

Diss. ETH No. 28897

Simulating the first steps of fertilization: Molecular Dynamics and Steered Molecular Dynamics studies of Juno and Izumo

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

PAULINA PACAK

Master Sciences, Technologies, Santé, Université Paris Diderot- Paris 7

born on 22.02.1993

citizen of

Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dr. h.c. Viola VOGEL, examiner

Prof. Dr. Michael NASH, co-examiner

Prof. Dr. Patrick BARTH, co-examiner

2022

Abstract

Infertility affects approximately 15% of couples globally, amounting to 50 million of them being unable to conceive. Mostly, the cause for it remains unexplained. With assisted reproductive *in vitro* technologies, it is nowadays possible to overcome some of the shortcomings by injecting the sperm directly into the oocyte. However, the molecular details which lead to the fusion of sperm and oocyte, could help to apply less invasive treatments are still largely unknown. Sperm-egg adhesion and membrane fusion are the first molecular steps of sexual reproduction in mammals. The proteins that make the first physical contact between two plasma membranes of gametes comprise: Juno, on the outer membrane of the female egg, and Izumo, on the surface of the male sperm. Juno is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored globular protein. Even though it is a member of the Folate Receptor (FR) family, it was shown not to bind folate when tested alone in a solution. Its feature distinguishing it from other FRs (and from Junos of other species), is an unusually long segment of its inhibitory loop of an unknown function. Izumo is a rod-like, trans-membrane protein with its extracellular parts composed of three segments: helical bundle on its N-terminal, hinge region and immunoglobulin (Ig)-like domain on its C-terminal. It can exist in two conformations, straight and boomerang, where its two domains are in a linear position or bent towards each other. Here, using computational tools, we studied the structure-function relationship of the Juno-Izumo complex. More specifically, we used approaches of equilibrium Molecular Dynamics (MD) and Steered Molecular Dynamics (SMD) simulations to gain structural insights into the trajectories by which tensile mechanical forces stretch and then dissociate the complex.

First, we took a closer look at Juno and Izumo, their structural states alone and in the complex with one another. We examined: how do their crystal structures change when getting hydrated in explicit water, which structural changes occur upon complexation,

what are lifetimes of the bonds that form between Juno and Izumo and can this behavior explain the influence of some factors known to be present at fertilization. We could show that the Juno-Izumo contact site comprises a large cluster of more than 30 short-lived interactions. We then observed *in silico*, a spontaneous folate binding to Juno, while in complex with Izumo. However only if Juno was complexed to Izumo which stabilized the inhibitory loop positioned at the entrance of the folate binding pocket in an open position. Furthermore, we confirmed Izumo's preference for the "straight" state when in complex with Izumo and showed the possible co-existence of "straight" and "boomerang" conformations of Izumo in solution. Moreover, the MD data thus suggest that the presence of heavy metal ions (Zn^{2+}) could shift the conformational distribution towards the "boomerang" shape. This behavior could potentially be disruptive for the Juno binding and therefore, could potentially explain structurally why exposure to heavy metals reduces fertility, or possibly be exploited to suppress fertilization. As sperm-egg fusion triggers the activation of the egg which includes the release of zinc ions, also referred to as "zinc spark", into extracellular space, this increased concentration of Zn^{2+} could be, among its other roles, destined to prevent the binding of Izumo from subsequent sperms and thereby serve as the first, fast polyspermy block.

We then asked, given that Juno is GPI-anchored to the lipid membrane of the egg, how does it orient on the lipid membrane and to what extent does this depend on the lipid composition. Using MD on different length and resolution scales, Coarse Grained and atomistic, we showed preferred Juno poses on the membrane and its possible lipid interaction sites. The preferred orientation on a lipid membrane that mimics the composition of lipid rafts, suggests that Juno can form dimers and linear multimers, and that this is potentially enhanced via loss of its intramolecular disulfide bonds. This local organization of Juno on the egg membrane could be an another regulatory mechanism, tightly coordinating the process of sperm-egg adhesion and fusion.

Finally, we asked how could the mechanical forces, undoubtedly present at the sperm-egg adhesion site, impact the Juno-Izumo interaction. To this end we have created a series of constant pulling SMD simulations. To assess its unbinding pathway, we chose orientations

that could be easily reproduced in wet lab experiments to pull two proteins apart. We have observed an initial increase in the contact area in response to the pulling force, different trajectories towards the rupture, one of which showed an extended lifetime and multi-branched force propagation pathways across the complex enabling distribution of the pulling forces. Taken together, those results suggest that the Juno-Izumo complex has high mechanical stability, with some characteristics of catch bond-like behavior. Further, to understand Juno-Izumo response to shear stress, we pulled on the complex in 5 other directions and observed alternative behavior of the Juno-Izumo complex. As sperms from different species push with different velocities, the mechanical design of the Juno-Izumo complex could therefore have evolved to serve as a first force-controlled species selection, suggesting that the mechanical stability of the complex depends on the direction from which the force is applied.

Many important factors, present at the fertilization are not accessible via experimental methods of structural biology, particularly if they are only transiently present in the gametes adhesion and fusion process, such as partial restraints posed by membrane binding or mechanical forces coming from the energetic flagellum movement. Using MD and SMD simulations, we were able to provide new insights into the interaction of Juno-Izumo complex with their additional binding that could be of a significant clinical relevance. The *in silico* results will help to decipher the mechanical design of the Juno-Izumo complex, important for the early stages of sexual reproduction. Our results possess great potential to inspire new experimental studies and hopefully, develop new infertility treatments and diagnosis strategies.

Résumé

L'infertilité touche environ 15% des couples dans le monde, ce qui représente 50 millions de couples incapables de concevoir. La plupart du temps, sa cause reste inexpliquée. Grâce aux techniques de procréation assistée in vitro, il est aujourd'hui possible de remédier à certains problèmes en injectant le sperme directement dans l'ovocyte. Cependant, les détails moléculaires qui conduisent à la fusion du sperme et de l'ovocyte, et qui pourraient permettre d'appliquer des traitements moins invasifs, sont encore largement inconnus. L'adhésion sperme-ovocyte et la fusion membranaire sont les premières étapes moléculaires de la reproduction sexuelle chez les mammifères. Les protéines qui établissent le premier contact physique entre deux membranes plasmiques des gamètes sont Juno, sur la membrane externe de l'ovocyte femelle, et Izumo, à la surface du sperme chez le mâle. Juno est une protéine globulaire ancrée au glycoposphatidylinositol (GPI). Elle fait partie de la famille des récepteurs des folates (FR), et ne se lie pas aux folates lorsque testée seule en solution. Elle se distingue des autres FR (et des Junos d'autres espèces) par un segment de sa boucle inhibitrice inhabituellement long et dont la fonction est inconnue. Izumo est une protéine transmembranaire en forme de bâtonnet, dont les parties extracellulaires sont composées de trois segments: un faisceau de quatre hélices sur son N-terminal, une région charnière et un domaine de type immunoglobuline sur son extrémité C-terminal. Elle peut exister dans deux conformations, droite ou boomerang, avec ses deux domaines alignés ou repliés l'un vers l'autre. En utilisant des outils informatiques, nous avons étudié la relation structure-fonction du complexe Juno-Izumo. Plus précisément, nous avons utilisé des approches de simulations de dynamique moléculaire (MD) à l'équilibre et de dynamique moléculaire dirigée (SMD) afin d'obtenir des informations structurales sur les trajectoires selon lesquelles les forces mécaniques de traction étirent puis dissocient le complexe.

Tout d’abord, nous avons examiné les états structuraux seuls et en complexe l’un avec l’autre de Juno et Izumo, en posant les questions suivantes: Comment leurs structures cristallines changent-elles lorsqu’elles sont hydratées dans de l’eau explicite? Quels changements structuraux se produisent lors de l’association en complexe? Quelle est la durée de vie des liaisons qui se forment entre Juno et Izumo? Les facteurs connus pour influencer la fécondation peuvent-ils être expliqués par ce comportement? Nous avons pu montrer que le site de contact de Juno-Izumo comprend un large cluster de plus de 30 interactions à courte durée de vie. Nous avons observé *in silico* la liaison spontanée du folate à Juno, cependant seulement si Juno est complexé à Izumo. Cette relation stabilise la boucle inhibitrice positionnée à l’entrée de la poche de liaison du folate en position ouverte. De plus, nous avons confirmé la préférence d’Izumo pour l’état “droit” lorsqu’il est en complexe avec Juno et montré la coexistence possible des conformations “droite” et “boomerang” d’Izumo en solution. De plus, les données MD suggèrent ainsi que la présence d’ions de métaux lourds (Zn^{2+}) pourrait déplacer la distribution conformationnelle vers la forme boomerang. Ce comportement pourrait potentiellement perturber la liaison avec Juno et être exploité. La fusion de sperme avec l’ovocyte déclenche l’activation ovocytaire qui inclut la libération d’un nuage d’ions zinc, également appelé “étincelle de zinc”, dans l’espace extracellulaire. Cette concentration accrue de zinc pourrait, entre autres rôles, être destinée à empêcher la fixation d’Izumo par les spermatozoïdes suivants et servir ainsi de premier bloc rapide de polyspermie.

Comme Juno est ancré par GPI à la membrane lipidique de l’ovocyte nous nous sommes ensuite posé la question suivante : comment Juno s’oriente-t-elle sur la membrane lipidique, et quelle est l’influence de la composition des lipides ? En utilisant la MD à différentes échelles de longueur, à gros grains et atomistique, nous avons montré les poses préférées de Juno sur la membrane et ses sites d’interaction lipidique possibles. L’orientation préférée sur une membrane lipidique qui imite la composition des radeaux lipidiques, suggère que Juno peut former des dimères et des multimères linéaires, et que cela est potentiellement accentué par la perte de ses liaisons disulfure intramoléculaires. Cette organisation locale de Juno sur la membrane de l’œuf pourrait être un autre mécanisme de régulation, coordonnant étroitement le processus d’adhésion et de fusion

sperme-ovocyte.

Enfin, nous nous sommes demandé comment les forces mécaniques, indubitablement présentes sur le site d'adhésion sperme-ovocyte, pouvaient avoir un impact sur l'interaction Juno-Izumo. À cette fin, nous avons créé une série de simulations SMD à traction constante. Pour évaluer la voie de déliaison, nous avons choisi des orientations facilement reproductibles dans des expériences en laboratoire pour séparer deux protéines. Nous avons observé une augmentation initiale de la surface de contact en réponse à la force de traction et deux trajectoires différentes avant la rupture, dont l'une a montré une durée de vie prolongée. L'un d'entre eux a permis de prolonger la durée de vie de l'interaction Juno-Izumo via la création d'une nouvelle interface, qui a montré pour la première fois le rôle potentiel de la mutation HIS177 de Juno associée à la polyspermie dans la liaison Izumo. De plus, nous avons observé des voies de propagation de force multibranches à travers le complexe, complexe permettant de distribuer les forces de traction. Enfin nous avons analysé les événements de rupture. L'ensemble de ces résultats suggère que le complexe Juno-Izumo présente une grande stabilité mécanique, avec des caractéristiques de comportement de type "catch bond". Comme les spermatozoïdes de différentes espèces poussent à des vitesses différentes, la conception mécanique du complexe Juno-Izumo pourrait avoir évolué pour servir une sélection du sperme contrôlée par la force. En outre, pour comprendre la réponse de Juno-Izumo à la contrainte de cisaillement, nous avons étiré le complexe dans 5 autres directions et observé un comportement alternatif.

De nombreux facteurs importants, présents lors de la fécondation, ne sont pas accessibles aux méthodes expérimentales de la biologie structurale, en particulier s'ils ne sont que transitoirement présents dans le processus d'adhésion et de fusion des gamètes, tels que les contraintes partielles posées par la liaison membranaire ou les forces mécaniques provenant du mouvement énergétique du flagelle. En utilisant des simulations MD et SMD, nous avons pu fournir de nouvelles informations sur l'interaction du complexe Juno-Izumo avec leur liaison supplémentaire qui pourrait être d'une importance clinique significative. Les résultats in-silico aideront à comprendre la

conception mécanique du complexe Juno-Izumo, importante pour les premières étapes de la reproduction sexuelle. Nos résultats possèdent un grand potentiel pour inspirer de nouvelles études expérimentales et, espérons-le, pour développer de nouveaux traitements de l'infertilité et des stratégies de diagnostic.