

Zusammenfassung

EHD4 gehört zu der EHD-Proteinfamilie („EH domain containing proteins“), die aus insgesamt vier Familienmitgliedern besteht. Die EHDs besitzen trotz ihrer ATPase-Funktion starke Ähnlichkeiten zu der großen GTPase Dynamin und können über ihre C-terminale EH-Domäne mit anderen NPF-haltigen Proteinen interagieren. Sie scheinen essentiell im intrazellulären Membrantransport, im Besonderen im Endomembransystem, zu sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in die folgenden drei Bereiche untergliedert werden: 1) Identifizierung EHD4-beeinflusster Transportwege, 2) EHD4, als ein neues Cilien-Protein und 3) Auswirkungen der EHD4-Defizienz auf Testis, Haut und Niere.

1) Bisher sind für EHD4 nur Clathrin-unabhängige Transportwege, wie z.B. Arf6-abhängige Endozytose, Macroendozytose und Pinozytose, beobachtet worden und EHD4 scheint eine Rolle am Ausgang von frühen Endosomen zu spielen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EHD4 mit Clathrin-umhüllten Vesikeln kolokalisiert, zusammen mit diesen aufgereinigt werden kann und dass Clathrin ein potentieller EHD4-Interaktionspartner ist. Mehrere Ergebnisse sprechen auch für eine Funktion von EHD4 am retrograden Transportweg von Endosomen zum Golgi-Apparat, wie es auch schon für EHD1 und EHD3 gezeigt werden konnte. Nach EHD4-Suppression fragmentiert der Golgi-Apparat, das klassische retrograde „Cargo“ M6PR misslokalisiert in der Zelle und die Assemblierung des Retromer Komplexes erscheint gestört. Eine neue Funktion von EHD4 in Clathrin-unabhängigen Transportwegen konnte anhand des GPI-verankerten Proteins - GFP-GPI - ermittelt werden. Überexpression von EHD4 ohne EH-Domäne führt im Vergleich zum Wildtyp zu deutlich mehr GFP-GPI an der Plasmamembran, was auf einer gestörten Internalisierung dieses Proteins beruht.

2) Zum ersten Mal konnte für EHD4 die Lokalisation an Cilien und ein Einfluss der EHD4-Suppression auf die Ciliogenese beobachtet werden. In EHD4-supprimierten Zellen sind weniger Zellen mit Cilien sowie verkürzte Cilien zu finden. Zudem wurde ein Cilien-Protein - Nephrocystin 1 - als neuer Interaktionspartner von EHD4 identifiziert und validiert. Beide Proteine kolokalisieren an der Übergangszone des Ciliums, die als Barriere für nicht-ciliäre Proteine gilt. Die Nephrocystin 1-Lokalisation ist nach EHD4-Suppression vor allem in den Zellen, in denen der Golgi-Apparat stark fragmentiert ist, verändert. EHD4 scheint am Molekültransport zum Cilium beteiligt zu sein und ist mitverantwortlich für die Ciliogenese.

3) EHD4-defiziente Mäuse zeigen einen starken Phänotyp in Testis, Haut und Niere. Die Testes der männlichen *Ehd4*^{-/-}-Mäuse sind um 50% verkleinert, die

Spermienbeweglichkeit und -anzahl sind verringert und sie besitzen weniger Keimzellen, was insgesamt zu einer reduzierten Fertilität führt. Durchschnittlich 50% der *Ehd4*^{-/-}-Mäuse zeigen im Bereich des dorsalen Rumpfes eine reduzierte Anzahl an Haaren (Hypotrichose). In Hautschnitten ist zu erkennen, dass die Haarfollikel geweitet, die Talgdrüsen vergrößert und eine Missordnung der Schwanzhaarfollikel besteht. Vermutlich führt die Abwesenheit von EHD4 zu einer Verzögerung der telogenen in die anagene Haarwachstumsphase. Die Nieren sechs Monate alter EHD4-defizienter Tiere sind schwerer als die Nieren der Wildtypiere und morphologisch leicht verändert. Die Sammelrohre des Nierenbeckens sind geweitet, Epithelzellen der distalen Tubuli zeigen Vakuolisierung und es konnte eine Leukozyten-Aggregation im Bereich des Nierenbeckens und der Blutgefäße beobachtet werden, was auf eine erhöhte Entzündungs-Prävalenz deutet.

EHD4 scheint also trotz der großen Homologie zu den anderen EHD-Proteinen einzigartige Funktionen, wie z.B. in den Cilien auszuüben, und eine wichtige physiologische Rolle in Testis, Haut und Niere zu spielen.

Abstract

EHD4 belongs to the EHD (EH domain containing proteins) protein family and is one of four highly homologous members in mammals. Their structures are related to that of the large GTPase dynamin, although they contain an N-terminal ATPase domain. Their C-terminal EH domain is an important interaction module for NPF-containing proteins. EHD proteins have key functions in intracellular membrane transport, especially in the endomembrane system. The results of this study can be divided into three parts: 1) identification of transport pathways influenced by EHD4, 2) EHD4 as a novel cilia protein and 3) impact of EHD4-deficiency on testis, skin and kidney.

1) Until now, EHD4 has been linked to clathrin-independent pathways like Arf6-dependent endocytosis, macroendocytosis and pinocytosis and seems to play a role at the exit of early endosomes. In this study, strong evidence is provided for EHD4 function in clathrin-dependent pathways. EHD4 colocalizes with clathrin-coated vesicles (CCVs) and can be detected in CCV-enriched fractions. Moreover, the clathrin heavy chain is a potential interaction partner of EHD4. Like EHD1 and EHD3, EHD4 seems to also play a role in the retrograde transport pathway from endosomes to the Golgi apparatus. A reduction in EHD4 levels leads to fragmentation of the Golgi, mislocalization of the classical retrograde cargo M6PR and defective assembly of the retromer complex. Besides, it has been shown, that EHD4 regulates the transport of GPI-anchored proteins like GFP-GPI. Overexpression of EHD4 without its EH domain increases GFP-GPI accumulation at the plasma membrane as compared to a control wildtype construct, which can be explained by slower internalisation of GFP-GPI.

2) A novel localization of EHD4 was identified at cilia and the impact of EHD4 on ciliogenesis was demonstrated. After reduction of EHD4 fewer cells with cilia are found and existing cilia are reduced in size. Furthermore, Nephrocystin 1 was identified as a novel interaction partner of EHD4 and the interaction confirmed. The two proteins colocalize at the transition zone of cilia and the distribution of Nephrocystin 1 is altered in EHD4-depleted cells. EHD4 seems to play a role in protein transport to cilia and is important for ciliogenesis.

3) EHD4-deficient mice show a strong phenotype in testis, skin and kidney. Due to smaller testes, reduced sperm motility, sperm number and germ cells, male *Ehd4*^{-/-}-mice are subfertile. Additionally, approximately 50% of all EHD4-deficient mice suffer from reduced number of hairs (hypotrichosis) at the dorsal back. Skin sections reveal dilated hair follicles, larger sebaceous glands and disordered hair follicles in the tail. One hypothesis is that EHD4 regulates the switch from the resting phase (telogen) to the hair growth phase (anagen) of

hair follicles. Moreover, kidneys of six month old *Ehd4*^{-/-}-mice are heavier than controls and show an altered morphology. The collecting ducts are enlarged, epithelial cells of distal tubules show vacuolisation and inflammation is found in the vasculature and the renal pelvis.

Despite the high homology among the EHD proteins, EHD4 seems to have unique functions, e.g. in ciliogenesis, and to play an important physiological role in testis, skin and kidney.