

Chemotaxis von Spermien

Der beschwerliche Weg zum Ei: immer der Nase nach

Stefan Bartram und Wilhelm Boland*

Stichwörter:

Bourgeonal · Chemotaxis · Odoranten · Rezeptoren · Signalkaskaden

Die Befruchtung einer menschlichen Eizelle durch ein Spermium ist ein bemerkenswert verschwenderischer und gleichzeitig hochkomplexer Prozess. Nur 200 bis 300 Spermien (eines von ca. 25.000!) schaffen den langen Weg von der Vagina zur Eizelle; das sind weniger als 0.004 % der insgesamt ejakulierten Samenzellen ($4-40 \times 10^7$). Ein Spermium mit einer Länge von ca. 60 μm muss zunächst den Uterus durchqueren (ca. 70–80 mm), an seinem Ende die Öffnung des Eileiters finden (Durchmesser ca. 0.2–0.5 mm) und von dort einen weiteren Weg (ca. 50–80 mm) zurücklegen, bevor es das Ei mit einem Durchmesser von 0.1 mm erreicht.^[1] Den Uterus durchqueren die Spermien noch ganz bequem in Schleimtröpfchen durch gerichtete peristaltische Bewegungen des Organs, die sie bis zur Öffnung des jeweils aktiven Eileiters befördern.^[2] Insgesamt legt ein Spermium bis zum nur wenige Stunden befruchtungsfähigen Ei eine Strecke von mehr als 3000 Gametenlängen zurück. Auf die Dimension eines Menschen übertragen würde dies bedeuten, im Dunkeln durch eine zerklüftete Landschaft auf ein nur kurzzeitig vorhandenes Ziel von drei Metern Breite in 4–5 km Entfernung zuzusteuern. Ohne zusätzliche Orientierungshilfen wäre die Verschmelzung mit einem reifen Ei ein reiner Zufallsprozess. Zwar konnten in den letzten Jahrzehnten bei niederen Organismen (Seeigeln, Algen, Korallen,

Fischen) zahlreiche Botenstoffe identifiziert werden,^[3] die eine gerichtete Navigation von Geschlechtszellen möglich machen, für Säuger aber gab es in dieser Richtung lange Zeit keinen brauchbaren Ansatz.

Erst Anfang der 90er Jahre gelang ein bemerkenswerter Durchbruch auf einem zunächst nicht unmittelbar verwandten Gebiet. Buck und Axel isolierten eine Multigenfamilie von Geruchsrezeptoren aus dem Riechepithel der Ratte, die sich als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit nachgeschalteter Signalkaskade erwiesen.^[4] Heute wissen wir, dass die einleitende chemoelektrische Signaltransduktion bei allen untersuchten Lebewesen auf analogen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beruht, der sich intrazelluläre Verstärkungskaskaden anschließen. Dazu zählen die Aktivierung von Adenylatcyclasen mit nachfolgender Bildung von cyclischem Adenosin-3'-monophosphat (cAMP) und/oder die Aktivierung einer Phospholipase C, die membranständiges Phosphatidylinositol zu 1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin hydrolysiert (Abbildung 1). Jede dieser Kaskaden baut über spezifisch assoziierte Ionenkanäle ein Rezeptorpotential auf, dem unter anderem ein transienter Konzentrationsanstieg von cytosolischem Ca²⁺ folgt.^[4–6] Durch ratiofluorimetrische Techniken lässt sich dieser Anstieg heute sichtbar machen.^[7]

Die eigentlichen Rezeptorproteine bestehen aus einer Kette von ca. 300 Aminosäuren mit sieben Transmembraneinheiten (7TM-Proteinen). Die codierende Region der epithelialen ORs enthält einige konservierte Aminosäuresequenzen, die sie von anderen 7TM-Proteinen unterscheiden und zu ihrer Identifizierung genutzt werden können. Hypervariable Regionen befinden sich

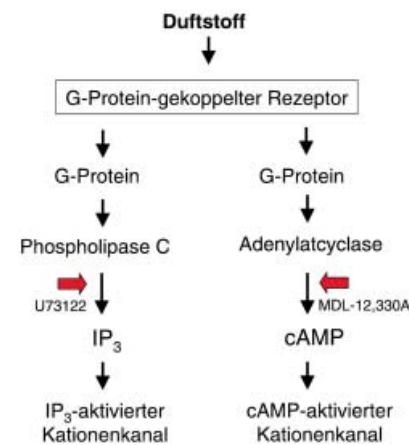


Abbildung 1. Alternative Signalkaskaden von Geruchsrezeptoren. Olfaktorische Rezeptoren (ORs) öffnen Ionenkanäle über assoziierte G-Proteine und cyclisches AMP (typisch für Vertebraten) oder durch Aktivierung einer Phospholipase C und Hydrolyse von Phosphatidylinositol zu IP₃ (typisch für Invertebraten, Fische, Crustaceen und Insekten). Die Kaskaden arbeiten entweder individuell (z. B. mit der embryonalen Nierenzelle HEK293 als Expressionssystem) oder sind miteinander (antagonistisch) verschaltet. U73122 und MDL-12,330A sind Inhibitoren der jeweiligen Signalrouten.

dagegen in den Sequenzen der Transmembranbereiche von der 2. bis zur 6. Einheit (Abbildung 2). Hier findet vermutlich auch die Bindung der lipophilen Duftstoffe statt, wobei die hohe lokale strukturelle Diversität selektive Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Riechstoffen ermöglicht.^[4,6]

Beim Menschen sind inzwischen 17 OR-codierende Genfamilien bekannt, die sich auf fast alle Chromosomen verteilen (Ausnahme: Chromosom 20 und Y). Mit ihren ca. 1000 Einzelgenen (davon nur ca. 350 funktional, der Rest sind Pseudogene) entsprechen sie damit etwa 1 % des menschlichen Genoms.^[6,8] Von diesen werden einige wenige ausschließlich oder bevorzugt in spermato-

[*] Prof. Dr. W. Boland, Dr. S. Bartram
Max-Planck-Institut für
Chemische Ökologie
Bioorganische Chemie
Hans-Knöll-Straße 8
07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-57-1202
E-mail: boland@ice.mpg.de

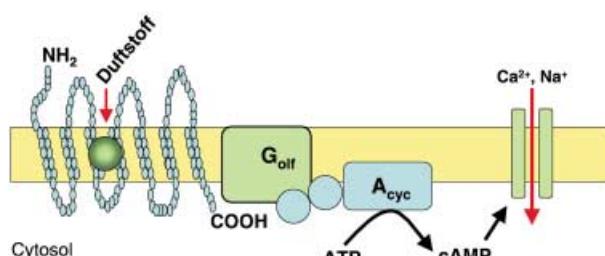


Abbildung 2. Aufbau eines Geruchsrezeptors (Odorant-Rezeptor, OR). Der Duftstoff bindet vermutlich an die hypervariablen Transmembransegmente des OR-Proteins und aktiviert über das assoziierte olfaktorische G-Protein (G_{olf}) die Adenylatcyclase (A_{cyc}). Cycisches AMP (cAMP) entsteht und stimuliert den Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ durch spezifisch assoziierte Ionenkanäle.

Bourgeonal den stärksten Ca^{2+} -Anstieg auslöste (Bourgeonal und Cyclamal gehören zu den synthetischen Maiglöckchennoten). Als Leitstruktur wurde so ein aromatischer Aldehyd vom Typ 3-Phenylpropanal ermittelt (Abbildung 3). Zusätzliche Methylgruppen in der Seitenkette

100-mal empfindlichere „Nase“ als die rekombinanten HEK-Zellen, reagieren aber ansonsten vergleichbar auf alle Strukturmerkmale der Testsubstanz. Coapplikation von Bourgeonal und einem Inhibitor der Adenylatcyclase (50 μ M MDL-12,330A, siehe Abbildung 1) unterdrückte den Ca^{2+} -Anstieg, während Inhibitoren der Phospholipase C (50 μ M U73122) keinen Effekt zeigten. Somit handelt es sich bei hOR17-4 um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der über eine cAMP-kontrollierte Sig-

genen Zellen exprimiert. Mithilfe von Antikörpern wurde bereits vor gerauer Zeit ein OR auf einem Flagellum reifer Spermien (beim Hund) lokalisiert,^[9] und ferner wurden bei menschlichen Spermien auch schon Ionenkanäle mit Struktur und Funktion analog zu Riechzellen gefunden.^[10]

Anhand eines auf Chromosom 17 neu identifizierten testikulären OR-Gens (hOR17-4) konnten nun Hatt et al. erstmals die Bedeutung und Funktionalität eines OR für die Navigation (Chemotaxis) menschlicher Spermien unter Beweis stellen.^[11] Da sich die Bindungstasche der Rezeptoren üblicherweise im Bereich der Transmembrandomänen der 7TM-Proteine befindet (Abbildung 2), wurde eine geklonte Domäne (Segmente II–VII) von hOR17-4 in embryonale menschliche Nierenzellen (HEK293) eingeschleust. In diesem rekombinanten System führt die Aktivierung des Rezeptorkomplexes über eine IP_3 -gesteuerte Signalkaskade (siehe Abbildung 1) zu einem transientes Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.^[7] Zwar ist das natürliche Signal der Eizelle (oder seiner Umgebung) noch unbekannt, die Autoren konnten aber den Strukturraum bioaktiver Kandidaten geschickt eingrenzen, indem sie eine Mischung von 100 chemisch sehr unterschiedlichen Duftsubstanzen (Henkel-100) und deren Subfraktionen zur Identifizierung eines zu hOR17-4 passenden Liganden verwendeten. Nur ein Stoff der Mischung, nämlich Cyclamal (Abbildung 3), führte zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. Die Bandbreite des Rezeptors wurde mit strukturell verwandten Verbindungen ausgelotet, wobei

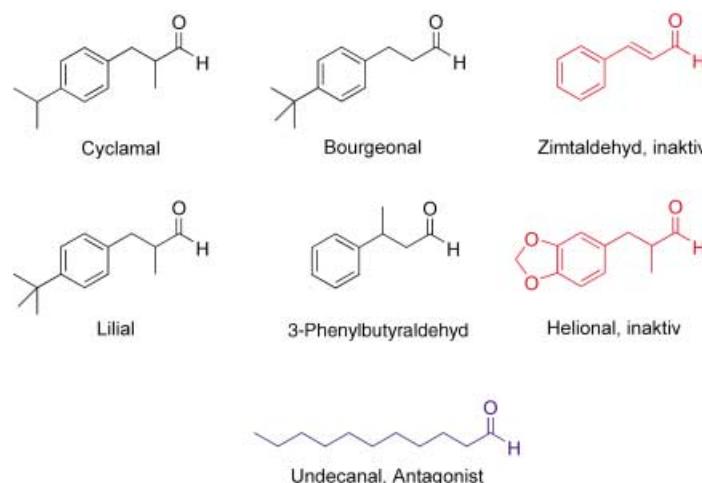


Abbildung 3. Bioaktive 3-Phenylpropanale mit Signalcharakter für menschliche Spermien. Eine Doppelbindung in der Seitenkette oder polare Substituenten am Ring werden nicht toleriert. Bei Zweisubstitution ist die *para*-Position obligat. Undecanal konkurriert als starker Antagonist um die Bindestelle an hOR17-4.

sowie Isopropyl- und *tert*-Butyl-Substituenten in *para*-Position am Ring (verstärken die Wirkung) werden toleriert, während polare Substituenten (z. B. in Helional) oder eine Doppelbindung in der Seitenkette das Molekül inaktivieren.

Überraschende Ergebnisse brachten Tests mit dem Henkel-Mix 10/2, der trotz des Gehalts an Bourgeonal keinen Einstrom von Ca^{2+} auslöste. Es stellte sich schließlich heraus, dass ebenfalls anwesendes Undecanal die Ca^{2+} -Antwort auf Bourgeonal komplett unterdrückt hatte. Nierenzellen mit dem vollständig exprimierten Rezeptorprotein hOR17-4 erbrachten erwartungsgemäß identische Resultate. Ganz entscheidend: Die Beobachtungen ließen sich ohne Einschränkung auf menschliche Spermien übertragen. Intakte Spermien haben für Bourgeonal zwar eine rund

nalkaskade zum Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} führt.

Computergestützte Videoanalysen des Schwimmverhaltens der Spermien in Konzentrationsgradienten von Bourgeonal zeigen eine klare Orientierung der Zellen zum ansteigenden Gradienten (Chemotaxis) und demonstrieren zusätzlich eine Erhöhung ihrer Geschwindigkeit, wenn Konzentrationen über 10^{-8} M erreicht werden. In Gegenwart von Undecanal (10–100 nm) wurden die für Bourgeonal typischen Reaktionen völlig unterdrückt (Abbildung 4). Undecanal konkurriert sehr erfolgreich um die Bindestelle des Bourgeonals, ohne jedoch die nachfolgende Signalkaskade auszulösen (kompetitiver Antagonist): Die Spermien werden orientierungslos und langsam.

Auch wenn die neuen Erkenntnisse zuvor noch *in vivo* abgesichert werden

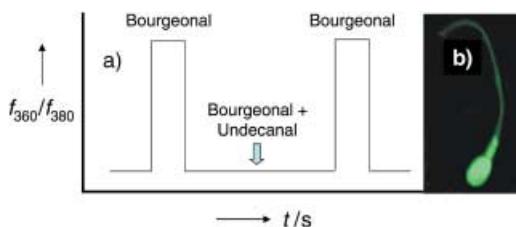


Abbildung 4. a) Reizantwort von Bourgeonal-stimulierten Spermien. Die transiente Akkumulation des einströmenden Ca^{2+} wird durch ratiofluorimetrische Messung Fura-2-beladener Spermien verfolgt (Fura 2 ist ein Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff). Bourgeonal induziert reproduzierbar und konzentrationsabhängig Ca^{2+} -Einströme. Bei gleichzeitiger Applikation von Bourgeonal und Undecanal findet kein Einstrom von Ca^{2+} statt. b) Fluoreszierendes Spermium.

müssen, eröffnen sich bereits jetzt faszinierende Perspektiven für die Reproduktionsmedizin. So könnte sich vielleicht der Fertilisationserfolg durch lokale Applikation von Signalstoffen positiv oder negativ beeinflussen lassen. Alternative Kontrazeptiva, die ohne

allen Säugern oder nur innerhalb begrenzter Familien identisch oder ähnlich ist, bleibt abzuwarten.

[1] M. Eisenbach, I. Tur-Kaspa, *Bioessays* **1999** *21*, 203–210.

Eingriff in den sensiblen Hormonstoffwechsel auskommen und auch sonst keinerlei zellschädigende Eigenschaften haben, sind denkbar. Die Existenz von Agonist und Antagonist lässt vermuten, dass auch bei anderen olfaktorischen Systemen solche oder analoge Prinzipien vorliegen und zu ihrer Steuerung genutzt werden könnten. Schließlich bleibt auch noch die Herausforderung, das eigentliche Signal der Eizelle oder ihrer Umgebung zu identifizieren. Ob dieses dann bei

- [2] G. Kunz, D. Beil, H. Deininger, L. Wildt, G. Leyendecker, *Hum. Reprod.* **1996**, *11*, 627–632.
- [3] M. Eisenbach, *Rev. Reprod.* **1999**, *4*, 56–66.
- [4] L. Buck, R. Axel, *Cell* **1991**, *65*, 175–187.
- [5] J. Krieger, H. Breer, *Science* **1999**, *286*, 720–723.
- [6] P. Mombaerts, *Science* **1999**, *286*, 707–711.
- [7] C. H. Wetzel, M. Oles, C. Wellerdieck, M. Kuczkowiak, G. Gisselmann, H. Hatt, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7426–7433.
- [8] G. Glusman, I. Ynani, I. Rubin, D. Lancet, *Genome Res.* **2001**, *11*, 685–702.
- [9] P. Vanderhaeghen, S. Schurmans, G. Vassart, M. Parmentier, *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1441–1452.
- [10] I. Weyand, M. Godde, S. Frings, J. Weiner, F. Müller, W. Altenhofen, H. Hatt, U. B. Kaupp, *Nature* **1994**, *368*, 859–863.
- [11] M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J. A. Riffell, C. H. Wetzel, R. K. Zimmer, H. Hatt, *Science* **2003**, *299*, 2054–2058.