

**Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Homey**

Zur Bedeutung der Chemotaxis für die gerichtete Migration humaner Spermien

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Ulrich Peter Wehry
2021**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:
Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Arne Gerber
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jan-Steffen Krüssel

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Duan and Wehry *et al.*, CCL20-CCR6 axis directs sperm-oocyte interaction and its dysregulation correlates/associates with male infertility, *Biology of reproduction*, 2020

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Chemotaxis für die gerichtete Migration humaner Spermien untersucht. Die Interaktion zwischen Spermium und Eizelle ist bei Säugetieren ein komplexer sowie für eine erfolgreiche Fertilisation entscheidender Prozess. Neben anatomischen Leitstrukturen werden Führungsmechanismen wie Chemotaxis, Rheotaxis und Thermotaxis für eine erfolgreiche Befruchtung als entscheidend angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode von Migrationsassays etabliert, um das chemotaktische Verhalten von Spermien zu analysieren. Ferner wurden Enzym-Linked Immunosorbent Assays (ELISA), immunhistochemische Färbungen und durchflusszytometrische Analysen (FACS) durchgeführt, um die Rolle des Chemokins CCL20 und seines Rezeptors CCR6 für die Migration von humanen Spermien zu untersuchen.

In immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass humane Spermien CCR6 exprimieren und in Richtung eines CCL20-Gradienten migrieren. Bei Spermien infertiler Spender zeigte sich eine reduzierte Migration in Richtung eines CCL20-Gradienten. Nach Neutralisation des Chemokins CCL20 oder dessen Rezeptors CCR6 mithilfe von Antikörpern schwächte sich die chemotaktische Antwort der Proben gesunder Probanden ab.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die CCL20/CCR6-Achse entscheidenden Einfluss auf die Spermien-Oozyten Interaktion nimmt.

Abstract

The interaction of sperm with the oocyte is pivotal during the process of mammalian fertilization. The limited numbers of sperm that reach the fallopian tube as well as anatomic restrictions indicate that human sperm-oocyte encounter is not a matter of chance but a directed process. Chemotaxis is the proposed mechanism for re-orientating sperm towards the source of a chemoattractant, and hence to the oocyte. Chemokines represent a superfamily of small (8-11 kDa), cytokine-like proteins that have been shown to mediate chemotaxis and tissue-specific homing of leukocytes through binding to specific chemokine receptors such as CCRs. Here, we show that CCR6 is abundantly expressed on human sperm. CCL20 protein induces chemotactic responses of human sperm. Neutralization of CCL20 in ovarian follicular fluid significantly impairs sperm migratory responses. Conversely, sperm analyses of infertile men showed a decrease reaction to CCL20 chemotactic gradients. Taken together, findings of the present study suggest that CCR6-CCL20 interaction may represent an important factor in directing sperm-oocyte interaction.

Abkürzungen

A	
Abb.	Abbildung
ART	Assistierte Reproduktionstechniken
C	
Ca	Carcinoma (s. Karzinom)
Ca²⁺	Zweiwertiges Kalzium
cAMP	Cyclic AMP (s. Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CatSper	Cationic Channel of Sperm (s. kationischer Spermenkanal)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DES	Dry eye syndrom
dH₂O	Destilliertes Wasser
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser
E	
et al.	Et alii (s. und andere)
ELISA	Enzyme-linkes Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	
FACS	Fluorescence activated cell sorter (s. Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	Fetal calf serum (s. fötales Kälberserum)
FSC	Forward scatter (s. Vorwärtsstreulicht)
G	
G	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	Gonadotropin-Releasing hormon
GPCRs	G-proteingekoppelte Rezeptoren
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
H	
hFF	Humane Follikelflüssigkeit
I	

IgG	Immunglobulin G
iCGRP	Immunreactive calcitonin gene related peptide (s. immunreaktives Calcitonin-Gen-assoziiertes Peptid)
IP3	1,4,5-Triphosphat
IVF	In vitro Fertilisation
ISCI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
K	
K+	Einwertiges Kalium
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	
LEEP-CAM	Lymphocyte Endothelial Epithelial-Cell Adhesion Molecule
LPS	Lipopolysacchariden
M	
m²	Quadratmeter
mM	Millimolar
Mg	Milligramm
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
N	
Na+	Einwertiges Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
Nm	Nanometer
P	
PBS	Phosphate buffered saline (s. phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (s. Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipas C
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
P-Wert	Probability (s. Wahrscheinlichkeit)
R	
R	Rot
RPM	Rotations per minute (s. Umdrehungen pro Minute)
RU	Relative units (s. relative Einheiten)
S	
S	Sekunde
S	Schwarz
s.	Siehe
Ser	Serin
s.o.	Siehe oben
SSC	Side scatter (s. Seitwärtsstreulicht)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	
Tbl.	Tabelle
Thr	Threonin
TM	Transmembran
TSG-6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 Protein
U	
U/min	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt.....	1
1.2 Longe-range-Mechanismen	2
1.3 Short-range-Mechanismen.....	3
1.4 Chemokine.....	5
1.5 Chemokinrezeptoren.....	6
1.6 CCR6 und sein Ligand CCL20.....	7
1.7 Ziel der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Reagenzien.....	11
2.2 Chemotaxis Assay	14
2.3 Spermienpräparation.....	14
2.4 Humane Follikelflüssigkeit.....	16
2.5 Spermien Zytospin.....	17
2.6 Immunzytochemische-Färbung	17
2.7 Durchflusszytometrische Analyse	18
2.8 Migrationsassay	19
2.9 Chemokine und Inhibitoren	22
2.10 Videoanalyse.....	22
2.11 Statistik	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Chemokinrezeptorexpressionsprofil humaner Spermien.....	26
3.2 CCL20 Proteinkonzentration humaner Follikelflüssigkeit.....	30
3.3 Migrationsverhalten humaner Spermien.....	32
3.4 Analyse des Migrationsverhaltens von Spermien infertiler Spender unter Einfluss humaner Follikelflüssigkeit fertiler Spenderinnen.....	48
4 Diskussion	49
5 Literaturverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt

Während des Geschlechtsverkehrs gelangen mehr als 250 Millionen Spermien in den weiblichen Geschlechtstrakt (Barratt and Cooke, 1991, Eisenbach, 1999a). Nach der Ejakulation gelangen die Spermien zunächst in den Cervix uteri. Anschließend erreichen sie das Cavum uteri, wo sich einige Spermien im Bereich der Isthmusregion temporär an das Schleimhautepithel binden. Nach Loslösung wandern sie zum Ort der Befruchtung, der Ampulla tubae uterinae. Eine geschlechtsreife Oozyte fusioniert in der sogenannten Akrosomenreaktion mit einem Spermium. Geschlechtsreife Oozyten sind von zwei Schichten umgeben, zum einen von einer äußeren Schicht (Cumulus oophorus), die aus ca. 5000 Granulosazellen besteht und die Corona radiata bildet, zum anderen von der inneren Zona pellucida. Diese besteht aus extrazellulärer Matrix und wird von Eizelle und Granulosazellen gebildet. Spermien müssen beide Schichten penetrieren, um bis zur Eizelle zu gelangen. Nur Spermien, die eine ausreichende Motilität und Morphologie besitzen, können die Akrosomenreaktion durchführen. Bei der Akrosomenreaktion legt sich das Spermium seitlich auf Höhe der äquatorialen Ebene an die Eizelle. Es erfolgt eine Zelladhäsion. Durch Ausschüttung proteolytischer Enzyme verschmilzt die Spermienmembran in einer der Phagozytose ähnlichen Reaktion mit der Oozytenmembran (Bronson, 1998, Okabe, 2016, Primakoff and Myles, 2002).

Die Zahl der Spermien verringert sich auf dem Weg im weiblichen Genitaltrakt signifikant (Barratt and Cooke, 1991). Von den 250 Millionen Spermien gelangen lediglich einige tausend Spermien in das Cavum uteri. Diese Zahl reduziert sich im Folgenden weiter. Am Ort der Befruchtung, der Ampulla tubae uterinae, sind letztendlich „nur“ 80-1400 Spermien nachweisbar. Dies entspricht einem Anteil von 0,004% der Spermien, die während des Koitus in den weiblichen Geschlechtstrakt gelangen. Für die Reduktion der Spermienanzahl wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Selektionsmechanismen, die unter anderem in long-range- und short-range-Mechanismen unterteilt werden, beschrieben (Bahat *et al.*, 2003, Eisenbach and Giojalas, 2006, Kaupp *et al.*, 2008, Spehr *et al.*, 2004, Tamba *et al.*, 2008). Diese Mechanismen sorgen unter anderem dafür, dass bei Frauen, die kurz vor der Ovulation stehen, ein signifikant

größerer Anteil an Spermien, die die Ampulla Tuba uterinae erreichen, nachgewiesen werden konnte, als bei Frauen in anderen Zyklusphasen (Williams *et al.*, 1993). Störungen dieser Mechanismen können ursächlich für Infertilität sein. Von Infertilität wird im klinischen Alltag gesprochen, wenn nach 12 Monaten trotz ungeschützten Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt (Habbema *et al.*, 2004). Die Ursachen hierfür können vielfältig sein: So wurden z.B. anatomische bzw. genetische Anomalien oder systemische bzw. neurologische Erkrankungen als Gründe identifiziert. Des Weiteren können Infektionen, Unfälle, iatrogene oder toxische Ursachen sowie die Entwicklung von Spermien-Antikörpern zu Infertilität führen (Katz *et al.*, 2017). In den letzten Jahren gab es mehrere Studien, die vermuten lassen, dass Defekte in den Leitmechanismen von Spermien eine wichtige Rolle für Infertilität spielen könnten (Suarez and Pacey, 2006).

1.2 Longe-range-Mechanismen

Zu den longe-range-Mechanismen werden alle Mechanismen gezählt, die bis zur Ampulla tubae uterinae auf die Spermien einwirken. Im Gegensatz dazu zählen zu den short-range-Mechanismen (Kapitel 1.3) alle Mechanismen, die darauffolgen.

1.2.1 Rheotaxis

Nach der Ejakulation ist der zeitlich erste bisher bekannte „long-range“-Mechanismus die Rheotaxis. Dieser Mechanismus wurde bei Spermien in der letzten Dekade erstmalig beschrieben. Rheotaxis beschreibt die Fähigkeit von Zellen sich entlang (negative Rheotaxis) oder entgegen (positive Rheotaxis) einer Flüssigkeitsströmung zu bewegen. Während des Koitus wird mechanisch eine Strömung von Tuba uterina in Richtung Cavum uteri erzeugt. Die Spermien schwimmen entgegen dieser in Richtung der Isthmusregion. Sie sind also in der Lage mit einer rheotaktischen Antwort auf Flüssigkeitsveränderungen zu reagieren (Zhang *et al.*, 2016, Lott, 1872, Miki and Clapham, 2013).

1.2.2 Sperm-storage site

Am Isthmus angekommen binden sich die Spermien vorübergehend an das Schleimhautepithel. Es wird ein transientes Spermienreservoir (sperm-storage site) gebildet, in dem die Spermien einen Reifungsprozess, die sogenannte Kapazitation, durchlaufen (Eisenbach and Giojalas, 2006, Suarez, 2008, Suarez, 2016). Spermien durchlaufen bei der Kapazitation biochemische Umbauprozesse. Die Oberflächenproteine werden ausgetauscht und die Spermien werden hyperaktiviert. Hyperaktivierung erhöht die Frequenz des Zilienschlags, sodass die Spermien die Zona pellucida und den Cumulus oophorus penetrieren können (Suarez, 2008). Die Akrosomenreaktion kann nur durch kapazitierte Spermien durchgeführt werden (Jaiswal *et al.*, 1999, Eisenbach and Giojalas, 2006, Eisenbach, 1999a, Kaupp *et al.*, 2008). Die Kapazitation läuft nicht bei allen Spermien zeitgleich ab und hält für eine Zeitspanne zwischen 50-240 min an (Cohen-Dayag *et al.*, 1994). Nur ein kleiner Anteil von 2-14% der Spermien einer Ejakulation durchläuft diesen Reifungsprozess (Cohen-Dayag *et al.*, 1995).

1.3 Short-range-Mechanismen

Thermotaxis und Chemotaxis sind zwei wichtige short-range-Mechanismen, die in den letzten Jahren immer genauer verstanden werden (Eisenbach and Giojalas, 2006).

1.3.1 Thermotaxis

Thermotaxis ist die Fähigkeit einer Zelle ihre Geschwindigkeit sowie ihre Fortbewegungsrichtung bei Temperaturunterschieden zu ändern. Temperaturunterschiede im weiblichen Geschlechtstrakt von Säugetieren wurden erstmalig 1972 von David *et al.* bei Hasen beschrieben (David *et al.*, 1971). Humane Spermien sind in der Lage in einem Temperaturbereich von 29°-41° C auf thermotaktische Reize zu reagieren. Darüber hinaus besitzen sie die Fähigkeit schon bei relativ kleinen Temperaturunterschieden von weniger als 0,0006° C ihr Bewegungsverhalten zu ändern (Bahat *et al.*, 2012). Die Auswirkungen der temperaturabhängige Bewegungsanpassung konnte bislang nur an Vertebraten beobachtet werden. Temperaturdifferenzen im weiblichen Genitaltrakt sind

zyklusabhängig. Kurz vor der Ovulation steigt der Temperaturunterschied von der Portio vaginae zur Tuba uterina von 0,6° C auf 1,6° C an (Bahat *et al.*, 2005). Die A. uterinae und die A. ovarica werden in der Lutealphase im Vergleich zur Follikelphase unterschiedlich durchblutet (Cicinelli *et al.*, 2004). Ein solches Temperaturgefälle konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt beim Menschen nicht nachgewiesen werden.

1.3.2 Chemotaxis

Chemotaxis ist die Fähigkeit von Zellen ihre Geschwindigkeit sowie ihre Fortbewegungsrichtung bei Konzentrationsunterschieden von chemischen Stoffen, z.B. Chemokinen, zu ändern. Chemokine sind kleine Signalproteine, die bei Spermien Signalkaskaden auslösen können, an deren Ende ein intrazellulärer Ca²⁺ Einstrom steht. Die veränderten Ca²⁺ Spiegel beeinflussen den Zilienschlag des Flagellums (Böhmer *et al.*, 2005, Wood *et al.*, 2005, Shiba *et al.*, 2008, Wachten *et al.*, 2017). Bei Invertebraten sind die molekularen Mechanismen der Chemotaxis bereits gut beschrieben. Beim Seeigel *Arbacia punctulata* (A. *punctulata*) ruhen die Spermien in den Gonaden bis sie in das umgebende Wasser abgegeben werden (Judycka *et al.*, 2017, Ohtake, 1976). Die ebenfalls im Wasser befindlichen Oozyten des Seeigels exprimieren Mediatoren, die die Bewegung der Spermien beeinflussen (Matsumoto *et al.*, 2003, Guerrero *et al.*, 2010). Im menschlichen Genitaltrakt ist die einzige bekannte chemotaktisch aktive Substanz die humane Follikelflüssigkeit (hFF), die im Cumulus-Oophorus-Komplex gebildet wird (Eisenbach and Giojalas, 2006, Eisenbach and Ralt, 1992). Ihr Hauptbestandteil Progesteron aktiviert den pH-abhängigen Ca²⁺ Kanal CatSper und erzeugt so einen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Durch den Ca²⁺-Einstrom werden weitere Zellkanäle aktiviert und die Bewegungsrichtung der Spermien ändert sich (Oren-Benaroya *et al.*, 2008, Wachten *et al.*, 2017). Neben Progesteron ist das Chemokin CCL5 als wichtiger Bestandteil hFF identifiziert worden, welches eine chemotaktische Antwort bei Spermien auslöst (Barbonetti *et al.*, 2008, Isobe *et al.*, 2002, Naz and Leslie, 2000, Wachten *et al.*, 2017).

Arbeiten von Spehr *et al.* lassen vermuten, dass sich darüber hinaus weitere chemotaktisch aktive Substanzen in hFF befinden. Auf der Oberfläche von Spermien konnte der Rezeptor hOR17-4 identifiziert werden. hOR17-4 ist ein olfaktorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor. Sein Ligand, der Blumenduftstoff Bourgeonal, konnte eine chemotaktische Antwort bei Spermien auslösen. Dabei aktiviert Bourgeonal intrazellulär

eine cAMP abhängige Kaskade, an deren Ende ein Ca²⁺-Einstrom in die Zelle steht (Spehr *et al.*, 2004, Spehr *et al.*, 2003). Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass Bourgeonal keinen physiologischen Bestandteil der hFF darstellt. Bisher wurde noch kein spezifischer hOR17-4 Ligand in hFF, an der Oozyte oder an den Granulosazellen nachgewiesen, sodass die physiologische Bedeutung von hOR17-4 noch geklärt werden muss (Spehr *et al.*, 2004, Spehr *et al.*, 2003).

1.4 Chemokine

Die Superfamilie der Chemokine ist eine Familie von Proteinen, von denen beim Menschen bisher 50 Proteinen bekannt sind. Mit einer Größe von 8-14 kDa gehören sie zu den kleineren Proteinen im menschlichen Körper (Zlotnik *et al.*, 2006a).

1.4.1 Aufbau und Funktion

Die untereinander strukturverwandten Proteine bestehen aus 67-127 Aminosäuren und besitzen ähnliche Tertiärstrukturen. Die Aminosäureketten legen sich zu drei β -Faltblättern zusammen. An ihren Kohlenstoff-Rest bilden sie zusätzlich eine α -Helix (Lee *et al.*, 2013). Ihre Nomenklatur (CC, CXC, CX3C oder XC) leitet sich aus Anzahl und Position ihrer Cysteinreste ab. Ihre Rezeptoren, mit einem R gekennzeichnet, sind im Gegensatz dazu nach der Chronologie ihrer Entdeckung benannt (Zlotnik *et al.*, 2006). Chemokine werden intrazellulär gebildet und in den extrazellulären Raum sezerniert. Sie binden an Glykosaminoglykane der Extrazellulärmatrix oder an Zelloberflächen. Dies führt zur Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten (Lee *et al.*, 2013).

Ihre immunologischen Effekte beruhen auf der Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen, der Homöostase dieser im Gewebe sowie der Migration von Lymphozyten zum Ort der Entzündung. Ihren migratorischen Eigenschaften verdanken sie ihren Namen Chemokine (von „*chemotactic cytokines*“) (Ranasinghe and Eri, 2018, Griffith *et al.*, 2014, Strieter, 2003).

Einige der 50 bekannten Chemokine können an mehrere Rezeptoren binden. Andere hingegen haben einen exklusiven Liganden (Lee *et al.*, 2013). Die Heterogenität in der Rezeptor-Liganden-Beziehung erschwert die Erforschung der Funktionen und der

Aufgaben von Chemokinen sowie deren Zusammenhang mit Erkrankungen (Ranasinghe and Eri, 2018).

1.5 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptors; GPCRs). Sie ist mit mehr als 800 bekannten Mitgliedern eine der größten Protein-Superfamilien. G-Protein steht verkürzt für Guanosintriphosphat(GTP)-bindendes Protein (Lee *et al.*, 2013). G-Proteine bestehen immer aus 7 Transmembran (TM)-Untereinheiten. Ein weiteres Synonym für GPCRs ist daher heptahelikale Rezeptoren (Fredriksson *et al.*, 2003, Lagerstrom and Schioth, 2008). Nach ihrer Erstentdeckung wurden die Namen 7TM Rezeptoren, heptahelikale Rezeptoren und GPCRs lange Zeit synonym verwendet. In den letzten Jahren wurden allerdings 7TM Rezeptoren entdeckt, die G-Protein unabhängige Signalkaskaden bedienen (Alexander *et al.*, 2011).

Rezeptoren aus der Familie der GPCRs sind unter anderem die sogenannten Chemokinrezeptoren. Diese können zu einer gerichteten Migration von Zellen führen und sind für die Zell-zu-Zell-Kommunikation wichtig. Sie sind auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Bisher wurden beim Menschen 20 verschiedene Chemokin-Rezeptoren entdeckt (Zlotnik *et al.*, 2006b).

1.5.1 Aufbau und Funktion von Chemokin-Rezeptoren

Jede Transmembrandomäne besteht aus 20-24 hydrophoben Aminosäuren, die jeweils zu einer α -Helix angeordnet sind. Die N-Terminale-Region des Proteins liegt immer extrazellulär und der Carboxy-Terminus (C-Terminus) intrazellulär (Fredriksson *et al.*, 2003, Lagerstrom and Schioth, 2008). Die Anordnung ihrer Aminosäure-Sequenzen erlaubt die Einteilung der GPCRs in mehrere strukturelle Klassen (Rhodopsin, Secretin, Glutamat, Adhaesion und Frizzled). Des Weiteren lassen sich funktionell stimulierende (Gs), inhibierende (Gi) und Proteinkinase-C-aktivierende (Gq) GPCR unterscheiden (Lu *et al.*, 2018).

Nach der GPCR-Aktivierung werden bestimmte Serin- (Ser) und Threonin- (Thr) Reste phosphoryliert. Dies geschieht entweder an einer intrazellulären Rezeptorschleife, am

C-Terminus durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase (GRK), an Second Messenger Kinasen wie z.B. Proteinkinase A (PKA) oder an der Proteinkinase C (PKC). Diese phosphorylierten intrazellulären Domänen rekrutieren danach β -Arrestine (β -Arrestin1 und/oder β -Arrestin 2). Die heterotrimeren G-Proteine werden vom Rezeptor entkoppelt und die Rezeptorinternalisierung und Desensibilisierung initiiert. Das heterotrimere G-Protein ist aus einer α -, β - und γ -Untereinheit aufgebaut. Für die Signaltransduktion ist zum einen die α -Untereinheit und zum anderen die $\beta\gamma$ -Untereinheiten als Paar verantwortlich. Dabei beeinflussen verschiedene Faktoren, wie z.B. der Ligand oder die Phosphorylierungsposition, ob die α -Untereinheit oder die $\beta\gamma$ -Untereinheiten für die weitere Signaltransduktion verantwortlich ist (Lefkowitz and Shenoy, 2005, Luttrell and Lefkowitz, 2002, Pierce *et al.*, 2002).

1.6 CCR6 und sein Ligand CCL20

Der Rezeptor CCR6 gehört der Superfamilie der GPCRs an und besitzt in der Literatur einige Synonyme (DCR2, DRY6, BN-1, CCR-6, CMKBR6, GPRCY4, STRL22, CD196, CKRL3, GPR29, CKR-L3, CC-CKR-6 or C-C CKR-6) (Ranasinghe and Eri, 2018). Der Ligand CCL20 besitzt ebenfalls mehrere Synonyme [macrophage inflammatory protein (MIP3 α), Exodus-1 and liver and activation regulated chemokine (LARC)] (Lee *et al.*, 2013). Diese Vielzahl an Namen, die in der Vergangenheit für den Rezeptor CCR6 sowie dessen Liganden CCL20 entstanden sind, spiegelt die Vielzahl an Funktionen und Signalwegen wieder, in die die CCL20/CCR6-Achse eingreift (Lee *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinrezeptoren, die mehrere Liganden besitzen, hat CCR6 einen exklusiven Liganden: das Chemokin CCL20. Umgekehrt bindet CCL20 lediglich an CCR6 (Lee *et al.*, 2013). Beta-Defensine und CCL18 werden allerdings in der Literatur noch als mögliche CCR6 Liganden diskutiert (Lafferty *et al.*, 2017, Zissel *et al.*, 2011).

CCR6 und CCL20 wurden in multiplen Geweben insbesondere im Appendix vermiformis, in der Milz, in den Lymphknoten und in der Pankreas nachgewiesen. Geringe Expressionsraten konnten im Dünndarm und in der fetalen Leber gezeigt werden (Ranasinghe and Eri, 2018).

CCR6 befindet sich ebenfalls auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wie zum Beispiel B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen (Sallusto and Baggiolini,

2008). Das dazu komplementäre CCL20 wird durch Immunzellen (Neutrophile Granulozyten, Th17-Zellen, TREG Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen sowie Langerhanszellen) und Endothelzellen gebildet (Nandi *et al.*, 2014) und leitet unter anderem PBMCs, insbesondere Th17-Zellen, zum Ort der Entzündung (Lee *et al.*, 2013).

Nach Bindung des Liganden CCL20 wird der intrazelluläre C-Terminus durch Austausch eines Guanosindiphosphat (GDP) durch ein GTP phosphorisiert und die Signalkaskaden in Gang gesetzt. Das G-Protein dissoziiert in eine α -Untereinheit und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die membrangebundene $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Phospholipase C (PLC). PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-trisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3). PIP3 wird in einem nächsten Schritt zu Inositoltrisphosphat (IP3) umgewandelt. Die PLC aktiviert zeitgleich das Diacylglycerol (DAG). Beide (IP3 und DAG) fungieren als sogenannte Second-Messenger. IP3 mobilisiert Kalzium-Ionen aus intrazellulären Depots wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum. DAG aktiviert gemeinsam mit den nun freigesetzten Kalzium-Ionen verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (Lu *et al.*, 2018, Ranasinghe and Eri, 2018). Die aktivierte PKC und einige Kalzium-abhängige Proteine katalysieren weitere enzymatische Vorgänge wie z.B. die Aktinpolymerisation, an deren Ende u.a. eine Zellmigration steht (Busillo *et al.*, 2010, Cheng *et al.*, 2000, Lefkowitz and Shenoy, 2005, Lu *et al.*, 2018).

Die Phosphorylierung an verschiedenen Stellen des C-Terminus der G-Proteins reguliert, welche weiteren Enzyme aktiviert werden. Die assoziierten Effekten werden durch unterschiedlich starke Rekrutierung der Proteine β -Arrestin1 und β -Arrestin2 reguliert. Der Chemokinrezeptor CCR6 kann hierdurch zum Teil entgegenwirkende Signalkaskaden im menschlichen Körper auslösen (Lu *et al.*, 2018, Ranasinghe and Eri, 2018, Strieter, 2003). Über diesen Mechanismus lassen sich die opponierenden pro- und antiinflammatorische Signalkaskade der CCL20/CCR6-Achse erklären. Sie nimmt eine entscheidende Rolle für die Homöostase von Entzündungsreaktionen ein (Lee *et al.*, 2013, Lu *et al.*, 2018).

1.6.1 Die Rolle von CCL20 bei der Aktivierung von TREG- und Th17- Zellen

Neben der Zellmigration von Lymphozyten zum Ort der Entzündung nimmt die CCR6/CCL20-Achse ebenfalls Einfluss auf die Differenzierung von naiven T-Helferzellen in die beiden Subgruppen Th17- und TREG-Zellen. Beiden Subgruppen werden bei Entzündungen und Inflammationen entgegengesetzte Aufgaben zugeschrieben (Lee *et al.*, 2013). TREG-Zellen unterdrücken die Proliferation von proinflammatorischen T-Zellen, Th17-Zellen verstärken Entzündungsreaktionen (Elgueta *et al.*, 2015).

Naive T-Helferzellen ruhen in Lymphknoten. Ihre Differenzierung wird unter anderem von der Zytokinumgebung und den Oberflächenrezeptoren gesteuert. Für die Differenzierung von Th17-Zellen und TREG-Zellen aus naiven T-Helferzellen ist die Hochregulierung von CCR6 auf ihrer Oberfläche und das Vorhandensein von CCL20 obligat (Wiede *et al.*, 2013). CCL20 wird von Lymphozyten nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen wie z.B. Lipopolysacchariden (LPS) oder den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IFN- γ und IL-1 β vermehrt gebildet. Aktivierte Th17-Zellen exprimieren ebenfalls CCL20. Dies deutet daraufhin, dass Th17-Zellen autokrin bzw. parakrin im Sinne einer positiven Feedbackschleife aktiviert werden. Das antiinflammatorische Il-10 unterdrückt die Bildung von CCL20 und induziert gleichzeitig die Entwicklung von TREG-Zellen (Luegering *et al.*, 2003, Strieter, 2003).

Im Mausmodell führte eine unterdrückte CCL20/CCR6-Achse zur Entwicklung von starken gastrointestinalen Entzündungen. Die proinflammatorische Th1/Th17-Achse gewann Überhand. Die CCR6-Expression scheint bei TREG-Zellen von größerer Bedeutung als in Th17-Zellpopulationen zu sein. Die typische Homöostase des Immunsystems gerät ins Ungleichgewicht. Es kommt zur Entwicklung eines ungünstigen Immunitätszustands, der in verschiedene Krankheiten, wie z.B. chronische Lebererkrankungen, chronische entzündliche Darmerkrankungen oder atopischer Dermatitis, mündet (Lee *et al.*, 2013, Dellacasagrande *et al.*, 2003, Lefkowitz and Shenoy, 2005, Brand *et al.*, 2006, Facco *et al.*, 2007, Rafaels *et al.*, 2009, Chung and Lan, 2011, Ito *et al.*, 2011, Welsh-Bacic *et al.*, 2011, Dohlman *et al.*, 2013, Hammerich *et al.*, 2014, Ransohoff and Trettel, 2015, Hedrick *et al.*, 2010, Burke *et al.*, 2015, Lee and Korner, 2017).

1.7 Ziel der Arbeit

Im menschlichen Körper nehmen Chemokine eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen ein. Leukozyten migrieren einem chemotaktischen Gradienten folgend zum Ort der Entzündung (Strieter, 2003). In den letzten Jahren konnte die Schlüsselrolle von Chemokinen bei Entzündungen und Autoimmunerkrankungen immer weiter aufgeschlüsselt werden (Ranasinghe and Eri, 2018, Muller *et al.*, 2001). In früheren Arbeiten konnte mithilfe von indirekter Immunfluoreszenz und durchflusszytometrischen Untersuchungen gezeigt werden, dass CCR6 bei humanen Spermien in der Schwanzregion sowie bei einigen Spermien in der post-Akrosomenregion lokalisiert ist (Caballero-Campo *et al.*, 2014, Zigmond, 1977). Des Weiteren sind in immunhistochemischen Färbungen von testikulären Gewebe bei Männern mit chronischer Nebenhodenentzündung CCL20 vermehrt und CCR6 vermindert exprimiert (Duan *et al.*, 2020).

Bisher ist noch nicht geklärt, welche Rolle Chemokine bei der Entwicklung von Infertilität einnehmen. Daher war das Ziel dieser Arbeit zum einen tiefergehende Einblicke in die Rolle der CCR6/CCL20-Achse für die Migration von humanen Spermien zu erhalten, sowie zum anderen den Einfluss der CCR6/CCL20-Achse auf die Fertilität bei chronischer Nebenhodenentzündung zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Die Expressionsmuster von CCR6 und CCL20 im humanen Reproduktionssystem wurden auf Gen- und Proteinebene untersucht.

Zur Untersuchung der Chemotaxis von humanen Spermien, einer gerichteten Migration von Spermien entlang unterschiedlicher chemotaktischer Gradienten, wurde ein videomikroskopischer Chemotaxis-Assay etabliert. Des Weiteren wurden diese Assays nach Neutralisation von CCL20 mittels CCL20-Antikörper oder einer Vorinkubation der Spermien mittels Anti-CCR6-Antikörper wiederholt. Ebenfalls wurden die chemotaktischen Antworten von Spermien subfertiler Spender analysiert.

2.1 Reagenzien

Phosphate buffered saline (PBS),1x	136,89 mM NaCl	PAA, Pasching, Österreich
	2,68 mM KCl	
	5,62 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O	
	1,1 mM NaH₂PO₄ x H₂O	
	1,47 mM KH₂PO₄	
	ad 1000 ml ddH₂O	pH 7.4
ELISA	CCL20	Human CCL20/MIP-3 alpha Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis, USA
Isotypkontrolle	Anti-Rabbit-Immunglobulin (IgG) Chrom pure	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Primärantikörper	CCR6	Monoclonal Mouse IgG2B R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR1	Monoclonal Mouse IgG2B

		R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR2	Monoclonal Mouse IgG2B R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR3	Monoclonal Rat IgG2A R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR5	Monoclonal Mouse IgG2B R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR7	Monoclonal Mouse IgG2A R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR9	Monoclonal Mouse IgG2A R&D Systems, Minneapolis, USA
	CXCR3	Monoclonal Mouse IgG1 R&D Systems, Minneapolis, USA
	CXCR5	Monoclonal Mouse IgG2B R&D Systems, Minneapolis, USA
	CXCR6	Monoclonal Mouse IgG2B R&D Systems, Minneapolis, USA
	CCR4	Mouse C57BL/6 IgG1 BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	CCR6	Mouse IgG1 BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	CXCR1	Mouse IgG2b BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	CXCR2	Mouse IgG1

		BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	CCR10	clone 1908 DNAX; Research institute, Palo Alto, CA, USA
	CCR8	goat IgG Alexis Biochemicals, Lausanne, Schweiz
Sekundärantikörper	NL557	Donkey anti-rabbit-IgG, R&D Systems, Minneapolis, USA

Tbl. 1: Liste der verwendeten Puffer und Reagenzien.

2.2 Chemotaxis Assay

2.2.1 Ejakulate

Die frischen Ejakulate stammten von gesunden, jungen Spendern im Alter von 20-40 Jahren (n=5). Des Weiteren wurden kryokonservierte Proben von infertilen Patienten (n=3) der andrologischen Abteilung des Universitätsklinikums Bonn (Studiennummer 356/16) verwendet. Die Spender wurden zuvor über die wissenschaftliche Nutzung ihrer Proben aufgeklärt. Die Proben wurden nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer 2265; Datum - Ethikvotum 24. November 2003) gewonnen.

2.3 Spermienpräparation

2.3.1 Zellseparation

Vor der Migrationsuntersuchung wurden die Spermienproben auf Körpertemperatur vorinkubiert (37° C, 6% CO₂) (HERA Cell, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland). Anschließend wurden die motilen, gesunden Zellen von immotilen Zellen und anderen Bestandteilen des Seminalplasmas mithilfe eines *Swim ups* voneinander getrennt (Oettle and Wiswedel, 1989, Jameel, 2008). Als Separationsmedium wurde Spermiumnährmedium (Sperm Preparation Medium, MediCult, Jyllinge, Dänemark) in einer 1:2-Verdünnung verwendet. Zuvor wurde das Medium auf Körpertemperatur vorgewärmt (37° C, 6% CO₂).

Für das *Swim up* wurden die aufgereinigten Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1500 U/min zentrifugiert (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Dann wurde das Pellet in 1 ml Nährmedium für 60 Minuten inkubiert (37° C, 6% CO₂). Im weiteren Verlauf der Experimente wurde ausschließlich der Überstand mit den beweglichen Spermien verwendet. Das Pellet mit den immotilen Spermien wurde verworfen.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der Proben

Die Spermien wurden in einer Neubauer-Zählkammer (Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezählt (Sukcharoen *et al.*, 1994). Dazu wurden die Zellen 1:10 mit Paraformaldehyd (0,4%, ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, USA.) fixiert und mit Trypanblau (0,4%, ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, USA) gefärbt. Zur Konzentrationsbestimmung der Zellen wurde die ermittelte Zellzahl mit 10×10^4 multipliziert. Für die Migrationsassays wurden die Proben mithilfe des Spermiumnährmediums auf eine Konzentration von 2-4 Millionen Zellen pro 1 ml verdünnt.

2.3.3 Bestimmung der CCL20-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von CCL20 in der nativen und aufgereinigten hFF erfolgte mithilfe eines Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA). Beim Sandwich-ELISA wird das Antigen von zwei Antikörpern gleichzeitig erkannt. Nach Zugabe von hFF erfolgte die Bindung des Antigens (in diesem Fall CCL20) an den mononukleären CCL20-Antikörper (Coating-AK) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Im nächsten Schritt wurde die Mikrotiterplatte gewaschen, um alle nicht-gebundenen hFF-Bestandteile zu entfernen. Im Anschluss wurde der zweite Antikörper (Capture-AK) hinzugegeben, der an eine andere Position des Antigen bindet. Es kommt zur Ausbildung eines AK-Antigen-AK-Komplex (Sandwich). Nach dem Waschen des Wells wurden die am Capture-AK bindenden chromogenen Substanzen Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin hinzugefügt, um die Reaktion durch einen Farbumschlag sichtbar zu machen. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Antigens (hier: CCL20). Die Auswertung der Farbentwicklung erfolgt durch Messung der Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm. Rekombinantes CCL20 Protein (R&D Systems, Minneapolis, USA) wurde für die Erstellung einer Standardkurve verwendet.

2.4 Humane Follikelflüssigkeit

Die hFF wurden in Kooperation mit der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Düsseldorf, von gesunden Probandinnen im gebärfähigen Alter gewonnen. Die Spenden erfolgten freiwillig und anonymisiert. In unseren Versuchen wurde die hFF zum einen nativ verwendet. Zum anderen wurde die hFF nach Trennung von positiv geladenen Proteinen mittels Heparin-Chromatographie [Heparin-Affinitätschromatographiesäule (HiTrap™ Heparin HP column 1ml, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)] verwendet.

2.4.1 Aufreinigung der Follikelflüssigkeit

Die hFF wurde mithilfe von Affinitätschromatographie (HiTrap™ Heparin HP column 1ml, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in einer 1 ml messenden Säule von positiv geladenen Teilchen getrennt. Als stationäre Phase kam hierbei Heparin zum Einsatz. Das heißt, dass die Heparin-Affinitäts-Chromatographie-Säule von innen mit negativen Heparinmolekülen beschichtet war. Da Heparin ausschließlich an positiv geladene Teilchen bindet, wurden positiv geladene Teile aus der hFF gefiltert (Stevic *et al.*, 2011). Die native hFF wurde für 10 Minuten bei 800 g und 20° C zentrifugiert, um Zellbestandteile von der restlichen hFF zu trennen. In einem zweiten Schritt wurde die hFF für 30 Minuten bei 13000 g und 4° C zentrifugiert. Hierbei wurden weitere nicht lösliche Bestandteile als Pellet von der restlichen hFF getrennt. Der Überstand wurde für die Affinitätschromatographie verwendet.

Die Heparinsäule musste vor der Chromatographie zunächst equilibriert werden. Hierfür wurden diese mit dem zehnfachen Säulenvolumen eines Waschpuffer (50 mM Tris-HCL; 50 mM NaCl; pH 7,4) durchspült. Die hFF wurde im Verhältnis 2:1 mit dem Waschpuffer (50 mM Tris-HCL; 50 mM NaCl; pH 7,4) verdünnt. Anschließend wurde die hFF mit einer Flussrate von 1 ml/min durch die Säule gedrückt. Nachdem die hFF die Säule durchflossen hatte wurde diese wieder, wie im ersten Schritt mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Waschpuffer gewaschen. Die in der Säule am Heparin gebundenen Proteine wurden mit einem Elutionspuffer (50 mM Tris-HCL; 2 M NaCl; pH 7,4) gelöst. Die Säule wurde zur Lagerung mit 20% Ethanol gewaschen. Dieses wurde vor jeder Benutzung der Säulen mit einem Bindungspuffer (10 mM Na₃PO₄ pH: 7,0) herausgewaschen.

2.5 Spermien Zytospin

Für die Zytospins wurden 200.000 der unter 2.3 beschriebenen aufgereinigte Spermien verwendet. Zytospins wurden mithilfe von Zytospin-Sets (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) nach Standardprotokoll erzeugt. Im Anschluss wurden diese zentrifugiert [3 min, 1180 U/min, 4° C (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen Bäch, Schweiz)] und auf einen beschichteten Objektträger (HistoBond® Objektträger, P. Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen) aufgetragen. Die Zentrifugierhilfe wurde entfernt und die Präparate wurden nach weiterer Zentrifugation (1 min, 1180 U/min, 4° C) luftgetrocknet. Nach Lagerung bei -80° C konnten die Präparate für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden.

2.6 Immunzytochemische-Färbung

Bei der immunzytochemischen Färbung werden bestimmte Proteinbestandteile von Zellen dargestellt (Lottspeich, 2012). Für die Färbungen der Spermien wurden monoklonale anti-human CCR6-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit einer Konzentration von 25 µg/ml verwendet. Als Isotypkontrolle diente der passende Anti-Rabbit-IgG (Chrom Pure, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in einer Konzentration von 25 µg/ml. Die Färbungen wurden wie folgt nach Standardprotokoll durchgeführt: Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blocken, wurden die Proben mit H₂O₂ für 15 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten mit PBS gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden die Proben zunächst mit einer Avidin D Lösung für 15 Minuten inkubiert, um die Biotinbindestellen zu blockieren. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Proben im Anschluss mit einer Biotinlösung inkubiert, um die Avidin Bindungsstellen zu blockieren (Avidin/Biotin Blocking Kit; Vector laboratory; CA, USA). Hiernach wurden die Anti-human CCR6-Primär-Antikörper beziehungsweise die Isotyp-Kontroll-Antikörper hinzugefügt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Proben wurden für 30 Minuten mit 3-amino-9-Ethylkarbazol eingedeckt (AEC-Kits, DAKO, Glostrup, Dänemark) und im Anschluss mit PBS zweimal für je 5 Minuten gewaschen. Hierauf erfolgte die Hinzugabe grünfluoreszierender Sekundärantikörper (mouse anti-Rabbit IgG-CFL 488, Santa Cruz Biotechnology, Dalls, Texas, USA) mit einer Endkonzentration von 4 µg/ml. Nach einer

45-minütigen Inkubation des Sekundärantikörpers wurden die Spermien mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Kernfärbung (DAPI, dilactate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA; Endkonzentration von 3 µg/ml) sowie Phalloidin (Phalloidin Conjugate, Promo-Fluor-488 Premium, Promo Kine, Heidelberg, Deutschland; Endkonzentration von 4,1 µg/ml) zur Darstellung des Zytoskeletts gefärbt. Nach abschließender Inkubation (20 Minuten) wurden die Objektträger mittels Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) eingedeckt und über Nacht in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fluoreszenzbilder wurden am nächsten Tag mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Jena, Deutschland) und der Axiovision 4.7 Software (Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt.

2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein laborchemisches Verfahren, welches die Differenzierung von Zellen erlaubt. Zellen, die an einem Lichtstrahl vorbeifließen, streuen einen Teil des Lichtes als optische Signale. Diese können mithilfe sogenannter Photomultipliern detektiert und nach Größe und Morphe der jeweiligen Zelle analysiert werden (Lottspeich, 2012). Bei der Auswertung unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) als Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel zur Zelle vom Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC). Das FSC hängt vom Zellvolumen ab. Das SSC ist sowohl von Granularität als auch Größe und Struktur des Zellkerns abhängig. Mithilfe von fluoreszenzaktivierten Zellsortierern (FACS, *fluorescence activated cell sorter*) können ebenfalls Fluoreszenzfarben erkannt werden. Desoxyribonukleinsäure-interkalierende Farbstoffe, zum Beispiel DAPI, sowie fluoreszenzmarkierte Antikörper werden hierzu verwendet.

Um das Expressionsmuster von CCRs zu bestimmen, wurden die Spermien von 26 Donoren mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Zur Kontrolle wurden jeweils Isotypkontrollen unter gleichen Bedingungen erstellt. Die Spermien wurden mithilfe des FACScalibur Flowcytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) und der CellQuest Software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) analysiert. Die Spermien wurden mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und mit Hilfe von humanem Serum (AB-Humanserum, steril, Dynal Biotech, WI, USA) unspezifische Bindestellen geblockt. Die Proben wurden nach 10-minütiger Inkubation zentrifugiert

(1500 U/min, 10 Minuten, RT; Hettich 1302 mit Rotor #1323, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) und in PBS aufgelöst. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Primärantikörper CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CCR, CCR9, CXCR3, CXCR5, CXCR6 (R&D Systems, Minneapolis, USA), CCR4, CCR6, CXCR1, CXCR2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) und CCR10 (DNAX; Research institute, Palo Alto, CA, USA) sowie CCR8 (210-762-R100, goat IgG, Alexis Biochemicals, Lausanne, Schweiz) nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Chrom Pure, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) sowie ein Anti-Goat-IgG-Antikörper (Caltag, Burlingame, CA, USA), die in derselben Konzentration wie die Primärantikörper eingesetzt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen im Dunkeln bei 4° C für 45 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mithilfe von PBS gewaschen, abzentrifugiert und wieder in PBS resuspendiert. Als Sekundärantikörper wurde NL557 (Donkey anti-Rabbit-IgG, R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt und 15 Minuten im Dunkeln bei 4° C inkubiert. Abschließend wurden die Spermien erneut mit PBS gewaschen und mit 250 µg Paraformaldehyd (1 %) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) fixiert. Es wurden 50.000 Ereignisse erfasst und grafisch dargestellt. Bei der Erstellung des Expressionsprofils wurden 5 Millionen aufgereinigte Spermien verwendet.

2.8 Migrationsassay

2.8.1 Aufbau

Für den Migrationsassay wurde ein neuer Versuchsaufbau konstruiert (Abbildung 1). Es wurden jeweils 250 µl Spermienlösung in eine Petrischale überführt. Während der Versuche wurde die Petrischale auf 37° C beheizt. Eine nicht-heparinisierte Kapillare (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, USA) wurde vollständig mit den zu untersuchenden Substanzen gefüllt. Das von der Petrischale abstehende Ende der Kapillare wurde mit Wachs verschlossen, um Kapillarkräfte zu minimieren. Das offene Ende wurde in die Lösung geführt. Die Kapillare wurde am Rand der Petrischale ebenfalls mit Wachs befestigt, damit diese nicht verrutscht. Es entstand, ausgehend vom offenen Ende der Kapillare, ein Konzentrationsgradient. Die Bewegung der Spermien wurde mit einem inversen Mikroskop (Olympus CK40, Olympus, Hamburg, Germany) mit

angeschlossener Kamera (Time-lapse-Video-Mikroskopie-System) und der AcioVision 4.1 Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) dokumentiert. Das Gesichtsfeld des Mikroskops wurde so eingestellt, dass es sich parallel zum offenen, in der Lösung liegenden Ende der Kapillare befand. Die Spermienmigration wurde jeweils für einen Zeitraum von 5 Minuten dokumentiert.

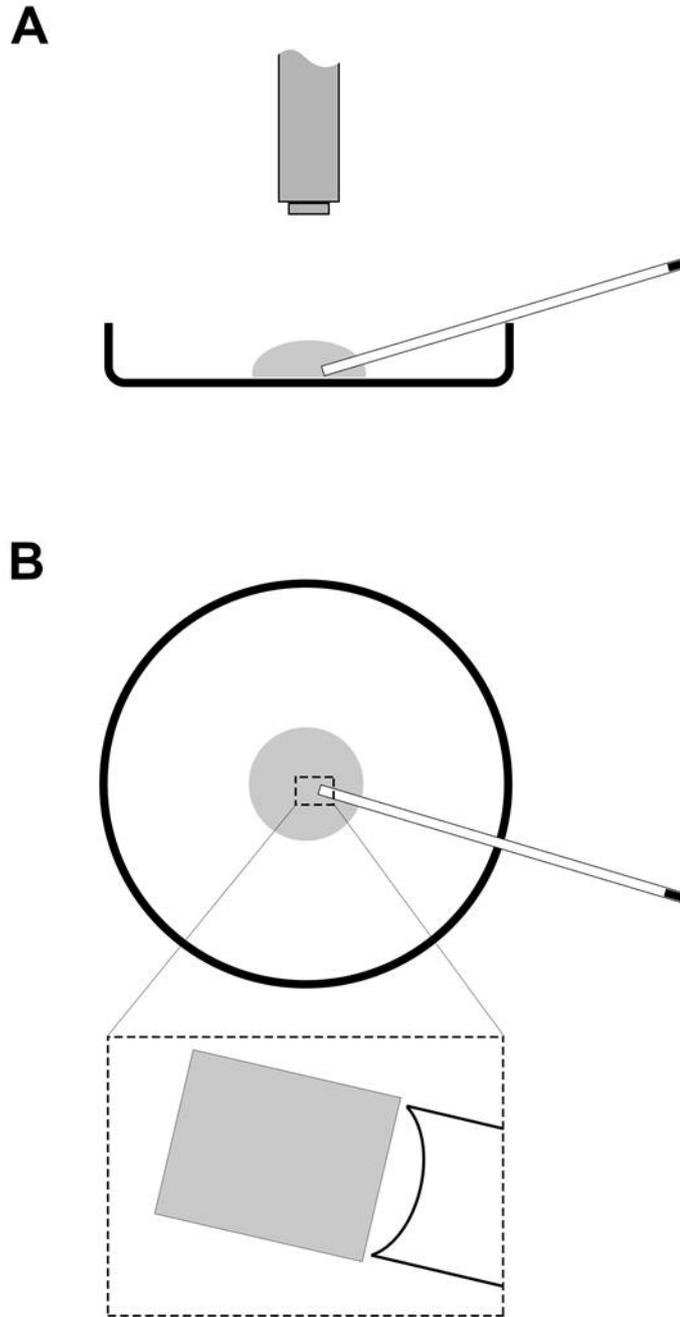


Abb. 1: Versuchsaufbau der Migrationsassays. (A) Seitliche Ansicht des Versuchs. (B) Vogelperspektive aus Sicht des Objektivs. In einer Petrischale befindet sich ein Tropfen mit 250 μg Spermienlösung. Die zu untersuchende Substanz befindet sich in der Kapillare. Das Objektiv befindet sich über der Petrischale (A). Der Tropfen findet sich zentral in der Petrischale (B – oben). Das Gesichtsfeld des Mikroskops ist grau hinterlegt. Die Kapillare befindet sich 0,2 μm rechts vom Gesichtsfeld (B - unten).

2.9 Chemokine und Inhibitoren

Bei jeder Versuchsreihe wurden die Kapillaren zunächst mit dem Spermiumnährmedium (Sperm Preparation Medium, MediCult, Jyllinge, Dänemark) als Mediumkontrolle befüllt. Als Positivkontrolle wurde hFF verwendet. Es konnte demonstriert werden, dass der CCL21 Rezeptor CCR7 nur in geringen Maßen von Spermien exprimiert wird. Rekombinantes humanes CCL21 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurde daher als Negativkontrolle verwendet. Rekombinantes humanes CCL20 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml) genutzt. Bei einer CCL20 Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich die stärkste chemotaktische Antwort, sodass für die folgenden Versuche diese Konzentration verwendet wurde. Um zu beweisen, dass die CCR6/CCL20-Achse für eine regelhafte chemotaktische Antwort von Spermien wichtig ist, erfolgten Versuchsreihen mit folgenden Modalitäten:

1. CCL20 Protein (100 ng/ml) zusammen mit neutralisierenden Anti-CCL20-Antikörpern (100 ng/ml) in der Kapillare.
2. Vorinkubation der Spermienlösung mit Anti-CCR6-Antikörpern (100 ng/ml) für eine Stunde zur Blockade der Rezeptoren und CCL20 Protein (100 ng/ml) in der Kapillare.
3. Die durch Heparin aufgereinigte hFF in der Kapillare.

Alle drei genannten Substrate wurden vor Befüllung der Kapillaren eine Stunde bei Körpertemperatur vorinkubiert (37° C, 6% CO₂) (HERA Cell, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland). Jede genannte Modalität wurde mit 3-5 biologischen Probanden und stets mit zwei technischen Replikaten durchgeführt.

2.10 Videoanalyse

Bei jeder Versuchsbedingung wurden Filmsequenzen von 30 Sekunden jeweils 1 Minute und 4 Minuten nach Versuchsbeginn aufgenommen. Die kurzen Filmsequenzen wurden mithilfe des Programmes Virtual Dub.1.7.8 Software (Avery Lee) standardisiert in

Bildserien geschnitten. Die Analyse der Spermiumbewegung erfolgte mithilfe des Programmes Image J 1.37c Software (Bethesda, MD, USA).

Die von den Spermien zurückgelegten Strecken wurden in ein X-Y-Koordinatensystem projiziert. Dabei wurden die Startpunkte jeder einzelnen Bewegung in den Nullpunkt des jeweiligen Koordinatensystems gelegt. Hierbei definiert die X-Achse die Richtung des Gradienten. In allen Versuchsreihen wurden die Mittelwerte zwischen den Endpunkten, Δx , berechnet. Eine Migration in Richtung des Gradienten wird als positive Bewegung auf der X-Achse angezeigt. Erfolgt keine chemotaktische Antwort auf den Gradienten liegt die durchschnittliche Migrationsstrecke bei null. Die Auswertung erfolgte mittels der von Fabro und Mitarbeitern publizierten Formeln zur Bestimmung der gerichteten Zellmigration (Fabro *et al.*, 2002):

1. Ungerichtete Migration: Relativer Anteil der Zellen, die sich in Richtung der Kapillare ($\Delta x > 0$) bewegten. Zu jedem Zeitpunkt wurden lediglich die Spermien betrachtet, die sich entlang der positiven X-Achse entlang des Gradienten bewegen. Zellen, die entlang der negativen X-Achse migrieren, werden hierbei nicht berücksichtigt. Löst der in der Kapillare befindliche Stoff eine chemotaktische Antwort aus, migrieren $>50\%$ der Zellen in Richtung der Kapillare. Ohne chemotaktischen Reiz liegt der relative Anteil dementsprechend bei 50% ; es wird von einem zufälligen Bewegungsverhalten gesprochen (Abb. 2) (Fabro *et al.*, 2002). Die Berechnungen erfolgten zu zwei Zeitpunkten (1 Minute und 4 Minuten nach Versuchsbeginn). Zusätzlich wurden beide Zeitpunkte zusammenfassend dargestellt.
2. Gerichtete Migration: Relativer Anteil der Zellen, die sich in Richtung des Gradienten und stärker in Richtung der Kapillare als orthogonal zur X-Achse bewegen ($\Delta x > 0/|\Delta y| > 1$). Lediglich Zellen, die sich in einem 45° Winkel in Richtung der positiven X-Achse ausgehend vom Nullpunkt des Koordinatensystems bewegen, werden bei dieser Berechnung mit einbezogen. Löst der in der Kapillare befindliche Stoff eine chemotaktische Antwort aus, migrieren $>25\%$ gerichtet in Richtung der Kapillare. Ohne chemotaktischen Reiz liegt der Anteil dementsprechend bei 25% (Abb. 2). Die Berechnungen erfolgten ebenfalls 1 Minute und 4 Minuten nach Versuchsbeginn. Zusätzlich wurden beide Zeitpunkte zusammenfassend dargestellt.

Mit dem Programm Chemotaxis (Ibidi GmbH, Gräfelfing Germany) wurden die Strecken Δx und Δy für die o.g. Formeln errechnet. Mithilfe dieses Programmes wurden ebenfalls Rosendiagramme für die einzelnen Bedingungen und zum anderen grafische Darstellungen der Migrationstrajektoren der Zellen erstellt.

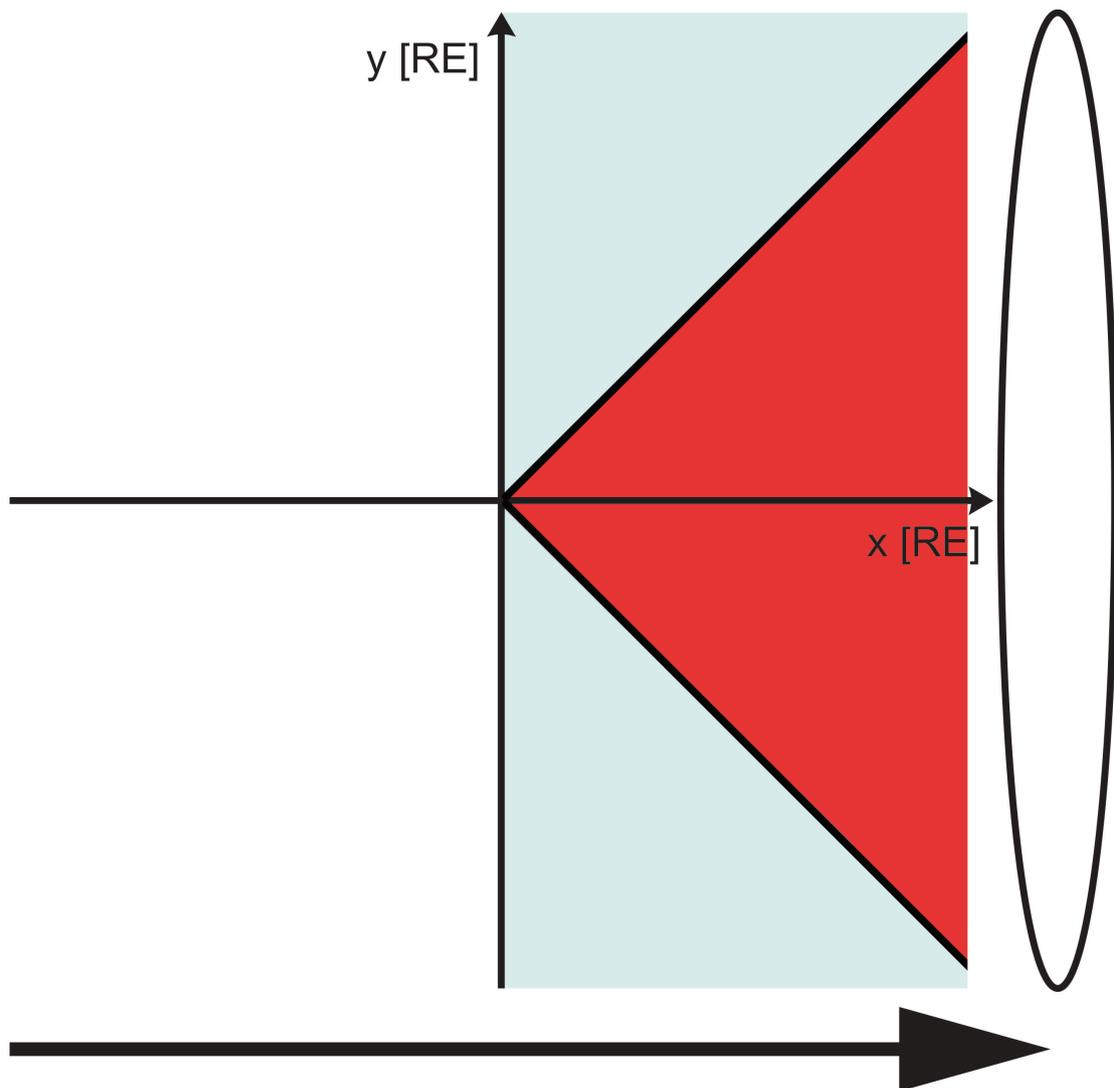


Abb. 2: Gerichtete und ungerichtete Migration. Als ungerichtete Migration wird der Anteil der Zellen bezeichnet, die sich in Richtung der Kapillare ($\Delta x > 0$) bewegen (Endpunkte der Migrationstrajektoren in der grauen und roten Fläche). Als gerichtete Migration wird der Anteil der Zellen bezeichnet, die sich stärker in Richtung der Kapillare verglichen mit der Motilität orthogonal zur X-Achse bewegen ($\Delta x > 0/|\Delta y| > 1$) (Endpunkte der Migrationstrajektoren in der roten Fläche). Die Kapillare ist im rechten Bildrand grafisch dargestellt. Der Pfeil gibt die Richtung des Gradienten an.

2.11 Statistik

Statistische Berechnungen erfolgten mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben. Die Modalitäten wurden jeweils paarweise miteinander verglichen. Die Signifikanz wurde sowohl für die gerichtete als auch die ungerichtete Migration berechnet. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (P-Wert) kleiner als der α -Wert war, wurde der Unterschied als signifikant angenommen. Als Signifikanzniveaus (α -Wert) wurden hierbei 0,05 (*), 0,01(**) und 0,001(***) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Chemokinrezeptorexpressionsprofil humaner Spermien

3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Proteinexpressionsprofil von Chemokinrezeptoren auf humanen Spermien untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde ein Antikörper-Panel von 17 Chemokin-Rezeptoren analysiert. Hierbei konnten unterschiedliche Expressionsraten der einzelnen Rezeptoren aufgezeigt werden (Tbl. 1, Abb. 3 + 4): Bei allen Probanden konnte eine starke und konstante Expression von CCR6 nachgewiesen werden. Der durchschnittliche prozentuelle Anteil aller analysierten Ereignisse lag für CCR6 bei 9,84%. Hierbei zeigte sich eine Spanne zwischen den einzelnen Donoren von 1,99% bis 38,0%. Bei allen untersuchten Probanden zeigten sich zusätzlich bei den Rezeptoren CCR10, CXCR31 sowie CXCR3 besonders hohe Expressionsraten, wohingegen bei den Rezeptoren CCR5, CCR7, CXCR6, CCR8 und CCR3 besonders niedrige Expressionsraten beobachtet werden konnten. Die Variabilität unterschied sich ebenfalls stark.

	Expression (%)	Range R (%)
CCR1	6,44	25,68
CCR2	3,48	8,46
CCR3	2,26	5,07
CCR4	5,40	47,93
CCR5	0,53	1,54
CCR6	9,84	36,15
CCR7	1,95	3,25
CCR8	2,66	6,32
CCR9	4,35	19,43
CCR10	24,63	56,46
CX3CR1	22,35	53,93
CXCR1	8,80	52,52
CXCR2	9,45	66,47
CXCR3	38,46	66,58
CXCR4	3,98	8,46
CXCR5	5,19	7,63
CXCR6	1,77	3,00

Tbl. 2: Relative Expression von Chemokinrezeptoren auf humanen Spermien. Prozentualer Anteil der untersuchten Chemokinrezeptoren und deren Range „R“ (Abweichung zwischen dem größten und dem kleinsten Messwert) auf humanen Spermien bei 17 unterschiedlichen Spendern.

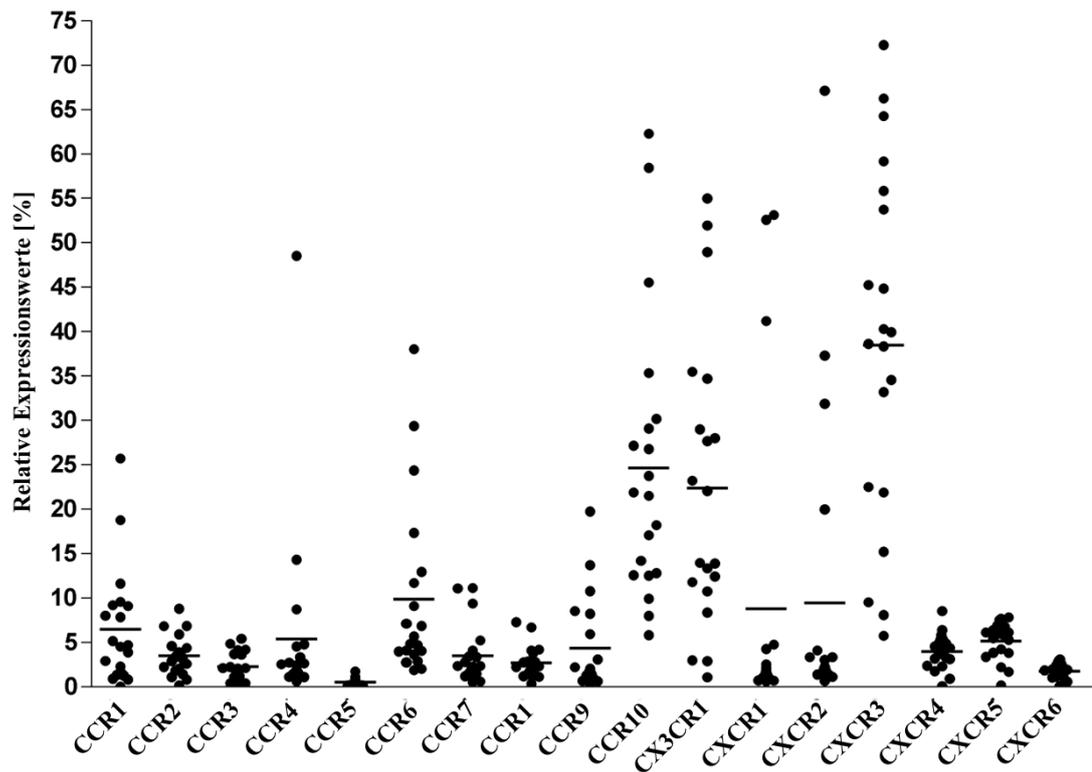


Abb. 3: Chemokinrezeptorprofil humaner Spermien. CCR6, CCR10 und CXCR3 sind als einzige der Rezeptoren konstant bei allen Donoren exprimiert. CCR1, CCR9, CX3CR2, CXCR4 sowie CXCR5 zeigen ebenfalls bei den meisten Donoren eine hohe Expressionsrate. Dargestellt sind 18 Rezeptoren: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CX3CR1, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6. Angaben in Prozent der relativen Expressionswerte. Durchflusszytometrische Auswertung Spermien fertiler Spender (n=26) mittels eines Proteinpanels für 17 Chemokinrezeptoren.

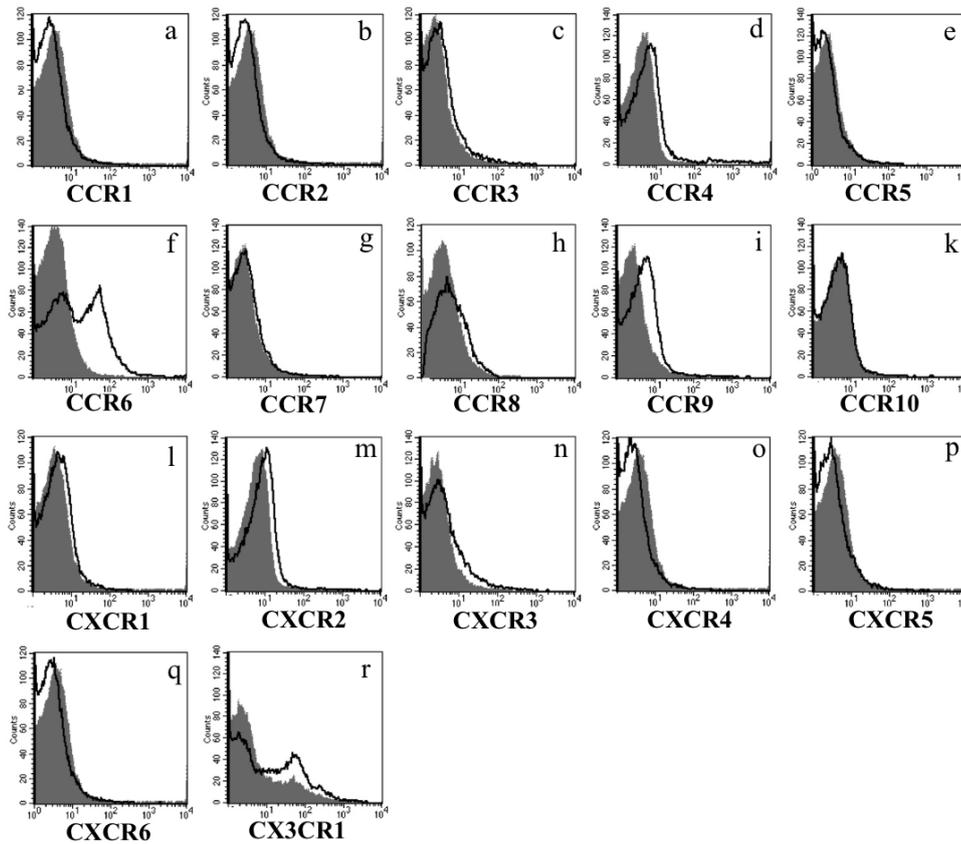


Abb. 4: Chemokinrezeptorprofil einer repräsentativen Probe. Dargestellt sind 17 Rezeptoren: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CX3CR1, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7. CCR6 zeigt eine hohe Expressionsrate. CCR7 wird in diesem Fall nicht exprimiert. Durchflusszytometrische Auswertung mittels eines Proteinpanels für 17 Chemokinrezeptoren.

3.1.2 Immunhistologische Untersuchungen

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde das CCR6-Proteinexpressionsmuster humaner Spermien auf zellulärer Ebene analysiert. Mithilfe dieser Methode konnte die genaue Lokalisation der CCR6-Rezeptoren auf humanen Spermien untersucht werden. Die Analyse zeigte eine deutliche Expression von CCR6 im Bereich des Hauptstückes des Flagellums sowie eine ringförmige Anordnung im Bereich des Kopfteils. Dahingegen konnte im Bereich des Mittelstückes sowie des Endstückes des Flagellums keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 5).

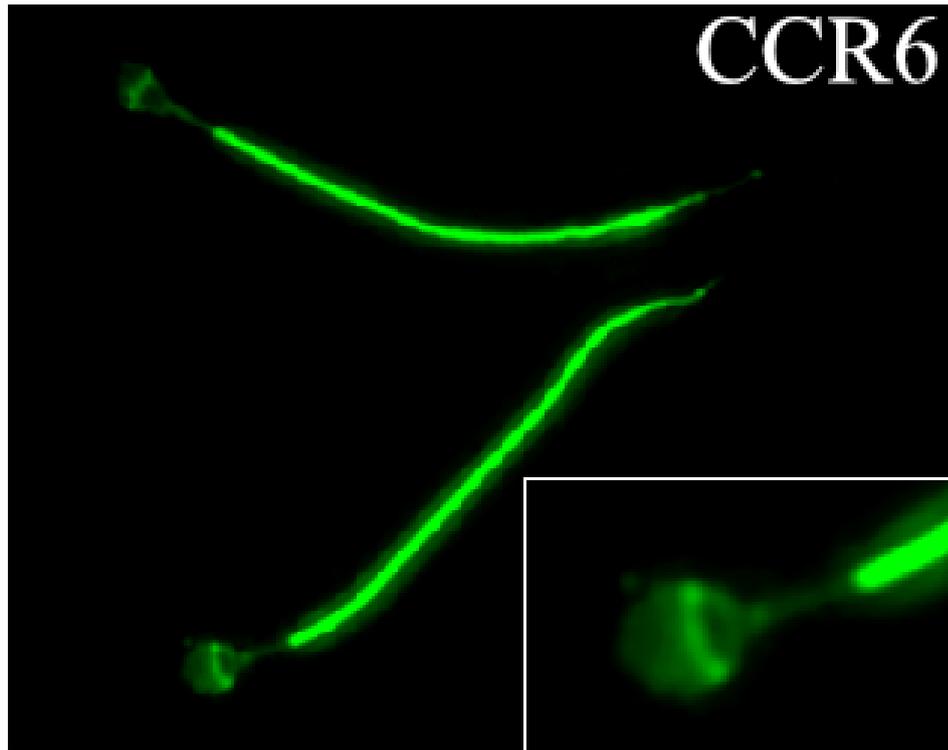


Abb. 5: CCR6-Proteinexpression auf humanen Spermien. Die Darstellung der Immunfluoreszenzzytochemie zeigt eine deutliche Expression von CCR6 auf humanen Spermien, insbesondere im Bereich des Flagellums sowie im Bereich der äquatorialen Ebene des Akrosoms. 250-fache und 400-fache (Fenster unten rechts) Vergrößerung.

3.2 CCL20 Proteinkonzentration humaner Follikelflüssigkeit

Die in dieser Arbeit untersuchten Spermien exprimierten konstant CCR6. In einem nächsten Schritt wurde die CCL20-Konzentration in der humanen Follikelflüssigkeit (hFF) von drei gesunden Spenderinnen mittels ELISA untersucht. Folgende Bedingungen wurden untersucht:

1. Native humane Follikelflüssigkeit (hFF).
2. Mittels Heparin-Affinitätschromatographie von positiv geladenen Proteinen getrennte humane Follikelflüssigkeit (fhFF).
3. Eluat der Heparin-Affinitätschromatographie, das ausgetragene Gemisch aus Lösungsmitteln und die in der stationären Phase gelösten Substanzen.

Die mittlere CCL20-Konzentration der hFF betrug 3201,3 pg/ml. Das Eluat zeigte eine CCL20-Konzentration von 2315,3 pg/ml. Die mittlere CCL20-Konzentration der fhFF wies einen Wert von 81,3 pg/ml auf (Abb. 6.).

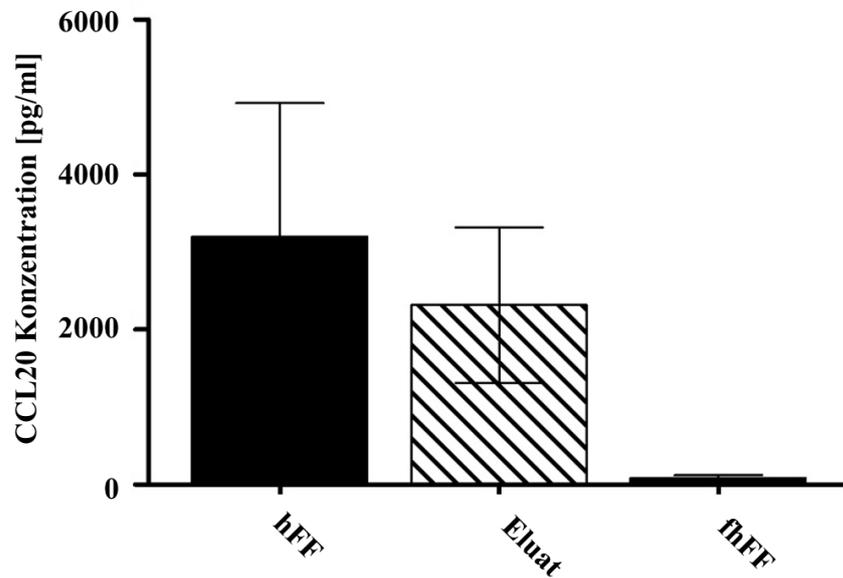


Abb. 6: CCL20-Proteinkonzentration humaner Follikelflüssigkeit. Mittlere CCL20-Konzentration unter Angabe des 95%-Konfidenzintervall von nativer humaner Follikelflüssigkeit (hFF), mittels Heparin-Affinitätschromatographie von positiv geladenen Proteinen getrennter humaner Follikelflüssigkeit (fhFF) sowie das Eluat der Säulen- Affinitätschromatographie. Die mittleren CCL20-Konzentrationen betragen 3201,3 pg/ml (hFF), 2315,3 pg/ml (Eluat) und 81,3 pg/ml (fhFF). Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt (n=3).

3.3 Migrationsverhalten humaner Spermien

3.3.1 Analyse des Migrationsverhaltens humaner Spermien fertiler Spender unter Einfluss eines Chemokingradienten

Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Relevanz des Chemokinliganden CCL20 für das Migrationsverhalten von Spermien untersucht: 1. Kontrollmedium; 2. CCL20 (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml); 3. hFF; 4. fhFF; 5. Anti-CCR6 (100 ng/ml) + CCL20 (100 ng/ml); 6. Anti-CCL20 (100 ng/ml) + CCL20 (100 ng/ml). Dazu wurde die Migration jedes Spermiums in einem Koordinatensystem ausgehend vom Nullpunkt abgebildet. Zudem wurde die Migrationsrichtung mit Migrationsvektoren und einem Hauptmigrationsvektor dargestellt. Der Hauptmigrationsvektor stellt die Richtung dar, in die die meisten Spermien migrieren (Abb. 7 - 15).

Ohne Gradienten (0 ng/ml CCL20-Konzentration) zeigte sich ein Verhältnis der Migrationsvektoren von 0,484 zu 0,513 in Richtung der Kapillare. Bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich ein Verhältnis der Migrationsvektoren in Richtung der Kapillare von 0,578. Ein Anteil von 0,422 bewegte sich in die entgegengesetzte Richtung. Der Hauptmigrationsvektor zeigte bei dieser Konzentration in Richtung der ansteigenden CCL20-Konzentration. Bei niedrigen (10 ng/ml) und höheren (100 ng/ml) CCL20-Konzentrationen zeigten insgesamt weniger Migrationstrajektoren in Richtung der Kapillare. Bei einer CCL20-Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich ein Verhältnis der Migrationstrajektoren von 0,428 zu 0,572. Bei einer höheren CCL20-Konzentration (1000 ng/ml) zeigte sich ein Verhältnis von 0,471 zu 0,529. Die Hauptmigrationstrajektoren zeigten nicht in Richtung der Kapillare (Abb. 7 – 9).

Die stärkste Zunahme der Migrationstrajektoren war unter dem Einfluss von hFF zu erkennen (Abb. 8). Bei dieser Versuchsbedingung zeigte ein Anteil von 0,639 der Spermien in Richtung des Gradienten und ein Anteil von 0,361 in die entgegengesetzte Richtung. Der Hauptmigrationsvektor zeigte deutlich in Richtung des Gradienten. Dies entspricht einer Zunahme im Vergleich zu 100 ng/ml CCL20 um 0,061 Einheiten. Bei der fhFF zeigte sich eine Abnahme der Migrationstrajektoren in Richtung des Gradienten im Vergleich zur hFF um 0,055 auf 0,584 (Abb. 10 – 12).

Nach Vorinkubation des CCL20-Ansatzes (100 ng/ml) mit neutralisierenden Anti-CCL20 Antikörpern (ebenfalls 100 ng/ml) veränderte sich das Migrationsverhalten. In

Richtung des Gradienten bewegte sich ein Anteil der Zellen von 0,490. In die entgegengesetzte Richtung bewegte sich ein Anteil von 0,510. Zusätzlich zeigte der Hauptmigrationsvektor nicht mehr in Richtung des Gradienten. Wurde im Vorfeld der Chemotaxis-Assays die Spermienproben für 30 Minuten mit Anti-CCR6-Antikörpern (100 ng/ml) vorinkubiert, verringerte sich der Anteil der Spermien, die in Richtung eines CCL20-Gradienten (100 ng/ml) bewegten von 0,578 auf 0,507. Bei einem CCL21-Gradienten von 100 ng/ml migrierte lediglich ein Anteil von 0,473 in Richtung der Kapillare (Abb. 13 – 15).

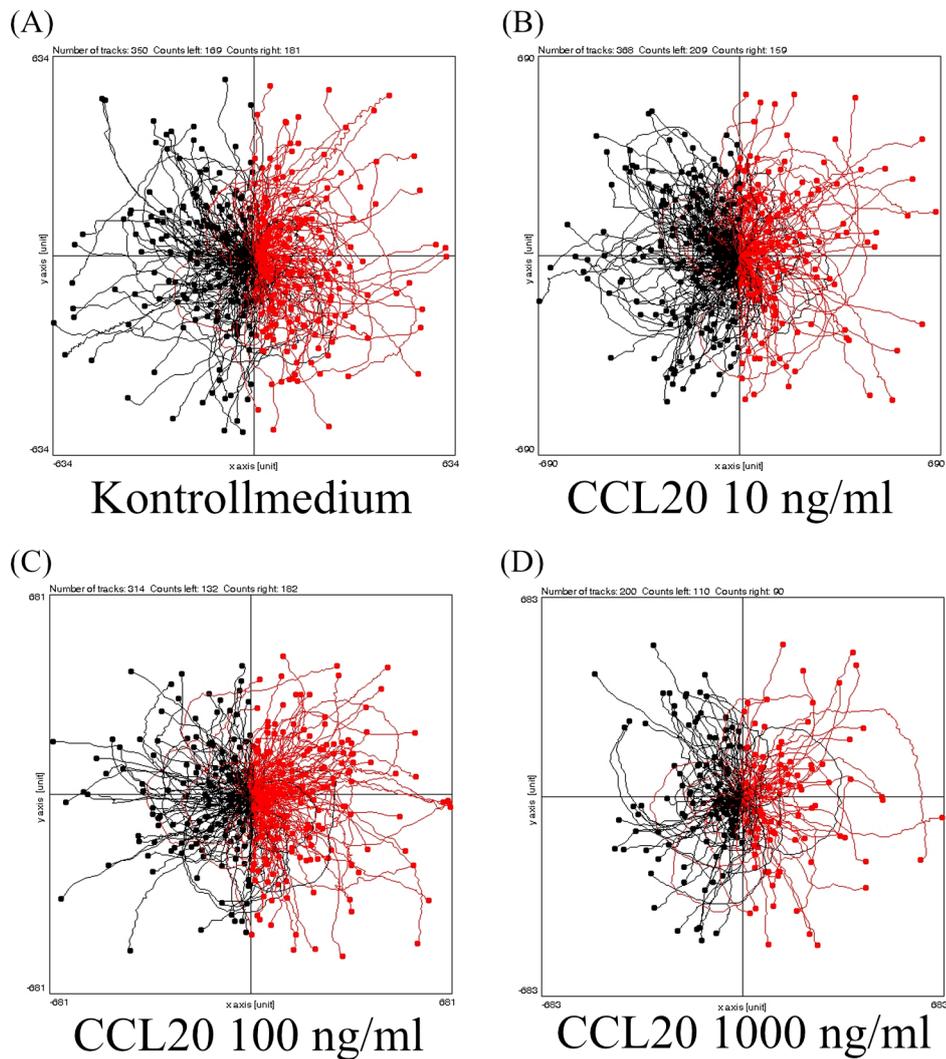


Abb. 7: Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einfluss unterschiedlicher CCL20-Konzentrationen. Darstellung der Migrationstrajektoren humaner Spermien mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. Migrationstrajektoren in Richtung des Gradienten sind rot, die in entgegengesetzte Richtung schwarz gefärbt. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 10 ng/ml, (C) CCL20 100 ng/ml, (D) CCL20 1000 ng/ml. Bei einem CCL20-Gradienten von 100 ng/ml migrieren die meisten Spermien in Richtung des Gradienten (rot) (C). Bei höheren (1000 ng/ml) und niedrigeren (10 ng/ml) Konzentrationen nimmt diese Anzahl ab (B + D). Zum Vergleich sind die Trajektoren unter Einfluss eines Kontrollmediums-Gradienten dargestellt (A). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 5 unterschiedlichen Donoren untersucht.

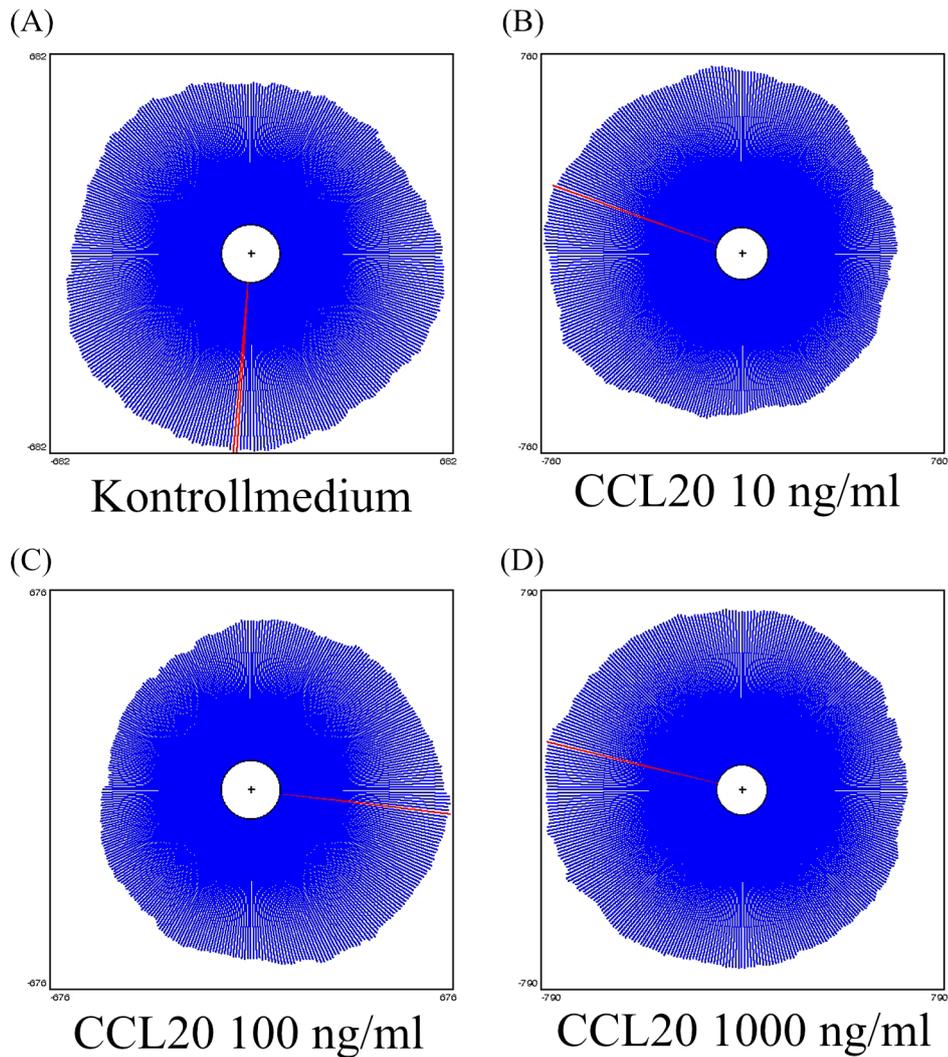


Abb. 8: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren mit Hauptmigrationsvektor humaner Spermien unter Einfluss unterschiedlicher CCL20-Konzentrationen. Darstellung der Hauptmigrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie unter Angabe des Hauptmigrationsvektors (rot). (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 10 ng/ml, (C) CCL20 100 ng/ml, (D) CCL20 1000 ng/ml. Unter Einfluss eines CCL20-Gradienten von 100 ng/ml nimmt die Anzahl der Migrationstrajektoren humaner Spermien in Richtung des Gradienten (nach rechts) zu (C). Der Hauptmigrationsvektor zeigt in Richtung des Gradienten. Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektoren humaner Spermien in Richtung des Gradienten nachweisbar (B + D). Zum Vergleich sind die Trajektoren unter Einfluss eines Kontrollmediums-Gradienten dargestellt (A). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 5 unterschiedlicher Donoren untersucht.

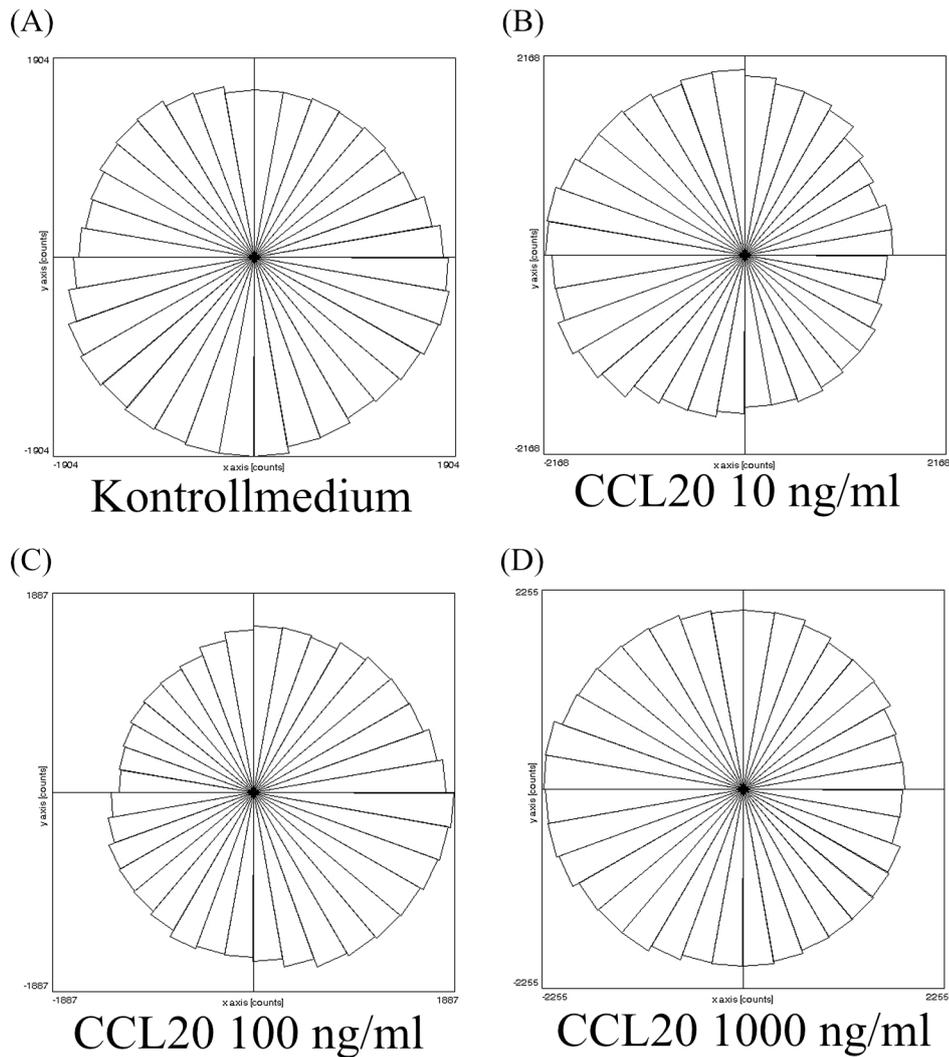


Abb. 9: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einfluss unterschiedlicher CCL20-Konzentrationen. Darstellung der Migrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 10 ng/ml, (C) CCL20 100 ng/ml, (D) CCL20 1000 ng/ml. Unter Einfluss eines CCL20-Gradienten von 100 ng/ml nimmt die Anzahl der Migrationstrajektoren humaner Spermien in Richtung des Gradienten (nach rechts) zu (C). Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektoren humaner Spermien in Richtung des Gradienten nachweisbar (B + D). Zum Vergleich sind die Trajektoren unter Einfluss eines Kontrollmediums-Gradienten dargestellt (A). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 5 unterschiedlicher Donoren untersucht.

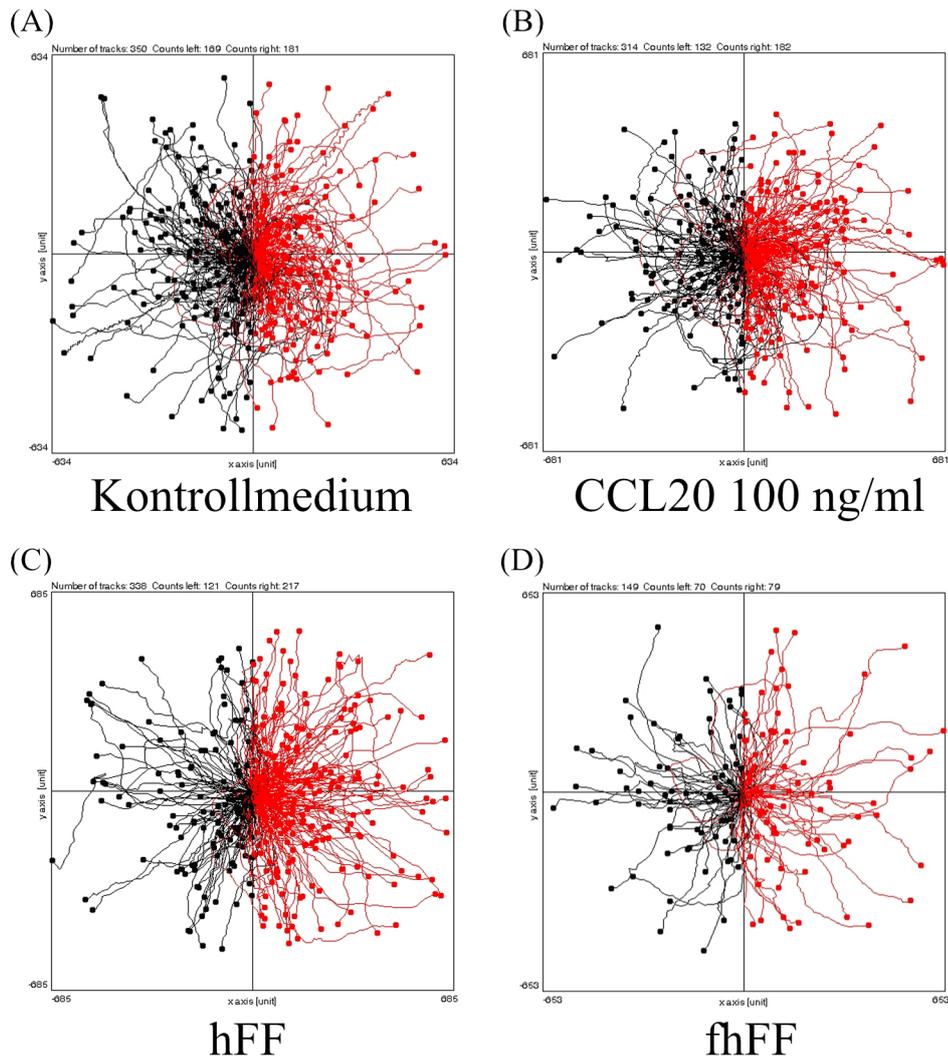


Abb. 10: Darstellung von Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einfluss von hFF. Darstellung der Migrationstrajektoren humaner Spermien mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. Migrationstrajektoren in Richtung des Gradienten sind rot, die in entgegengesetzte Richtung schwarz gefärbt. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) hFF, (D) fhFF. Bei einem Gradienten humaner Follikelflüssigkeit (hFF) migrieren die meisten Spermien in Richtung des Gradienten (rot) (C). Bei der durch Säulenchromatographie gefilterten Follikelflüssigkeit nimmt diese Anzahl ab (D). Zum Vergleich sind die Trajektoren der Kontrolle und bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 5 unterschiedlichen Donoren untersucht.

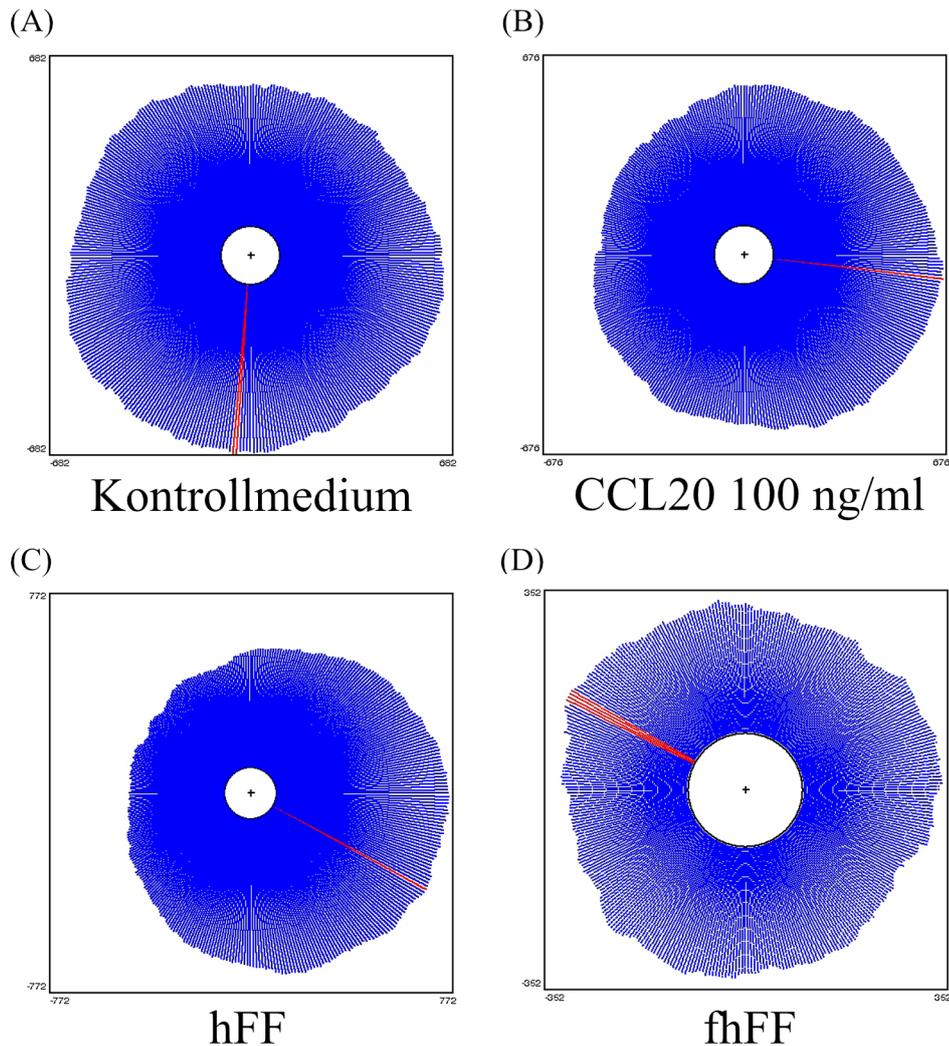


Abb. 11: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren mit Hauptmigrationsvektor humaner Spermien unter Einfluss von hFF. Darstellung der Migrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie unter Angabe des Hauptmigrationsvektors (rot). (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) hFF, (D) fhFF. Bei einem Gradienten humaner Follikelflüssigkeit (hFF) migrieren die meisten Spermien in Richtung der steigenden Konzentration (nach rechts) (C). Der Hauptmigrationsvektor zeigt ebenfalls nach rechts. Bei der durch Säulenchromatographie gefilterten Follikelflüssigkeit nimmt diese Anzahl ab. Der Hauptmigrationsvektor zeigt nun nach links (D). Zum Vergleich sind die Trajektoren unter Einfluss eines Kontrollmediums-Gradienten und unter Einfluss eines CCL20-Gradienten mit einer Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 5 unterschiedlicher Donoren untersucht.

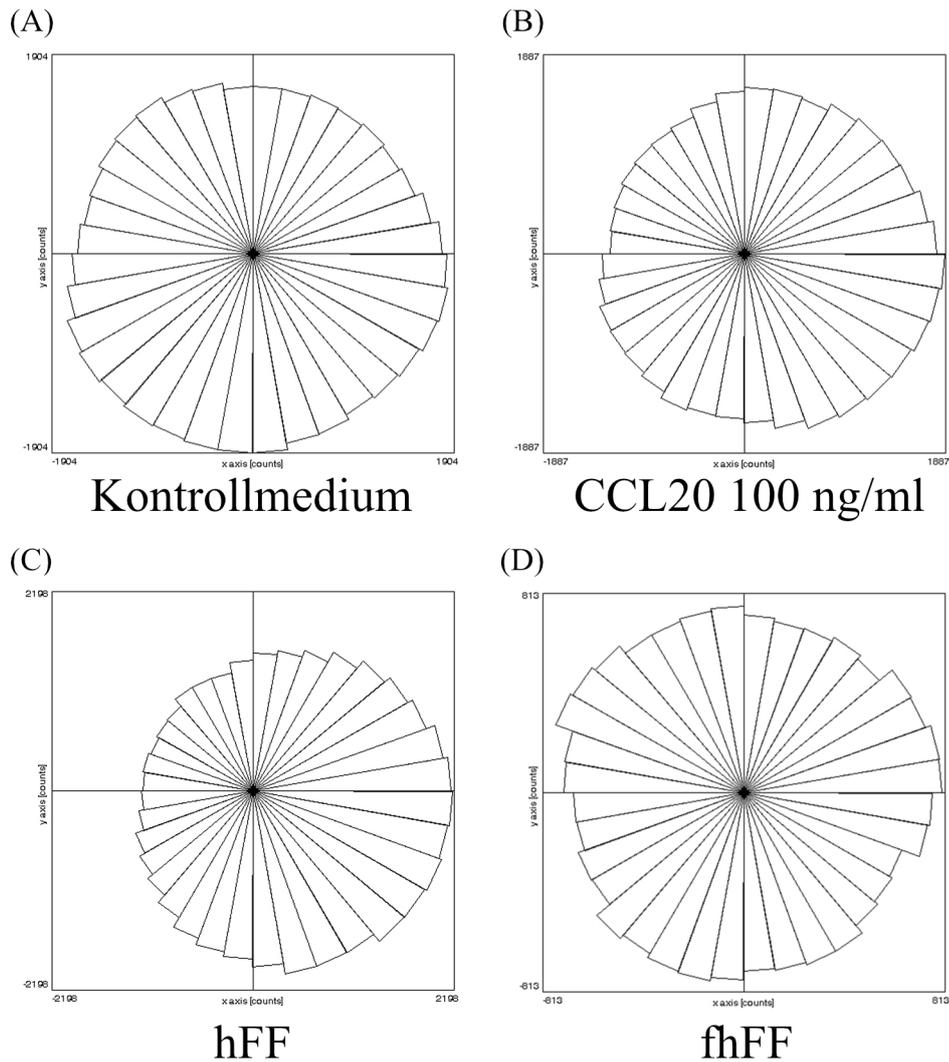


Abb. 12: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einfluss hFF. Darstellung der Hauptmigrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) hFF, (D) fhFF. Bei einem Gradienten humaner Follikelflüssigkeit (hFF) migrieren die meisten Spermien in Richtung derselben (nach rechts) (C). Bei der durch Säulenchromatographie gefilterten Follikelflüssigkeit nimmt diese Anzahl ab (D). Zum Vergleich sind die Trajekturen unter Einfluss eines Kontrollmediums-Gradienten und unter Einfluss eines CCL20-Gradienten mit einer Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Trajekturen für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 5 unterschiedlicher Donoren untersucht.

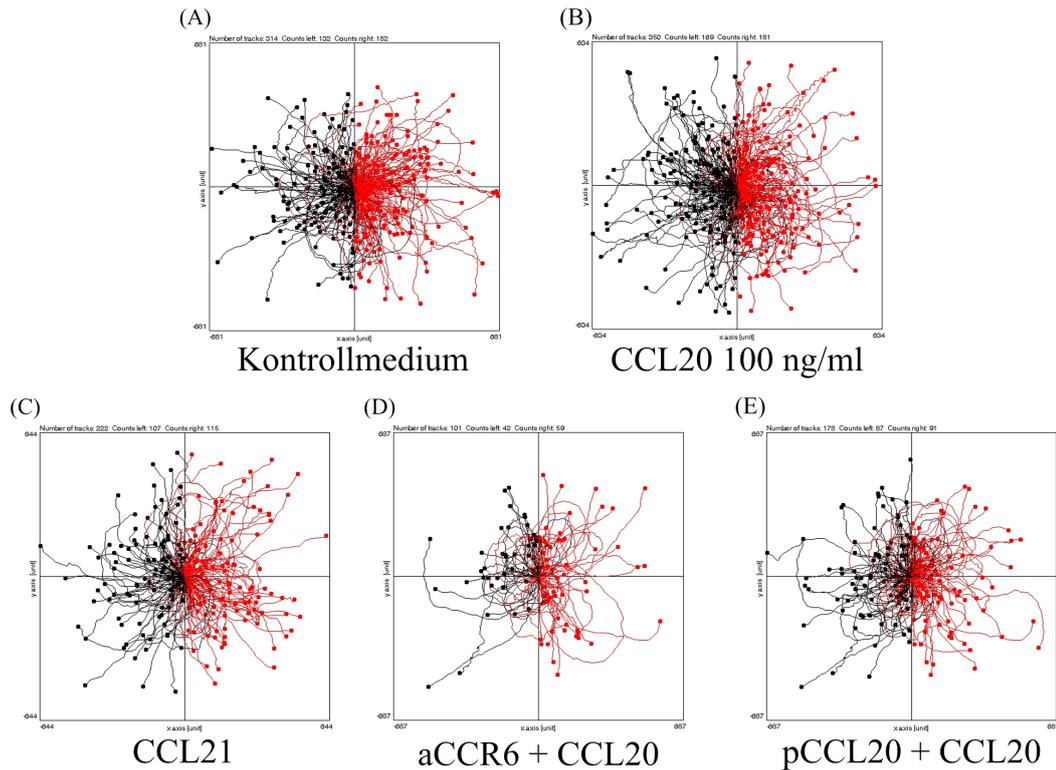


Abb. 13: Darstellung von Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einsatz neutralisierender Antikörper. Darstellung der Migrationstrajektoren humaner Spermien mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. Migrationstrajektoren in Richtung des Gradienten sind rot, die in entgegengesetzte Richtung schwarz gefärbt. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) CCL21 100 ng/ml, (D) Anti-CCR6-Antikörper 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (aCCR6 + CCL20), (E) Anti-CCL20 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (pCCL20 + CCL20). Bei einem CCL21-Gradienten von 100 ng/ml migriert keine signifikant höhere Anzahl an Spermien in Richtung des Gradienten (rot) (C). Ähnlich verhält es sich nach Vorinkubation der Spermienlösung für eine Stunde mit Anti-CCR6-Antikörper (100 ng/ml) (aCCR6 + CCL20) und der Beimischung von CCL20 neutralisierenden Anti-CCL20 Antikörpern in die Kapillare (pCCL20 + CCL20) (D + E). Zum Vergleich sind die Trajektoren der Kontrolle und bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Trajektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 5 unterschiedlichen Donoren untersucht.

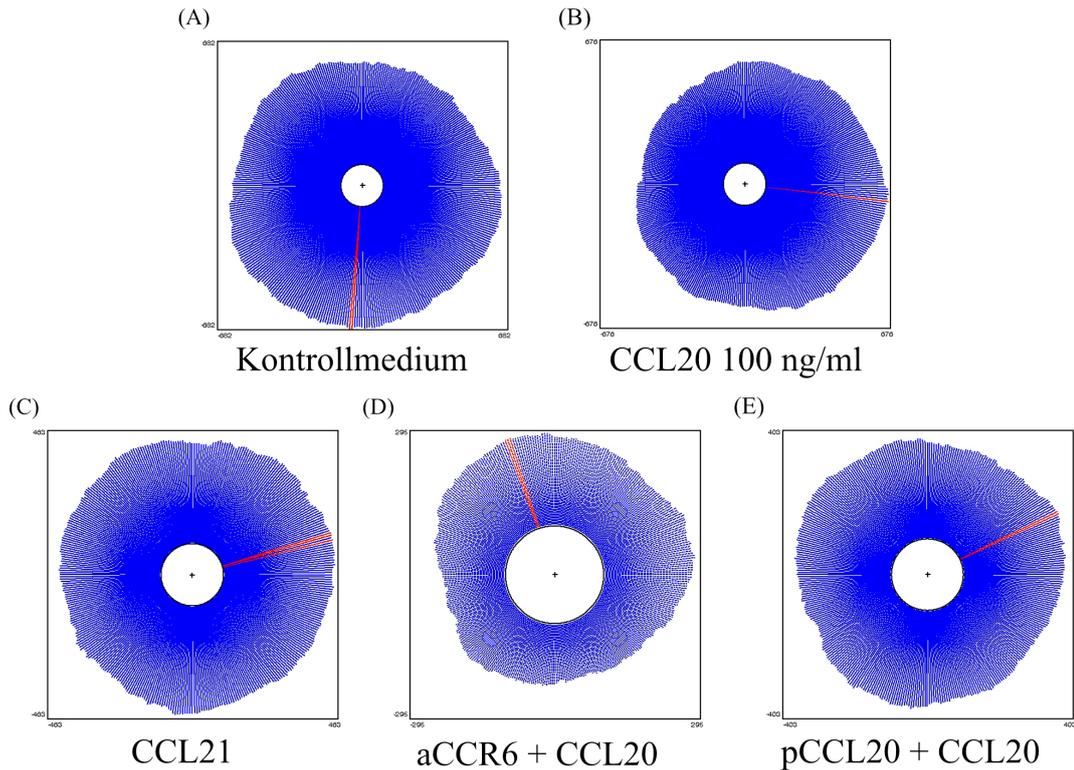


Abb. 14: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren mit Hauptmigrationsvektor humaner Spermien unter Einsatz neutralisierender Antikörper. Darstellung der Migrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie unter Angabe des Hauptmigrationsvektors (rot). (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) CCL21 100 ng/ml, (D) Anti-CCR6-Antikörper 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (aCCR6 + CCL20), (E) Anti-CCL20 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (pCCL20 + CCL20). Bei einem CCL21-Gradienten von 100 ng/ml migriert keine signifikant höhere Anzahl an Spermien in Richtung des Gradienten (C). Ähnlich verhält es sich nach Vorinkubation der Spermienlösung für eine Stunde mit Anti-CCR6-Antikörper (100 ng/ml) (aCCR6 + CCL20) und der Beimischung von CCL20 neutralisierenden Anti-CCL20 Antikörpern in die Kapillare (pCCL20 + CCL20) (D + E). Zum Vergleich sind die Vektoren der Kontrolle und bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Vektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 5 unterschiedlichen Donoren untersucht.

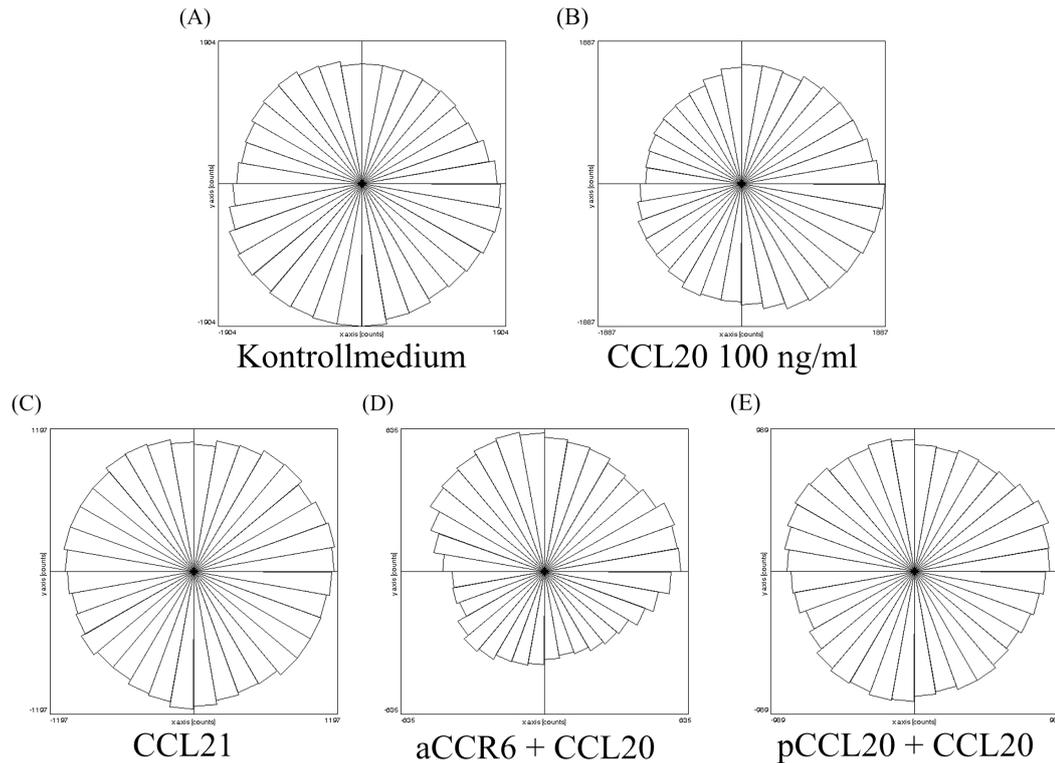


Abb. 15: Zirkuläre Darstellung von Migrationstrajektoren humaner Spermien unter Einsatz neutralisierender Antikörper. Darstellung der Hauptmigrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. (A) Kontrollmedium, (B) CCL20 100 ng/ml, (C) CCL21 100 ng/ml, (D) Anti-CCR6-Antikörper 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (aCCR6 + CCL20), (E) Anti-CCL20 100 ng/ml + CCL20 100 ng/ml (pCCL20 + CCL20). Bei einem CCL21-Gradienten von 100 ng/ml migriert keine signifikant höhere Anzahl an Spermien in Richtung des Gradienten (C). Ähnlich verhält es sich nach Vorinkubation der Spermienlösung für eine Stunde mit Anti-CCR6-Antikörper (100 ng/ml) (aCCR6 + CCL20) und der Beimischung von CCL20 neutralisierenden Anti-CCL20 Antikörpern in die Kapillare (pCCL20 + CCL20) (D + E). Zum Vergleich sind die Vektoren der Kontrolle und bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml dargestellt (A + B). Dargestellt sind zusammengefasste Vektoren für jeweils drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 5 unterschiedlichen Donoren untersucht.

3.3.2 Analyse der ungerichteten Migration humaner Spermien unter Einfluss eines Chemokin-Gradientens

Bei der Analyse der ungerichteten Migration gemäß Fabro *et al.* (Fabro *et al.*, 2002) wurde, wie in Abschnitt 2.10 Videoanalyse, beschrieben der Anteil der Spermien berechnet, welcher in Richtung des Chemokingradienten migriert ist.

Die Spermien gesunder Spender zeigten eine signifikante Migration in Richtung eines CCL20-Gradienten von 100 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0143$). Insgesamt zeigten bei der Kontrolle 48,4% der Spermien eine ungerichtete Migration in Richtung des Gradientens. Bei einem Gradienten von 100 ng/ml zeigten 57,8% eine ungerichtete Migration entlang des Gradienten ($p = 0,0143$, Abb. 15A). Somit zeigten bei 100 ng/ml CCL20 9,4% mehr Spermien eine ungerichtete Migration als bei der Kontrolle. Bei einer CCL20-Konzentration von 10 ng/ml nahm dieser Unterschied ab. Bei einer CCL20-Konzentration von 1000 ng/ml zeigten 47,1% der Spermien eine ungerichtete Migration entlang des Gradienten. Vergleicht man das Migrationsverhalten der Spermien bei einem Gradienten von 100 ng/ml CCL20 zu 1000 ng/ml zeigte sich ein Unterschied von 10,7% ($p = 0,0286$). Bei einer niedrigeren Konzentration von 10 ng/ml CCL20 zeigte sich eine Abnahme der Spermien, die sich entlang des Gradienten bewegen, um 15% ($p = 0,0286$, Abb. 15A).

Lässt man Spermien gesunder Spender entgegen eines Gradienten humaner Follikelflüssigkeit fertiler Frauen migrieren, steigt der Anteil der Spermien, die sich in Richtung des Gradienten bewegen, im Vergleich zur Mediumkontrolle von 48,4% auf 63,9% ($p = 0,0286$, Abb. 15C). Im Vergleich zu CCL20 (100 ng/ml) steigt der Anteil von 57,8% auf 63,9% ($p = 0,0286$). Bei der Untersuchung des Migrationsverhalten entgegen eines Gradienten der fhFF sinkt der Anteil der Spermien, die eine ungerichtete Migration aufweisen, im Vergleich zur naiven Follikelflüssigkeit von 63,9% auf 58,4% ($p = 0,500$ Abb. 15C).

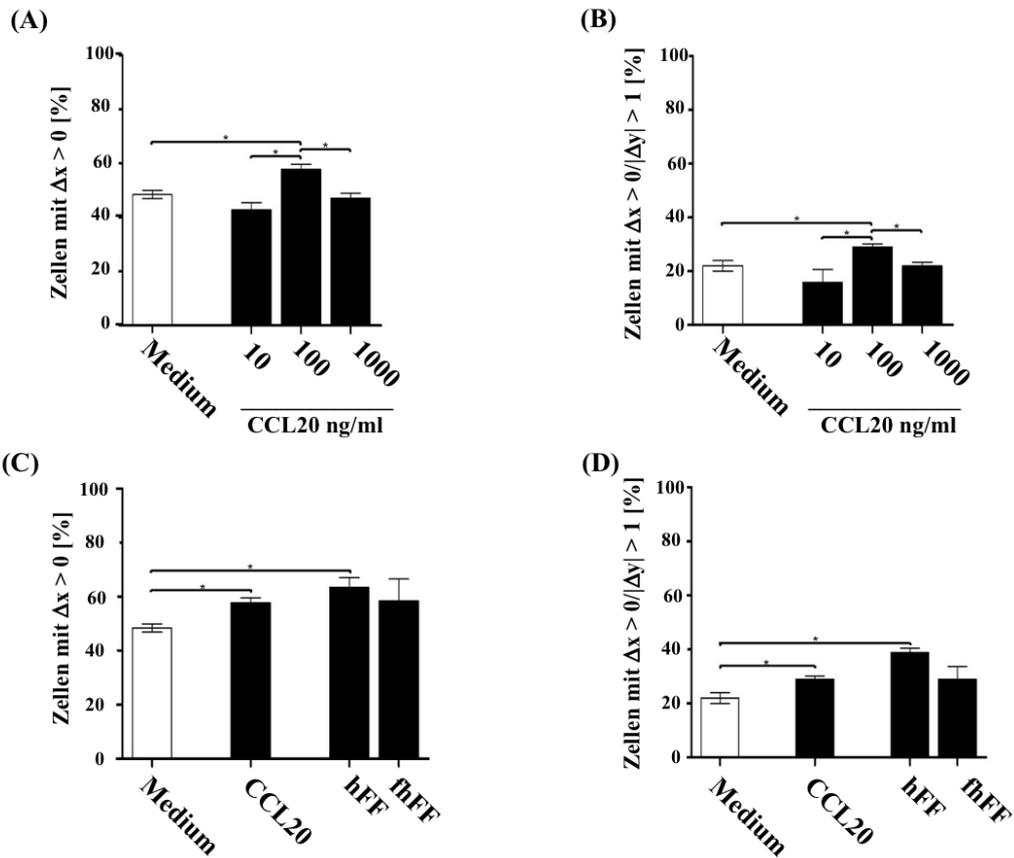


Abb. 15: Analyse der ungerichteten und gerichteten Migration humaner Spermien fertiler Spender entlang eines Gradienten von CCL20 oder hFF. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Unter Einfluss eines CCL20-Gradienten von 100 ng/ml nimmt der Anteil der Spermien, die in Richtung des Gradienten migrieren, zu. Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen ist eine Abnahme nachweisbar (A + B). Die größte Änderung des Migrationsverhaltens findet sich bei einem hFF-Gradienten (1/10 verdünnt). Bei der säulenchromatografisch aufgereinigten Follikelflüssigkeit (fhFF) nimmt dieser Anteil tendenziell ab (C + D). Die Auswertung der Migration humaner Spermien erfolgte zu definierten Einzelzeitpunkten 1 min und 4 min. Dargestellt ist eine grafische Zusammenfassung. Die Analyse der Migration humaner Spermien erfolgte mit Hilfe der Time-lapse-Video-Mikroskopie. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil der Spermien dargestellt, die in Richtung des Gradienten migrieren. Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Es wurden Spermienproben 5 unterschiedlicher Donoren in drei unabhängigen Versuchen analysiert.

Nach Vorinkubation des CCL20-Ansatzes mit neutralisierenden CCL20-Antikörpern (100 ng/ml) bewegen sich lediglich 49,0% der Spermien in Richtung des Gradienten (Abb. 16A). Dies entspricht im Vergleich zu einem CCL20-Gradienten von 100 ng/ml CCL20 einer Abnahme um 8,8% ($p = 0,0286$). Wurden die untersuchten Spermien im Vorfeld für 30 Minuten mit Anti-CCR6-Antikörpern in einer Konzentration von 100 ng/ml vorinkubiert, migrierten 50,7% der Spermien in Richtung des Gradienten. Dies entsprach einer Abnahme von 7,1 % im Vergleich zu CCL20 (100 ng/ml) ($p = 0,1143$). Bei einem CCL21-Gradienten von 100 ng/ml migrierten 47,3% der Spermien in Richtung des Gradienten (Abb. 16A).

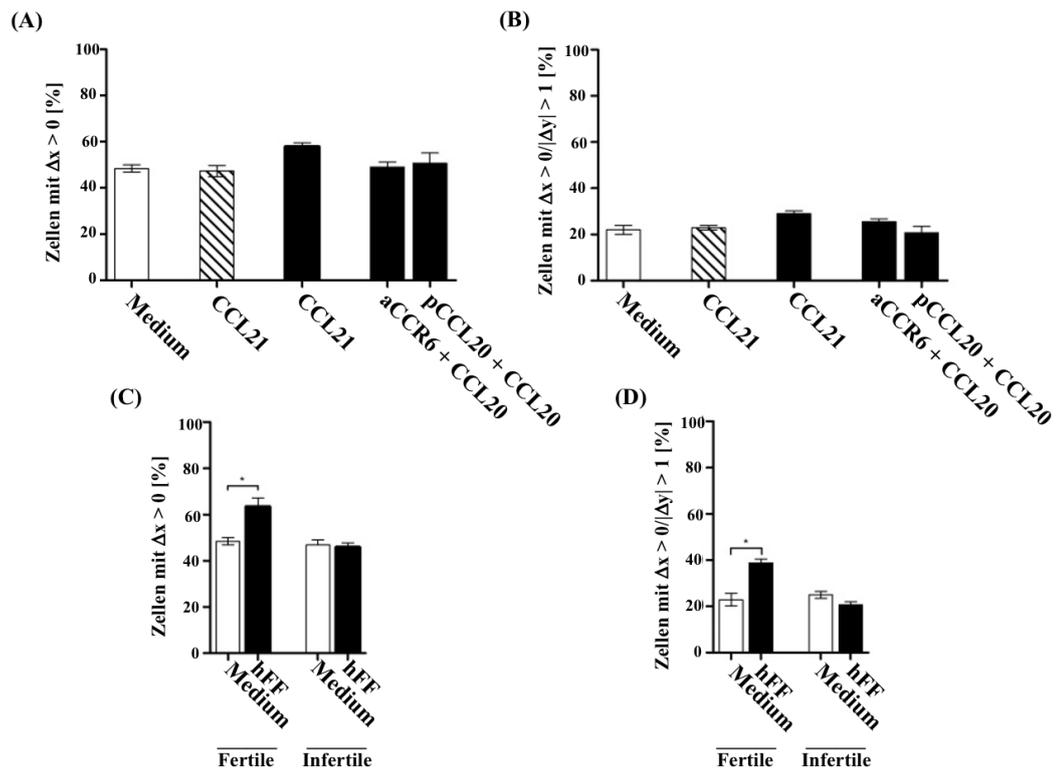


Abb. 16: Analyse der ungerichteten und gerichteten Migration humaner Spermien fertiler Spender entlang eines CCL20-Gradienten nach Vorinkubation der Spermien mit neutralisierenden anti-CCR6 Antikörpern (aCCR6 + CCL20) oder neutralisierenden anti-CCL20 Antikörpern (pCCL20 + CCL20) oder humaner Spermien infertiler Spender entlang eines hFF-Gradienten. Unter Einfluss neutralisierender Antikörper nimmt der Anteil der Spermien, die bei 100 ng/ml CCL20 in Richtung des Gradienten migrieren, signifikant ab. Zur Kontrolle wurden chemotaktische Assays mit CCL21 durchgeführt (A + B). Anders als bei Proben gesunder Spender zeigten die Proben infertiler Spender keinen Unterschied im Migrationsverhalten entlang eines Gradienten humaner Follikelflüssigkeit (hFF) im Vergleich zur Mediumkontrolle (C + D). Auswertung der Migration humaner Spermien erfolgte zu definierten Einzelzeitpunkten nach 1 min und 4 min. Die Analyse der Migration erfolgte mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil der Spermien dargestellt, die in Richtung des Gradienten migrieren. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-U-Test* berechnet (* $P < 0,05$).

3.3.3 Analyse der gerichteten Migration

Bei der Analyse der gerichteten Migration der Spermien nach Fabro *et al.* (Fabro *et al.*, 2002) wurde, wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, der Anteil der Spermien untersucht, welche sich stärker in Richtung der Kapillare und somit des Gradienten bewegen als orthogonal zu dieser.

Die Spermien fertiler Spender zeigten eine signifikant gerichtete Migration in Richtung eines CCL20-Gradienten von 100 ng/ml im Vergleich zur Mediumkontrolle. Insgesamt zeigten bei der Kontrolle 22,0% der Spermien eine gerichtete Migration. Bei 100 ng/ml zeigten 29,0% eine gerichtete Migration entlang des Gradienten ($p=0,029$). Somit zeigten bei 100 ng/ml CCL20 7% mehr Spermien eine gerichtete Migration als bei der Kontrolle. Bei CCL20-Konzentration von 10 ng/ml zeigten 13,2% der Spermien eine gerichtete Migration, wohingegen bei 1000 ng/ml 21,9% der Spermien eine gerichtete Migration entlang des Gradienten zeigten. Bei 1000 ng/ml zeigte sich somit im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme um 0,1% und beim Vergleich der Gradienten 100 ng/ml CCL20 und 1000 ng/ml, ein Unterschied von 7,1% ($p=0,0286$) (Abb. 15B).

Bewegten sich die Spermien entlang eines Gradienten humaner Follikelflüssigkeit gesunder Spenderinnen, zeigten 38,8% der Spermien eine gerichtete Migration entlang des Gradienten. Dies entsprach einer Zunahme um 9,8% ($p=0,0286$) im Vergleich zu 100 ng/ml und um 16,8% ($p=0,0286$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15D).

Bei der Beobachtung des Migrationsverhalten humaner Spermien entlang eines Gradienten chromatografisch gefilterter humaner Follikelflüssigkeit zeigten 29,0% der Spermien eine gerichtete Migration. Im Vergleich zur nativen Follikelflüssigkeit entsprach dies einer Abnahme um 9,8% (Abb. 15D).

Nach Vorinkubation des CCL20 Ansatzes (100 ng/ml) mit neutralisierenden Anti-CCR6-Antikörpern (100 ng/ml) bewegten sich lediglich 25,6% der Spermien in Richtung dieses Gradienten. Dies entspricht im Vergleich zu 100 ng/ml CCL20 einer Abnahme um 3,4%. Werden die untersuchten Spermien im Vorfeld für 30 Minuten mit CCL20 (100 ng/ml) vorinkubiert, migrierten 20,7% der Spermien in Richtung des CCL20-Gradienten (100 ng/ml). Dies entspricht im Vergleich zu einem CCL20-Gradienten (100 ng/ml) ohne vorherige Vorinkubation einer signifikanten Abnahme um 8,3% ($p=0,0286$). Bei einem CCL21-Gradienten (100 ng/ml) migrierten 22,9% der Spermien in Richtung des Gradienten (Abb. 16B).

3.4 Analyse des Migrationsverhaltens von Spermien infertiler Spender unter Einfluss humaner Follikelflüssigkeit fertiler Spenderinnen

3.4.1 Analyse der ungerichteten Migration

Bei der Analyse der ungerichteten Migration der Spermien infertiler Spender wurde das Migrationsverhalten für insgesamt 5 Minuten dokumentiert. Bei der Mediumkontrolle bewegten sich 45,9% der Spermien in Richtung der Kapillare. Dies entsprach in etwa den 48,4% der Spermien fertiler Spender, die in Richtung der Kapillare ungerichtet migrierten. Entlang eines Gradienten von hFF gesunder Spenderinnen zeigten 46,8% der Spermien infertiler Donoren eine ungerichtete Migration. Dies entspricht einer Abnahme um 16,6% im Vergleich zu Spermien gesunder Donoren (Abb. 16C).

3.4.2 Analyse der gerichteten Migration

Bei der Analyse der gerichteten Migration der Spermien infertiler Spender zeigten sich folgende Ergebnisse in einem Untersuchungszeitraum von 5 Minuten: Bei der Kontrolle bewegten sich 25,0% der Spermien in Richtung der Kapillare. Mit einem Unterschied von 3,1% entsprach dies ungefähr dem Migrationsverhalten humaner Spermien fertiler Spender unter Kontrollbedingungen. Entlang eines Gradienten von hFF gesunder Donorinnen zeigten 20,6% der Spermien eine gerichtete Migration. Dies entspricht einer Abnahme um 18,2% im Vergleich zu dem Migrationsverhalten Spermien gesunder Spender (Abb. 16D).

4 Diskussion

Millionen von Paaren sind weltweit von einem unerfüllten Kinderwunsch betroffen. Man nimmt an, dass in Europa etwas 10-15% aller Paare unter Fruchtbarkeitsstörungen leiden. Von Infertilität spricht man laut WHO-Kriterien, wenn trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr während eines Jahres keine Schwangerschaft eintritt (Boivin *et al.*, 2007). Die Häufigkeit der Infertilität in westlichen Gesellschaften nimmt in den letzten Jahrzehnten zu. Die Ursachen sind multifaktoriell bedingt und liegen zu etwa 40% ausschließlich bei der Frau und zu 40% ausschließlich beim Mann. 20% der Fälle mit unerfülltem Kinderwunsch betreffen beide Partner gemeinsam. Beispielhafte Gründe sind somatische Störungen wie genetische Aberrationen, eine ungesunde Lebensweise (z.B. Nikotinabusus) oder die Verschiebung des Kinderwunsches in ein zunehmend höheres Alter. Dies führt gerade bei Frauen zu geringerer Fruchtbarkeit und steigenden Abortraten (Boivin *et al.*, 2007, Warburton, 1986, Kinney *et al.*, 2007).

In den letzten Jahren hat sich der Erfolg von Behandlungen mit assistierten Reproduktionstechnologien (ART) massiv verbessert. Unter ART versteht man hauptsächlich zwei Methoden: 1. Die *in-vitro*-Fertilisation (IVF); 2. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Bei beiden Methoden wird zunächst die Eizellreifung hormonell mittels Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Agonisten bzw. Antagonisten ausgelöst. Die Befruchtung der Eizelle wird entweder passiv mittels IVF im Inkubationsschrank oder aktiv mittels ICSI durchgeführt. Bei der ICSI wird ein Spermium direkt in die Oozyte injiziert. In einem letzten Schritt erfolgt die Übertragung des Embryos in den weiblichen Uterus (Zheng *et al.*, 2019, Davies *et al.*, 2012). Seit 1978 Louise Brown als erstes Kind durch IVF geboren wurde, zeigt sich ein massiver Anstieg an Geburten mit Unterstützung von ART (Niederberger *et al.*, 2018). Trotz der Erfolge der ART in den letzten Jahrzehnten stehen heutige Reproduktionsmediziner vor denselben Problemen wie damals: Zum einen die Bestimmung der optimalen hormonellen Bedingungen für eine Implantation des befruchteten Embryos während des weiblichen Zyklus sowie zum anderen das Problem qualitativ hochwertige Spermien und Oozyten zu selektieren (Johnson, 2019). Obwohl die meisten Kinder, die mithilfe ART gezeugt werden, gesund sind, zeigen diese u.a. eine erhöhte Assoziation zu angeborenen Anomalien, schlechteren kognitiven Eigenschaften und metabolischen Störungen wie z.B. Adipositas (Sullivan-Pyke *et al.*, 2017). Ein tiefergehendes Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen bei der Interaktion von menschlichen Gameten

haben in den letzten Jahren geholfen, Komplikationen und unerwünschte Ereignisse bei der ART zu minimieren und die Anzahl ungewollter kinderloser Paare zu senken (Davies *et al.*, 2012, Hilbert and Gunderson, 2019). Von besonderem Interesse ist aktuell hierbei auch die Erforschung grundlegender Prinzipien wie der Spermienthermo- und Chemotaxis.

Humane Follikelflüssigkeit bildet für die Oozyte eine schützende Umgebung und ist für die physiologische Reifung dieser erforderlich. Seit längerem ist bekannt, dass hFF chemotaktisch aktive Substanzen wie das weibliche Geschlechtshormon Progesteron enthält. *In vitro* konnte demonstriert werden, dass Spermien entlang eines Progesteron-Gradienten migrieren (Eisenbach and Giojalas, 2006, Kaupp *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2005). Spermien werden somit durch die hFF in Richtung der Eizelle geleitet. Analysen verschiedener Chemokin-Rezeptoren bei multiplen gesunden Probanden zeigen, dass von den in dieser Arbeit untersuchten 17 Rezeptoren u.a. CCR6 permanent auf allen untersuchten Spermien exprimiert wurde. Darüber hinaus konnte CCL20 als CCR6-Ligand in allen untersuchten Follikelflüssigkeiten nachgewiesen werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass CCL20 neben Progesteron eine weitere chemotaktisch aktive Substanz im weiblichen Genitaltrakt ist. Dies wird durch weitere Ergebnisse unserer Kooperationspartner unterstützt, die zeigen konnten, dass CCL20 in den hFF Proben gesunder Spenderinnen permanent nachweisbar war (Duan *et al.*, 2020). In der zitierten Studie konnte CCL20 spezifisch an den Rezeptor CCR6 von humanen Spermien binden. Anhand der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CCR6/CCL20-Achse eine entscheidende Bedeutung in der Entstehung für männliche Infertilität haben könnte. Diese Schlussfolgerung wird im Folgenden näher erläutert und diskutiert.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen unserer Chemokinrezeptoranalysen von humanen Spermien stehen die Studien von Muciaccia *et al.*, die zeigen, dass CCR3 und CCR5 sehr wohl auf der Oberfläche humaner Spermien exprimiert werden (Muciaccia *et al.*, 2005). CCL5 und seine Rezeptoren CCR3 und CCR5 scheinen eine wichtige Rolle für die Motilität von Spermien und für die Akrosomen-Reaktion einzunehmen (Lishko *et al.*, 2011, Muciaccia *et al.*, 2005, Strünker *et al.*, 2011). CCR3 ist in der postakrosomalen Region und CCR5 in der periakrosomalen Region von humanen Spermien lokalisiert (Barbonetti *et al.*, 2008, Muciaccia *et al.*, 2005). Humane Spermien migrieren entlang eines CCL5-Gradienten. Spermien zeigen eine verminderte Fähigkeit zur Fertilisation, wenn sie mit hohen CCL5-Konzentrationen, vergleichbar mit denen unter

inflammatorischen Bedingungen, inkubiert werden (Barbonetti *et al.*, 2008). Neben hohen CCL5-Konzentration konnten Naz *et al.* zeigen, dass auch niedrigere Level von CCL5 im Seminalplasma mit Infertilität einhergehen können (Naz and Leslie, 2000). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chemokinrezeptoranalysen konnten in allen untersuchten Proben lediglich geringe bis gar keine Expression von CCR3 und CCR5 gezeigt werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten u.a. durch unterschiedliche Entwicklungsstadien der untersuchten Spermien erklärt werden. In dieser Arbeit wurden lediglich Spermien nach erfolgreicher Kapazitation und nach Durchführung eines *swim ups* zur Selektion von gesunden und motilen Spermien untersucht. Muciaccia *et al.* untersuchten die Rezeptorexpression von frisch ejakulierten Spermien immunchemisch sowie immunzytologisch ohne vorherige Kapazitation und Selektion. Während der Kapazitation verändert sich das Oberflächenproteinprofil humaner Spermien. Insbesondere zeigt sich während der Kapazitation eine signifikante Abnahme der CCR5 Oberflächenexpressionsraten. Dieser Effekt scheint nach Fixierung im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen aufgehoben zu sein. Die immunhistochemische Fixierung erhöht die Permeabilität der Spermienmembran, sodass Antikörper leichter in den intrazellulären Raum gelangen können. Barbonetti *et al.* postulierten hohe intrazelluläre Level an CCR5 in kapazitierten Spermien, die nach Fixierung angefärbt wurden (Barbonetti *et al.*, 2009). Die Bedeutung der von der Kapazitation abhängigen CCR5 Expression ist derzeit noch nicht geklärt. Eine regelhafte Kapazitation könnte u.a. durch Rezeptor-Liganden-Bindung mit konsekutiver Internalisierung erfolgen. Des Weiteren bindet CCL5 neben den genannten Rezeptoren CCR3 und CCR5 ebenfalls an CCR1 und CCR4. Beide Rezeptoren werden an der Oberfläche von humanen Spermien exprimiert und könnten die chemotaktischen Effekte ebenfalls beeinflussen (Appay and Rowland-Jones, 2001, Udi *et al.*, 2013).

Um die Funktion der CCR6/CCL20-Achse bei der Gameteninteraktion genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Chemotaxis-Assay etabliert, der eine Analyse der Zellmigration entlang eines chemischen Gradienten ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass sich humane Spermien fertiler Spender in Richtung eines CCL20-Gradienten bewegen. Es wurden drei verschiedene CCL20-Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml) untersucht und zwischen gerichteter und ungerichteter Migration entlang der Gradienten unterschieden. Die meisten Spermien zeigten bei einer CCL20-Konzentration von 100 ng/ml eine signifikante Reaktion. Bei niedrigeren (10 ng/ml) oder höheren (1000 ng/ml) Konzentrationen zeigten weniger Spermien eine chemotaktische

Antwort. Die Reaktionen waren in etwa auf demselben Niveau wie bei durchgeführten Mediumkontrollen. Des Weiteren war ein für chemotaktisch ausgelöste Phänomene typischen glockenförmigen Verlauf im Diagramm erkennbar. Dies konnte somit in der vorliegenden Arbeit erstmals bei humanen Spermien gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für den glockenförmigen Verlauf ist, dass bei zu geringen CCL20-Konzentrationen die Zahl der besetzten Rezeptoren zu niedrig ist, um die intrazellulären Signalkaskaden auszulösen, an deren Ende eine Änderung im Motilitätsverhalten steht. Erhöht man die Konzentration des Chemokins, geht eine immer höhere Anzahl an Rezeptoren eine Bindung mit ihren Liganden ein, bis bei einer gewissen Schwellenkonzentration alle Oberflächenrezeptoren besetzt sind. Die Rezeptoren sind maximal gesättigt und werden zum Teil internalisiert. Bei weiter steigender Chemokinkonzentration sind keine weiteren Bindungsstellen frei, um die noch höheren Konzentrationen wahrzunehmen. Eine konzentrationsabhängige chemotaktische Antwort ist somit bei zu geringen und bei zu hohen Konzentrationen nicht mehr möglich (Adler, 1973, Ralt *et al.*, 1994).

Follikelflüssigkeit gesunder Spenderinnen konnte die stärkste chemotaktische Antwort unter allen in der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuchsbedingungen auslösen. Diese Antwort war stärker als die chemotaktische Antwort von Spermien unter dem alleinigen Einfluss von CCL20. In einem nächsten Schritt wurde hFF chromatografisch aufgetrennt und CCL20 herausgefiltert. Dies diente der Untersuchung, inwieweit CCL20 eine Schlüsselfunktion in der Chemotaxis humaner Spermien einnehmen könnte. Mittels ELISA konnte nachgewiesen werden, dass das aufgefangene Eluat signifikante Mengen an CCL20 enthielt. Die gefilterte Follikelflüssigkeit hingegen enthielt kaum nachweisbare CCL20-Konzentrationen. Bei den im Anschluss durchgeführten Migrationsassays migrierten die Spermien gesunder Probanden in geringerem Ausmaß, aber immer noch deutlich in Richtung des Gradienten der gefilterten hFF. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der gängigen Literatur, das unter physiologischen Bedingungen sich neben CCL20 weitere chemotaktisch aktive Stoffe wie z.B. CCL5 und Progesteron in der hFF befinden (Eisenbach and Giojalas, 2006, Kaupp *et al.*, 2008, Lishko *et al.*, 2011, Muciaccia *et al.*, 2005, Strünker *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2005).

Spermien, die bis zur Oozyte gelangt sind, müssen vor der Akrosomenreaktion den Oozyten-Cumulus-Komplex durchdringen. Dabei ist die zeitlich korrekte Interaktion zwischen Eizelle und Spermium notwendig, um eine Fertilisation zu ermöglichen. Für

die ideale Bedingung, unter denen kapazitierte Spermien zur Eizelle gelangen, wird durch den korrekten Aufbau der Cumulus-Zellen sowie der Zona pellucida gesorgt (Fulop *et al.*, 2003, Van Soom *et al.*, 2002, Tamba *et al.*, 2008, Primakoff and Myles, 2002). Membranständige und sekretorische Enzyme, wie zum Beispiel Hyaluronidase oder Acrosin, versetzen Spermien in die Lage, die Zona pellucida zu durchdringen. Die enzymatische Spaltung ist höchstwahrscheinlich notwendig, da die rein mechanische Kraft der Spermien nicht ausreichend ist (Primakoff and Myles, 2002, Modelski *et al.*, 2014). Eine strukturelle Veränderung der EZM erschwert die Penetration der Spermien. Nach Penetration beider Schichten folgt als letzter Schritt die Akrosomenreaktion (Fulop *et al.*, 2003, Matteo *et al.*, 2017).

Im letzten Schritt der Befruchtung menschlicher Gameten verschmelzen Spermienmembran und Oozytenmembran in der sogenannten Akrosomenreaktion miteinander. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zur Akrosomenreaktion führen, sind bis dato nicht vollständig verstanden. In älteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Prostaglandin E₂ und seinem Rezeptor EP2 sowie CCL7 eine bedeutende Rolle während der Akrosomenreaktion einnehmen (Tamba *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich der Rezeptor CCR6 vor allem im Bereich des Flagellums sowie der äquatorialen Ebene des Kopfbereiches des Spermiums befindet. Nach CCL20 Bindung an seinen Rezeptor kommt es zum Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Die Zilienschlagfrequenz wird durch diesen Ca²⁺-Einstrom gesteuert (Caballero-Campo *et al.*, 2014). Die äquatoriale Ebene ist für die Akrosomenreaktion von Bedeutung. Das Spermium legt sich während der Akrosomenreaktion mit der CCR6-positiven äquatorialen Ebene an die Oozytenmembran an. Oozyte und Granulosazellen sind in der Lage CCL20 zu bilden (Duan *et al.*, 2020). Die mikroskopische Lokalisation von CCL20 und insbesondere CCR6 lässt somit vermuten, dass die CCR6/CCL20-Achse sowohl an der Spermienpenetration als auch an der Akrosomenreaktion, respektive Gametenfusion beteiligt sein könnten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Caballero-Campo *et al.*, die zeigen konnten, dass CCR6 im Bereich der äquatorialen Ebene und im Schwanzbereich von humanen Spermien exprimiert wird. Des Weiteren konnten sie CCL20 in hFF nachweisen. Sie konnten zeigen, dass Spermien mit einer Geschwindigkeitsveränderung in Anwesenheit eines CCL20 Gradienten reagieren und sich Spermien in Richtung eines CCL20-Gradienten fortbewegen. In der zitierten Arbeit zeigten humane Spermien eine stärkere chemotaktische Antwort in Anwesenheit eines CCL20 Gradienten als in Gegenwart eines

Gradienten humaner Follikelflüssigkeit. Dieser Widerspruch zu unseren Ergebnissen könnte an unterschiedlichen verwendeten CCL20 Konzentrationen liegen. Caballero-Campo *et al.* verwendeten eine deutlich geringere CCL20 Konzentration von lediglich 1000 pg/ml. Des Weiteren wurden für die Chemotaxisassays eine Zigmond-Zählkammer verwendet, die sich im Aufbau von dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau unterscheidet (Caballero-Campo *et al.*, 2014, Zigmond, 1977).

Chronische Entzündungen des männlichen Genitaltraktes sind hauptsächlich für Infertilität (Katz *et al.*, 2017). Histologische Untersuchungen von Hodengewebe infertiler Männer mit testikulärer Entzündung zeigen lymphozytenreiche Entzündungsinfiltrate. Diese lassen vermuten, dass die CCR6/CCL20-Achse Einfluss auf die Entstehung von männlicher Infertilität haben könnte. Entzündungsreaktionen können fokal oder multifokal auftreten. Immunhistochemische Färbungen von testikulären Gewebeproben infertiler Männer mit chronischer Nebenhodenentzündung zeigen hohe CCL20-Expressionsraten in den interstitiellen Entzündungsinfiltraten. Die Infiltrate sind in der Regel peritubulär und gehen mit einem Untergang der Tubuli seminiferi einher. Auch bei unregelmäßig oder sporadisch auftretenden Entzündungsinfiltraten können diese Entzündungsreaktionen zu einem signifikanten und irreversiblen Rückgang des Hodenvolumens führen. Die Qualität der Spermatogenese verschlechtert sich signifikant. Allam *et al.* konnten zeigen, dass Ejakulate von Männern mit chronischer Nebenhodenentzündung eine signifikant höhere Rate an apoptotischen Spermien aufweisen als Ejakulate von gesunden Kontrollgruppen. Es kann in der Folge zu einer Azoospermie kommen (Allam *et al.*, 2008, Duan *et al.*, 2020, Haidl *et al.*, 2018). Bei in- oder subfertilen Männern ohne Entzündungsreaktion konnten immer noch geringe Mengen CCL20 interstitiell dargestellt werden. Im Vergleich hierzu zeigten Gewebeproben von gesunden Männern keinerlei Expression von CCL20 in den Tubuli seminiferi. Spermien einer gesunden Kontrollgruppe zeigten höhere CCR6-Expressionen als Spermien von Männern mit chronischen Entzündungen des Genitaltraktes (Duan *et al.*, 2020). Callero-Campo *et al.* konnten bei gesunden Mäusen erhöhte Expressionen von Ccr6 mRNA im testikulären Gewebe nachweisen (Caballero-Campo *et al.*, 2014). Dementsprechend lässt sich annehmen, dass eine CCR6-Expression auf Spermien einen physiologischen Zustand widerspiegelt. Die erhöhten CCL20-Konzentrationen im Nebenhoden könnten zu einer Differenzierungsstörung der Spermatozyten und zu einer Absättigung von CCR6 und konsekutiver Internalisierung führen. Die CCL20/CCR6-Achse scheint somit neben der Motilität, der Vitalität, der Akrosomenreaktion und der

Apoptose von Spermien ebenfalls die physiologische Ausreifung und die Qualität des Seminalplasmas zu beeinflussen. Dies wird durch die Beobachtung früherer Arbeiten unserer Kooperationspartner unterstrichen, welche eine Korrelation zwischen hohen CCR6-Expressionsraten auf Spermien und der Spermienvorwärtsbewegung, Morphologie und Vitalität nachweisen konnten. Die CCR6-Expression auf Spermien korrelierte hierbei invers mit der CCL20-Konzentration im Seminalplasma. Die CCL20-Konzentration korrelierte wiederum direkt mit der IL-6-Konzentration im Seminalplasma (Duan *et al.*, 2020). IL-6 stellt einen Marker für Inflammation dar (Jordan *et al.*, 2017). Migrationsassays mit Spermien infertiler Spender mit hohen CCL20-Konzentrationen im Seminalplasma zeigen keine Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen Mediumkontrolle und hFF. Um die Bedeutung dieser Beobachtung näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Proben fertiler Spender unter Blockade des CCR6-Rezeptors mit neutralisierenden Anti-CCR6-Antikörpern oder Neutralisation von CCL20 *in vitro* untersucht, um Bedingungen einer chronischen Nebenhodenentzündung zu simulieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Migration der behandelten Spermien im Vergleich unbehandelter Spermien in Richtung eines CCL20-Gradienten abnahm. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass bei den Proben infertiler Männer die CCR6-Rezeptoren durch hohe CCL20-Konzentrationen abgesättigt sind. Sie können folglich nicht mehr in Richtung des Gradienten des in hFF befindliche CCL20 migrieren.

Frühere Arbeiten von Duan *et al.* konnten zeigen, dass bei testikulären Entzündungsreaktionen Th17-Zellen eine entscheidende Rolle einnehmen (Duan *et al.*, 2011). Bei testikulären Gewebeproben von Männern mit chronischer Nebenhodenentzündung oder Azoospermie kamen im Vergleich zur gesunden Spermatogenese interstitielle entzündliche Infiltrate mit erhöhten Leveln von Th17-Zellen sowie ihren Zytokinen IL-17A, IL-21 und IL-22 zur Darstellung. Ebenfalls konnten erhöhte Mengen von IL-23-bildenden antigen-präsentierenden Zellen (APC) gemessen werden. Die Bildung von APC wird unter anderem über Th17-Zellen gesteuert (Duan *et al.*, 2011). Th17-Zellen scheinen somit ein kritischer Faktor in der Pathogenese von männlicher Infertilität bei chronischer Nebenhodenentzündung zu sein. Th17-Zellen und B-Zellen werden während entzündlichen und immunologischen Reaktionen durch CCL20 rekrutiert und chemotaktisch zum Entzündungsherd geleitet. Th17-Zellen stimulieren *in vitro* über die Bildung von IL-17, IL-22 und TNF-alpha die Bildung von CCL20 und Beta-Defensinen auf Proteinebene in epidermalen Keratozyten sowie einigen

Endothelzellen. Beide scheinen zum einen als Adhäsionsmoleküle für CCR6⁺-Zellen zu dienen. Zum anderen führt die CCR6 Aktivierung über Beta-Defensinen im Gegensatz zur Aktivierung von CCR6 über CCL20 nicht zur Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺-Speichern. Die Zellen reagieren somit nicht mit einer Hyperaktivierung. Immunzellen werden unter Ausbildung eines *Circulus vitiosus* daran gehindert, den Ort der Entzündung zu verlassen (Ghannam *et al.*, 2011, Hirata *et al.*, 2010, Reboldi *et al.*, 2009). In Zusammenschau lässt sich somit propagieren, dass CCR6-Rezeptoren auf Spermien bei einer chronischen Orchitis bereits im Nebenhoden abgesättigt und internalisiert werden. Eine chemotaktische Antwort auf CCL20 wäre dann nicht mehr adäquat möglich. Diese Hypothese wird durch eine *In-Vivo*-Studie von Oliva *et al.* unterstützt, die zeigen konnte, dass Männer mit chronischer Nebenhodenentzündung eine geringere Fertilität als gesunde Männer aufweisen (Oliva and Multigner, 2018).

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die Methode des verwendeten Migrationsassays dar, welcher von unserer Arbeitsgruppe neu entwickelt wurde. Mit dem Assay lassen sich Veränderungen in der Chemotaxis (Fähigkeit einer Zelle, sich in Richtung eines Konzentrationsgradienten zu bewegen) gut untersuchen. Es lassen sich jedoch keine Aussagen zur Chemokinese (Fähigkeit einer Zelle, sich bei Konzentrationsunterschieden schneller zu bewegen) und zum „Trapping“ (Akkumulation von Zellen an einem Ort aufgrund Migrationsgeschwindigkeitsänderungen) machen (Eisenbach, 1999a, Eisenbach, 1999b, Eisenbach and Giojalas, 2006, Zigmond, 1977). Eine weitere Limitation stellt die verhältnismäßig geringe Zahl untersuchter Probanden dar. Dies könnte in der statistischen Auswertung zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. Weitere Experimente mit höheren Fallzahlen sind notwendig, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen. Die von uns verwendete Negativkontrolle CCL21 müsste ebenfalls in weiteren Studien detaillierter untersucht werden. Der CCL21 Rezeptor CCR7 wurde zumindest in geringen Maßen von Spermien exprimiert. Die genaue physiologische Bedeutung hiervon ist noch unklar. Des Weiteren muss die klinische Relevanz der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse gezeigt werden.

Gewonnen Erkenntnisse könnten z.B. bei der assistierten Reproduktion („künstliche Befruchtung“) genutzt werden. Die Qualität der Spermien ist dabei entscheidend für die Auswahl der geeigneten Therapie. Geeignete Spermien zur assistierten Reproduktion sollten motil sowie normal geformt sein, damit eine Akrosomenreaktion stattfinden kann. Die Verwendung dieser Spermien erhöht die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung (Sharma *et al.*, 2018). Chemotaktische Eigenschaften könnten als Werkzeug

zur Selektion von geeigneten Spermien im Rahmen assistierter Reproduktionsverfahren verwendet werden, um chemosensible Spermien zu selektieren. Geeignete Verfahren zur Analyse der Spermienqualität sind neben der Ejakulatanalyse die Gewinnung einer Stanzbiopsie aus Hodengewebe. Zeigen sich hier Zeichen einer Entzündung (z.B. erhöhte Anzahl von Leukozyten), sollten dem Mann antientzündliche Therapien angeboten werden, um somit den o.g. *Circulum vitiosus* zu unterbrechen und eine regelhafte Spermienreifung zu ermöglichen. Im klinischen Alltag werden seit Jahrzehnten die gleichen Kombinationen einer antibiotischen Therapie mit z.B. Tetracyklinen mit einer anti-inflammatorischen Therapie mit z.B. nichtsteroidalen Antirheumatika angewandt. Der Therapieerfolg ist lediglich mäßig und assistierte Reproduktionsmaßnahmen sind trotz medikamentöser Therapie notwendig (Krause, 1993, Sharma *et al.*, 2018, Vicari, 2000). Alternativ könnten in Zukunft Anti-CCL20-Antikörper als therapeutischer Ansatz genutzt werden. Das *Dry-eye-syndrom* (DES) in der Ophthalmologie ist wie die chronische Orchitis eine multifaktoriell bedingte Erkrankung und ebenfalls noch nicht vollständig verstanden. CCL20 ist auf dem Epithel der Augenoberfläche exprimiert und bei DES Patienten vermehrt nachweisbar. Aktuelle Untersuchungen in einem DES-Mausmodell zeigen nun erstmal, dass eine Blockade durch Anti-CCL20-Antikörper die Vermehrung von Th17-Zellen verringert und die klinische Symptomatik verbessert (Heidari *et al.*, 2020). Dieser vielversprechende Ansatz könnte bei der chronischen Orchitis in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die potentielle klinische Bedeutung der Chemotaxis menschlicher Spermien ist nicht auf die Verfahren der ART beschränkt. Neben unerfülltem Kinderwunsch stellen steigende Geburtenraten in einigen Teilen der Welt ein immer größer werdendes soziales und ökonomisches Problem dar. Tiefergehende Erkenntnisse auf dem Gebiet der gerichteten Migration humaner Spermien könnten bei der Entwicklung von neuen Kontrazeptionsverfahren prinzipiell von Nutzen sein. Für den Mann gibt es neben dem Kondom derzeit keine weitere wirkungsvolle, nebenwirkungsarme und reversible Kontrazeptionsmöglichkeit. Bisherige Therapieversuche durch Suppression von Gonaotropinen mit z.B. Testosteron, GnRH- oder Gestagen-Analoga führten zwar zu einer reversiblen und wirkungsvollen Kontrazeption, bei den Probanden zeigten sich jedoch Nebenwirkungen, wie eine Erhöhung der Blutfettwerte, starke Gewichtszunahme, Nachtschweiß, Gynäkomastie, Abnahme des Hodenvolumens, starke Lokalreaktionen an den Injektionsstellen oder Libidoverlust (Anawalt and Amory, 2001, Ilani *et al.*, 2011). Bereits vor einigen Jahren diskutierten daher Lee *et al.* als weiteren potenziellen

Wirkmechanismus einer chemischen Kontrazeption beim Mann die Modulation der Spermatogenese. Als mögliche Zielstruktur nannten die Autoren auch die Unterbindung der Zell-zu-Zell Kommunikation zwischen Gameten und Sertolizellen (Lee *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund könnte die CCR6/CCL20-Achse ein Angriffspunkt für die Entwicklung neuartiger medikamentöser Möglichkeiten der Kontrazeption beim Mann sein.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuartiger Chemotaxis-Assay zur Analyse des Migrationsverhaltens von Zellen etabliert werden. Des Weiteren konnte CCL20 neben Progesteron und CCL5 als weitere chemotaktisch aktive Substanz in hFF identifiziert werden. Darüber hinaus konnten wir ein das Chemokinrezeptorprofil humaner Spermien definieren. Die Bedeutung der Interaktion zwischen CCL20 und CCR6 für die Spermatogenese und die Akrosomenreaktion ist noch nicht abschließend geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die CCR6/CCL20-Achse eine Ursache dafür sein könnte, dass Spermien, die durch eine Entzündungsreaktion z.B. im Rahmen einer chronischen Orchitis in ihrem Aufbau beeinträchtigt sind, nicht in der Lage sind bis zur Oozyte zu migrieren und die Eizelhülle zu penetrieren. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass CCR6-Signale neben ihren immunologischen Funktionen weitere zellulären Schlüsselfunktionen steuern. Die CCL20-CCR6 Interaktion scheint ein wichtiger Faktor für die humane Gameteninteraktion zu sein und könnte eine Rolle bei der Entstehung von Infertilität spielen.

5 Literaturverzeichnis

- ADLER, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 74, 77-91.
- ALEXANDER, S. P. H., MATHIE, A. & PETERS, J. A. 2011. G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *British Journal of Pharmacology*, 164, S5-S113.
- ALLAM, J. P., FRONHOFFS, F., FATHY, A., NOVAK, N., OLTERMANN, I., BIEBER, T., SCHUPPE, H. C. & HAIDL, G. 2008. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologia*, 40, 329-34.
- ANAWALT, B. D. & AMORY, J. K. 2001. Male hormonal contraceptives. *Expert Opin Pharmacother*, 2, 1389-98.
- APPAY, V. & ROWLAND-JONES, S. L. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*, 22, 83-7.
- BAHAT, A., CAPLAN, S. R. & EISENBACH, M. 2012. Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS One*, 7, e41915.
- BAHAT, A., EISENBACH, M. & TUR-KASPA, I. 2005. Periovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod*, 20, 2118-21.
- BAHAT, A., TUR-KASPA, I., GAKAMSKY, A., GIOJALAS, L. C., BREITBART, H. & EISENBACH, M. 2003. Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med*, 9, 149-50.
- BARBONETTI, A., VASSALLO, M. R., ANTONANGELO, C., NUCCETELLI, V., D'ANGELI, A., PELLICCIONE, F., GIORGI, M., FRANCAVILLA, F. & FRANCAVILLA, S. 2008. RANTES and human sperm fertilizing ability: effect on acrosome reaction and sperm/oocyte fusion. *Mol Hum Reprod*, 14, 387-91.
- BARBONETTI, A., VASSALLO, M. R. C., PELLICCIONE, F., D'ANGELI, A., SANTUCCI, R., MUCIACCIA, B., STEFANINI, M., FRANCAVILLA, F. & FRANCAVILLA, S. 2009. Beta-chemokine receptor CCR5 in human spermatozoa and its relationship with seminal parameters. *Human Reproduction*, 24, 2979-2987.
- BARRATT, C. L. & COOKE, I. D. 1991. Sperm transport in the human female reproductive tract--a dynamic interaction. *Int J Androl*, 14, 394-411.
- BÖHMER, M., VAN, Q., WEYAND, I., HAGEN, V., BEYERMANN, M., MATSUMOTO, M., HOSHI, M., HILDEBRAND, E. & KAUPP, U. B. 2005. Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *PLoS One*, 24, 2741-2752.
- BOIVIN, J., BUNTING, L., COLLINS, J. A. & NYGREN, K. G. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 22, 1506-12.
- BRAND, S., OLSZAK, T., BEIGEL, F., DIEBOLD, J., OTTE, J. M., EICHHORST, S. T., GOKE, B. & DAMBACHER, J. 2006. Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem*, 97, 709-23.

- BRONSON, R. 1998. Is the oocyte a non-professional phagocyte? *Hum Reprod Update*, 4, 763-75.
- BURKE, S. J., KARLSTAD, M. D., REGAL, K. M., SPARER, T. E., LU, D., ELKS, C. M., GRANT, R. W., STEPHENS, J. M., BURK, D. H. & COLLIER, J. J. 2015. CCL20 is elevated during obesity and differentially regulated by NF-kappaB subunits in pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta*, 1849, 637-52.
- BUSILLO, J. M., ARMANDO, S., SENGUPTA, R., MEUCCI, O., BOUVIER, M. & BENOVIC, J. L. 2010. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*, 285, 7805-17.
- CABALLERO-CAMPO, P., BUFFONE, M. G., BENENCIA, F., CONEJO-GARCÍA, J. R., RINAUDO, P. F. & GERTON, G. L. 2014. A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis. *Journal of cellular physiology*, 229, 68-78.
- CHENG, Z. J., ZHAO, J., SUN, Y., HU, W., WU, Y. L., CEN, B., WU, G. X. & PEI, G. 2000. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem*, 275, 2479-85.
- CHUNG, A. C. & LAN, H. Y. 2011. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 22, 802-9.
- CICINELLI, E., EINER-JENSEN, N., BARBA, B., LUISI, D., ALFONSO, R. & TARTAGNI, M. 2004. Blood to the cornual area of the uterus is mainly supplied from the ovarian artery in the follicular phase and from the uterine artery in the luteal phase. *Hum Reprod*, 19, 1003-8.
- COHEN-DAYAG, A., RALT, D., TUR-KASPA, I., MANOR, M., MAKLER, A., DOR, J., MASHIACH, S. & EISENBACH, M. 1994. Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol Reprod*, 50, 786-90.
- COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S. & EISENBACH, M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11039-43.
- DAVID, A., VILENSKY, A. & NATHAN, H. 1971. [Temperature changes in different parts of the rabbit oviduct. Preliminary report]. *Harefuah*, 80, 180-2.
- DAVIES, M. J., MOORE, V. M., WILLSON, K. J., VAN ESSEN, P., PRIEST, K., SCOTT, H., HAAN, E. A. & CHAN, A. 2012. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med*, 366, 1803-13.
- DELLACASAGRANDE, J., SCHREURS, O. J. F., HOFGAARD, P. O., OMHOLT, H., STEINSVOLL, S., SCHENCK, K., BOGEN, B. & DEMBIC, Z. 2003. Liver Metastasis of Cancer Facilitated by Chemokine Receptor CCR6. *Scandinavian Journal of Immunology*, 57, 534-544.
- DOHLMAN, T. H., CHAUHAN, S. K., KODATI, S., HUA, J., CHEN, Y., OMOTO, M., SADRAI, Z. & DANA, R. 2013. The CCR6/CCL20 axis mediates Th17 cell migration to the ocular surface in dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, 4081-91.
- DUAN, Y. G., WEHRY, U. P., BUHREN, B. A., SCHRUMPF, H., OLÁH, P., BÜNEMANN, E., YU, C. F., CHEN, S. J., MÜLLER, A., HIRCHENHAIN, J., VAN LIEROP, A., NOVAK, N., CAI, Z. M., KRÜSSEL, J. S., SCHUPPE,

- H. C., HAIDL, G., GERBER, P. A., ALLAM, J. P. & HOMEY, B. 2020. CCL20-CCR6 axis directs sperm-oocyte interaction and its dysregulation correlates/associates with male infertility. *Biol Reprod*.
- DUAN, Y. G., YU, C. F., NOVAK, N., BIEBER, T., ZHU, C. H., SCHUPPE, H. C., HAIDL, G. & ALLAM, J. P. 2011. Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *Int J Androl*, 34, e536-45.
- EISENBACH, M. 1999a. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet*, 25, 87-94.
- EISENBACH, M. 1999b. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod*, 4, 56-66.
- EISENBACH, M. & GIOJALAS, L. C. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 276-85.
- EISENBACH, M. & RALT, D. 1992. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am J Physiol*, 262, C1095-101.
- ELGUETA, R., MARKS, E., NOWAK, E., MENEZES, S., BENSON, M., RAMAN, V. S., ORTIZ, C., O'CONNELL, S., HESS, H., LORD, G. M. & NOELLE, R. 2015. CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *J Immunol*, 194, 505-13.
- FABRO, G., ROVASIO, R. A., CIVALERO, S., FRENKEL, A., CAPLAN, S. R., EISENBACH, M. & GIOJALAS, L. C. 2002. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod*, 67, 1565-71.
- FACCO, M., BAESSO, I., MIORIN, M., BORTOLI, M., CABRELLE, A., BOSCARO, E., GURRIERI, C., TRENTIN, L., ZAMBELLO, R., CALABRESE, F., CASSATELLA, M. A., SEMENZATO, G. & AGOSTINI, C. 2007. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J Leukoc Biol*, 82, 946-55.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-72.
- FULOP, C., SZANTO, S., MUKHOPADHYAY, D., BARDOS, T., KAMATH, R. V., RUGG, M. S., DAY, A. J., SALUSTRI, A., HASCALL, V. C., GLANT, T. T. & MIKECZ, K. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*, 130, 2253-61.
- GHANNAM, S., DEJOU, C., PEDRETTI, N., GIOT, J. P., DORGHAM, K., BOUKHADDAOUI, H., DELEUZE, V., BERNARD, F. X., JORGENSEN, C., YSSEL, H. & PENE, J. 2011. CCL20 and beta-defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium in vitro under flow conditions. *J Immunol*, 186, 1411-20.
- GRIFFITH, J. W., SOKOL, C. L. & LUSTER, A. D. 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 659-702.
- GUERRERO, A., NISHIGAKI, T., CARNEIRO, J., YOSHIRO, T., WOOD, C. D. & DARSZON, A. 2010. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344, 52-65.
- HABBEMA, J. D. F., COLLINS, J., LERIDON, H., EVERS, J. L. H., LUNENFELD, B. & TEVELDE, E. R. 2004. Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Human Reproduction*, 19, 1497-1501.

- Haidl, G., Haidl, F., Allam, J. P. & Schuppe, H. C. 2018. Therapeutic options in male genital tract inflammation. *Andrologia*, e13207.
- Hammerich, L., Bangen, J. M., Govaere, O., Zimmermann, H. W., Gassler, N., Huss, S., Liedtke, C., Prinz, I., Lira, S. A., Luedde, T., Roskams, T., Trautwein, C., Heymann, F. & Tacke, F. 2014. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of gammadelta T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 59, 630-42.
- Hedrick, M. N., Lonsdorf, A. S., Hwang, S. T. & Farber, J. M. 2010. CCR6 as a possible therapeutic target in psoriasis. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 911-22.
- Heidari, M., Noorizadeh, F., Wu, K., Inomata, T. & Mashaghi, A. 2020. Das trockene Auge: Neue Ansätze für Diagnostik und Therapie. *Kompass Ophthalmologie*, 6, 64-75.
- Hilbert, S. M. & Gundersen, S. 2019. Complications of Assisted Reproductive Technology. *Emerg Med Clin North Am*, 37, 239-249.
- Hirata, T., Osuga, Y., Takamura, M., Kodama, A., Hirota, Y., Koga, K., Yoshino, O., Harada, M., Takemura, Y., Yano, T. & Taketani, Y. 2010. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology*, 151, 5468-76.
- Ilani, N., Swerdloff, R. S. & Wang, C. 2011. Male hormonal contraception: potential risks and benefits. *Rev Endocr Metab Disord*, 12, 107-17.
- Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N. & Toyoda, N. 2002. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*, 17, 1441-6.
- Ito, T., Carson, W. F. T., Cavassani, K. A., Connett, J. M. & Kunkel, S. L. 2011. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Exp Cell Res*, 317, 613-9.
- Jaiswal, B. S., Eisenbach, M. & Tur-Kaspa, I. 1999. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod*, 5, 214-9.
- Jameel, T. 2008. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *J Pak Med Assoc*, 58, 71-4.
- Johnson, M. H. 2019. A short history of in vitro fertilization (IVF). *Int J Dev Biol*, 63, 83-92.
- Jordan, S. C., Choi, J., Kim, I., Wu, G., Toyoda, M., Shin, B. & Vo, A. 2017. Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection: Therapeutic Implications of IL-6 Receptor Blockade. *Transplantation*, 101, 32-44.
- Judycka, S., Ciereszko, A., Dobosz, S., Zalewski, T. & Dietrich, G. J. 2017. Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol*, 245, 89-93.
- Katz, D. J., Teloken, P. & Shoshany, O. 2017. Male infertility - The other side of the equation. *Aust Fam Physician*, 46, 641-646.
- Kaupf, U. B., Kashikar, N. D. & Weyand, I. 2008. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol*, 70, 93-117.
- Kinney, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. & Levin, B. 2007. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22, 1175-85.

- KRAUSE, W. 1993. [Andrologic indications for assisted reproduction techniques. When can increased fertilization rates by assisted reproduction be expected?]. *Fortschr Med*, 111, 164-7.
- LAFFERTY, M. K., SUN, L., CHRISTENSEN-QUICK, A., LU, W. & GARZINO-DEMO, A. 2017. Human Beta Defensin 2 Selectively Inhibits HIV-1 in Highly Permissive CCR6⁺CD4⁺ T Cells. *Viruses*, 9, 111.
- LAGERSTROM, M. C. & SCHIOTH, H. B. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 339-57.
- LEE, A. Y. & KORNER, H. 2017. CCR6/CCL20 chemokine axis in human immunodeficiency virus immunity and pathogenesis. *J Gen Virol*, 98, 338-344.
- LEE, A. Y. S., ERI, R., LYONS, A. B., GRIMM, M. C. & KORNER, H. 2013. CC Chemokine Ligand 20 and Its Cognate Receptor CCR6 in Mucosal T Cell Immunology and Inflammatory Bowel Disease: Odd Couple or Axis of Evil? *Frontiers in Immunology*, 4, 194.
- LEE, N. P., WONG, E. W., MRUK, D. D. & CHENG, C. Y. 2009. Testicular cell junction: a novel target for male contraception. *Curr Med Chem*, 16, 906-15.
- LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-7.
- LISHKO, P. V., BOTCHKINA, I. L. & KIRICHOK, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471, 387.
- LOTT, G. 1872. *Zur Anatomie und Physiologie des Cervix uteri*, Ferdinand Enke.
- LOTTSPREICH, F., ENGELS, J.W., SOLODKOFF ZETTLMEIER, L. 2012. "Bioanalytik". Springer Verlag.
- LU, M.-Y., LU, S.-S., CHANG, S.-L. & LIAO, F. 2018. The Phosphorylation of CCR6 on Distinct Ser/Thr Residues in the Carboxyl Terminus Differentially Regulates Biological Function. *Frontiers in immunology*, 9, 415-415.
- LUEGERING, A., MEAD, J., HUDSON, J. T., III, KUCHARZIK, T. & WILLIAMS, I. 2003. CCR6 deficient mice with increased numbers of CD4⁺CD8⁺ TCR intestinal intraepithelial lymphocytes exhibit enhanced innate immunity to infection with the nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Gastroenterology*, 124, A339.
- LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115, 455-65.
- MATSUMOTO, M., SOLZIN, J., HELBIG, A., HAGEN, V., UENO, S.-I., KAWASE, O., MARUYAMA, Y., OGISO, M., GODDE, M., MINAKATA, H., KAUPP, U. B., HOSHI, M. & WEYAND, I. 2003. A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Developmental Biology*, 260, 314-324.
- MATTEO, M., CICINELLI, E., NERI, M., CARRUBBA, R., CARPAGNANO, F. A., ROMEO, F., SCUTIERO, G., GRECO, P., GARLANDA, C., VENDEMIALE, G., LEVI SETTI, P. E. & SERVIDDIO, G. 2017. Pro-inflammatory M1/Th1 type immune network and increased expression of TSG-6 in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 218, 99-105.
- MIKI, K. & CLAPHAM, D. E. 2013. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol*, 23, 443-52.

- MODELSKI, M. J., MENLAH, G., WANG, Y., DASH, S., WU, K., GALILEO, D. S. & MARTIN-DELEON, P. A. 2014. Hyaluronidase 2: a novel germ cell hyaluronidase with epididymal expression and functional roles in mammalian sperm. *Biol Reprod*, 91, 109.
- MUCIACCIA, B., PADULA, F., GANDINI, L., LENZI, A. & STEFANINI, M. 2005. HIV-1 chemokine co-receptor CCR5 is expressed on the surface of human spermatozoa. *Aids*, 19, 1424-6.
- MULLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W., WAGNER, S. N., BARRERA, J. L., MOHAR, A., VERASTEGUI, E. & ZLOTNIK, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-6.
- NANDI, B., PAI, C., HUANG, Q., PRABHALA, R. H., MUNSHI, N. C. & GOLD, J. S. 2014. CCR6, the sole receptor for the chemokine CCL20, promotes spontaneous intestinal tumorigenesis. *PloS one*, 9, e97566-e97566.
- NAZ, R. K. & LESLIE, M. H. 2000. Immunobiologic implication of RANTES in seminal plasma of fertile, infertile and immunoinfertile men. *Am J Reprod Immunol*, 44, 197-204.
- NIEDERBERGER, C., PELLICER, A., COHEN, J., GARDNER, D. K., PALERMO, G. D., O'NEILL, C. L., CHOW, S., ROSENWAKS, Z., COBO, A., SWAIN, J. E., SCHOOLCRAFT, W. B., FRYDMAN, R., BISHOP, L. A., AHARON, D., GORDON, C., NEW, E., DECHERNEY, A., TAN, S. L., PAULSON, R. J., GOLDFARB, J. M., BRÄNNSTRÖM, M., DONNEZ, J., SILBER, S., DOLMANS, M. M., SIMPSON, J. L., HANDYSIDE, A. H., MUNNÉ, S., EGUIZABAL, C., MONTSERRAT, N., IZPISUA BELMONTE, J. C., TROUNSON, A., SIMON, C., TULANDI, T., GIUDICE, L. C., NORMAN, R. J., HSUEH, A. J., SUN, Y., LAUFER, N., KOCHMAN, R., ELDAR-GEVA, T., LUNENFELD, B., EZCURRA, D., D'HOOGE, T., FAUSER, B., TARLATZIS, B. C., MELDRUM, D. R., CASPER, R. F., FATEMI, H. M., DEVROEY, P., GALLIANO, D., WIKLAND, M., SIGMAN, M., SCHOOR, R. A., GOLDSTEIN, M., LIPSHULTZ, L. I., SCHLEGEL, P. N., HUSSEIN, A., OATES, R. D., BRANNIGAN, R. E., ROSS, H. E., PENNING, G., KLOCK, S. C., BROWN, S., VAN STEIRTEGHEM, A., REBAR, R. W. & LABARBERA, A. R. 2018. Forty years of IVF. *Fertil Steril*, 110, 185-324.e5.
- OETTLE, E. E. & WISWEDEL, K. 1989. Changes in sperm motility, morphology and concentration induced by the swim-up procedure. *S Afr Med J*, 75, 22-3.
- OHTAKE, H. 1976. Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. I. Effect of pH and egg water on the respiratory rate. *J Exp Zool*, 198, 303-11.
- OKABE, M. 2016. The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 220, 1-13.
- OLIVA, A. & MULTIGNER, L. 2018. Chronic epididymitis and Grade III varicocele and their associations with semen characteristics in men consulting for couple infertility. *Asian J Androl*, 20, 360-365.
- OREN-BENAROYA, R., ORVIETO, R., GAKAMSKY, A., PINCHASOV, M. & EISENBACH, M. 2008. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*, 23, 2339-45.
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639-50.

- PRIMAKOFF, P. & MYLES, D. G. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 296, 2183-5.
- RAFAELS, N. M., BECK, L. A., GAO, P. S., HAND, T., BOGUNIEWICZ, M., HATA, T. R., SCHNEIDER, L., HANIFIN, J. M., GALLO, R. L., GAO, L., YANG, M., BEATY, T. H., LEUNG, D. Y. & BARNES, K. C. 2009. Variations in the CCL20 and CCR6 Genes are Associated with Atopic Dermatitis and Eczema Herpeticum in Populations of European and African descent. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, S70.
- RALT, D., MANOR, M., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., BEN-SHLOMO, I., MAKLER, A., YULI, I., DOR, J., BLUMBERG, S., MASHIACH, S. & ET AL. 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol Reprod*, 50, 774-85.
- RANASINGHE, R. & ERI, R. 2018. Pleiotropic Immune Functions of Chemokine Receptor 6 in Health and Disease. *Medicines*, 5, 69.
- RANSOHOFF, R. M. & TRETTEL, F. 2015. Editorial Research Topic "Chemokines and chemokine receptors in brain homeostasis". *Front Cell Neurosci*, 9, 132.
- REBOLDI, A., COISNE, C., BAUMJOHANN, D., BENVENUTO, F., BOTTINELLI, D., LIRA, S., UCCELLI, A., LANZAVECCHIA, A., ENGELHARDT, B. & SALLUSTO, F. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*, 10, 514-23.
- SALLUSTO, F. & BAGGIOLINI, M. 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature Immunology*, 9, 949.
- SHARMA, R. S., SAXENA, R. & SINGH, R. 2018. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian J Med Res*, 148, S10-s14.
- SHIBA, K., BABA, S. A., INOUE, T. & YOSHIDA, M. 2008. Ca²⁺ bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. 105, 19312-19317.
- SPEHR, M., GISSELMANN, G., POPLAWSKI, A., RIFFELL, J. A., WETZEL, C. H., ZIMMER, R. K. & HATT, H. 2003. Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis. 299, 2054-2058.
- SPEHR, M., SCHWANE, K., RIFFELL, J. A., BARBOUR, J., ZIMMER, R. K., NEUHAUS, E. M. & HATT, H. 2004. Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol Chem*, 279, 40194-203.
- STEVIC, I., PARMAR, N., PAREDES, N., BERRY, L. R., CHAN, A. K. C. J. C. B. & BIOPHYSICS 2011. Binding of Heparin to Metals. 59, 171-178.
- STRIETER, R. M. K., S.L. ; STANDIFORD, T. 2003. Lung Biology in Health and Disease. 1-341.
- STRÜNKER, T., GOODWIN, N., BRENKER, C., KASHIKAR, N. D., WEYAND, I., SEIFERT, R. & KAUPP, U. B. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471, 382.
- SUAREZ, S. S. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*, 14, 647-57.
- SUAREZ, S. S. 2016. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*, 363, 185-94.
- SUAREZ, S. S. & PACEY, A. A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12, 23-37.

- SUKCHAROEN, N., NGEAMJIRAWAT, J., CHANPRASIT, Y. & ARIBARG, A. 1994. A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement. *J Med Assoc Thai*, 77, 471-6.
- SULLIVAN-PYKE, C. S., SENAPATI, S., MAINIGI, M. A. & BARNHART, K. T. 2017. In Vitro fertilization and adverse obstetric and perinatal outcomes. *Semin Perinatol*, 41, 345-353.
- SUN, F., BAHAT, A., GAKAMSKY, A., GIRSH, E., KATZ, N., GIOJALAS, L. C., TUR-KASPA, I. & EISENBACH, M. 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod*, 20, 761-7.
- TAMBA, S., YODOI, R., SEGI-NISHIDA, E., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S. & SUGIMOTO, Y. 2008. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14539-44.
- UDI, J., SCHÜLER, J., WIDER, D., IHORST, G., CATUSSE, J., WALDSCHMIDT, J., SCHNERCH, D., FOLLO, M., WÄSCH, R. & ENGELHARDT, M. 2013. Potent in vitro and in vivo activity of sorafenib in multiple myeloma: induction of cell death, CD138-downregulation and inhibition of migration through actin depolymerization. *Br J Haematol*, 161, 104-16.
- VAN SOOM, A., TANGHE, S., DE PAUW, I., MAES, D. & DE KRUIF, A. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim*, 37, 144-51.
- VICARI, E. 2000. Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. *Hum Reprod*, 15, 2536-44.
- WACHTEN, D., JIKELI, J. F. & KAUPP, U. B. 2017. Sperm Sensory Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- WARBURTON, D., KLINE, J., STEIN, Z. AND STROBINO, B. 1986. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. *Perinatal Genetics*, 23-40.
- WELSH-BACIC, D., LINDENMEYER, M., COHEN, C. D., DRAGANOVICI, D., MANDELBAUM, J., EDENHOFER, I., ZIEGLER, U., REGELE, H., WUTHRICH, R. P. & SEGERER, S. 2011. Expression of the chemokine receptor CCR6 in human renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant*, 26, 1211-20.
- WIEDE, F., FROMM, P. D., COMERFORD, I., KARA, E., BANNAN, J., SCHUH, W., RANASINGHE, C., TARLINTON, D., WINKLER, T., MCCOLL, S. R. & KORNER, H. 2013. CCR6 is transiently upregulated on B cells after activation and modulates the germinal center reaction in the mouse. *Immunol Cell Biol*, 91, 335-9.
- WILLIAMS, M., HILL, C. J., SCUDAMORE, I., DUNPHY, B., COOKE, I. D. & BARRATT, C. L. 1993. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod*, 8, 2019-26.
- WOOD, C. D., NISHIGAKI, T., FURUTA, T., BABA, S. A. & DARZON, A. 2005. Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. 169, 725-731.
- ZHANG, Z., LIU, J., MERIANO, J., RU, C., XIE, S., LUO, J. & SUN, Y. 2016. Human sperm rheotaxis: a passive physical process. *Sci Rep*, 6, 23553.
- ZHENG, D., ZENG, L., YANG, R., LIAN, Y., ZHU, Y. M., LIANG, X., TANG, L., WANG, H., CAO, Y., HAO, G., LIU, J., ZHAO, J., WANG, R., MOL, B. W.,

- LI, R., HUANG, H. F. & QIAO, J. 2019. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*, 9, e030366.
- ZIGMOND, S. H. 1977. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*, 75, 606-16.
- ZISSEL, G., HÖHNE, K., KILIC, A., MAIER, C., PLOENES, T., PRASSE, A., TREPEL, M., EIBEL, H. & MÜLLER-QUERNHEIM, J. 2011. CCR6 is a receptor for CCL18 expressed on human lung fibroblasts from IPF lungs. 38.
- ZLOTNIK, A., YOSHIE, O. & NOMIYAMA, H. 2006a. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology*, 7, 243-243.
- ZLOTNIK, A., YOSHIE, O. & NOMIYAMA, H. 2006b. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology*, 7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Arne Gerber dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe an diesem Thema zu forschen. Er hat es geschafft meine Begeisterung für die Dermatologie zu wecken, dass ich mich dazu entschieden habe Hautarzt zu werden.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey für seine freundliche Unterstützung und die Möglichkeit in seiner Klinik zu forschen und zu arbeiten bedanken.

Bei Frau Dr. Bettina Alexandra Buhren und Herrn Dr. Holger Schrupf möchte ich mich für die Einarbeitung in die Experimente und Unterstützung während meiner Laborarbeit bedanken. Die wissenschaftliche Betreuung als auch die Hilfsbereitschaft waren mir stets eine große Unterstützung.

Danke an allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie für die gemeinsamen schönen und lehrreichen Jahre. Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Unterstützung, schöne Zeit und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders zu erwähnen hierbei ist Frau Dr. Julia Baran, der ich viel zu verdanken habe.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und Brüder, die mir mein Studium ermöglicht haben und während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Bruder Richard bedanken, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mir während der gesamten Zeit mit Rat zur Seite stand.