998; Hecht 1998).

Als benötigte Strukturen für die Zellkernformung sind das Akroplaxom und die Manschette zu nennen (Kierszenbaum und Tres 2004; Toshimori und Ito 2003). Das Akroplaxom enthält Strukturproteine, wie z.B. Keratin-5, und funktioniert als mechanisches Gerüst, das Kräfte auf den Zellkern überträgt und so zu dessen Formung beiträgt. Im Zuge der Elongation des Spermienkopfes tritt es in Kontakt mit den ektoplasmatischen Spezialisierungen (ES) – einer aktinbasierten Struktur innerhalb der Sertoli Zellen, die zur Verankerung der heranreifenden Zellen im Epithel dient (Wong et al. 2008). Auch die Entstehung des Akrosoms soll maßgeblich vom Akroplaxom unterstützt werden (O'Donnell 2014). Die Manschette hingegen baut auf einem mikrotubulären Rückgrat auf und soll ebenfalls zur Formung des Zellkerns und somit des Spermienkopfes beitragen. Sie erstreckt sich direkt unterhalb des Akrosoms ins

Zytoplasma, taucht im Rahmen der Spermiogenese in zeitlicher Abstimmung mit der Kernkondensation erstmals bei S7-Spermatiden auf und wird in S14-Spermatiden wieder abgebaut. Diese zeitliche Abstimmung unterstützt die Vermutung, dass die Manschette eine wichtige Rolle bei der Formung des Spermienköpfchens einnimmt (O'Donnell und O'Bryan 2014; Moreno und Schatten 2000; Rattner und Brinkley 1972). Anomalien in der Entstehung und Formung von Akroplaxom und Manschette wurden bereits mit drastischen Deformationen der Spermienköpfchen in Verbindung gebracht (Kierszenbaum und Tres 2004; Toshimori und Ito 2003; Russell et al. 1991; O'Donnell 2014).

1.7.3 Spermischwanz

Die Bildung des Spermischwanzes ist ein weiterer wichtiger Schritt während der Spermiogenese, denn diese Struktur bildet die Grundlage für die Möglichkeit zur zielgerichteten Fortbewegung des Spermiums. Es handelt sich hierbei um motiles Zilium - eine spezialisierten Form von Zilien - welche zwar die grundlegenden Bestandteile mit den primären Zilien gemein hat, jedoch zusätzliche, spezialisierte Hilfsstrukturen aufweist (Abbildung 13) (Zabeo et al. 2019).

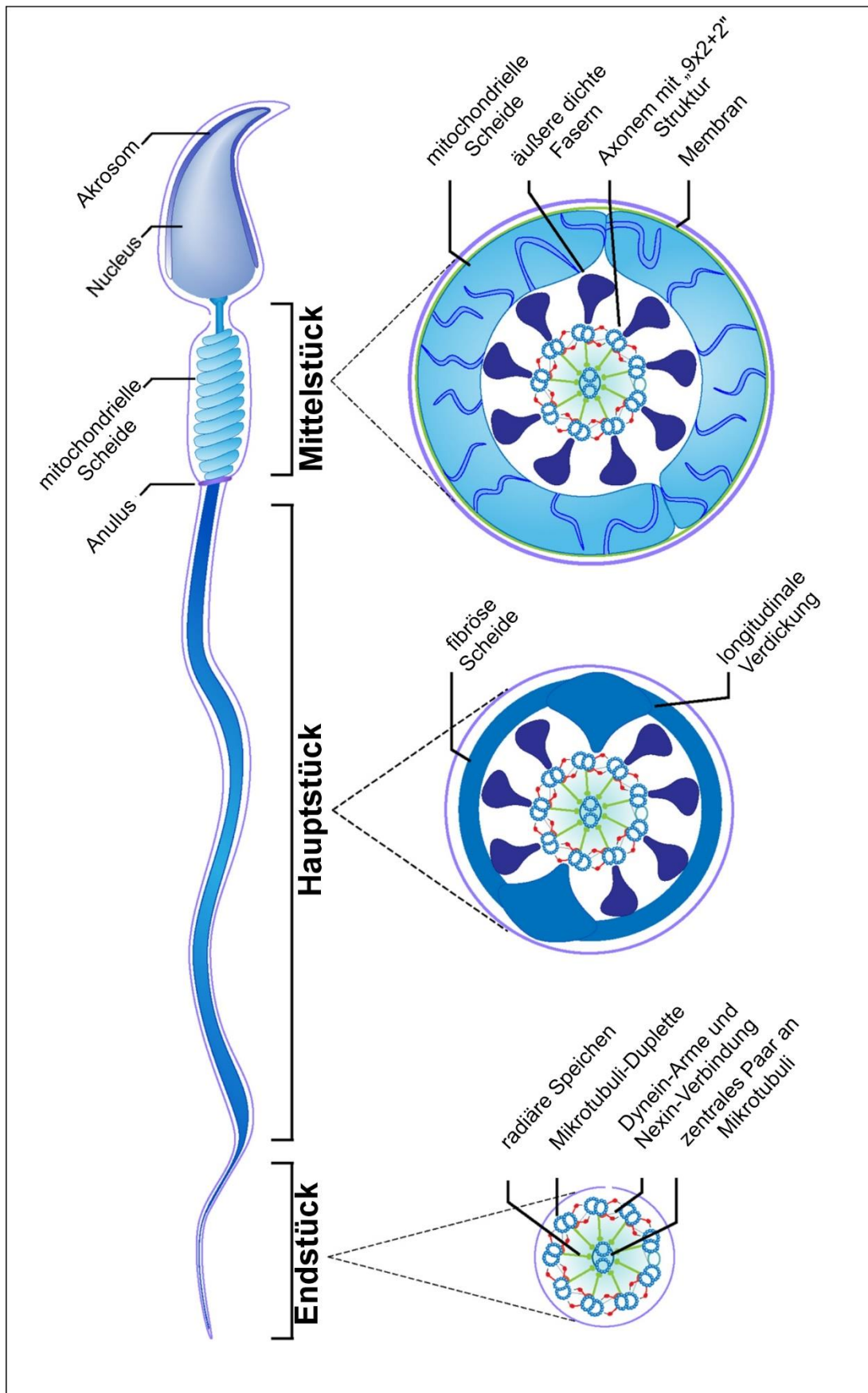


ABBILDUNG 13: Der Aufbau des Spermischwanzes. Der Spermischwanz ist für die zielgerichtete Fortbewegung des Spermiums von großer Bedeutung und kann in vier große Abschnitte eingeteilt werden: Das Verbindungsstück als Übergang von Spermienkopf zu Spermischwanz, das Mittelstück mit seiner charakteristischen mitochondriellen Scheide, das Hauptstück mit der fibrösen Scheide und das schmalere Endstück, dem akessorische Strukturen fehlen. Der Spermischwanz wird zu den Flagellen oder motilen Zilien

gezählt, weshalb das mikrotubuläre Rückgrat – das Axonem – auch die typische „9x2+2“-Struktur dieser Klasse von Zilien aufweist. Das Wissen, dass endozytotische Prozesse in der Ziliogenese eine zentrale Rolle spielen, legt die Vermutung nahe, dass auch die Entstehung der Spermischwanzes auf endozytotischen Vorgängen beruht. Die Abbildung wurde modifiziert nach Dunleavy et al. 2019.

Grundlegend kann der Spermischwanz in vier Abschnitte unterteilt werden: Ausgehend vom Spermienkopf werden ein Verbindungsstück, ein Mittelstück, ein Hauptstück und ein Endstück definiert. Während diese Abschnitte äußerlich nur schwer voneinander abzugrenzen sind, werden im Inneren des Spermischwanzes eindeutige Unterscheidungsmerkmale deutlich, die weiterhin entscheidend für die Funktion sind. Allen Abschnitten gleich ist das zentral gelegene Axonem, eine Mikrotubuli-basierte Struktur im Inneren der Geißel. Die axonemale Struktur im Spermischwanz ist vergleichbar mit der anderer motiler Zilien und zeigt den charakteristischen „9x2+2“-Aufbau, d.h. es zeigt sich ein zentrales Paar an Mikrotubuli, die von neun Dupletten umgeben sind. Einzige Ausnahme stellt dabei der letzte Abschnitt des Endstücks dar, in dem sich die typische Struktur des Axonems aufgrund des stark abnehmenden Durchmessers auflöst. Zusätzliche Dynein-Arme, sowie radiäre Speichen vermitteln zwischen dem zentralen Paar und den peripheren Mikrotubuli-Dupletten und bewerkstelligen die Fähigkeit zur Ausführung des typischen Flagellenschlags zur zielgerichteten Fortbewegung (Pigino und Ishikawa 2012).

Das Mittelstück ist charakterisiert durch die ausgeprägte mitochondrielle Scheide, die durch dicht-gepackte Bündel an Mitochondrien gebildet wird. Mitochondrien sind energieproduzierende Zellorganellen: Über oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) wird ATP generiert, das für die Ausführung des Flagellenschlags benötigt wird. Das Hauptstück zeigt eine ausgeprägte, fibröse Scheide, sowie Bündel von sog. dichten Fasern. Sie stellen Spermischwanz-spezifische, zytoskelettale Strukturen dar, die der Geißel Stabilität verleihen, die Bewegung erleichtern und sie vor durch Scherkräfte verursachte Schäden bewahren (Fawcett 1975). Die fibröse Scheide enthält u.a. A-Kinase Ankerproteine (AKAP's) (Brown et al. 2003) und weitere Proteine, die vermutlich als Gerüst für weitere Signalproteine dienen (Eddy et al. 2003). AKAP4, ein Mitglied der AKAP's, kann demnach als Marker für die fibröse Scheide und damit für das Hauptstück des Spermischwanzes verwendet werden.

Es ist bekannt, dass die korrekte Ausbildung des Axonems und der akzessorischen Strukturen im Spermischwanz zu einem großen Teil auf Vesikeltransportprozessen beruht, die maßgeblich über zwei evolutionär-konservierte, zilienspezifische Prozesse, nämlich den intraflagellaren Transport (IFT) und den Intramanschetten-Transport (IMT), bewerkstelligt werden. IFT und IMT sind bidirektionale Transportplattformen, die hauptsächlich aus Mikrotubuli und F-Actin-Filamenten aufgebaut sind. Durch sie wird die benötigte Fracht vom Basalkörper des Ziliums zur Spitze (anterograd) und auch wieder zurück (retrograd) transportiert (Kierszenbaum 2002).

1.8 Die Blut-Hoden-Schranke – eine spezielle Struktur der Sertoli-Zellen

Die Blut-Hoden-Schranke (BTB) stellt eine äußerst dichte, immunologische und hodenspezifische Barriere dar, welche die heranreifenden, differenzierenden und größtenteils nicht mehr teilungsfähigen Zellen (Spermatiden) vor äußeren Einflüssen schützt, indem sie sie räumlich vom Blutstrom trennt. Die BTB wird von benachbarten Sertoli-Zellen gebildet und besteht aus unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakten, wie tight junctions, gap junctions, Desmosomen und den hodenspezifischen ektoplasmatischen Spezialisierungen (ES) (Cheng et al. 2011). Das Hodenepithel wird durch die BTB in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt. Während die beiden meiotischen Teilungen, die Spermiogenese und die Spermiation "hinter" der BTB im vom Blutstrom abgeschirmten, adluminalen Teil des Epithels stattfinden, sind mitotische Teilungen, spermatogoniale Erneuerung und Differenzierung bis zum Stadium der präleptotenen Spermatozyten im basalen Kompartiment und in engem Kontakt zur Blutversorgung lokalisiert. Die BTB ist jedoch keine statische Struktur, sondern steht unter konstanter Modulierung: Während des Spermatogenese-Zyklus finden zeitlich abgestimmte und exzessive Umgestaltungsprozesse der epithelialen Ordnung statt. Das streng-regulierte, kurzzeitige Öffnen der Blut-Hoden-Schranke erlaubt den Übertritt von präleptotenen Spermatozyten aus dem basalen ins adluminale Kompartiment und wird maßgeblich über Endozytoseprozesse, endosomenvermitteltem Abbau, Transzytose und Recyclingprozesse bewerkstelligt (Cheng und Mruk 2012). Abgesehen von ihrer Beteiligung am Aufbau der BTB übernehmen auch die Sertoli-Zellen weitere, essentielle Funktionen im Epithel: Sie stabilisieren, erhalten die epitheliale Integrität, beherbergen und schützen die heranreifenden Keimzellen, versorgen sie mit Nährstoffen und leiten hormonelle Signale weiter (Liu et al. 2020).

1.9 Hormonelle Steuerung der Spermatogenese

Die Spermatogenese steht maßgeblich unter der Kontrolle von endokrinen, autokrinen und parakrinen Stimuli. Die bedeutendsten endokrinen Stimuli, die Einfluss auf die Entwicklung und den Erhalt der Spermatogenese nehmen, sind die Gonadotropine FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon), deren Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen als Reaktion auf den Stimulus des hypothalamischen Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) stattfindet, sowie das Steroidhormon Testosteron und verschiedene, weitere Stimuli, die ihren Ursprung in den somatischen Zellen des Hodengewebes nehmen (Abbildung 14) (Sofikitis et al. 2008). Ein durch die Sexualhormone und Inhibin induzierter negativer Feedback-Mechanismus hält diese sog. HPG (*hypothalamic-pituitary-gonadal*)-Achse im Gleichgewicht (Hayes 2001). Die Wirkung von FSH und LH wird über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren FSHR auf Sertoli-Zellen und LHR auf den Leydig-Zellen vermittelt (Hayes 2001; McLachlan et al. 2002), wobei die Leydig-Zellen auf diesen

Stimulus mit der Produktion des Sexualhormons Testosteron reagieren (McLachlan 2000; O'Shaughnessy 2014). Testosteron aktiviert den Androgenrezeptor in den Sertoli-Zellen und induziert weiterführende Signale (Welsh et al. 2009). FSH hingegen wirkt entweder unabhängig, oder aber im Zusammenspiel mit Testosteron und spielt eine entscheidende Rolle in der Proliferation der Sertoli-Zellen, indem es u.a. Einfluss auf die Expression dafür erforderlicher Gene nimmt. Auch die Struktur und die Signalweiterleitung innerhalb der Sertoli-Zellen ist entscheidend für einen einwandfreien Ablauf der Spermatogenese, eine fehlerfreie Keimzellreifung und die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale (Sofikitis et al. 2008).

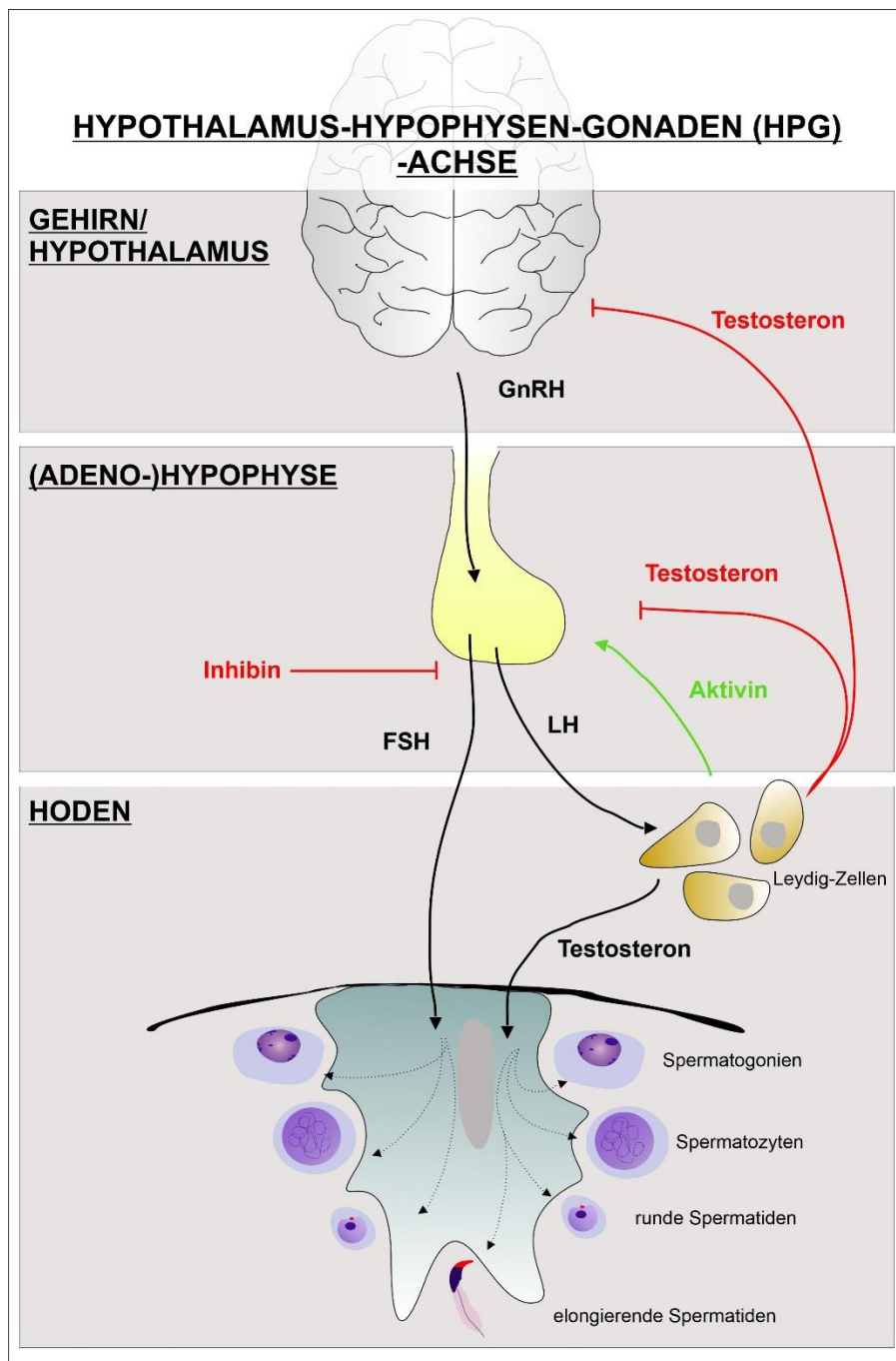


ABBILDUNG 14: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese. Endokrine Stimuli nehmen entscheidenden Einfluss auf die Spermatogenese. Die bedeutendsten Hormonwirkungen werden durch die aus dem Hypophysenvorderlappen stammenden Gonadotropine LH und FSH, sowie durch das Steroidhormon Testosteron, dessen Produktion in den Leydig-Zellen durch LH ausgelöst wird, induziert. FSH und Testosteron können entweder in Zusammenspiel, oder aber unabhängig voneinander Einfluss auf die Sertoli-Zell-Funktion nehmen.

1.10 Schicksal der Spermatozoa: Reifung und Speicherung im Nebenhoden

Die im Zuge der Spermiation aus dem Hodenepithel abgegebenen und strukturell „fertigen“, aber noch nicht befruchtungsfähigen Spermien werden zunächst über das *Rete testis* und die *Ductuli efferenti* in den Nebenhoden weitergeleitet. Der Nebenhoden lässt sich anatomisch in

vier Bereiche einteilen: Das initiale Segment, den Kopf (*Caput epididymidis*), den Körper (*Corpus epididymidis*) und den Schwanz (*Cauda epididymidis*). Um eine Eizelle erfolgreich befruchten zu können, bedarf es weiterer Modifikationen, welche die Spermien zum einen während ihrer Passage des Nebenhodens erwerben, zum anderen im Zuge der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt (Gervasi und Visconti 2017). Im caudalen Teil des Nebenhodens werden die Spermien dann so lange zwischengelagert, bis Millionen von ihnen im Zuge der Ejakulation ausgeschieden werden.

2. Zielsetzungen

Bei sechs Patienten aus vier drusischen Familien wurde durch unsere Kooperationspartner Prof. Dr. Robert Kleta und Dr. Naomi Issler eine neue autosomal-rezessive Form der niedermolekularen Proteinurie (1-2g/d) in Kombination mit einem Hörverlust im Hochfrequenzbereich festgestellt. Die Ursache für diese klinischen Symptome wurde in einer Mutation im *EHD1*-Gen identifiziert, die zu einer veränderten Form und Funktion des resultierenden Proteins führte. Das Auftreten der rezessiven Erkrankung war in den Familien durch Cousinenheirat begünstigt worden (Abbildung 1).

EHD1 gehört einer Proteinfamilie an, die aus insgesamt 4 Mitgliedern besteht, welche untereinander ein sehr hohes Maß an Strukturähnlichkeit aufweisen und welchen allesamt eine zentrale Rolle beim endozytotischen Vesikeltransport und beim Rezeptorrecycling zugeschrieben wird. EHD1 übernimmt dabei eine bedeutende Rolle bei der Überführung von Recyclingmaterial vom frühen Endosom zum endosomalen Recyclingkompartiment bzw. direkt zurück zur Plasmamembran über den schnellen Recycling-Weg (Caplan et al. 2002). Wir beobachteten, dass EHD1 eine wichtige Rolle bei der Proteinrückresorption in proximalen Tubuluszellen der Niere einnimmt (Issler et al. 2022). Darüber hinaus wird vermutet, dass EHD1 an membranbildenden und -formenden Prozessen beteiligt ist, die u.a. mit der Ziliogenese in Verbindung gebracht werden können (Lu et al. 2015).

Interessante und umfangreiche Daten zur Veränderung physiologischer Funktionen in der Niere bei komplettem Funktionsausfall bzw. Funktionsänderung von EHD1 wurden von Sara Afonso während ihrer Dissertation beschrieben und verbesserten das Verständnis des klinischen Phänotyps der Patienten (Issler et al., 2022). Die genauen Folgen der EHD1-Mutation für die Spermio-genese waren jedoch bislang unerforscht.

Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der testikulären Pathophysiologie homozygoter, männlicher *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse mit dem Ziel, die Bedeutung von EHD1 während der Spermatogenese, sowie die Auswirkungen einer Funktionsänderung, bzw. eines Funktionsverlustes dieses Proteins auf die Fertilität detailliert zu untersuchen. Die zugrunde liegenden Prozesse sollten dabei möglichst umfassend untersucht werden. Die hier dokumentierten Untersuchungen wurden zum größten Teil an Mausmodellen sowie zu einem kleineren Teil am Zellmodell durchgeführt. Während *Ehd1* im *Ehd1*^{-/-}-Mausmodell komplett inaktiviert wurde, trugen die *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse die exakt gleiche, homozygote Mutation in sich, die bei den Patienten gefunden worden war. Verglichen wurden die Ergebnisse stets mit *Ehd1*^{wt/wt}-Mäusen, die das unveränderte *Ehd1*-Gen besaßen.

Zur Untersuchung der Interaktion des humanen EHD1 mit anderen Proteinen und Protein-Komplexen wurde zudem ein durch Tetrazyklin induzierbares Zellmodell von LLC-PK1-Zellen

verwendet. Diese Zellen überexprimieren entweder humanes Wildtyp-EHD1 oder mutiertes EHD1, wenn dem Kulturmedium Tetrazyklin zugesetzt wird.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Ehd1 einen bisher unterschätzten Beitrag zur Aufrechterhaltung komplexer Abläufe während der murinen Spermatogenese leistet und dass die Einschränkung der normalen Ehd1-Funktion zu schweren Störungen dieser Prozesse führt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Tuttnauer 2540ELC	Biomedis GmbH, Gießen, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Heizplatte für Paraffinschnitte HI 1220	Leica, Wetzlar, Deutschland
Inkubator/Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Inverses Mikroskop Observer Z.1	Zeiss, Jena, Deutschland
Konfokales Mikroskop LSM 710	Zeiss, Jena, Deutschland
Kryotom CryoStar NX70	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Microtom (Rotary microtome RM2165)	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Operationsbesteck	FST, Bad Oeynhausen, Deutschland
Paraffin Inkubator INCUB LG CAP SHAKER 230V	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
PCR-Maschine Tprofessional Basic Gradient	Biometra – Analytik Jena, Jena, Deutschland
pH-Elektrode inoLab WTW Series 720	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
RNAScope® Wärmeofen	HybEZ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Sterilbank ClairePure B-2-130	Berner, Elmshorn, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop EM902	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland Labnet, Edison, NJ, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Platte	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Biopsie-Einbettkassetten	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
DAKO Mounting Medium (nicht-fluoreszierend)	DakoCytomation, Dakato North America Inc., Carpinteria, USA
A-PAP Pen, Fettstift	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Deckgläschen	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
DePeX Einbettmedium	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DNA-Leiter (50bp, 1 kb)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Epoxid Einbettmedium	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Eppendorf Cups (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	nerbe plus, Winsen (Luhe), Deutschland
Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
GeneRuler™ DNA Leiter (50 bp, 100	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Insulinspritze (0,5 ml)	BD Micro-Fine+, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, Deutschland
Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Metallkassetten für Paraffineinbettung	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mikrotommesser	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger Poly-Lysin	O. Kindler GmbH, Freiburg
Objektträger Superfrost	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	nerbe plus, Winsen (Luhe), Deutschland
Surgipath Paraplast Paraffinwachs	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tissue Tek OCT-Einbettmedium für Kryogewebe	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Netherlands
Zellkulturflaschen (T-25, T-75)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellkulturplatten (6-well, 12-well, 24-well)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

3.1.3 Chemikalien & Enzyme

Produkte	Hersteller
0,9% NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
2-Methylbutan (C ₅ H ₁₂)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Agarose	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat (C ₂ H ₆ AsNaO ₂ · 3 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM/Ham'sF12 Zellkultur-Medium	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
EDTA	Supelco, St. Louis, Missouri, USA
EGTA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y	Abcam, Cambridge, UK
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetal Calf Serum)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Formalinlösung (30%)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leibowitz Medium (1X)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Opti-MEM™	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 100X (10 ⁷ U/l Pen G, 10000 mg/l Strep.-Sulfat, NaCl 900 mg/l)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Periodsäure	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNAscope® Waschpuffer	ACD, Wiesbaden, Deutschland
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SpermAir GM501	Gynemed, Lensahn, Deutschland
TAE-Buffer (10x)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetrazyklin	Bioline, London, UK
tri-Natriumcitrat Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris Ultrapure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (10X) (0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA,)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.4 Kits

Kit	Hersteller
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega, Walldorf, Deutschland
HighYiel PCR-/Gelaufreinigung	SLG, Gauting, Deutschland
Lipofectamine 3000 Kit	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RNAscope® H2O2 & Protease Plus Kit	ACD, Wiesbaden, Deutschland
RNAscope® Multiplex Fluorescent V2 Assay	ACD, Wiesbaden, Deutschland
RNAscope® Target Retrieval Kit	ACD, Wiesbaden, Deutschland
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim, Deutschland

3.1.5 Software

Programm	Hersteller
Adobe Photoshop CS4	Adobe Inc., San José, California, USA
Chromas	Technelysium, South Brisbane, Australia
Clone Manager Professional 9	Sci Ed Software, Westminster, Colorado, USA
CorelDraw Graphics Suite X7	Corel Corporation, Ottawa, Canada
Microsoft Office Professional Plus 2016	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Origin V94E	OriginLab Corporation, Northampton, USA
ZEN Blue	Zeiss, Jena, Deutschland
ZEN Lite	Zeiss, Jena, Deutschland
ZEN Pro V2.3	Zeiss, Jena, Deutschland

3.1.6 Antikörper

Beschreibung	AK-Typ	Verd.	Hersteller
anti-EHD1, rabbit monoklonal IgG; [EPR4954]	Primär-AK	1:100	Abcam, Cambridge, UK
anti-VPS35, goat polyklonal IgG	Primär-AK	1:100	Abcam, Cambridge, UK
anti-MICAL-L1, mouse polyklonal	Primär-AK	1:100	Abnova, Taipei City, Taiwan
anti-Tom20, mouse monoklonal IgG	Primär-AK	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-AKAP4, rabbit polyklonal IgG	Primär-AK	1:100	Origene, Rockville, US
Anti-Vimentin, chicken IgY	Primär-AK	1:00	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Alexa Fluor® 488 donkey anti rabbit	Sekundär-AK	1:400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Alexa Fluor® 555 donkey anti mouse	Sekundär-AK	1:400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
AlexaFluor® 555 donkey anti rabbit	Sekundär-AK	1:400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Alexa Fluor® 647 donkey anti mouse	Sekundär-AK	1:400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Alexa Fluor® 647 donkey anti rabbit	Sekundär-AK	1:400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Alexa Fluor® 647 donkey anti-goat	Sekundär-AK	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor® 647 donkey anti chicken	Sekundär-AK	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HOE33342 (5x10 ⁻⁴ M)	Kein AK	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker™ Orange CMTMRos	Kein AK	250 nM	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Lectin PNA Alexa Fluor 647 conj.	Kein AK	1:650	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US

3.1.7 Puffer & Lösungen

Antikörperverdünnungslösung (IF), pH 7.4	BSA	0.5%
	Triton X-100	0.04%
	in 1XPBS	
Bouin'sches Fixativ	Formalin	10%
	Eisessig	4,7%
	Pikrinsäure	0,95%
Blocklösung, pH 7.4	BSA	5%
	Triton X-100	0.04%
	in 1XPBS	
Citratpuffer, pH 6	Natriumcitrat-dihydrat	2.059 g
	Zitronensäure-monohydrat	0.317 g
	in Aqua dest.	ad 1000 ml
Fixierlösung (3% PFA, pH 7.4)	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM

	Paraformaldehyd	3%
	Succhrose	100 mM
	in Aqua dest.	
Glutaraldehydlösung (2%, pH 7.4)	Glutaraldehyd	2%
	Natriumcacodylat	0.1 M
	in Aquadest	
Induktionsmedium LLC-PK1-Zellen	Tetrazyklin-Stock (12,5 mg/ml)	1µg/ml
	In Kulturmedium LLC-PK1-Zellen	
Kulturmedium LLC-PK1-Zellen	RPMI 1640 Medium	500 ml
	FCS	5%
	Penicillin/ Streptomycin 100X (10 ⁷ U/l Pen G, 10000 mg/l Strep.Sulfat, NaCl 900 mg/l)	1%
Nachfixierlösung	1XPBS	13.32 mL
	Sucrose	3.20 g
	Fixierlösung (3% PFA)	20 mL
1% OsO ₄ Lösung, pH 7.4	OsO ₄	1%
	Natriumcacodylat	0.1 M
	in Aqua dest.	
1% Periodsäure-Lösung	Periodsäure	1%
	in Aqua dest.	
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7.4	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10.3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	
SDS-Lösung (0,1%)	SDS	0.1%
	in 1XPBS	
Tail Buffer (pH 8)	EDTA	0,1M
	SDS	0,50%
	Tris-HCl	50mM

TE-Puffer (pH 7,5)	in Aqua dest.	
	Tris	10mM
	EDTA	1mM
	in Aqua dest.	

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

3.2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle Mäuse wurden unter optimalen Bedingungen gehalten, wobei Futter und Wasser uneingeschränkt zur Verfügung standen. Alle Tierversuche wurden nach den vorgeschriebenen Richtlinien durchgeführt und von den lokalen Tierschutzbehörden genehmigt.

3.2.1.2 Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Bei abgesetzten, mindestens 4 Wochen alten Mäusen wurde die genomische DNA (gDNA) aus Ohrbiopsien, die gleichzeitig der Tiermarkierung dienten, isoliert. In manchen Fällen erfolgte die Genotypisierung aus Schwanzbiopsien, die post mortem gewonnen wurden. Die Biopsien wurden mindestens 3 Stunden oder über Nacht in 300 µl Tail Buffer (0,1 M EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) mit 1 µl Proteinase K (100 mg/mL) bei 55 °C auf dem Schüttler (500 U/min) verdaut. Nach dem vollständigen Verdau wurden 300 µl Isopropanol (99 %) und 50 µl Ammoniumacetat (CH₃COONH₄, 7,5 M) zu jeder Probe gegeben, gründlich gemischt und 15 Minuten bei -20 °C inkubiert, um die genomische DNA zu fällen. Die gefällte gDNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min pelletiert und das Pellet durch vorsichtige Zugabe von 1 ml EtOH (70 %) gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen, die Pellets wurden 5 min an der Luft getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. Die Proben wurden erneut für mindestens 30 Minuten lang bei 55 °C und 500 U/min auf dem Schüttler inkubiert und die gDNA bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.1.3 Geschlechtsbestimmung bei jungen Mäusen mittels PCR

Bei erwachsenen Mäusen lässt sich das Geschlecht leicht anhand äußerlich sichtbarer Merkmale wie dem Abstand zwischen Genitalbereich und Anus, sowie dem charakteristischen Hodensack der Männchen bestimmen. Bei jungen Mäusen gestaltet sich die Unterscheidung schwierig, da die äußerlichen Geschlechtsmerkmale noch nicht vollständig ausgeprägt sind. Eine zuverlässige Geschlechtsbestimmung dieser Mäuse wurde deshalb mittels Polymerase-

Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von zwei Primerpaaren durchgeführt, die bestimmte Abschnitte des X- und des Y-Chromosoms amplifizierten (McFarlane et al. 2013).

Primer:

Sense-Primer: Xlr-SX_se: GATGATTTGAGTGGAAATGTGAGGTA,

Antisense-Primer: Xlr-SX_as: CTTATGTTTATAGGCATGCACCATGTA,

Sense-Primer: Zfy_se: GACTAGACATGTCTTAACATCTGTCC,

Antisense-Primer: Zfy_as: CCTATTGCATGGACTGCAGCTTATG.

Während in der Auswertung durch Gelelektrophorese für Männchen zwei Banden sichtbar wurden (XY), zeigten weibliche Mäuse lediglich ein Produkt für das X-chromosomale Amplikon (XX).

Bestandteil des Reaktionsansatzes	Volumen pro Probe
RedTaq Mix (2x)	10 µl
sense / antisense Primer (10µM)	je 1 µl
PCR-H ₂ O	7 µl
genomische DNA	1 µl
Σ	20 µl

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Aktivierung	94°C	5 min	35
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	4 min	
Lagerung	4°C		

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese (2µl PCR-Produkt + 1µl 6x Loading Dye + 3µl MilliQ-H₂O) unter Verwendung eines 2%igen Agarosegels und einer 50bp-DNA-Leiter aufgetrennt und das Ergebnis ausgewertet.

3.2.1.4 Genotypisierung von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen

Die Genotypisierung von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen erfolgte durch Sequenzierung. Die genomische DNA wurde zunächst durch PCR unter Verwendung des SYBR®Green PCR Kits (Roche) vervielfältigt.

Primer:

Sense-Primer: 5256_mEHD1_R398W_se: ACTCCCCTGCTTGGATAGTCT (10µM)

Antisense-Primer: 5257_mEHD1_R398W-as: CCTTGTCCACATCTGCCAAC (10µM)

Bestandteil des Reaktionsansatzes	Volumen pro Probe
SYBR® Green	10 µl
sense / antisense Primer (10µM)	je 1 µl
PCR-H ₂ O	7 µl
genomische DNA	1 µl
Σ	20 µl

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Aktivierung	94°C	10 min	32
Denaturierung	94°C	1 min	
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Lagerung	4°C		

Die entstandenen PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese (2µl PCR-Produkt + 1µl 6x Loading Dye + 3µl MilliQ-H₂O) mit einem 2%-igen Agarosegel auf ihre spezifische Größe kontrolliert. Sofern die entstandenen Banden den Erwartungen entsprachen, wurde das verbliebene PCR-Produkt mit dem HighYield PCR Purification Kit (Hersteller) nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und in 20 µl MilliQ-H₂O eluiert. Mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurden ein Sequenzieransatz hergestellt:

Bestandteil des Sequenzieransatzes	Volumen pro Probe
Aufgereinigtes PCR-Produkt	5 µl
sense-Primer 5256 (s.o.)	2 µl
PCR-H ₂ O	8 µl
Σ	15 µl

Die Sequenzierung wurde von der Microsynth Seqlab GmbH durchgeführt. Die Sequenzier-Ergebnisse wurden mit der ChromasLite® Software ausgewertet. Ausschlaggebend für die Beurteilung des Genotyps waren hierbei die drei Basen (XXX), die sich der ersten Nukleotidsequenz AGT TGT AGT TGT XXX anschlossen: "TGG" für *Ehd1*^{R398W/R398W}, "YGS" für *Ehd1*^{R398W/wt} und "CGC" für *Ehd1*^{wt/wt}.

3.2.2 Fixierung des Hodengewebes

Die Erfahrung hat gezeigt, dass die konventionelle Fixierung mit 3 % Paraformaldehyd über retrograde, arterielle Perfusion die besten Ergebnisse bei der Konservierung von Nierengewebe zeigt. Für die optimale Fixierung von Hodengewebe hat sich diese Methode jedoch als ungeeignet erwiesen: Hodenarterien sind äußerst empfindliche Gefäßstrukturen, die direkt von der Aorta abzweigen und durch die Präparation derselben sehr leicht beschädigt werden können. Stattdessen wurden die Mäuse in tiefer Narkose (2,5% Isofluran) dekapitiert, das Hoden- und Nebenhodengewebe entnommen und 24 Stunden lang bei 4°C in Bouin'schem Fixativ immersionsfixiert. Dieses Fixativ ist dafür bekannt, dass es Hoden- und Nebenhodengewebe sehr gut konserviert, da es Chromatinstrukturen im Kern bewahrt und die Möglichkeit bietet, mitotische und meiotische Figuren zu identifizieren. Nach der Fixierung wurde das Gewebe in 70%igem Methanol gelagert und entsprechend dem Einbettungsprotokoll weiterverarbeitet.

3.2.3 Aufbereitung von Bouin-fixiertem Gewebe, Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Da sich die Kryokonservierung von Hoden- und Nebenhodengewebe aufgrund der geringen Qualität der Gewebeerhaltung als ungeeignet erwies, wurde bevorzugt die Paraffineinbettung für die langfristige Konservierung der Gewebe verwendet. Die entnommenen, Bouin-fixierten Hoden und Nebenhoden wurden schrittweise nach folgendem Protokoll weiter verarbeitet:

Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
70 % Methanol	25 min	RT
80% Methanol	25 min	RT
90% Methanol	25 min	RT
100% Methanol	25 min	RT
100% 2-Propanol	25 min	RT
2-Propanol + Paraffin (1:1)	60 min	60°C
Paraffin	ü.N.	60°C
frisches Paraffin	60 min	60°C

Anschließend wurden die Gewebe unter Verwendung von Metallkassetten in Paraffin eingebettet und ausgehärtet. Für H.E.-Färbungen, PAS-Färbungen, RNAScope®- und Immunfärbungen wurden 5µm dicke Schnitte von in Paraffin-eingebettetem Gewebe auf Poly-Lysin- (für histologische und Immunfluoreszenzfärbungen; O. Kindler GmbH) oder Superfrost®-Objektträger (für RNAScope-Experimente; Thermo Scientific) aufgezogen und 30 min bei 40°C auf einer Heizplatte getrocknet, bis keine Wassereinschlüsse mehr zwischen Schnitt und Objektträger vorhanden waren.

3.2.4 Histologische Färbungen - Hämatoxylin/Eosin (H.E.)

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H.E.) ist eine bekannte, histologische Routinefärbung, welche eine Differenzierung bestimmter Gewebebestandteile anhand ihrer elektrischen Ladung ermöglicht. Hämatoxylin ist ein kationischer Farbstoff mit einer tief blau-violetten Farbe, der mit basophilen, negativ geladenen Komponenten in der Zelle reagiert, wie z. B. der DNA in Zellkernen oder Teilen des Zytoplasmas, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind. Im Gegensatz dazu ist Eosin ein anionischer Farbstoff mit einer leuchtend-roten Farbe, der mit azidophilen, positiv-geladenen Zellbestandteilen wie einem Großteil des Zytoplasmas und fibrösen, extrazellulären Bestandteilen reagiert.

Für die H.E.-Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten Geweben verwendet. Die Schnitte wurden deparaffiniert und rehydriert, indem sie zweimal 5 min in Xylol inkubiert wurden, gefolgt von 12 min in 99% Isopropanol und abnehmenden Konzentrationen von Ethanol (95%, 80%, 70%), ebenfalls für jeweils 12 Minuten. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in 1XPBS wurden die Objektträger für 3 min in Mayer's Hemalum inkubiert, das einen Komplex aus Aluminiumionen und dem Oxidationsprodukt von Hämatoxylin (Hämatin) darstellt. Durch Auswaschen oder „Bläuen“ der Schnitte in fließendem Leitungswasser wurde überschüssiges Hämalum entfernt, was zu der typischen tief blau-violetten Färbung führte. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 2 min mit 80% alkoholischer Eosinlösung inkubiert, gefolgt von kurzen Entwässerungsschritten in Ethanol steigender Konzentration (70%, 80%, 90%), 99%igem Isopropanol, sowie finaler Inkubation in Xylol für 2x 5 min. Die gefärbten Gewebe wurden mit Hilfe eines xylolbasierten Einbettmediums (DePex) auf den Objektträgern eingedeckelt.

3.2.5 Histologische Färbungen - Periodsäure-Schiff (PAS)

Die Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) ist eine häufig verwendete Färbemethode zum Nachweis von Polysacchariden wie Glykogen, Glykoproteinen und Glykolipiden. Die Periodsäure oxidiert Glykolgruppen zu Aldehydgruppen, während das Schiff'sche Reagenz – es enthält farblose, fuchsinschwefelige Säure - an diese Aldehydgruppen bindet und einen Farbumschlag induziert. Als Kontrastfärbung wurde Meyer's Hämalaun verwendet (siehe H.E. Färbung).

5 µm dicke Schnitte von Paraffin-Geweben wurden deparaffiniert und rehydriert, indem sie zweimal 5 min in Xylol inkubiert wurden, gefolgt von 12 min in 99% Isopropanol und abnehmenden Konzentrationen von Ethanol (95%, 80%, 70%), ebenfalls für jeweils 12 Minuten. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in 1XPBS wurden die Objektträger 10 Minuten lang mit 1%iger Periodsäurelösung beschichtet, um die Glykole zu Aldehyden zu oxidieren. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 1 Minute folgte eine 15-

minütige Inkubation mit Schiff'schem Reagenz, was den Farbumschlag induzierte. Überschüssiges Schiff'sches Reagenz wurde durch Spülen der Schnitte für 5 min mit Leitungswasser (37 °C) entfernt. Zur Kontrastfärbung wurden die Schnitte für 1 min in Mayer's Hämalaun (siehe oben) inkubiert. Es folgten ein letzter Waschschrift mit Leitungswasser für 5 min und kurze Dehydratisierungsschritte in Ethanol steigender Konzentrationen (70%, 80%, 90%), 99%igem Isopropanol und schließlich zweimal in Xylol für jeweils 5 Minuten. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines xylolbasierten Einbettmediums (DePex) auf den Objektträgern eingedeckelt.

3.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbung (IF) wird zum Nachweis zellulärer Komponenten, z.B. von Proteinen oder anderen Makromolekülen, in Gewebeproben verwendet und basiert auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, die durch spezifische Markierungsmoleküle, in der Regel Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore), sichtbar gemacht werden können. Diese Fluorophore können entweder an den primären (direkte IF) oder sekundären (indirekte IF) Antikörper gekoppelt sein. Mit ihrer Hilfe kann die intrazelluläre Verteilung, sowie die subzelluläre Lokalisierung des Zielproteins in verschiedenen Geweben oder Zellen genauer untersucht und in Kontext gebracht werden.

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Methoden der Immunfluoreszenz (IF) beschrieben. Die "direkte" IF erfordert einen einzigen Antikörper, der an das Zielprotein bindet und zum Nachweis direkt mit einem Fluorophor gekoppelt ist, während die "indirekte" IF auf Interaktion von zwei interagierenden Antikörpern beruht: Der erste, nicht konjugierte "primäre" Antikörper ist gegen das Zielprotein gerichtet, während der zweite, mit einem Fluorophor gekoppelte "sekundäre" Antikörper, gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Bindet nun der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper an den an der Zielstruktur haftenden Primärantikörper, so kann er mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert und die Zielstruktur sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an Paraffingewebe durchgeführt. 5 µm dünne Gewebeschnitte wurden zunächst deparaffiniert (2x 12 min in Xylol) und anschließend durch die Inkubation in 99% Isopropanol, sowie abnehmenden Konzentrationen von Ethanol (95%, 80%, 70%) für jeweils 12 Minuten rehydriert. Nach einem Waschschrift für 5 min in 1XPBS wurden die Objektträger 15 Minuten lang in Citratpuffer (pH 6,0) bei 95 °C (Wasserbad) aufgekocht, um unzugängliche Antigen-Epitope für den Primärantikörper zugänglich zu machen. Es folgte ein weiterer Waschschrift für 5 min in 1XPBS.

Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden mit Hilfe einer PBS-basierten Blocklösung für 10 Minuten abgesättigt, gefolgt von einem erneuten Waschschrift für 5 min in 1XPBS. Die

primären Antikörper wurden entsprechend der optimalen Verdünnung in PBS-basierter Antikörperverdünnungslösung verdünnt und die Gewebeschnitte damit überschichtet. Damit die Antikörperverdünnung auf den Schnitten verweilte, wurde mit Hilfe eines speziellen Fettstiftes eine Barriere gezogen. Die überschichteten Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Sekundärantikörper ebenfalls in Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Nachdem die Primärantikörper durch einen Waschschrift für 5 min in 1XPBS entfernt wurden, wurden die Gewebeschnitte mit den verdünnten Sekundärantikörpern überschichtet und eine Stunde lang unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Nach letztmaligem Waschen der Schnitte für 5 min mit 1XPBS war die Färbung beendet und die Schnitte wurden mit nicht-fluoreszierendem DAKO Mounting Medium eingedeckelt und zum Verfestigen des Mountingmediums im Kühlschrank aufbewahrt. Die Schnitte wurden standardmäßig kurz nach der Fertigstellung der Färbung mikroskopiert.

3.2.7 Richardson-Färbung von Epon-eingebetteten Semi-Dünnschnitten

Epon-eingebettete Semidünnschnitte (680nm) wurden durch die von Richardson et al. (1960) beschriebene Methylenblau-Azur II-Färbung gefärbt. Die Färbelösung setzte sich aus 1% Methylenblau in 1%-iger, wässriger Boraxlösung und 1% Azur II in Aqua dest. im Mischverhältnis 1:1 zusammen. Die Schnitte wurden auf Objektträger gelegt und bei 80°C auf der Heizplatte getrocknet. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einem Tropfen Färbelösung bedeckt und bei 80°C so lange gefärbt, bis die Färbelösung einen metallischen Rand bildete. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte mit Aqua dest. gespült, getrocknet und eingedeckelt. Die Richardson-Färbungen wurden von Helga Othmen (Institut für molekulare und zelluläre Anatomie, Universität Regensburg) durchgeführt.

3.2.8 Mikroskopie

Sowohl histologische Färbungen, als auch Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) unter Verwendung des 20x-Objektivs für Übersichtsaufnahmen und des 63x-Ölimmersionsobjektivs für eine detailliertere Ansicht analysiert. Von besonders wichtigen Färbungen wurden auch Übersichtsaufnahmen mit dem 63x Ölimmersionsobjektiv aufgenommen, jedoch nahm diese Methode sehr viel Zeit und sehr viel Speicherplatz in Anspruch. Die Auswertung erfolgte mit der Software ZEN 3.0 (Zeiss). Für den Fluorophor-Nachweis wurden, je nach verwendetem sekundären Antikörper, geeignete Anregungswellenlängen verwendet: 405 nm (für HOE33342), 488 nm (für Alexa Fluor® 488), 561 nm (für Alexa Fluor® 555) und 633 nm (für Alexa Fluor® 647 und Cy5). Die Emission wurde mit geeigneten Bandpassfiltern bei 450-517 nm, 493-542 nm, 562-640 nm und 638-755 nm nachgewiesen.

3.2.9 Isolation reifer Spermien aus der Cauda epididymidis

Wenn reife Spermien aus dem Hodenepithel freigesetzt werden, werden sie über die *ductuli efferentes* in den Nebenhoden transportiert, wo sie weiter modifiziert (Caput und Corpus epididymidis) und schließlich gelagert werden (Cauda epididymidis). Um die Morphologie und Beweglichkeit der Spermien zu untersuchen, wurden sie aus dem caudalen Abschnitt des Nebenhodens isoliert, um lediglich Spermien mit einem möglichst hohen Reifegrad zu untersuchen.

Die Mäuse wurden in tiefer Narkose (2,5 % Isofluran) durch Enthauptung getötet. Hoden und Nebenhoden wurden vorsichtig entnommen und voneinander getrennt, ohne das Gewebe zu quetschen. Der kaudale Teil der Nebenhoden wurde von Caput und Corpus abgetrennt, mehrmals mit einer kleinen Schere geschnitten und die Spermien in 500 µl SpermAir GM501-Medium von Gynemed® ausgewaschen, einem gebrauchsfertigen Medium für alle Spermienpräparationen, Spermienwaschungen und Swim-up-Tests, das die natürliche Bewegung und Aktivität der Spermien nicht beeinträchtigt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit, in der sich grobe Gewebestücke absetzten, wurden 100 µl des milchigen Überstands in ein neues Eppi mit 500 µl frischem SpermAir-Medium überführt. Je nach enthaltener Spermienkonzentration war eine zusätzliche Verdünnung nötig, um vereinzelte Spermien im Mikroskop erkennen zu können.

3.2.10 Vorbereitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Mäuse in tiefer Narkose (2,5% Isofluran) durch Enthauptung getötet. Hoden und Nebenhoden wurden vorsichtig entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in eine Fixierlösung aus 2 % Glutaraldehyd und 0,1 M Na-Cacodylat (pH 7,4) überführt. Die Gewebe wurden durch Spülen mit 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,4 (3 x 20 min), 1 % OsO₄ in 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,4 (2 h), 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,4 Kakodylsäure (3 x 20 min) nachfixiert und in ansteigenden Konzentrationen von Ethanol 50 % / 70 % / 90 % / 96 % / 100 % (jeweils 20 min) und schließlich in Aceton (3 x 15 min) dehydriert. Anschließend wurden die Proben in Epon eingebettet und dieses bei 60 °C 48 Stunden lang nach Standardprotokollen polymerisiert. Ultradünnschnitte wurden am EM902 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 80keV mikroskopiert und aufgenommen.

3.2.11 In-situ-Hybridisierung (RNAScope®)

Die Lokalisierung von mRNA-Expressionsstellen wurde mit dem RNAScope® Multiplex Fluorescent V2 Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Obwohl sich der Hersteller nicht zur Verwendung von Bouin-fixiertem Gewebe zur Durchführung des Assays

äußerte, wurde die Funktionalität des Kits auf diesem Gewebe in Testfärbungen bestätigt. Es wurden 5 µm dicke Schnitte von Bouin-fixiertem, Paraffingewebe verwendet, welche unmittelbar vor Beginn der Prozedur zur in-situ-Hybridisierung angefertigt wurden. Die Paraffinschnitte wurden anschließend für 1h im Brutschrank bei 60°C inkubiert und anschließend entparaffiniert (2x 5 min Xylol, 2x 2 min 100% Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte vollständig getrocknet (5 min bei 60°C im Brutschrank) und für 10 min bei RT mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bedeckt, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren. Das H₂O₂ wurde in einem Waschschrift mit Wasser entfernt und die Schnitte für 15min in Target-Retrieval-Lösung aufgekocht. Es folgte ein Waschschrift in Wasser, sowie in 99% Ethanol (p.A.) (3 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und über Nacht beim RT getrocknet. Am nächsten Tag folgten die Hybridisierungsschritte: Die Schnitte wurden zunächst mit ProteasePlus-Lösung aus dem Kit bedeckt und bei 40°C für 30 min im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Hybridisierungssonde appliziert und erneut für 2h bei 40°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die nachfolgenden Amplifikationsschritte wurden exakt nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Hybridisierungssignale wurden mit den TSA® Plus-Fluorophoren Cy3 und Cy5 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) nachgewiesen, und die Zellkerne wurden durch die DAPI-Lösung aus dem Kit gefärbt. Die fertigen Schnitte wurden mit ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) eingedeckelt und mit Hilfe des Axio Observer Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert.

3.2.12 Zellkultur

3.2.12.1 Induzierbares LLC-PK1-Zellmodell

Eine proximale tubuläre Nierenzelllinie vom Schwein (LLC-PK1) wurde als Hauptzellkulturmodell verwendet, um verschiedene Aspekte der EHD1-Interaktionen und -Funktion zu untersuchen. LLC-PK1-Zellen wurden von Dr. Enriko Klootwijk (Royal Free Hospital - Centre for Nephrology, London) entweder mit humanem Wildtyp (WT-EHD1) oder mutiertem EHD1 (R398W-hEHD1) stabil transfiziert. Die Genexpression wurde mit Hilfe eines Tet-On-Systems gesteuert: Die Zugabe von Tetracyclin (1 µg/ml) zum Medium für >48h bewirkt eine Aktivierung der Expression des transfizierten Gens durch Bindung an den Repressor, der die Hemmung des Genpromotors unter Abwesenheit von Tetrazyklin verhindert.

Die Zellen wurden in kleinen Zellkulturflaschen (T25) bei 37° und 5% CO₂ in einem geeigneten LLC-PK1-Medium kultiviert und gesplittet, wenn eine Konfluenz von 80-100% erreicht war. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden je 250.000 Zellen in mit Glasplättchen bestückte 6-Well-Platten ausgesät und für 24h kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch Tetrazyklin enthaltendes Medium ersetzt und für weitere 48h inkubiert.

3.2.12.2 Immunfluoreszenzfärbung von induzierten LLC-PK1-Zellen

Nach der Tetrazyklin-Induktion für mindestens 48 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden dreimal mit 1XPBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 4% PFA in 1XPBS (pH 7,4) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal mit 1XPBS gewaschen, gefolgt von einem Demaskierungs-/Permeabilisierungsschritt mit 0,1 % SDS in 1XPBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Nach weiteren drei Waschschritten mit 1XPBS wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen durch Zugabe von Blocklösung für 10 min bei RT abgesättigt. Es folgte erneut ein Waschschriff von 3x 5min. Die primären Antikörper wurden entsprechend ihrer optimalen Arbeitskonzentration in Antikörperverdünnungslösung verdünnt und die Zellen damit für eine Stunde bei 4°C unter Lichtausschluss überschichtet. Anschließend wurde die Verdünnung an Primäantikörpern entfernt, die Zellen dreimal in 1XPBS gewaschen und die sekundären Antikörper im Verhältnis 1:400 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss folgte ein letzter, dreimaliger Waschschriff, durch welchen ungebundene sekundäre Antikörper entfernt werden sollten. Zuletzt wurden die Glasplättchen mit den gefärbten Zellen durch nicht-fluoreszierendes DAKO Mounting Medium auf Glasobjektträger überführt und ausgehärtet.

3.2.12.3 Mitochondrienfärbung an LLC-PK1-Zellen mittels MitoTracker™ Orange CMTMRos

Mitochondrielle Strukturen wurden mit Hilfe des MitoTracker™ Orange CMTMRos-Farbstoffs angefärbt. Die MitoTracker™ Farbstoffe diffundieren passiv über die Plasmamembran und akkumulieren schließlich in aktiven Mitochondrien, wobei der hier verwendete MitoTracker™ Orange anders als der MitoTracker™ Green oder Red selbst nach Fixierung der Zellen in den Mitochondrien detektierbar bleibt. 250.000 stabil-transfizierte LLC-PK1 WT-hEHD1 und R398W-hEHD1-Zellen wurden pro Well einer mit Glasplättchen bestückten 6-Well-Platte in LLC-PK1-Medium ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch Induktionsmedium (1 µg/ml Tetrazyklin) ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 Stunden induziert. MitoTracker™ Orange wurde in Leibowitz-Medium auf eine Endkonzentration von 250 nM verdünnt, das Induktionsmedium von den Zellen entfernt und durch die MitoTracker™ Orange-Verdünnung ersetzt. Die Zellen wurden für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die MitoTracker™-Verdünnung entfernt, die Zellen mit dreimal mit 1XPBS gewaschen und anschließend durch 4% PFA in 1XPBS (pH 7,4) für 10 min fixiert. Erneut folgten drei Waschschriffe mit 1XPBS, bevor die Gläschen auf Objektträgern unter Verwendung des DAKO Mounting Medium eingedeckelt wurden.

3.2.13 DeadEnd™ Fluorometrisches TUNEL-System (Promega)

Das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System von Promega ist ein typischer TUNEL-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung apoptotischer Zellen. Obwohl es viele verschiedene Arten der Apoptose gibt, ist die DNA-Fragmentierung ein indikatives Ereignis, das bei allen Formen auftritt. Dieser Assay detektiert DNA-Fragmentierung katalytisch durch den Einbau von Fluorescein-12-dUTP an den 3'-OH-Enden der DNA mit Hilfe von TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase), wobei ein polymerer Schwanz nach dem klassischen TUNEL-Prinzip (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) gebildet wird. So können DNA-Strangbrüche durch ihr grün fluoreszierendes Signal aufgrund der Fluorescein-12-dUTP-Markierung nachgewiesen werden. Das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System wurde an Paraffin eingebettetem, Bouin-fixiertem Hodengewebe gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.2.14 Statistik

Alle statistischen Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Anzahl der Beobachtungen wurde mit "n" betitelt. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde – sofern nicht anders angegeben - der ungepaarte *Student's t-Test* verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde akzeptiert, um statistische Signifikanz anzuzeigen, was durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet wurde. Die Statistiken wurden mit der Software Origin 2022 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Zuchtstatistik

Der Zuchtversuch mit männlichen, homozygoten *Ehd1*^{-/-} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen mit weiblichen Mäusen unterschiedlicher Genotypen über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten brachte keinerlei Nachkommen hervor, wie der folgenden Zuchtstatistik entnommen werden kann (Abbildung 15):

n	Genotyp der Elterntiere		Nachkommen						ges.
	Weibchen	Männchen	<i>Ehd1</i> ^{wt/wt}	<i>Ehd1</i> ^{wt/-}	<i>Ehd1</i> ^{-/-}	<i>Ehd1</i> ^{wt/wt}	<i>Ehd1</i> ^{R398W/wt}	<i>Ehd1</i> ^{R398W/R398W}	
6	<i>Ehd1</i> ^{wt/-}	<i>Ehd1</i> ^{wt/-}	60 (28%)	132 (61,7%)	22 (10,3%)				214
1	<i>Ehd1</i> ^{-/-}	<i>Ehd1</i> ^{wt/-}	0	4 (80%)	1 (20%)				5
3	<i>Ehd1</i> ^{wt/wt}	<i>Ehd1</i> ^{-/-}	0	0	0				0
7*	<i>Ehd1</i> ^{R398W/wt}	<i>Ehd1</i> ^{R398W/wt}				39 (21,7%)	91 (50,6%)	50 (27,7%)	180
1*	<i>Ehd1</i> ^{R398W/R398W}	<i>Ehd1</i> ^{R398W/wt}				0	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11
2	<i>Ehd1</i> ^{R398W/wt}	<i>Ehd1</i> ^{R398W/R398W}				0	0	0	0

ABBILDUNG 15: Zuchtstatistik. Die Zuchtstatistik verdeutlicht die Unfähigkeit männlicher *Ehd1*^{-/-} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse, Nachkommen zu zeugen. Die Tiere wurden für mindestens 3 Monate mit fertilen Weibchen verpaart, die zuvor schon mindestens einen Wurf hervorgebracht haben. Im Gegensatz zu den Männchen sind homozygote *Ehd1*^{-/-} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Weibchen dennoch fertil, was darauf hindeutet, dass sich die Auswirkungen der eingeschränkten oder veränderten EHD1-Funktion auf die männliche Reproduktion beschränkt. Die Tabelle wurde aus Issler et al, 2022 übernommen und aktualisiert (Issler et al. 2022). "n" bezeichnet die Anzahl der Zuchtpaare, die in der Statistik berücksichtigt sind. Manche Zuchtpaare brachten mehrere Würfe hervor (*), die in der Statistik erfasst wurden.

Weibliche, homozygote *Ehd1*^{-/-} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse hingegen waren durchaus in der Lage, Nachkommen zu gebären, was darauf hindeutet, dass die Auswirkungen der Mutation nur die männlichen Fortpflanzungseigenschaften beeinträchtigten. Bei den vorliegenden knockout und knockin-Mausmodellen, die ursprünglich zur Untersuchung der Auswirkungen eines Funktionsverlustes bzw. einer Funktionsänderung des Ehd1-Proteins im Hinblick auf den Nieren- und Innenohrphänotyp der Patienten geschaffen wurden, lag somit zusätzlich als weiterer Phänotyp Infertilität vor, deren Ursachen weiter untersucht werden mussten.

4.2 Auswirkungen der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mutation auf die männlichen Geschlechtsorgane und die Spermatogenese

4.2.1 Gewichtsbestimmung von Hoden und Nebenhoden - Präparation von Hoden, Nebenhoden und Seminaldrüsen

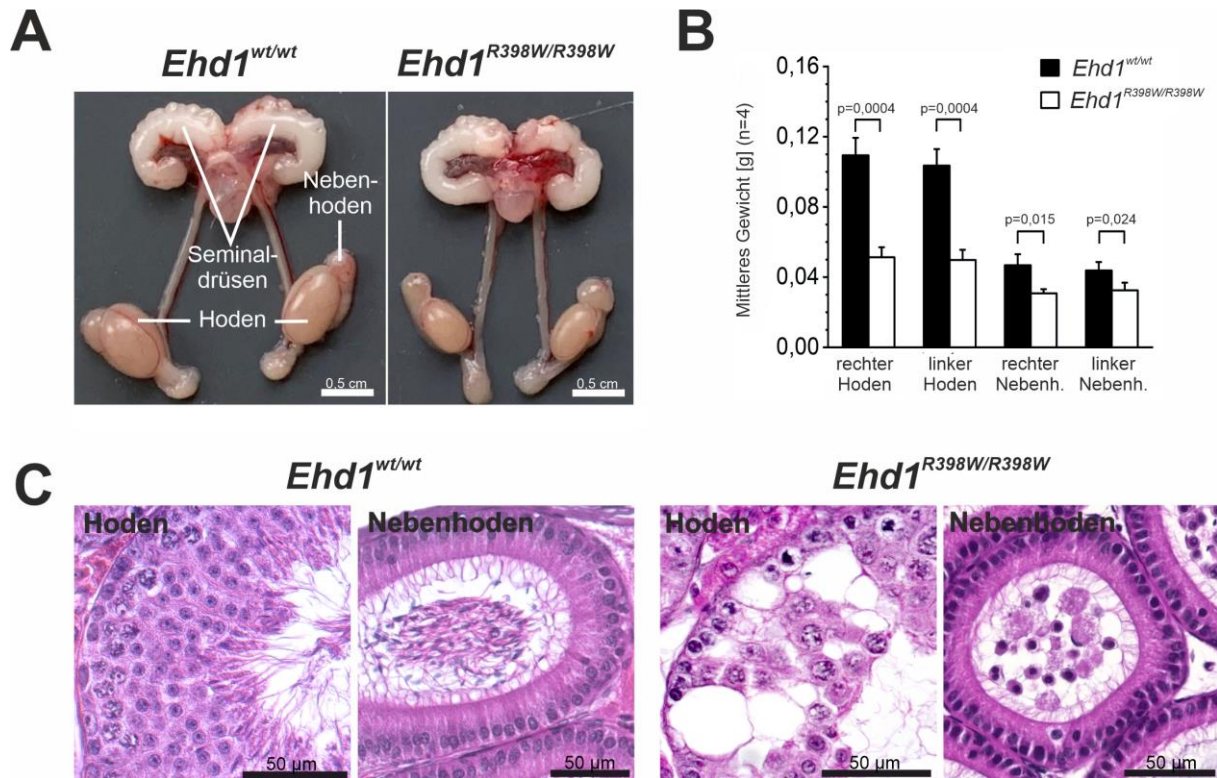


ABBILDUNG 16: Auswirkungen der Mutation auf die männlichen Geschlechtsorgane. (A) Präparationen der männlichen Geschlechtsorgane zeigten verkleinerte Hoden und Nebenhoden bei *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die Seminaldrüsen schienen nicht betroffen. Maßstab: 0,5 cm. (B) Gewichtsbestimmungen der Hoden und Nebenhoden bestätigten diese Beobachtung. Maßstab: 50µm (C) Histologische Übersichtsfärbungen des Hoden- und Nebenhodengewebes zeigten massive Zerstörungen im Samenepithel der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse. Im Lumen der Nebenhodengänge wurden anstelle reifer Spermien unreife Spermiovorläufer sichtbar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

Eine vergleichende Gewebepreparation der männlichen Fortpflanzungsorgane zeigte einen deutlichen Unterschied in Größe und Gewicht der Hoden und Nebenhoden von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (*Ehd1*^{wt/wt}). Die Seminaldrüsen hingegen schienen nicht betroffen zu sein (Abbildung 16A). Die statistische Analyse ergab ein signifikant verringertes Gewicht der Hoden und Nebenhoden der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse (Abbildung 16B). Hämatoxylin/Eosin-Färbungen (H.E.) an Bouin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Hoden- und Nebenhodengeweben (Abbildung 16C) zeigten massive Zerstörungen in fast allen angeschnittenen Hodentubuli. Große, löchrige Abschnitte durchzogen das Epithel und die Verteilung der vorkommenden Zelltypen unterschied sich augenscheinlich vom Wildtyp. Die Gesamtzahl an Zellen war drastisch reduziert und die massiven epithelialen Defekte erschwerten eine genauere Eingrenzung der zu Grunde liegenden Probleme.

In den Nebenhodengängen konnte anstatt der typischen, stromlinienförmigen Spermien eine große Menge unreifer Vorläuferzellen beobachtet werden, was zunächst auf eine vorzeitige Ablösung aus dem Hodenepithel hindeutete.

4.2.2 Histologische Beurteilung der mutationsbedingten Defekte im Spermatogenesezyklus mittels H.E.-Färbung

Anhand histologischer Übersichtsfärbungen wie der Hematoxylin/Eosin-Färbung lassen sich die einzelnen Zelltypen, sowie charakteristische Strukturen im Hodenepithel darstellen.

Die folgenden Übersichtsaufnahmen kompletter Hodenquerschnitte von *Ehd1^{wt/wt}* und *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen ließen bereits auf den ersten Blick deutliche Unterschiede in den Grundstrukturen der Tubulus-Querschnitte erkennen (Abbildung 17).

Bei der *Ehd1^{wt/wt}*-Maus waren die einzelnen Samenkanälchen klar voneinander abgrenzbar. Es ergab sich ein harmonisches Gesamtbild und der epitheliale Aufbau benachbarter Samenkanälchen variierte je nach aktuellem Spermatogenese-Stadium, in dem sich die einzelnen Tubuli befanden. Die Spermatogenese-Stadien waren problemlos bestimmbar. Im Vergleich dazu enthüllte das beinahe „löchrige“ Erscheinungsbild des Hodenquerschnitts der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus das gesamte Ausmaß des Schadens: Die schwere Zerstörung und die massive, epitheliale Unordnung ließen keine Zuordnung zu bestimmten Spermatogenese-Stadien zu. Die Zusammenstellung und die Lokalisation der Zellen im Epithel variierte stark und folgte keinem festgelegten Schema.

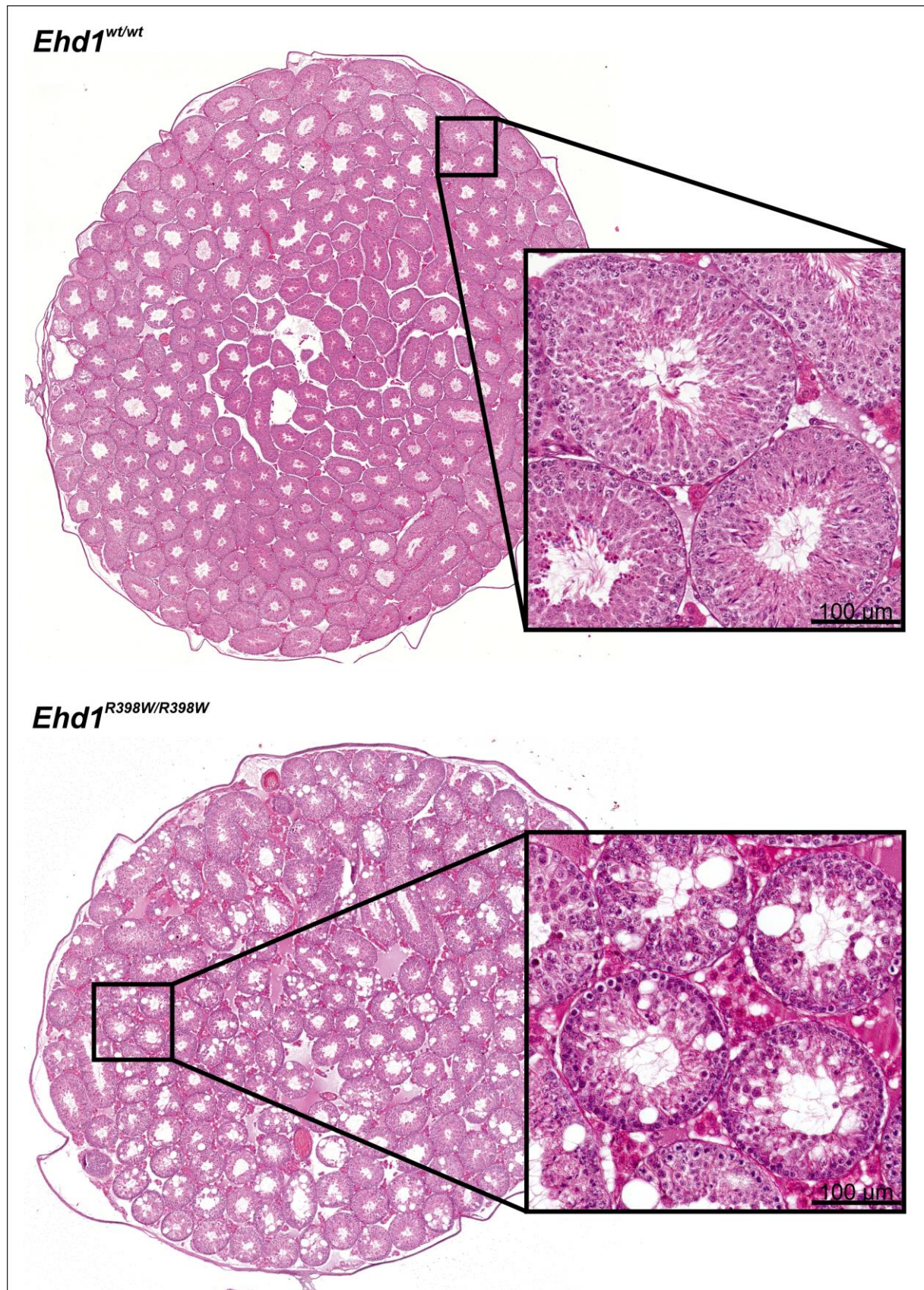


ABBILDUNG 17: Histologische Übersichtsfärbung ganzer Hodenquerschnitte. Die H.E.-gefärbten Übersichtsaufnahmen von kompletten Hodenquerschnitten zeigten das ganze Ausmaß der Zerstörung, die sich über nahezu alle Samenkanälchen der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus erstreckte. Das löchrig erscheinende Epithel unterschied sich deutlich vom homogen wirkenden Epithel des Wildtyps. Ein genauer Blick auf die vergrößerten Bereiche erlaubte für die *Ehd1*^{wt/wt}-Maus eine eindeutige Zuordnung zu den entsprechenden Spermatogenesestadien, da die vorherrschenden Zelltypen eindeutig identifiziert werden konnten. Das Epithel

erschien homogen und im Tubuluslumen waren Anteile der Spermenschwänze erkennbar. Der hohe Zerstörungsgrad des Samenepithels der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse machte eine eindeutige Stadienidentifikation unmöglich. Das Auftreten und die Lokalisation bestimmter Zelltypen waren verändert, was eine Beeinträchtigung des gesamten Spermatogenese-Prozesses vermuten ließ. Im Lumen der Tubuli waren Anteile von Spermenschwänzen zu erkennen, die jedoch im Gegensatz zum Wildtyp in keinerlei Verbindung mit reifen, elongierten Spermienköpfchen standen. Maßstab: 100 µm.

Die im Epithel vorkommenden Zelltypen und die mutationsbedingten Veränderungen wurden durch eine Richardson-Färbung an Semi-Dünnschnitten (680nm) von Epon-eingebetteten Hoden nochmals detailliert dargestellt. Durch die geringe Schnittdicke in Kombination mit der typischen Blaufärbung ließen sich vor allem die Kernstrukturen besonders gut darstellen. Abbildung 18 zeigt je einen repräsentativen Tubulusausschnitt, von *Ehd1^{wt/wt}*, *Ehd1^{R398W/R398W}* und *Ehd1^{-/-}*-Mäusen.

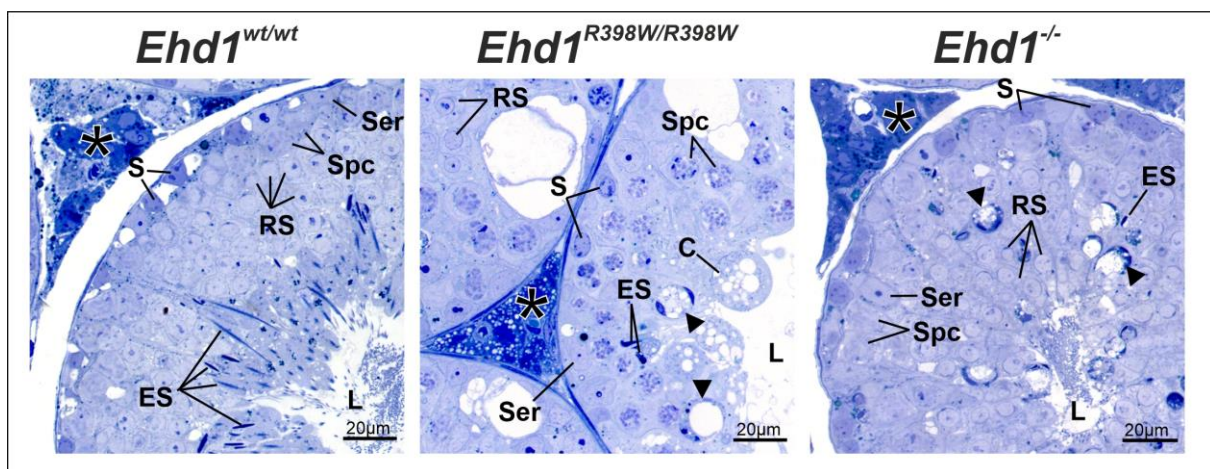


ABBILDUNG 18: Richardson-Färbung des Hodenepithels. Richardson-Färbungen an Semi-Dünnschnitten verdeutlichen nochmals die Unterschiede im Erscheinungsbild des Samenepithels von *Ehd1^{wt/wt}*, *Ehd1^{R398W/R398W}* und *Ehd1^{-/-}*-Mäusen. Obwohl sich die Arbeit auf das knockin-Mausmodell konzentriert, wurde hier vergleichend auch das knockout-Mausmodell dargestellt. Der Wildtyp zeigte reife, elongierende Spermatiden (ES) mit stark kondensierten Kernen im Bereich des Tubuluslumens (L). In unmittelbarer Nähe zur Basalmembran waren Spermatogonien (S) und Kerne von Sertoli-Zellen (Ser) zu sehen, während Spermatocyten (Spc) und runde Spermatiden (RS) mittig im Epithel lokalisiert waren. Die um die Tubuli liegenden Leydig-Zellen (*) zeigten das typische Erscheinungsbild. Im stark veränderten, löchrigen Samenepithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus konnten nur einige wenige Zelltypen eindeutig identifiziert werden und es wurden massive Veränderungen der epithelialen Ordnung deutlich. Besonders auffällig waren große, rundliche, cytoplasmatische Strukturen, die möglicherweise defekte Keimzellstrukturen wie malformierte Kerne zeigten (Pfeilkopf). Derartige Strukturen konnten auch im Samenepithel der *Ehd1^{-/-}*-Maus beobachtet werden. Maßstab: 20µm.

Das Samenepithel der Wildtyp-Maus zeigte die erwarteten Zelltypen, die in ihrer Gesamtheit eine eindeutige Identifikation des Spermatogenese-Stadiums zuließen. Basal fanden sich Spermatogonien (S) und Sertoli-Zellkerne (Ser), während Spermatocyten (Spc) und runde Spermatiden (RS) die Mitte des Epithels füllten. Elongierende Spermatiden (ES) orientierten sich bereits in Richtung Lumen (L). Die hormonproduzierenden Leydig'schen Zwischenzellen (*) lagen zwischen den Tubuli seminiferi. Die mutationsbedingte Störung der tubulären Architektur erschwerte die Stadien-Identifikation bei der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus immens. Die Anzahl an Spermatogonien, die normalerweise in unmittelbarer Nähe zur Basalmembran lokalisiert sind, war deutlich reduziert, und einige der vorhandenen Zellen wiesen Malformationen auf. Die regelrechte Ordnung des Epithels erschien aufgebrochen. Ins

Tubuluslumen (L) erstreckten sich Zytoplasma-Blasen, die hin und wieder fehlgeformte, stark-kondensierte Kerne elongierender Spermatoziden, sowie weitere fehlerhafte, schwer definierbare Strukturen enthielten.

Im *Ehd1*^{-/-}-Hoden, der hier ergänzend dargestellt wurde, war die Einteilung der Stadien ebenfalls erschwert, allerdings erschien das Epithel weniger zerstört als in der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus. Auffällig war das vermehrte Auftreten runder, stark-gefärbter Strukturen (Pfeilspitzen) im adluminalen Kompartiment, die jenen Strukturen im Epithel der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus sehr ähnlich waren. Möglicherweise enthielten sie fehlgeformte Zellkomponenten, die aufgrund möglicher Dysfunktionalität zum Abbau vorgesehen waren.

Die zur Aufrechterhaltung der Spermatogenese wichtigen Leydig-Zellen im Hodeninterstitium waren bei allen drei Genotypen vorhanden. Ihr Aussehen erschien mutationsbedingt leicht verändert, da bei der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus im Gegensatz zu den anderen beiden Genotypen viele kleine, helle Einschlüsse beobachtet werden konnten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine gesteigerte Lagerung von Lipiden, die während des Fixierungs- und Einbettungsprozesses auf dem Gewebe ausgewaschen wurden. Die Leydig'schen Zwischenzellen der *Ehd1*^{-/-}-Maus zeigte ein ähnliches Erscheinungsbild wie im Wildtyp-Hoden.

4.3 Beurteilung der mutationsbedingten Veränderung der Ehd1-Expression

4.3.1 Abhängigkeit der Ehd1-Expression im Samenepithel vom Spermatogenese-Stadium

Um die zugrundeliegenden Probleme, die durch die Mutation im *Ehd1*-Gen im Hinblick auf die Spermatogenese entstehen, zu identifizieren, wurde zunächst die normale Expression des Ehd1-Proteins im Samenepithel einer Wildtyp-Maus genauer untersucht.

Hierfür wurden einzelne Tubuli aus dem Hodengewebe isoliert, in Bouin'schem Fixativ für 1h fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Paraffinschnitte wurden angefertigt und nach dem beschriebenen Färbeprotokoll für Immunfluoreszenzfärbungen gefärbt (Abbildung 19).

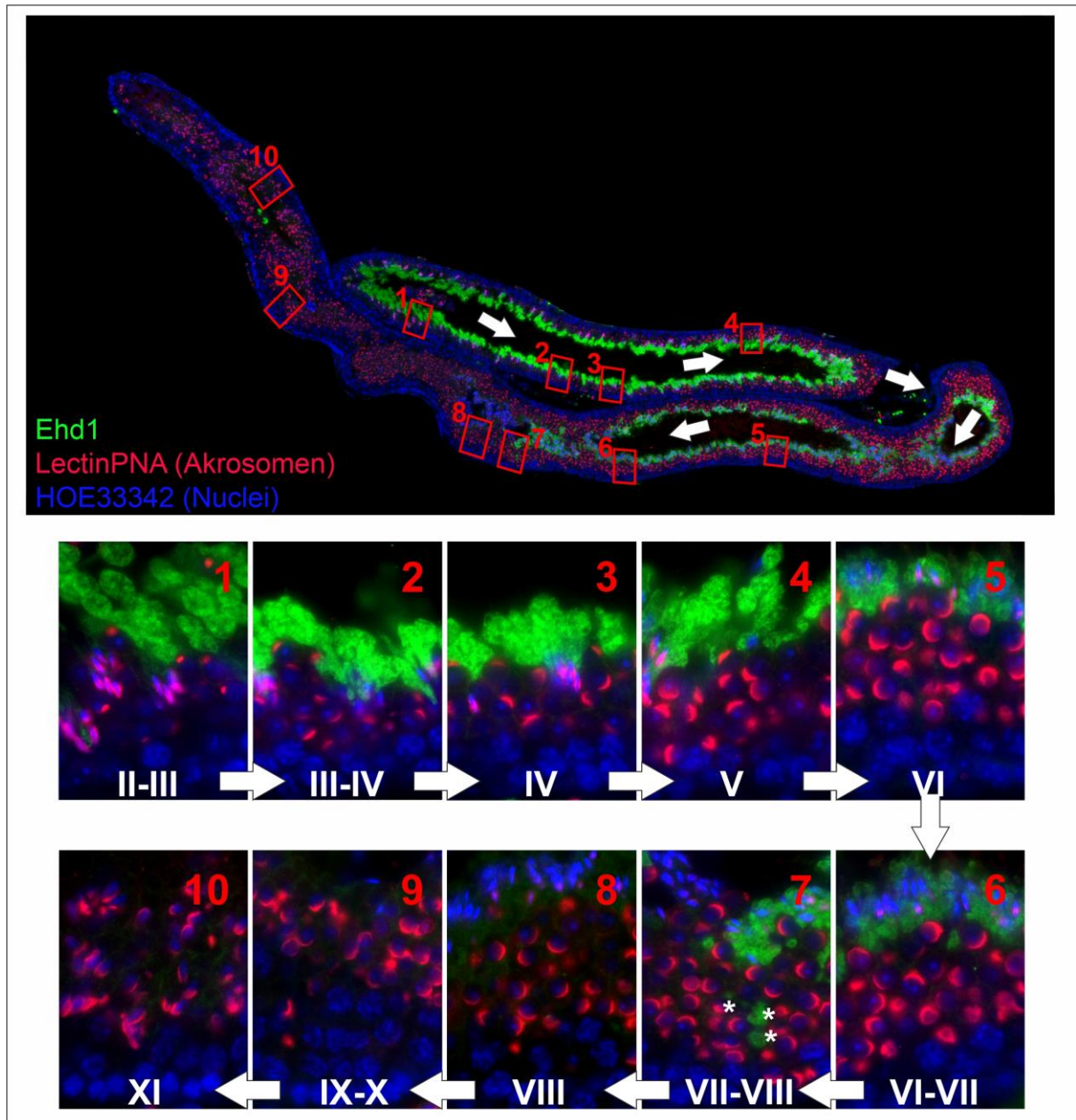


ABBILDUNG 19: Ehd1-Proteinexpression im isolierten Tubulus. Ein einzelner Hodentubulus wurde aus dem Verband isoliert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Abbildung zeigt einen Längsschnitt dieses Tubulus, in dem Wildtyp-Ehd1 (grün), die Akrosomen (rot) und die Zellkerne (blau) sichtbar gemacht wurden. Es wurden zehn Bereiche (1-10) vergrößert dargestellt, die den Verlauf der Spermatogenese, sowie die Veränderungen der Ehd1-Proteinexpression und -lokalisation zeigen. Dabei wurden die Abschnitte so dargestellt, dass sich die Basalmembran unten und das Tubuluslumen oben im Bild befinden. Auch der Verlauf der Akrosomenbiogenese in ihren einzelnen Stadien wurde deutlich. In Abbildung 1 (Stadium II-III) zeigte sich Ehd1 in zytoplasmatischen Strukturen in unmittelbarer Nähe zum Lumen. Im weiteren Verlauf veränderte sich die Lokalisation nicht, jedoch verstärkte sich die Expression fortlaufend. Unmittelbar vor der Spermiation (Stadium VII-VII) konzentrierte sich die Ehd1-Expression zunehmend um die reifen Spermatozoa, die sich am Tubuluslumen aufreihen (Stadium VI-VII). Ausschnitt 7 verdeutlichte, dass die Ehd1-Expression nach der Ablösung komplett erlosch (Stadium IX-XI). Ehd1-positive Strukturen – bei welchen es sich vermutlich um abgeschiedenes Zytoplasma handelte – wurden von Sertoli-Zellen phagozytiert und konnten mittig im Epithel detektiert werden (*). Die Ehd1-Expression zeigt einen stadienabhängigen Verlauf, was darauf hindeutet, dass das Protein zu bestimmten Zeitpunkten während der Keimzellreifung eine besondere Rolle spielt. Grün: Ehd1, Rot: LectinPNA (Akrosomen), Blau: HOE33342 (Zellkerne).

Abbildung 19 zeigt einen längsgeschnittenen Hodentubulus, in dem die Verlaufsrichtung der Spermatogenese durch weiße Pfeile gekennzeichnet wurde. In grün ist das Ehd1 Protein dargestellt, während die rote Färbung (LectinPNA) die Akrosomen in ihren unterschiedlichen

Entwicklungsstadien zeigt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe des Zellkernfarbstoffes HOE33342 in blau markiert. Entlang dieses Tubulus wurden insgesamt zehn Abschnitte vergrößert abgebildet (1-10). Die entsprechenden Spermatogenese-Stadien wurden nach den Kriterien von Meistrich & Hess identifiziert und als römische Ziffern angegeben.

Das Ehd1-Protein zeigt eine starke Expression in unmittelbarer Nähe zum Tubuluslumen. Anhand des Durchlichtbildes (nicht dargestellt) zeigte sich, dass es sich bei den Ehd1-positiven, rundlichen Strukturen um das Zytoplasma elongierender Spermatisden handelt, welches im Zuge der Spermiation abgeschieden und durch die Sertoli-Zellen phagozytiert wird. Ziel dieses Abscheidungsprozesses ist es, nicht mehr benötigte Zellorganellen zu eliminieren und durch die damit erreichte Kompaktheit eine maximale Beweglichkeit der Spermien zu gewährleisten. Je weiter sich die heranreifenden Keimzellen diesem Stadium nähern, desto mehr nimmt die Ehd1-Expression zu, bis sie nach erfolgreicher Ablösung der reifen Spermatozoa aus dem Epithel schließlich vollends erlischt (Bild 7, Stadium VII). Ehd1-positive, zytoplasmatische Überreste, die im Epithel verblieben und phagozytiert wurden, konnten beobachtet werden (*). Das Protein scheint in zeitlich streng definierten Prozessen der Spermatognese - und dabei hauptsächlich während der Spermiogenese - eine wichtige Rolle zu spielen.

Um vergleichend zur Proteinexpression auch die Expression der Ehd1-mRNA im Verlauf der Spermatogenese beurteilen zu können, wurden konsekutive Paraffinschnitte von Hodengewebe einer Wildtyp-Maus angefertigt. Mit Hilfe dieser Technik konnten die exakt gleichen Tubulusabschnitte mit einem Versatz von 5µm (entspricht der Dicke eines Paraffinschnittes) auf unterschiedliche Art und Weise untersucht werden. Während das Protein erneut über Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt wurde, konnte die mRNA über die sog. RNAScope® Technologie sichtbar gemacht werden. Aus Übersichtsaufnahmen beider Färbungen wurden identische Tubulusquerschnitte ausgewählt, vergrößert und vergleichend zueinander abgebildet (Abbildung 20). Die Übersichtsaufnahmen sind im ergänzenden Material (Ergänzende Abbildung 2) dieser Arbeit hinterlegt.

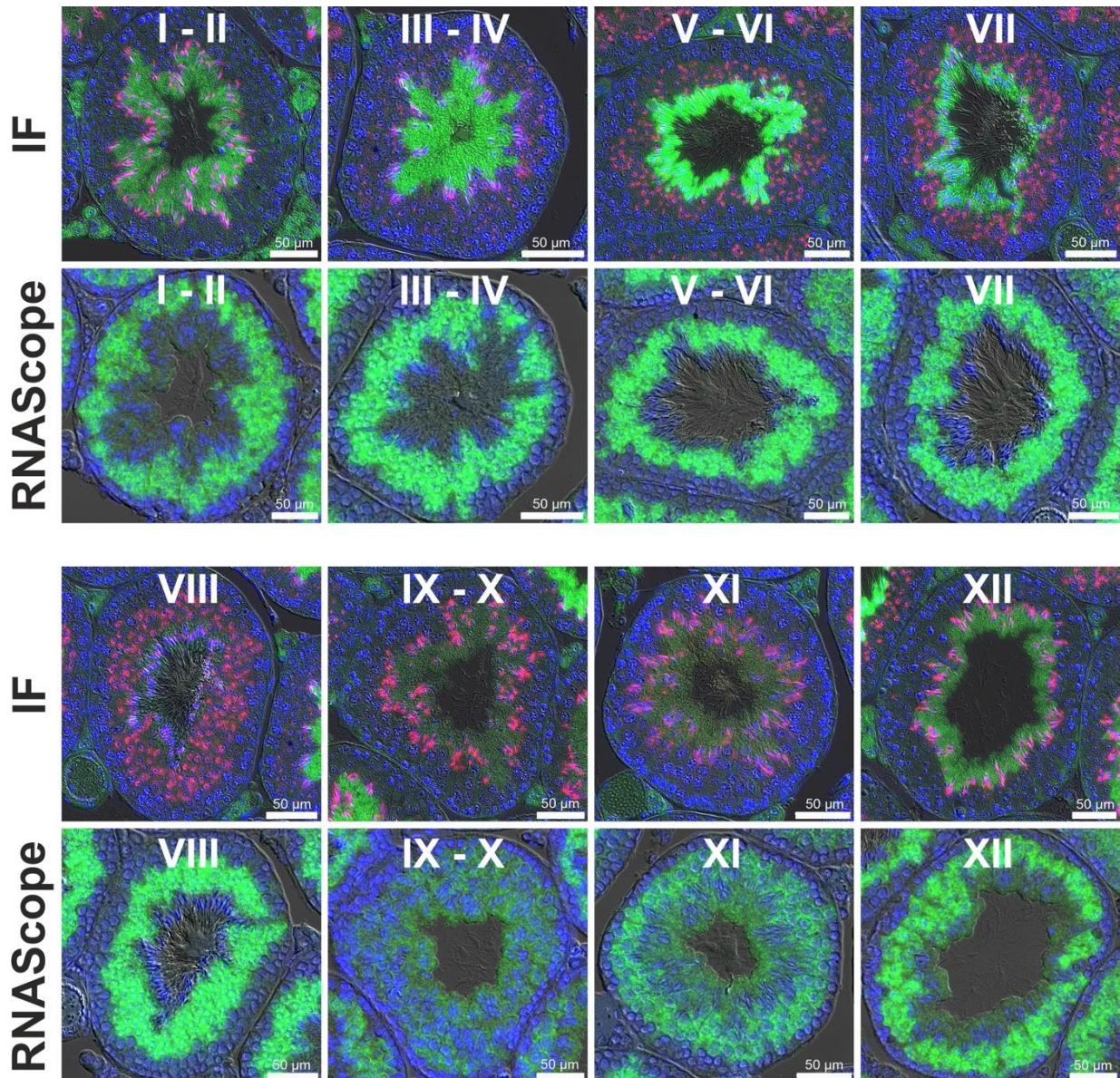


ABBILDUNG 20: Gegenüberstellung der Expressionsmuster von Ehd1-Protein und -mRNA. Immunofluoreszenzfärbungen (obere Reihe, IF) und RNAScope® (untere Reihe) an Bouin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Hodengewebe einer Wildtyp-Maus sind vergleichend dargestellt. Untereinander angeordnete Bilder stellen Konsekutivschnitte dar und zeigen den Querschnitt desselben Hodentubulus. Das Ehd1-Protein (grün, obere Reihe) zeigte ein stadienabhängiges Auftreten mit maximaler Intensität in den Stadien V–VII. Ehd1-mRNA (grün, untere Reihe) hingegen wurde hauptsächlich mittig im Epithel und nahe den runden Spermatisden detektiert. Obwohl sich auch hier eine Stadienabhängigkeit zeigte, wurde eine gewisse Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression festgestellt. Die Stadien wurden mit Hilfe der Lectin-PNA-Färbung und nach den Richtlinien von (Meistrich und Hess 2013) beurteilt. Grün: Ehd1 (Protein oder mRNA), rot: LectinPNA (Akrosomen), blau: HOE33342 (HOE33342). Maßstab: 50 µm.

Ehd1-mRNA und Ehd1-Protein zeigten stadienabhängige Expressionsmuster innerhalb des Spermienepithels: Während die mRNA vor allem im Bereich runder Spermatisden in der Mitte des Epithels lokalisiert war, wurde das Protein an unterschiedlichen Stellen detektiert. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen im isolierten Tubulus (Abbildung 19) konnte das Ehd1-Protein hauptsächlich im Zytoplasma der reifen Spermatisden gefunden werden, die sich stetig in Richtung Tubuluslumen bewegten. Das Ehd1-Protein war dort unmittelbar nach Ablösung der Spermatozoen aus dem Epithel (Stadium VIII) kaum mehr detektierbar. Mit Fortschreiten der Spermatogenese nahm die Proteinexpression wieder zu (X-XII) und

erreichte zu den Stadien VI-VII erneut das Maximum. Auch für die Ehd1-mRNA wurde ein stadienabhängiges Expressionsmuster beobachtet, jedoch weniger ausgeprägt und mit einer gewissen zeitlichen und räumlichen Diskrepanz zur Proteinexpression. Diese Abweichung lässt sich damit erklären, dass zahlreiche Gene im Zuge der Spermatogenese einer sog. Translationsverzögerung unterliegen. Wie bereits Braun et al. im Jahr 1998 feststellten, wird die aktive Transkription von Genen während der Keimzellreifung eingestellt, sobald es zum Austausch von Histonen durch Protamine und damit zur Verdichtung des Chromatins im Zellkern kommt. So produzieren die runden Spermatiden in ihren frühen Stadien, in denen die Erbinformation noch uneingeschränkt zugänglich ist, eine große Menge mRNA's, von denen viele jedoch erst an späteren Punkten der Spermiogenese in Protein übersetzt werden (Braun 1998).

Des Weiteren konnte das Ehd1-Protein in unmittelbarer Nähe zu primären Spermatozyten und frühen, runden Spermatiden detektiert werden. Während Spermatozyten ihre letzte meiotische Teilung durchlaufen müssen, um haploide Zellen zu werden, ist das Zellstadium der runden Spermatiden durch zahlreiche Differenzierungsprozesse wie die Akrosomenbiogenese und die Entwicklung des Spermischwanzes gekennzeichnet. Dies sind Ereignisse, die bekannterweise stark von der Endozytose abhängen und möglicherweise die unterstützende Aktivität von Ehd1 benötigen. Die Lokalisation von Ehd1-positiven Strukturen an runden Spermatiden ist aufgrund der kleinen Vergrößerung in dieser Darstellung nicht erkennbar, wird aber in Abbildung 28 in Verbindung mit der Akrosomenbiogenese nochmals genauer dargestellt.

4.3.2 Auswirkungen der Mutation auf die Ehd1-Expression

Der direkte Vergleich zweier Übersichtsbilder des Hodengewebes von *Ehd1^{wt/wt}*- und *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen (Abbildung 21) zeigte die drastischen, mutationsbedingten Veränderungen im Expressionsmuster des Ehd1-Proteins. Während die Ehd1-Expression beim Wildtyp zweifellos den entsprechenden Stadien der Spermatogenese zugeordnet werden konnte, war eine solche Zuordnung aufgrund der Mutation nicht mehr möglich. Das mutierte Ehd1 zeigte sich stadienunabhängig in großen, runden, vesikulären Strukturen - vermutlich zytoplasmatische Vesikel - oder in tubulären Strukturen, die jedoch keine Verbindung zu anderen, zellulären Bestandteilen aufwiesen. Weiter machte die LectinPNA-Färbung akrosomale Malformationen deutlich.

Die mutationsbedingte Konformationsänderung des Ehd1-Proteins schien nicht nur dessen Expressionsverhalten, sondern auch die Wechselwirkung mit anderen zellulären Bestandteilen grundlegend zu beeinträchtigen.

4.4 Charakterisierung isolierter Spermien aus der *Cauda epididymidis*

Wie bereits in Abbildung 16C deutlich wurde, lösten sich – vermutlich bedingt durch multiple Störungen während der Keimzellreifung - unreife Zellstadien aus dem Samenepithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse und erreichten die Lagerstätte der Spermien – die *Cauda epididymidis*. Bei einer normal ablaufenden Spermatogenese werden die vollends differenzierten, aber noch nicht befruchtungsfähigen Spermien bis zu ihrem "Einsatz" in der *Cauda epididymidis* - dem letzten Abschnitt des Nebenhodens - zwischengelagert. Im Hinblick auf die unzureichende Ausreifung der Spermiovorläufer im Samenepithel von *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen wurde der Inhalt des caudalen Teiles des Nebenhodens isoliert, um festzustellen, welches Reifestadium die Zellen aufwiesen, die hier gelagert wurden. Für diese Untersuchung wurden Hoden und Nebenhoden entnommen, vorsichtig voneinander getrennt, der caudale Teil des Nebenhodens separiert und in SpermAir®-Medium - einem Spezialmedium, dessen Inhaltsstoffe die natürliche Motilität der Spermien erhalten soll – aufgenommen. Nach mehrfachem Einschneiden der *Cauda* wurde der Inhalt vorsichtig ausgespült, große Gewebestücke abzentrifugiert und der Überstand unter dem Mikroskop begutachtet (Abbildung 22). Das Fehlen spezieller Apparaturen zur Beurteilung der Spermienbewegung (wie beispielsweise *computer-assisted semen analysis (CASA)*-Apparaturen) erschwerte die Untersuchung des Schwanzschlags und der Motilität erheblich, sodass die isolierten Spermien lediglich fotografiert und nicht gefilmt wurden.

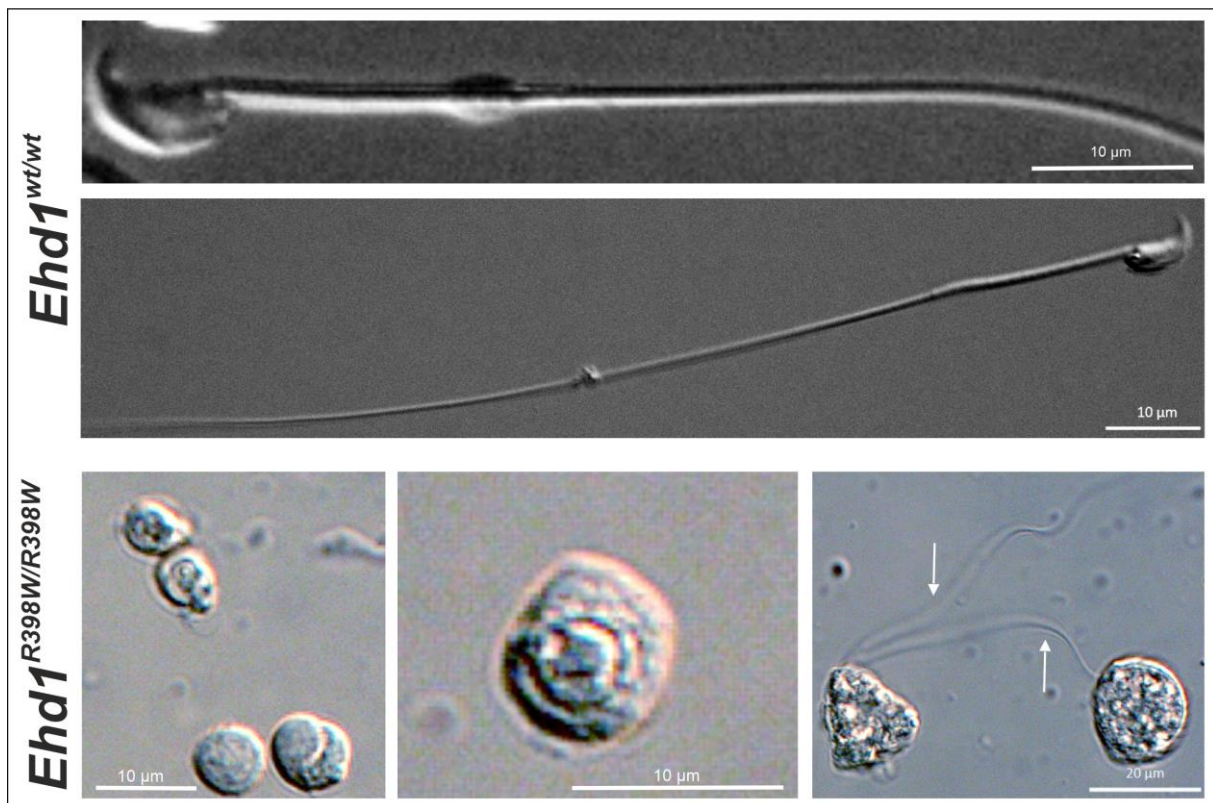


ABBILDUNG 22: Darstellung isolierter Spermien (-vorläufer) aus der *cauda epididymidis*. Isolierte Spermien aus dem caudalen Teil des Nebenhodens einer *Ehd1^{wt/wt}*-Maus zeigten das typische, stromlinienförmige Aussehen

mit sichelförmigem Kopf, dem das Akrosom aufsitzt, und dem langen Flagellum, dessen unterschiedlichen Anteile zum Teil sogar im Durchlichtbild zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu konnten aus dem Nebenhoden der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus praktisch keine typischen Spermien isoliert werden. Stattdessen zeigten sich runde Zellen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um unreife Spermiovorfänger oder phagozytierende Zellen handelte. Sie wurden vermutlich vorzeitig aus dem Samenepithel ausgelöst. Teilweise ließen sich runde Spermatiden (mittleres Bild) und spermischwanz-ähnliche Strukturen (rechtes Bild) erahnen. Maßstab: 10µm / 20µm

Bereits im Durchlicht-Bild zeigte sich deutlich, dass aus dem caudalen Teil des Nebenhodens von *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen größtenteils unreife Vorläuferzellen anstelle reifer Spermien isoliert werden konnten. Vermutlich handelt es sich hierbei um runde Spermatiden und/oder Spermatozyten. Der gelappte Kern dieser Zellen erweckte den Anschein, dass es sich alternativ auch um Makrophagen handeln könnte. Teilweise ließen sich untypische, Spermischwanz-artige Strukturen (Pfeile) erkennen, die scheinbar wahllos mit amorphen Zellmaterial assoziiert waren. Im Gegensatz dazu konnten aus dem Nebenhoden der *Ehd1^{wt/wt}*-Maus reife Spermien isoliert werden, welche das charakteristische Aussehen muriner Spermien zeigten.

Anschließend wurden die Spermien bzw. Spermiovorfänger fixiert und nach einem angepassten Protokoll für Immunfluoreszenzfärbungen auf spezielle Marker gefärbt (Abbildung 23 & 24). Nachdem das Expressionsmuster im Hodenepithel zunächst vermuten ließ, dass *Ehd1* nach der Ablösung der reifen Spermatozoa aus dem Epithel im abgeschiedenen Zytoplasma verblieb und von den Sertoli-Zellen phagozytiert wurde, war es nun daran zu überprüfen, ob *Ehd1* auch an strukturell-ausgereiften Spermien detektiert werden konnte. Die Immunfluoreszenzfärbung der Spermien aus der Cauda epididymides von *Ehd1^{wt/wt}*-Mäusen zeigte eine deutliche Ko-Lokalisation von *Ehd1* im Bereich des Akrosoms, aber auch im Bereich der mitochondriellen Scheide des Spermischwanz-Mittelstücks, die durch den TOM20-Antikörper angefärbt wurde. Da die Entstehung des Spermischwanzes als Ziliogenese gesehen werden kann und die Beteiligung von EHD1 an diesem Prozess bereits mehrfach berichtet wurde, wäre es denkbar, dass auch die Spermischwanz-Entstehung durch die *Ehd1*-Funktion unterstützt wird. Weiterhin muss die Anordnung der Mitochondrien um das Spermischwanz-Mittelstück koordiniert werden. Überflüssige Zellorganellen werden innerhalb des umgebenden Zytoplasmas neu organisiert, umgelagert und abgeschieden, sodass lediglich für den späteren Flagellenschlag essentiell wichtige Strukturen zurückbleiben. Auch hier könnte *Ehd1* unterstützend mitwirken.

Die unreifen Keimzellen aus dem Nebenhoden der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus zeigten deformierte, akrosomale Strukturen, die sich als eine Art Kapsel um eine der Zellen erstreckten. TOM20 als Marker der mitochondriellen Scheide konnte zwar detektiert werden, allerdings ohne erkennbare Verbindung zu spezifischen, spermischwanzartigen Strukturen. Auch das mutierte *Ehd1* wurde in runden oder tubulären Aggregaten lokalisiert, jedoch ohne erkennbaren Bezug zu den akrosomalen oder mitochondriellen Strukturen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die eingeschränkte *Ehd1*-Funktion möglicherweise

mit Beeinträchtigungen während der Entstehung des Akrosoms, sowie dem Aufbau akzessorischer Spermischwanzstrukturen in Verbindung gebracht werden könnte.

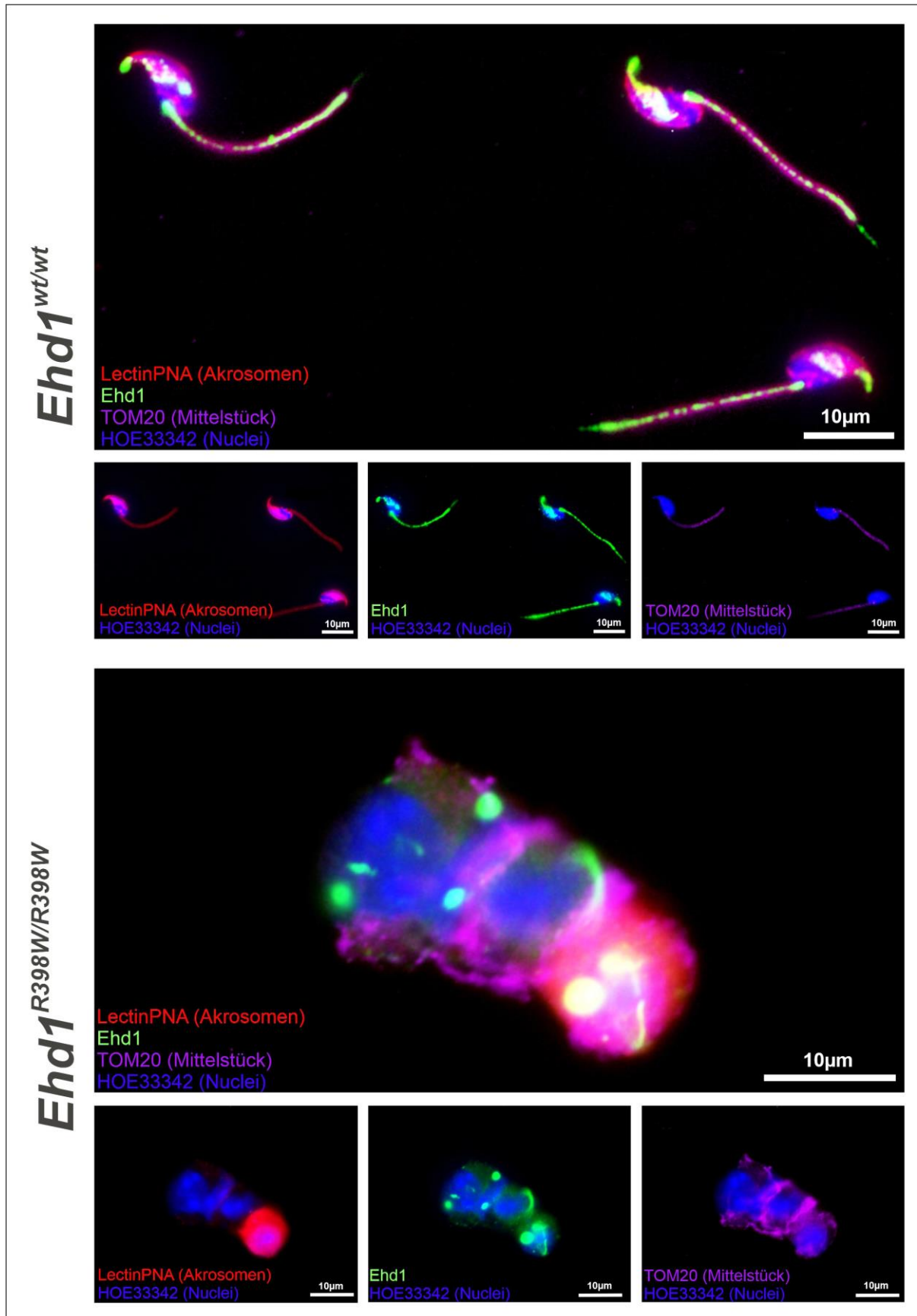


ABBILDUNG 23: Immunfluoreszenz-Färbung isolierter Spermien (-vorläufer) aus der *Cauda epididymidis*. Immunfluoreszenzfärbungen von isolierten Spermien bzw. Vorläuferzellen aus der *Cauda epididymidis* von *Ehd1*^{wt/wt}- und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen zeigten, dass Ehd1 nicht nur im Samenepithel während der Spermatogenese, sondern auch in reifen Spermien vorhanden war. Isolierte Wildtyp-Spermien zeigten eine deutliche Ko-Lokalisation von Ehd1 und dem Akrosom sowie mit dem mitochondrienreichen Mittelstück des

Spermienschwanzes, welches durch den TOM20-Antikörper sichtbar gemacht wurde. Der hier dargestellte Zellverband, der aus dem Nebenhoden einer *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus isoliert wurde, zeigte deutlich, dass die Ehd1-Variante weder mit akrosomalen Strukturen, die lediglich an einer einzigen Zelle nachgewiesen werden konnten, noch mit strukturell-veränderten Anteilen des Mittelstücks assoziiert war. Die akrosomale Malformation und die beeinträchtigte Spermienschwanzentstehung könnten möglicherweise eine Folge der veränderten bzw. eingeschränkten Funktion von Ehd1 darstellen. Grün: Ehd1 (Wildtyp oder Mutante), rot: LectinPNA (Akrosomen), lila: TOM20 (Spermienschwanzmittelstück), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 10µm.

Da neben dem mitochondrienreichen Mittelstück auch das Hauptstück des Spermienschwanzes eine essentielle Bedeutung für den Flagellenschlag und die Motilität des Spermiums einnimmt, wurde auch diese Struktur durch Verwendung eines AKAP4-Antikörpers durch Immunfluoreszenz-Färbung überprüft. Das *A-Kinase Anchoring Protein 4* (AKAP4) wird als eine bedeutende Strukturkomponente der fibrösen Scheide gesehen und kann somit zur Markierung des Hauptstücks verwendet werden.

Die Wildtyp-Spermien zeigten die erwarteten Färbungen der einzelnen Strukturen: Das sichelförmige Akrosom wurde in rot, die mitochondrielle Scheide des Mittelstücks durch den TOM20-Antikörper in lila und das lange Hauptstück durch den AKAP4-Antikörper in grün dargestellt. Die LectinPNA-Färbung konzentrierte sich größtenteils auf das Akrosom, allerdings wurde eine leichte Färbung (wahrscheinlich unspezifische Färbung) auch im Mittelstück festgestellt. TOM20 und AKAP4 überlagerten sich nicht, was hinsichtlich der strikten Trennung von mitochondrieller und fibröser Scheide zu erwarten war. Ein einzelner isolierter Spermiovorläufer aus dem Nebenhoden der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus zeigte eine ausgeprägte, aber untypisch geformte akrosomale Struktur, die eine Beeinträchtigung in frühen Stadien der Akrosomenbiogenese widerspiegeln könnte. Spermienschwanzähnliche Strukturen konnten nicht detektiert werden. Mit Verweis auf die Herkunft der abgebildeten Zelle, die aus dem caudalen Teil des Nebenhodens isoliert wurde, handelt es sich bei der dargestellten Zelle sehr wahrscheinlich um ein rundes Spermatid, welches frühzeitig aus dem Epithel abgeschieden wurde. Auch TOM20- und AKAP4-positive Strukturen konnten im marginalen Bereich des Zellkerns bzw. mittig zum Zellkern nachgewiesen werden, jedoch nicht in ihrer typischen Position im Spermienschwanz.

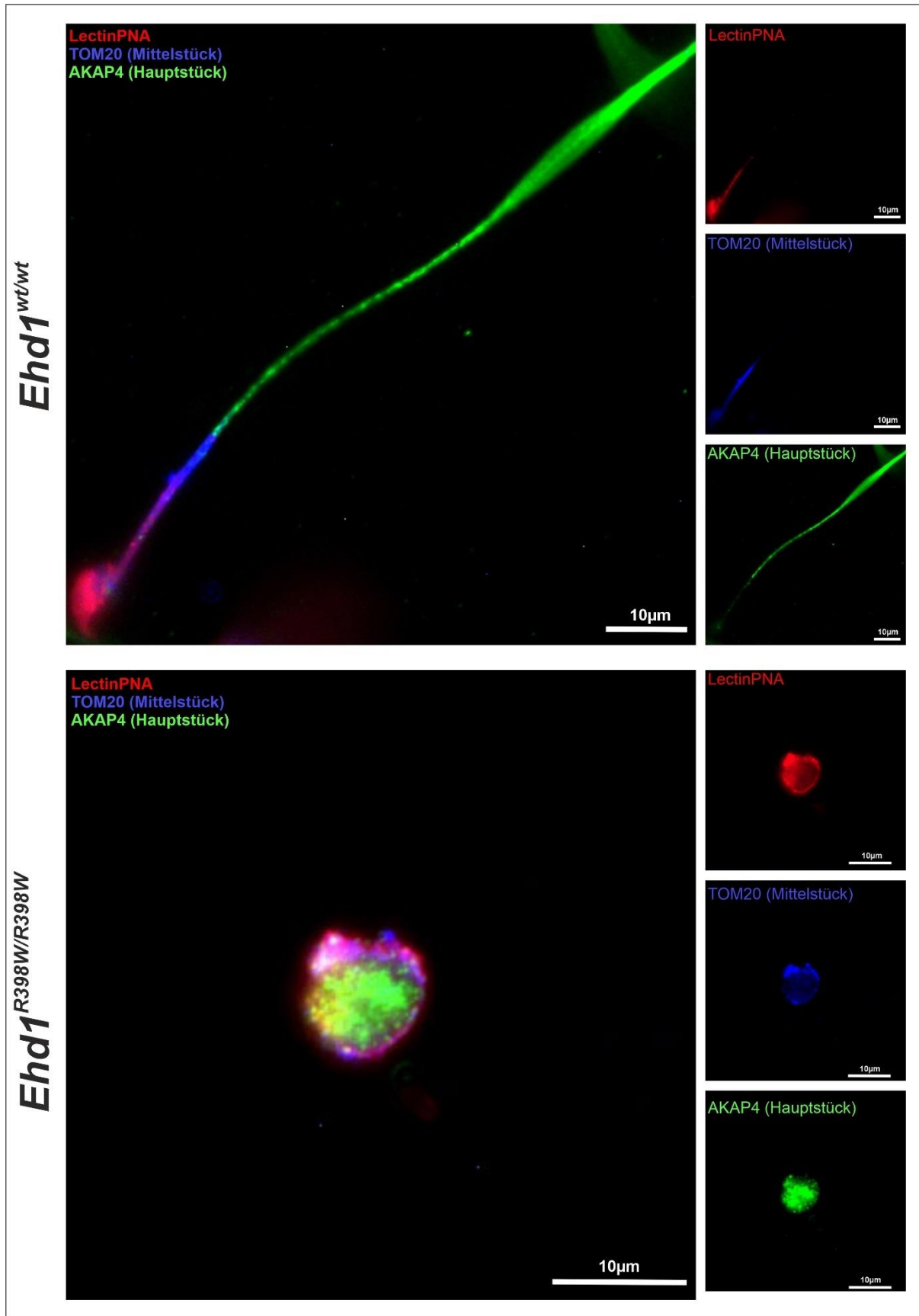


ABBILDUNG 24: Immunfluoreszenzfärbung isolierter Spermien (-vorläufer) aus der Cauda epididymidis – II. Isolierte Spermien bzw. Spermiovorläufer aus der Cauda epididymidis einer *Ehd1*^{wt/wt}- und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich der Ausprägung essentieller Bestandteile des Spermenschwanzes untersucht. Repräsentativ für eine Vielzahl an isolierten Wildtyp-Spermien zeigt das hier dargestellte Spermium den typischen Schwanzaufbau mit dem mitochondrienreichen Mittelstück (TOM20), sowie

dem langen Hauptstück mit einer durchgängigen fibrösen Scheide, die mit Hilfe des AKAP4-Antikörpers sichtbar gemacht wurde. Unter Verwendung von LectinPNA wurde zusätzlich das sichelförmige Akrosom dargestellt. Der isolierte Spermiovorläufer hingegen zeigte neben seiner rundlichen, unterentwickelten Form auch keinerlei Ansätze eines Flagellums, obwohl TOM20-, als auch ausgeprägte AKAP4-positive Strukturen detektiert werden konnten. Malformierte, akrosomale Strukturen akkumulierten um den Zellkern. Rot: LectinPNA (Akrosomen), blau: TOM20 (Spermischwanzmittelstück), grün: AKAP4 (Spermischwanzhauptstück). Auf die Zellkernfärbung wurde verzichtet. Maßstab: 10µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine eindeutige Co-Lokalisation von Ehd1 und dem Akrosom sowie dem Mittelstück des Flagellums in reifen Spermien vorliegt. Inwiefern diese räumliche Nähe auch eine Interaktion darstellt, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse sind nicht im Stande, reife Spermien zu produzieren. Stattdessen sind im kaudalen Teil des Nebenhodens unreife Vorläuferzellen zu finden, die sich vermutlich vorzeitig aus dem Samenepithel gelöst haben. In diesen Zellen lag das mutierte Ehd1 in aggregierten Strukturen vor, die keinerlei Überlagerung zu akrosomalen oder flagellaren Strukturen zeigten. Akrosomale und spermischwanzspezifische Bestandteile konnten zwar – wenn auch strukturell stark verändert - detektiert, aber nicht den typischen Strukturen zugeordnet werden.

4.5 Gewichtsverlauf während der frühen, postnatalen Entwicklung

In Anlehnung an Rainey et al., die in ihren ausführlichen Untersuchungen zu einem *Ehd1*-knockout-Mausmodell über eine erhöhte Rate an neonataler Letalität, sowie über Entwicklungsverzögerungen von der Geburt bis zum Erwachsenenalter berichteten (Rainey et al. 2010), wurde die postnatale Entwicklung weiblicher und männlicher *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse im Hinblick auf die Gewichtszunahme innerhalb der ersten 25 Tage nach Geburt (days post partum; dpp) untersucht (Abbildung 25).

Die neugeborenen Jungtiere wurden durch eine Tattoowierung markiert und in den nachfolgenden ersten 25 Lebenstagen gewogen. Die Datenerhebung wurde verblindet durchgeführt, da die Genotypen der Mäuse erst nach dem letzten Wiegeetag ermittelt wurden. Um das Stresslevel für das Muttertier und die Jungtiere möglichst klein zu halten, wurden die Tiere nicht jeden Tag, sondern an festgelegten Wochentagen gewogen. Dies hatte aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der Geburt zur Folge, dass nicht für alle Tiere derselbe Wiegezeitpunkt abgedeckt werden konnte. Entsprechend wurden die Daten mehrerer Tage zusammengefasst und gemittelt. Um geschlechtsspezifische Unterschiede erfassen zu können, wurde für männliche und weibliche Mäuse ein separates Diagramm angefertigt.

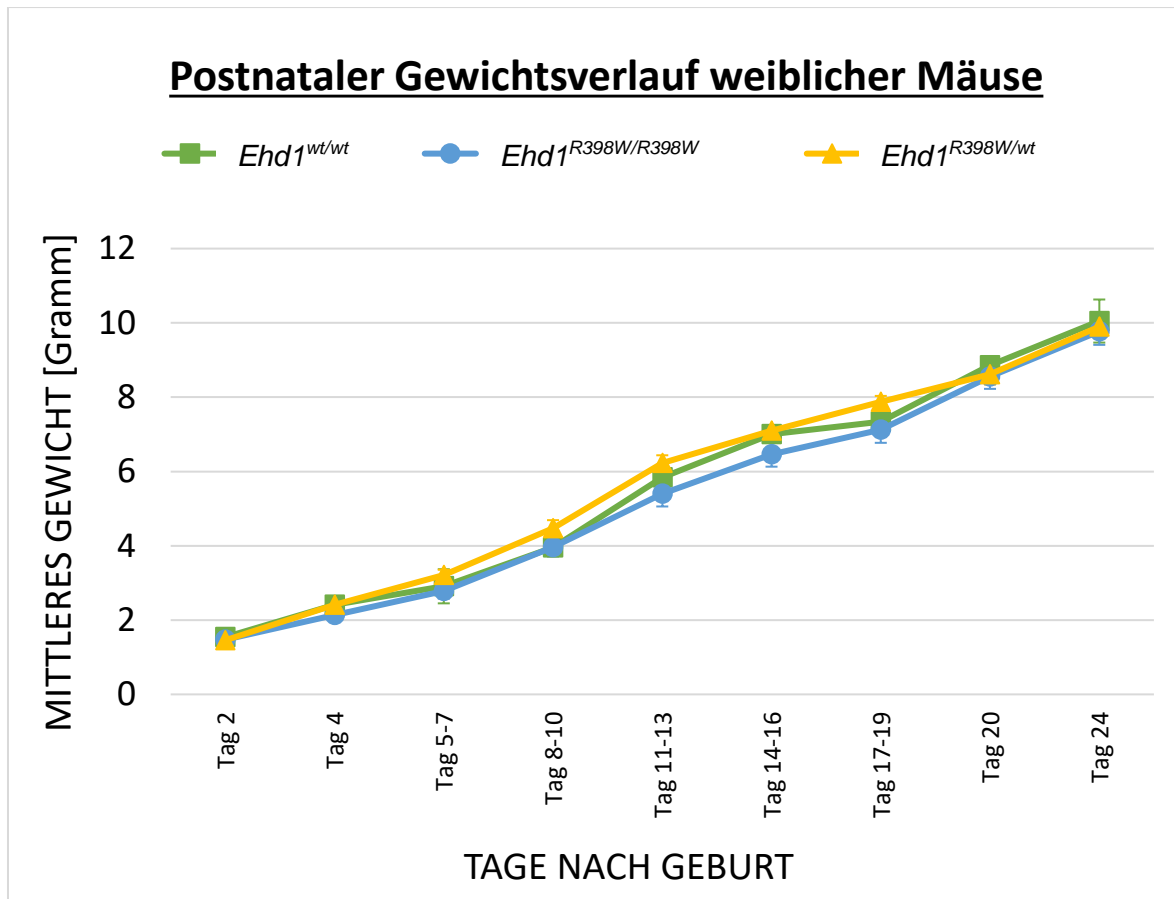
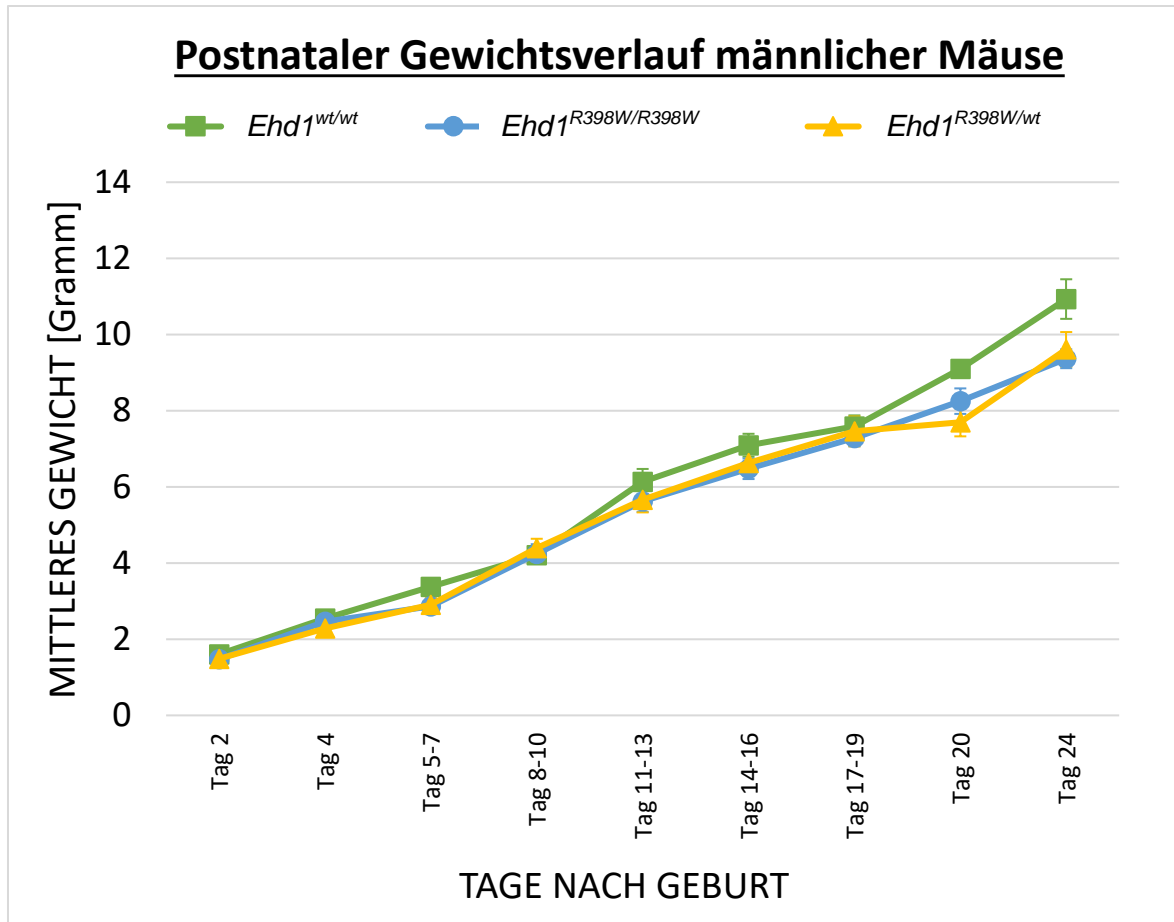


ABBILDUNG 25: Postnataler Gewichtsverlauf. Während sich bei den weiblichen Nachkommen keine Unterschiede im postnatalen Gewichtsverlauf zwischen den Genotypen feststellen ließen, konnte bei den Männchen ein tendenziell reduziertes Gewicht der heterozygoten und homozygoten Mutationsträger (*Ehd1*^{R398W/wt} und *Ehd1*^{R398W/R398W}) festgestellt werden, welches sich bis zum Ende der Messreihe am postnatalen Tag 24 stetig verdeutlichte. Eine statistische Signifikanz konnte nicht festgestellt werden. Die Grafik zeigt die Mittelwerte (männliche Mäuse: n=3-14; weibliche Mäuse: n=1-11) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Wenn auch ohne statistische Signifikanz - zeichnete sich unter den männlichen Mäusen ab Tag 11-13 ein tendenziell leicht reduziertes Gewicht der homozygoten (*Ehd1*^{R398W/R398W}) und heterozygoten (*Ehd1*^{R398W/wt}) Mäuse im Vergleich zum Wildtyp ab. Dieser Gewichtsunterschied blieb auch mit fortschreitendem Alter erhalten. Bei den weiblichen Mäusen zeigten sich keine relevanten Unterschiede.

4.6 Zeitliche Eingrenzung des Einsetzens mutationsbedingter Beeinträchtigungen der Spermatogenese

Das erhebliche Ausmaß der Zerstörung des Hodenepithels bei erwachsenen *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen erschwerte es, die durch die Mutation verursachten Pathomechanismen bei der Spermatogenese zu identifizieren. Der hohe Grad der Zerstörung ließ keine Unterscheidung zwischen Ursache und Folge zu. Um dieses Problem umgehen und den Beginn des spermatogenen Versagens in Zusammenhang mit der *Ehd1*-Mutation zu klären, wurden verschiedene postnatale Entwicklungsstadien des Samenepithels im zeitlichen Verlauf genauer untersucht (Abbildung 26).

Wie bereits erwähnt, verläuft die Spermatogenese bei Mäusen als asynchrone Welle entlang der Tubuli unter der Kontrolle verschiedener Hormone und Retinolsäure (Griswold 2016; Endo et al. 2017). Jeder Zyklus nimmt dabei eine Dauer von 8,6 Tagen in Anspruch. Für die Entwicklung eines reifen Spermatozoon aus einem Spermatogonium sind insgesamt 35 Tage (4 Zyklen) erforderlich (Oakberg 1956). Innerhalb dieser ersten 35 Tage post partum wurden vier Zeitpunkte (8, 14, 25 und 35 dpp) zur Durchführung detaillierter Untersuchungen gewählt, wobei auf die spezifischen Zelltypen, den Entwicklungsfortschritt, das Expressionsmuster des *Ehd1*-Proteins, sowie den Beginn der Störungen der Spermatogenese geachtet wurde.

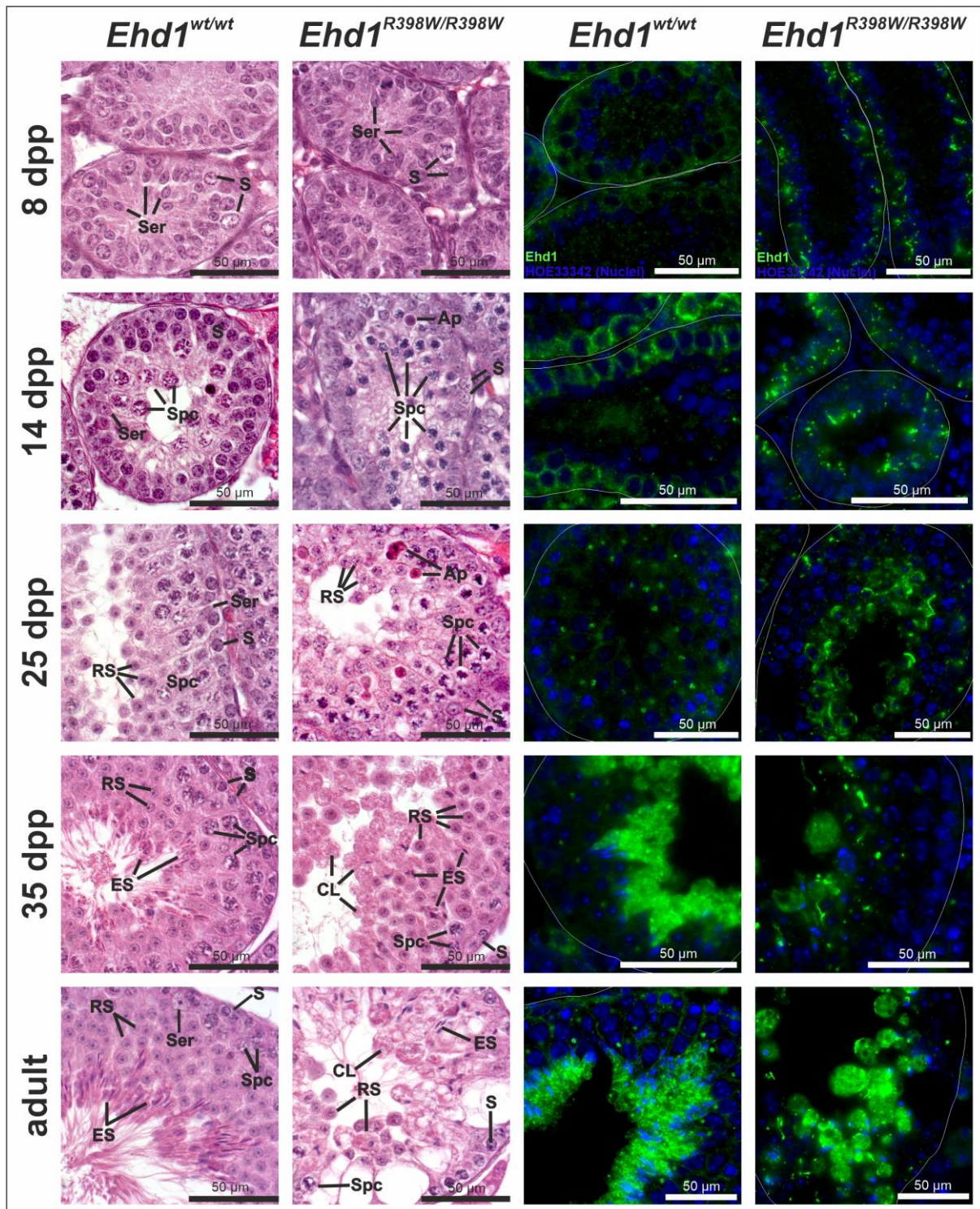


ABBILDUNG 26: H.E.- und Immunfluoreszenzfärbung postnataler Zeitpunkte. Histologische H.E.- und Immunfluoreszenzfärbungen an Bouin-fixiertem Hodengewebe junger Mäuse wurden durchgeführt, um den Zeitpunkt der ersten Auswirkungen der *Ehd1*-Mutation festzustellen. Bereits 8 Tage nach Geburt zeigte sich bei den *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen ein verändertes Expressionmuster, während histologische Veränderungen im Hodenepithel erst 14 Tage post partum beobachtet werden konnten. Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen (Ap), die Lage der identifizierbaren Zelltypen, sowie die tiefe Verankerung reifer Spermatiden im Epithel wiesen auf erste Probleme im Verlauf der ersten Spermatogenese-Welle hin. Grün: *Ehd1* (Wildtyp oder Mutante), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 50µm.

Querschnitte der Hodentubuli von 8 Tage alten *Ehd1*^{wt/wt} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen beherbergten hauptsächlich Spermatogonien (S) an der Basalmembran, sowie Sertoli-Zellen (Ser), die das lumenlose Epithel aufbauten. Gelegentlich wurden mitotische Teilungen

beobachtet (nicht gezeigt) und es waren keine offensichtlichen histologischen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Im Hinblick auf die Proteinexpression zeigten sich jedoch bereits Unterschiede: Obwohl die Ehd1-Expression gleichermaßen schwach war, zeigte sich das Wildtyp-Ehd1 gleichmäßig verteilt in unmittelbarer Nähe zu den Spermatogonien, während das mutierte Protein bereits pathologische Aggregate bildete.

14 Tage post partum beginnen die ersten Spermatogonien zu Spermatozyten zu differenzieren. Während *Ehd1^{wt/wt}*-Mäuse normal aussehende Spermatozyten mit charakteristischem, aufgelockertem Chromatin aufwiesen, waren die Spermatozyten von *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen kleiner und besaßen weitaus kompakteres Chromatin. Dies deutete auf anfängliche Verzögerungen im Reifungsprozess hin. Die Expression des Ehd1-Proteins nahm in beiden Genotypen zu, jedoch verlagerte sich die Lokalisierung der Ehd1-positiven Aggregate in der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus bereits in Richtung Lumen. Im Gegensatz dazu verblieb das Wildtyp-Ehd1 im basalen Kompartiment.

Die Bildung der Blut-Hoden-Schranke beginnt bei Mäusen zwischen dem 15. und 18. Tag nach der Geburt und ist normalerweise am postnatalen Tag 21 abgeschlossen (Hogarth 2015). Eine intakte BTB unterteilt das Hodenepithel in zwei Kompartimente: das basale und das adluminal Kompartiment, die beide durch die dort beherbergten Zelltypen charakterisiert sind. Die Integrität des BTB ist der Schlüssel zu einer intakten Spermatogenese und eine Störung oder Unterbrechung kann zu schwerwiegenden Folgen für die normale Spermienproduktion führen (Cheng und Mruk 2012). Die desorganisierte epitheliale Architektur, abnormale Veränderungen der Zellmorphologie, sowie eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen bei 25-Tage alten *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen könnten möglicherweise Folgen einer beeinträchtigten BTB-Integrität darstellen. Darüber hinaus zeigten diese Mäuse die stärksten Veränderung in der Ehd1-Proteinexpression: Während sich das Wildtyp-Ehd1 von der Basalmembran auf punktuelle Strukturen im adluminalen Kompartiment verlagerte, die sowohl Spermatozyten, als auch den ersten, runden Spermatischen zugeordnet werden konnten und bereits teilweise mit akrosomaler Granula assoziiert waren, verteilten sich die tubulären Aggregate des mutierten Proteins willkürlich im Epithel ohne sichtbare Ko-Lokalisation zu akrosomalen Strukturen (ergänzende Abbildung 10). Am 35. postnatalen Tag sollte die erste Welle der Spermatogenese abgeschlossen sein (Oakberg 1956). Zu diesem Zeitpunkt weist das Spermienepithel normalerweise eine geordnete Architektur auf, die aus einer charakteristischen Konstellation spezifischer Zelltypen besteht. Im Hodengewebe der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse war eine Zuordnung zu bestimmten Spermatogenesestadien nicht möglich, da die normale Architektur des Epithels aufgehoben und die Zellanordnung stark verändert war. Darüber hinaus wurden verschiedene Anomalien beobachtet, wie z. B. ein unausgewogenes Verhältnis von runden Spermatischen zu Spermatozyten und elongierenden Spermatischen, Störungen der Chromatinkondensation und Missbildungen der sich formenden

Spermatidenköpfe. Einige von ihnen schienen tief im Epithel verankert, anstatt in Richtung Lumen zu wandern. Der Membranumbau während der Reifung der Spermatiden schien an der unzureichenden Abscheidung des überschüssigen Zytoplasmas zu scheitern. Stattdessen lagerten sich große, runde – vermutlich cytoplasmatische - Vesikel im Tubuluslumen ab. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Mutation im *Ehd1*-Gen bereits negative Auswirkungen auf die erste Spermatogenese-Welle nach sich zog. Obwohl die Architektur des Epithels und die Morphologie der Zellen zunächst normal erschienen, konnten bei genauerer Betrachtung dennoch erste Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp ausgemacht werden. Eine derart massive Zerstörung des Hodenepithels, wie sie bei adulten *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen beobachtet werden konnte, ist innerhalb der ersten 35 Lebensstage noch nicht vorhanden. Die Defekte scheinen sich mit zunehmendem Alter stetig zu verschlimmern.

4.7 Ultrastrukturelle Darstellung endozytose-abhängiger Prozesse während der Spermatogenese

Es ist bekannt, dass zahlreiche Prozesse im Spermienepithel zumindest teilweise von der Endozytose abhängig sind. Dazu zählen u.a. die Akrosomenbiogenese, das adäquate Öffnen und Schließen der Blut-Hoden-Schranke, sowie die Entstehung des Spermischwanzes. Die Auswirkungen der *Ehd1*-Mutation auf diese Prozesse wurden auf ultrastruktureller Ebene mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht (Abbildung 27).

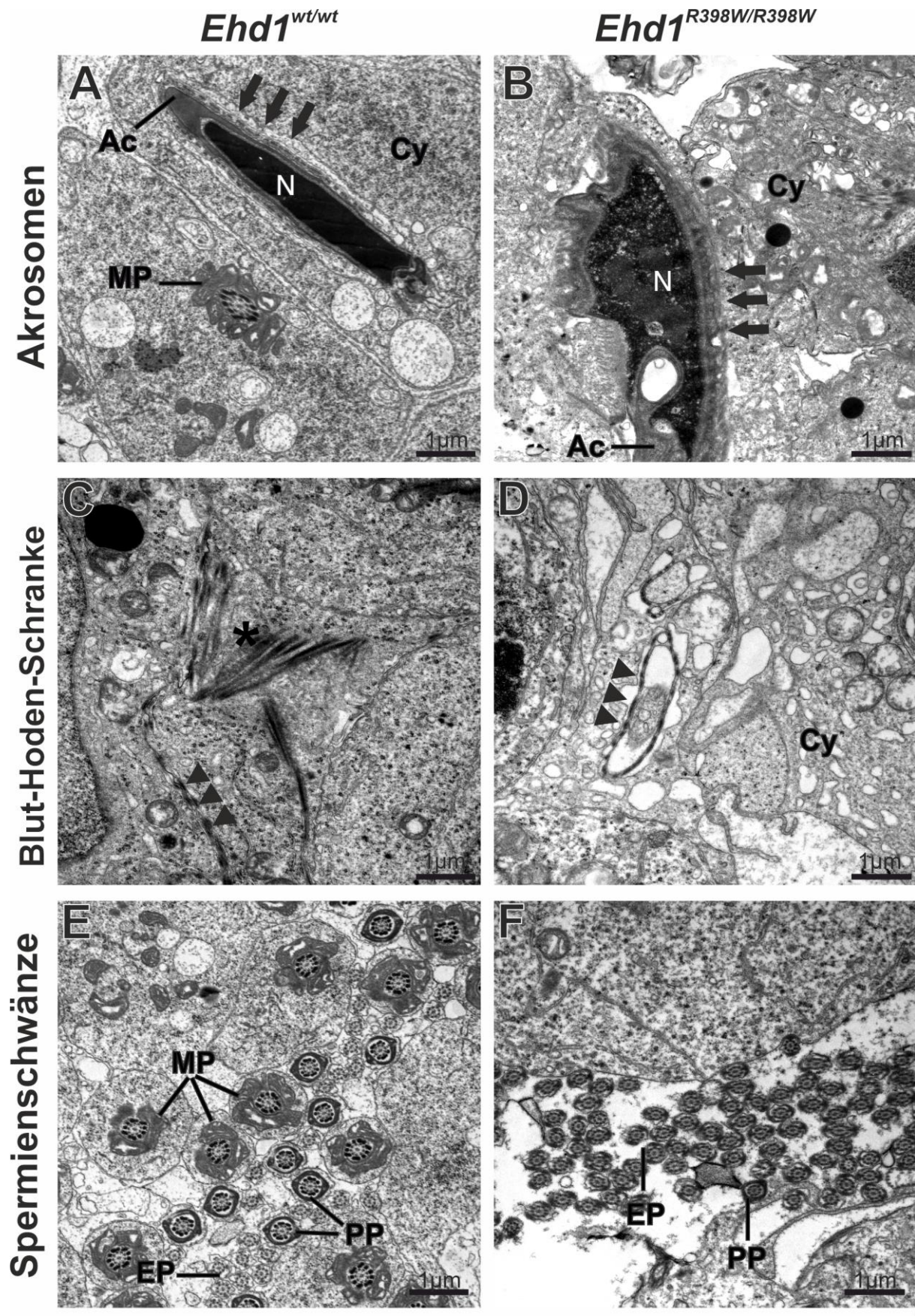


ABBILDUNG 27: Ultrastrukturelle Darstellung Endozytose-abhängiger Prozesse der Spermatogenese. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von endozytischen Prozessen während der Spermatogenese in *Ehd1*^{wt/wt} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen verdeutlichen die Auswirkungen der Mutante auf die Keimzellreifung. (A) Der Wildtyp zeigte typisch-geformte Köpfchen mit kondensiertem Chromatin (N) und eindeutig

abgrenzbaren akrosomalen Strukturen (Ac). Sie waren von ektoplasmatischen Spezialisierungen (Pfeile) umgeben, die als gestrichelte Linie sichtbar wurden. **(B)** Ein sich fehlerhaft entwickelndes Spermium im Samenepithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus wies neben Defekten bei der Kernformung auch eine unzureichende Kondensation des Chromatins (N) auf. Die ektoplasmatischen Spezialisierungen, die das heranreifende Spermium unter normalen Umständen im Epithel verankern, erschienen verdickt (Pfeile). Zudem erschien das umliegende Zytoplasma (Cy) aufgelockert und beherbergte elektronendichte, tiefschwarze, runde Strukturen, bei welchen es sich möglicherweise um Lipidtröpfchen handelte. Akrosomale Strukturen (Ac) konnten nicht zweifelsfrei identifiziert werden. **(C)** Im basalen Kompartiment des Epithels von *Ehd1^{wt/wt}*-Mäusen wurden kurze Abschnitte der Blut-Hoden-Schranke abgebildet. Die auffälligen, verschwommenen Streifen (*) zeigen möglicherweise die Neuorganisation der BTB nach dem Übergang eines präleptotenen Spermatozyten in das adluminal Kompartiment. **(D)** Im Epithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus zeigten sich ringförmige Strukturen (Pfeilspitzen), deren Erscheinungsbild den Zell-Zell-Kontakten der BTB glich, aber aufgrund der fehlerhaften Formation die Funktion als Barriere keinesfalls erfüllen konnte. Das Zytoplasma (Cyt) erschien aufgelockert. **(E)** Während in der Wildtyp-Maus zahlreiche Querschnitte aller Teile des Spermiumschwanzes (MP: Mittelstück; PP: Hauptstück; EP: Endstück) beobachtet werden konnten, fehlten bei der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus die Mittelstücke vollständig **(F)**. Maßstab: 1µm.

4.7.1 Entwicklung des Akrosoms

Als essentielle Struktur für das Spermium, um mit einer Eizelle verschmelzen zu können, wird dem Akrosom im Rahmen der Fortpflanzung eine ganz besondere Bedeutung zugeschrieben. Eine intakte Form und vollständige Funktionalität sind deshalb unerlässlich. In der Anfangsphase der Akrosom-Biogenese - der Golgi-Phase - ist der aktive Transport von Material vom Golgi-Apparat über das trans-Golgi-Netzwerk, sowie der Endozytose-Weg von der Plasmamembran wesentlich für die Initiierung der Akrosomenentstehung (Berruti und Paiardi 2011). Allerdings muss dieser kontinuierliche Transport auch in den darauffolgenden Reifungsphasen aufrechterhalten werden. Die Akrosomen- und Reifungsphase ist dann durch umfangreiche strukturelle und membranöse Veränderungen gekennzeichnet und resultiert in dem Spezies-spezifischen Aussehen des fertigen Akrosoms (Khawar et al. 2019). EHD1, ein Protein, von dem bekannt ist, dass es am endozytischen Vesikeltransport und an Membranformungsprozessen beteiligt ist, könnte dabei eine entscheidende Funktion einnehmen.

Der Längsschnitt eines reifen Spermiums einer *Ehd1^{wt/wt}*-Maus zeigte die typische Kopfform mit stark kondensiertem Kernchromatin, das von einem sichelförmigen Akrosom bedeckt war (Abbildung 27A). Dieses reife, elongierte Spermium war über apikale, ektoplasmatische Spezialisierungen im Epithel verankert, wobei die Aktinfilamentbündel als gestrichelte Linie sichtbar wurden. Einerseits ist diese Verankerung der Spermien im Epithel für eine ordnungsgemäße Spermienreifung unerlässlich, andererseits kann sie aber auch zu Problemen führen, wenn sich die Spermien aufgrund eines unvollständigen Abbaus der ektoplasmatischen Spezialisierungen (ES) nicht aus dem Epithel lösen können. Ektoplasmatische Spezialisierungen treten nicht nur apikal, sondern auch basal auf. Hier bilden sie eine Schlüsselkomponente der Blut-Hoden-Schranke. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigte die überwiegende Mehrheit der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Spermienköpfe eine unvollständige Chromatinkondensation in Kombination mit nukleären und akrosomalen Missbildungen, verdickten ES mit unscharfen Grenzen, sowie untypisch erscheinendes Zytoplasma, das

vermutlich Lipidtropfen (tiefschwarze (elektronendichte), runde Strukturen) und Mitochondrien mit beschädigten Cristae enthielt (Abbildung 27B).

Die Beteiligung von Ehd1 bei der Akrosomenbildung wurde durch Immunfluoreszenzfärbung bekräftigt (Abbildung 28). In *Ehd1*^{wt/wt}-Mäusen kam es zur Kollokalisierung von Ehd1 mit frühen, akrosomalen Vesikeln, die durch LectinPNA-Färbung sichtbar gemacht wurde. Ehd1-positive Vesikel schienen prä-akrosomale Strukturen zu umschließen. Derartige Zusammenlagerungen zwischen dem entstehenden Akrosom und Ehd1 fehlten im Samenepithel von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen. Stattdessen konnten Aggregate von akrosomalem Material teils in zytoplasmatischen Vesikeln, teils als solitäre Strukturen von undefinierter Form im löchrigen Epithel beobachtet werden. Bereits weiterentwickelte, akrosomale Strukturen in unmittelbarer Nähe der Zellkerne zeigten deutliche Fehlbildungen.

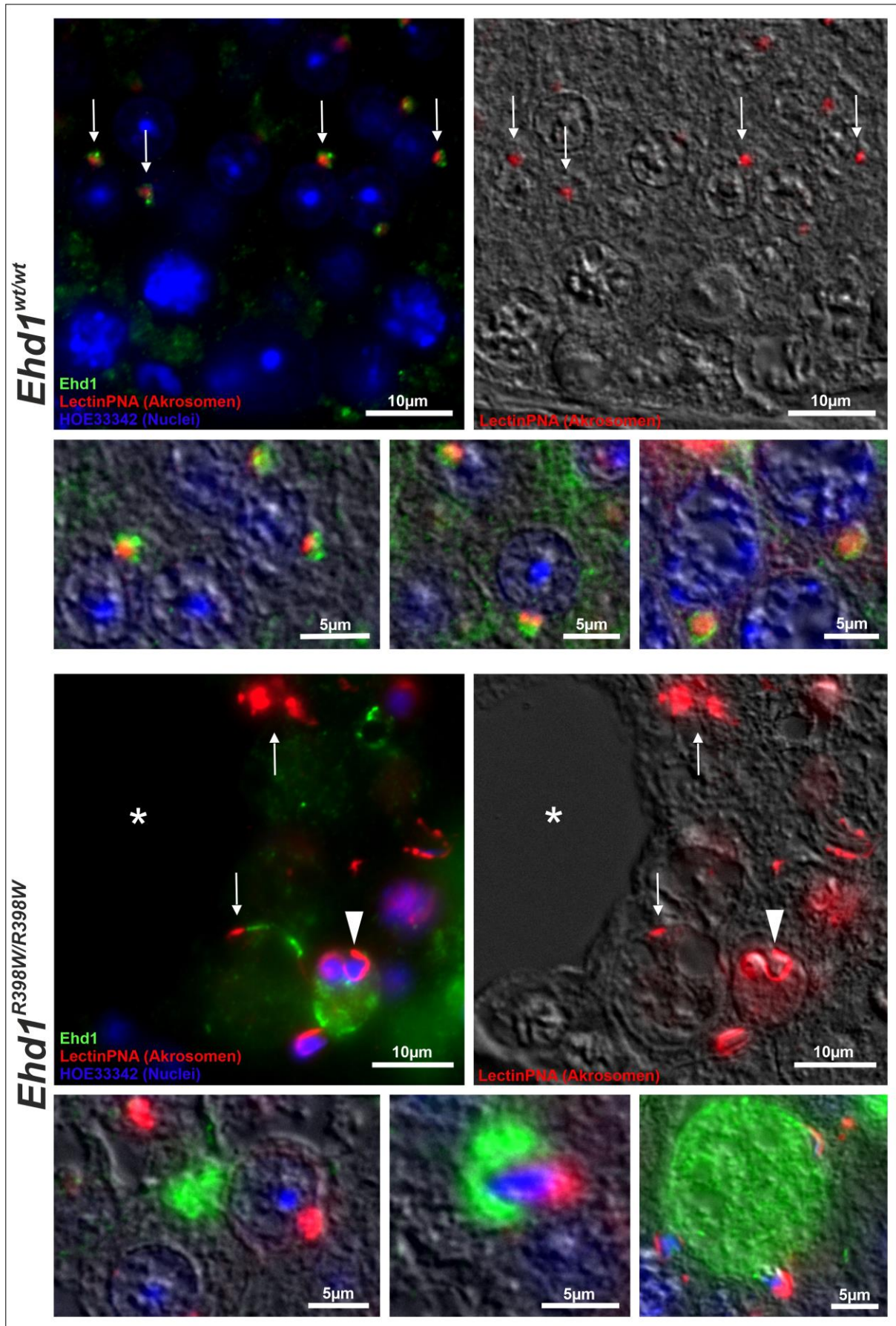


ABBILDUNG 28: Interaktion von Ehd1 mit akrosomalen Strukturen. Wildtyp-Ehd1 ko-lokalisierte mit akrosomalen Granula an runden Spermatischen, was auf eine Beteiligung von Ehd1 an der akrosomalen Biogenese hinweisen könnte. Der Mutante hingegen fehlte die Fähigkeit zur Interaktion. Schwere akrosomale Fehlbildungen

konnten beobachtet werden. Grün: Ehd1 (Wildtyp oder Mutante), rot: LectinPNA (akrosomale Strukturen), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 10µm (Übersichtsbilder) bzw. 5µm (Vergrößerungsbilder).

4.7.2 Integrität der Blut-Hoden-Schranke

Die Blut-Hoden-Schranke (blood testis barrier, BTB) ist für den streng-kooordinierten Ablauf der Spermatogenese im Hodenepithel von besonders großer Bedeutung und eine Beeinträchtigung der Funktion resultiert in schweren Störungen der Keimzellreifung. Abbildung 27C zeigt kurze Abschnitte der Blut-Hoden-Schranke, die im basalen Kompartiment des Epithels einer *Ehd1^{wt/wt}*-Maus gefunden wurde. Die auffälligen, verschwommenen Streifen (Abbildung 27C,*) zeigen möglicherweise die Neuorganisation der BTB nach dem Übergang eines präleptotenen Spermatozyten in das adluminale Kompartiment. Im Epithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus zeigten sich ringförmige Strukturen (Abbildung 27D, Pfeilspitzen), deren Erscheinungsbild den Zell-Zell-Kontakten der BTB glich, aber aufgrund der fehlerhaften Formation die Funktion als Barriere keinesfalls erfüllen konnte. Das Zytoplasma (Cyt) erschien aufgelockert.

Zur weiterführenden Beurteilung der Integrität der BTB in den *Ehd1^{wt/wt}* und *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen wurde HOE33258 mit Hilfe einer Insulinspritze unmittelbar unter die *tunica albuginea* frisch entnommener Hoden gespritzt. Die Hoden wurden für 10 min inkubiert und anschließend kryokonserviert. Im Anschluss wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 5µm erstellt und eingedeckelt. Die Auswertung am Mikroskop zeigte, dass der interkalierende Farbstoff bei der *Ehd1^{wt/wt}*-Maus nur sehr schwach bis in das adluminale Kompartiment des Hodenepithels eindringen konnte. Eine deutliche Färbung konnte stattdessen im Marginalbereich der Tubuli lokalisiert werden. Bei der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus zeigte sich hingegen eine gleichmäßige und deutliche Färbung nahezu aller Zellen im Inneren des Epithels bis hin zur luminalen Grenze. Diese Beobachtungen ergeben erste Hinweise darauf, dass die Integrität der BTB aufgrund der Mutation beeinträchtigt ist (Abbildung 29).

Da es sich bei diesem Versuch um ein Pilotexperiment handelte, sind weitere Experimente notwendig, um die vorläufigen Ergebnisse zu verifizieren. Bisherige Ergebnisse lassen vermuten, dass die Mutation und der damit einhergehende Funktionsverlust des Ehd1-Proteins die Integrität der Blut-Hoden-Schranke negativ beeinflusst.

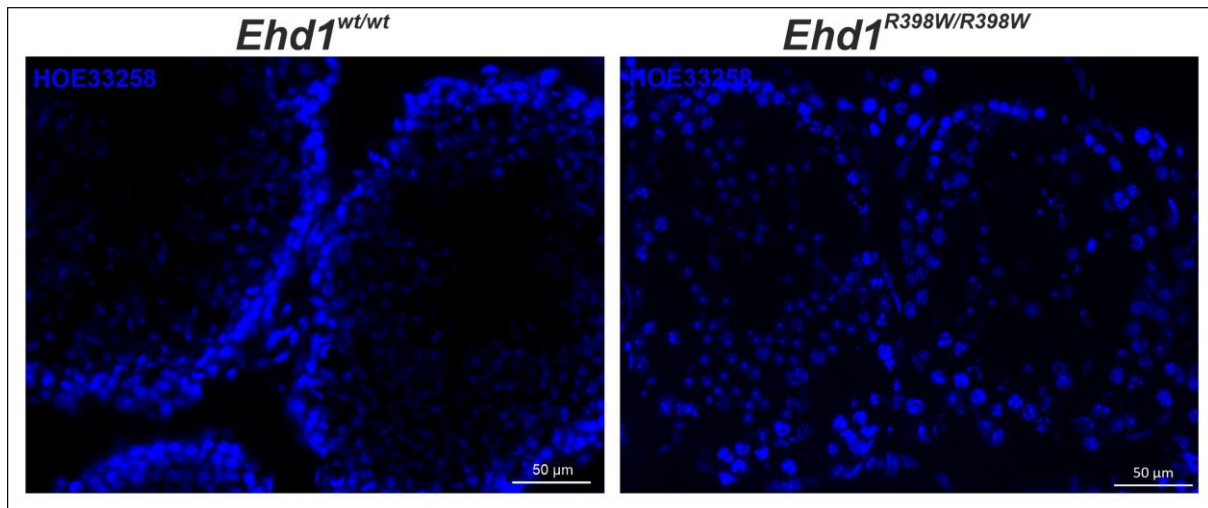


ABBILDUNG 29: Integrität der Blut-Hoden-Schranke. Die Direkt-Injektion von HOE33258 in das Interstitium des Hodengewebes sollte zeigen, inwiefern der DNA-interkalierende Farbstoff im Stande ist, die Blut-Hoden-Schranke zu passieren und sich im Inneren des Hodenepithels auszubreiten. Hierfür wurden die Hoden freigelegt, der Farbstoff injiziert und die Hoden nach kurzer Inkubationszeit kryokonserviert. Es wurde deutlich, dass der Farbstoff in der *Ehd1*^{wt/wt}-Maus deutlich stärker zurückgehalten werden konnte als in der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus, bei der selbst lumenständige Zellkerne angefärbt wurden. Blau: HOE33258 (Zellkerne). Maßstab: 50 μm

4.7.3 Entstehung des Spermenschwanzes und akzessorischer, flagellarer Strukturen

Jeder Abschnitt des Spermenschwanzes zeichnet sich durch spezifische Strukturen aus, die letztlich für einen adäquaten Flagellenschlag verantwortlich sind.

Charakteristisch für das Mittelstück sind die mitochondrielle Hülle, die für die Energiebereitstellung verantwortlich ist, sowie 9 äußere, dichte Fasern, welche den Flagellenschlag unterstützen. Diese beiden Strukturen umgeben das Axonem, welches die Kernstruktur des Flagellums bildet. Das Axonem setzt sich aus neun Dupletten von Mikrotubuli sowie einem zentralen Paar von Mikrotubuli zusammen. Dynein-Arme und radiäre Speichen sind akzessorische, axonem-spezifische Strukturen, welche die Beweglichkeit des Axonems sicherstellen. Dem Hauptstück des Spermenschwanzes fehlt die mitochondrielle Hülle. Stattdessen ist dieser Teil durch eine fibröse Scheide gekennzeichnet, die zusammen mit den äußeren, dichten Fasern den Schwanzschlag bewerkstelligt. Der Aufbau des Axonems gleicht dem des Mittelstücks. Das Endstück hingegen besitzt einen geringeren Durchmesser und weist keine zusätzlichen Strukturen auf (Lehti und Sironen 2017). Obwohl weder im Hodenepithel der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse, noch in Übersichtsaufnahmen des Nebenhodens reife Spermien zu sehen waren, konnten wir im Elektronenmikroskop Querschnitte von Spermenschwänzen finden (Abbildung 27, F). Es konnten einige Haupt- und Endstücke abgebildet werden, die eine normale „9x2+2“-Struktur des Axonems aufwiesen, was darauf hindeutet, dass die Entstehung der ziliären Kernstrukturen durch die Mutation nicht beeinträchtigt zu sein schien. Interessanterweise wurden keine intakten Querschnitte von Mittelstücken mit ihrer charakteristischen mitochondriellen Scheide gefunden. Stattdessen

zeigten sich Überreste von Mittelstücken und Anhäufungen von beschädigten Mitochondrien in riesigen, runden Strukturen, die vermutlich dysfunktionale Zellbestandteile und beschädigtes Material beherbergten (Abbildung 30). Möglicherweise spielt Ehd1 eher eine Rolle im Aufbau der akzessorischen Strukturen des Spermischwanzes als bei der Entstehung der axonemalen Kernstrukturen selbst. In *Ehd1^{wt/wt}*-Mäusen hingegen wurden zahlreiche Querschnitte aller drei Spermischwanzabschnitte mit ihren charakteristischen akzessorischen Strukturen in der luminalen Region des Spermienepithels gesichtet (Abbildung 27, E).

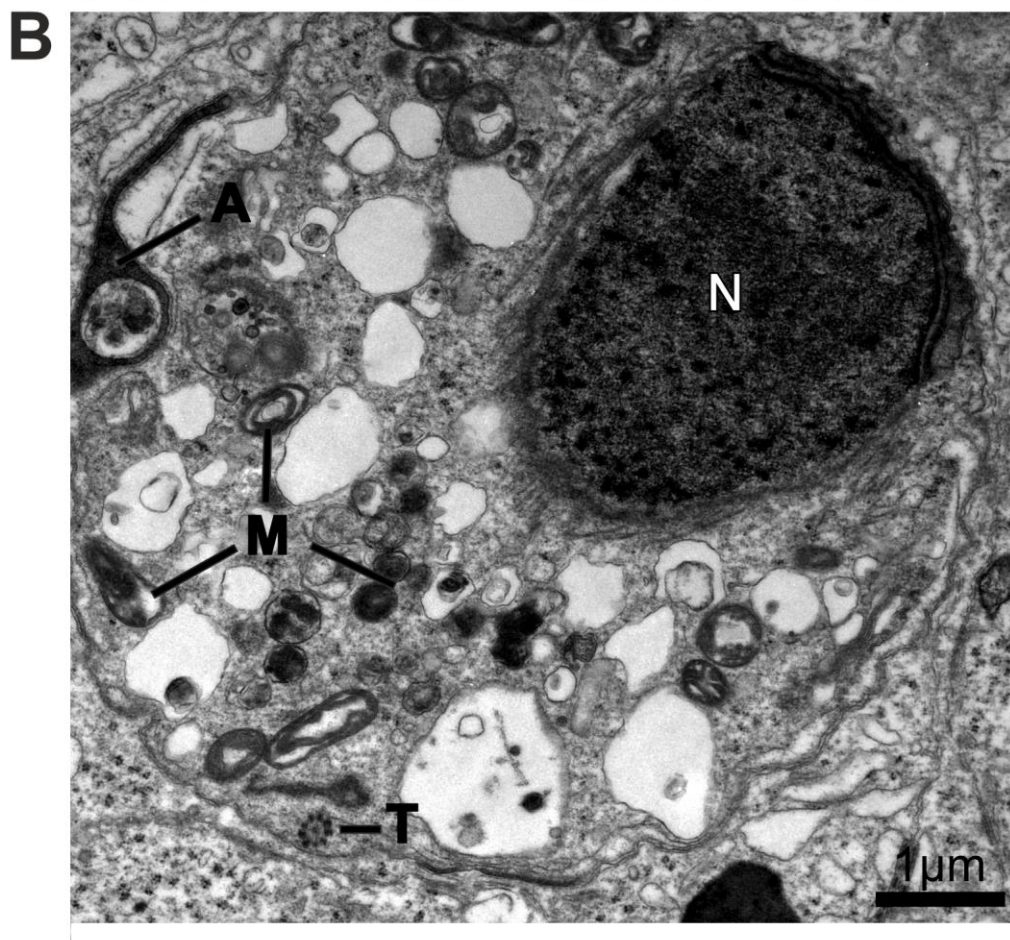
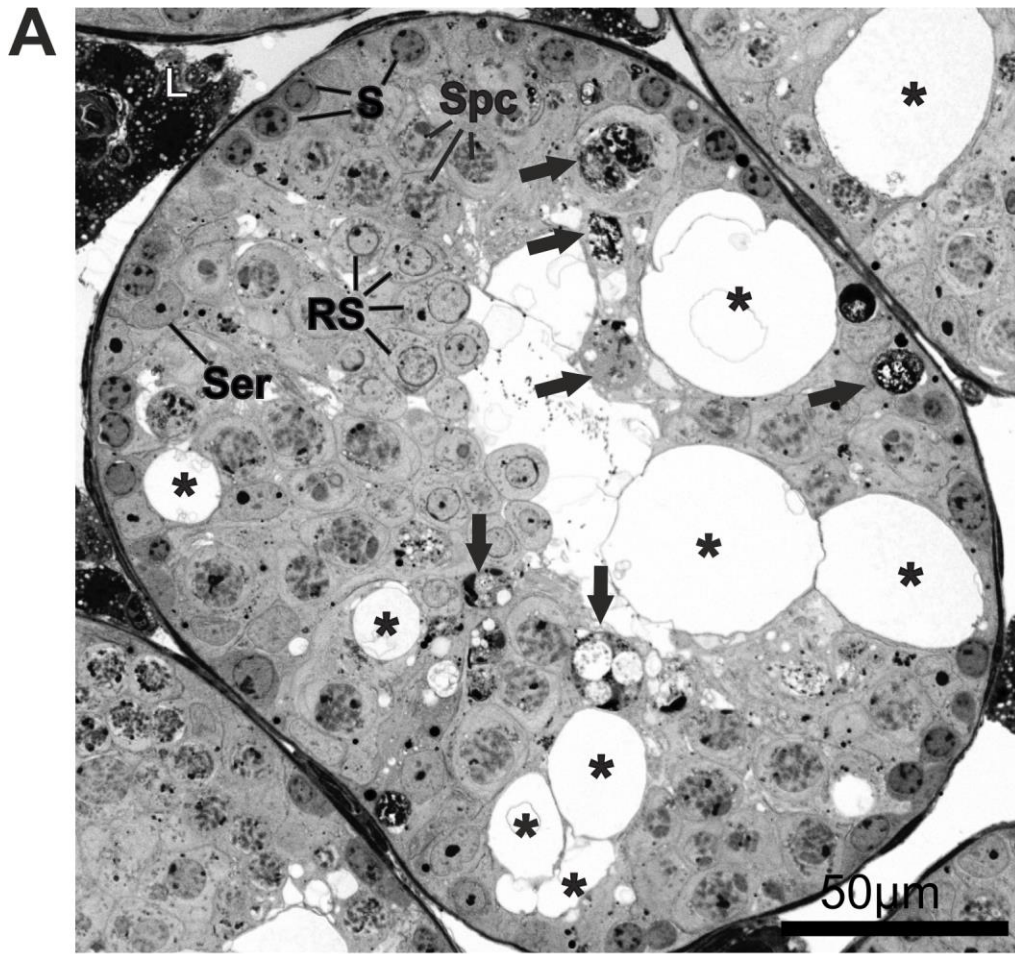


ABBILDUNG 30: Ultrastruktur pathologischer Strukturen im Samenepithel von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen. Die Zuordnung der Spermatogenese-Stadien bei *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen war aufgrund der stark veränderten epithelialen Struktur nicht möglich. **(A)** Die in Graustufen dargestellte Richardson-Färbung dieses Semi-Dünnschnitts von in Epon eingebettetem Hodengewebe zeigte ein löchriges Epithel (*), das verschiedene Zelltypen wie Spermatogonien (S), Spermatozyten (Spc), runde Spermatozyten (RS) und Sertoli-Zellkerne (Ser) erkennen ließ. Eine Vielzahl der Zellen wies Missbildungen auf, und die untypische Lokalisation im Epithel erfüllte nicht die Kriterien für eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Stadium der Spermatogenese. Beschädigte und vermutlich dysfunktionale Zellbestandteile wurden in runde, membranumgebene Strukturen (Pfeile) eingelagert und von Sertoli-Zellen phagozytiert. Maßstab: 50µm. **(B)** Eine höhere Vergrößerung dieser runden, heterogenen Strukturen zeigte den Inhalt: Defekte Teile von missgebildeten Spermiovorläufern wie Spermatozytenköpfchen mit loseem Chromatin (N), malformierte akrosomale Strukturen (A) sowie beschädigte Mitochondrien (M) und Anteile des Spermischwanz-Axonems (T). Maßstab: 1µm.

4.8 Untersuchung der Interaktion zwischen *Ehd1* und dem Retromer im Hodengewebe

Erste Verbindungen zwischen EHD1 und Retromer wurden bereits vor einigen Jahren entdeckt (Zhang et al. 2012a) und in Verbindung mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten, wie z. B. die Alzheimer-Krankheit, gebracht. Es ist bekannt, dass der retrograde Transport von Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk durch verschiedene Mechanismen erfolgt, wobei das Retromer als einer der bedeutendsten diskutiert wird. Es ist auch bekannt, dass EHD1 als zentrales Protein im endozytotischen Recycling mit den Retromer-Komponenten VPS26 und Vps35 interagiert. Über die detaillierten Mechanismen dieser Interaktion und andere Faktoren, die möglicherweise beteiligt sind, fehlen bis dato jedoch aussagekräftige Informationen (Zhang et al. 2012a). Bekanntermaßen ist die Entstehung und das Wachstum des Akrosoms von der Lieferung von Proteinen und Membranen aus dem Golgi abhängig (Da Ros et al. 2015), aber auch Komponenten des endosomalen Systems sind involviert (Berruti und Paiardi 2011). Es ist denkbar, dass EDH1 eine Schnittstelle zwischen dem endosomalen System und dem Golgi darstellt, indem es Einfluss auf die Funktion des Retromers nimmt. Um festzustellen, ob im Hodengewebe eine solche Interaktion vorliegt und diese möglicherweise durch die Mutation in *Ehd1* beeinträchtigt wird, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen *Ehd1* und VPS35 an Hodengewebe von *Ehd1*^{wt/wt}- und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen angefertigt.

Es zeigte sich eine eindeutige Ko-Lokalisation zwischen der Retromer-Komponente VPS35 und *Ehd1* in unmittelbarer Nähe von Spermatozyten und runden Spermatozyten (Abbildung 31). Wildtyp-*Ehd1* schien VPS35 zu umschließen, während das mutierte Protein in Form von Aggregaten ohne jegliche Verbindung zu VPS35 (Pfeile) beobachtet wurde. Außerdem schien der Retromer-Komplex bei den *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen nahe der Basalmembran zu akkumulieren.

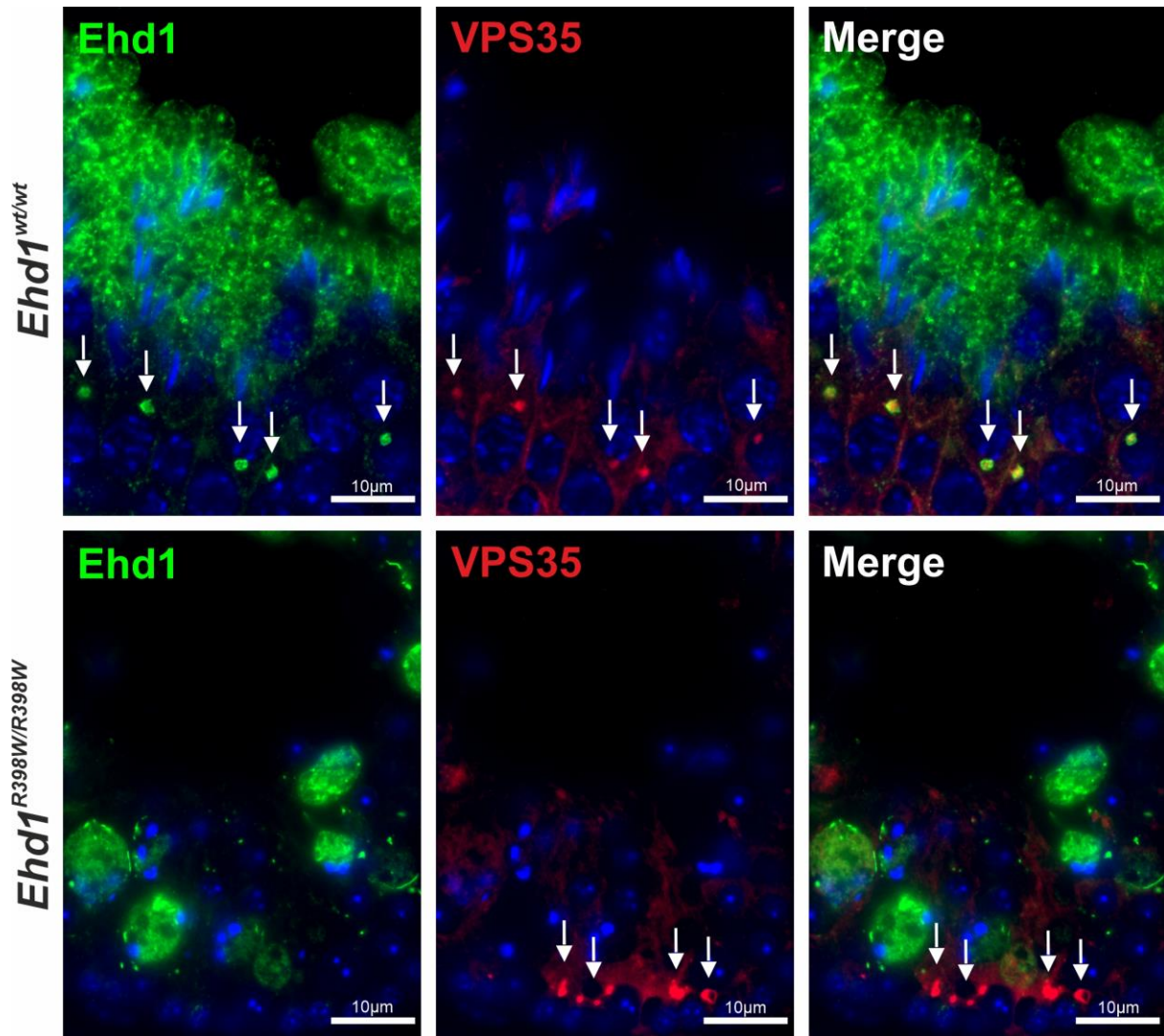


ABBILDUNG 31: Interaktion von Ehd1 mit dem Retromer im Hodenepithel. Wildtyp-Ehd1 konnte zum einen in Zytoplasmablasen elongierender Spermatisen im Bereich des Tubuluslumens lokalisiert werden, zum anderen als scharf-abgegrenzte, runde Strukturen mittig im Samenepithel. Diese Vesikel zeigten eine eindeutige Ko-Lokalisation zu VPS35-positiven Strukturen, die einen Bestandteil des Retromerkomplexes darstellen. In *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen blieb die Kolokalisation der Ehd1-Variante und dem Retromer aus. Stattdessen akkumulierte VPS35 ohne mutiertes Ehd1 im basalen Kompartiment. Grün: Ehd1 (Wildtyp oder Mutante), rot: VPS35 (Retromer), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 10 μm.

Die massiven akrosomalen Malformationen bei *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäusen (Abbildung 27, B), die gescheiterte Interaktion von Ehd1 mit akrosomalen Strukturen (Abbildung 28) sowie mit VPS35 als zentrale Komponente des Retromer-Komplexes (Abbildung 31) deuten darauf hin, dass eine Fehlfunktion von Ehd1 die Akrosomenentstehung beeinträchtigt und dies womöglich auf eine gescheiterte Interaktion mit dem Retromer-Komplex zurückzuführen ist.

4.9 Untersuchung der Interaktion zwischen EHD1 und dem Retromer im induzierbaren Zellmodell

Ergänzend zur Interaktion von EHD1 und dem Retromer im Hodengewebe sollte überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse in einem Zellmodell reproduzieren lassen. LLC-PK1-Zellen (proximale Tubuluszellen vom Schwein) wurden durch einen Kooperationspartner genetisch

so verändert, dass sie nach Tetracyclin-Induktion entweder humane Wildtyp-EHD1 oder das humane, mutierte EHD1^{R398W} überexprimierten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung wurden in den induzierten Zellen jeweils EHD1 und VPS35 als zentrale Komponente des Retromer-Komplexes markiert.

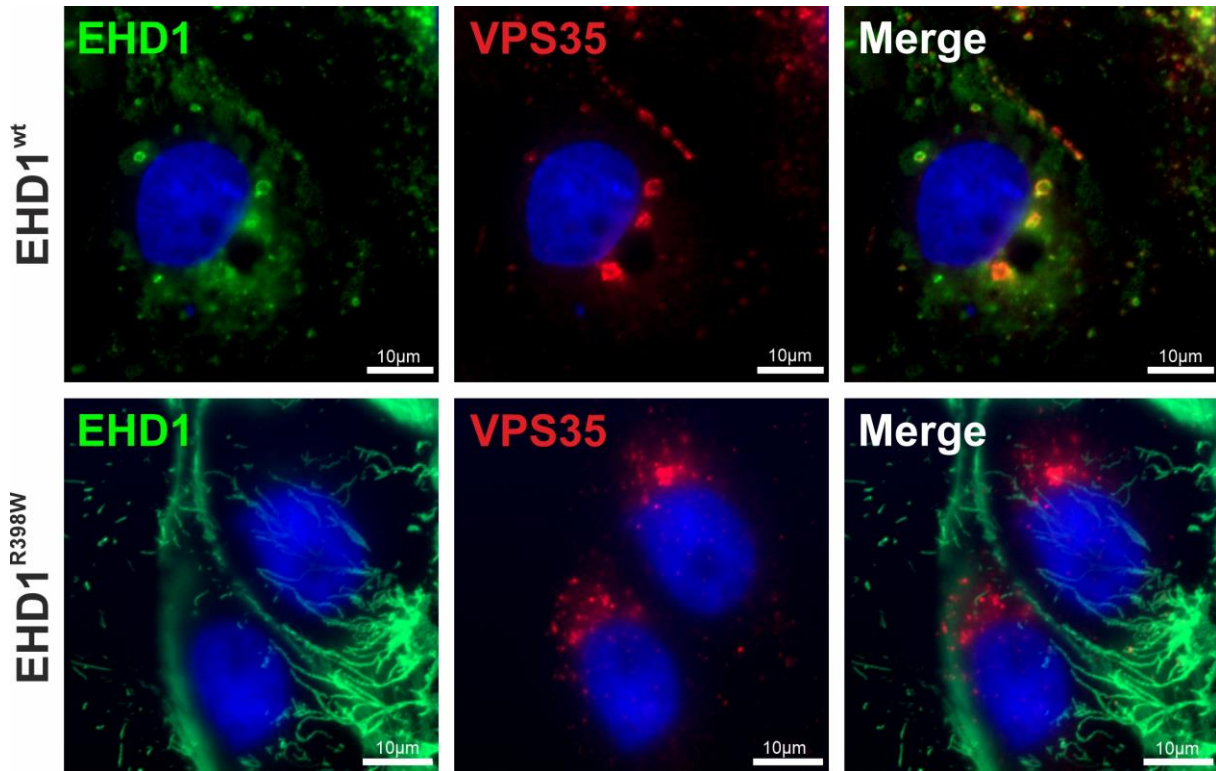


ABBILDUNG 32: Interaktion von EHD1 mit dem Retromer im induzierbaren Zellmodell. Induzierbare LLC-PK1-Zellen überexprimierten nach Tetrazyklin-Behandlung entweder humanes Wildtyp-EHD1 oder mutiertes EHD1. Während das Wildtyp-Protein in runden Strukturen von unterschiedlicher Größe homogen innerhalb der Zellen verteilt war und an prominenten Punkten mit VPS35-positiven Vesikeln kolokalisierte, zeigte sich das mutierte Protein in langen, tubulären Strukturen, die keine Überlagerung mit VPS35 zeigten. Eine Interaktion zwischen EHD1 und dem Retromer-Komplex schien durch die Mutation verhindert zu werden. Grün: EHD1 (Wildtyp oder Mutante), rot: VPS35 (Retromer), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 10µm.

Während LLC-PK1-Zellen, die Wildtyp-EHD1 exprimierten, eine punktförmige, gleichmäßige Verteilung des Proteins im Zytoplasma zeigten, wurde die EHD1-Mutante in Übereinstimmung mit dem Erscheinungsbild in humanen Geweben in länglichen, tubulären Strukturen nachgewiesen (Abbildung 32). Es wird angenommen, dass diese Strukturen das Ergebnis einer eingeschränkten Membranspaltung aufgrund der Mutation sind (Issler et al. 2022). Was die Interaktion von EHD1 und dem Retromer betrifft, so konnten die Ergebnisse aus dem murinen Hodengewebe reproduziert werden: Während punktförmige Wildtyp-EHD1-Vesikel teilweise mit dem Retromer kolokalisierten, verlor die EHD1-Mutante gänzlich die Fähigkeit zur Interaktion. Stattdessen akkumulierte VPS35 in unmittelbarer Nähe des Zellkerns, während das mutierte EHD1 in langen, tubulären Strukturen beobachtet wurde, die sich über das gesamte Zytoplasma erstreckten.

Wie bereits erwähnt, gehört EHD1 einer komplexen Maschinerie für endozytotisches Recycling und Membranformung an, zu der beispielsweise auch MICAL-L1 als Interaktor gezählt wird. (Sharma et al. 2009) Daher untersuchten wir die Auswirkung der EHD1^{R398W}-Mutation auf die Verteilung von MICAL-L1 im direkten Vergleich mit der Verteilung des Retromers. Interessanterweise blieb MICAL-L1 in Zellen, die die EHD1-Mutante überexprimierten, dennoch mit EHD1 assoziiert (Abbildung 33). Die Zellen, die Wildtyp-EHD1 exprimierten, zeigten die bereits zuvor gezeigte Kollokalisierung von EHD1 mit dem Retromer, sowie stellenweise auch Assoziationen zwischen MICAL-L1 und VPS35-positiven Vesikeln. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei den länglichen Strukturen, die in Zellen mit der EHD1^{R398W}-Mutante beobachtet wurden, tatsächlich um abnorme, röhrenförmige Recycling-Endosomen handelt (Issler et al). Möglicherweise basiert die Interaktion zwischen MICAL-L1 und EHD1 auf anderen Vorgängen, die von der Mutation unbeeinflusst bleiben, während die Interaktion zum Retromer abbricht.

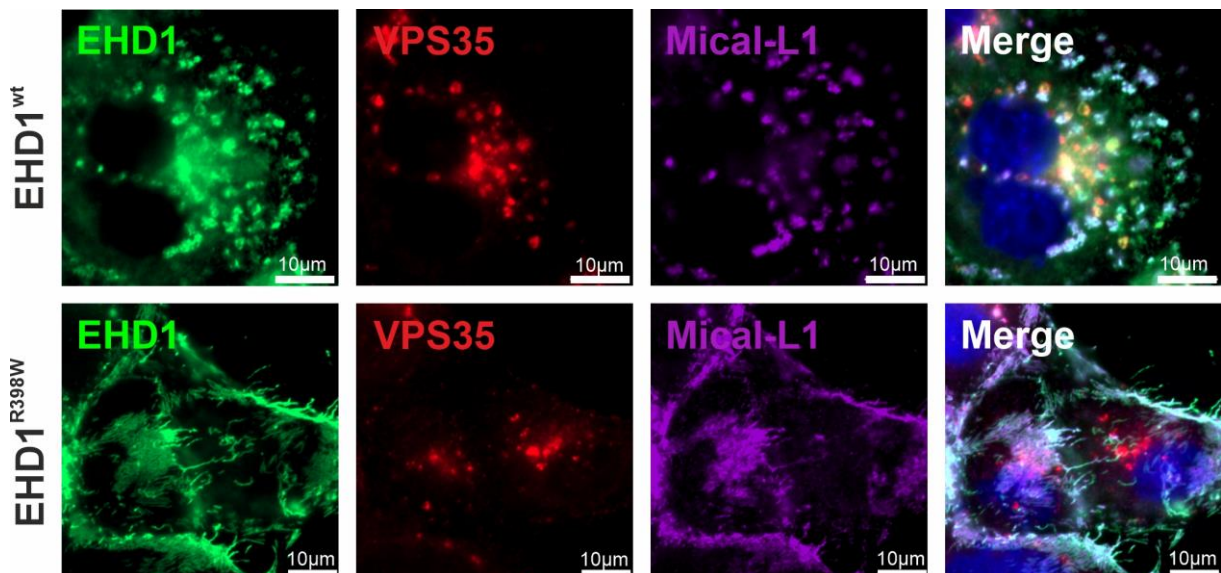


ABBILDUNG 33: Vergleichende Darstellung des Interaktionsverhaltens von EHD1 mit VPS35 und MICAL-L1. Die Interaktion zwischen EHD1 und MICAL-L1, einem bekannten Interaktor von EHD1 im Rahmen der Endozytose-Maschinerie, scheint trotz der funktions- und strukturverändernden Mutation erhalten zu bleiben. Anhand der dargestellten Vierfach-Färbung wird vergleichend nochmals gezeigt, dass eine Interaktion zwischen Retromer-Komplex und mutiertem EHD1-Protein nicht mehr möglich ist. Grün: EHD1 (Wildtyp oder Mutante), rot: VPS35 (Retromer), lila: MICAL-L1, blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 10µm.

4.10 Untersuchung des Ploiditätstatus zur Beurteilung der meiotischen Aktivität

Das Auftreten verschiedener Zellstadien im Hodenepithel kann Aufschluss darüber geben, ob eine Störung der meiotischen Teilungsaktivität vorliegt. Anhand ihrer Ploidität können tetraploide, diploide und haploide Zellen unterschieden werden. Das Verhältnis dieser Zellen zueinander kann verwendet werden, um die meiotische Aktivität oder den Ertrag der Spermienproduktion zu bestimmen (Schradin et al. 2012). Wird eine Zellfärbung mit DAPI

durchgeführt und die Zellen sortiert, so stammen tetraploide (4c) Signale hauptsächlich von primären Spermatozyten in der G2/M-Phase des Zellzyklus und von mitotisch-aktiven Spermatogonien, während diploide (2c) Signale in sekundären Spermatozyten, Spermatogonien und somatischen Zellen nachgewiesen werden. Haploide (1c) Signale stammen hauptsächlich aus postmeiotischen Zellstadien wie Spermatischen und Spermatozoen. Eine hohe Anzahl von haploiden Signalen deutet auf eine hohe Spermienproduktion und damit auf eine hohe meiotische Aktivität hin. Dasselbe wird durch ein niedriges Verhältnis von diploiden zu tetraploiden (2c/4c) oder ein hohes Verhältnis von haploiden zu diploiden (1c/2c) Zellen angezeigt. Das Verhältnis von haploiden zu tetraploiden (1c/4c) Zellen gibt einen Hinweis auf die Ausbeute an haploiden Spermatischen, die sich aus Spermatozyten entwickelt haben.

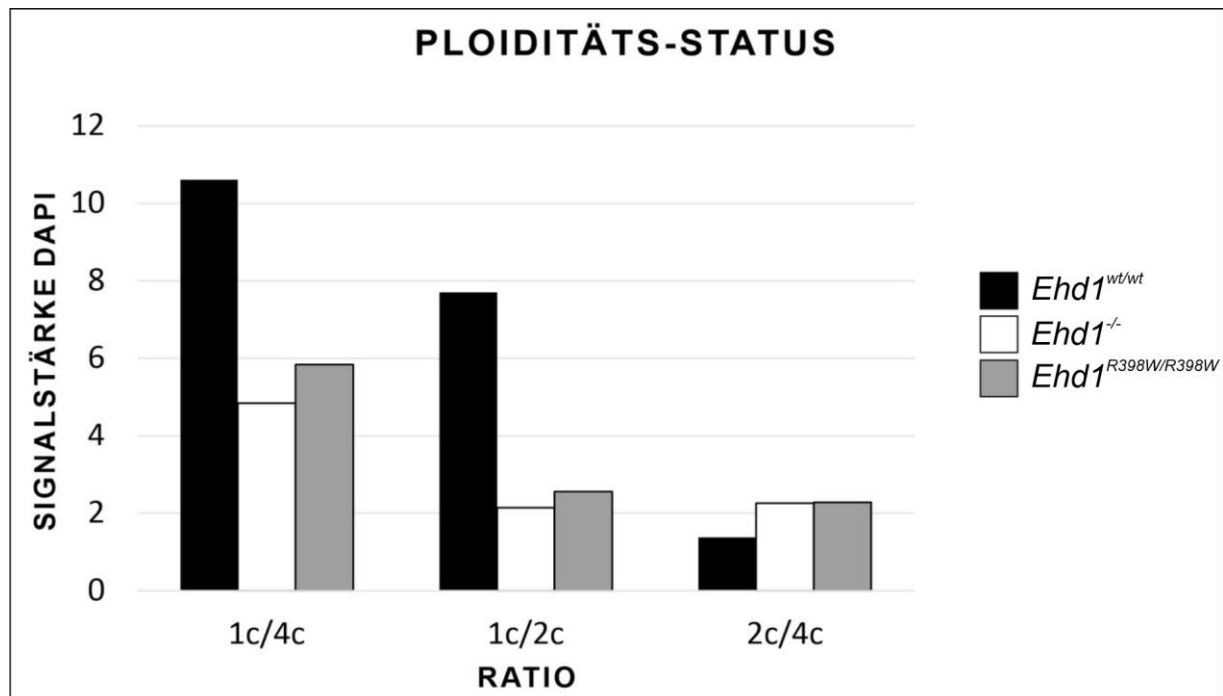


ABBILDUNG 34: Ermittlung des Ploiditätsstatus zur Überprüfung der meiotischen Aktivität. Die Ermittlung des Ploiditätsstatus lässt Rückschlüsse auf die meiotische Teilungsaktivität entsprechender Zellstadien zu. *Ehd1*^{-/-} und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse zeigten eine verringerte 1c/4c-, sowie 1c/2c-Ratio, kombiniert mit einer erhöhten 2c/4c-Ratio im Vergleich zum Wildtyp. Diese Befunde deuteten auf eine verringerte, meiotische Aktivität und folglich auf eine beeinträchtigte Spermienproduktion hin.

Vorläufige Messungen ergaben eine verringerte Menge an haploiden Signalen (nicht dargestellt) sowie verringerte 1c/4c- und 1c/2c-Ration, was auf eine reduzierte Umwandlung von Spermatozyten zu Spermatischen im Zuge der Keimzellreifung hinweist (Abbildung 34). Des Weiteren zeigte sich ein erhöhtes 2c/4c- Verhältnis bei den *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, was wiederum auf eine verringerte meiotische Aktivität schließen lässt. Diese Daten deuten auf negative Auswirkungen der Mutation auf die Aktivität der meiotischen reduktiven Teilung während der Spermatogenese hin. Da die hier dargestellten Ergebnisse lediglich aus Testläufen stammten, die eine geringe Anzahl an Mäusen einschloss, sind weitere

Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Tieren erforderlich, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Diese weiterführenden Messungen konnten bisher aufgrund mangelnder Zuchtausbeute nicht durchgeführt werden, sind aber für die kommenden Monate vorgesehen.

4.11 Ermittlung des Hormonstatus betroffener Patienten und nahe verwandter Personen

Die Erhebung des Hormonstatus stellt meist einen der ersten Schritte auf dem Weg zu einer vollständigen Aufklärung bei unerfülltem Kinderwunsch dar, denn eine veränderte Hormonlage nimmt immensen Einfluss auf das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten und Abläufe der Spermatogenese, aber auch des weiblichen Zyklus. Die umfassenden Untersuchungen, die vor einiger Zeit an den Patienten mit *EHD1*-Mutation durchgeführt wurden, bezogen sich aufgrund der diagnostizierten Phänotypen größtenteils auf die Nierenfunktion und das Hörvermögen. Dass die Mutation Einfluss auf die männliche Fertilität nehmen könnte, war zum damaligen Zeitpunkt nicht bekannt. Entsprechend wurde bei der Blutentnahme nicht berücksichtigt, dass an diesen Proben Hormonbestimmungen durchgeführt werden sollten. Die asservierten Proben umfassten deshalb lediglich Citrat-Plasma bzw. EDTA-Plasma und keine Serumproben, die zur Bestimmung der hormonellen Lage normalerweise Anwendung finden. Da eine erneute Kontaktaufnahme mit den Patienten aufgrund ihres Aufenthaltsortes in einer Krisenregion des nahen Ostens nicht möglich war, wurden die vorhandenen Citrat-/EDTA-Plasma-Proben für die Untersuchung der Hormonspiegel verwendet. Im Vorfeld durchgeführte Tests des Instituts für klinische Chemie des Uniklinikum Regensburg ergaben, dass die Verwendung von Citrat-Plasma bzw. EDTA-Plasma zur Bestimmung von Hormonen zwar nicht üblich, aber durchaus vertretbar war, da sie vergleichbare Werte zu frischem Serum lieferten. Einzig die Verdünnung, die sich durch die Zugabe von Citrat ergab (9 Teile Plasma, 1 Teil Citrat), musste bei den Ergebnissen berücksichtigt werden.

Die Proben wurden vom Institut für klinische Chemie des Uniklinikums Regensburg auf unterschiedliche (Sexual-)Hormone untersucht. Während Progesteron- und Testosteron-Spiegel durch Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-TMS) ermittelt wurden, wurde für die Bestimmung der Gonadotropine LH und FSH, sowie für Estradiol und TSH ein Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ELICA) verwendet. Obwohl ELICA ein standardisiertes und viel angewandtes Verfahren darstellt, so sind die Ergebnisse der Massenspektroskopie dennoch verlässlicher, wenn auch störanfälliger.

Ergebnisse			Estradiol (E2)	Progesteron	LH (basal)	FSH (basal)	Testosteron (basal)	TSH (basal)
Alter bei Probennahme	Geschlecht	ID-Nr.	nmol/l	µg/l	IU/l	IU/l	µg/l	mIU/l
n.a.	w	B1	0,18	0,48	6,98	5,33	0,16	1,33
n.a.		B4	0,37	0,18	6,31	3,89	0,34	1,26
n.a.		F1	0,51	0,41	3,22	2,89	0,13	1,66
n.a.		G1	0,21	0,33	7,37	8,56	0,12	3,33
n.a.		G6	0,26	5,54	2,96	4,22	0,20	1,47
n.a.		G7	0,13	0,10	4,73	6,67	0,16	1,69
14		B3*	0,27	0,34	7,58	5,44	0,39	2,21
32		C1*	0,33	0,52	9,78	4,80	0,21	1,98
21		C2*	38,40	39,19	0,30	0,30	0,87	2,20
n.a.		B2	0,13	0,46	4,12	3,00	3,08	4,01
n.a.	B5	0,02	0,29	0,33	0,67	<0,06	3,74	
n.a.	G2	0,08	0,48	10,01	16,11	2,88	0,81	
n.a.	G4	0,08	0,27	3,97	6,56	4,82	2,14	
n.a.	G5	0,12	0,21	7,70	10,11	8,04	1,24	
17	F2*	0,08	0,13	5,08	8,78	5,99	2,47	
24	C3*	0,13	0,29	9,81	9,67	8,07	3,46	
12	G3*	0,03	0,14	3,99	4,00	1,73	1,81	

Referenzwerte			Estradiol (E2)		Progesteron		LH (basal)		FSH (basal)		Testosteron (basal)		TSH (basal)	
Geschlecht	zyklusphasenbedingte Referenzbereiche	nmol/l	µg/l	IU/l	IU/l	µg/l	mIU/l							
		min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	
w	pA	0,114	0,332	/	/	< 12,6	< 12,5	/	/	/	/	/	/	
	pB	0,222	1,959	/	/	< 95,6	< 21,5	/	/	/	/	/	/	
	pC	0,222	0,854	/	/	< 11,4	< 7,7	/	/	/	/	/	/	
	pD	0,018	0,505	/	/	< 58,5	< 134,8	/	/	/	/	/	/	
	unabh.	/	/	<	17,25	/	/	/	/	0,09	0,66	0,27	4,2	
m		0,041	0,159	<	0,22	<	8,6	<	12,4	2,19	10,7	0,27	4,2	

ABBILDUNG 35: Ermittlung des Hormonstatus der Patienten und nahe verwandter Personen. Asserviertes Citrat- und EDTA-Plasma der Patienten und nahe verwandter Personen wurde auf unterschiedliche (Sexual-) Hormone getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass keine der untersuchten Proben drastische Veränderung des Hormonstatus aufwies. Die Testosteronwerte der männlichen Patienten (mit * gekennzeichnet) lagen ebenfalls im Normalbereich, wobei die erniedrigten Testosteronwerte von G3 auf das junge Alter des Patienten bei Probennahme zurückzuführen waren. Patientin C2 zeigte stark erhöhte Estradiol und Progesteronwerte bei normalem, aber recht niedrigem LH und FSH. Sie war womöglich schwanger.

Die erhobenen Messwerte (Abbildung 35) wurden mit Referenzwerten verglichen, die ebenfalls vom Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg zu Verfügung gestellt wurden. Sie sind in einer separaten Tabelle in Abbildung 35 aufgeführt. Die farbige Markierung der erhobenen Daten zeigt eine Erhöhung (dunkelrot) oder eine Erniedrigung (hellrot) in Bezug auf die entsprechenden Referenzwerte an. Nicht-markierte Werte befanden sich innerhalb des Normbereichs. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Proben ist anzumerken, dass die erhobenen Daten stets kritisch betrachtet werden sollten, da eine Veränderung der enthaltenen Hormonlevel über die lange Asservationszeit hinweg nicht ausgeschlossen werden kann. Ein weiterer Punkt, der für die Interpretation der Ergebnisse weiblicher Probandinnen von besonderer Bedeutung war, war die vorherrschende Zyklusphase, denn der weibliche Zyklus unterliegt starken, hormonellen Schwankungen. Entsprechend lassen sich im Hinblick auf die Referenzwerte vier verschiedenen Phasen (pA, pB, pC und pD) unterscheiden, wobei pA die Follikelphase darstellt, pB die Zyklusmitte, pC die Lutealphase und pD die postmenopausale Phase. Da derartige Informationen nicht

vorhanden waren, konnte keine exakte Eingrenzung der Referenzbereiche vorgenommen werden. Für die Beurteilung der Ergebnisse wurde vorerst die Zyklusphase pB angenommen, da diese Zyklusphase den größten Referenzbereich aufwies.

Die Schilddrüse und durch sie produzierte Hormone nehmen Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselprozesse im Körper. Auch die Produktion der Sexualhormone kann durch sie verändert werden. Aus diesem Grund wurden ergänzend die TSH-Level bestimmt, die sich jedoch für alle untersuchten Proben innerhalb des Referenzbereichs befanden.

Estradiol wird zwar zu den weiblichen Sexualhormonen gezählt, jedoch konnte gezeigt werden, dass es auch großen Einfluss auf die männliche Sexualfunktion nimmt (Schulster et al. 2016). Estradiol entsteht zu einem Großteil durch Aromatisierung (Katalyse durch Aromatase) aus dem männlichen Sexualhormon Testosteron, während ein kleiner Anteil von den Leydig'schen Zwischenzellen im Hoden produziert wird (Vermeulen et al. 2002; Aktories et al. 2022). Ein Gleichgewicht von Testosteron und Estradiol ist speziell für die Entwicklung der Sexualfunktion von besonderer Bedeutung. Erhöhte Estradiolwerte beim Mann können u.a. für eine verminderte Spermienproduktion, Hypogonadismus (Testosterondefizit, sowie Defizit in der Spermienproduktion oder beides) und erektile Dysfunktion verantwortlich sein (Schulster et al. 2016). Während unter den weiblichen Personen B1, G1 und G7 erniedrigte Estradiolwerte zeigten, konnten unter den Männern bei B5 und G3 (betroffener Patient) erniedrigte Werte festgestellt werden. C2, eine weibliche homozygote Patientin, wies als einzige stark erhöhte Estradiolwerte auf.

Das Gelbkörperhormon Progesteron ist das wichtigste natürliche Gestagen und obwohl es zu den weiblichen Sexualhormonen zählt, entsteht es auch im männlichen Organismus als Zwischenprodukt bei der Testosteronsynthese (Aktories et al. 2022). Bei Patientin C2 konnten stark erhöhte Progesteronwerte detektiert werden. Weiterhin waren diese auch bei einer Reihe männlicher Personen (B2, B5, G2, G4 und dem Patienten C3) erhöhte Progesteronwerte festgestellt werden.

Die Gonadotropine LH und FSH hingegen waren lediglich bei den männlichen Personen G2 und C3 leicht oberhalb der Norm.

Testosteron gilt als bekanntestes und wichtigstes männliches Sexualhormon und gehört zur Gruppe der Androgene. Doch auch im weiblichen Organismus spielt Testosteron eine wichtige Rolle, weil daraus durch Aromatisierung Estradiol gebildet wird (Aktories et al. 2022). Das Vorkommen von Androgenrezeptoren im weiblichen Körper (Brust, Gehirn, Knochen, Muskeln Leber, Haut und Fettgewebe) spricht zusätzlich für eine direkte Testosteronwirkung (Elraiyah et al. 2014). Patientin C2 wies erhöhte Testosteronwerte auf. Unter den männlichen Personen zeigten B5 und G3 erniedrigte Testosteronwerte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bestimmung der Sexualhormone in den zur Verfügung stehenden Proben keine drastischen Veränderungen der Hormonlage im Hinblick auf die homozygoten Ehd1-Patienten zeigte. Die männlichen, homozygoten *EHD1*^{R398W/R398W}-Patienten F2 und C3 wiesen normale Testosteronlevel auf, während es bei Patient G3 erniedrigt war. Da Patient G3 zum Untersuchungszeitpunkt 12 Jahre alt war, war der erniedrigte Wert sehr wahrscheinlich auf den noch anstehenden Eintritt in die Geschlechtsreife zurückzuführen. Einzig Patientin C2 zeigte stark erhöhte Estradiol und Progesteron-Werte bei normalen, aber recht niedrigen LH- und FSH-Levels. Nach Rücksprache mit dem Institut für klinische Chemie der Uniklinik Regensburg deutet diese Hormonlage darauf hin, dass die Patientin zum Zeitpunkt der Untersuchung schwanger war. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen am Mausmodell, in dem weibliche, homozygote Mäuse ebenfalls gebärfähig waren, wäre dies durchaus möglich.

5 Diskussion

5.1 Fallbeschreibung

Diese Arbeit befasst sich mit weiterführenden Untersuchungen zur Pathophysiologie der ersten beim Menschen identifizierten krankheitsassoziierten Mutation im *EHD1*-Gen (c.1192C>T, p.R398W), die bei betroffenen Patienten zu tubulärer Proteinurie und Innenohrschwerhörigkeit führt (Issler et al. 2022). Neben der Niere und dem Innenohr wird EHD1 besonders stark im Hoden exprimiert. Es ist bekannt, dass männliche Mäuse, denen das *Ehd1*-Gen fehlt, verkleinerte Hoden aufweisen und unfruchtbar sind (Rainey et al. 2010). Jedoch war bisher nicht bekannt, ob auch die bei den oben genannten Patienten gefundene p.R398W-Mutation Einfluss auf die Hodenfunktion nimmt. Die vorliegende Dissertation beschreibt detaillierte Untersuchungen des Hodenphänotyps des *Ehd1*^{R398W/R398W}-knockin-Mausmodells, die schwere Störungen der Spermatogenese auf mehreren Ebenen aufzeigten und die Bedeutung von EHD1 für die männliche Keimzellreifung in ein neues Licht rückten.

5.2 Physiologische Funktion von EHD1

Das *Eps15-homology-domain containing protein 1* (EHD1) ist Teil einer hochkomplexen Maschinerie von Proteinen, die maßgeblich die intrazelluläre Membranorganisation und Vesikelspaltung im Rahmen endozytotischer Prozesse steuern. Weiterhin ist bekannt, dass EHD1 an der Ziliogenese beteiligt ist (Lu et al. 2015; Lu und Westlake 2021; Bhattacharyya et al. 2016). Aus diesen Gründen war es naheliegend, dass der Hoden als Organsystem, in dem komplexe Prozesse der Keimzellreifung zu einem großen Teil auf endozytotischen Vorgängen beruhen und in dem die Ziliogenese in Form der Spermienschwanzentwicklung ein zentrales Element darstellt, in hohem Maße auf eine normale Funktion von EHD1 angewiesen sein könnte.

5.3 Lokalisation und Expression von Ehd1 im murinen Hoden

EHD1 wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert, u.a. in der Niere, im Innenohr und im Gehirn. Die größte Expression findet sich bei Mensch und Maus jedoch im Hodengewebe. Die Spermatogenese – die männliche Keimzellreifung – findet in der kleinsten, funktionellen Einheit des Hodens - den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) – statt. Beim Menschen kann sie in 6 unterschiedliche Stadien (I-VI) eingeteilt werden, während bei der Maus 12 Stadien (I-XII) definiert sind. Ein jedes Stadium wird durch die typische Konstellation an Zellen im Samenepithel definiert und umfasst zeitlich abgestimmte, streng koordinierte und kontrollierte Prozesse, die für eine erfolgreiche Keimzellreifung essentiell sind. Ehd1 zeigte im Verlauf der murinen Spermatogenese ein stadienabhängiges Expressionsmuster, was darauf schließen lässt, dass die Funktion von Ehd1 zu bestimmten, zeitlich eingrenzenden Prozessen von

Bedeutung ist. In Verbindung mit der Lokalisation des Proteins innerhalb des Epithels wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass Ehd1 vor allem für die komplexen Ausdifferenzierungsprozesse der Spermiogenese eine Rolle spielt, zu denen u.a. die Kernformung- und Kondensation, die Entstehung des Akrosoms und des Flagellums, sowie die Abscheidung des überschüssigen Zytoplasmas und damit verbundene, membranöse Umgestaltungsprozesse gehören.

Vergleicht man das Expressionsmuster und die Lokalisation von Ehd1-mRNA und -Protein im Epithel (Abbildung 20, Ergänzende Abbildung 2), so wird eine zeitliche und räumliche Diskrepanz deutlich: Während das Protein hauptsächlich im Bereich der reifen, elongierten Spermatiden in unmittelbarer Nähe zum Tubuluslumen zu erkennen war, konzentrierte sich die mRNA auf den mittleren Bereich des Epithels, in dem hauptsächlich runde Spermatiden zu erkennen waren. Der Grund für diese Abweichungen liegt sehr wahrscheinlich in der sogenannten Translationsverzögerung: Als runde Spermatiden treten die Keimzellen in die Spermiogenese ein und erfahren dabei – wie bereits erwähnt - massive, strukturelle Veränderungen. Durch die Kondensation des Kernchromatins und der damit stark eingeschränkten Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zum genetischen Material werden bereits in den frühen Phasen der Spermiogenese, in der die Zugänglichkeit noch gewährleistet ist, viele mRNA's vorproduziert jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt in Protein translatiert (Braun 1998).

5.4 Beschreibung des Hodenphänotyps bei *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen

Die Infertilität der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse konnte auf einen drastischen Hodenphänotyp zurückgeführt werden, der sich bereits im Verlauf der ersten Spermatogenese-Welle (0-35dpp) manifestierte und mit zunehmendem Alter verschlimmerte. Im Folgenden sollen die ermittelten Auswirkungen der Mutation auf die Spermatogenese nochmals kurz zusammengefasst und diskutiert werden.

5.4.1 Veränderte Lokalisation im Samenepithel

Eine offensichtliche mutationsbedingte Veränderung stellt die pathologische Lokalisation des Ehd1-Proteins innerhalb des Samenepithels dar: Wildtyp-Ehd1 konnte abhängig vom vorherrschenden Spermatogenese-Stadium vor allem im Bereich elongierender Spermatiden in der Nähe des Tubuluslumens detektiert werden (Abbildung 21). Des Weiteren kolokalisierten granuläre, Ehd1-positive Strukturen mit prä-akrosomaler Granula an runden Spermatiden (Abbildung 28), sowie mit der Retromer-Komponente VPS35 an Spermatozyten (Abbildung 31). Die Ehd1-Mutante hingegen war aufgrund der mutationsbedingten Konformations- und Funktionsänderung nicht mehr in der Lage, die regelrechte stadienabhängige Expression aufrecht zu erhalten. Stattdessen wurde das mutierte Protein in

großen, runden Strukturen detektiert, bei denen es sich möglicherweise um abnormale Zytoplasma-Blasen handelte, oder aber in länglichen, vermutlich tubulären Aggregaten, die im gesamten Epithel verteilt waren. Eine Interaktion mit akrosomalen Strukturen oder dem Retromer schien nicht mehr möglich.

5.4.2 Beeinträchtigte Kernkondensation

Die charakteristische, speziesspezifische Form des Spermienköpfchens entsteht im Zuge der Spermiogenese durch ausgeprägte Kernformungs- und Kondensationsmechanismen. Während die Kernkondensation maßgeblich durch den Austausch von Histonen durch Protamine zustande kommt, wird die Formgebung zu einem Großteil durch das Zytoskelett bewerkstelligt. Eine mutationsbedingte Beeinträchtigung dieser Prozesse führte in *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen zu unterentwickelten und deformierten Spermienköpfchen, die im Kern unvollständig kondensiertes Chromatin aufwiesen. Ehd1 als Protein, das bereits mehrfach mit Vorgängen der Membranformung assoziiert wurde, leistet vermutlich auch einen Beitrag in der membranösen Umstrukturierung der Spermien.

5.4.3 Akrosomale Malformationen

Das Akrosom als eine hochspezialisierte Struktur, die das Spermienköpfchen zu ca. 2/3 bedeckt, ist essentiell für die Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle während des Fertilisationsprozesses. Es ist bekannt, dass seine Entwicklung in hohem Maße von der kontinuierlichen Zufuhr von Material über den Golgi-Apparat, aber auch von endozytiertem Material von der Plasmamembran abhängig ist. In *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen schienen bereits die frühen Entwicklungsstadien dieser Struktur grundlegend gestört zu sein, was schließlich zu massiven strukturellen akrosomalen Malformationen führte. Ehd1 interagiert an runden Spermatiden mit frühen akrosomalen Granula und blieb sogar in reifen Spermien, die aus dem Nebenhoden isoliert wurden, damit assoziiert, während das mutierte Protein keine Verbindung zu akrosomalen Strukturen einging.

5.4.4 Fehlerhafter Zusammenbau der Spermischwänze

Der Spermischwanz wird zu den motilen Zilien gezählt und ist für die gerichtete Fortbewegung der Spermien unerlässlich. Während der Entwicklung des Flagellums finden erhebliche Membranumbau- und Transportprozesse statt, wie es auch bei der Ziliogenese der Fall ist. Da EHD1 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von primären Zilien zugeschrieben wird, liegt es nahe, dass es auch bei der Entstehung und Entwicklung des Spermischwanzes eine bedeutende Rolle einnehmen könnte. Obwohl die Kernstruktur des Spermischwanzes – das Axonem – nicht betroffen zu sein schien und eine normale „9x2+2“-Struktur zeigte, wurden bei den *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen dennoch massive Probleme bei der

Bildung des Spermischwanzes deutlich: Während intakte Mittelstücke mit ihrer charakteristischen mitochondriellen Scheide gänzlich zu fehlen schienen, zeigten Querschnitte von Hauptstücken Deformationen der fibrösen Scheide. Zum Abbau vorgesehene, akzessorische Schwanzstrukturen konnten stattdessen in großen runden Strukturen im Samenepithel gefunden werden, bei welchen es sich vermutlich Lysosomen bzw. Autophagosomen handelte.

5.4.5 Beeinträchtigte BTB-Integrität

Die Blut-Hoden-Schranke (BTB) ist eine einzigartige, Hoden-spezifische und extrem dichte immunologische Barriere im Hodengewebe von Säugern. Obwohl ihre Aufgabe darin besteht, die heranreifenden Spermatozoen vor "äußeren Einflüssen" zu schützen, ist sie keine statische Struktur, sondern unterliegt einer ständigen Umgestaltung (Öffnung und Schließung). Es ist bekannt, dass dieses „Gating“ auf Endozytose, Transzytose und endosomal-vermittelten Abbau- und Recyclingprozessen beruht (Cheng und Mruk 2012). Die kontrollierte Öffnung, die den Übergang von präleptotenen Spermatozyten aus dem basalen in das adluminal Kompartiment ermöglicht, findet im Stadium VII-VIII statt und fällt zeitlich mit der Spermiation zusammen (Cheng et al. 2011). Erste Experimente zur Überprüfung der BTB-Integrität durch Injektion von HOE33258 ließen vermuten, dass die Barrierefunktion der Blut-Hoden-Schranke aufgrund der Mutation in *Ehd1* verändert war, da der DNA-Farbstoff zu den luminal-gelegenen Zellen vordringen konnte, die normalerweise im Schutze der BTB stehen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Abschnitten der BTB, die sich wahllos im Cytoplasma kräuselten, unterstützten die Vermutung, dass die Integrität der Blut-Hoden-Schranke mutationsbedingt aufgehoben war. Eine Aussage darüber, ob die gestörte BTB-Integrität im Gesamtbild dieses komplexen und schweren Hodenphänotyps eine Ursache oder eine Folge darstellt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

5.4.6 Einschränkung der Interaktion mit dem Retromer-Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Immunfärbungen zeigen, dass die *Ehd1*-Mutante sowohl im Hodengewebe als auch im induzierbaren Zellsystem die Fähigkeit zur Interaktion mit dem Retromer-Komplex verloren hatte (Abbildungen 31,32). Das Retromer ist dafür bekannt, eine wichtige Rolle in der hochkomplexen und vielschichtigen Endozytose-Maschinerie zu spielen, indem es die Verteilung der Fracht über den retrograden Transport zum Golgi-Apparat reguliert (McKenzie et al. 2012). Eine Interaktion zwischen EHD1 und dem Retromer wurde bereits beschrieben, obwohl die genauen Mechanismen nach wie vor ungelöst sind (Gokool et al. 2007). Auch im Rahmen der Autophagie (Cui et al. 2019) und im lysosomalen System (Maruzs et al. 2015) soll das Retromer eine wichtige Rolle spielen. Die *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse zeigten große, runde Strukturen im Hodenepithel mit

eingeschlossenem defektem oder teilweise abgebautem Material. Es ist denkbar, dass diese abnorm großen Strukturen pathologische Autophagosomen oder Lysosomen darstellen und dass ihr Auftreten mit einer veränderten Ehd1- und/oder Retromer-Funktion in Verbindung gebracht werden könnte. Inwiefern EHD1 und der Retromer-Komplex im Rahmen der Spermatogenese miteinander in Verbindung stehen, welche Bedingungen für eine Interaktion erfüllt sein müssen und welche weiteren Faktoren beteiligt sind, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

5.4.7 Veränderung membranöser Umgestaltungsprozesse

In-silico Strukturanalysen zeigten, dass der mutationsbedingte Austausch der Aminosäure Arginin durch ein Tryptophan an Stelle p.398 im Ehd1-Protein die Dimerisierung zweier EHD1-Monomere und damit auch die Oligomerisierung beeinträchtigt (Issler et al. 2022). Infolgedessen bleiben Zielmembranen ungeschnitten und große, mit EHD1 dekorierte tubuläre Strukturen entstehen. Insbesondere während der Spermatogenese ist der Membranumbau ein wesentliches Ereignis für die sich entwickelnden Keimzellen, um ihre endgültige Form, Funktionalität und Motilität zu erlangen. In diesem Zusammenhang könnten die beobachteten strukturellen Defekte wie eine eingeschränkte Kernkondensation und -Formung, akrosomale Fehlbildungen, sowie die unvollständige Spermischwanzbildung das Ergebnis von pathologisch eingeschränkten Membranformungsprozessen darstellen.

5.4.8 Verringerte meiotische Aktivität

Die quantitative Zusammensetzung der verschiedenen Keimzellstadien im Hodenepithel kann für eine Beurteilung der meiotischen Teilungsaktivität verwendet werden (Schradin et al. 2012). Es können tetraploide (primäre Spermatozyten & mitotisch-aktive Spermatogonien in der G2/M-Phase), diploide (sekundäre Spermatozyten, Spermatogonien und somatische Zellen) und haploide (Spermatiden & Spermatozoa) Zellen unterschieden werden. Vorläufige Ergebnisse deuteten auf negative Auswirkungen der Ehd1-Variante auf die meiotische Teilungsaktivität hin, da die Ausbeute an haploiden Zellen reduziert war (Abbildung 34). Die reduzierte Rate haploider Zellen könnte allerdings auch einem beschleunigten Abbau oder Untergang dieser Zellen geschuldet sein.

5.5 *Loss-of-function vs. gain-of-function*

Die hier beschriebenen Beobachtungen im Hodengewebe von *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen ähneln der von Rainey et al. beschriebenen Hodenpathologie eines globalen *Ehd1*-knockouts (Rainey et al. 2010). Die Ähnlichkeit der Pathologien legt nahe, dass es sich bei der p.R398W-Mutation möglicherweise um eine *Loss-of-Function*-Mutation handelt, durch die das Protein seine eigentliche Funktion verliert und dadurch die Pathologie ausgelöst wird. Sowohl *Ehd1*^{-/-}, als

auch *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse waren nicht in der Lage, Nachkommen zu zeugen. Das Fortschreiten der Spermatogenese schien verzögert zu sein, und beide Genotypen zeigten prominente, akrosomale Malformationen. Rainey et al. führten das Fehlen von reifen Spermien auf ein Versagen der Spermiogenese zurück, also der Ausdifferenzierung der Spermatiden zu reifen Spermatozoa. Bei *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen traten die größten Probleme ebenfalls während dieses Reifungsprozesses auf, was letztlich zu einer stark verminderten Produktion von reifen, funktionellen Spermien, sowie einer verstärkten Phagozytose der unterentwickelten Zellen und der Zelltrümmer führte. Es ist wahrscheinlich, dass die massive Zerstörung des Hodenepithels und die damit verbundene epitheliale Dysfunktion in einer fortschreitenden Atrophie der Tubuli resultiert und dadurch das drastisch reduzierte Gewicht der Hoden im Vergleich zum Wildtyp bedingte. Die erlangten Erkenntnisse über die Auswirkungen der Mutation bekräftigen die Vermutung der Rainey-Gruppe, dass Ehd1- zumindest im murinen Organismus - als bedeutendes Protein während endozytischer Prozesse im Rahmen der Spermatogenese gesehen werden kann. Der hohe Zerstörungsgrad und die geringe Expression anderer Mitglieder der EHD-Proteinfamilie im Hodengewebe lassen vermuten, dass kompensatorische Effekte eher unwahrscheinlich sind. Es muss jedoch angemerkt werden, dass - obwohl ein mutationsbedingter Funktionsverlust von Ehd1 naheliegt - nicht ausgeschlossen werden kann, dass es eine zusätzliche *gain-of-function*-Komponente gibt. Für die Möglichkeit einer pathologischen Funktion durch das mutierte Protein spricht die Tatsache, dass das mutierte Protein in pathologisch aussehenden runden Zellen im Bereich des Tubuluslumens sowie in vermutlich tubulären intrazellulären Strukturen zu finden ist. Es ist denkbar, dass das mutierte Protein nicht nur eine aufgehobene physiologische Funktion aufweist, sondern durch seine Anwesenheit zelluläre Prozesse stört und damit für die im Vergleich zur Knockoutmaus noch tiefgreifendere Hodenpathologie verantwortlich ist.

5.6 Relevanz für die männliche Fertilität beim Menschen

Auch wenn sich im Mausmodell ein eindeutiger und ausgeprägter Hodenphänotyp zeigte, ist der Fertilitätsstatus der männlichen Patienten weiterhin unklar. Dies ist hauptsächlich dadurch bedingt, zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung der Patienten keinerlei Hinweise auf eine Infertilitätsproblematik vorlagen und es daher unterlassen wurde, spezifisch danach zu suchen. Der Aufenthaltsort der Patienten in einer Krisenregion des Nahen Ostens sowie die Zugehörigkeit der Patienten zur drusischen Glaubensgemeinschaft, die für ihre streng-religiösen Überzeugungen bekannt ist, haben bisher die erneute Kontaktaufnahme verhindert. Somit fehlt derzeit der Nachweis eines menschlichen Hodenphänotyps in Verbindung mit der beschriebenen Variante in *EHD1*.

Obwohl nur wenige Daten zur Beteiligung von EHD1 in der humanen Spermatogenese vorliegen, wurde *EHD1* als potentiell Kandidaten-Genen für ein Versagen der Spermatogenese beim Menschen bereits diskutiert (Kui et al. 2019).

Schwere Ausprägungen der männlichen Unfruchtbarkeit können zwar nicht direkt von väterlicher Seite vererbt werden, jedoch über ein autosomal-rezessives Vererbungsmuster durch nicht-betroffene, heterozygote Eltern, sowie über X-chromosomale Vererbung (Yatsenko et al. 2015). Es wird vermutet, dass mindestens 15% der Fälle von männlicher Unfruchtbarkeit auf die Genetik zurückzuführen sind (Shamsi et al. 2011; Tournaye et al. 2017). Im Rahmen einer groß angelegten Studie aus dem Jahr 2018 konnte nur in 4% der infertilen Männer eine kausale genetische Diagnose gestellt werden (Tüttelmann et al. 2018), denn trotz der stetigen Weiterentwicklung in der molekularen Diagnostik ist das Wissen über die Beteiligung genetischer Komponenten bei männlicher Infertilität immer noch begrenzt. Die p.R398W-Mutation folgt einem solchen autosomal-rezessiven Vererbungsmuster, betrifft lediglich die männlichen Betroffenen und könnte in der Zukunft zur Anerkennung von EHD1 als mögliches Infertilitätsgen führen.

Eine Kombination aus Schwerhörigkeit und männlicher Infertilität wird auch als Phänotyp des Deafness-Infertility-Syndroms (DIS) beschrieben. Als ursächlich wird hierbei eine Deletion der Gene für Stereocilin (STRC) und für eine Untereinheit des CatSper-Ionenkanals (CATSPER2) auf Chromosom 15 gesehen, die zu einer funktionellen Einschränkung der sensorischen Zellen im Innenohr, sowie der CatSper-Calciumkanäle im Hauptstück des Spermischwanzes führt. Der Einstrom von Calcium ins Innere des Spermischwanzes – ausgelöst durch eine Progesteron-abhängige Aktivierung der CatSper-Kanäle - führt unter normalen Umständen zu Beschleunigung des Flagellenschlags, die essentiell für die Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle ist. Betroffene Männer sind zeugungsunfähig, obwohl die Spermien keine morphologischen Veränderungen aufweisen (Zhang et al. 2007). Das Deafness-Infertility-Syndrom unterliegt wie die *EHD1*-Mutation einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster. Obwohl sich Ursachen der Ehd1-assoziierten Infertilität von jenen der DIS grundlegend unterscheiden, stellt diese Diagnose dennoch ein weiteres Beispiel für genetisch-bedingte Infertilität, die mit einer Beeinträchtigung des Hörvermögens einhergeht (Hildebrand et al. 2010). Die Schwerhörigkeit der EHD1-Patienten ist zwar belegt, jedoch ist bisher nicht geklärt, welche für das Hörvermögen essentiellen Mechanismen dabei von der Mutation beeinträchtigt werden. Umfassende Untersuchungen dazu laufen und sollen alsbald veröffentlicht werden. Möglicherweise liefern diese Ergebnisse neue Hinweise auf bisher unbeachtete Aspekte der EHD1-Funktion, die auch für die Bedeutung des EHD1-Proteins für die Spermatogenese relevant sein könnten.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Komplexität der Abläufe während der Spermatogenese in Kombination mit dem begrenzten Wissen über genetische Komponenten der männlichen Infertilität macht die Identifikation möglicherweise involvierter Gene umso bedeutender. Die bei Patienten mit niedermolekularer Proteinurie und Schwerhörigkeit gefundene p.R398W-Variante in EHD1 resultierte im korrespondierenden *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mausmodell in einer prominenten, vollständigen Infertilität männlicher homozygoter Mutationsträger. Sie ist die erste beschriebene humane Mutation in *EHD1*, die erhebliche Auswirkungen auf die murine Spermatogenese zeigte und zu Infertilität führte. Die Ursachen der Unfruchtbarkeit konnten mutationsbedingten Einschränkungen in verschiedenen Prozessen der Spermatogenese zugeordnet werden, von denen sich die meisten im Zuge der Spermiogenese abspielen: Die Kernformung und -kondensation, die Akrosomenformation, die Entwicklung des Spermischwanzes, die Regulation der Blut-Hoden-Schranke, die Interaktion mit dem Retromer als bedeutende Komponente des Trans-Golgi-Netzwerkes, sowie membranöse Umgestaltungsprozesse. Vermutlich ist auch die meiotische Teilungsaktivität eingeschränkt. Obwohl sich murine Spermatogenese in manchen Punkten von der humanen unterscheidet, zeigen sich dennoch große Parallelen, was eine erste Grundlage für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus darstellt. Nichtsdestotrotz fehlt bislang die Bestätigung eines Hodenphänotyps bei den männlichen Patienten, da zum Zeitpunkt der umfassenden Untersuchungen weder Fertilitäts-Tests durchgeführt noch Informationen über den Familienstand oder einen unerfüllten Kinderwunsch erhoben wurden. Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt keine Möglichkeit besteht, mit den *EHD1*-Patienten erneut in Kontakt zu treten, so wäre es dennoch ein immenser Fortschritt, einige der hier beschriebenen Untersuchungen an humanem Hodengewebe durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die dargelegten Ergebnisse für eine zentrale Rolle von EHD1 bei der männliche Keimzellreifung sprechen und sie bestätigen damit die Erkenntnisse einer vorausgegangenen Studie (Rainey et al. 2010). Der Aspekt über die Rolle des Retromers als potenzieller Interaktor von EHD1 während der Spermatogenese ist neu und bedarf weiterer Untersuchungen. Insgesamt bildet diese Arbeit eine solide Grundlage für Studien, mit deren Hilfe EHD1 als mögliches Infertilitätsgen im Menschen identifiziert werden könnte.

7 Literaturverzeichnis

Aktories, K.; Flockerzi, V.; Förstermann U; Hofmann, F. B.; Bernhard, F. (Hg.) (2022): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier GmbH. 13. Auflage: Urban & Fischer Verlag.

Allgood, Samuel C.; Neunuebel, M. Ramona (2018): The recycling endosome and bacterial pathogens. In: *Cellular microbiology* 20 (7), e12857. DOI: 10.1111/cmi.12857.

Allison, A. C.; Hartree, E. F. (1970): Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. In: *Journal of Reproduction and Fertility* (21), S. 501–515.

Anderson, Ericka L.; Baltus, Andrew E.; Roepers-Gajadien, Hermien L.; Hassold, Terry J.; Rooij, Dirk G. de; van Pelt, Ans M. M.; Page, David C. (2008): Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39), S. 14976–14980. DOI: 10.1073/pnas.0807297105.

Arya, Priyanka; Rainey, Mark A.; Bhattacharyya, Sohinee; Mohapatra, Bhopal C.; George, Manju; Kuracha, Murali R. et al. (2015): The endocytic recycling regulatory protein EHD1 Is required for ocular lens development. In: *Developmental biology* 408 (1), S. 41–55. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.10.005.

Azhar, Muhammad; Altaf, Saba; Uddin, Islam; Cheng, Jinbao; Wu, Limin; Tong, Xianhong et al. (2021): Towards Post-Meiotic Sperm Production: Genetic Insight into Human Infertility from Mouse Models. In: *International journal of biological sciences* 17 (10), S. 2487–2503. DOI: 10.7150/ijbs.60384.

Babakhanzadeh, Emad; Nazari, Majid; Ghasemifar, Sina; Khodadadian, Ali (2020): Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. In: *International journal of general medicine* 13, S. 29–41. DOI: 10.2147/IJGM.S241099.

Bahl, Kriti; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2015): Role of the EHD2 unstructured loop in dimerization, protein binding and subcellular localization. In: *PloS one* 10 (4), e0123710. DOI: 10.1371/journal.pone.0123710.

Berruti, Giovanna; Paiardi, Chiara (2011): Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. In: *Spermatogenesis* 1 (2), S. 95–98. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16820.

Bhattacharyya, Sohinee; Rainey, Mark A.; Arya, Priyanka; Mohapatra, Bhopal C.; Mushtaq, Insha; Dutta, Samikshan et al. (2016): Endocytic recycling protein EHD1 regulates primary cilia morphogenesis and SHH signaling during neural tube development. In: *Scientific reports* 6, S. 20727. DOI: 10.1038/srep20727.

- Blume, Jessica J.; Halbach, Arndt; Behrendt, Dieter; Paulsson, Mats; Plomann, Markus (2007): EHD proteins are associated with tubular and vesicular compartments and interact with specific phospholipids. In: *Experimental cell research* 313 (2), S. 219–231. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.10.006.
- Boivin, Jacky; Bunting, Laura; Collins, John A.; Nygren, Karl G. (2007): International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 22 (6), S. 1506–1512. DOI: 10.1093/humrep/dem046.
- Braun, R. E. (1998): Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. In: *Seminars in cell & developmental biology* 9 (4), S. 483–489. DOI: 10.1006/scdb.1998.0226.
- Brown, Paula R.; Miki, Kiyoshi; Harper, Deborah B.; Eddy, Edward M. (2003): A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. In: *Biology of reproduction* 68 (6), S. 2241–2248. DOI: 10.1095/biolreprod.102.013466.
- Caplan, Steve; Naslavsky, Naava; Hartnell, Lisa M.; Lodge, Robert; Polishchuk, Roman S.; Donaldson, Julie G.; Bonifacino, Juan S. (2002): A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. In: *The EMBO journal* 21 (11), S. 2557–2567. DOI: 10.1093/emboj/21.11.2557.
- Cheng, C. Yan; Mruk, Dolores D. (2012): The blood-testis barrier and its implications for male contraception. In: *Pharmacological reviews* 64 (1), S. 16–64. DOI: 10.1124/pr.110.002790.
- Cheng, C. Yan; Wong, Elissa Wp; Lie, Pearl Py; Li, Michelle Wm; Mruk, Dolores D.; Yan, Helen Hn et al. (2011): Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. In: *Spermatogenesis* 1 (2), S. 105–115. DOI: 10.4161/spmg.1.2.15745.
- Conner, Sean D.; Schmid, Sandra L. (2003): Regulated portals of entry into the cell. In: *Nature* 422 (6927), S. 37–44. DOI: 10.1038/nature01451.
- Cui, Yi; Carosi, Julian M.; Yang, Zhe; Ariotti, Nicholas; Kerr, Markus C.; Parton, Robert G. et al. (2019): Retromer has a selective function in cargo sorting via endosome transport carriers. In: *The Journal of cell biology* 218 (2), S. 615–631. DOI: 10.1083/jcb.201806153.
- Da Ros, Matteo; Hirvonen, Noora; Olotu, Opeyemi; Toppari, Jorma; Kotaja, Noora (2015): Retromer vesicles interact with RNA granules in haploid male germ cells. In: *Molecular and cellular endocrinology* 401, S. 73–83. DOI: 10.1016/j.mce.2014.11.026.
- Daumke, Oliver; Lundmark, Richard; Vallis, Yvonne; Martens, Sascha; Butler, P. Jonathan G.; McMahon, Harvey T. (2007): Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase

- involved in membrane remodelling. In: *Nature* 449 (7164), S. 923–927. DOI: 10.1038/nature06173.
- Di Fiore, Pier Paolo; Zastrow, Mark von (2014): Endocytosis, signaling, and beyond. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a016865.
- Doherty, Gary J.; McMahon, Harvey T. (2009): Mechanisms of endocytosis. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 857–902. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Dunleavy, Jessica E. M.; O'Bryan, Moira K.; Stanton Peter G; O'Donnell, Liza (2019): The cytoskeleton in spermatogenesis. In: *Reproduction* (157), R53-R72. DOI:10.1530/REP-18-0457
- Eddy, Edward M.; Toshimori, Kiyotaka; O'Brien, Deborah A. (2003): Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. In: *Microscopy research and technique* 61 (1), S. 103–115. DOI: 10.1002/jemt.10320.
- Elraiyah, Tarig; Sonbol, Mohamad Bassam; Wang, Zhen; Khairalseed, Tagwa; Asi, Noor; Undavalli, Chaitanya et al. (2014): Clinical review: The benefits and harms of systemic testosterone therapy in postmenopausal women with normal adrenal function: a systematic review and meta-analysis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (10), S. 3543–3550. DOI: 10.1210/jc.2014-2262.
- Farmer, Trey; Reinecke, James B.; Xie, Shuwei; Bahl, Kriti; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2017): Control of mitochondrial homeostasis by endocytic regulatory proteins. In: *Journal of cell science* 130 (14), S. 2359–2370. DOI: 10.1242/jcs.204537.
- Fawcett, D. W. (1975): The Mammalian Spermatozoon. In: *Developmental biology* (44), S. 394–436. DOI:10.1016/0012-1606(75)90411-x
- Friend, D. S.; Fawcett, D. W. (1974): Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. In: *The Journal of cell biology* 63 (2 Pt 1), S. 641–664. DOI: 10.1083/jcb.63.2.641.
- Galperin, Emilia; Benjamin, Sigi; Rapaport, Debora; Rotem-Yehudar, Rinat; Tolchinsky, Sandra; Horowitz, Mia (2002): EHD3: a protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (8), S. 575–589. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2002.30807.x.
- Ganga, Anil Kumar; Kennedy, Margaret C.; Oguchi, Mai E.; Gray, Shawn; Oliver, Kendall E.; Knight, Tracy A. et al. (2021): Rab34 GTPase mediates ciliary membrane formation in the intracellular ciliogenesis pathway. In: *Current biology: CB* 31 (13), 2895-2905.e7. DOI: 10.1016/j.cub.2021.04.075.
- George, Manju; Ying, Guoguang; Rainey, Mark A.; Solomon, Aharon; Parikh, Pankit T.; Gao, Qingshen et al. (2007): Shared as well as distinct roles of EHD proteins revealed by

- biochemical and functional comparisons in mammalian cells and *C. elegans*. In: *BMC cell biology* 8, S. 3. DOI: 10.1186/1471-2121-8-3.
- Gervasi, M. G.; Visconti, P. E. (2017): Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. In: *Andrology* 5 (2), S. 204–218. DOI: 10.1111/andr.12320.
- Gokool, Suzanne; Tattersall, Daniel; Seaman, Matthew N. J. (2007): EHD1 interacts with retromer to stabilize SNX1 tubules and facilitate endosome-to-Golgi retrieval. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (12), S. 1873–1886. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00652.x.
- Goldenring, James R. (2015): Recycling endosomes. In: *Current opinion in cell biology* 35, S. 117–122. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.04.018.
- Grant, Barth D.; Donaldson, Julie G. (2009): Pathways and mechanisms of endocytic recycling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (9), S. 597–608. DOI: 10.1038/nrm2755.
- Griswold, Michael D. (2016): Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. In: *Physiological reviews* 96 (1), S. 1–17. DOI: 10.1152/physrev.00013.2015.
- Hayes, F. J. (2001): Differential Regulation of Gonadotropin Secretion by Testosterone in the Human Male: Absence of a Negative Feedback Effect of Testosterone on Follicle-Stimulating Hormone Secretion. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (1), S. 53–58. DOI: 10.1210/jc.86.1.53.
- Hecht, Norman B. (1998): Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. In: *Bioessays* 20 (7), S. 555–561. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199807)20:7<555::AID-BIES6>3.0.CO;2-J.
- Hildebrand, Michael S.; Avenarius, Matthew R.; Fellous, Marc; Zhang, Yuzhou; Meyer, Nicole C.; Auer, Jana et al. (2010): Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. In: *European journal of human genetics: EJHG* 18 (11), S. 1178–1184. DOI: 10.1038/ejhg.2010.108.
- Hogarth, Cathryn (2015): Retinoic acid metabolism, signaling, and function in the adult testis. In: *Sertoli Cell Biology*: Elsevier, S. 247–272. DOI:10.1016/B978-0-12-417047-6.00009-0
- Hogarth, Cathryn A.; Griswold, Michael D. (2010): The key role of vitamin A in spermatogenesis. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (4), S. 956–962. DOI: 10.1172/JCI41303.
- Ikawa, Masahito; Inoue, Naokazu; Benham, Adam M.; Okabe, Masaru (2010): Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (4), S. 984–994. DOI: 10.1172/JCI41585.

- Issler, Naomi; Afonso, Sara; Weissman, Irith; Jordan, Katrin; Cebrian-Serrano, Alberto; Meindl, Katrin et al. (2022): A Founder Mutation in EHD1 Presents with Tubular Proteinuria and Deafness. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 33 (4), S. 732–745. DOI: 10.1681/ASN.2021101312.
- Johnson, L.; Petty, C. S.; Neaves, W. B. (1980): A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. In: *Biology of reproduction* 22 (5), S. 1233–1243. DOI: 10.1093/biolreprod/22.5.1233.
- Jones, Tyler; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2020): Eps15 Homology Domain Protein 4 (EHD4) is required for Eps15 Homology Domain Protein 1 (EHD1)-mediated endosomal recruitment and fission. In: *PLoS one* 15 (9), e0239657. DOI: 10.1371/journal.pone.0239657.
- Khawar, Muhammad Babar; Gao, Hui; Li, Wei (2019): Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 7, S. 195. DOI: 10.3389/fcell.2019.00195.
- Kieken, Fabien; Jović, Marko; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve; Sorgen, Paul L. (2007): EH domain of EHD1. In: *Journal of biomolecular NMR* 39 (4), S. 323–329. DOI: 10.1007/s10858-007-9196-0.
- Kieken, Fabien; Jović, Marko; Tonelli, Marco; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve; Sorgen, Paul L. (2009): Structural insight into the interaction of proteins containing NPF, DPF, and GPF motifs with the C-terminal EH-domain of EHD1. In: *Protein Science* 18 (12), S. 2471–2479. DOI: 10.1002/pro.258.
- Kieken, Fabien; Sharma, Mahak; Jovic, Marko; Giridharan, Sai Srinivas Panapakkam; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve; Sorgen, Paul L. (2010): Mechanism for the selective interaction of C-terminal Eps15 homology domain proteins with specific Asn-Pro-Phe-containing partners. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (12), S. 8687–8694. DOI: 10.1074/jbc.M109.045666.
- Kierszenbaum, Abraham L. (2002): Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. In: *Molecular reproduction and development* 63 (1), S. 1–4. DOI: 10.1002/mrd.10179.
- Kierszenbaum, Abraham L.; Tres, Laura L. (2004): The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. In: *Archives of histology and cytology* 67 (4), S. 271–284. DOI: 10.1679/aohc.67.271.
- Kui, Fang; Ye, Hui; Chen, Xi-Ling; Zhang, Jun (2019): Microarray meta-analysis identifies candidate genes for human spermatogenic arrest. In: *Andrologia* 51 (8), e13301. DOI: 10.1111/and.13301.

- Kumar, Naina; Singh, Amit Kant (2015): Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. In: *Journal of human reproductive sciences* 8 (4), S. 191–196. DOI: 10.4103/0974-1208.170370.
- Lampe, Marko; Vassilopoulos, Stéphane; Merrifield, Christien (2016): Clathrin coated pits, plaques and adhesion. In: *Journal of structural biology* 196 (1), S. 48–56. DOI: 10.1016/j.jsb.2016.07.009.
- Larsen, Ulla (2005): Research on infertility: which definition should we use? In: *Fertility and Sterility* 83 (4), S. 846–852. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.033.
- Lehti, Mari S.; Sironen, Anu (2017): Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. In: *Biology of reproduction* 97 (4), S. 522–536. DOI: 10.1093/biolre/iox096.
- Lewit-Bentley, Anita; Réty, Stephane (2000): EF-hand calcium-binding proteins. In: *Structural Biology* (10), S. 637–643. DOI:10.1016/s0959-440x(00)00142-1
- Liu, Yue; Fan, Jiaying; Yan, Yan; Dang, Xuening; Zhao, Ran; Xu, Yimei; Ding, Zhide (2020): JMY expression by Sertoli cells contributes to mediating spermatogenesis in mice. In: *The FEBS journal* 287 (24), S. 5478–5497. DOI: 10.1111/febs.15328.
- Livera, G.; Rouiller-Fabre, V.; Pairault, C.; Levacher, C.; Habert, R. (2002): Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. In: *Reproduction*, S. 173–180. DOI: 10.1530/rep.0.1240173.
- Lu, Quanlong; Insinna, Christine; Ott, Carolyn; Stauffer, Jimmy; Pintado, Petra A.; Rahajeng, Juliati et al. (2015): Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. In: *Nature cell biology* 17 (3), S. 228–240. DOI: 10.1038/ncb3109.
- Lu, Quanlong; Westlake, Christopher J. (2021): CLEM Characterization of Rab8 and Associated Membrane Trafficking Regulators at Primary Cilium Structures. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2293, S. 91–103. DOI: 10.1007/978-1-0716-1346-7_7.
- Martínez-Menárguez, J. A.; Geuze, H. J.; Ballesta, J.(1996): Evidence for a Nonlysosomal Origin of the Acrosome. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44(4), S. 313–320. DOI:10.1177/44.4.8601690
- Maruzs, Tamás; Lőrincz, Péter; Szatmári, Zsuzsanna; Széplaki, Szilvia; Sándor, Zoltán; Lakatos, Zsolt et al. (2015): Retromer Ensures the Degradation of Autophagic Cargo by Maintaining Lysosome Function in Drosophila. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (10), S. 1088–1107. DOI: 10.1111/tra.12309.
- Mascarenhas, Maya N.; Flaxman, Seth R.; Boerma, Ties; Vanderpoel, Sheryl; Stevens, Gretchen A. (2012): National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a

- systematic analysis of 277 health surveys. In: *PLoS medicine* 9 (12), e1001356. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001356.
- McFarlane, L.; Truong, V.; Palmer, J. S.; Wilhelm, D. (2013): Novel PCR assay for determining the genetic sex of mice. In: *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 7 (4), S. 207–211. DOI: 10.1159/000348677.
- McKenzie, Jenna E.; Raisley, Brent; Zhou, Xin; Naslavsky, Naava; Taguchi, Tomohiko; Caplan, Steve; Sheff, David (2012): Retromer guides STxB and CD8-M6PR from early to recycling endosomes, EHD1 guides STxB from recycling endosome to Golgi. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (8), S. 1140–1159. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2012.01374.x.
- McLachlan, R. I. (2000): The endocrine control of spermatogenesis. In: *Bailliere's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 14 (3), S. 345–362. DOI: 10.1053/beem.2000.0084.
- McLachlan, R. I.; O'Donnell, L.; Meachem, S. J.; Stanton, P. G.; Kretser, D. M. de; Pratis, K.; Robertson, D. M. (2002): Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. In: *Recent progress in hormone research* 57, S. 149–179. DOI: 10.1210/rp.57.1.149.
- Meistrich, Marvin L.; Hess, Rex A. (2013): Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 927, S. 299–307. DOI: 10.1007/978-1-62703-038-0_27.
- Mintz, L.; Galperin, E.; Pasmanik-Chor, M.; Tulzinsky, S.; Bromberg, Y.; Kozak, C. A. et al. (1999): EHD1--an EH-domain-containing protein with a specific expression pattern. In: *Genomics* 59 (1), S. 66–76. DOI: 10.1006/geno.1999.5800.
- Molla-Herman, Anahi; Ghossoub, Rania; Blisnick, Thierry; Meunier, Alice; Serres, Catherine; Silbermann, Flora et al. (2010): The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 10), S. 1785–1795. DOI: 10.1242/jcs.059519.
- Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Chan, E. K.; Wessel, G. M.; Schatten, G. (2000): The Golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during rhesus spermiogenesis: structural alterations. In: *Developmental biology* 219 (2), S. 334–349. DOI: 10.1006/dbio.2000.9606.
- Moreno, Ricardo D. (2003): Differential expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP-1) during mammalian spermiogenesis. In: *Molecular reproduction and development* 66 (2), S. 202–209. DOI: 10.1002/mrd.10342.

- Moreno, Ricardo D.; Alvarado, Carlos P. (2006): The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. In: *Molecular reproduction and development* 73 (11), S. 1430–1434. DOI: 10.1002/mrd.20581.
- Moreno, Ricardo D.; Schatten, Gerald (2000): Microtubule configurations and post-translational tubulin modifications during mammalian spermatogenesis. In: *Cell Motil. Cytoskeleton* 46 (4), S. 235–246. DOI: 10.1002/1097-0169(200008)46:4<235::AID-CM1>3.0.CO;2-G.
- Naslavsky, Naava; Boehm, Markus; Backlund, Peter S.; Caplan, Steve (2004): Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane. In: *Molecular biology of the cell* 15 (5), S. 2410–2422. DOI: 10.1091/mbc.e03-10-0733.
- Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2011): EHD proteins: key conductors of endocytic transport. In: *Trends in cell biology* 21 (2), S. 122–131. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.10.003.
- Naslavsky, Naava; Rahajeng, Juliati; Chenavas, Sylvie; Sorgen, Paul L.; Caplan, Steve (2007): EHD1 and Eps15 interact with phosphatidylinositols via their Eps15 homology domains. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (22), S. 16612–16622. DOI: 10.1074/jbc.M609493200.
- Naslavsky, Naava; Rahajeng, Juliati; Sharma, Mahak; Jovic, Marko; Caplan, Steve (2006): Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. In: *Molecular biology of the cell* 17 (1), S. 163–177. DOI: 10.1091/mbc.e05-05-0466.
- OAKBERG, E. F. (1956): Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. In: *The American journal of anatomy* 99 (3), S. 507–516. DOI: 10.1002/aja.1000990307.
- O'Donnell, Liza (2014): Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. In: *Spermatogenesis* 4 (2), e979623. DOI: 10.4161/21565562.2014.979623.
- O'Donnell, Liza; O'Bryan, Moira K. (2014): Microtubules and spermatogenesis. In: *Seminars in cell & developmental biology* 30, S. 45–54. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.01.003.
- Ombelet, Willem; Cooke, Ian; Dyer, Silke; Serour, Gamal; Devroey, Paul (2008): Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. In: *Human reproduction update* 14 (6), S. 605–621. DOI: 10.1093/humupd/dmn042.
- O'Shaughnessy, Peter J. (2014): Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. In: *Seminars in cell & developmental biology* 29, S. 55–65. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.010.
- Pala, Rajasekharreddy; Jamal, Maha; Alshammari, Qamar; Nauli, Surya M. (2018): The Roles of Primary Cilia in Cardiovascular Diseases. In: *Cells* 7 (12). DOI: 10.3390/cells7120233.

- Paoluzi, S.; Castagnoli, L.; Lauro, I.; Salcini, A. E.; Coda, L.; Fre', S. et al. (1998): Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast. In: *The EMBO journal* 17 (22), S. 6541–6550. DOI: 10.1093/emboj/17.22.6541.
- Pigino, Gaia; Ishikawa, Takashi (2012): Axonemal radial spokes: 3D structure, function and assembly. In: *Bioarchitecture* 2 (2), S. 50–58. DOI: 10.4161/bioa.20394.
- Polo, Simona; Confalonieri, Stefano; Salcini, Anna Elisabetta; Di Fiore, Pier Paolo (2003): EH and UIM: endocytosis and more. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003 (213), re17. DOI: 10.1126/stke.2132003re17.
- Rainey, Mark A.; George, Manju; Ying, Guoguang; Akakura, Reiko; Burgess, Daniel J.; Siefker, Ed et al. (2010): The endocytic recycling regulator EHD1 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice. In: *BMC developmental biology* 10, S. 37. DOI: 10.1186/1471-213X-10-37.
- Rapaport, Debora; Lugassy, Yevgenia; Sprecher, Eli; Horowitz, Mia (2010): Loss of SNAP29 Impairs Endocytic Recycling and Cell Motility. In: *PloS one* (5(3):e9759. DOI:10.1371/journal.pone.0009759.
- Rattner, J. B.; Brinkley, B. R. (1972): Ultrastructure of Mammalian Spermiogenesis. In: *Journal of Ultrastructure Research* 41(3), S. 209–218. DOI:10.1016/s0022-5320(72)90065-2
- Russell, L. D.; Russell, J. A.; MacGregor, G. R.; Meistrich, M. L. (1991): Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. In: *The American journal of anatomy* 192 (2), S. 97–120. DOI: 10.1002/aja.1001920202.
- Rutstein, Shea O. and Iqbal H. Shah (2004): Infecundity, Infertility and Childlessness in Developing Countries. Hg. v. DHS Comparative Reports No. 9. ORC Macro and the World Health Organization. Calverton, Maryland, USA. Online verfügbar unter <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/CR9/CR9.pdf>.
- Salcini, A. E.; Confalonieri, S.; Doria, M.; Santolini, E.; Tassi, E.; Minenkova, O. et al. (1997): Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. In: *Genes & development* 11 (17), S. 2239–2249. DOI: 10.1101/gad.11.17.2239.
- Schradin, Carsten; Eder, Susanne; Müller, Karin (2012): Differential investment into testes and sperm production in alternative male reproductive tactics of the African striped mouse (*Rhabdomys pumilio*). In: *Hormones and behavior* 61 (5), S. 686–695. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.03.002.

- Schulster, Michael; Bernie, Aaron M.; Ramasamy, Ranjith (2016): The role of estradiol in male reproductive function. In: *Asian journal of andrology* 18 (3), S. 435–440. DOI: 10.4103/1008-682X.173932.
- Sengupta, Soma; George, Manju; Miller, Katharine K.; Naik, Khurram; Chou, Jonathan; Cheatham, Mary Ann et al. (2009): EHD4 and CDH23 are interacting partners in cochlear hair cells. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (30), S. 20121–20129. DOI: 10.1074/jbc.M109.025668.
- Shamsi, M. B.; Kumar, K.; Dada, R. (2011): Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility. In: *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India* 27 (1), S. 110–120. DOI: 10.4103/0970-1591.78436.
- Sharma, Mahak; Giridharan, Sai Srinivas Panapakkam; Rahajeng, Juliati; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2009): MICAL-L1 links EHD1 to tubular recycling endosomes and regulates receptor recycling. In: *Molecular biology of the cell* 20 (24), S. 5181–5194. DOI: 10.1091/mbc.e09-06-0535.
- Sofikitis, Nikolaos; Giotitsas, Nikolaos; Tsounapi, Panagiota; Baltogiannis, Dimitrios; Giannakis, Dimitrios; Pardalidis, Nikolaos (2008): Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109 (3-5), S. 323–330. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.004.
- Toshimori, Kiyotaka; Ito, Chizuru (2003): Formation and organization of the mammalian sperm head. In: *Archives of histology and cytology* (66 (5)), S. 383–396. DOI:10.1679/aohc.66.383
- Tournaye, Herman; Krausz, Csilla; Oates, Robert D. (2017): Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 5 (7), S. 544–553. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30040-7.
- Tüttelmann, Frank; Ruckert, Christian; Röpke, Albrecht (2018): Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. In: *Medizinische Genetik : Mitteilungsblatt des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V* 30 (1), S. 12–20. DOI: 10.1007/s11825-018-0181-7.
- Vermeulen, A.; Kaufman, J. M.; Goemaere, S.; van Pottelberg, I. (2002): Estradiol in elderly men. In: *The Aging Male* 5 (2), S. 98–102. DOI: 10.1080/tam.5.2.98.102.
- Welsh, Michelle; Saunders, Philippa T. K.; Atanassova, Nina; Sharpe, Richard M.; Smith, Lee B. (2009): Androgen action *via* testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. In: *The FASEB Journal - Research Communication* (12), S.4218-4230. DOI:10.1096/fj.09-138347

- Winters, Stephen J.; Huhtaniemi, Ilpo T. (2017): Male Hypogonadism. Cham: Springer International Publishing. ISBN:9783319532981
- Wong, Elissa W. P.; Mruk, Dolores D.; Cheng, C. Yan (2008): Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 692–708. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.11.006.
- Xu, Yue; Shi, Hong; Wei, Shunhui; Wong, Siew Heng; Hong, Wanjin (2004): Mutually exclusive interactions of EHD1 with GS32 and syndapin II. In: *Molecular membrane biology* 21 (4), S. 269–277. DOI: 10.1080/09687680410001716871.
- Yatsenko, Alexander N.; Georgiadis, Andrew P.; Röpke, Albrecht; Berman, Andrea J.; Jaffe, Thomas; Olszewska, Marta et al. (2015): X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. In: *The New England journal of medicine* 372 (22), S. 2097–2107. DOI: 10.1056/NEJMoa1406192.
- Yee, Laura E.; Reiter, Jeremy F. (2015): Ciliary vesicle formation: a prelude to ciliogenesis. In: *Developmental cell* 32 (6), S. 665–666. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.03.012.
- Yoshinaga, Kazuya; Toshimori, Kiyotaka (2003): Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. In: *Microscopy research and technique* 61 (1), S. 39–45. DOI: 10.1002/jemt.10315.
- Zabeo, Davide; Croft, Jacob T.; Höög, Johanna L. (2019): Axonemal doublet microtubules can split into two complete singlets in human sperm flagellum tips. In: *FEBS letters* (593), S. 892–902. DOI: 10.1101/562777.
- Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G. D.; Mouzon, J. de; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K. et al. (2009): International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. In: *Fertility and Sterility* 92 (5), S. 1520–1524. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.
- Zhang, Jing; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2012a): EHDs meet the retromer: Complex regulation of retrograde transport. In: *Cellular logistics* 2 (3), S. 161–165. DOI: 10.4161/cl.20582.
- Zhang, Jing; Naslavsky, Naava; Caplan, Steve (2012b): Rabs and EHDs: alternate modes for traffic control. In: *Bioscience reports* 32 (1), S. 17–23. DOI: 10.1042/BSR20110009.
- Zhang, Yuzhou; Malekpour, Mahdi; Al-Madani, Navid; Kahrizi, Kimia; Zanganeh, Marvam; Lohr, Naomi J. et al. (2007): Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. In: *Journal of medical genetics* 44 (4), S. 233–240. DOI: 10.1136/jmg.2006.045765.

8 Eigene Publikationen

Issler, Naomi; Afonso, Sara; Weissman, Irith; Jordan, Katrin; Cebrian-Serrano, Alberto; Meindl, Katrin et al. (2022): A Founder Mutation in EHD1 Presents with Tubular Proteinuria and Deafness. In: Journal of the American Society of Nephrology: JASN 33 (4), S. 732–745. DOI: 10.1681/ASN.2021101312.

Meindl, Katrin; Issler, Naomi; Afonso, Sara; Cebrian-Serrano, Alberto; Müller, Karin; Sterner, Christina; Othmen, Helga; Tegtmeier, Ines; Witzgall Ralph; Davies, Benjamin; Kleta, Robert; Warth, Richard. Human-derived mutation in Ehd1 leads to defective spermatogenesis and male infertility in mice. 2023, submitted.

9 Kongressbeiträge

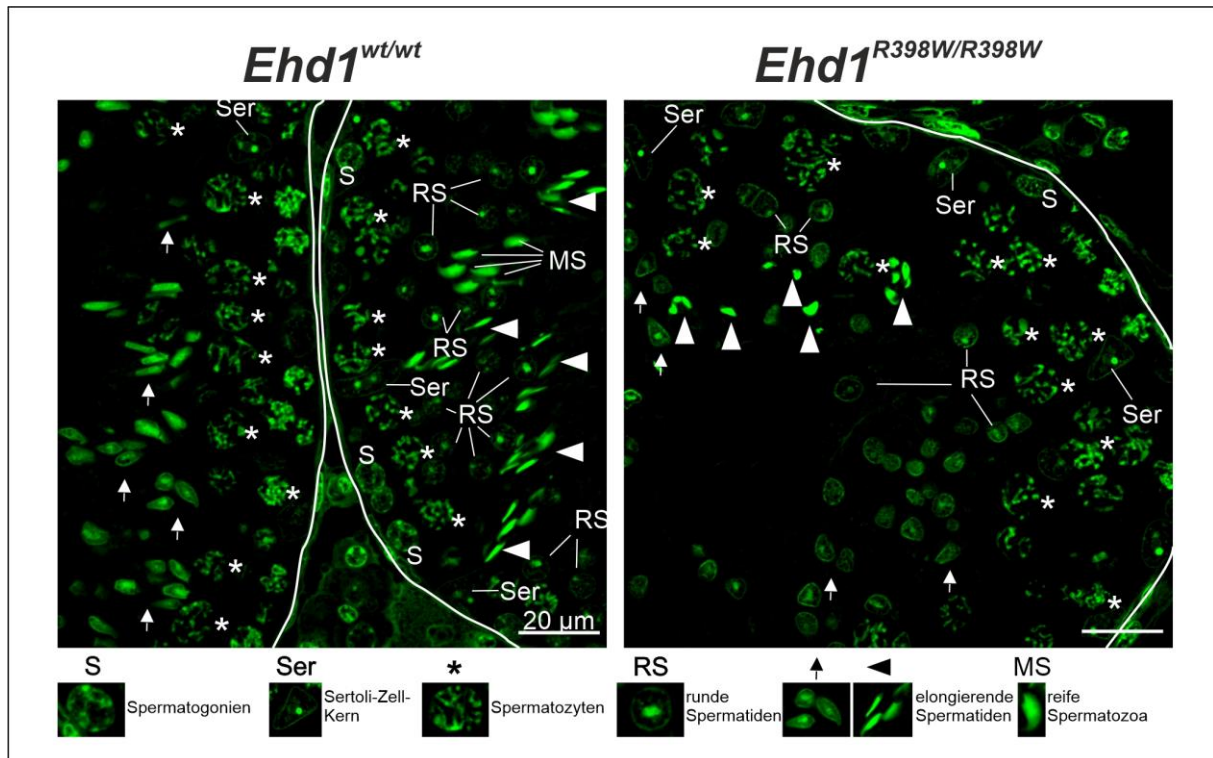
“Role of VAP in spermatogenesis and ciliogenesis in renal epithelial cells”, Posterpräsentation und 1. Preis beim Posterwettbewerb beim Kongress “Oncolytic Viruses” am Uniklinikum Regensburg, 2019.

“Role of VAP in spermatogenesis and ciliogenesis in renal epithelial cells”, Posterpräsentation und Kurzvortrag bei der EUKISS, 2019 in Zürich.

10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: Patientenstammbäume. _____	7
ABBILDUNG 2: Grundlagen der Endozytose. _____	10
ABBILDUNG 3: Struktureller Aufbau der EHD-Proteine. _____	11
ABBILDUNG 4: In-silico Struktur des EHD1-Proteins. _____	13
ABBILDUNG 5. Mechanismen der Ziliogenese. _____	16
ABBILDUNG 6: Auswirkungen der p.R398W-Mutation auf die EHD1-Funktion. _____	18
ABBILDUNG 7: Grundlagen der Spermatogenese. _____	21
ABBILDUNG 8: Der Spermatogenese-Zyklus. _____	23
ABBILDUNG 9: Grundlagen zur Kontinuität der Spermienproduktion. _____	25
ABBILDUNG 10: Die 12 Stadien der murinen Spermatogenese. _____	27
ABBILDUNG 11: Das Akrosom. _____	29
ABBILDUNG 12: Die Phasen der Akrosomenbiogenese. _____	30
ABBILDUNG 13: Der Aufbau des Spermischwanzes. _____	33
ABBILDUNG 14: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese. _____	37
ABBILDUNG 15: Zuchtstatistik. _____	58
ABBILDUNG 16: Auswirkungen der Mutation auf die männlichen Geschlechtsorgane. _____	59
ABBILDUNG 17: Histologische Übersichtsfärbung ganzer Hodenquerschnitte. _____	61
ABBILDUNG 18: Richardson-Färbung des Hodenepithels. _____	62
ABBILDUNG 19: Ehd1-Proteinexpression im isolierten Tubulus. _____	64
ABBILDUNG 20: Gegenüberstellung der Expressionsmuster von Ehd1-Protein und -mRNA. _____	66
ABBILDUNG 21: Veränderung der Proteinexpression durch die p.R398W-Mutation. _____	68
ABBILDUNG 22: Darstellung Isolierter Spermien (-vorläufer) aus der <i>cauda epididymidis</i> . _____	69
ABBILDUNG 23: Immunfluoreszenz-Färbung isolierter Spermien (-vorläufer) aus der <i>Cauda epididymidis</i> . ____	72
ABBILDUNG 24: Immunfluoreszenzfärbung isolierter Spermien (-vorläufer) aus der <i>Cauda epididymidis</i> – II. _	74
ABBILDUNG 25: Postnataler Gewichtsverlauf. _____	77
ABBILDUNG 26: H.E.- und Immunfluoreszenzfärbung postnataler Zeitpunkte. _____	78
ABBILDUNG 27: Ultrastrukturelle Darstellung Endozytose-abhängiger Prozesse der Spermatogenese. _____	81
ABBILDUNG 28: Interaktion von Ehd1 mit akrosomalen Strukturen. _____	84
ABBILDUNG 29: Integrität der Blut-Hoden-Schranke. _____	86
ABBILDUNG 30: Ultrastruktur pathologischer Strukturen im Samenepithel von <i>Ehd1^{R398W/R398W}</i> -Mäusen. ____	89
ABBILDUNG 31: Interaktion von Ehd1 mit dem Retromer im Hodenepithel. _____	90
ABBILDUNG 32: Interaktion von EHD1 mit dem Retromer im induzierbaren Zellmodell. _____	91
ABBILDUNG 33: Vergleichende Darstellung des Interaktionsverhaltens von EHD1 mit VPS35 und MICAL-L1.. _	92
ABBILDUNG 34: Ermittlung des Ploiditätsstatus zur Überprüfung der meiotischen Aktivität. _____	93
ABBILDUNG 35: Ermittlung des Hormonstatus der Patienten und nahe verwandter Personen. _____	95

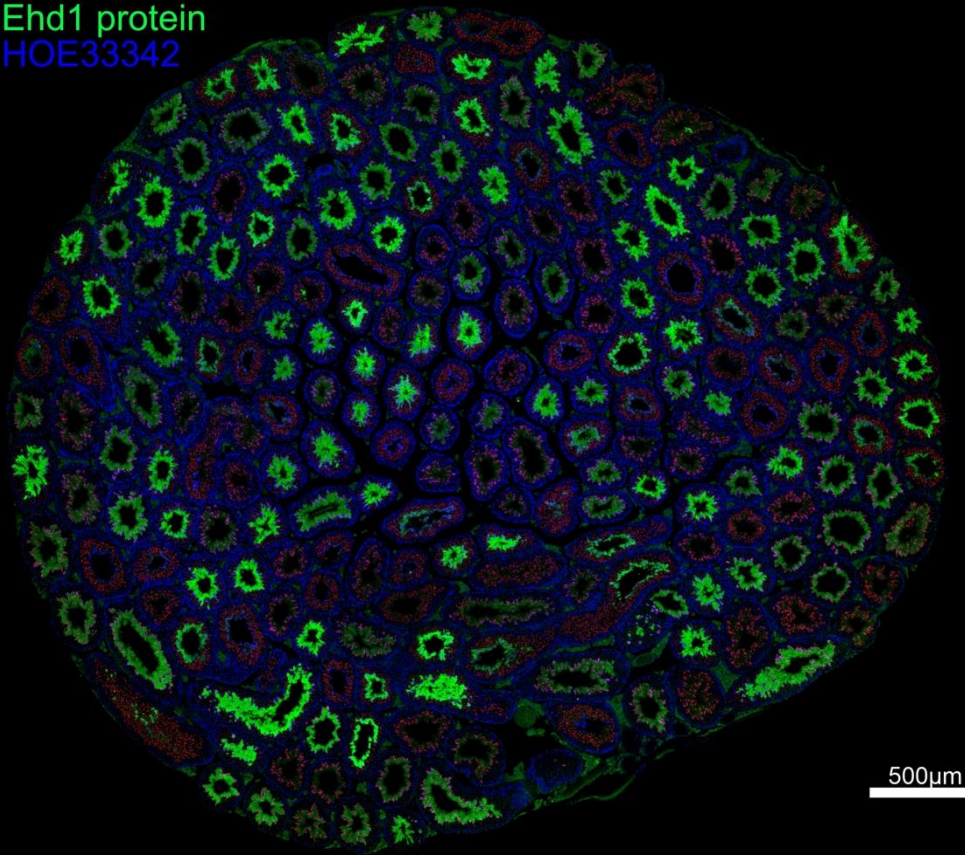
11 Ergänzendes Material



ERGÄNZENDE ABBILDUNG 1. Akridinorange-Färbung des Samenepithels von *Ehd1*^{wt/wt}- und *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen. Die Färbung des Kernchromatins durch Akridinorange verdeutlichte die beeinträchtigte Reifung der Keimzellen aufgrund der *Ehd1*-Mutante. Während frühe Keimzellstadien (Spermatogonien (S), Spermatozyten (Spc)) nicht betroffen zu sein schienen, so wurden im Stadium der runden (RS) und elongierenden Spermatischen (→, ▼) strukturelle Abweichungen zum Wildtyp deutlich. Bei der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus konnten keine reifen Spermatozoa (MS) beobachtet werden. Maßstab: 20µm.

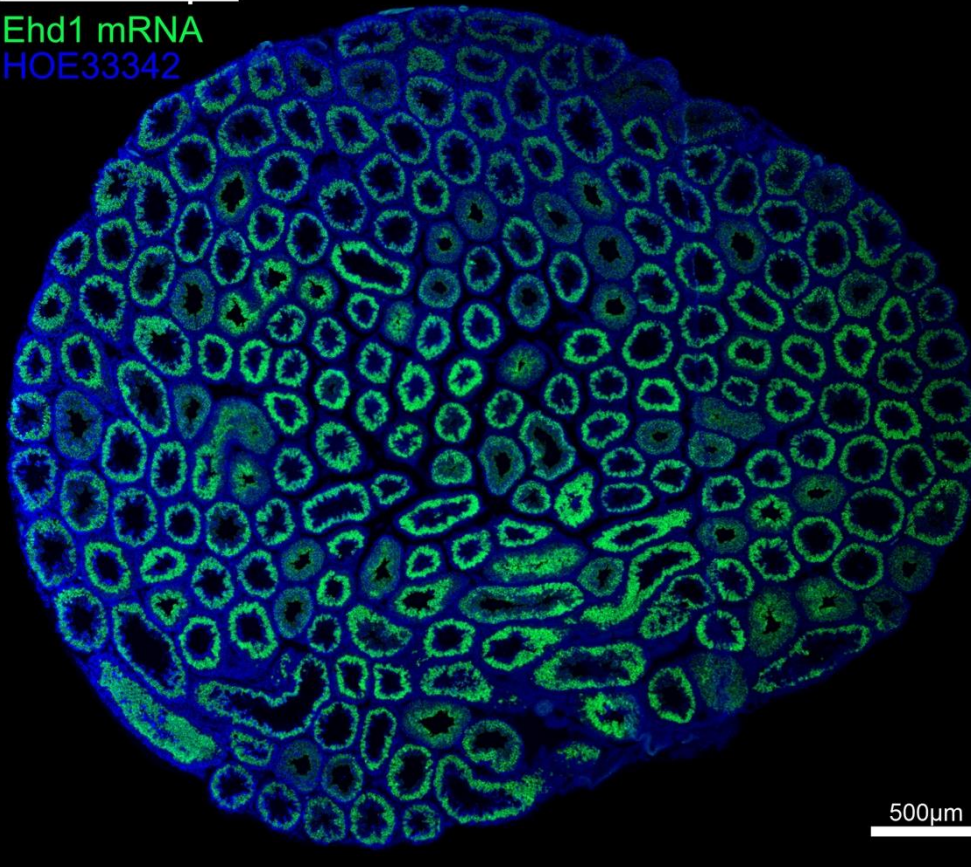
Immunfluoreszenzfärbung

Ehd1 protein
HOE33342

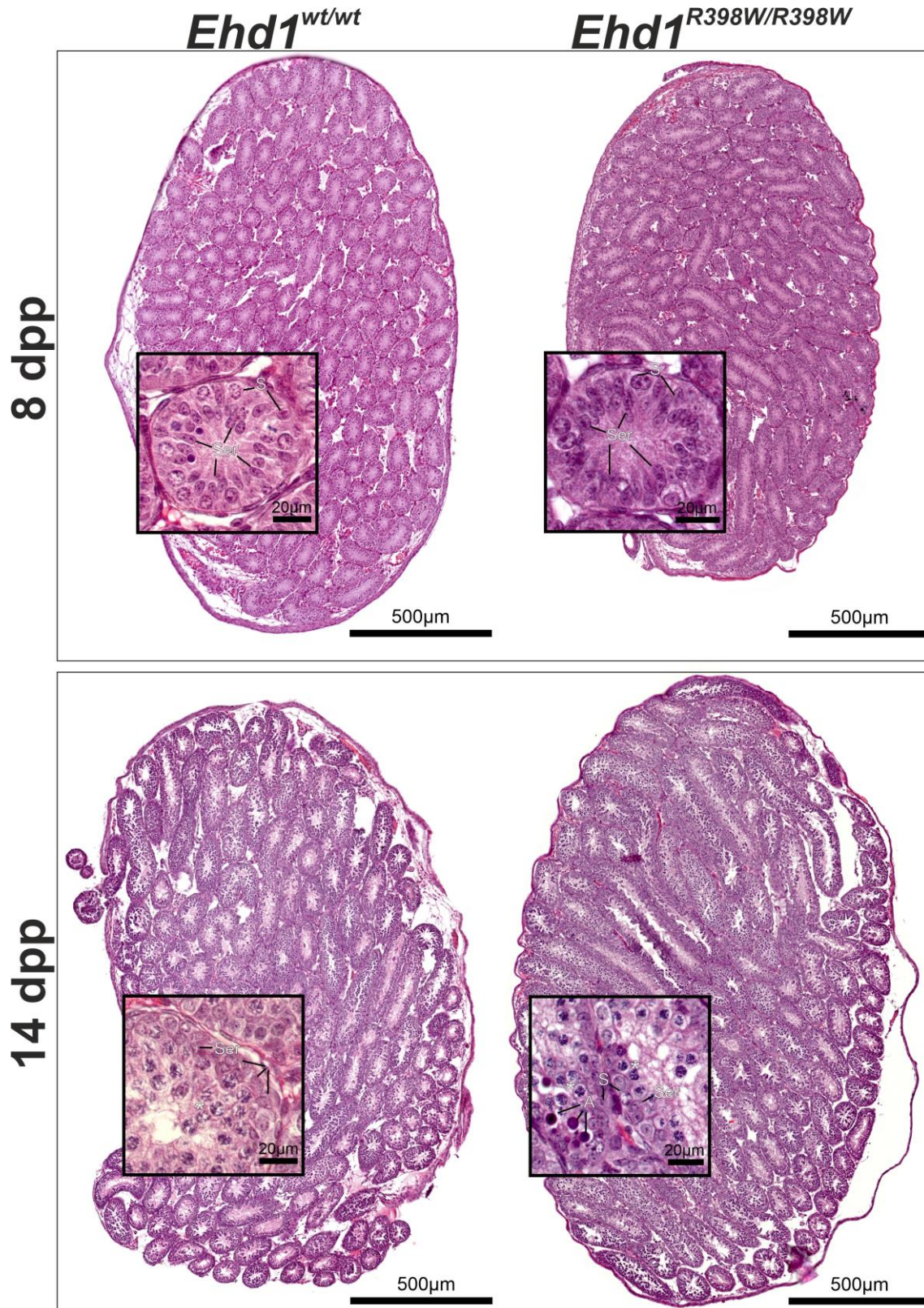


RNA Scope

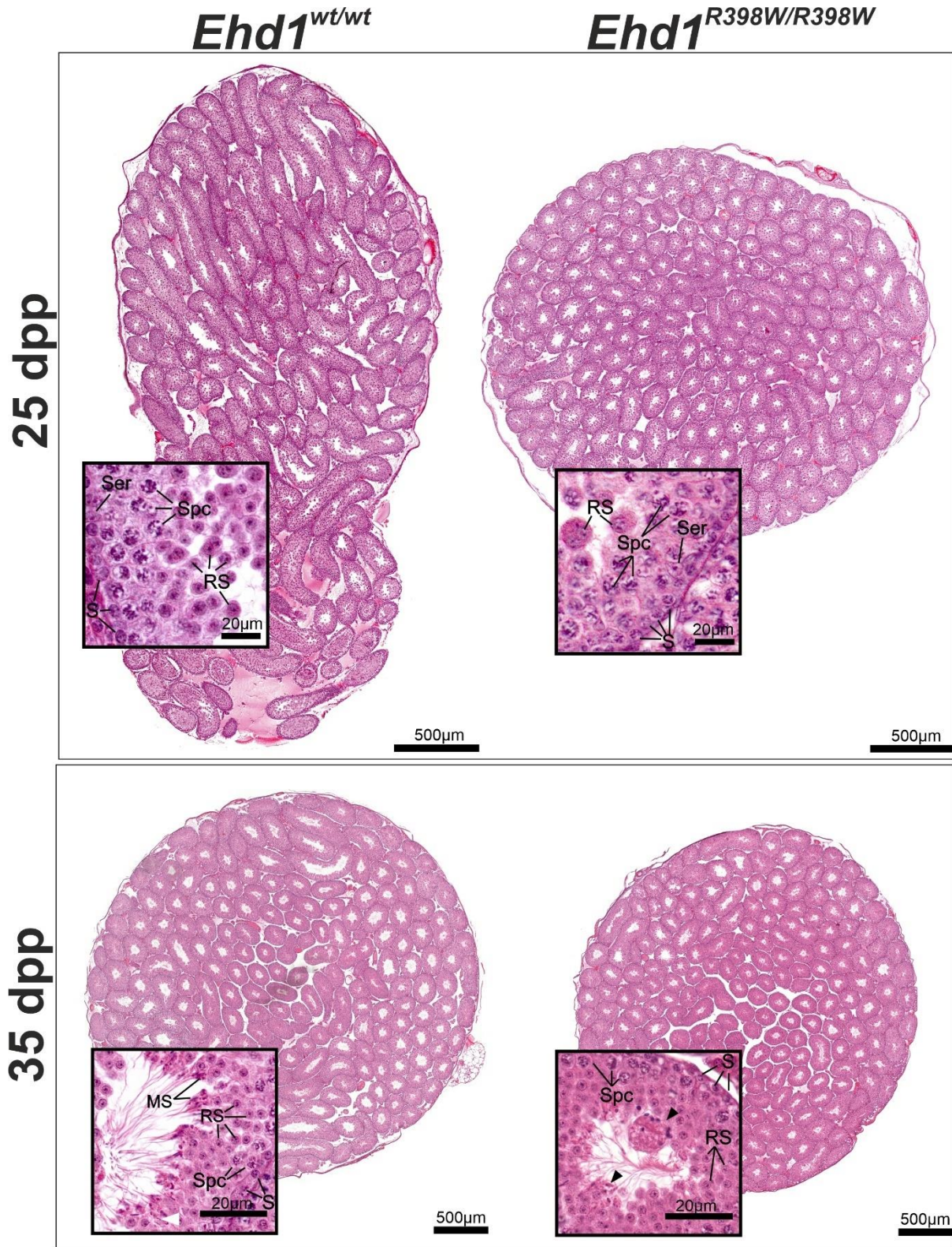
Ehd1 mRNA
HOE33342



ERGÄNZENDE ABBILDUNG 2. Übersichtsbilder von Konsektivschnitten eines Wildtyp-Hodens. Die Expression von Ehd1-Protein (Immunfluoreszenz) wurde im Vergleich zu Ehd1-mRNA (RNAScope) dargestellt. Während das Protein das typische, stadienabhängige Expressionsmuster zeigte, erschien die mRNA konstanter exprimiert zu sein. Auch die Lokalisation innerhalb des Spermieneithels unterschied sich deutlich, wobei das Protein vorwiegend luminal, die mRNA dagegen zentral im Epithel nachgewiesen wurde. Diese zeitliche und räumliche Diskrepanz ist auf die Translationsverzögerung zurückzuführen, die bei reifenden Keimzellen auftritt, da der zunehmend kondensierte Kern der elongierenden Spermatiden keine Transkriptionsvorgänge mehr zulässt. Infolgedessen wird die mRNA zu einem Zeitpunkt produziert, zu dem das Genom noch leicht zugänglich ist, jedoch erst später in Protein übersetzt. Grün: Ehd1-Protein oder mRNA; rot: LectinPNA (Akrosomen); blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 500µm.

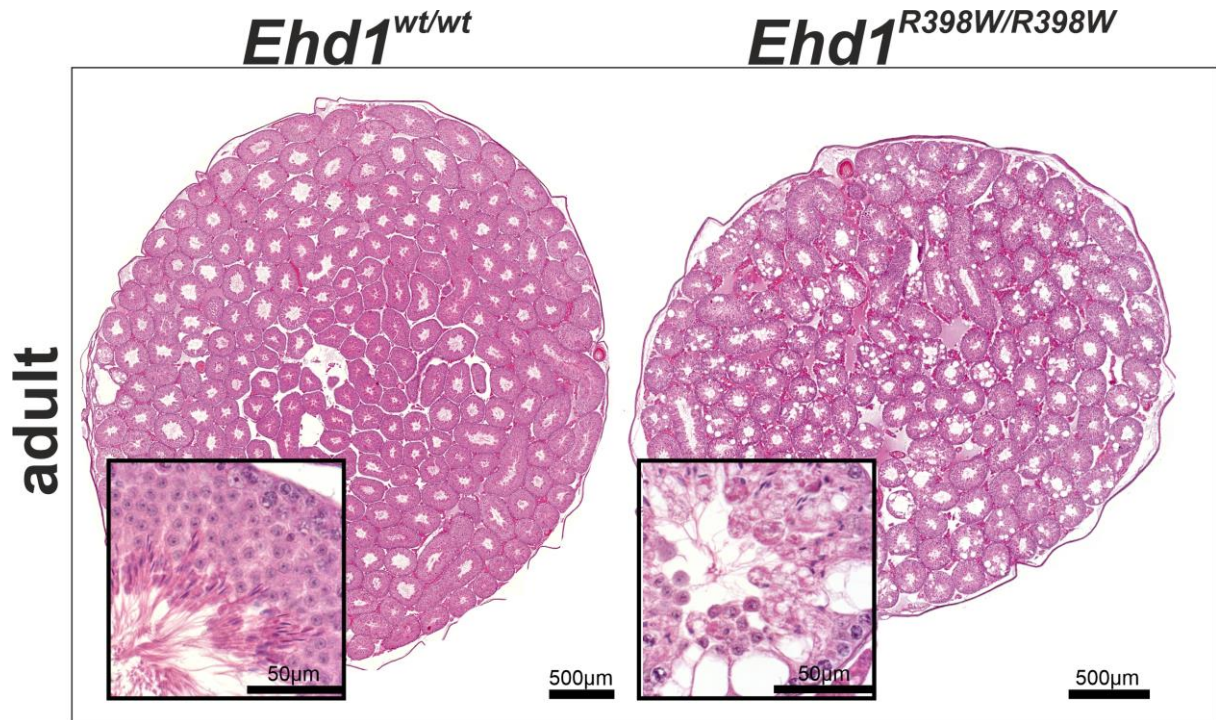


ERGÄNZENDE ABBILDUNG 3. Übersichtsaufnahmen von Hodengewebe junger Mäuse – I. Die Übersichtsaufnahmen der Hoden von 8 und 14 Tage alten Mäusen zeigten, dass die dramatischen Veränderungen des Hodenepithels nicht bereits bei der Geburt vorhanden waren, sondern sich mit zunehmendem Alter entwickelten und verschlimmerten. 8 Tage post partum bestand das Hodenepithel hauptsächlich aus Sertoli-Zellen (Ser) und Spermatogonien (S), während 14 Tage nach der Geburt die ersten Spermatozyten (Spc) beobachtet werden konnten. Bei *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen erschien das Chromatin der Spermatozyten kondensierter und im Epithel wurde eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen (A) beobachtet. Maßstab: 20µm (Vergrößerung) / 500µm (Übersicht).

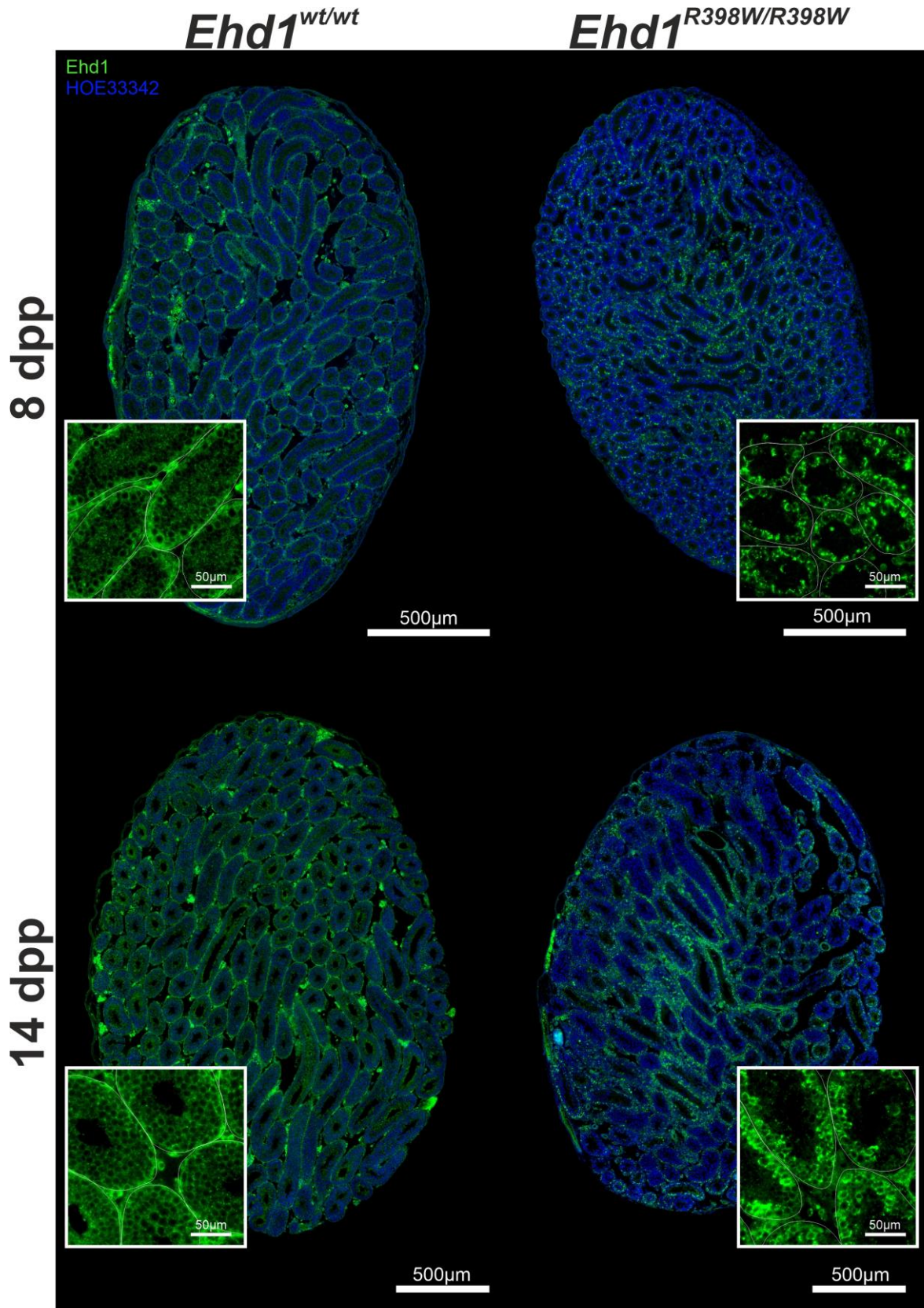


ERGÄNZENDE ABILDUNG 4. Übersichtsaufnahmen von Hodengewebe junger Mäuse – II. Im Alter von 25 Tagen waren die ersten runden Spermatiden (RS) sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt ist die Blut-Hoden-Schranke in der Regel vollständig und trennt das Hodenepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment. *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse zeigten eine Verzögerung der Keimzellreifung, da das Stadium der runde Spermatiden seltener beobachtet werden konnte. Außerdem wurden in der luminalen Region große, runde Strukturen beobachtet, die vermutlich zytoplasmatischen Ursprungs waren. Innerhalb dieser Strukturen konnten mehrere Zellkerne beobachtet werden, sowie unterentwickelte und möglicherweise defekte Strukturen. Innerhalb der ersten 35 Lebenstage ist die initiale Spermatogenese-Welle vollendet, und die ersten reifen Spermatozoen werden aus dem Hodenepithel abgelöst. Obwohl die bei jungen *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäusen beobachteten Defekte nicht so schwerwiegend waren wie bei erwachsenen Mäusen, zeigten sich die ersten Anzeichen eines spermatogenen Versagens, da sich vielkernige Strukturen in das Tubuluslumen ausdehnten, die Epithelarchitektur desorganisiert

erschien und Teile der in das Lumen ragenden Spermischwänze oft keine Verbindung zu kondensierten Kernen hatten. Maßstabsleiste: 20µm (Zoom) / 500µm (Übersicht).

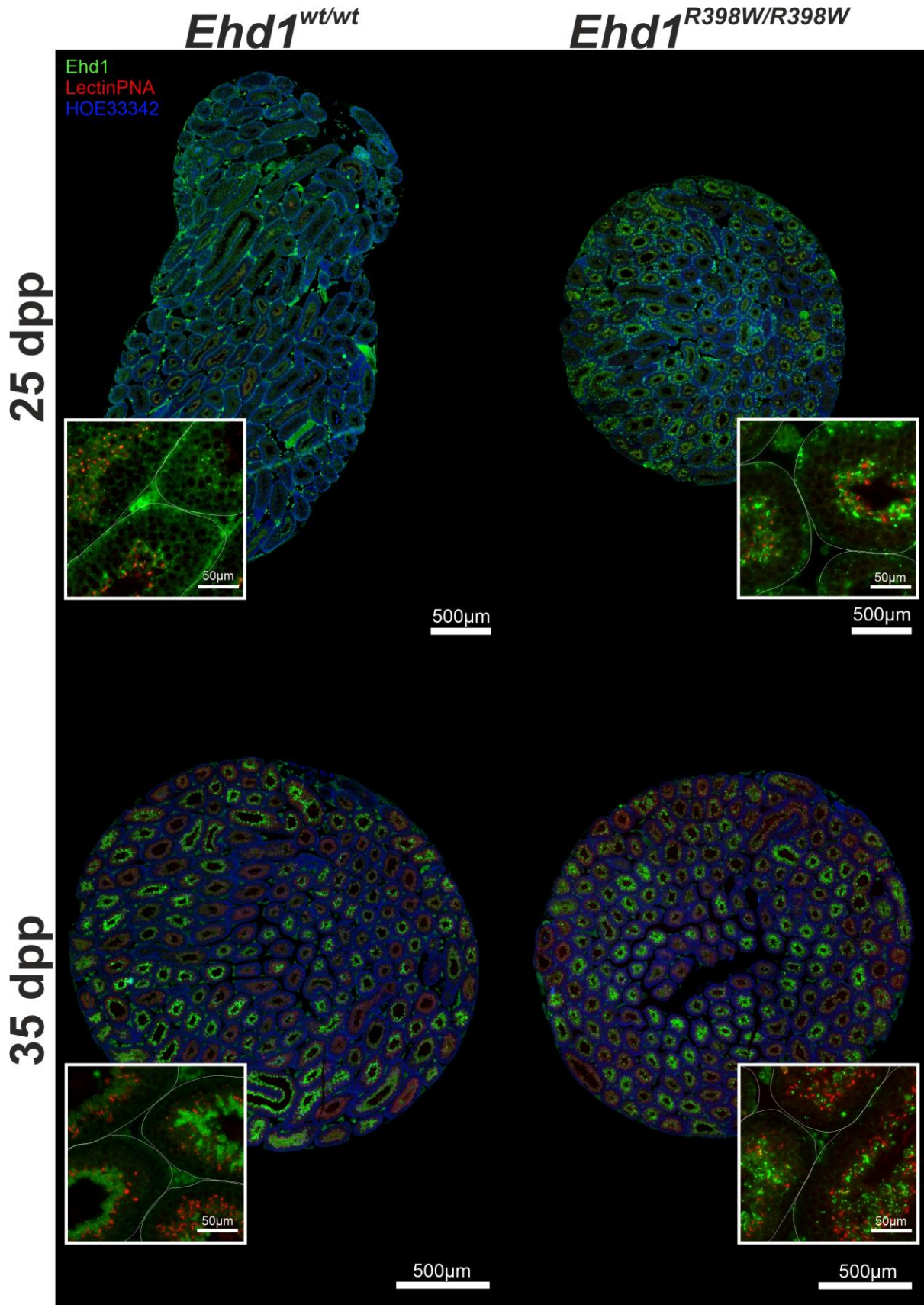


ERGÄNZENDE ABBILDUNG 5. Übersichtsaufnahmen von Hodengewebe junger Mäuse – III. Übersichtsaufnahmen kompletter Hodenquerschnitte erwachsener Mäuse (90 Tage) zeigen das volle Ausmaß der Zerstörung, die bei der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus fast alle Hodentubuli betraf. Eine genaue Betrachtung der vergrößerten Bereiche ermöglichte eine eindeutige Zuordnung des abgebildeten Spermatogenesestadiums der *Ehd1^{wt/wt}*-Maus, da die vorherrschenden Zelltypen klar identifiziert werden konnten. Das Epithel erschien homogen und Spermischwänze ragten ins Tubuluslumen. Der hohe Grad der Zerstörung im Epithel der *Ehd1^{R398W/R398W}*-Maus machte es unmöglich, die spermatogenen Stadien zu untersuchen. Sowohl das Aussehen als auch die Lokalisierung bestimmter Zelltypen waren verändert, was auf eine Beeinträchtigung des gesamten Spermatogeneseprozesses hindeutet. Im Lumen der Hodenkanälchen waren einige spermischwanzähnliche Strukturen sichtbar, die jedoch nicht mit reifen, verlängerten Spermienköpfen verbunden waren. Maßstabsleiste: 50µm (Zoom) / 500µm (Übersicht)



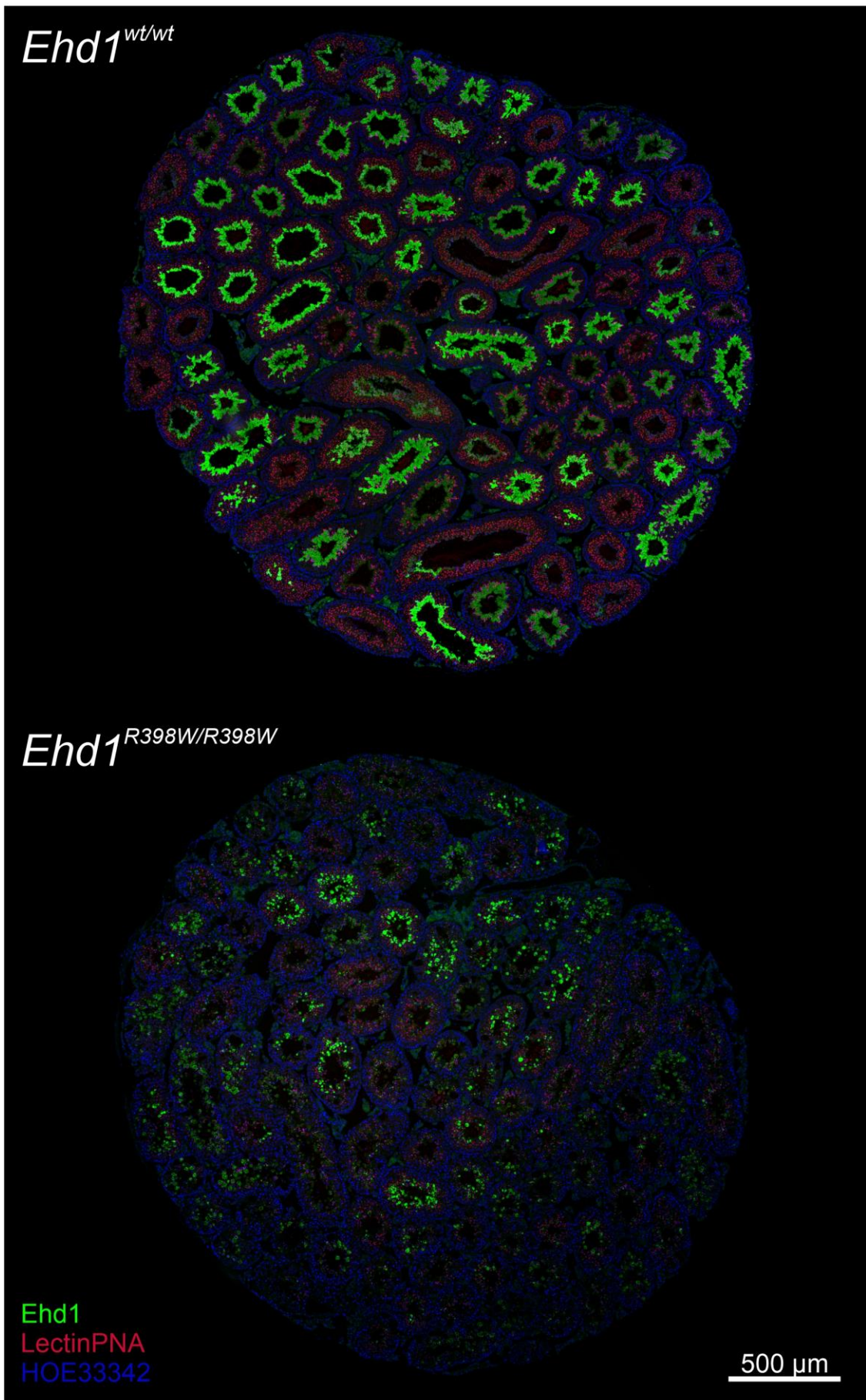
ERGÄNZENDE ABBILDUNG 6. IF-Übersichtsaufnahmen junger Mäuse – I. Immunfluoreszenzfärbungen von Hodenquerschnitten von 8 und 14 Tage alten *Ehd1*^{wt/wt} und *Ehd1*^{R398W/R398W} Mäusen zeigten, dass die Ehd1-Expression bereits während der ersten spermatogenen Welle verändert war. In 8 Tage alten Mäusen erschien das Wildtyp-Ehd1 homogen verteilt in unmittelbarer Nähe der Spermatogonien an der Basalmembran. Das mutierte Protein zeigte die gleiche Lokalisation, bildete jedoch Aggregate. Nach 14 Tagen verlagerte sich das Wildtyp-Protein über das gesamte Epithel, während das mutierte Protein weiterhin im basalen Kompartiment akkumulierte.

Grün: Ehd1, Blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 50 μm (Vergrößerungsbild), 500 μm (Übersicht). Zum leichteren Erkennen der Tubuli wurde weiße, die Tubuli umgebende Linien in die Bilder eingezeichnet.

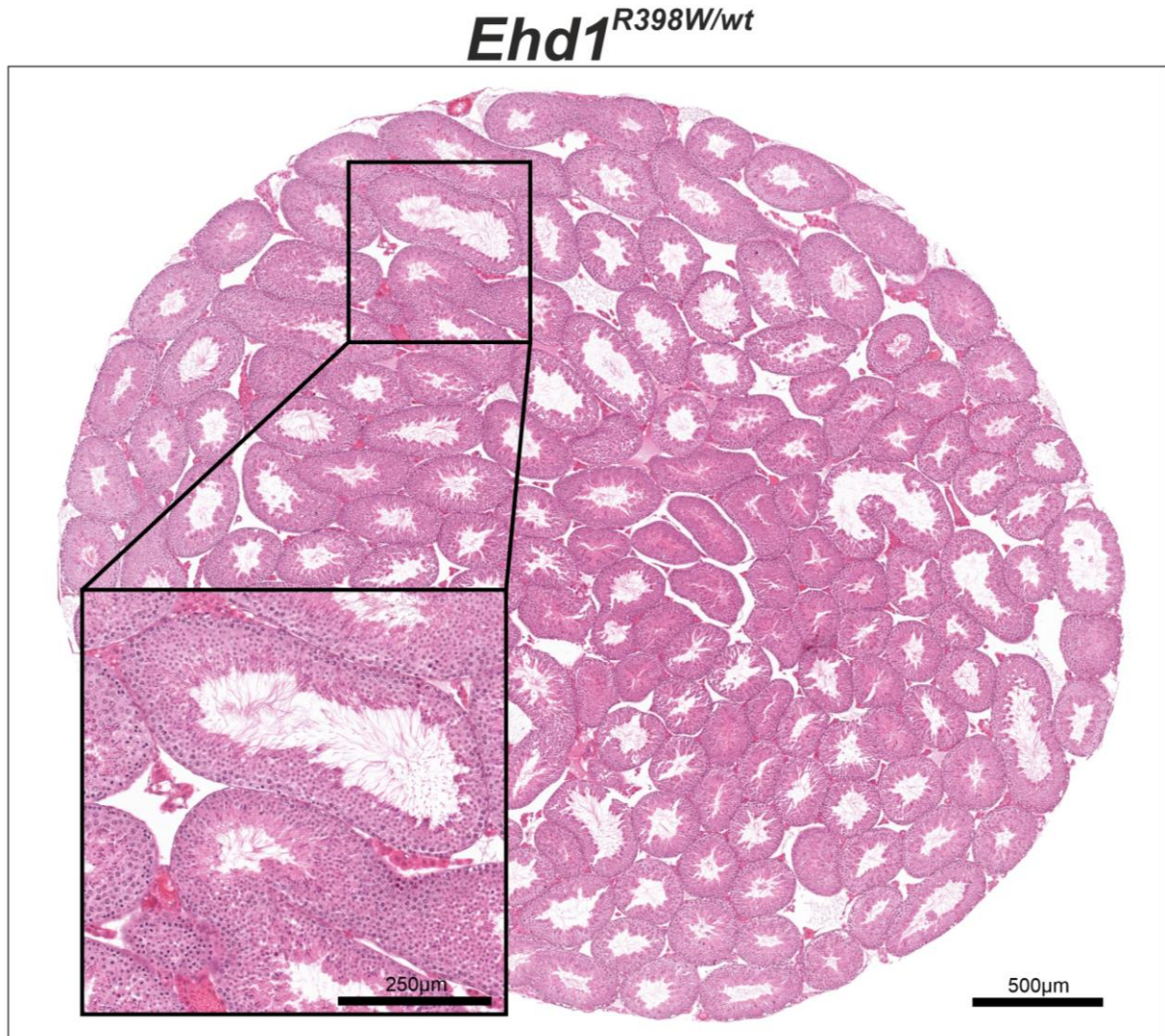


ERGÄNZENDE ABBILDUNG 7. IF-Übersichtsaufnahmen junger Mäuse – I. 25 Tage nach der Geburt waren die ersten akrosomalen Strukturen sichtbar. Wildtyp-Ehd1 wurde vermehrt im adluminalen Bereich, sowie in scharf abgegrenzten, runden Strukturen beobachtet, von denen einige mit akrosomalen Strukturen interagierten. Im Gegensatz dazu zeigten die Aggregate des mutierten Proteins keine Kolokalisation mit den sich entwickelnden Akrosomen. 35 Tage nach der Geburt ist die erste Spermatogenese-Welle abgeschlossen. In der *Ehd1*^{wt/wt}-Maus

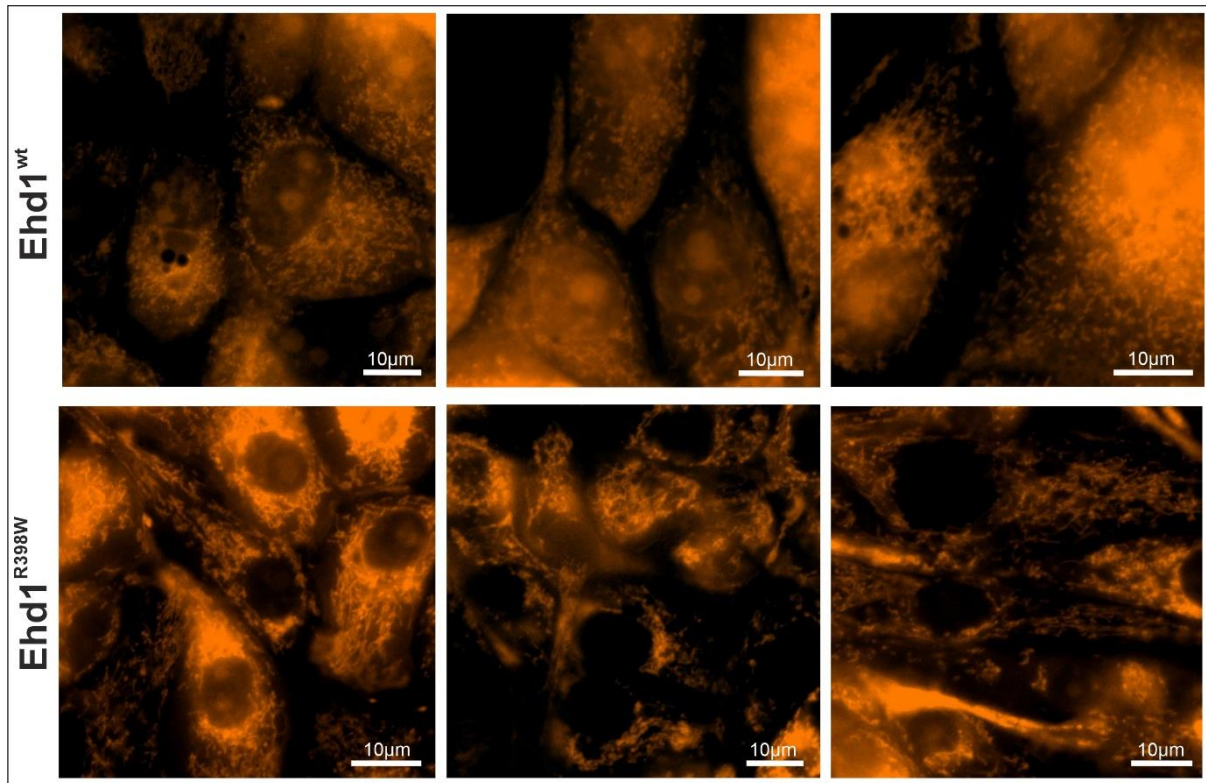
zeigte das Protein ein stadienabhängiges Expressionsmuster, während eine eindeutige Bestimmung der Spermatogenese-Stadien bei der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus nicht möglich war. Die mutationsbedingte Veränderung der Ehd1-Funktion schien sich negativ auf die frühen spermatogenen Prozesse auszuwirken, auch, wenn das Hodenepithel noch keine schweren, atrophischen Defekte aufwies. Diese schienen sich mit zunehmendem Alter zu verschlimmern. Grün: Ehd1, rot: LectinPNA (Akrosomen), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 50 µm (Vergrößerungsbild), 500 µm (Übersicht). Zum leichteren Erkennen der Tubuli wurde weiße, die Tubuli umgebende Linien in die Bilder eingezeichnet.



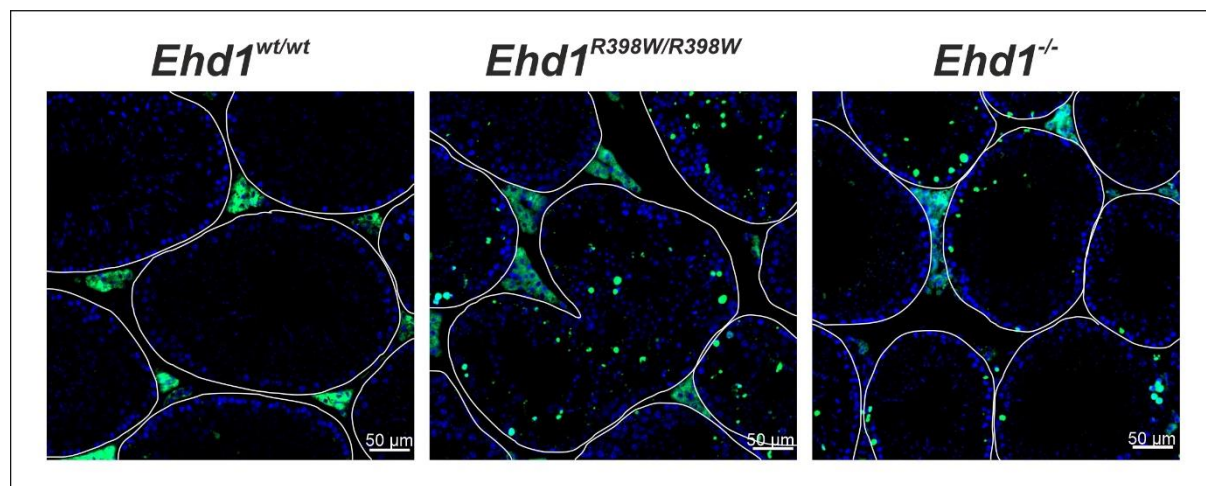
ERGÄNZENDE ABBILDUNG 8. Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen kompletter Hodenquerschnitte adulter *Ehd1^{wt/wt}*- und *Ehd1^{R398W/R398W}*-Mäuse. Die Expression des Ehd1-Proteins unterschied sich grundlegend bei den beiden Genotypen. Während das Wildtyp-Protein das bereits diskutierte, stadienabhängige und überwiegend lumenständige Expressionsmuster zeigte, konnten aufgrund der Mutation keine Parallelen zwischen Proteinexpression und Spermatogenese-Stadium erkannt werden. Das mutierte Protein zeigte eine Mislokalisierung innerhalb des Samenepithels, indem es vorherrschend in großen, runden, cytoplasmatischen Strukturen auftrat, die im gesamten Epithel verteilt waren. Weiterhin wurden akrosomale Malformationen deutlich. Grün: Ehd1 (Wildtyp oder Mutante), rot: LectinPNA (Akrosomen), blau: HOE33342 (Zellkerne). Maßstab: 500µm.



ERGÄNZENDE ABBILDUNG 9. H.E.-Übersichtsaufnahme des Hodenquerschnitts einer *Ehd1^{R398W/wt}*-Maus. Heterozygote, männliche *Ehd1^{R398W/wt}*-Mäuse waren fruchtbar, da sie in der Lage waren, Nachkommen hervorzubringen. Um festzustellen, ob die Mutation eines Allels ausreicht, um Beeinträchtigungen der Spermatogenese zu verursachen, wurden auch diese Mäuse untersucht: Das Epithel erschien vergleichbar homogen wie das von Wildtyp-Mäusen und es konnten keine offensichtlichen Defekte festgestellt werden. Die Stadien der Spermatogenese waren eindeutig identifizierbar und die Keimzellreifung zeigte die normalen Abläufe. Maßstab: 250µm (Vergrößerungsbild) / 500µm (Übersicht).



ERGÄNZENDE ABBILDUNG 10. Darstellung des mitochondrialen Netzwerks im induzierbaren LLC-PK1-Modell. Induzierbare LLC-PK1-Zellen exprimierten unter Tetrazyklin-Induktion entweder Wildtyp- oder mutiertes EHD1. Dargestellt ist das mitochondrielle Netzwerk dieser Zellen, das mit Hilfe von MitoTracker Orange angefärbt wurde. Während die Mitochondrien der EHD1^{wt}-Zellen als kleine, solitäre Strukturen homogen im Cytoplasma verteilt waren, erschienen jene der EHD1^{R398W}-Zellen teils klumpig, teils tubulär. (Farmer et al. 2017) berichteten von beeinträchtigter mitochondrialer Dynamik unter EHD1-Depletion. Orange: MitoTracker®Orange. Maßstab: 10µm.



ERGÄNZENDE ABBILDUNG 11. Detektion apoptotischer Ereignisse mit Hilfe des DeadEnd TUNEL-Assays. Die drastische Zerstörung im Hodenepithel adulter *Ehd1*^{R398W/R398W}-Mäuse legte die Vermutung nahe, dass es gehäuft zu apoptotischen Ereignissen kommt. Zellen können auf unterschiedliche Art und Weise untergehen: Durch nekrotische Ereignisse, die stets mit einer prominenten Entzündungsreaktion einhergehen, oder durch Formen des programmierten Zelltods, z.B. durch Apoptose, –bei der keine Inflammation ausgelöst wird. Trotz der starken Zerstörung der epithelialen Ordnung konnten keine Hinweise auf nekrotische Vorgänge oder vermehrte Entzündungszellen (nicht gezeigt) ausgemacht werden. Hingegen konnten mit Hilfe des DeadEnd TUNEL-Assays zahlreiche apoptotische Zellen im Samenepithel der *Ehd1*^{R398W/R398W}-Maus detektiert werden. Während die Wildtyp-Maus kaum untergehende Zellen zeigte, wurden Apoptosen ebenfalls im Hodenepithel der *Ehd1*^{-/-} gesichtet – auch wenn diese vergleichsweise seltener auftraten. Grün: apoptotische Zellen mit Doppelstrangbrüchen. Maßstab: 50 µm.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil, im Resultateteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Katrin Meindl

13 Danksagung

Mein Dank und meine tiefste Verbundenheit geht an all diejenigen, die mich über Jahre hinweg bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Richard Warth danken. Mich vor vier Jahren an Sie zu wenden, um mit Ihnen die möglichen Zukunftsaussichten nach meinem Masterabschluss zu besprechen, war das Beste, was ich hätte tun können – denn es hat mich in Ihre Arbeitsgruppe gebracht. In meinem Projekt haben Sie mir viele Freiheiten gelassen, mich selbst und meine eigenen Ideen einzubringen. Dennoch standen Sie -wann immer nötig- mit Rat und Tat zur Seite. An so mancher Herausforderung bin ich gewachsen und konnte dabei immer auf Ihre Unterstützung zählen. Am allermeisten möchte ich mich jedoch für Ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen und Ihren respektvollen Umgang bedanken, mit dem Sie nicht nur mir, sondern allen Menschen entgegengetreten. Dafür schätze ich Sie sehr.

Meinen Mentoren, Prof. Christian Wetzel und PD Björn Buchholz möchte ich für die Begleitung meiner Arbeit danken, sowie für die zahlreichen Anregungen und das Brainstorming zum weiteren Vorgehen, die im Rahmen der jährlichen Progress Reports entstanden sind.

Tausend Dank an Christina, die mir (vor ihrer jobtechnischen Neufindung im sozialen Bereich) alle grundlegenden Methoden, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, beigebracht hat. Mein Wissen über alle erdenklichen Färbemethoden und die Arbeit mit Mäusen besteht alleine durch Dich.

Eva, meine liebe Freundin. Bereits vor Deinem Start in der AG Warth (über den ich mich immernoch tierisch freue) hatte ich mit Dir einen ganz besonderen Menschen an meiner Seite, auf den ich mich immer verlassen konnte. Du bist ehrlich, Du bist zuverlässig, Du würdest mich nie im Stich lassen – egal ob Privat oder im Labor. Ich hoffe, dass ich Dir den selben Halt geben konnte und geben werde, den du mir immer gegeben hast.

Ein großer Dank geht an Ines und Anna-Lena, die ebenfalls immer zu Stelle waren, wenn's knifflig wurde. Ihr seid super!

Allen, wir haben gemeinsam Anfang 2019 im Labor gestartet und ich schätze Dich sehr als lieben Kollegen, aber auch als Freund. Ich danke Dir für Deine lockere und erfrischende kubanische Art und Deine große Hilfsbereitschaft, mit der Du so manche Situationen entschärft hast. Bleib immer genau so, wie Du bist! Und danke für die tausend Papierrollen, die Du mit Leib und Seele gesammelt hast, damit der Hund nicht verhungert.

Auch bei Michaela und Karo möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Ihr seid die guten Seelen, die den Laden am Laufen halten. Vor allem in Sachen mentale Unterstützung fand ich in Euch geduldige Zuhörer, die immer einen guten Rat liefern konnten.

Sascha und Markus, danke, dass immer zur Stelle wart, wenn man Euch gebraucht hat. Vielen Dank auch Helga aus der AG Witzgall, mit der ich viele Stunden am Elektronenmikroskop verbringen durfte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Florian Weber (Institut für Pathologie, Uniklinikum Regensburg), Dr. Karin Müller (Leibnitz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin) und Dr. Sabrina Krautbauer (Institut für klinische Chemie, Uniklinikum Regensburg) für die Durchführung spezieller Messungen und die große Hilfe bei der Beantwortung grundlegender Fragen zur Reproduktionsbiologie, sowie für produktive Diskussionen zur Ergebnisinterpretation.

Marcel, meine bessere Hälfte. Danke, dass Du in allen Höhen und Tiefen an meiner Seite bist. Du und Nelly seid alles für mich.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne meine Eltern, die mich immer und bedingungslos unterstützt haben, wäre ich heute nicht dort, wo ich bin. Papa, Mama, Moritz und Liesi: Danke, dass Ihr immer da seid, wenn man Euch braucht.