

97e jaargang - nummer 4 - April 2010 - K.N.P.S.V.

FOLIA

P
H
A
R
M
A
C
E
U
T
I
C
A

COPULATIE

Hv1-protonpompen & spermacellen

Embryoselectie

Sex differences in drug abuse

HIV-resistentie

Hv1-protonpompen en de activering van spermacellen

Door R.A. van Gestel¹ en B.M. Gadella²

¹Departement Farmaceutische Wetenschappen, Faculteit Betawetenschappen, Universiteit Utrecht;

²Departementen Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren en Biochemie Celbiologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht.

Protonpompen zijn betrokken bij de activering van spermacellen en daarom benodigd voor de bevruchting van de eicel.

Humane zaadcellen zijn aanvankelijk slechte zwimmers in het mannelijke geslachtskanaal en moeten eerst geactiveerd worden wanneer ze in het vrouwelijke geslachtskanaal komen. Pas na deze activering zijn spermacellen in staat om de eicel te bevruchten. Het is bekend dat het mannelijke geslachtsvocht dat in het ejaculaat zit de spermamotiliteit op een laag pitje houdt. Een lage pH en lage bicarbonaat (HCO_3^-) concentraties zijn daarbij van belang. Na introductie in het vrouwelijke geslachtskanaal zullen succesvolle spermacellen uiteindelijk de eileider bereiken waar ze vertoeven in een zwak basisch milieu en een hoge concentratie bicarbonaat ionen. Zowel de hoge concentratie bicarbonaat ionen als de hogere omgevings pH blijken de spermacel te activeren hetgeen waar te nemen is door de zogenaamde hypermotiliteit van de spermacellen (Gadella & van Gestel 2004). De cytosolaire pH van de spermacel neem toe alsmede de cytosolaire bicarbonaat concentratie (dit geschiedt via een eiwit dat $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ via antiport over de plasma membraan uitwisselt) (Zeng et al., 1996). Tevens wordt door de toename van de cytosolaire pH de sperma plasmamembraan gedepolariseerd hetgeen leidt tot het openen van voltage gated Ca^{2+} kanalen



(de zogenaamde CatSper's). De instroom van Ca^{2+} is een van de belangrijke componenten voor de activering van de spermacel (Kirichock et al., 2006). De eveneens binnengekomen bicarbonaat ionen binden aan adenylaat cyclase (ADCY10) waardoor deze wordt geactiveerd en cyclisch AMP gaat produceren (Hess et al., 2005). De toegenomen cyclisch AMP concentraties staan borg voor de initiatie van een aantal signaal transductie paden die tot gevolg hebben dat de glycolyse wordt geactiveerd in de staart van de spermacel. De daardoor sneller gegenereerde ATP wordt benut voor de hypergeactiveerde motiliteit.

Deze hypermotiliteit geeft de spermacel snelheid wat uitermate belangrijk is voor de spermacel om te kunnen concurreren met de andere spermacellen. Immers, de geactiveerde spermacel moet als snelste een dikke extracellulaire matrix rondom de eicel penetreren (de zona pellucida). Pas dan kan eventueel de eicel worden bevrucht maar alleen als de spermacel echt de eerste is. Dit omdat de eicel zich direct op slot zet om eventuele polyspermie -bevruchting met meer dan een spermacel- te voorkomen. Dit zal immers bij zoogdieren niet tot nakomelingen leiden. (Fig. 1)

Dr. R.A. van Gestel (rechts) heeft haar studie Farmacie voltooid aan de Universiteit Utrecht (2000). Daarna heeft ze 4 jaar een promotie onderzoek gedaan aan de activering van spermacellen in relatie met de oppervlakte veranderingen aan de spermakop die van belang zijn bij de sperma-zona binding (2005). Dit onderzoek werd gefinancierd door NWO-Medische Wetenschappen en is verricht onder begeleiding van Dr. B.M. Gadella. Dr. R.A. van Gestel is thans Universitair Docent bij het departement Farmaceutische Wetenschappen aan de Universiteit Utrecht.

Dr. B.M. Gadella (links) is afgestudeerd in de Biologie aan de Universiteit Utrecht (1989) en heeft zich daarna verdiept in de voortplantingsbiologie bij zoogdieren en is gepromoveerd aan de Faculteit Diergeneeskunde (1994, cum laude). Daarna heeft hij een Human Capital and Mobility Program fellowship (EU) bemachtigd voor een onderzoeksproject aan de Universiteit van Cambridge (UK) en is na twee jaar teruggekeerd naar de Faculteit Diergeneeskunde op een 5 jarig Akademie-fellowship (KNAW). Hij is thans Universitair Hoofd Docent en leider van een team dat onderzoek verricht op de moleculaire interacties tussen gameten van zoogdieren die van belang zijn bij de bevruchting.

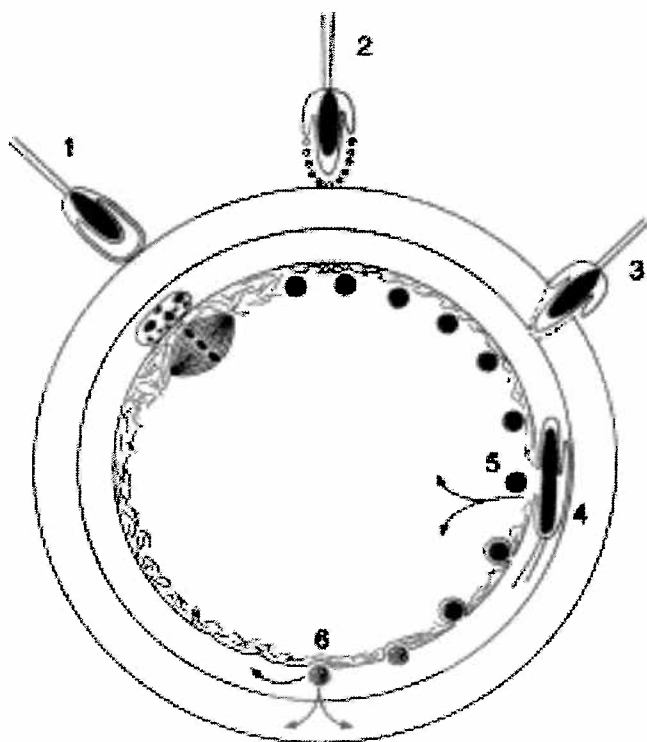
In de voorbereiding van de bevruchting van de eicel vormt de activering van de spermacel dus een cruciale stap. Dit proces kan goed worden nagebootst onder in vitro condities die dan ook routinematig worden benut voor dit doeleinde in de in vitro fertilisatie (IVF) klinieken. Spermacellen worden eerst gewassen waardoor het ejaculaatvocht maar ook oppervlakte coatingseiwitten die de spermactivering remmen worden weggevoerd van de zaadcel. De buffer waarin de gewassen spermacellen vervolgens worden verdund bootst de electrolytische en voedingscondities van de eileider na en wordt dan ook wel SOF medium (synthetic oviductal fluid) genoemd. De pH daarvan is zwak basisch (pH 7.4) en de bicarbonaat concentratie vrij hoog (25 mM) daarnaast bevat het fysiologische hoeveelheden glucose pyruvaat en lactaat. Spermacellen worden binnen een uur of 4 geactiveerd en kunnen dan de eicel in een reageerbuis bevruchten. Het is lange tijd onduidelijk geweest hoe het basisch worden van de spermacel nu eigenlijk tot stand

komt. Deze is er immers mede verantwoordelijk voor dat het bicarbonaat gehalte van de spermacellen zal toenemen en speelt daarmee een centrale regulerende rol in de activering van de spermacel. Recent is hierin duidelijkheid gekomen door een studie gepubliceerd in Cell (Linshko et al., 2010): Er blijken op de staart van de spermacel protonkanalen te zijn die voor dit protontransport zorg dragen. Deze protonkanalen (type Hv1) blijken actiever te worden als het Zn^{2+} gehalte daalt. Zn^{2+} komt in hoge concentraties voor in het ejaculaatvocht terwijl het in erg verdunde concentraties aanwezig is in de eileider (en in het SOF medium).

Door de andere ion samenstelling worden de voltage gated Hv1 kanalen opengezet.

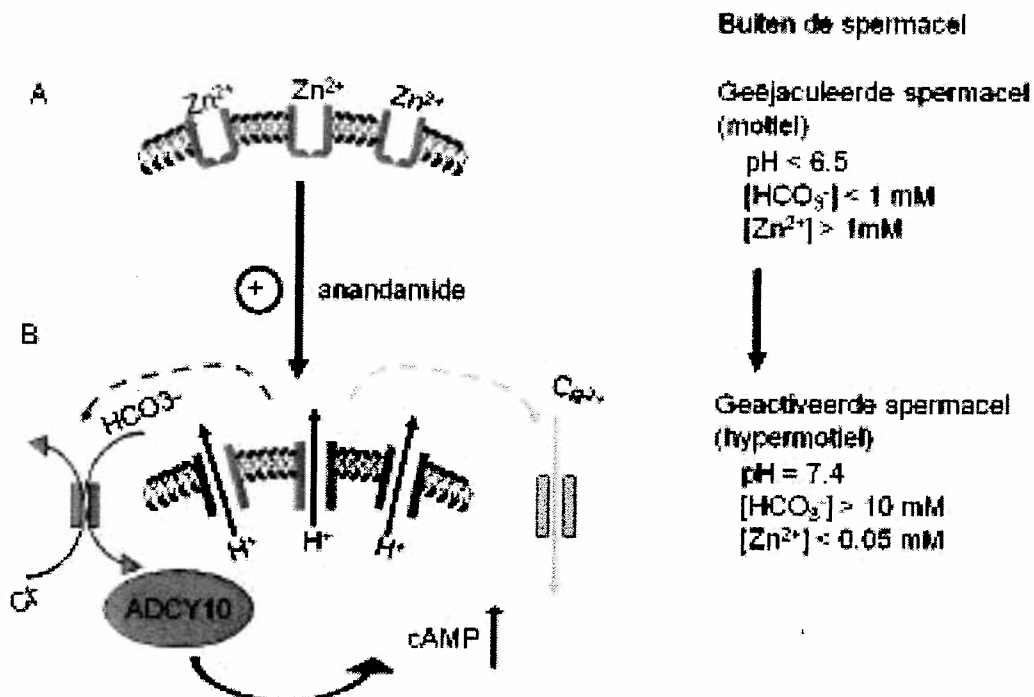
Zodat protonen van het cytosol naar de extracellulaire buffer worden getransporteerd zodat de spermacel meer basisch wordt.

Naast de Hv1 kanalen bestaat er ook Na^+/H^+ uitwisseling over de sperma plasmamembraan via een antiport eiwit die mede zorg draagt voor het basisch worden van de spermacel. De rol daarvan is aangetoond met knock-out muizen (Wang et al., 2007). Hoe belangrijk de Hv1 kanalen werkelijk zijn voor de verandering in pH moet eigenlijk nog worden aangetoond met knock-out muizen die spermacellen produceren zonder dit protonkanaal. Dit onderzoek is problematisch omdat muizenspermacellen geen Hv1 kanalen lijken te hebben (Linshko et al., 2010). Maar dat kan te maken hebben met het feit dat er bij onderzoek met muizen met onrijpe spermacellen moet worden gewerkt (het muizensperma wordt verkregen door het uit de bijbal te pipetteren terwijl humaan sperma wordt verkregen door ejaculatie). Het is mogelijk dat de Hv1 kanalen op het onrijpe sperma van de bijbal nog functioneel geblokkeerd zijn en pas na verwijdering van blokkerende factoren in staat zijn om te functioneren (Florman et al., 2010). Dit moet nog nader worden onderzocht. (Fig. 2)



Figuur 1: De interacties die de spermacel aangaat met een eicel zona complex rondom de bevruchting: (1) De binding aan de zona pellucida, (2) de acrosomreactie, (3) de penetratie (drilling) door de zona pellucida, (4) de bevruchtingsfusie, (5) het activeren van de eicel, (6) de corticale reactie die een effectieve polyspermie blokkade opgang zet.

Het aardige van de ontdekking van de Hv1 kanalen is dat ze gemeten zijn met de zogenaamde patch-clamping techniek. Hierbij wordt met een superklein pipetje de spermacel vast gezogen. De cel staat daarmee bij de mond van de micropipetpunt in contact met het milieu van de vloeistof in de pipet en iontransport kan worden gemeten omdat deze een verandering in geleidbaarheid tot stand brengt die kan worden geregistreerd. Het is een huzarenstukje maar de onderzoekers zijn in staat gebleken om de kleine zaadcel (dimensies van de kop x lengte x breedte x dikte is ongeveer 5 x 3 x 1 micrometer, diameter van de staart <1 micrometer) vast te zuigen op de "patch" om zodoende protonen extrusie van de spermacel te meten. Dit is op verschillende plekken van de zaadcel gedaan en alleen de staart bleek geleidbaarheid te hebben. De electrofysiologische localisatie met de patch-clamp techniek bleek overeen te komen met de immunolocalisatie van het Hv1, gerapporteerd door dezelfde onderzoekers.



Figuur 2: De centrale rol van het openen van de protonkanalen bij de activering van de spermacel (links). Door de veranderde ionconcentraties in de omgeving van de spermacel (rechts) worden de Hv1 kanalen geopend. Dit kan worden tegen gegaan door kunstmatig Zn^{2+} ionen aan het medium toe te voegen of gestimuleerd worden door anandamide toe te voegen. Beiden werken op het dichtstaan of openen van de Hv1 kanalen. In groen en rood staan de Cl^-/HCO_3^- antiporter (rood) en het Ca^{2+} kanaal (CatSper, groen) die respectievelijk worden geactiveerd of geopend na de protonenextrusie en het basisch worden van de spermacel. Zowel bicarbonaat als calcium ionen komen uiteindelijk de spermacel binnen als gevolg protonenextrusie via Hv1 kanalen en van zijn van belang voor de activering van de spermacel.

Een tweede aardige bijkomstige vinding is dat endocannabinoïden zoals anandamide ook de spermacellen kan activeren door dezelfde Hv1 protonkanalen open te zetten (Francavilla et al., 2009; Lewis & Maccarrone 2009). Daarom zouden cannabinoïde stoffen aan de ene kant de spermacel activering kunnen bespoedigen bij mannen waar dit onder IVF condities niet goed verloopt en wellicht biedt dat kansen voor het ontwikkelen van medicijnen voor onvruchtbaarheid.

Aan de andere kant blijkt dat mannen die regelmatig blowen en daarmee verwante cannabinoïden inhaleren nogal eens vruchtbaarheidsproblemen hebben.

Mogelijk omdat de spermacel activering te vroeg opstart. Daarom

kunnen dit soort cannabinoïde stoffen eveneens ontwikkeld worden om te dienen als anticonceptivum. Ontwikkeling van farmaca uit (endo)cannabinoïden kan dus mogelijk een toepassing krijgen in de humane voortplantingsgeneeskunde.

Literatuur

Florman HM, Jungnickel MK and Sutton KA. Shedding light on sperm pHertility. *Cell* (2010) 140:310-311

Francavilla F, Battista N, Barbonetti A, Vassallo MRC, Rapino C, Antonangelo C, Pasquariello N, Catanzaro G, Barboni B and Maccarrone M. Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability. *Endocrinology* (2009) 150:4692-4700.

Gadella BM and Van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci.* (2004) 82-83:307-19.

Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* (2005) 9:249-59.

Kirichok Y, Navarro B and Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* (2006) 439:737-740

Lewis SE and Maccarrone M. Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. *Pharmacological Research* (2009) 60:121-131.

Linshko PV, Botchkina IL, Fedorenko A and Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* (2010) 140:327-337.

Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL. A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 29;104(22):9325-30.

Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm: identification of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- dependent and arylaminobenzoate dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* (1996) 173:510-520.