

Characterization of the sensory-motor loop and the 3D flagellar beat of sperm

Inaugural-Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln vorgelegt von

An Gong

aus Yueyang, China

Berichterstatter: Prof. Dr. Berenike Maier

(Gutachter) Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp

Die Dissertation wurde von Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2020

Kurzzusammenfassung

Befruchtung ist der Schlüssel zur Fortpflanzung. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Eier zu finden, können Spermien physikalische und chemische Reize registrieren und ihre Motorantwort entsprechend anpassen. Das Verständnis der Motorantwort der Spermien ist wichtig. Eine typische chemisch-induzierte Motorantwort von Spermien ist Chemotaxis. Eier setzen Lockstoffe frei, die einen Konzentrationsgradienten um das Ei bilden. Während Spermien im Lockstoffgradienten navigieren, sind sie ständig einem sich ändernden Reiz ausgesetzt. Der von der Zelle wahrgenommene Reiz ist also ein Ergebnis des chemischen Gradienten an sich und der Bewegung einer Zelle oder eines Organismus im Gradienten: Der sensorische Prozess und die Motorantwort bilden eine Rückkopplungsschleife. Solche Rückkopplungsschleifen erschweren die Charakterisierung der Input/Output-Beziehung eines sensorischen Systems, da der Reiz und die Reaktion in einem Gradienten miteinander verflochten sind und sich ständig ändern. Obwohl Chemotaxis von Seeigelspermien intensiv untersucht wurde, ist die Transferfunktion zwischen dem Reiz und der Motorantwort immer noch unbekannt. Ich habe eine opto-chemische Methode angewendet, um den intrazellulären Botenstoff in der Zelle freizusetzen. Mit dieser Methode kann die Zelle unabhängig von ihrer Position stimuliert werden. Mit diesem Ansatz konnte ich die Transferfunktion der Spermien für stereotype Wellenformen der Stimulation bestimmen. Die experimentell beobachteten Schwimmbahnen von Spermien können durch ein Modell vorhergesagt werden, das ich im Verlauf dieser Arbeit entwickelt habe. Basierend auf dieser Erkenntnis schlug ich einen Ansatz zur Fernsteuerung von Spermien in Abwesenheit des Lockstoffs unter Verwendung von Lichtfeldern vor. Diese Lichtfelder haben gegenüber einem Lockstoffgradienten insofern Vorteile, als sie steuerbar sind und nicht auf den Stofftransport durch Diffusion beschränkt sind. Ich habe drei typische Lichtfelder erzeugt - lineare, exponentielle und solche mit einem Gaußschen Profil - und die Motorantwort der Spermien unter diesen drei Szenarien untersucht.

Ich untersuchte auch, wie sich die Motorantwort der Flagellen auf das Schwimmverhalten der Spermien auswirkt. Frühere Studien deuteten darauf hin, dass, im zweidimensionalen Fall, die mittlere Flagellenkrümmung C_0 zur Steuerung verwendet wird. Darüber hinaus haben neuere Studien gezeigt, dass neben C_0 auch die zweite Harmonische des Flagellenschlags zum Lenken verwendet werden kann. Diese Studien basierten auf der Untersuchung der Motilität von Spermien, die nicht frei schwimmen können, sondern mit dem Kopf auf der Glasoberfläche fixiert sind und sich daher nur um die Achse des

Fixierpunktes drehen können; Außerdem wurde Effekt von Harmonischen Oberschwingungen zuvor nicht diskutiert. Ich habe die „*resistive force theory*“ verwendet, um sowohl frei schwimmende als auch gebundene Spermien zu untersuchen. Ich fand heraus, dass höhere Harmonische Oberschwingungen des Flagellenschlags (über die zweite Ordnung hinaus) nicht zur Steuerung beitragen. Bei fixierten Spermien tragen die zweite Harmonische und C_0 gleichermaßen zur Steuerung bei. Bei frei schwimmenden Spermien trägt die zweite Harmonische im Vergleich zu C_0 , viel weniger zur Steuerung bei.

Im 3D-Szenario haben frühere Studien vorausgesagt, dass die mittlere Flagellenkrümmung C_0 und die Planarität des Flagellenschlags unterschiedliche Schwimmbahnen in Spermien verschiedener Arten erklären können. In diesen theoretischen Studien fehlten jedoch die experimentellen Beweise, da die 3D-Rekonstruktion des Flagellums technisch schwierig ist. Ich verbesserte eine holographische Bildgebungsmethode und erhielt qualitativ hochwertige Aufzeichnungen des 3D Flagellenschlags. Ich fand heraus, dass ein asymmetrischer und planarer Flagellenschlag zu einer kreisförmigen Schwimmbahn führt, während symmetrischer und nicht planarer Flagellenschlag zu einer Schwimmbahn, die einem verdrehten Band gleicht, führt. Beide Schwimmbahnen stimmen mit den theoretischen Vorhersagen überein. Ich fand heraus, dass menschliche und Mausspermien beim 3D Schwimmen Torsionswellen erzeugen, deren Peaks hauptsächlich in den Regionen mit niedriger Krümmung des Flagellums lokalisiert sind. Ich schlage vor, dass diese lokalisierten Torsionswellen in der Natur häufig sind und dass sie eine intrinsische Eigenschaft des Schlagens von Axonemen sind. Diese Studie bietet neue Einblicke in die axonemale Struktur, den 3D-Flagellenschlag und das daraus resultierende Schwimmverhalten.

Abstract

Sperm can register physical and chemical cues to tune sperm motor responses. As a result, the chance that sperm find the egg increases. Understanding the sperm motor response is an essential task. One typical chemical-induced motor response is chemotaxis. Eggs release chemoattractant molecule which form a concentration gradient around egg. Sperm can register this chemical cue and change their flagellar beat pattern accordingly. As sperm actively navigate in the chemoattractant gradient, they are constantly exposed to a changing stimulus. Thus, the stimulus sensed by the cell is a result of the sensory gradient per se, and of the self-imposed motion in the gradient: The sensory process and the motor response form a feedback loop. Even though chemotaxis of sea urchin sperm has been well studied, the transfer function between the stimulus input and the output motor response is still lacking. I used an opto-chemical method in which light generates the second messenger for chemotaxis within the cell. This method uncouples the location of the cell from the stimulus. Using this approach, I reveal the stimulus-motor response transfer function for stereotypical waveforms of stimulation. The experimentally observed swimming trajectories of sperm can be predicted by a model that I developed in the course of this work. Based on this insight, I proposed an approach to control sperm remotely in the absence of a chemoattractant concentration using light fields. These light fields have advantages over the chemoattractant concentration gradient, in that they are controllable, and are not restricted to mass transfer by diffusion. I created three typical light fields: linear, exponential and Gaussian and studied the performance of chemotaxis under different scenarios.

I also investigated how the flagellar motor responses will determine sperm swimming. Previous studies have shown that, in 2D, the mean flagellar curvature C_0 generated by sperm can be used for steering. Furthermore, recent studies have revealed that, in addition to C_0 , the second harmonic of the flagellar beat can also be used for steering. Yet, these studies were based on the motility of tethered sperm, and the effect of harmonics higher than two was not discussed before. I used the resistive force theory to check both freely swimming and tethered sperm. I found that the harmonics higher than second order contributes almost nothing to steering. For tethered sperm, the second harmonic contributes almost equally for steering compared to C_0 . For freely swimming sperm, the second harmonic contributes much less for steering compared to C_0 .

In the 3D scenario, previous studies predicted that the mean flagellar curvature C_0 and the planarity of the flagellar beat can account for different swimming trajectories found in sperm from different species, but these studies lack experimental evidence because the 3D reconstruction of the flagellum is technical challenging. I improved a holographic imaging method and obtained high-quality recording of the flagellar beat in 3D. I found that asymmetric and planar flagellar beat results in a circular swimming path, whereas symmetric and non-planar flagellar beat results in a “twisted-ribbon” swimming path. Both swimming trajectories are consistent with the theoretical predictions. I found that during swimming in 3D, human and mouse sperm produce torsion waves that have confined peaks mainly localized at the low curvature regions of the flagellum. I suggest that these localized torsion waves are common in nature, and that they are an intrinsic property of beating axonemes. This study provides new insight regarding the axonemal structure, the 3D flagellar beat, and the resulting swimming behavior.

Contents

Kurzzusammenfassung III

Abstract V

Contents..... VII

List of Figures..... X

Nomenclature..... XII

Chapter 1 Introduction 1

 1.1 Sperm Chemotaxis 2

 1.1.1 Chemotaxis of sea urchin sperm 3

 1.1.2 Chemotaxis in general 6

 1.1.3 Mathematical description of sperm chemotaxis..... 7

 1.2 Sperm ultrastructure and how flagella beat 9

 1.2.1 Axonemal and peri-axonemal structures 9

 1.2.2 How flagella beat..... 11

 1.3 From sperm beat to swimming..... 14

 1.3.1 Sperm beat pattern descriptions 15

 1.3.2 Resistive force theory 17

 1.3.3 Sperm swimming trajectories and beat patterns..... 20

 1.4 Aim of my thesis 21

Chapter 2 Materials and Method 22

 2.1 Chemicals 22

 2.2 Solutions 22

 2.3 Sperm sample preparation 23

 2.3.1 Sea urchin sperm 23

 2.3.2 Human sperm 24

2.3.3 Mouse sperm.....	25
2.4 Temporal Modulation of cGMP release.....	25
2.4.1 Optical setup	25
2.4.2 UV power calibration	26
2.5 Spatial Modulation for Sea Urchin Sperm	27
2.5.1 Optical setup	27
2.5.2 DLP beamer calibration.....	28
2.5.3 Sperm iconized accumulation with UV light fields	28
2.5.4 The creation of functional UV profiles	29
2.5.5 Light intensity gradient calculation.....	30
2.5.6 Curvature and stimulus calculation.....	31
2.6 Digital in-line holographic microscopy (DIHM).....	31
2.6.1 Preprocess.....	32
2.6.2 Calculation of re-focus stack	34
2.6.3 Feature extraction.....	36
2.7 Software	37
Chapter 3 The Sensory-Motor Loop in Sperm Chemotaxis	38
3.1 Temporal stimulus and spirographic trajectories.....	38
3.2 From signaling to behavior: a simple calculation.....	41
3.2.1 Calculation of path curvature for a sinusoidal stimulus.....	41
3.3.2 Characterization of the trajectory type and symmetry fold	43
3.3.3 Discussion about the linear drifting direction.....	46
3.3 Spatial stimulus: implementation of a virtual chemoattractant gradient.....	50
3.4 “Chemotaxis” in UV-light fields	53
3.5 Frequency dependency in sperm sensory-motor loop and the origin of band pass filtering.....	60
3.6 Conclusions	64

Chapter 4 The Steering Gaits of Sperm	65
4.1 Changing direction requires beat patterns with broken symmetry	65
4.2 Sperm use different harmonics for steering.....	68
4.3 The steering parameter space.....	72
4.4 Conclusions.....	73
Chapter 5 Three-Dimensional (3D) Beat Pattern of the Flagellum.....	75
5.1 Digital in-line holographic microscopy and hologram analysis	75
5.2 Swimming trajectories and the underlying flagellar beat patterns.....	77
5.3 Description of the sperm flagellar shape	84
5.4 Conclusion	87
Chapter 6 Discussion	89
6.1 Temporal stimulation and the spatial light-field method	91
6.2 The role of Ca^{2+} in the sperm sensory-motor loop.....	92
6.3 Deficits of in-line holographic microscopy and possible solutions	94
6.4 The twist point of the flagellum and the possible origin of the out-of-plane component	96
6.5 Outlook	98
Appendix 1: The secret of loading more caged cGMP	99
Appendix 2: Explanation of powersmooth method	103
References	106
Acknowledgements.....	119

List of Figures

Figure 1: Schematic representation of the sea urchin sperm chemotaxis process. 4

Figure 2: Techniques for studying the chemotactic signaling pathway of sperm from the sea urchin *A. punctulata*..... 5

Figure 3: Schematic representation of sensory-motor loop..... 7

Figure 4: The morphology and ultrastructure of sperm..... 11

Figure 5: Schematic illustration of how axonemes bend..... 12

Figure 6: Definition of the flagellar curvature and tangent angle 16

Figure 7: Schematic illustration of 3D representations for sperm flagellum..... 17

Figure 8: RTF predicted swimming paths for three prototypical flagellar waveforms..... 19

Figure 9: Structure of DEACM-cGMP and BECMCM-cGMP 22

Figure 10: Setup for temporal modulation experiments 26

Figure 11: Calibration curve for the relative power of the UV LED 26

Figure 12: The spatial light modulation setup 27

Figure 13: The four beamer input images for generating the Minerva logo using UV light 29

Figure 14: Holographic setup..... 32

Figure 15: A Hologram and its normalization 33

Figure 16: Basics for in-line holography and its analysis..... 35

Figure 17: Experiment paradigm for the study of the motor response to sensory perception in sperm..... 40

Figure 18: Calcium signal evoked on sperm as a response to a sinusoidal stimulus 42

Figure 19: Schematic representation of the orientation delay $\Delta\theta$ and how it determines the shape of the swimming path..... 44

Figure 20: Simulated swimming trajectories 45

Figure 21: Schematic representation of the relative drift angle together with its numerical calculation and analytical approximation results 49

Figure 22: The image stretching of the light projector..... 51

Figure 23: Accumulation experiments in the absence of chemoattractant 52

Figure 24: Properties of light fields created for experiments..... 54

Figure 25: Sperm swimming in virtual chemoattractant landscapes..... 55

Figure 26: Curvature and the periodic component in stimulus oscillate at the same frequency..... 57

Figure 27: Schematic illustration of the link between temporal and spatial relative drift angle in a linear light field.....	58
Figure 28: Distribution of sperm relative drift angle within different light fields	59
Figure 29: Distribution of sperm drifting speed within different light field shapes.....	60
Figure 30: Sperm swimming radius within different light fields	60
.....	61
Figure 32: Chiral flagellar beat patterns result in net cell rotation.....	67
Figure 33: Contribution of the beat harmonic modes to the rotational velocity Ω for freely swimming sperm.....	71
Figure 34: Parameter space of flagellar beat patterns relevant for changing direction	73
Figure 35: Swimming trajectories and head orientation of a sea urchin and a human sperm cell when swimming near a wall	78
Figure 36: Flagellar beat pattern of sea urchin and human sperm.....	80
Figure 37: The non-planarity of the sea urchin and human sperm flagellar beat.....	81
Figure 38: Visualization of sperm rolling	82
Figure 39: Characterization of mouse sperm swimming near a chamber wall	84
Figure 40: Illustration of a human sperm flagellar shape and the two-segment non-planarity Γ_{ts}	85
Figure 41: Curvature (C) and torsion (τ_f) of a human sperm flagellum.....	86
Figure 42: Curvature and torsion of a knock-out mouse sperm flagellum	87
Figure 43: Simulated sperm spirographic trajectories using resistive force theory	94
Figure 44: Deficits of in-line holographic microscopy.....	95
Figure 45: Illustration of the out-of-plane component and the CP twist in flagella of <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	97
Figure 46: Structures of the axial and equatorial isomers of coumarinylmethyl caged cGMPs and the hydrolysis reaction of BECMCM-cGMP	99
Figure 47: Accumulation experiments without and with probenecid.....	101