

## Abstract

Many aquatic organisms reproduce by external fertilization – they release eggs and sperm into the water. The immotile egg attracts sperm by releasing small compounds. The directed swimming behaviour of sperm towards the egg is called chemotaxis.

The sea urchin *Arbacia punctulata* is a model organism for the study of the molecular mechanisms of sperm chemotaxis. Resact is the chemoattractive peptide. Binding of resact to its receptor – a guanylyl cyclase – stimulates the rapid synthesis of the second messenger cGMP in the flagellum. Subsequently,  $\text{Ca}^{2+}$  channels open. The increase of  $\text{Ca}^{2+}$  controls the pattern of the flagellar beat, thereby changing the swimming direction of sperm. For a long time, the mechanisms which lead to the  $\text{Ca}^{2+}$  increase were a matter of controversial debate. Recently, voltage recordings from intact sperm showed that resact evokes a brief hyperpolarization, which is followed by a sustained depolarization. It was assumed that the hyperpolarization is caused by the opening of  $\text{K}^+$ -selective cyclic nucleotide-gated (CNGK) channels.

In the present study, I have cloned the CNGK channel that causes the hyperpolarization. The channel, designated ApCNGK, is localized in the flagellum of *A. punctulata* sperm. The ApCNGK channel has several unique features compared to other CNG channels: it is encoded by a single, large polypeptide that comprises four similar repeats; it is selective for  $\text{K}^+$  ions; the channel opens in a non-cooperative fashion; it is exquisitely sensitive to cGMP ( $K_{1/2} \approx 25$  nM), and a single molecule of cGMP suffices to open the channel.

Sperm of *A. punctulata* transduce the binding of a single resact molecule into a cellular response. The features of ApCNGK contribute to the high sensitivity of the chemotactic signalling pathway of *A. punctulata* sperm.

## Zusammenfassung

Im Wasser lebende Organismen pflanzen sich häufig durch externe Befruchtung fort – sie entlassen Eizellen und Spermien ins Wasser. Die Eizelle setzt Substanzen frei, die das Spermium anlocken. Das gerichtete Schwimmen hin zur Eizelle nennt man Chemotaxis.

Als Modellorganismus zur Erforschung der Chemotaxis von Spermien dient der Seeigel *Arbacia punctulata*; einige Komponenten des chemotaktischen Signalwegs von *A. punctulata* Spermien sind bereits bekannt. Der Lockstoff von *A. punctulata* ist Resact, ein Peptid von 14 Aminosäuren. Bindet Resact an seinen Rezeptor, eine membranständige Guanylylzyklase, stimuliert es die schnelle Synthese des intrazellulären Botenstoffs cGMP. Damit wird ein Signalweg eingeleitet, der zur Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen führt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kontrolliert das Schlagmuster des Flagellums und führt so zum gerichteten Schwimmen auf die Eizelle zu. Die Mechanismen, die zur Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führen, wurden lange Zeit kontrovers diskutiert. Zuletzt konnten kinetische Messungen an lebenden Spermien zeigen, dass die Stimulation mit Resact zu einer schnellen, transienten Hyperpolarisation der Zelle führt. Es wurde vermutet, dass ein  $\text{K}^+$ -selektiver zyklisch Nukleotid-gesteuerter (CNGK) Ionenkanal diese Hyperpolarisation hervorruft.

In meiner Doktorarbeit ist es mir gelungen, diesen Ionenkanal, ApCNGK genannt, zu klonieren und im Flagellum von *A. punctulata* Spermien nachzuweisen. Der ApCNGK-Kanal weist – verglichen mit klassischen CNG-Kanälen – einige ungewöhnliche Eigenschaften auf: Er besitzt vier Kanaldomänen in einer einzigen Polypeptidkette; er ist  $\text{K}^+$ -selektiv; der Kanal öffnet nicht-kooperativ; er ist hoch sensitiv für cGMP ( $K_{1/2} \approx 25 \text{ nM}$ ), und die Bindung eines einzelnen cGMP-Molekül reicht aus, um den Kanal zu aktivieren. Diese Eigenschaften des ApCNGK-Kanals verleihen *A. punctulata* Spermien eine hohe Empfindlichkeit: Sie können die Bindung eines einzelnen Resact-Moleküls in eine zelluläre Antwort umsetzen.