

Steffen Klaus Meurer: Molekularbiologische und immunologische Charakterisierung von Chemorezeptoren in Säugetier-Spermien. 2002

Die Chemotaxis von Invertebraten-Spermien ist gut dokumentiert (Morisawa, 1994). Das chemotaktisch wirkende Eizellpeptid Resact der Seeigellart *Arbacia punctulata* bindet an eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase (Ward et al., 1985; Shimomura et al., 1986). Säugetier-Spermien reagieren chemotaktisch auf Substanzen, die von der Eizelle selbst und/oder vom weiblichen Genitaltrakt stammen (Eisenbach & Tur-Kaspa, 1999). Bislang konnten jedoch weder die chemotaktisch wirksamen Substanzen noch die entsprechenden membranständigen Rezeptoren identifiziert werden. Derzeitige Hypothesen über die chemotaktische Signalkette orientieren sich an den Signalwegen zur Wahrnehmung von Duftstoffen in Riechzellen. Demnach könnten Duftstoffrezeptoren (OR) oder die membranständige Guanylylzyklase-D eine Rolle bei der Chemotaxis von Säugetier-Spermien spielen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 12 verschiedene putative OR durch RT-PCR in Keimzellen von männlichen Mäusen identifiziert. Vier OR wurden vollständig kloniert. Die 12 OR stammen aus 10 verschiedenen Subfamilien. Dies bedeutet, daß die im Hoden exprimierten OR keine eigene Subfamilie von hodenspezifischen OR bilden. Mit Ausnahme von TOR8, der zur Klasse I (Fisch-ähnliche) der OR zu rechnen ist, gehören die anderen OR der Klasse II (Säugetier-ähnliche) an. Alle untersuchten OR sind auch in Riechzellen exprimiert. 6 OR sind darüber hinaus auch in verschiedenen weiteren Geweben (z.B. Gehirn, Herz) nachweisbar. Für die meisten der untersuchten OR konnten Transkripte bereits im präpubertären Hoden nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß OR nicht nur eine Funktion in reifen Spermien haben könnten, sondern bereits während der Entwicklung bzw. der Organisation des Keimzellepithels. Durch Northernblot-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß zwei OR, TOR13 und TORS1, höher exprimiert sind als die anderen OR. Transkripte von TOR13 konnten durch in situ Hybridisierung in Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert werden. Die Klonierung von TOR13 und TORS1 zeigte, daß es sich bei TOR13 um einen C-terminal verkürzten OR handelt. Es ist unbekannt, ob ein OR, dem die 7. transmembranale Domäne und der C-Terminus fehlen, funktionell ist. Aus diesem Grund wurde nur TORS1 charakterisiert. Eine Southernblot-Analyse von genomischer DNA zeigte, daß TORS1 das einzige Gen einer neuen Subfamilie darstellt. TORS1 ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Das TORS1-Gen ließ sich nicht funktionell heterolog exprimieren, obwohl das Rezeptorprotein in den Wirtszellen synthetisiert und auch posttranslational modifiziert wurde. Mit TORS1 konnte ein OR-Gen identifiziert werden, das für einen konditionalen Gen knock-out geeignet wäre. Mit einem Gen knock-out könnte man vielleicht Hinweise auf die physiologische Funktion der OR in Spermien erhalten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde $G_{\alpha\text{olf}}$, der Wechselwirkungspartner von OR in Riechzellen, aus Hoden-cDNA kloniert. Durch Westernblot-Experimente konnte $G_{\alpha\text{olf}}$ in Spermien detektiert werden. Immunhistochemische-Versuche zeigten, daß $G_{\alpha\text{olf}}$ im akrosomalen Bereich der Spermien lokalisiert ist. Die Adenylylzyklase III, der Effektor von Golf in Riechzellen, ließ sich durch Westernblot-Analyse nicht in Spermien nachweisen. Dies bedeutet, daß OR in Spermien nicht, wie in Riechzellen, über $G_{\alpha\text{olf}}$ die ACIII aktivieren können. Die OR müssen in Spermien einen anderen Signalweg aktivieren. Im dritten Teil wurde schließlich untersucht, ob eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase und ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal (CNG-Kanal) in Maus-Spermien exprimiert sind. Eine cGMP-vermittelte Signalkaskade könnte - ähnlich wie in Seeigelspermien - das chemotaktische Verhalten regulieren. Mit Hilfe von RT-PCR konnten aus Keimzellen-cDNA Transkripte der Guanylylzyklase-D amplifiziert werden. Ebenfalls konnten Transkripte der α -Untereinheit mCNGA3 und der modulatorischen β -Untereinheit mCNGB3 nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Experimenten wurde die GC-D in den Flagellen der Spermien lokalisiert. Die GC-D und der CNG-Kanal könnten Bestandteile eines cGMP-Signalwegs sein, der das Schwimmverhalten von Säugetier-Spermien reguliert.

Chemotaxis of sperm is well established in marine invertebrates, such as sea urchin (Morisawa, 1994). The chemotactic egg-derived peptide resact of the sea urchin *Arbacia punctulata* binds to a membrane-bound receptor-guanylyl cyclase. Mammalian sperm show chemotactic behaviour in response to factors released by the egg itself and/or the female reproductive tract. Neither the chemotactic factors nor the respective membrane receptors of sperm have been identified. Current hypotheses on the chemotactic signaling pathways rely on models for odorant sensation in olfactory sensory neurons (OSN). Thus, G-protein coupled odorant receptors (OR) or the receptor guanylyl cyclase-D might play a role in chemotaxis of mammalian sperm. In the first part of this PhD Thesis, 12 different putative OR have been identified by RT-PCR in germ cells of male mice. Four complete OR genes were cloned from genomic DNA. The twelve amplified ORs are members of ten subfamilies revealing that testicular ORs do not constitute a specific subfamily. Except for TOR8 that belongs to class I OR (fish-like), the other receptors are members of class II OR (mammalian-like). All ORs are also expressed in OSN. Furthermore 6 ORs are expressed in additional tissues (i.e. heart, brain). Most ORs are already expressed in the prepubertal testis. This finding points out that in addition to a functional role in mature sperm ORs may be involved in the development and organization of the germ cell epithelium. Northernblot experiments revealed that two ORs (TOR13 and TORS1) are more abundantly expressed than the other ORs. By in situ hybridization-experiments transcripts of TOR13 were localized to spermatogonia and spermatocytes. Cloning of the TOR13 and TORS1 genes showed that the TOR13 gene codes for a C-terminal truncated receptor protein. Because it is unknown whether an OR lacking the seventh transmembrane domain and the C-terminus is functional, only the TORS1 gene was further characterized. Southernblot analysis revealed that TORS1 is the only gene of a new cluster. The gene could be assigned to chromosome 11. TORS1 could not be functionally expressed in a heterologous system although the receptor protein was synthesized and posttranslationally modified in the host cells. In conclusion, TORS1 is a candidate for a conditional gene knock-out. This approach might provide a deeper insight into the function of ORs in sperm cells. In the second part, $G_{\alpha_{olf}}$, the interaction partner of OR in OSN, has been cloned from testicular cDNA. By Westernblot experiments, $G_{\alpha_{olf}}$ could be detected in sperm. $G_{\alpha_{olf}}$ was immunohistochemically localized to the acrosomal part of the head. Adenylyl cyclase III (ACIII), the effector of Golf in OSN, could not be detected in sperm by Westernblot experiments. Thus unlike in OSN, OR in sperm do not activate ACIII by means of $G_{\alpha_{olf}}$. Consequently, in sperm ORs must participate in a different signaling cascade. In the third part, I investigated whether a receptor GC and a cGMP-regulated ion channel (CNG-channel) are expressed in sperm. A signaling cascade comprising a receptor GC could be involved in chemotaxis such as in sea urchin sperm. Transcripts of the GC-D could be identified in cDNA of sperm precursor cells. The ion channel α -subunit mCNGA3 and the modulatory β -subunit mCNGB3 have been also amplified from germ cell cDNA. In immunohistochemical experiments, the GC-D was localized to the principal piece of the sperm tail. Thus, it is tempting to speculate that the GC-D and the CNG ion channel are components of a signaling pathway that regulates the swimming behaviour of mammalian sperm cells.