

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



**Forschungsbericht: Molekulare Mechanismen männlicher Infertilität – Ergebnisse der Klinischen Forschergruppe KFO 181 (Leiter: K. Steger, Sprecher: W. Weidner)
//Mechanisms of Male Factor Infertility – Data from the Clinical Research Unit KFO 181**

Steger K, Baumgart-Vogt E, Bergmann M, Brehm R
Chakraborty T, Konrad L, Linn T, Meinhardt A
Middendorff R, Paradowska-Dogan A, Rathke C
Renkawitz-Pohl R, Schagdarsurengin U, Weidner W
J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2016; 13 (4), 138-147

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Forschungsbericht: Molekulare Mechanismen männlicher Infertilität – Ergebnisse der Klinischen Forschergruppe KFO 181 (Leiter: K. Steger, Sprecher: W. Weidner)

K. Steger¹, E. Baumgart-Vogt², M. Bergmann³, R. Brehm⁴, T. Chakraborty⁵, L. Konrad⁶, T. Linn⁷, G. Lüers⁸, A. Meinhardt², R. Middendorff², A. Paradowska-Dogan¹, C. Rathke⁹, R. Renkawitz-Pohl⁹, U. Schagdarsurengin¹, W. Weidner¹

Die Klinische Forschergruppe (KFO) 181 wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) von Dezember 2008 bis Februar 2016 gefördert. Gemeinsames Ziel der Gruppe war die Untersuchung „Molekularer Mechanismen männlicher Infertilität“ zum Zweck der Verbesserung des Verständnisses molekularer Regulationsvorgänge während der männlichen Keimzellentwicklung und der Diagnose idiopathischer männlicher Infertilität. Hierzu untersuchten Naturwissenschaftler sowie Human- und Veterinärmediziner in zuletzt acht Teilprojekten unterschiedliche Zellen in menschlichen Hodengewebs- und Ejakulatproben (aus der Gießener Hodengewebs- und Kryobank) sowie im Tiermodell (Maus, Ratte, Bulle). Das Spektrum der Analysen reichte von den Folgen einer Hoden-Mangeldurchblutung über Infektion und Entzündung bis zur postmeiotischen Differenzierung haploider Spermatozoen, ihren Transport in den Nebenhoden und einer weitergehenden Charakterisierung des Spermien-Epigenoms. Die Ergebnisse deuten auch auf molekularer Ebene auf einen vielfältigen Ursachenkomplex der männlichen Infertilität hin. Neben neuen Erkenntnissen zu molekularen Regulationsmechanismen der Keimzellentwicklung konnte die Gruppe auch zwei Patente erwirken, deren Umsetzung derzeit durch zwei Firmen vollzogen wird.

Zusätzliche Informationen unter: http://www.uni-giessen.de/cms/fbz/fb11/forschung/forschergruppen/kfo_181/home

Schlüsselwörter: Epigenetik, KFO 181, Männliche Fertilität, Spermatogenese, Spermienqualität

Mechanisms of Male Factor Infertility – Data from the Clinical Research Unit KFO 181 (Head: K. Steger, Speaker: W. Weidner). The Clinical Research Unit (KFO) 181 was funded by the German Research Foundation (DFG) from December 2008 to February 2016. The common aim of the group was the analysis of 'Mechanisms of male factor infertility' in order to improve our knowledge on molecular regulatory mechanisms during male germ cell development and the diagnosis of idiopathic male infertility. In eight individual projects, scientists, medical doctors and veterinarians studied various cells within human testicular biopsy material and ejaculates (from the Giessen testicular biopsy repository and cryobank) as well as in animal models (mouse, rat, bull). Analyses included possible effects of decreased oxygen supply and malnutrition of the testis, infection and inflammation, postmeiotic differentiation of haploid spermatids, germ cell transport from testis to epididymis and further characterization of the sperm epigenome. Although data suggest multiple causes of male infertility, the group was able to gain new insights into molecular regulatory mechanisms during male germ cell development. In addition, two patents could be obtained. ELISA tests are currently developed by two companies.

For additional information see: http://www.uni-giessen.de/cms/fbz/fb11/forschung/forschergruppen/kfo_181/home

J Reproduktionsmed Endokrinol Online 2016; 13 (4): 138–47.

Key words: epigenetics, KFO 181, male fertility, spermatogenesis, sperm quality

■ Einleitung

Die Klinische Forschergruppe (KFO) 181 „Molekulare Mechanismen männlicher Infertilität“ wurde von Dezember 2008 bis Februar 2016 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert, wobei 50 % der Mittel anteilig von den Fachbereichen Human- und Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen sowie dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (PMR) getragen wurden. Entsprechend den Statuten der DFG zur Einrichtung von KFOs, deren primäres Ziel die Etablierung von universitären Schwerpunkten ist, wurde parallel zur ersten Förderperiode eine Forschungsprofessur (W2) geschaffen, die durch ein ordentliches Berufungsverfahren mit Prof. Dr. Klaus Steger besetzt wurde. Die Professur für Molekulare Andrologie ist der Klinik

und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie zugeordnet und wird nun vom Fachbereich Humanmedizin der JLU Gießen getragen.

Im Rahmen der KFO 181 wurden in zuletzt acht Teilprojekten jeweils unterschiedliche Zellen des Hodens an menschlichen Biopsiematerial und Samenproben sowie am Tiermodell (Maus, Ratte, Rind) mit dem Ziel einer Verbesserung des Verständnisses molekularer Regulationsmechanismen während der normalen und gestörten Keimzellentwicklung untersucht (Abb. 1). Da die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Hodens eine wichtige Rolle für die Keimzellentwicklung spielt, untersuchte ein Projekt die Auswirkungen einer Atherosklerose-bedingten Mangeldurchblutung am Beispiel des ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}-Mausmodells. Ein weiteres Projekt analysierte im

Rattenmodell die Folgen einer durch uropathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) (UPEC) induzierten Hodenentzündung auf die Spermatogenese. Da Entzündungsreaktionen durch fettreiche Ernährung gefördert werden können, wurden am Beispiel des Pex13^{-/-}-Mausmodells untersucht, welche Effekte ein gestörter Fettstoffwechsel auf die Zellen des Hodens haben kann. Zwei weitere Projekte beschäftigten sich mit der Keimzell-Sertolizell-Interaktion während der Meiose und der Regulation der Genexpression in postmeiotischen haploiden Spermatozoen. Mithilfe von „time lapse imaging“ konnten neue Erkenntnisse zum Transportmechanismus unbeweglicher Spermatozoen vom Hoden zum Nebenhoden gewonnen werden. Einen weiteren Schwerpunkt bildete der Histon-Protamin-Austausch in haploiden Spermatozoen sowie die Bedeutung der in den Spermatozoen

Eingegangen: 26. April 2016; akzeptiert: 28. April 2016 (verantwortlicher Rubrik-Herausgeber: Prof. F.-M. Köhn, München)

Aus der ¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Gießen; dem ²Institut für Anatomie und Zellbiologie, Gießen; dem ³Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie und Embryologie, Gießen; dem ⁴Institut für Anatomie, Tierärztliche Hochschule, Hannover; dem ⁵Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen; der ⁶Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Gießen; der ⁷Klinik für Innere Medizin III, Gießen; dem ⁸Institut für Experimentelle Anatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und dem ⁹Institut für Entwicklungsbiologie, Marburg

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Klaus Steger, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Sektion Molekulare Andrologie, Biomedizinisches Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität, D-35392 Gießen, Schubertstraße 81; E-Mail: Klaus.Steger@chiru.med.uni-giessen.de

verbleibenden Resthistone. Diese Thematik wurde von der Kerngruppe der KFO 181 anhand von zwei Projekten an menschlichen Samenproben und am Tiermodell Rind bearbeitet.

Neben der Klärung von molekularen Regulationsmechanismen, die in die Keimzellentwicklung involviert sind, war das gemeinsame Ziel der Gruppe eine Verbesserung des aktuellen Verständnisses zur Diagnose der idiopathischen männlichen Infertilität. Zusammenfassend lassen die von den einzelnen Teilprojekten generierten Ergebnisse auch auf molekularer Ebene einen multifaktoriellen Ursachenkomplex der männlichen Infertilität vermuten. Letztlich konnten von der Gruppe jedoch zwei Patente für einen Test zum Nachweis von Autoantikörpern gegen testikuläre Antigene und für einen Schnelltest zur Bestimmung der Spermienqualität erzielt werden. Beide Tests befinden sich derzeit in der Entwicklung.

Atherosklerose-bedingte Spermatogenesestörungen: Ergebnisse vom ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}-Knockout-Mausmodell und prospektive Studien am Menschen (WW, TL, RM)

Die Rolle von vaskulären Faktoren für die männliche Infertilität ist bislang völlig unklar. Im Hoden werden gefäßassoziierte Störungen der Spermatogenese vermutet. Zur Durchführung detaillierterer Analysen wurde von unserer Arbeitsgruppe das ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}-Rezeptor-Mausmodell etabliert, wobei das Mutationsmodell (KO) mit dem Wild-typ (WT) in ansteigenden Altersschritten (von 20–87 Wochen) verglichen wurde. Erste Untersuchungen zeigten in den KO-Mäusen eine deutliche Störung der Spermatogenese mit einer Reduktion der Spermienzahl in den *Tubuli seminiferi* [1]. Eine quantitative MikroCT-Analyse wies eine damit assoziierte Reduktion der Hodenvolumina und des vaskulären Volumens im Vergleich zu den Kontrolltieren nach. Eine additiv durchgeführte stereologische Untersuchung in Semidünnschnitten bestätigte die MikroCT-Befunde. Darüber hinaus konnte eine signifikante Verminderung der Länge und des Volumens in den testikulären Kapillaroberflächen der KO-Mäuse nachgewiesen werden. Diese Veränderungen assoziierten mit einer verstärkten Expression von Entzündungsparametern in den Hoden der KO-Mäuse. Begleitet wurde diese

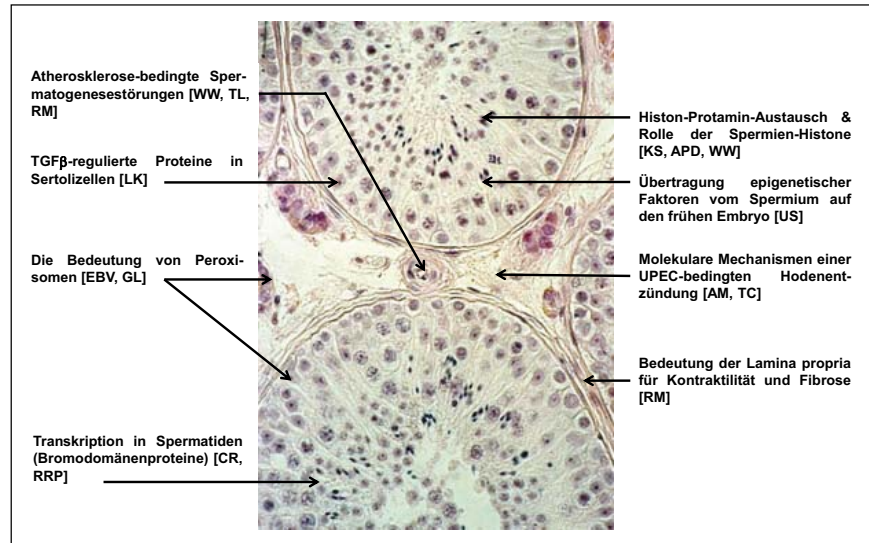


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Zellen des Hodens, die von den unterschiedlichen Teilprojekten untersucht wurden. In Klammern stehen die Initialen der Autoren, die das Teilprojekt bearbeitet haben. © K. Steger.

testikuläre Reaktion durch einen Abfall des Serum-Testosteronspiegels. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung einer direkten Verbindung zwischen einer veränderten arteriellen Blutzufuhr am Hoden und männlicher Infertilität. Es war keine Altersabhängigkeit nachzuweisen. Als entscheidende ätiopathogenetisch zu diskutierende Veränderungen erschienen uns die reduzierte Dichte der mikrovaskulären Struktur, der Abfall des Serum-Testosteronspiegels und die vermehrte Expression von Entzündungsparametern. Die Daten unterstreichen die Bedeutung einer testikulären mikrovaskulären Störung (und eventuell einer konsekutiv gestörten Spermatogenese) bei nachgewiesener Hypercholesterinämie und Atherosklerose im Tiermodell.

In einer Kohorten-Studie an Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie zeigte sich in einer Pilotanalyse eine Korrelation zwischen einer reduzierten testikulären Durchblutung (Duplex-Sonographie: reduzierte „peak flow velocity“) und der Qualität der Spermatogenese nach histologischer Aufarbeitung anhand eines Spermatogenese-Scores. Die Bewertung dieser klinischen Befunde steht noch aus.

Molekulare Mechanismen einer durch uropathogene *E. coli* (UPEC) verursachten Hodenentzündung und gestörten Spermatogenese (AM, TC)

Infektionen und Entzündungen des männlichen Reproduktionstraktes gehören mit etwa 14 % der Fälle zu den häufigsten Ursachen einer männlichen In-

fertilität. Dabei stellen *E. coli* Serovare eine wesentliche Erregergruppe bei Infekten des männlichen Genitaltraktes dar. Dies liegt darin begründet, dass besonders uropathogene *E. coli* (UPEC) prävalent bei Harnwegsinfekten vorkommen und die beim Mann mit den Harnwegen anastomosierenden Genitalwege eine direkte Infektionsausbreitung begünstigen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass UPEC in Sertoli-Zellen, peritubulären Zellen und testikulären Makrophagen den proinflammatorischen MyD88-abhängigen NFκB-Signalweg innerhalb der Zelle auf unterschiedlichen Ebenen blockieren können. Diese Hemmung resultiert in einer Unterdrückung der Sekretion von Zytokinen wie IL-6 und TNF-α, die wesentlicher Bestandteil einer antibakteriellen Immunantwort sind [2]. Stattdessen gelingt es UPEC, die Immunantwort der Zelle zu einer gegen Bakterien wenig wirksamen antiviralen Antwort zu manipulieren, die statt über MyD88 durch den Interferon-related factor-3 (IRF-3) vermittelt wird. UPEC kann folglich das intrazelluläre Signal, welches durch das Erkennen von *E. coli*-Komponenten durch die genannten testikulären Zellen ausgelöst wird, so manipulieren, dass die Wahrscheinlichkeit für ein Überleben des Erregers erhöht wird, da die durch IRF-3 induzierten Typ-I- und -II-Interferone sowie das „IFN-γ-inducible protein 10“ (IP-10) und RANTES nur eine geringe antibakterielle Wirksamkeit aufweisen [2].

Auf Erregerseite gelang es, mithilfe von Mutanten und einer Gesamtgenom-Ex-

pressionsanalyse mit alpha-Hemolysin, einen zentralen UPEC-Virulenzfaktor zu identifizieren, der für die Deviation der Immunantwort der Wirtszellen verantwortlich ist [3].

Die Antibiotikatherapie ist als Behandlungsoption bakterieller Epididymo-Orchitiden etabliert. Jedoch treten immer häufiger Resistenzproblematiken auf, welche die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien erfordern. Hier bieten prinzipiell die im männlichen Reproduktionstrakt exprimierten Defensine, eine Gruppe basischer antimikrobieller Peptide, neue Ansatzmöglichkeiten. Bestimmte Defensine werden spezifisch nur im Hoden, eine andere Gruppe ausschließlich im Nebenhoden synthetisiert. Sie wirken unspezifisch gegen Bakterien. Bei UPEC-Infekten in einem bakteriellen Rattenmodell der Epididymo-Orchitis zeigte sich eine starke Inhibition der Expression von Defensinen, wie Defensin-21, und Defensin-ähnlichen Molekülen, wie Spag11 (Sperm-associated antigen-11) im infizierten Hoden und Nebenhoden. Die beobachtete Hemmung erfolgte überraschend, da in vielen anderen Systemen eine bakterielle Infektion zu einer Synthesesteigerung führt, um die Pathogene zu eliminieren [4]. Die Applikation von rekombinantem Defensin-21 in UPEC-infizierten Ratten konnte die bakterielle „Last“ im Reproduktionstrakt substantiell reduzieren [4].

Im Hoden resultierte die UPEC-Infektion in einer starken Störung der Spermatogenese, verursacht durch Keimzellverlust. Es wurden aber auch Schäden in den somatischen Zellen des Hodens gefunden, die besonders im Fall der Sertoli-Zellen zu einem sekundären Keimzellverlust führen können. Die Aktivierung von klassischen Apoptosemarkern wie Caspase-8, Caspase-3/6, Caspase-1 sowie das Vorkommen von 180 bp DNA-Fragmenten konnte jedoch nicht beobachtet werden. Als Indikator für den nekrotischen Zelltod wurde die passive Abgabe von „high mobility group box protein-1“ [HMGB1] im Infektionsmodell *in vivo* dokumentiert [5]. Dies deutet auf Nekrose als vorherrschende Form des Zelltodes bei UPEC-Infekten des Hodens hin, mit der Konsequenz, dass nekrotische Zellbestandteile – im Gegensatz zur Apoptose – die inflammatorische Antwort weiter stimulieren und damit den Gewebeschaden erhöhen.

Die Bedeutung von Peroxisomen für Hodenfunktion und Fertilität [EBV, GL]

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen und unter anderem wichtige Funktionen im Stoffwechsel von Lipiden – wie den langkettigen und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) – und von reaktiven Sauerstoffverbindungen erfüllen [6]. Bei Erkrankungen, die auf einer Störung der Peroxisomenfunktion beruhen, kommt es neben neurologischen Symptomen auch zu Störungen in der Hodenentwicklung und der Keimzellerzeugung [7–11].

Eine detailliertere Charakterisierung der Peroxisomen im Hoden zeigte, dass diese bezüglich ihres Proteinmusters in den verschiedenen Zellarten des Hodengewebes heterogen waren, was auf eine unterschiedliche Funktion dieser Organellen in den verschiedenen Zellarten hinweist [12–14]. Im Rahmen dieses Projekts wurden mithilfe verschiedener Zelltypspezifischer konditionaler Cre/loxP-Pex13-Knockout-Mausmodelle [15] sowie dem siRNA-vermittelten Knockdown von Pex13 in Zellkulturen die Rolle der Peroxisomen für die Fertilität des Mannes in der Protektion der Spermatogenese und der endokrinen Funktion des Hodens systematisch untersucht. PEX13 ist ein peroxisomales Membranprotein, das essentiell für den Import der Proteine in die Peroxisomenmatrix ist. In Pex13-defizienten Zellen wird ein Komplettausfall der peroxisomalen Stoffwechselwege erzeugt, wodurch dessen Auswirkungen und die Rolle der Peroxisomen Zelltypspezifisch im Hoden analysiert werden konnte.

Erzeugung und Auswirkungen zellspezifischer Peroxisomendysfunktion im Hoden

Der Knockout des Pex13-Gens erfolgte über verschiedene cre-Linien in Spermato gonien (Stra8-cre/Pex13flox), runden Spermatoziden (Prm-cre/Pex13flox) und Sertoli-Zellen (AMH-cre/Pex13flox). In Leydig-Zellen wurde die peroxisomale Funktion über einen Pex13 siRNA-vermittelten Knockdown gestört. Der induzierte Funktionsausfall der Peroxisomen führte sowohl in Keimzellen als auch in somatischen Zellen (Sertoli-Zellen) zu schweren Beeinträchtigungen der Spermatogenese und der endokrinen Funktionen des Hodens (Sertoli-Zellen und

Leydig-Zellen). In den jeweiligen Pex13-defizienten Tieren (Spermato gonien, Sertoli- und Leydig-Zellen) war die Katalase, ein klassisches peroxisomales Matrixprotein, bei den jeweiligen Knockouts bzw. Knockdowns in das Zytoplasma mislokalisiert, was die zelluläre Situation bei peroxisomalen Erkrankungen des Menschen widerspiegelt [6]. Weiterhin konnte eine Akkumulation von rein peroxisomal verstoffwechselten Fettsäuren (z. B. sehr langkettige Fettsäuren = VLCFA), verzweigt-kettige Fettsäuren (Ausnahme postmeiotischer Pex13 KO) sowie Veränderungen in peroxisomalen Syntheseprodukten (Docosahexaensäure = DHA) nachgewiesen werden.

Spezifische Spermatogeneseveränderungen

Der prämeiotische Pex13-Knockout (Stra8-cre/Pex13KO) führte zu einem Arrest der Spermatogenese auf Spermatozidenniveau mit deutlich nachweisbarer zytoplasmatischer Katalase in multinukleären Riesenzellen und zur Azoospermie, während männliche Mäuse mit postmeiotischem Pex13-Knockout eine normale Fertilität besaßen und in späten Spermatoziden auch keine zytoplasmatische Katalase aufwiesen (Abb. 2). Ähnliche multinukleäre Riesenzellen wurden auch bei einem Mausmodell mit Störungen der peroxisomalen Plasmalogensynthese [16] und bei generellen zellulären Defekten des Lipidmetabolismus [17] beschrieben. Im Gegensatz hierzu entwickelten Sertoli-zellspezifische Pex13-Knockout-Mäuse ein komplettes Sertoli Cell Only- (SCO-) Syndrom mit gleichzeitig einhergehender Proliferation von Leydig-Zellen. Dieses Modell ähnelt einem Pex5-Knockout in Sertoli-Zellen [18].

Veränderungen der endokrinen Hodenfunktion

Die Leydig-Zell-Proliferation in Sertoli-zellspezifischen Pex13-Knockout-Mäusen führte zur Aufrechterhaltung des Testosteronspiegels, allerdings wurden eindeutige Veränderungen im Bereich der Androgenvorstufen und der Östrogene im Hoden nachgewiesen. Eine klare Androgen-Östrogen-Dysbalance mit einer eindeutigen Verringerung der Testosteronsynthese und einer Akkumulation von Östradiol wurde nach funktioneller Störung des peroxisomalen Stoffwechsels durch spezifischen Knockdown von Pex13 in primären Leydig-Zellen und in

einer Leydig-Tumorzell-Linie nachgewiesen. Diese Befunde lassen auf eine vorhandene Androgen-Östrogen-Dysbalance bei Kindern mit peroxisomalen Biogenesedefekten schließen, was die beschriebenen Phänotypen des Kryptorchismus bei Knaben oder der Kliteromegalie bei Mädchen mit Zellweger-Syndrom, der schwersten Form eines peroxisomalen Biogenesedefekts, erklären könnte [11, 19].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die normale Biogenese der Peroxisomen und der peroxisomale Stoffwechsel für die Aufrechterhaltung der männlichen Fertilität essentiell sind und deren Ausfall in den meisten Zellen des Hodens zur männlichen Infertilität führt.

Untersuchung TGF-beta-regulierter Proteine in Sertoli-Zellen (LK)

Clusterin (CLU) ist ein ubiquitär exprimiertes heterodimeres Glykoprotein, das bei vielen Funktionen wichtig ist, z. B. Zell-Zell-Interaktionen, Apoptose, Epithelial-mesenchymale Transition, Karzinogenese und als Chaperon bei z. B. Morbus Alzheimer [20]. Ursprünglich wurde CLU als ein Androgen-reprimiertes Protein in der Prostata identifiziert und ist auch als „testosterone-repressed prostate message“, „glycoprotein-80, serum protein-40,40, dimeric acidic glycoprotein“, „sulfated glycoprotein-2“, „complement lysis inhibitor“ und Apolipoprotein-J bekannt [20]. Im Hoden ist CLU fast ausschließlich in Sertoli-Zellen exprimiert, reduzierte CLU-Spiegel wurden bei männlicher Infertilität gefunden [21, 22]. Darüber hinaus ist nur wenig über seine Funktion bekannt. In dieser Studie wurde primär der Einfluss von CLU auf die Meiose untersucht.

Wir fanden eine Hoch-Regulation von CLU durch die „transforming growth factors-beta“ (TGF β 1–3) und eine Inhibition der Staurosporin-induzierten Apoptose durch CLU. Die CLU-Rezeptoren sind die Multi-Liganden-Rezeptoren „very low density lipoprotein receptor“ (VLDLR) und der Apolipoprotein-E-Rezeptor-2 (ApoER2), weil durch einen spezifischen Inhibitor von VLDLR/ApoER2 die Phosphorylierung von Akt und damit der CLU-Signalweg verhindert wird [23]. Wir fanden ebenfalls eine Hoch-Regulation von Meiose-assoziierten Proteinen (*Stra8*, *MYBL1*, *CREB* und

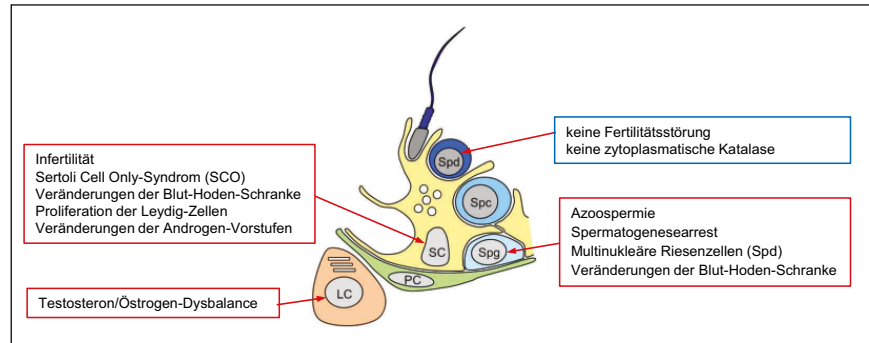


Abbildung 2: Schema zu den unterschiedlichen Phänotypen bei Defizienz von Peroxisomen in verschiedenen Zelltypen des Mausehodens. Rote Pfeile markieren die Zellart des Pex13-Knockout/Knockdown. © K. Steger. Spg = Spermatogonien; Spc = Spermatozyten; Spd = Spermatiden; SC = Sertoli-Zellen; PC = Peritubulär-Zellen; LC: Leydig-Zellen

LDHC) in Tubulus-Kulturen nach Behandlung mit rekombinantem CLU. Zum Beispiel zeigte sich eine deutlich gesteigerte Proteinexpression von *Stra8*, das im Hoden nur in prämeiotischen Keimzellen exprimiert ist und als „Torwächter“ der Meiose gilt [24].

Ein anderer Teil des Projektes beschäftigte sich mit der verbesserten Diagnose der männlichen Infertilität. Wir konnten bereits zeigen, dass bei infertilen Patienten sowohl die Anzahl an Sertoli-Zellen als auch die Stammzellpopulation der Keimzellen zusätzlich zu den am besten untersuchten Meiose-Defekten reduziert waren [25]. Im Anschluss konzentrierten wir uns auf die Effizienz des Eintritts in die Meiose.

Zur Analyse von Patienten mit Azoospermie und definierten Spermatogenese-Defekten wurden OCT2 für Typ-A-Spermatogonien, Sarcoma antigen-1 (*SAGE1*) für Mitose-Meiose-Transition [26, 27] und Smad3 für pachytäne Spermatozyten [25] verwendet. Besonders Patienten mit einem Reifungsarrest (primäre Spermatozyten) hatten eine signifikant reduzierte Anzahl von Typ-A-Spermatogonien. Des Weiteren waren *SAGE1*-positive Spermatozyten deutlich reduziert in Fällen mit Hypospermatogenese und Reifearrest und bestätigte ältere Arbeiten [28, 29]. Aber es ist wichtig zu ermitteln, ob der mitotische Defekt nicht schon vorher besteht; das bedeutet, ob nicht bereits die Anzahl der Spermatogonien reduziert ist. In den untersuchten Fällen zeigte sich, dass bei Patienten mit Reifearrest die reduzierte Anzahl an Typ-A-Spermatogonien (54 %) ähnlich hoch wie die reduzierte Anzahl an sich teilenden/differenzierenden *SAGE1*-positiven Spermatozo-

nien (42 %) ist. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass der Defekt eher bei den frühen Spermatogonien und weniger bei der Mitose liegt.

Für eine detaillierte individuelle Klassifikation der Patienten unterschieden wir zwischen „hoher Effizienz des Meiose-Eintritts“ (große Zahl pachytäner Spermatozyten) und „geringer Effizienz des Meiose-Eintritts“ (niedrige Zahl pachytäner Spermatozyten). Nur Patienten mit histologisch normaler Spermatogenese oder Hypospermatogenese zeigten eine normale Anzahl an Spermatogonien und eine hohe Effizienz des Meiose-Eintritts. Dagegen hatten Patienten mit Reifungsarrest immer eine niedrige Effizienz des Meiose-Eintritts [30]. Die Analyse der Meiose zeigte bis zu 50 % reduzierte Rekombinationsraten in Fällen mit Reifungsarrest [31, 32], ebenso wie eine 6-fach erhöhte Frequenz an genetischen Abnormalitäten in Fällen mit Reifungsarrest versus Hypospermatogenese [33]. In allen diesen Fällen wurde aber nicht die Anzahl der Spermatogonien oder der Meiose-Eintritt bestimmt.

Die individuelle Klassifizierung von männlichen Patienten mit gestörter Spermatogenese besonders der frühen Phase ist eine wichtige Erweiterung des Klassifizierungssystems von Bergmann und Kliesch [34]. Im Wesentlichen konnte bei männlichen Patienten mit gestörter Spermatogenese gezeigt werden, dass (1.) Sertoli-Zahlen reduziert sein können, (2.) Spermatogonien-Zahlen reduziert sein können und (3.) kompensatorische Mechanismen in der Meiose vorhanden sein müssen, um diese frühen Spermatogenese-Defekte ausgleichen zu können.

■ Die Transkriptionphase in haploiden Spermatischen korreliert mit dem Auftreten verschiedener Histonmodifikationen und der differentiellen Expression zahlreicher, neusynthetisierter Bromodomänenproteine und Transkriptionsfaktoren (CR, RRP)

Während der Spermatogenese durchlaufen die männlichen Keimzellen zahlreiche Differenzierungsschritte, die zur Entwicklung eines hochspezialisierten Spermiums führen. Diese Differenzierungsschritte unterliegen einem streng kontrollierten Genexpressionsprogramm. In der postmeiotischen Phase der Spermienreifung, der Spermiogenese, finden enorme morphologische Zellveränderungen statt, die durch zahlreiche verschiedene Proteine gewährleistet werden. Diese Proteine entstehen hauptsächlich aus translational reprimierten und gespeicherten mRNAs.

Bei *Drosophila* findet die Synthese dieser Spermiogenese-relevanten mRNAs in primären Spermatozyten statt, die Transkription der entsprechenden Gene ist von Testis-spezifischen TATA-Box-Bindeprotein- (TBP-) assoziierten Faktoren [tTAFs] und von Testis-spezifischen Bromodomänenproteinen (tBRDs) abhängig [35, 36]. Zudem wird postuliert, dass tTAFs an den Spermiogenese-relevanten Genen als Gegenspieler von Polycomb agieren [37].

Bei der murinen Spermatogenese steigt die Transkription von 1652 Genen während oder nach der Meiose drastisch an [38]. Proteine, die zu einem späteren Zeitpunkt der Spermiogenese benötigt werden, z. B. Protamine, basieren auf translational reprimierten und gespeicherten mRNAs, die bereits in runden Spermatischen synthetisiert werden [39]. Insgesamt werden etwa 2375 Gene in meiotischen und postmeiotischen männlichen Keimzellen transkribiert [38]. Zudem wurden die TAF-Varianten TAF4B und TAF7L in frühen Spermatischen von Mäusen detektiert [40, 41]. Das spezifisch im Hoden exprimierte Bromodomänenprotein BRDT ist in Spermatozyten und in frühen Spermatischen nachweisbar [42]. Dennoch ist bisher wenig über

die Transkription Spermiogenese-relevanter Gene in Säugetieren bekannt. Daher haben wir uns die Frage gestellt, ob bei Säugetieren, genau wie bei *Drosophila*, spezialisierte Transkriptionsinitiationskomplexe existieren.

Zu Beginn unserer Arbeiten wollten wir uns ein eigenes Bild über die Verteilung von TAF4B in männlichen Keimzellen verschaffen. Dazu wurden drei verschiedene TAF4B-Antikörper (darunter auch der in [41] verwendete) an humanen Hodenbiopsie-Proben und an unterschiedlich fixierten murinen Hodenschnitten getestet. Mit keinem der Antikörper konnte ein Signal in frühen Spermatischen detektiert werden. Stattdessen war TAF4B in Spermatozyten und in Spermatozyten von Mäusen und in humanen Spermatozyten zu detektieren. Zudem konnte mittels qPCR eine signifikante Anreicherung von TAF4B in Spermatozyten im Vergleich zu postmeiotischen Spermatischen nachgewiesen werden. Diese Daten deuteten darauf hin, dass TAF4B keine essentielle Rolle bei der Transkription der Spermiogenese-relevanten Gene spielt.

Zudem waren die Transkripte der kanonischen TAFs TAF2, TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 und TAF12 sowie die der TAF-Varianten TAF5L und TAF6L in frühen Spermatischen signifikant angereichert. Die Anreicherung dieser TAFs auf Proteinebene in humanen und murinen Spermatischen wurde exemplarisch immunhistologisch validiert. Es scheint offensichtlich, dass viele der kanonischen TAFs eine Rolle bei der Transkription der Spermiogenese-relevanten Gene spielen. Interessanterweise scheinen TAF5 und TAF5L sowie TAF6 und TAF6L in Spermatischen gleichzeitig aufzutreten. Kürzlich wurde gezeigt, dass TAF7L mit TRF2 kooperiert und eine Gruppe von Genen in Spermatischen aktiviert [43]. Es wäre denkbar, dass in frühen Spermatischen verschiedenen zusammengesetzte TFIID-Komplexe existieren, die jeweils bestimmte Gruppen von Genen regulieren. Neben zahlreichen TAFs waren die Transkripte der Bromodomänenproteine BRD1, BRD2, BRD3, BRD7, BRD8, PCAF, SMARCA2 und TRIM24 in frühen Spermatischen signifikant angereichert. Die Transkripte der Polycomb-Proteine RING1, BMI1, SCM1 und EZH2 zeigten ebenfalls eine signifikante Anreicherung in frühen Spermatischen.

Die Anreicherung der entsprechenden Proteine in humanen und murinen Spermatischen wurde exemplarisch immunhistologisch validiert. Zudem zeigten immunhistologische Untersuchungen, dass die Transkription in Spermatischen von Mäusen und beim Menschen zum Erliegen kommt, noch bevor Protamine zu detektieren sind [44].

Des Weiteren zeigten immunhistologische Untersuchungen, dass zu Beginn der postmeiotischen Transkription eine Hyperacetylierung von Histon H4 zu detektieren ist (K5ac, K8ac und K16ac bei Mäusen; K5ac, K8ac und K12ac beim Menschen). Diese Hyperacetylierung nimmt mit Fortschreiten der Transkriptionsphase ab und steigt am Ende wieder an. Dieser Wiederanstieg repräsentiert die in der Literatur beschriebene Hyperacetylierung beim Austausch der Histone durch Protamine [45]. Unsere Daten sind konträr zu denen anderer Publikationen, die Histone in den meisten runden Spermatischen als nicht-acetyliert beschreiben [46]. Es wird postuliert, dass BRD2 Transkriptionsfaktoren, Histonacetyltransferasen und Chromatin-Remodeller zu Promotoren rekrutiert, indem es eine Art Gerüst am Chromatin bereitstellt [47–50]. Für BRDT wurde gezeigt, dass es eine Rolle bei der richtigen Expression einer Gruppe von Genen in frühen Spermatischen spielt [51, 52]. Die Acetyltransferase PCAF agiert als Transkriptions-Kofaktor und bildet mit mehr als 20 weiteren Proteinen den sogenannten PCAF-Komplex. Dieser Komplex beinhaltet, genau wie der TFIID-Komplex, die Histon-ähnlichen Untereinheiten TAF9, TAF10 und TAF12 und bildet eine Histon-Oktamer-ähnliche Struktur aus [53, 54]. Zusätzliche Komponenten des PCAF-Komplexes sind die TAF-Varianten TAF5L und TAF6L [55].

Wir konnten in runden Spermatischen Komponenten des kanonischen TFIID-Komplexes, des PCAF-Komplexes, TAF-Varianten sowie verschiedene Bromodomänenproteine nachweisen und postulieren daher, dass in Spermatischen verschiedenen zusammengesetzte Transkriptionskomplexe, bestehend aus unterschiedlichen TFIID-Komplexen, verschiedenen Bromodomänenproteinen und dem PCAF-Komplex existieren, die jeweils unterschiedliche Gruppen von Genen regulieren.

■ Besonderheiten der für den Spermatozoentransport notwendigen Kontraktilität von Samenkanälchen und Nebenhodengang (RM)

Der Transport von Spermatozoen, die noch unbeweglich aus dem Keimepithel freigesetzt werden, und ihre ordnungsgemäße Reifung hängt entscheidend von der Aktivität glatter Muskulatur, die die *Tubuli seminiferi* und den *Ductus (D.) epididymidis* umgibt, und von ihrer lokalen noch unzureichend verstandenen Regulation ab [56, 57]. Zur Charakterisierung der kontraktilen Aktivität des kaudalen *D. epididymidis* beim Nager konnten wir Organbad-Untersuchungen etablieren [58], aufgrund dünnerer Wandstärken waren proximale Nebenhodenteile oder *Tubuli seminiferi* dieser Methode jedoch nicht zugänglich. Wir entwickelten daher ein „Time-lapse imaging“-Mikroskopie-Verfahren, das die Untersuchung der Kontraktilität von *Tubuli seminiferi* und einzelnen Abschnitten des *D. epididymidis* [59] unter beinahe physiologischen Bedingungen und die gezielte Austestung von Pharmaka am Gewebe ermöglicht.

Die *Tubuli seminiferi* der Ratte, die von einer einzelnen Zelllage peritubulärer Muskelzellen umgeben sind, zeigen ein spontanes, jedoch irreguläres, undulierendes Kontraktionsmuster. Zur weiteren Charakterisierung setzten wir die Fourier-Analyse ein, die eine Darstellung dieser irregulären Aktivität als Frequenzspektrum erlaubt. Allein der optische Vergleich der so generierten Frequenzspektren erlaubt eine rasche Erfassung von Veränderungen, die durch die Zugabe unterschiedlicher Pharmaka erzeugt werden. Außerdem konnten bestimmte typische Spektralkonfigurationen verschiedenen, durch Transillumination zu unterscheidenden Regionen der Spermato-genese zugeordnet werden.

Im Gegensatz zu Ratte und Maus enthält die peritubuläre Lamina propria humaner Samenkanälchen mehrere Schichten peritubulärer Zellen, die von kollagenen Fasern getrennt sind [60, 61]. Menschliche *Tubuli seminiferi* zeigen ebenfalls spontane Kontraktionen, die jedoch sehr langsam und eher peristaltisch ablaufen und sich klar vom Kontraktionsmuster

bei der Ratte unterscheiden. In Fällen mit fibrotischen Veränderungen der Lamina propria, die bei einem großen Teil von Spermatogenesestörungen vorhanden sind, konnten keine Kontraktionen beobachtet werden. Die weitere Charakterisierung peritubulärer Zellen zeigte die Kolokalisation von Markern für glatte Muskulatur wie auch für Bindegewebe in einer einzelnen Zelle mit einem Überwiegen der Bindegewebsmarker, das auch in klassischen glatten Muskelzellen wie z. B. aus der Pulmonalarterie und der Prostata auffiel. Neben der kontraktilen Funktion haben menschliche peritubuläre Zellen auch diverse andere wichtige Funktionen. Hierzu gehören u. a. sekretorische Funktionen [62], ein Einfluss auf die Keimzellen [63], eine Rolle beim postnatalen Wachstum des Hodens [64], eine Bedeutung für die Definition der spermatogonialen Stammzellnische, sowie wichtige Interaktionen mit den lokalen Abwehrzellen.

Im Nebenhodengang konnten anders als in den *Tubuli seminiferi* regelmäßige, spontane, nicht neuronal vermittelte Kontraktionen nachgewiesen werden, die den intraluminalen Inhalt bewegen [58] und in Caput, Corpus und Cauda ein unterschiedliches Muster von Frequenz und Amplitude aufweisen [56, 58]. So genannte „Segmente“, die durch interstitielle bindegewebige Septen abgegrenzt werden, stellen eine feinere Gliederungsmöglichkeit des Organs dar als die gröbere in Kopf, Körper und Schwanz [65, 66]. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass in diesen Segmenten ein unterschiedlicher muskulärer Tonus vorliegt. Dies zeigt sich einerseits in einem Modell der ascendierenden, bakteriellen Epididymitis, bei dem im Segment unmittelbar oberhalb des noch luminal Bakterien enthaltenden ein geringerer Gangdurchmesser auffällt [66]. Weiterhin findet sich in den einzelnen Segmenten unterschiedliche Expression von Enzymen, die die Kontraktilität beeinflussen [67].

Obwohl der Transit der reifenden Spermatozoen durch Hoden und Nebenhoden Kontraktionen der glatten Muskulatur erfordert, darf der Transport andererseits nicht zu schnell sein, sodass auch relaxierende Einflüsse von Bedeutung sind. Das cGMP-System, dessen Komponenten in Hoden und Nebenhoden exprimiert sind [56, 58, 67, 68], vermittelt die Relaxation glatter Muskulatur. Die An-

hebung von cGMP durch NO oder Sildenafil als einem Inhibitor der cGMP-abbauenden Phosphodiesterase-5 (PDE5) führt in beiden Organen zu einer Verlangsamung der kontraktilen Frequenzen, ohne dass eine Dauermedikation im Tiermodell zur Aufhebung von spontanen Kontraktionen führt [58]. Neben der PDE5 kommen auch die meisten anderen der 11 bekannten PDE-Familien, die cGMP und/oder cAMP abbauen (und so Kontraktilität beeinflussen), in peritubulären Zellen menschlicher Proben vor. Ein besonders interessanter Befund war die fehlende Expression eines Vertreters aus der PDE1-Familie in fibrotisch veränderter im Vergleich zur normalen Lamina propria und seiner Re-Expression unter Kulturbedingungen.

Ein besseres Verständnis für das Zusammenspiel von Kontraktilität, Fibroseentstehung und der Rolle cGMP-abhängiger Signalwege eröffnet neue Optionen zur Behandlung der männlichen Infertilität. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt, dass cGMP-Signalwege durch NO, natriuretische Peptide oder unterschiedliche Phosphodiesterase-Hemmer bereits therapeutisch beeinflusst werden, von besonderer Bedeutung.

Der Histon-Protamin-Austausch und die Rolle der Rest-Histone in Spermien (KS, APD, WW)

Während der Spermiogenese wird die Mehrzahl DNA-bindender Histone durch Spermien-spezifische Protamine ersetzt (Abb. 3). Obwohl Spermatozoen transkriptional inaktive Zellen sind [69], weisen die in ihnen verbleibenden Histone (Rest-Histone) eine Vielzahl epigenetischer Modifikationen auf. Vor Kurzem wurde am Mausmodell gezeigt, dass das Spermium bei der Befruchtung neben seinem haploiden Genom auch epigenetische Informationen auf die Eizelle überträgt und nachweislich bis zur F2-Generation weitervererben kann [70].

Im Rahmen unserer Untersuchungen führten wir zunächst eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit einem Antikörper gegen die Histonmodifikation H4K12ac (Histon H4 mit einer Acetylgruppe an Lysin 12) an Samenproben von fertilen Spendern durch. Das an H4K12ac gebundene Chromatin wurde anschließend einer Promotorarray-Analyse (ChIP-on-chip) unterzogen [71]. Es fand sich eine Anreicherung von H4K12ac-Bin-

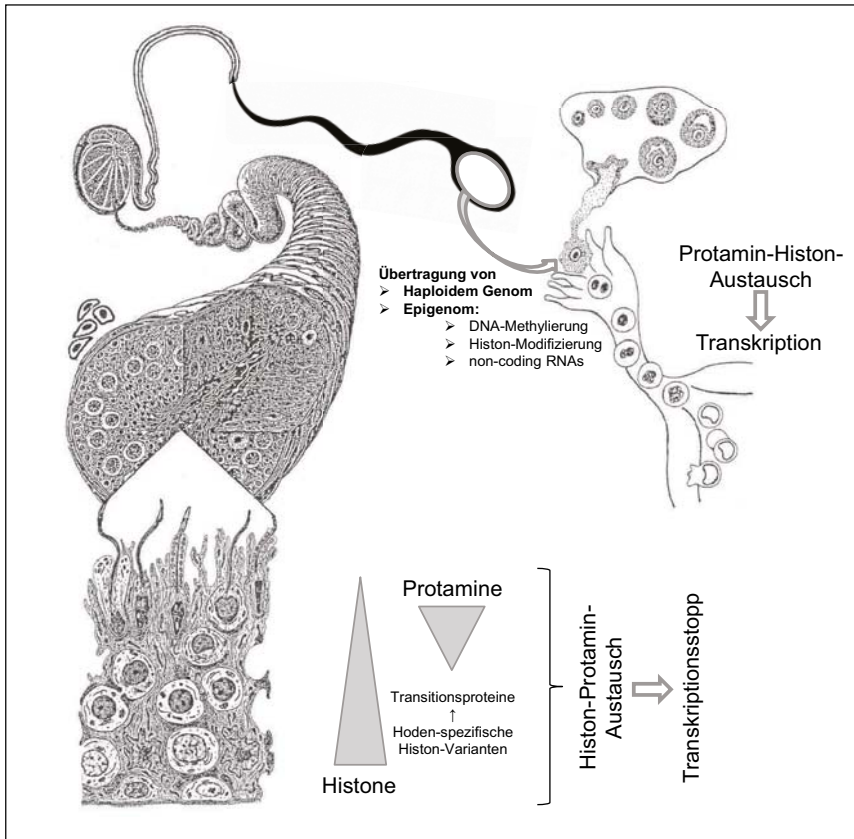


Abbildung 3: Schema zum mehrstufigen Histon-Protamin-Austausch und der Übertragung epigenetischer Markierungen vom Spermium auf die Eizelle während der Befruchtung. © K. Steger.

dungsstellen in Promotoren von Genen, die in Entwicklungsprozesse der frühen Embryogenese involviert sind. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von einer amerikanischen Arbeitsgruppe publiziert [72]. Weiterführende Analysen zeigten, dass die identifizierten Kandidatengene mit einem hohen Level ihrer korrespondierenden Transkripte in Spermien korrelierten [73]. Hierbei wurde die höchste mRNA-Konzentration für das Hoden-spezifische PHD-Finger-Protein-7 (PHF7) gefunden. Im Mausmodell konnte H4K12ac vom männlichen Pronucleus bis zu frühen Stadien der Embryogenese nachgewiesen werden. Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit Datenbanken zur Genexpression in humanen Embryonen ergab, dass die mit H4K12ac-assoziierten Genpromotoren nur schwach mit den im 4-Zell-Stadium exprimierten Genen korrelierten. Demgegenüber gab es Übereinstimmungen mit 23 Genen des 8-Zell-Stadiums und 39 Genen des Blastozysten-Stadiums.

Um zu klären, ob eine von der Normal-situation in fertilen Spendern abweichende Histonacetylierung oder DNA-Methylierung für eine männliche Subfertilität

verantwortlich sein könnte, wurde ChIP-on-chip für H4K12ac auch an Samenproben von subfertilen Patienten mit Störungen der Chromatinkondensation (Nachweis durch Anilin-Blau-Färbung) durchgeführt. Ausgewählte Genpromotoren wurden anschließend einer Pyrosequenzierung unterzogen, um den Grad der DNA-Methylierung zu bestimmen [74]. Zwar konnte an einigen entwicklungsrelevanten Genen eine Reduzierung der H4K12ac-Bindung nachgewiesen werden, doch existierte kein signifikanter Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen fertilen Spendern und subfertilen Patienten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Veränderungen der H4K12ac-Bindung nicht mit einer Änderung der DNA-Methylierung einhergehen.

Im Rahmen der Etablierung eines ELISA-Tests zum Nachweis von Spermien-Protaminen kam es zu einem überraschenden, aber interessanten Nebenbefund. So resultierte die Expression humaner Protamine sowohl in prokaryotischen *E. coli* als auch in eukaryotischen HeLa-Zellen innerhalb kürzester Zeit zu einem kompletten Stopp der Zellproliferation, der nach Entfernung der Protamine rückgän-

gig gemacht werden konnte [75]. Wir vermuten als Ursache die hohe Bindungsaffinität der Arginin-reichen Protamine an das negativ geladene Rückgrat der DNA. Sollte sich diese Beobachtung in weiteren Experimenten bestätigen, dann könnte dies in Zukunft eine alternative und effektive Möglichkeit darstellen, um das Wachstum bestimmter Krebszellen mit hoher Proliferationsrate innerhalb eines Gewebeverbands spezifisch zu stoppen.

Die Übertragung (epi)genetischer Faktoren vom Spermium auf den frühen Embryo (US)

Nukleosomale Strukturen, die während der Spermiogenese vom Austausch durch Protamine verschont bleiben, stellen eine Besonderheit des Spermien-Epigenoms dar. Da sie in spezifischen Genombereichen angesiedelt sind und bestimmte posttranslationale Histonmodifikationen aufweisen, wird ihnen eine potentielle Bedeutung für die frühe Embryogenese und im Transgenerations-Kontext zugeschrieben. Bislang existierende Daten und Publikationen zur Genom-weiten Verteilung von Spermien-Nukleosomen bzw. deren biologischer Funktion weisen keinen Konsens auf. So konnten frühere nChIP-Seq-basierte Arbeiten an Spermien von Mensch und Maus zeigen, dass Histone vorwiegend in CpG-reichen hypomethylierten Promotoren von Genen mit „house-keeping“ und entwicklungsrelevanten Funktionen (z. B. HOX-Genen) zu finden sind [71, 72, 76, 77]. Zahlreiche andere Arbeiten aber, die grundlegend andere unabhängige methodische Ansätze verwendeten (FISH, Immunfärbung oder „small-scale“-Klonierung), konnten im Gegensatz dazu nachweisen, dass die große Mehrheit der Spermien-Nukleosomen im perizentrischen Heterochromatin und in repetitiven DNA-Elementen (z. B. LINE [long interspersed nuclear elements] und SINE [small INE]) zu finden sind [78–81].

In dem vorliegenden Projekt wurde mittels MNase-Verdau die nukleosomale DNA-Fraktion aus humanen und bovinen Spermien isoliert und ohne weitere Anreicherung mit Antikörpern direkt mittels Illumina-Technologie sequenziert. Ziel war es, mittels unterschiedlicher Säugetier-Modelle ein universelles Genom-weites Profil der Nukleosomverteilung zu ermitteln, welches die hohe Wahrscheinlichkeit der Nukleosom-Kon-

servierung auch außerhalb der kodierenden Bereiche und Promotoren berücksichtigt [82]. Unsere Ergebnisse bestätigten für beiden Organismen, dass die große Mehrheit der putativen nukleosomalen Bindestellen im intergenischen Bereich liegt und mit bestimmten repetitiven DNA-Elementen (LINE1, SINE, Centromer-Repeats) assoziiert sind. Des Weiteren wurde bei Mensch und Rind ein geringer Anteil an putativen Bindestellen in Genpromotoren von RNA- und Protein-prozessierenden Faktoren, Signaltransduktoren und Faktoren für die Mitochondrienfunktion gefunden. Die transkriptionale Aktivität dieser Gene bzw. Genklassen konnte in der Präimplantationsphase von menschlichen und Mäuse-Embryonen gezeigt werden [83]. Interessanterweise waren sowohl bei humanen als auch in bovinen Spermien keine putativen nukleosomalen Bindestellen im HOX-Gencluster zu finden. Nukleosom-abgereichert waren außerdem Bereiche von repetitiven Elementen wie LINE2, LTR (long terminal repeats) und einfache Repeats. Parallel zu unserer Arbeit hat eine andere Gruppe via „paired-end“-Genom-weiter Sequenzierung die gesamte MNase-erzeugte nukleosomale DNA-Leiter untersucht und ebenfalls zeigen können, dass die Spermien-Nukleosome vorwiegend in intergenischen Gen-armen Bereichen liegen und, Genom-weit betrachtet in Genpromotoren, inklusive die der HOX-Gene, stark abgereichert sind [84]. Außerdem wurde in dieser Studie alternativ mit einer unabhängigen Methode (FISH-Nachweis der Histone H4 und TH2B) demonstriert, dass im Spermium die meisten Nukleosomen im Heterochromatin-reichen Chromozentrum liegen.

Basierend auf unseren Ergebnissen vermuten wir, dass die Spermien-spezifischen Nukleosomen vornehmlich in der Präimplantationsentwicklung für die Centromerfunktion, aber auch für die epigenetische Regulation bzw. Suppression von Retrotransposons relevant sind. Weiterführende Studien im Bereich der molekularen Embryologie unter Einsatz von Tiermodellen sind notwendig, um dies zu klären und, darüber hinaus, die Bedeutung des Spermien-Epigenoms in idiopathischen Fällen der männlichen Infertilität, im Einsatz der ART (assisted reproductive technology) und im Generationen-übergreifendem (transgenerationalen) Kontext zu verstehen (Abb. 4).

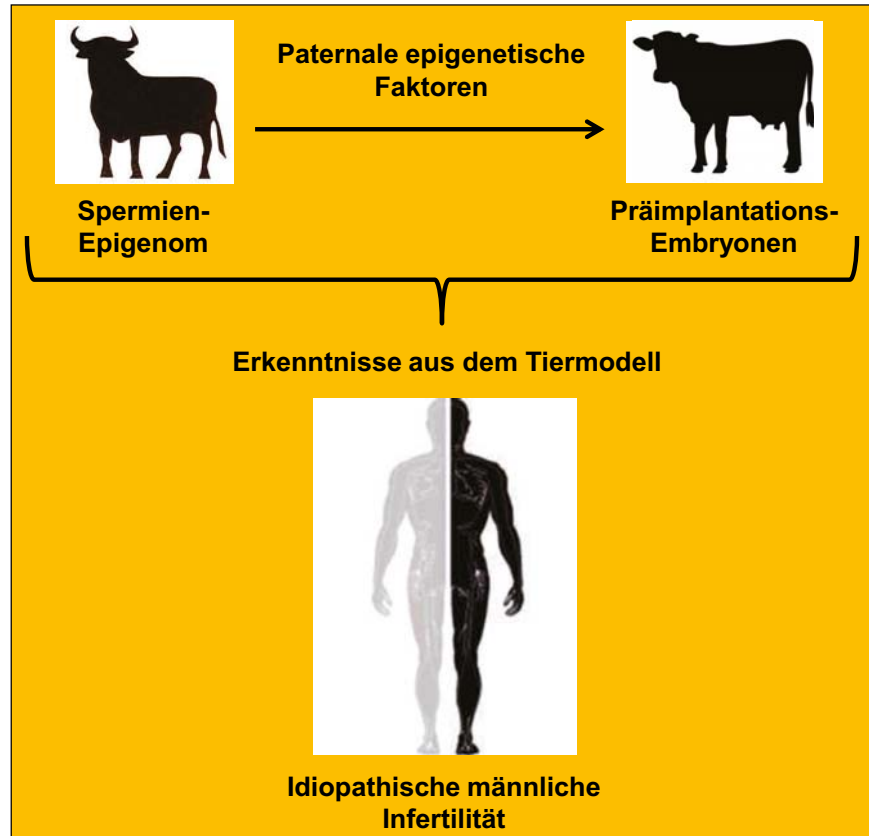


Abbildung 4: In Bezug auf das Spermien-Epigenom, speziell die präservierten Nukleosomen und deren Genom-weite Verteilung, zeigen Mensch und Rind große Ähnlichkeiten. Das Rindmodell eignet sich daher sehr gut für weiterführende Studien, die sich mit dem Aufbau und dem Zustandekommen des Spermien-Epigenoms beschäftigen und dessen Funktion in der frühen Präimplantationsentwicklung untersuchen. Die Erkenntnisse aus dem Tiermodell können als Grundlage dienen, um die molekularen Ursachen einer idiopathischen Infertilität bei Männern im Detail zu verstehen und molekulare Prognosemarker für ART zu identifizieren. © K. Steger.

■ Relevanz für die Praxis

Neben einer Vielzahl von grundlegenden Erkenntnissen zu molekularen Regulationsmechanismen der männlichen Keimzellentwicklung bei Mensch und Tier wurde von der Gruppe auch eine Reihe von praxisrelevanten Ergebnissen erzielt:

- So korreliert eine Atherosklerosebedingte Mangel durchblutung des Hodens im Mausmodell mit einem verminderten Gefäßvolumen und einer reduzierten Kapillardichte. Der eingeschränkte Blutfluss resultiert in Schädigungen der Spermatogenese, verringerter Spermienzahl, reduziertem Serum-Testosteronspiegel, systemischen und lokalen Entzündungen sowie einer verminderten Wurfgröße in der F1-Generation.
- Infektionen des Hodens, die im Rattenmodell durch uropathogene *E. coli* (UPEC) induziert werden, führen zu einer Schädigung der

Spermatogenese und einer Verringerung der Spermienzahl, wobei Nekrose den bevorzugten Signaltransduktionsweg zum Zelltod darstellt. UPEC hemmen die Verteidigungsantwort des Wirts durch Hemmung der Expression antibakterieller Defensine im Nebenhoden. Defensinsubstitution führt zu einer effizienten Eliminierung des Pathogens.

- Subfertile Patienten zeigen außer Meiose-Defekten auch eine reduzierte Anzahl an Sertoli-Zellen und Stammzellen. Diese Defekte (Sertoli- und Keimzellen) konnten von den meisten Patienten mit histologisch normaler Spermatogenese oder Hypospermatogenese in der Meiose ausgeglichen werden. Clusterin, ein androgen- und TGF-beta-abhängiges Protein, nutzt die Multi-Ligand-Rezeptoren „very low density lipoprotein receptor“ (VLDLR) und Apolipoprotein-E-Rezeptor 2 (ApoER2) und erhöht die Protein-

Expression und Phosphorylierung von einigen Proteinen, die bei der Meiose wichtig sind.

- Es sind zahlreiche verschiedene Transkriptionsfaktoren, Bromodomänenproteine und Histonmodifikationen für eine korrekte Differenzierung muriner und humaner haploider Spermatozyten notwendig.
- Im Mausmodell führen Peroxisomen-Fehlfunktionen in Spermatozyten zu Spermatozyten-Reifungsdefekten und Störungen der Blut-Hoden-Schranke, in Sertoli-Zellen zu einem Sertoli-Cell-Only- (SCO-) Syndrom mit begleitender Hodenentzündung und Herabsetzung der Testosteronsynthese in Leydig-Zellen. In Patienten mit bunter Atrophie konnte eine Reduzierung des Pex13-Proteins in apoptotischen Spermatozyten nachgewiesen werden.
- Im Rattenmodell weisen Hodenkanälchen komplexe und irreguläre Kontraktionen der Lamina propria auf, der Nebenhodengang zeigt hingegen regelmäßige Kontraktionen. In humanen Hodenkanälchen laufen spontane Kontraktionen langsamer und in Form eines peristaltischen Musters ab. Hodenkanälchen mit fibrotisch verdickter Lamina propria zeigen keine Kontraktionen. Die Tatsache, dass PDE1C ausschließlich in solchen Hodenkanälchen fehlt, lässt eine Rolle dieses Enzyms bei der Fibroseentstehung vermuten.
- Es war bereits bekannt, dass die Expression von Protamin in elongierenden Spermatozyten über eine Kondensation des Kernchromatins zu einem Stopp der Transkription führt. Transfiziert man Protamin in *E. coli*- oder HeLa-Zellen, die selbst kein Protamin besitzen, so kommt es zu einem Stopp der Zellproliferation, was für einen generellen Reaktionsmechanismus spricht. Diese Beobachtung könnte in Zukunft zu einem neuartigen Ansatz für eine spezifische Behandlung von Krebszellen beitragen.
- Es wird vermutet, dass das Spermium bei der Befruchtung neben dem haploiden Chromosomensatz auch epigenetische Information auf die Eizelle überträgt. Mittels ChIP-on-chip wurden Genom-weit Bin-

dungsstellen von H4K12ac in humanen Spermien identifiziert. Hierbei wurden signifikante Unterschiede zwischen den Daten von fertilen Spendern und subfertilen Männern gefunden, was eine wichtige Rolle von Histonmodifikationen für die männliche Fertilität und eventuell für den frühen Embryo vermuten lässt.

- Parallele Untersuchungen an humanen und bovinen Spermien legen ein universelles Muster des Nukleosomenrückhalts im Spermienchromatin nahe. So finden sich Nukleosomen vornehmlich in distalen intergenischen Bereichen des Spermien-genoms und assoziieren mit Retrotransposonelementen (LINE1, SINE) und Zentromer-spezifischen repetitiven Elementen. Im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung wurden Genpromotoren und Exone im Spermien-genom vorwiegend als Nukleosomen-arm bzw. Nukleosomen-frei vorgefunden. Von diesem Trend wichen nur wenige Genpromotoren ab (u. a. Promotoren von Genen für Faktoren der RNA- und Protein-Prozessierung), die gleichzeitig zu einer Nukleosomenanreicherung führten und CpG-hypomethyliert waren.

■ Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung der Klinischen Forschergruppe (KFO) 181 sowie bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die an den Teilprojekten beteiligt waren und somit zum Gelingen des Gesamtprojekts beigetragen haben. Die Kerngruppe der KFO 181 etablierte während der beiden Förderperioden der KFO 181 die beiden Plattformen Laser-Zell-Mikrodissektion und Epigenetik. Dies wäre nicht möglich gewesen ohne die Beschaffung eines Carl Zeiss/PALM MicroBeam durch die von Behring-Röntgen Stiftung sowie des RotorGene (Qiagen) und des Pyromark Sequenzers (Qiagen) durch die DFG.

■ Interessenkonflikt

Alle Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur:

1. Langheinrich AC, Paradowska A, Kilinski R, Kampschulte M, Steinfeld K, et al. Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: first lessons from the ApoE(-/-)/LDL receptor(-/-) double knockout mouse model. *Int J Androl* 2012; 35: 562–71.
2. Bhushan S, Tchatalbachev S, Klug J, Fijak M, Pineau C, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *J Immunol* 2008; 180: 5537–47.
3. Bhushan S, Hossain H, Lu Y, Geisler A, Tchatalbachev S, et al. Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege. *PLoS One* 2011; 6: e28452.
4. Biswas B, Bhushan S, Rajesh A, Suraj SK, Lu Y, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* [UPC] induced antimicrobial gene expression in the male reproductive tract of rat: evaluation of the potential of Defensin 21 to limit infection. *Andrology* 2015; 3: 368–75.
5. Lu Y, Bhushan S, Tchatalbachev S, Marconi M, Bergmann M, et al. Necrosis is the dominant cell death pathway in uropathogenic *Escherichia coli* elicited epididymo-orchitis and is responsible for damage of rat testis. *PLoS One* 2013; 8: e52919.
6. Wanders RJ. Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet* 2004; 126A: 355–75.
7. Powers J, Schaumburg H. The testis in adrenoleukodystrophy. *Am J Pathol* 1981; 102: 90–8.
8. Powers J. Adrenoleukodystrophy (adreno-testiculo-leukomyelo-neuropathic-complex). *Clin Neuropathol* 1985; 4: 181–99.
9. Aversa A, Palleschi S, Crucci G, Silvestroni L, Isidori A, Fabbri A. Rapid decline of fertility in a case of adrenoleukodystrophy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2474–9.
10. Brennemann W, Köhler W, Zier S, Klingmüller D. Testicular dysfunction in adrenomyeloneuropathy. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 34–9.
11. Dimmick J. Pathology of peroxisomal disorders. In: Applegarth D, Dimmick J, Hall J (eds). *Organelle diseases*. Chapman & Hall, London, 1997; 211–32.
12. Lüers GH, Thiele S, Schad A, Völkl A, Yokota S, Seitz J. Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 2006; 125: 693–703.
13. Nenicu A, Lüers GH, Kovacs W, Otte DM, Zimmer A, Bergmann M, Baumgart-Vogt E. Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* 2007; 77: 1060–72.
14. Dastig S, Nenicu A, Otte DM, Zimmer A, Seitz J, et al. Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem Cell Biol* 2011; 136: 413–25.
15. Bjorkman J, Tonks I, Maxwell MA, Paterson C, Kay GF, Crane DI. Conditional inactivation of the peroxisome biogenesis Pex13 gene by Cre-loxP excision. *Genesis* 2002; 32: 179–80.
16. Rodemer C, Thai TP, Brugger B, Kaercher T, Werner H, et al. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1881–95.
17. Zdravcevic D, Tvrdek P, Guillou H, Haslam R, Kobayashi T, et al. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res* 2011; 52: 245–55.
18. Huyghe S, Schmalbruch H, De Gendt K, Verhoeven G, Guillou F, et al. Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology* 2006; 147: 2228–36.
19. Iwasa M, Yamagata T, Mizuguchi M, Itoh M, Matsumoto A, et al. Contiguous ABCD1 DXS1357E deletion syndrome: report of an autopsy case. *Neuropathology* 2013; 33: 292–8.
20. Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *BioMol Concepts* 2016; 7: 1–15.
21. Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil Steril* 2011; 95: 2745–8.
22. Salehi M, Akbari H, Heidari MH. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* 2013; 80: 718–24.
23. Leeb C, Eresheim C, Nimpf J. Clusterin is a ligand for apolipoprotein E receptor 2 [ApoER2] and very low density lipoprotein receptor [VLDLR] and signals via the Reelin-signaling pathway. *J Biol Chem* 2014; 289: 4161–72.
24. Feng CW, Bowles J, Koopman P. Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 488–97.

25. Hentrich A, Wolter M, Szardening-Kirchner C, Lüers GH, Bergmann M, et al. Reduced numbers of Sertoli, germ, and spermatogenic stem cells in impaired spermatogenesis. *Modern Pathol* 2011; 24: 1380–9.
26. Lim J, Goriely A, Turner GD, Ewen KA, Jacobsen GK, et al. OCT2, SSSX and SAGE1 reveal the phenotypic heterogeneity of spermatocytic seminoma reflecting distinct subpopulations of spermatogonia. *J Pathol* 2011; 224: 473–83.
27. Chen YT, Chiu R, Lee P, Benek D, Jin B, Old LJ. Chromosome X-encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Hum Reprod* 2011; 26: 3232–43.
28. Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Yavetz H, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, et al. Spermatogenic proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril* 2003; 80: 1175–80.
29. Steger K, Aleithi I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 227–33.
30. Borgers M, Wolter M, Hentrich A, Bergmann M, Kliesch S, et al. Role of compensatory mechanisms in impaired spermatogenesis. *Reproduction* 2014; 148: 315–20.
31. Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Hopps CV, Greene C, et al. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2875–83.
32. Egozcue J, Sarraze Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 337–42.
33. Weedon JW, Bennett RC, Fenig DM, Lamb DJ, Lipshultz LI. Early versus late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure. *J Urol* 2011; 186: 621–6.
34. Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds) 3. ed. *Andrology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010; 155–68.
35. Hiller M, Chen X, Pringle MJ, Suchorolski M, Sancak Y, et al. Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development* 2004; 131: 5297–308.
36. Theofil I, Bartkuhn M, Hundertmark T, Boettger T, Gärtner SMK, et al. tBRD-1 selectively controls gene activity in the *Drosophila* testis and interacts with two new members of the bromodomain and extra-terminal [BET] family. *PLoS One* 2014; 9: e108267.
37. Chen X, Hiller M, Sancak Y, Fuller MT. Tissue-specific TAFs counteract polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* 2005; 310: 869–72.
38. Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *PNAS* 2003; 100: 12201–6.
39. Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 1999; 199: 471–87.
40. Pointud JC, Mengus G, Brancorsini S, Monaco L, Parvini M, et al. The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci* 2003; 116: 1847–58.
41. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIIID. *Genes Dev* 2005; 19: 794–803.
42. Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007; 134: 3507–15.
43. Zhou H, Grubisic I, Zheng K, He Y, Wang PJ, et al. Taf71 cooperates with Trif2 to regulate spermiogenesis. *PNAS* 2013; 110: 16886–91.
44. Dottermusch-Heidel C, Klaus ES, Gonzalez NH, Bhushan S, Meinhardt A, et al. H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology* 2014; 5: 655–65.
45. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 155–68.
46. Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 950–60.
47. Belkina AC, Blanton WP, Nikolajczyk BS, Denis GV. The double bromodomain protein Brd2 promotes B cell expansion and mitogenesis. *J Leukoc Biol* 2014; 95: 451–60.
48. Denis GV, McComb ME, Faller DV, Sinha A, Romesser PB, Costello CE. Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *J Proteome Res* 2006; 5: 502–11.
49. Garcia-Gutierrez P, Mundi M, Garcia-Dominguez M. Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B. *J Cell Sci* 2012; 125: 3671–80.
50. Sinha A, Faller DV, Denis GV. Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A. *Biochem J* 2005; 387: 257–69.
51. Berkovits BD, Wang L, Guarnieri P, Wolgemuth DJ. The testis-specific double bromodomain-containing protein BRDT forms a complex with multiple spliceosome components and is required for mRNA splicing and 3'-UTR truncation in round spermatids. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 7162–75.
52. Gaucher J, Boussouf R, Montellier E, Curtet S, Buchou T, et al. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012; 31: 3809–20.
53. Krumm A, Madisen L, Yang XJ, Goodman R, Nakatani Y, Groudine M. Long-distance transcriptional enhancement by the histone acetyltransferase PCAF. *PNAS* 1998; 95: 13501–6.
54. Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, et al. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 1998; 94: 35–44.
55. Wang L, Dent SYR. Functions of SAGA in development and disease. *Epigenomics* 2014; 6: 329–39.
56. Mewe M, Bauer CK, Müller D, Middendorff R. Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology* 2006; 147: 2051–62.
57. Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R. Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod* 2006; 75: 651–9.
58. Mietens A, Tasch S, Feuerstacke C, Eichner G, Volkman J, et al. Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349: 145–53.
59. Mietens A, Tasch S, Stammler A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R. Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct – effects of cGMP signaling. *PLoS One* 2014; 9: e92603.
60. Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: More than meets the eye. *Reproduction* 2013; 145: R107–16.
61. Volkman J, Müller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, et al. Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Hum Reprod* 2011; 26: 1450–61.
62. Scheil C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A. Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* 2008; 149: 1678–86.
63. Welsh M, Saunders PTK, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J* 2009; 23: 4218–30.
64. Nurmio M, Kallio J, Adam M, Mayerhofer A, Toppari J, Jahnukainen K. Peritubular myoid cells have a role in postnatal testicular growth. *Spermatogenesis* 2012; 2: 79–87.
65. Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QAT. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 2003; 125: 871–8.
66. Stammler A, Hau T, Bhushan S, Meinhardt A, Jonigk D, et al. Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Hum Reprod* 2015; 30: 1557–65.
67. Thong A, Müller D, Feuerstacke C, Mietens A, Stammler A, Middendorff R. Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells – its relevance for CNP degradation. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 234–43.
68. Müller D, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Middendorff R. Cyclic GMP signaling in rat urinary bladder, prostate, and epididymis: tissue-specific changes with aging and in response to Leydig cell depletion. *Reproduction* 2011; 142: 333–43.
69. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 2005; 37: 69–71.
70. Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* 2015; 6: 350.
71. Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009; 19: 1338–49.
72. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009; 460: 473–8.
73. Paradowska A, Miller D, Spiess AN, Vieweg M, Cerna M, et al. Genome-wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics* 2012; 7: 1057–70.
74. Vieweg M, Dvorakova-Hortova K, Dudkova B, Waliszewski P, Otte M, et al. Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 31.
75. Günther K, Paradowska-Dogan A, Bärmann B, Klein H, von Eichel-Streiber C, et al. Expression of sperm-specific protamines impairs bacterial and eukaryotic cell proliferation. *Histochem Cell Biol* 2015; 143: 599–609.
76. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 679–87.
77. Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20: 868–75.
78. Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrossi F, et al. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 1999; 112: 3537–48.
79. Govin J, Ecoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, et al. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007; 176: 283–94.
80. van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 2006; 298: 458–69.
81. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Bader JJ, Meyer RG. Alteration of poly[ADP-ribose] metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. *Chromosoma* 2013; 122: 319–35.
82. Samans B, Yang Y, Krebs S, Sarode GV, Blum H, et al. Uniformity of nucleosome preservation pattern in mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell* 2014; 30: 23–35.
83. Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang CY, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 2013; 500: 593–7.
84. Carone BR, Hung JH, Hainer SJ, Chou MT, Carone DM, et al. High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev Cell* 2014; 30: 11–22.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)