



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

*INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA*

“IDENTIFICACIÓN DE CANALES DE CALCIO EN EL  
ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

GI SELA GRANADOS GONZÁLEZ

ASESORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ

CUERNAVACA, MOR.

2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A mi pequeño Oswaldo, eres la mayor bendición que me ha dado la vida, me has hecho la mujer más feliz del mundo, emanas tanta fuerza y entusiasmo que me haces seguir adelante, "yo también TE AMO"*

*A Oswaldo, por enseñarme y aprender conmigo, por tu amor y tu presencia, gracias  
MA*

*A mis papas Irma y Lorenzo*  
*A mi hermana Gaby, a Jorge*  
*A mis sobrinos Julieta y Andrés*

*Gracias por todo el apoyo que me han brindado, este logro  
también es de ustedes, los quiero mucho*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Carmen Beltrán gracias por todas tus enseñanzas y por ser mi "Pepe Grillo".

Al Dr. Alberto Darszon por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Esme, Blanca, José Luis, Chris, Nachito, Daniel, Takuya, Gabriel, Lucía, Laura, Carlos, Yuyú.

A Yolo, Laura, Tak, Conchita, Herbert, Esme, Blanca, Fabián, Daniel, Lauris, Nachito, Carlos, Lucy, Rayo, Mario, Mariana, Viviana, Denhí, Enrique, Chris, Claudia, Vero, Tona, por tantos momentos divertidos y por su sincera amistad.

A Lulú, Monik, Fer, por su incomparable amistad.

A Miriam, tu forma de ser siempre tan positiva me ha hecho crecer personalmente, gracias por ser mi amiga.

A los González, por ser una gran familia y estar siempre cerca.

A la familia Hernández-Gallegos, por aceptarme a ser parte de ustedes.

Al comité tutorial Dra. Hilda Lomelí B. y Dra. Blanca E. Galindo B, por sus valiosas aportaciones en la realización de éste trabajo.

De manera especial quiero agradecer al Dr. Marco T. González Martínez, sus comentarios y sugerencias me ayudaron a mejorar este trabajo, y aunque ya no pudo verlo concluido, gracias por todo, donde quiera que este.

A los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias: Dr. Jean Louis Charli, Dra. Verónica Narváez, Dr. Ignacio López, Dr. Gustavo Pedraza y Dra. Carmen Beltrán.

A CONACYT y DGEP por la ayuda económica que me brindaron durante la realización de este proyecto.

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
El erizo de mar	11
El espermatozoide de erizo de mar	13
La movilidad	13
La Reacción Acrosomal (RA)	23
Los canales de Ca <sup>2+</sup>	29
Los canales Ca <sub>v</sub>	29
Canales SOCs	35
Canales TRP	36
La subfamilia TRPC	38
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>40</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
Gametos y Reactivos	41
Aislamiento de ARN y experimentos de RT-PCR	42
Análisis de secuencias	43
Análisis Filogenético	43
Northern blot	44
Inmunolocalización	45
Western blot	46
<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
La expresión de los suCa <sub>v</sub> s se detectó en el testículo de <i>S. purpuratus</i> .	48
Dos Ca <sub>v</sub> s en la base de datos del Genoma del Erizo de mar	51
Inmunolocalización de las proteínas de los canales of suCa <sub>v</sub> L1 and suCa <sub>v</sub> NL1 en el espermatozoide de <i>S. purpuratus</i>	54
Análisis de las proteínas de los canales TRPC en el espermatozoide de <i>S. purpuratus</i>	60
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>72</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>94</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilil ciclase
AMA	Agua de mar artificial
1 CaAMA	Agua de mar artificial conteniendo 1 mM $\text{Ca}^{2+}$ pH 7.0
$\text{AMP}_c$	Adenosina 3',5'-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
BLMs	Bicapas lipídicas planas
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular
$\text{Ca}_v$	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltage
DAG	Diacylglicerol
DHP	Dihidropiridinas
DIDS	4,4'-diisotiocianatostilbeno-2-2'-ácido disulfónico
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
EGTA	Etilenglicol-bis-( $\beta$ -amino-etileter)N,N'-ácido tetracético
$E_m$	Potencial de membrana
FSP	Polímero de fucosa sulfatada
$\text{GMP}_c$	Guanosina 3',5'-monofosfato
$\text{IP}_3$	Inositol 1,4,5 trisfosfato
KB-R7943	2-(2-(4-Nitrobenzyloxy)fenil)isotioureametanosulfonato
$[\text{K}^+]_e$	Concentración de potasio extracelular
kDa	Kilodaltones
MP	Membrana plasmática
PBS	Buffer salino de fosfatos
$\text{pH}_i$	pH intracelular
PLC	Fosfolipasa C
RA	Reacción Acrosomal
REJ	Receptor para la gelatina del óvulo homólogo
SAP	Péptido activador del espermatozoide
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS
SOCE	Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ operada por pozas
SOCs	canales de $\text{Ca}^{2+}$ activados por el vaciamiento de pozas internas
TEA	Tetraetilamonio
TRP	Receptor de potencial transitorio
VH	Vesículas híbridas

## RESUMEN

La fecundación es un evento fundamental en la generación de un nuevo individuo, lo que implica la participación de dos células altamente diferenciadas: el óvulo y el espermatozoide. Los canales iónicos son un instrumento de diálogo entre el espermatozoide, su medio ambiente y el óvulo. En particular, el  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero que participa en la regulación de varios procesos fisiológicos del espermatozoide, tales como la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula puede producirse a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_V$ ), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por el vaciamiento de pozas internas y/o por segundos mensajeros (SOCs, TRPs), entre otros.

En este trabajo, se identificaron por primera vez las subunidades de los canales  $\text{Ca}_V$  ( $\text{Ca}_V1.2$  y  $\text{Ca}_V2.3$ ) y de los canales tipo TRP (Transient Receptor Potential) (TRPC (Canónicos) 3, 5 y 6) en el espermatozoide de erizo de mar. La localización diferencial de dichos canales en el espermatozoide de erizo de mar utilizando anticuerpos contra los canales  $\text{Ca}_V$ 's y los TRPC's de mamífero, sugiere que estos canales pueden estar implicados en diferentes funciones tales como la movilidad y la RA.



## INTRODUCCIÓN

Los flujos iónicos juegan un papel esencial en el diálogo entre gametos (Wassarman *et al.*, 2001). La movilidad del espermatozoide es una característica fundamental para que los gametos puedan encontrarse uno al otro y así generar un nuevo individuo. Componentes difusibles del óvulo preparan y guían al espermatozoide a encontrar al óvulo (Fig. 1) (Miller y Vogt, 1996; Morisawa, 1994). Durante la reacción acrosomal (RA), el acrosoma y la membrana plasmática se fusionan, lo que permite la conjunción de eventos en el espermatozoide que son necesarios para la penetración de la capa de gelatina que rodea al óvulo y posteriormente la fusión con la membrana plasmática de dicho óvulo (Yanagimachi, 1998).



Figura 1. Fecundación en el erizo de mar. Fotomicrografía donde se muestran espermatozoides de erizo de mar rodeando al óvulo.

En especies acuáticas, el estado metabólico y la movilidad del espermatozoide se estimula de manera especie-específica por pequeños péptidos (~10-14 aminoácidos) llamados péptidos activadores del espermatozoide (SAP's), que se encuentran en la capa de gelatina que rodea al óvulo. Estos péptidos difusibles inician el diálogo entre los gametos de erizo de mar, influenciando la fisiología del espermatozoide a través de receptores específicos e incrementando su metabolismo y movimiento (llamado quimiocinesis) o directamente el movimiento del espermatozoide hacia el óvulo (quimiotaxis) (Ward *et al.*, 1985).

Posiblemente estos péptidos pueden facilitar la RA, actuando de manera concertada con el inductor natural (polímero de fucosa sulfatada (FSP) llamado "Factor" (Vacquier, 1998), que se encuentra en la capa de gelatina que rodea al óvulo) y promoviendo la penetración del espermatozoide a través de la capa de gelatina (Darszon *et al.*, 1996; Hirohashi y Vacquier, 2002a; Suzuki y Garbers, 1984; Vacquier y Moy, 1997).

El Speract (SAP1) es un decapeptido (GFDLNGGGVG) presente en la capa de gelatina de *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki, 1995), de *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough y Garbers, 1981) y de *Lytechinus pictus*. A concentraciones picomolares estimula la movilidad y respiración del espermatozoide, así como el metabolismo de fosfolípidos (Hansbrough *et al.*, 1980). El SAP1 causa una hiperpolarización transitoria mediada por GMPc, que regula un canal selectivo a K<sup>+</sup> (Babcock *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 2000 y Galindo 2007; Lee y Garbers, 1986). Esto

estimula una disminución rápida de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Nishigaki *et al.*, 2004) seguida de un aumento transitorio que involucra al menos dos tipos de transportadores de  $Ca^{2+}$ ; posiblemente canales dependientes de voltaje y transportadores de  $Ca^{2+}$  dependientes de AMPc (Cook y Babcock, 1993; Kaupp *et al.*, 2003; Reynaud *et al.*, 1993).

El componente de la capa de gelatina del óvulo que induce la RA (un evento crucial para la fecundación) es un polímero de fucosa sulfatada (FSP) llamado "Factor" (Vacquier, 1998). Este componente induce la entrada de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , y la salida de  $K^+$  y  $H^+$ , que da como resultado un aumento en las  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Na^+]_i$  y en el  $pH_i$ ; además también cambia el potencial de membrana ( $E_m$ ) (Darszon *et al.*, 2001; Rodriguez y Darszon, 2003; Schackmann, 1989). El FSP también activa cinasas y fosfatasas y eleva los niveles de AMPc e  $InsP_3$  (Garbers, 1989). Antagonistas de canales de  $K^+$  ( $TEA^+$ ) y de canales  $Ca_v$  (verapamil,  $Ni^{2+}$  y dihidropiridinas (DHPs)) inhiben la RA, lo cual indica su participación en este proceso (Darszon *et al.*, 1999).

### ***El erizo de mar***

El erizo de mar se utiliza en estudios de fecundación y embriogénesis, ya que como modelo de estudio presenta varias ventajas como: produce una gran cantidad de gametos, son organismos de fecundación externa, es fácil mantenerlos en el laboratorio y tienen sexos separados (Fig. 2). Durante la espermatogénesis se han caracterizado morfológicamente a los tipos celulares testiculares, así como la expresión del receptor para la

gelatina del óvulo homólogo (REJ) (Ward *et al.*, 1994; Longo y Anderson, 1969; Nishioka *et al.*, 1987). Sin embargo, hasta 2005 no se sabía nada acerca de los canales iónicos en estas células.



Figura 2. El erizo de mar. *Strongylocentrotus purpuratus*.

En el erizo de mar la espermatogénesis sigue un ciclo anual, produciendo millones de gametos cada temporada reproductiva. Cada animal tiene cinco gónadas arregladas radialmente en la cavidad del cuerpo, se subdividen por capas de epitelio y tejido conectivo en numerosos compartimentos, que son estructuras redondas con lúmenes individuales en el centro (Smith y Poccia, 1991).

## ***El espermatozoide de erizo de mar***

### **La movilidad**

La movilidad es probablemente el proceso mejor regulado por el espermatozoide. El espermatozoide de erizo de mar se encuentra inactivo en la gónada y se activa después de ser eyaculado al agua de mar, los cambios iónicos entre los gametos y el agua de mar activan al espermatozoide.

Estas células están inmóviles en el testículo ya que existe una alta concentración de  $\text{CO}_2$  en el semen, lo que mantiene el  $\text{pH}_i$  a  $\sim 7.2$ . La dineína que es una ATPasa que se encuentra en el flagelo, es inactiva por debajo de  $\text{pH} 7.3$ , esto reprime la movilidad y la respiración (consumo de oxígeno) (Johnson *et al.*, 1983; Christen *et al.*, 1982). Cuando los espermatozoides se liberan al agua de mar la concentración de  $\text{CO}_2$  que rodea al espermatozoide baja, se induce una liberación de  $\text{H}^+$ , aumenta el  $\text{pH}_i$  a  $\sim 7.5$ , y se activa la dineína catalizando la hidrólisis de ATP. La producción de ADP, el substrato para la fosforilación oxidativa, permite un aumento de 50 veces de la respiración mitocondrial, con lo que se inicia la movilidad (Mitchel, 2004; Darszon *et al.*, 2007, 2008).

La activación de la movilidad se inhibe en agua de mar sin  $\text{Na}^+$  y se restablece añadiendo  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  a dicha agua. El espermatozoide de erizo de mar posee un intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el flagelo. Este intercambio que

participa en la activación del espermatozoide es insensible a amilorida y a  $Mg^{2+}$ , es dependiente de voltaje y es modulado por  $Zn^{2+}$  (Clapper y Epel, 1985; Trimmer y Vacquier, 1986; Schackmann, 1989; Darszon *et al.*, 2008). La ATPasa de  $Na^+/K^+$  también participa en la regulación del  $pH_i$ , manteniendo baja la  $[Na^+]_i$  (Gatti y Christen, 1985).

La concentración externa de  $K^+$  ( $[K^+]_e$ ) es más alta en el semen que en el agua de mar. Al liberarse los espermatozoides, el potencial de membrana ( $E_m$ ) se hiperpolariza, esto ocurre por el cambio en la  $[K^+]_e$  del agua de mar con respecto a la gónada (Christen *et al.*, 1986). La activación del espermatozoide se inhibe cuando la  $[K^+]_e$  se incrementa a 100 mM, lo que sugiere que el cambio en la  $[K^+]_e$  es muy importante para la activación del espermatozoide (Lee y Garbers, 1986; Garbers, 1989; Darszon *et al.*, 1999).

Por otro lado, la actividad de la adenilil ciclasa (AC) también es importante en la movilidad de los espermatozoides. El aumento de AMPc puede activar a la Proteína-Cinasa A (PKA), que fosforila al brazo externo de la cadena ligera de la dineína, contribuyendo a la movilidad del espermatozoide de erizo de mar (Inaba *et al.*, 1999; Garbers, 1989; Morisawa, 1994).

El espermatozoide de *S. purpuratus* posee los dos tipos de AC's; la soluble (susAC, que se estimula por  $Ca^{+2}$ , pH alcalino, bicarbonato y la PKA) (Nomura, *et al.*, 2005; Beltrán *et al.*, 2007a) y las AC transmembranales (ACtm; que se regulan por la proteína Gs) (Beltrán *et al.*, 2007a,b). Debido a que la susAC muestra una dependencia al pH, es probable que dicha

enzima se active por aumentos del  $\text{pH}_i$ , como el que el espermatozoide sufre cuando se libera al agua de mar y hace contacto con la capa de gelatina del óvulo homólogo (Beltrán *et al.*, 2007b).

Se sabe que el  $\text{HCO}_3^-$  regula múltiples vías de transducción de señales involucradas en la movilidad del espermatozoide (Morisawa y Morisawa, 1988; Okamura *et al.*, 1985; Hess *et al.*, 2005). También el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) es crucial para la modulación del  $\text{pH}_i$  en muchos sistemas celulares.

Los transportadores de bicarbonato pertenecen a la familia de proteínas que transportan iones  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana plasmática, junto con al menos un ión monovalente. En ratón, el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) del espermatozoide participa en la hiperpolarización de la membrana y aumenta el  $\text{pH}_i$  durante la capacitación (Demarco *et al.*, 2003).

En el espermatozoide de erizo de mar, se clonó un cotransportador (suNBC), que se localiza principalmente en la membrana plasmática del flagelo. El suNBC muestra algunas características comunes con la familia del NBC de mamíferos, y su localización sugiere que participa en la regulación de la movilidad (Gunaratne *et al.*, 2006). Además, el  $\text{HCO}_3^-$  aumenta la movilidad y la hiperactivación del espermatozoide humano a través de la activación directa de una AC soluble (sAC) (Buck *et al.*, 1999) y mediante un aumento en los niveles de fosforilación en residuos de tirosina, de proteínas que van desde los 40,000-120,000 Da, dentro de las cuales solo la hexocinasa ha sido identificada (Visconti *et al.*, 1995).

El speract y el resact (Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>), un péptido que se encuentra en capa de gelatina del óvulo del erizo de mar *Arbacia punctulata*, estimulan la entrada de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> y <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> y la salida de H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Estos cambios de permeabilidad aumentan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y el pH<sub>i</sub> (Schackmann, 1989). Además, estos péptidos elevan las concentraciones de GMPc y AMPc, y como resultado se fosforilan algunas proteínas (Garbers, 1989).

La unión del speract (Fig. 3) a su receptor activa una guanilil ciclasa (GC) de membrana (Dangott y Garbers, 1984; Bentley *et al.*, 1988; Garbers, 1989; Darszon *et al.*, 2006, 2008, Beltrán *et al.*, 2007b). En *A. punctulata*, el resact se une directamente a la GC (Singh *et al.*, 1988). La señalización por speract causa una salida de K<sup>+</sup> a través de canales de K<sup>+</sup> dependientes de GMPc causando una disminución del E<sub>m</sub> del espermatozoide (Babcock *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 2000 y 2007; Strunker *et al.*, 2006). Esta hiperpolarización puede estimular un intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> que mantiene baja la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (DiPolo y Beauge, 1999). Algunas fosfatasa y fosfodiesterasas son sensibles al pH<sub>i</sub> e inactivan rápidamente a la GC, con lo que baja la [GMPc]<sub>i</sub> (Garbers, 1989). Además, una concentración alta de K<sup>+</sup> en el agua de mar bloquea todas las respuestas del espermatozoide al speract exceptuando el aumento en la [GMPc]<sub>i</sub> (Harumi *et al.*, 1992).

La hiperpolarización inducida por el speract estimula: un intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Lee y Garbers, 1986), la actividad de AC (Beltrán *et al.*, 1996;



Galindo *et al.*, 2005) y posiblemente a los canales catiónicos llamados SpHCN1 y SpHCN2 (canales del espermatozoide de erizo de mar activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos) (Gauss *et al.*, 1998, Galindo *et al.*, 2005). Estos cambios permiten un aumento en el  $pH_i$ , en la  $[AMPC]_i$  y en la entrada de  $Na^+$  (Fig.3).

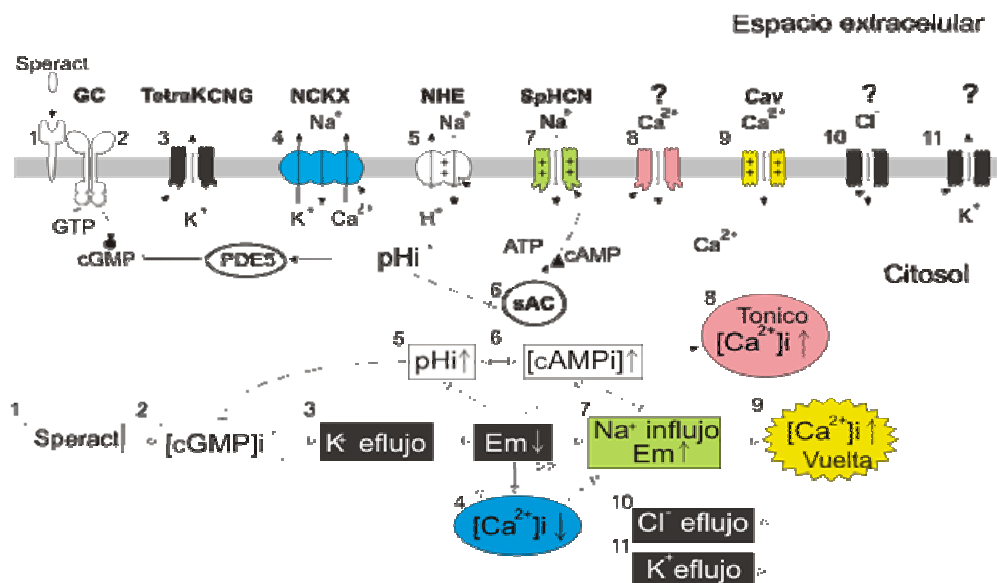


Figura 3. Modelo de la respuesta al speract en el espermatozoide de *S. purpuratus*. (1) El speract se une a su receptor y estimula una guanilil ciclase (GC, 2), aumentando la  $[GMPc]_i$  que induce una salida de  $K^+$  a través de un canal regulado por nucleótidos cíclicos (TetraKCNG, 3), esto produce una hiperpolarización del potencial de membrana ( $E_m$ ). La hiperpolarización transitoria activa algunos componentes: el intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE), lo que da como resultado una alcalinización del  $pH_i$ ; la adenilil ciclase soluble (AC, 6) que aumenta la  $[AMPC]_i$  este segundo mensajero activa a los canales catiónicos regulados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN, 7) los cuales permiten la entrada de  $Na^+$  y pudieran controlar el movimiento rítmico del flagelo. El AMPc pudiera también regular el intercambio de  $Na^+/Ca^{2+}$  que mantiene baja la  $[Ca^{2+}]_i$ , esto a través del intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$  dependiente de  $K^+$  (NCKX, 4) y del NHE (5). La hiperpolarización también remueve la inactivación de los canales de  $Ca^{2+}$  regulados por voltaje ( $Ca_v$ , 9) que se abren por una repolarización. El cotransportador  $Na^+-HCO_3^-$  (NBC) participa en la regulación del  $pH_i$ . Cambios en el  $pH_i$  modulan las fosfodiesterasas (PDE8) reduciendo la  $[GMPc]_i$ . Un canal de  $Cl^-$  ( $Cl^-C$ , 10) sensible a ácido nuflúmico (NA) participa en la regulación del  $E_m$  durante la respuesta al speract. Figura modificada de Beltrán *et al.*, 2007b.

Se han desarrollado y utilizado SAP's fotoactivables (speract y resact enjaulados) así como nucleótidos cíclicos permeables para el estudio de las respuestas rápidas del espermatozoide a los SAP's (Kaupp *et al.*, 2003; Tatsu *et al.*, 2002). Estos compuestos se utilizan para estudiar la quimiotaxis ya que la concentración local de los SAP's se puede controlar con iluminación UV, sin perturbación del medio durante el experimento, lo que puede causar un artefacto en el movimiento del espermatozoide (Kaupp *et al.*, 2003; Strunker *et al.*, 2006; Darszon *et al.*, 2008).

En el flagelo del espermatozoide de *A. punctulata*, se encontraron, por análisis de espectrometría de masas, varios péptidos correspondientes a un fragmento de un nuevo tipo de canal selectivo a  $K^+$ , con un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y con homología a un canal activado por nucleótidos cíclicos (CNG) (Strunker *et al.*, 2006). Estos resultados se corroboraron con mediciones rápidas de Em, donde el resact y el GMPc directamente causan una hiperpolarización por la apertura del canal (Strunker *et al.*, 2006).

Galindo *et al.* (2007) encontraron en el espermatozoide de *S. purpuratus* un nuevo canal regulado por nucleótidos cíclicos y selectivo a  $K^+$  (canal Sp-tetraKCNG, EF151800), con un peso molecular aparente de 250 kDa. El canal Sp-tetraKCNG es un solo polipéptido formado de cuatro dominios, similares a los que presentan los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Cada dominio tiene seis segmentos transmembranales (S1-S6). Cada uno de estos módulos repetidos tienen la

secuencia GYGD, que es distintiva para el filtro de selectividad de los canales de  $K^+$  (Galindo *et al.*, 2007).

El espermatozoide de erizo de mar presenta dos canales que pertenecen a la familia de canales de  $K^+$  activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN), SpHCN1 (Gauss *et al.*, 1998) y SpHCN2 (Galindo *et al.*, 2005). Los canales HCN contribuyen a la despolarización que genera la actividad rítmica del marcapasos en el corazón y en neuronas (Robinson *et al.*, 2003).

El SpHCN1 fue el primer canal del espermatozoide de erizo clonado y expresado heterológamente (Gauss *et al.*, 1998). El SPHCN1 se activa por potenciales hiperpolarizantes y/o por aumentos de AMPc, después de la unión del SAP. El ZD7288, un inhibidor de los canales HCN, modifica la cinética de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por estos (Nishigaki *et al.*, 2004). La selectividad del canal SPHCN1 a  $K^+$  es pobre ( $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 5$ ), por lo que en condiciones fisiológicas dejaría entrar  $Na^+$  y contribuiría a la re o despolarización del espermatozoide. Porque el SpHCN1 se encuentra principalmente en el flagelo y los canales HCN están involucrados en el movimiento rítmico autónomo de neuronas y marcapasos en el corazón, este canal puede modular el movimiento flagelar y participar en la quimotaxis en el espermatozoide de erizo de mar (Kaupp y Seifert, 2001).

Se han registrado canales con estas propiedades en membranas de flagelo de espermatozoide de erizo de mar incorporadas en bicapas lipídicas

planas (BLMs) y por la técnica de "patch-clamp" en espermatozoide de erizo de mar hinchado (Labarca *et al.*, 1996, Sanchez *et al.*, 2001).

Además, en el flagelo del espermatozoide de otras especies de erizo de mar, se ha observado la apertura de una vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  rápida que genera vueltas quimiotácticas en respuesta a quimioatrayentes naturales (Bohmer, 2005).

Resact, el único SAP de erizo de mar para el cual se demostró su capacidad quimioatrayente, necesita de  $\text{Ca}^{2+}$  externo para alterar la movilidad del espermatozoide (Ward *et al.*, 1985). Es importante mencionar que *S. purpuratus* y *A. punctulata* están separados por millones de años en la evolución. Esto indica que puede haber diferencias en la forma en que los SAPs modulan la movilidad del espermatozoide. En *S. purpuratus*, una  $[\text{Ca}^{2+}]$  alta activa un movimiento asimétrico del flagelo en espermatozoides sin membrana (Brokaw, 1979). En el espermatozoide intacto se necesita un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  para que se modifique el movimiento del flagelo (Cook *et al.*, 1994). Aunque la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es crucial para la regulación del movimiento flagelar, poco se conoce acerca de la entrada de calcio activada por los SAPs. Un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  actuando en su modo reverso (normalmente participa en la entrada de  $\text{Na}^+$ ) puede estar participando en el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante este proceso (Schackmann y Chock, 1986). Sin embargo, consistente con la despolarización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por el speract (Reynaud *et al.*, 1993), un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por AMPc pudiera contribuir a esta entrada (Cook y Babcock, 1993).

Bajo condiciones fisiológicas, el espermatozoide puede encontrar efectivamente al SAP solamente en la vecindad del óvulo ( $< 0.5$  mm). Considerando la velocidad lineal del nado del espermatozoide ( $\sim 0.2$  mm/seg), los SAPs pueden afectar su trayectoria solo por unos segundos y saturar sus receptores antes de llegar al óvulo (Nishigaki y Darszon, 2000). Nishigaki *et al.* (2001), realizaron mediciones en tiempo real de la respuesta del espermatozoide a los SAPs utilizando técnicas de mezclado rápido. También se han realizado experimentos utilizando la fotólisis de compuestos enjaulados y técnicas de imágenes para entender la regulación de la movilidad del espermatozoide (Nishigaki *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2003, 2005; Kaupp *et al.*, 2003; Strunker *et al.*, 2006). Estas herramientas han servido para elucidar los procesos de señalización con alta resolución espacial y temporal ya sea en célula única o en población en el espermatozoide de erizo de mar.

Por otro lado se sabe que aumentos en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducen movimientos flagelares asimétricos aumentando la curvatura de espermatozoides sin membrana que pueden seguir nadando (Brokaw, 1987; Cook *et al.*, 1994). Más aún, el  $Ca^{2+}$  externo ( $[Ca^{2+}]_e$ ) se requiere para la quimotaxis inducida por los SAPs (Ward *et al.*, 1985; Morisawa, 1994). Se ha observado que en espermatozoides de algunas especies marinas aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  al estar en contacto con sus respectivos quimioatrayentes (Cook *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2003; Schackmann y Chock, 1986). El  $[Ca^{2+}]_i$  controla la locomoción del espermatozoide y los canales iónicos participan en este proceso. Sin embargo, no se sabe cómo

actúa este catión divalente, ni cómo se transporta y regula durante este proceso fundamental para el espermatozoide.

En espermatozoides individuales de erizo de mar se demostró que el  $[Ca^{2+}]_i$  fluctúa espontáneamente y también en respuesta al speract. Bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje ( $Ca_v$ ) como el  $Ni^{2+}$  y la nimodipina, y cambios en la concentración de  $K^+$  externo que modifican el potencial eléctrico de los espermatozoides, alteran las fluctuaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por el speract (Wood *et al.*, 2003). Recientemente se encontró que el espermatozoide sufre cambios en la movilidad producidos por el GMPc. Este evento requiere la entrada de  $Ca^{2+}$  al flagelo a través de una vía sensible a inhibidores de los canales  $Ca_v$ , indicando la participación de estos canales en la quimiotaxis (Wood *et al.*, 2005, 2007). Alterando la cinética de estas fluctuaciones con ácido niflúmico, un inhibidor de los canales de  $Cl^-$  activados por  $Ca^{2+}$ , se observaron grandes cambios en los patrones de movilidad del espermatozoide (Wood *et al.*, 2007). Además, la activación del espermatozoide de ascidia, es sensible a inhibidores de canales  $Ca_v$ , y la quimiotaxis se puede bloquear con inhibidores de canales SOC (canales operados por pozas internas; Yoshida 1993, 2003) indicando la participación de estos canales en diferentes fenómenos de la movilidad. Se ha sugerido que los canales  $Ca_v$ s pueden contribuir al aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulada por los SAPs (Strunker *et al.*, 2006).

Por otro lado, Strunker *et al.* (2006) reportaron la secuencia parcial de un canal  $Ca_v$  tipo T ( $Ca_v$  3) en el testículo de *S. purpuratus*. Aunque no se conoce su participación en la vía de señalización del speract.

Está reportado que en el genoma de *S. purpuratus* existen 2 homólogos del canal CatSper (Xia *et al.*, 2007). Este canal puede ser un candidato que contribuya al aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por los SAPs. Una conexión entre el AMPc y el canal CatSper sensible a  $\text{pH}_i$ , puede involucrar al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dependiente de voltaje, o una regulación dependiente de AMPc del sitio de fosforilación del canal CatSper.

### **La Reacción Acrosomal (RA)**

La RA en los espermatozoides de todas las especies que poseen acrosoma, incluyendo mamíferos, es esencial para que dicha célula fecunde al óvulo homólogo (Vacquier, 1998; Wassarman, 2001). El acrosoma es una vesícula secretora derivada del Aparato de Golgi, que se encuentra en la cabeza del espermatozoide de muchos animales.

Los espermatozoides de organismos marinos con fecundación externa sufren la RA cuando encuentran la capa externa del óvulo (gelatina o EJ por sus siglas en inglés para "Egg Jelly") (Yanagimachi, 1994). El componente de la gelatina que induce la RA en *S. purpuratus* y *L. pictus* es un polímero de fucosa sulfatada (Factor o FSP) (Vacquier, 1998; Neill y Vacquier, 2004; Darszon *et al.*, 2008).

Durante la RA, la membrana plasmática y la membrana del acrosoma se fusionan en múltiples sitios proporcionando a la membrana del espermatozoide elementos que se necesitan para la penetración de la capa

de gelatina y la subsiguiente fusión con la membrana plasmática del óvulo (Yanagimachi, 1998).

En organismos marinos la RA comprende la exocitosis de la vesícula acrosomal y la polimerización de actina dependiente del  $pH_i$ , permitiendo la extensión del túbulo acrosomal (Darszon *et al.*, 2005).

Como en neuronas y en células endocrinas, la fusión de membranas en el espermatozoide de erizo de mar y de mamífero parece estar gobernada por SNAREs (receptores solubles de proteínas sensibles a N-etilmaleimida) y proteínas G pequeñas como Rabs (Williams *et al.*, 1998; Kierszenbaum, 2000, Branham *et al.*, 2006).

En el espermatozoide de erizo de mar, el túbulo acrosomal está cubierto de bindina, una proteína que interactúa con el FSP que se encuentra en la capa de gelatina que rodea al óvulo homólogo. El FSP se une a su receptor en el espermatozoide (suREJ1, una glicoproteína de membrana de 210 kDa) localizado en la punta de la cabeza sobre el acrosoma y a lo largo del flagelo (Mah *et al.*, 2005) Además, el FSP eleva la  $[AMPc]_i$  y de  $IP_3$ , y estimula las actividades de PKA y fosfolipasa D en el espermatozoide de erizo de mar (Neill y Vacquier, 2004; Darszon *et al.*, 2005).

La fusión de la membrana plasmática y la acrosomal durante la RA produce vesículas híbridas (VHs) que contienen, al menos, tres tipos de canales iónicos: Un canal activado por AMPc, sensible a  $Ba^{2+}$ , que es el que



se encuentra con más frecuencia en registros de BLMs (*Black Lipid Membranes*: Bicapas lipídicas planas) (Schulz *et al.*, 2004). También se han identificado canales iónicos de membranas de flagelo con características similares en las BLMs (Labarca *et al.*, 1996) y mediante la técnica de fijación de voltaje en micro-áreas de membrana ("patch-clamp") en espermatozoide hinchado de erizo de mar (Sanchez *et al.*, 2001). Los otros dos tipos de canales también son catiónicos y con grandes conductancias (Schulz *et al.*, 2004).

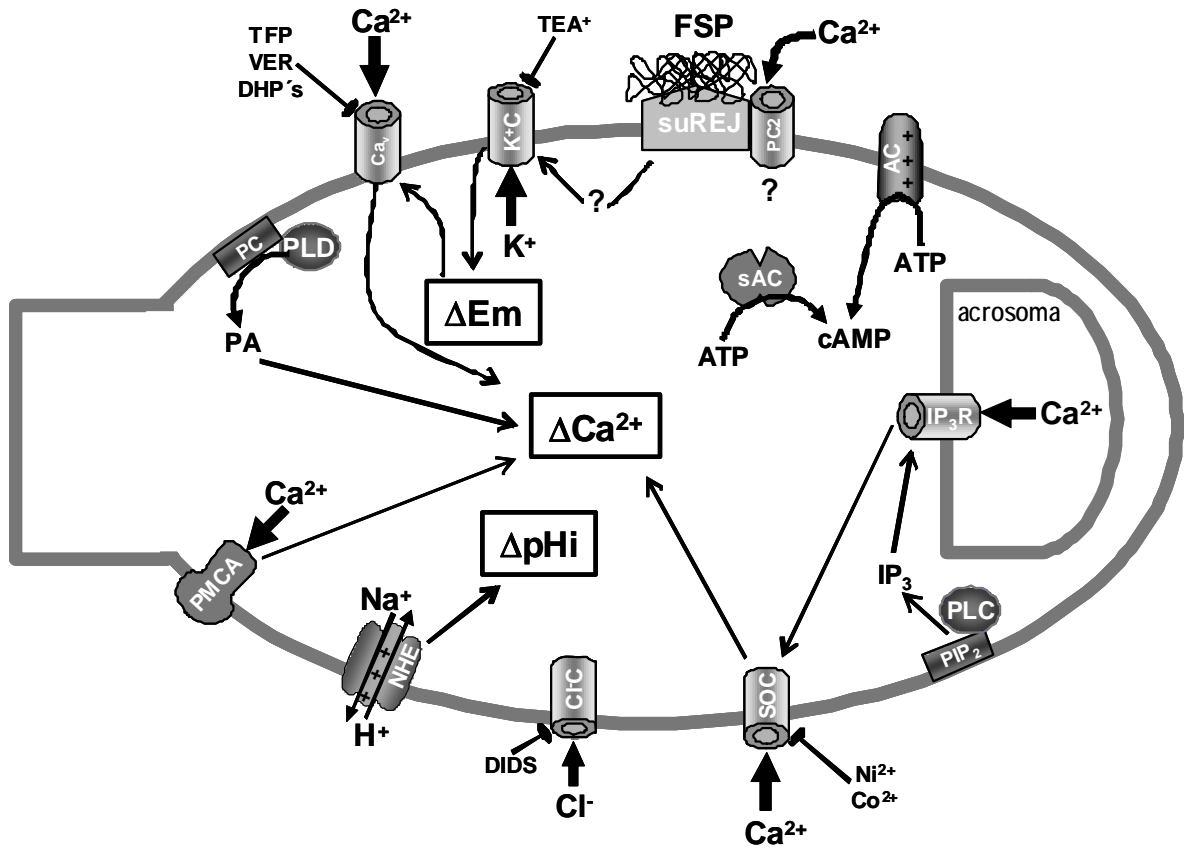


Figura 4. Vías intracelulares de control de la Reacción Acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar. El Factor o FSP se une a su receptor (suREJ) activando de manera transitoria un canal de  $K^+$  sensible a tetraetilamonio (TEA). La salida de  $K^+$  causa una hiperpolarización de la membrana que estimula un intercambiador  $Na^+/H^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  y de voltaje (NHE), una alcalinización del  $pH_i$  y la remoción de la inactivación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje ( $Ca_v$ ) sensibles a nimodipina y a  $Ni^{2+}$ . El incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  puede estimular una fosfolipasa C (PLC) y producir inositol1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ). La liberación de calcio de las pozas de  $Ca^{2+}$  (acrosoma) a través de receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) permite la activación de canales de  $Ca^{2+}$  operados por pozas internas (SOC) en la membrana plasmática, resultando en un aumento sostenido en la  $[Ca^{2+}]_i$  que es fundamental para la reacción acrosomal. La fosfolipasa D (PLD) hidroliza la fosfatidilcolina (PC) liberando el ácido fosfatídico (PA) que participa en la entrada de  $Ca^{2+}$  por un mecanismo desconocido. La inhibición de la ATPasa de  $Ca^{2+}$  (PMCA) aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  que puede inhibir la reacción acrosomal. Un aumento en la  $[cAMP]_i$  puede estar regulando diferentes canales incluyendo un canal de  $Cl^-$  sensible a DIDS ( $Cl^-C$ ) que puede estar participando en mantener en reposo el  $E_m$ . El espermatozoide de erizo de mar posee un homólogo de Policistina-2 (suPC2) que junto con suREJ3 puede tener actividad de canal de  $Ca^{2+}$  (Modificado de Beltrán, *et al.*, 2007b).

Además del suREJ1, en el espermatozoide de erizo de mar se clonaron y secuenciaron suREJ2 (Galindo *et al.*, 2004) y suREJ3 (Mengerink *et al.*, 2002). Las tres proteínas suREJ tienen un módulo REJ (~600 aminoácidos que contiene 6 residuos de cisteína conservados), que posee gran homología con la proteína policistina-1 (PKD1, por sus siglas en inglés para "Polycystin Kidney Disease-1"), cuya mutante, en humano, es responsable de la enfermedad autosómica dominante del riñón poliquistico (ADPKD): y con PCREJ, una proteína específica de testículo- de mamíferos cuya función se desconoce. La ADPKD se origina por mutaciones en los genes de *PKD1* y *PKD2*, que codifican para las proteínas transmembranales PKD1 y PKD2 (Policistina-2), respectivamente (Neill y Vacquier, 2004). En mamíferos PKD1 y PKD2 se asocian con un canal catiónico no selectivo (Xu *et al.*, 2003). La PKD2 (TRPP2), un miembro de la superfamilia de proteínas TRP, tiene secuencias de aminoácidos parecidas a canales  $Ca_v$  y a otros canales catiónicos (Nilius y Voets, 2005). Esta proteína, por sí misma forma canales no selectivos permeables a  $Ca^{2+}$  que podrían estar participando en la unión al ligando (Ikeda y Guggino, 2002).

El receptor suREJ3 incluye una región carboxilo terminal transmembranal homóloga a los canales  $Ca_v$ , y se ha visto que estos canales se asocian con PKD2 (Xu *et al.*, 2003). El espermatozoide de erizo de mar tiene un homólogo de PKD2 (suPKD2) que se asocia con suREJ3. Este se encuentra localizado en una pequeña región de la membrana plasmática del espermatozoide, en una banda delgada sobre la vesícula acrosomal (Mengerink *et al.*, 2002; Neill y Vacquier, 2004). Además, en vesículas de membrana plasmática de espermatozoides de erizo de mar o

de ratón, incorporadas en bicapas planas, se registró un canal de alta conductancia, permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ , cuyas propiedades se parecen a algunas que muestran los canales de PKD1–PKD2 (Beltran *et al.*, 1994; Lievano *et al.*, 1990). En el espermatozoide de erizo de mar, este canal es pobremente selectivo a cationes monovalentes y divalentes ( $PCa/PNa \sim 5$ ) (Lievano *et al.*, 1990). Esta evidencia sugiere que las proteínas REJ y PKD pueden estar participando en los flujos iónicos que se efectúan después de la unión del FSP y que permiten la RA.

La RA requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Dan, 1967) y se inhibe por bloqueadores de canales iónicos (Florman *et al.*, 1998; Publicover y Barrat, 1999). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la RA del espermatozoide de erizo de mar produce cambios en el  $\text{pH}_i$  y en la  $[\text{Na}^+]_i$ . Esto está regulada por al menos dos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes (Rodriguez y Darszon, 2003). El FSP produce un aumento rápido y transitorio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que es sensible a verapamil y dihidropiridinas (DHPs) (bloqueadores de canales  $\text{Ca}_v$  que inhiben la RA). Cinco segundos después, un segundo canal de  $\text{Ca}^{2+}$  insensible a los bloqueadores antes mencionados, que es dependiente del  $\text{pH}_i$  y permeable a  $\text{Mn}^{2+}$  y a  $\text{Na}^+$ , permite la RA del espermatozoide. Por otra parte, como ocurre en la RA de mamíferos (Jungnickel *et al.*, 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Santi *et al.*, 1998), el segundo canal parece ser un canal SOC (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2001). En el espermatozoide de erizo de mar se han detectado receptores de  $\text{IP}_3$ , posiblemente en el acrosoma (Zapata *et al.*, 1997). Se sabe que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde pozas intracelulares, y regulada por  $\text{IP}_3$  activa a los SOCs que están en la membrana plasmática (Nilius y Voets, 2005). Se puede abrir al segundo canal, a través de un

evento no fisiológico, utilizando una forma no hidrolizada del FSP de bajo peso molecular ( $\sim 60$  kDa), la cual aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  pero no induce la RA por sí misma (Hirohashi y Vacquier, 2002b). La sola activación del segundo canal causa exocitosis acrosomal pero no la polimerización de actina (Fig. 4) (Hirohashi y Vacquier, 2003).

La elevación de la  $[K^+]_e$  de 30-50 mM o la adición de  $TEA^+$ , un bloqueador de canales de  $K^+$ , inhibe la RA y aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  y el  $pH_i$  asociado a esta reacción en el espermatozoide de *S. purpuratus* (Darszon *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren la participación de canales de  $K^+$  en la RA. En el espermatozoide de *L. pictus*, la unión al FSP induce un hiperpolarización dependiente de  $K^+$  (Gonzalez-Martinez y Darszon, 1987), lo que activa un intercambio  $Na^+/H^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  estimulado por hiperpolarización lo que aumenta el  $pH_i$  (Gonzalez-Martinez *et al.*, 1992). Esta hiperpolarización puede ser la que remueva la inactivación de los canales  $Ca_v$  (Gonzalez-Martinez y Darszon, 1987; Lievano *et al.*, 1990).

Además de canales de  $Ca^{2+}$ , se han registrado canales de  $K^+$  sensibles a  $TEA^+$  (Gonzalez-Martinez *et al.*, 1992; Labarca *et al.*, 1996) y canales de  $Cl^-$  en vesículas de membrana plasmática de espermatozoides de *S. purpuratus* reconstituidas en BLMs. La RA del espermatozoide de erizo de mar se inhibe por 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2-2'-ácido disulfónico (DIDS), un bloqueador de canales aniónicos y transportadores (Morales *et al.*, 1993). La sensibilidad de algunos de los canales iónicos registrados en BLMs a inhibidores de la RA es consistente con la participación de dichos

canales en este evento fundamental (Fig.4) (Lievano *et al.*, 1990; Beltrán *et al.*, 1994; Darszon *et al.*, 2005).

### ***Los canales de Ca<sup>2+</sup>***

El Ca<sup>2+</sup> es un regulador fundamental en la fisiología del espermatozoide (Baldi *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2003). El aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) puede ocurrir por la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula a través de la membrana plasmática (MP) o mediante su liberación de pozas internas (como el retículo endo/sarcoplásmico en las células somáticas). La entrada de Ca<sup>2+</sup> externo a la célula puede llevarse a cabo a través de varios tipos de canales de Ca<sup>2+</sup> como son los canales Ca<sub>v</sub>, los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por el vaciamiento de pozas internas o por segundos mensajeros (SOCs, TRPs), los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por nucleótidos cíclicos (CNG), los canales de Ca<sup>2+</sup> regulados por ligandos, o mediante la actividad de los intercambiadores de Ca<sup>2+</sup> y las bombas de Ca<sup>2+</sup>. Los espermatozoides de los mamíferos expresan canales Ca<sub>v</sub> y canales tipo TRPC, entre otros (Darszon *et al.*, 2005). Sin embargo, el papel que cada uno de estos canales tiene en la fisiología del espermatozoide aún no es claro, en parte porque es difícil estudiar los canales iónicos presentes en el espermatozoide mediante las técnicas convencionales de registro electrofisiológico como "*patch clamp*", una de las metodologías centrales para el estudio de los canales iónicos en otros tipos celulares.

## Los canales $Ca_v$

Los canales  $Ca_v$ s constituyen una superfamilia de genes que codifican para proteínas transmembranales. Estos canales median el influjo de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y están involucrados en orquestar diversos procesos fisiológicos incluyendo la espermatogénesis y la RA del espermatozoide (Benoff, 1998; Darszon *et al.*, 2006). Por otro lado, también regulan procesos intracelulares como la contracción muscular, secreción, expresión de genes y liberación de neurotransmisores. La función de los canales  $Ca_v$ s es convertir los cambios del potencial de membrana ( $E_m$ ) en una señal de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Los canales  $Ca_v$ s son complejos de proteínas transmembranales y están compuestos de cuatro o cinco subunidades diferentes:  $\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha 2$  y  $\delta$ , que son codificadas por genes diferentes. La subunidad  $\alpha 1$  es la subunidad principal del canal  $Ca_v$  y es responsable de las características funcionales del canal como la selectividad, los sitios de unión a las toxinas y la dependencia de voltaje (Fig. 5).

La subunidad  $\alpha 1$  es la más grande de todas, tiene un peso aproximado de 190-250 kDa y constituye al canal iónico como tal. Esta subunidad forma el poro del canal y contiene el sensor de voltaje. Cada subunidad  $\alpha 1$  se organiza en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos formados por seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 de cada dominio forma parte del sensor de voltaje. El asa extracelular que se localiza entre los segmentos S5 y S6 de cada uno de los

dominios constituye el poro del canal, por lo tanto el filtro de selectividad iónica (Fig. 5).

Hasta la fecha se han descrito 10 genes que codifican para distintas subunidades  $\alpha 1$ . Estos genes dan lugar a dos diferentes subfamilias de  $\text{Ca}_v$ 's que se han identificado en células de mamífero con base a su umbral de activación por voltaje: canales activados por bajo y alto voltaje (LVA y HVA, respectivamente). Se han definido cuatro subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -HVA (llamados L, N, P/Q y R) y un subtipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -LVA (conocido como T).

La clonación molecular mostró que hay siete genes de los canales HVA ( $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$  y  $\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$ ) que codifican para las proteínas de la subunidad  $\alpha 1$ , responsables de la conducción de iones, el sensor de voltaje, y la unión de drogas específicas y toxinas (Catterall, 2000; Ertel *et al.*, 2000).

La subunidad  $\beta$  es una proteína citoplásmica que, en general, no atraviesa la membrana plasmática, aunque en reportes recientes se sugiere que en algunos casos podría anclarse a la membrana interaccionando con otras proteínas membranales (Birnbaumer *et al.*, 1998; Catterall, 2000; Lacinova, 2001; Chen *et al.*, 2004). El peso molecular deducido de ésta subunidad es de  $\sim 58$  kDa. Se han clonado 4 subunidades accesorias  $\beta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -HVA ( $\text{Ca}_v\beta_1$ - $\text{Ca}_v\beta_4$ ). Las subunidades  $\beta$  se unen a las subunidades  $\alpha 1$  en una secuencia específica localizada en el asa intracelular que se encuentra entre los dominios I y II de la subunidad  $\alpha 1$ . Esta secuencia se conoce como el dominio de interacción de  $\alpha$ , al dominio de



interacción correspondiente en la  $\beta$  se le conoce como dominio de interacción  $\beta$  (Leroy *et al.*, 2005).

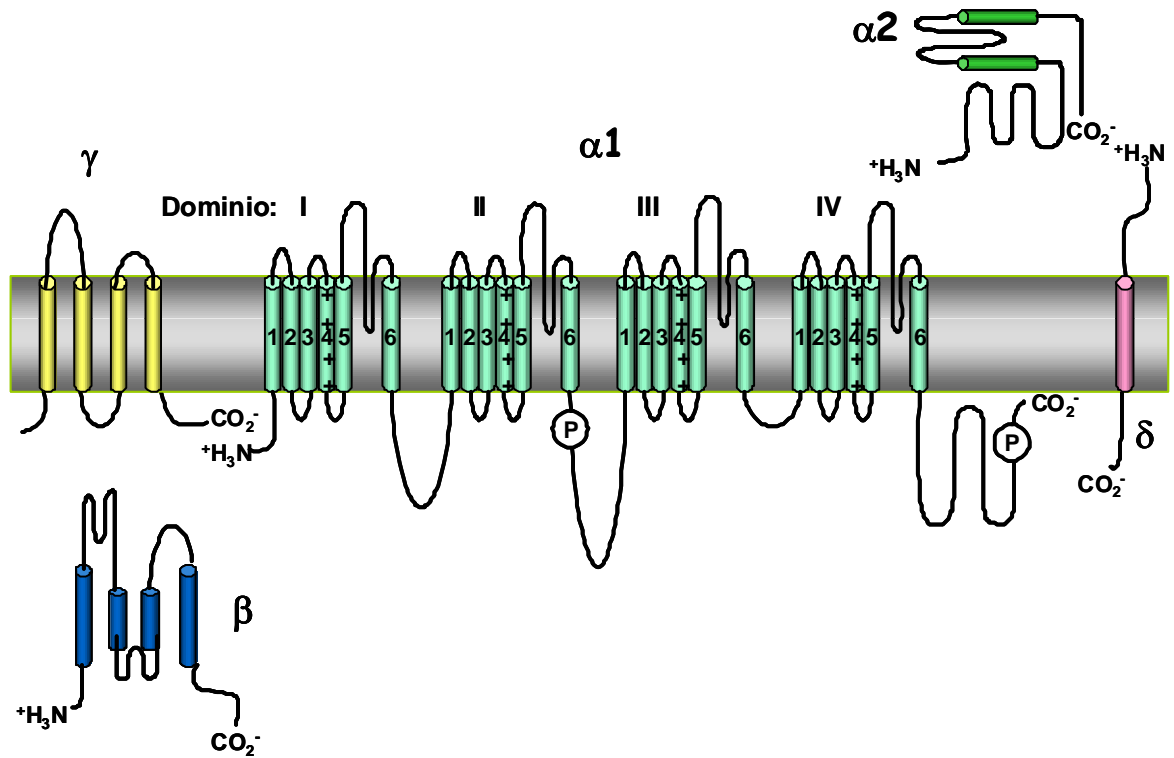


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los canales Ca<sub>v</sub>. P, sitios de fosforilación, las subunidades  $\alpha_1, \alpha_2$  y  $\beta$ . Modificado de Catterall, 2000.

Además, se conocen tres complejos  $\alpha_2\delta$  (Felix, 1999) y cinco subunidades transmembranales  $\gamma$  (Klugbauer *et al.*, 2000). Existen otras subunidades  $\alpha_1$  clonadas (Ca<sub>v</sub>3.1-Ca<sub>v</sub>3.3), éstas pertenecen a la familia de canales LVA. De acuerdo con diferentes estudios, los canales LVA podrían estar integrados por una subunidad  $\alpha_1$  y, al menos, una subunidad  $\gamma$  (Klugbauer *et al.*, 2000) sin la participación de las subunidades  $\beta$  clásicas (Perez-Reyes *et al.*, 1998; Leuranguer *et al.*, 1998; Lacinova *et al.*, 2000).

Aunque las subunidades  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -HVA modifican significativamente la activación y/o inactivación de la corriente, estas subunidades fallan sistemáticamente en modular los canales LVA clonados o solo tienen efectos menores (Lacinova *et al.*, 2000).

Los canales  $\text{Ca}_v1$  (Tipo L) se inhiben por fenilalquilaminas (verapamil), dihidropiridinas (DHPs) y benzodiazepinas (diltiazem). Las fenilalquilaminas bloquean al poro por el lado intracelular. Las DHPs pueden ser activadores o inhibidores, actúan alostéricamente cambiando al canal del estado abierto al estado cerrado, en lugar de ocluir al poro.

Los canales  $\text{Ca}_v2$  son relativamente insensibles a DHPs pero se bloquean específicamente por toxinas peptídicas (Miljanich y Ramachandran, 1995; Catterall *et al.*, 2003). Los canales  $\text{Ca}_v2.1$  (tipo P/Q) se bloquean específicamente con  $\omega$ -Agatoxina IVA, un péptido presente en el veneno de la araña australiana *Atrax robustus* (con  $\text{IC}_{50}$ s de  $\sim 2$  y  $\sim 200$  nM para canales P y Q, respectivamente). Los canales  $\text{Ca}_v2.2$  (tipo N) se bloquean por  $\omega$ -conotoxina GVIA (proveniente del veneno del caracol marino *Conus geographus*) y toxinas relacionadas, en tanto que los canales  $\text{Ca}_v2.3$  (tipo R) se bloquean por SNX-482 (péptido derivado del veneno de la tarántula *Hysterocrates gigas*) (Bourinet *et al.*, 2001; Catterall *et al.*, 2003).

Finalmente, los canales de la familia  $\text{Ca}_v3$  (Tipo T) se inhiben por mibefradil ( $\text{IC}_{50} \sim 5 \mu\text{M}$ ) (Todorovic y Lingle, 1998). Sin embargo, a

concentraciones más elevadas, el mibefradil puede actuar como un antagonista de las corrientes tipo HVA (Martín *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Existen asimismo algunos agentes de uso clínico que bloquean de manera más a menos selectiva a los canales tipo T entre los que destacan la etosuximida, la pimozida, la amilorida, y la nifedipina (Arnoult *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 2005).

Aunque en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de invertebrados la subunidad  $\alpha 1$  tiene secuencias similares en estructura que los de vertebrados, existen diferencias farmacológicas. Por ejemplo, Jeziorski y colaboradores (Jeziorski *et al.*, 1998) clonaron y expresaron la subunidad  $\alpha 1$  de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la medusa de mar *Cyanea capillata* que es estructuralmente similar a un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Este canal es poco sensible a DHPs. Otras subunidades de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de invertebrados difieren fisiológica y farmacológicamente de sus contrapartes en vertebrados, como la subunidad  $\beta$  (Jeziorski *et al.*, 2000).

Los canales  $\text{Ca}_v$ s de invertebrados han sido blanco de extensivas investigaciones, y para extrapolar las propiedades básicas de estos canales se han hecho estudios en el sistema nervioso del calamar, en neuronas de caracol y en ovocitos de invertebrados marinos. Una clasificación similar de los canales  $\text{Ca}_v$  de mamífero se ha aplicado a los canales  $\text{Ca}_v$  de invertebrados basándose en su farmacología a antagonistas orgánicos e inorgánicos, así como a la cinética del canal (Okamura *et al.*, 2003).

La clonación de las subunidades de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de varias especies de invertebrados, combinada con la información del genoma de *Caenorhabditis elegans*, ha clarificado la organización y evolución de los genes de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de los *metazoa*. El papel crucial de los canales HVA en la fisiología del espermatozoide, su identificación molecular y localización en invertebrados se desconoce.

### **Canales SOCs**

En 1986, Putney propuso una hipótesis para la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ , en la cual el vaciamiento de las pozas de  $\text{Ca}^{2+}$  activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se localizan en la membrana plasmática ayudando a rellenar dichas pozas (Putney, 1986). A esto se le conoce como entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por pozas intracelulares (SOCE) (Putney y Bird, 1993). Esta entrada se estimula en respuesta a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las pozas y es mediada por la activación de canales específicos que se encuentran en la membrana plasmática, llamados canales de calcio operados por pozas internas (SOC's) (Ambudkar, 2007). La primera corriente identificada operada por pozas internas fue la corriente I crac, que es mediada por un canal que es altamente selectivo para  $\text{Ca}^{2+}$  (Salido *et al.*, 2009).

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por receptor (ROCE) y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por pozas (SOCE), son funciones que realizan todas las células de eucariontes superiores y su deterioro amenaza su vida (Liao, *et al.*, 2008; Birnbaumer, 2009). Muchas células son capaces de liberar  $\text{Ca}^{2+}$

secuestrado por pozas como el retículo endoplásmico. Las membranas de estas pozas contienen la bomba SERCA (ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico) y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  operado por  $\text{IP}_3$  (Receptor de  $\text{IP}_3$ ) que regulan la entrada y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Esta liberación activa los canales SOCs que se encuentran en la membrana plasmática (Pani y Singh, 2009). Los receptores, en la superficie celular, activados por la fosfolipasa C (PLC) evocan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares. Un aumento transitorio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resulta de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico (RE) (Lewis, 2007). Los inhibidores de SERCA como la tapsigargina o el ácido ciclopiazónico, bloquean el cargado, permitiendo que la poza de  $\text{Ca}^{2+}$  se vacíe por una vía de "fuga" no caracterizada, sin la estimulación de la PLC.

Aún se desconoce cómo se regula la actividad de los SOCs en la membrana plasmática por la reducción en la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  en una poza intracelular. Se han formulado tres hipótesis principales sobre dicha apertura: 1) Un acoplamiento conformacional, 2) un mensajero intracelular móvil y 3) un modelo de exocitosis (Berridge, 2004; Parekh y Putney, 2005; Ambudkar, 2007). Se han identificado algunos posibles componentes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por pozas. Los cuales son los miembros de la familia de los canales catiónicos TRPC (receptor de potencial transitorio canónicos), las proteínas Orai (proteína de 301 aminoácidos que regula el vaciamiento de las pozas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y STIM (sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ ), pueden estar participando en esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ambudkar, 2007; Liao, *et al.*, 2007; 2008; Pani y Singh, 2009; Birnbaumer, 2009; Salido *et al.*, 2009).

## Canales TRP

Se ha propuesto que los genes del fotorreceptor de *Drosophila*, receptor de potencial transitorio (*trp*) pueden codificar para SOCs. Ya se han identificado siete homólogos de *trp* en mamíferos. La expresión de estas proteínas, en algunos casos, sugiere que los *trp* codifican para SOCs (Putney y McKay, 1999; Boulay *et al.*, 1999; Albert, *et al.*, 2007).

Los canales TRP forman una superfamilia diversa de canales catiónicos que responden a una variedad de señales (Ramsey *et al.*, 2006; Ventkatchalam y Montell, 2007; Gaudet, 2008). Por ejemplo, algunos están implicados en la percepción sensorial y se activan directamente por ligandos químicos o estímulos físicos sensoriales como la temperatura, estrés osmótico y mecánico. Otros se activan por estimulación de un receptor a través de la fosfolipasa C (PLC) (Hewavitharana *et al.*, 2007; Gaudet, 2008). Una característica interesante de algunos canales TRP, es que se pueden activar como resultado de la integración de algunas señales de naturaleza diferente (física o química) y de fuentes diferentes (intra o extracelular) (Hewavitharana *et al.*, 2007; Gaudet, 2008).

En mamíferos, la familia de canales TRP contiene cerca de 30 miembros, distribuidos en seis subfamilias, de acuerdo a su secuencia y función: TRPA (anquirina), TRPC (canónicos), TRPM (melastatina), TRPML (mucopolina), TRPP (policistina) y TRPV (vaniloide). Aunque existe otra familia que no se encuentra en mamíferos (TRPN), sólo en gusanos y peces

(Montell, 2005; Gaudet, 2008). Los canales TRP se regulan por diferentes mecanismos, pero un tema en común en las subfamilias de TRPC/V/M, es su regulación por mensajeros lipídicos. Existe evidencia genética que apoya la idea del papel activador del diacilglicerol (DAG), para los algunos TRPCs (Gaudet, 2008). Los canales TRP tienen seis segmentos transmembranales homólogos al dominio transmembranal del canal de potasio Shaker (Long *et al.*, 2005, 2007). Estos segmentos se ensamblan en homo o en heterotetrámeros para formar un canal selectivo a cationes (Pedersen *et al.*, 2005; Hardie, 2007).

### ***La subfamilia TRPC***

En vertebrados se han descrito un total de siete proteínas TRPC. En contraste con lo que sucede en ratón y rata, en humanos sólo se expresan seis TRPCs, porque TRPC2 es un pseudogen. Esta subfamilia difiere de otras subfamilias de TRP ya que desempeña dos tipos de funciones diferentes: despolarización de la membrana y aumento sostenido de  $Ca^{2+}$  intracelular (Birnbaumer, 2009).

Esta subfamilia se divide en cuatro subgrupos, basado en sus características funcionales y en el alineamiento de sus secuencias: TRPC3/6/7, TRPC4/5, TRPC1 y TRPC2 (Hardie, 2007; Birnbaumer, 2009). Algunas proteínas TRPC pueden activarse por el vaciamiento de  $Ca^{2+}$  de las pozas intracelulares. Los TRPC2, 3, 6 y 7 se activan por diacilglicerol (DAG). Sin embargo TRPC3 también puede regularse por el vaciamiento de pozas internas (Hardie, 2007).

Como en el caso de las tres proteínas TRPC de *Drosophila*, los TRPC de mamífero incluyen tres o cuatro dominios de anquirina (son 33 aminoácidos que regulan la interacción proteína-proteína (Minke y Cook, 2002)), seis probables dominios transmembranales y una identidad  $\geq 30\%$  en la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal. La región C-terminal en los TRPC de mamíferos es variable. El dominio PDZ, consta de 80-90 aminoácidos y median en el ensamblaje de diferentes componentes (Fig. 6). Los productos de los genes *trpc*, entre los que se encuentran los canales tipo SOC, podrían estar participando en la movilidad del espermatozoide. En nuestro grupo se identificaron los canales TRPC1, TRPC3 y TRPC6 en el espermatozoide de ratón mediante la técnica de inmunolocalización (Treviño *et al.*, 2001). En otros estudios realizados en el laboratorio empleando espermatozoides de humano se encontraron los mensajeros para *trpc1*, *trpc3*, *trpc6* y *trpc7* y mediante estudios de inmunolocalización se identificaron TRPC1, TRPC3 y TRPC4 y TRPC6 los cuales se localizan mayoritariamente en el flagelo (Castellano *et al.*, 2003).



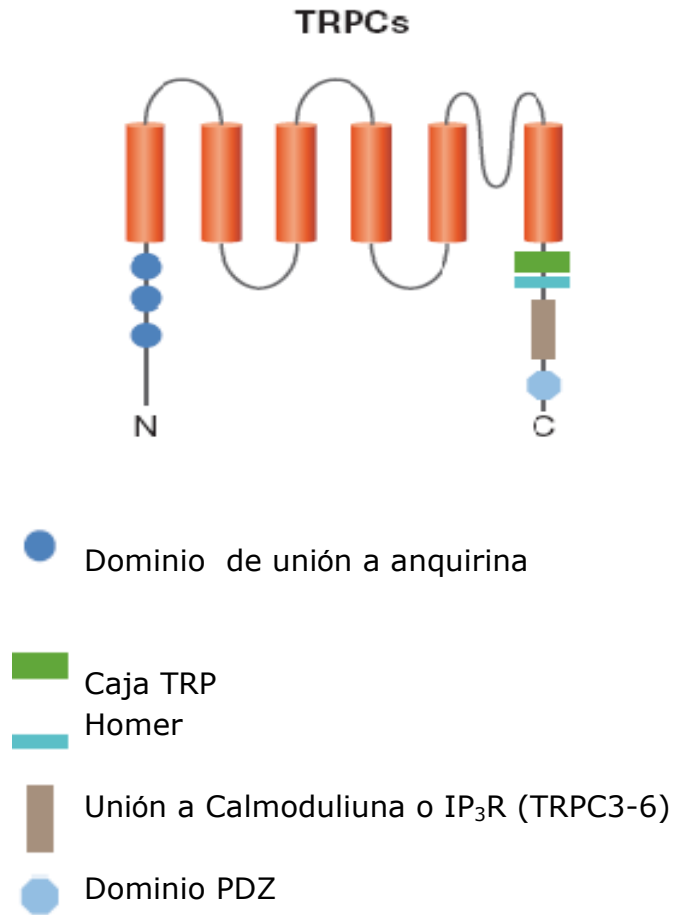


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los canales tipo TRP (Modificado de Giamarchi *et al.*, 2006).

Con base en lo anterior, decidimos identificar y caracterizar los canales de Ca<sub>v</sub> y TRPC para elucidar su participación en la RA o en la movilidad del espermatozoide de erizo de mar.

## **HIPÓTESIS**

Dado que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son importantes en diversos procesos fisiológicos de las células y dada su distribución en el espermatozoide entonces podrían estar participando en la Reacción Acrosomal y/o en la movilidad del espermatozoide de erizo de mar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Conocer la identidad molecular de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de erizo de mar.
2. Estudiar la localización subcelular de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan en la movilidad y/o Reacción Acrosomal en el espermatozoide de erizo de mar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Gametos y Reactivos*

Los espermatozoides de *S. purpuratus* y *L. pictus* (Marinus, Inc. Long Beach, CA, USA y Pamanes Inc. Ensenada, Baja California, México) se obtienen "secos" por inyección intracelómica de KCl 0.5M y se almacenan no más de 24 hrs a 4°C hasta su uso (Fig. 7).

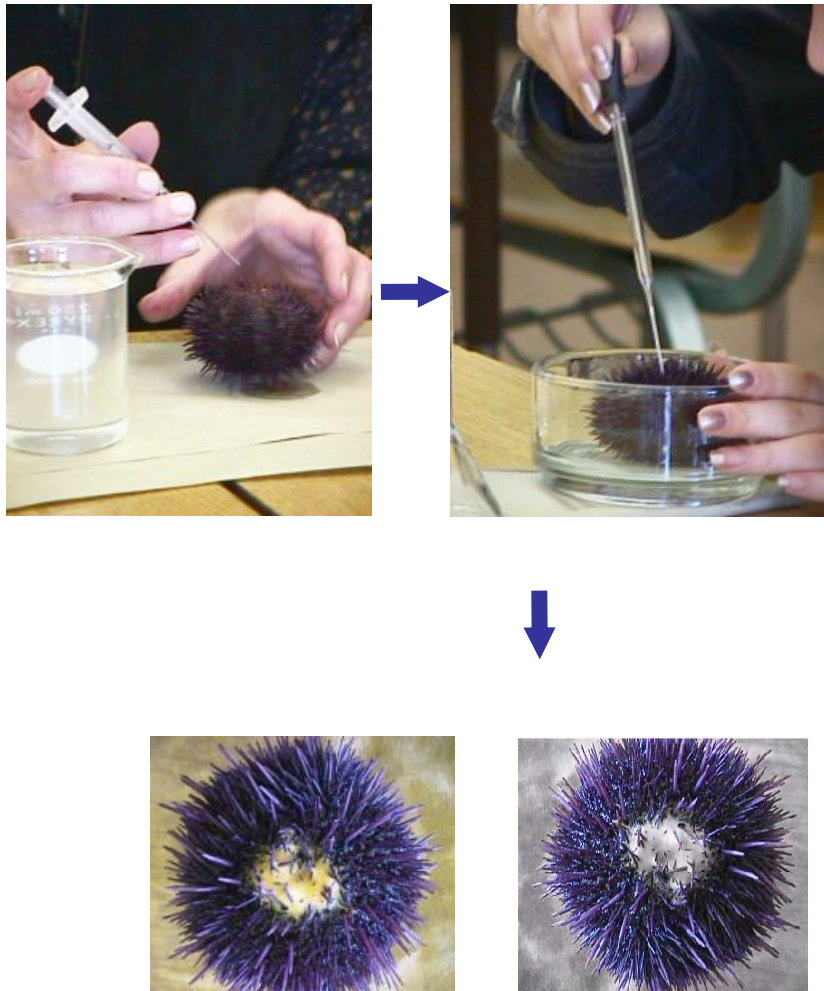


Figura 7. Obtención de gametos del erizo de mar.

El agua de mar artificial (AMA) contiene (en mM): NaCl 465, KCl 10, CaCl<sub>2</sub> 10, MgCl<sub>2</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 30, NaHCO<sub>3</sub> 2.5, Hepes 10, EDTA 0.1 (pH 8.0, 950-1000 mOsm). Agua de mar con bajo Ca<sup>2+</sup> (1CaAMA) es AMA a pH 7.0 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 1 mM. La nimodipina fue de Tocris Cookson Inc. La nifedipina fue de Sigma–Aldrich. Los anticuerpos anti-Cav2.1, 2.2, 2.3, 2.4; anti-Cav1.2, 1.3; anti-Cav3.1, 3.3 y anti-Pan (anticuerpo general para la subunidad  $\alpha$ 1 de los canales Cav<sub>s</sub>) fueron de Alomone Labs (Jerusalem Israel). Los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 o Alexa 594, así como el Fluo4-AM fueron de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El resto de los reactivos que se utilizaron fueron del más alto grado de pureza.

### ***Aislamiento de ARN y experimentos de RT-PCR***

El ARN de testículo del erizo de mar de *S. purpuratus* se aisló utilizando TRIzol Reagent (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del manual. El ADNc se sintetizó de las muestras totales de ARN con hexámeros al azar por transcripción reversa (Superscript II RNase H-Reverse transcriptasa, Invitrogen). El ADNc se amplificó por PCR utilizando la Taq ADN Polimerasa Titanium (Clontech). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de PCR de los Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>2.3 (A1C sentido: 5´-ATG CTG ACC GTG TTC CA-3´, A1C antisentido: 5´-ATC CTC CTC TAT CTG TTG CTT-3´; A1Eb sentido: 5´-GCC CAG CAG ACA CCT AAC-30, A1Eb antisentido: 50-AAC ACG CAG TCA AAC ACG-3´) se hicieron utilizando como molde secuencias de la base de datos del genoma del erizo de mar (<http://sugp.caltech.edu/SUGP/>) que se alinearon con las secuencias de los

canales Cav1.2 y2.3 de rata. La ausencia de contaminación genómica de las muestras en el ARN se confirmó con controles sin la transcriptasa reversa (no RT) para cada experimento. Los productos amplificados se analizaron por secuenciación del ADN para confirmar su identidad.

### ***Análisis de secuencias***

Los productos de PCR secuenciados se compararon (tBLASTn) con una base de datos no redundante del NCBI (NR; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para confirmar su identidad. Las secuencias de ADNc de las clonas se tradujeron en las secuencias peptídicas correspondientes, las cuales se analizaron con algunas herramientas bioinformáticas: CLUSTALW en el programa BioEdit; se utilizaron para los alineamientos las regiones transmembranales y los dominios se predijeron con los programas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

### ***Análisis Filogenético***

Se utilizaron secuencias completas de canales de Ca<sup>2+</sup> de varios organismos para generar un árbol filogenético de los canales Ca<sub>v</sub> con el método de "neighbor-joining". Utilizamos el Ca<sub>v</sub>3.2 de humano como grupo externo. El árbol se generó utilizando el programa MEGA3 [25] con 3,000 replicaciones y la corrección de Poisson. Los números de acceso en el GenBank son: Q13698, Ca<sub>v</sub>1.1 humano; O57483, Ca<sub>v</sub>1.1 rana; P22316,

Ca<sub>v</sub>1.1 carpa; NP\_000710, Ca<sub>v</sub>1.2 humano; Q01815, Ca<sub>v</sub>1.2 ratón; NP\_571975, Ca<sub>v</sub>1.2 pez cebra; NP\_000711, Ca<sub>v</sub>1.3 humano; AAS20586, Ca<sub>v</sub>1 pez cebra; P27732, Ca<sub>v</sub>1.3 rata; NP\_005174, Ca<sub>v</sub>1.4 humano; NP\_062528, Ca<sub>v</sub>1.4 ratón; NP\_000059, Ca<sub>v</sub>2.1 humano; NP\_037050, Ca<sub>v</sub>2.1 rata; CAI11858, Ca<sub>v</sub>2.1 pez cebra; NP\_000709, Ca<sub>v</sub>2.2 humano; NP\_671482, Ca<sub>v</sub>2.2 rata; P56698, Ca<sub>v</sub>2.2 raya eléctrica; NP\_000712, Ca<sub>v</sub>2.3 humano; Q07652, Ca<sub>v</sub>2.3 rata; P56699, Ca<sub>v</sub>2.3 raya eléctrica; AAD11470, coral; AAC63050, medusa; BAA13136 calamar y BAA34927, de ascidia. Los números de acceso del cDNA de los fragmentos de los canales Ca<sub>v</sub> son: DQ185022 para suCa<sub>v</sub>L y DQ188083 para suCa<sub>v</sub>NL. Las secuencias predichas de los canales Ca<sub>v</sub> del erizo de mar son: XP\_780220 para suCa<sub>v</sub>NL y XP\_783410 para suCa<sub>v</sub>L.

### ***Northern blot***

El ARN de testículo del erizo de mar de *S. purpuratus* se aisló utilizando TRIzol Reagent (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del manual. El ARN se separó en un gel desnaturalizante (MOPS 10X, formaldehído, agarosa y agua DEPC), se llevó a cabo la electroforesis en amortiguador MOPS 1x, a 85 V por 4 horas.

Una vez terminada la electroforesis, los fragmentos se traspasaron a una membrana de nylon, en amortiguador SSC 10x (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3 M), por 24 horas. La membrana de nylon se expuso a radiación UV, lo que permite la unión permanente y covalente del ARN a la membrana.

Como sonda se utilizaron los fragmentos obtenidos por RT-PCR para suCavL1 y suCavNL1, marcados con [<sup>32</sup>P]dCTP y utilizamos DNA de salmón para bloquear sitios inespecíficos. La membrana se puso a hibridar a 65°C toda la noche y posteriormente se lavó tres veces con SSC 2X y 0.1% SDS por 15 minutos a 65°C. La señal se observó exponiendo a una placa radiográfica (X-OMAT-K, Kodak).

### ***Inmunolocalización***

Los espermatozoides se diluyeron en AMA (1:900). La suspensión de espermatozoides (100 µl) se colocó en un portaobjetos con bioadhesivo (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, USA) y se dejó sedimentar por 60 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo las células pegadas se fijaron por 10 min con paraformaldehído al 4% en AMA pH 8.0, se lavaron con PBS (3x 5 min), se permeabilizaron con 0.1% Tritón X-100 en PBS por 10 min, y se bloquearon con 2% BSA (en PBS) por 1-2 h. Las muestras se incubaron a 4°C toda la noche, con el anticuerpo primario (Alomone Labs, Israel) diluido 1:50 en 2% BSA-PBS. Al final los espermatozoides se lavaron con PBS (3x 5 min), y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-conejo IgG) acoplado a Alexa Fluor 594 o 488, y se lavaron con PBS (3x 5 min). Los experimentos control se realizaron preincubando el anticuerpo primario con el péptido antigénico correspondiente (1:5). Las muestras marcadas fluorescentemente se observaron en un microscopio confocal (BioRad 600, Zeiss LSM 510 Meta). Para poder comparar, las imágenes del anticuerpo y

sus controles, los registros se hicieron utilizando los mismos parámetros del láser y sensibilidad del fotomultiplicador.

### ***Western blot***

Los espermatozoides se colectaron como se menciona arriba. El aislamiento de la membrana, se realizó a 4°C. Los flagelos se recuperan por centrifugación a 35,000 xg 40 min. El precipitado que contenía los flagelos se resuspendió por homogenización en 10 ml de la solución hipotónica Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, DTT 0.1 mM e inhibidores de proteasas para romper los flagelos. Se colocaron 5 ml de éste homogenado sobre 10 ml de un colchón de sacarosa (Tris-HCl 10 mM, Sacarosa 40%, CaCl<sub>2</sub> 1mM, DTT 0.1 mM pH 8.0), en un tubo Corex 15 ml y se centrifugaron a 200,000 xg durante 75 min en un rotor de columpio. Al final de la centrifugación se obtuvo un gradiente con una banda en la interfase con la solución de sacarosa (membranas). Estas membranas se lavaron por centrifugación a 200,000 xg por 30 min. Las membranas presentes en el precipitado se resuspendieron en el mínimo volumen de solución hipotónica y se guardaron en alícuotas a -70°C hasta su uso (García-Soto *et al.*, 1988).

Las membranas se solubilizaron en amortiguador de carga (10% de SDS, 50% de glicerol, 8 mM de EDTA, 0.5 M de Trisma Base pH 6.8) a 70°C durante 30 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a una



membrana de nitrocelulosa por 20 min, posteriormente la membrana se bloqueo con PBS-leche 2% al 5% por 60 min. Los anticuerpos Anti-Cav1.2, anti-Cav2.3 y anti-Pan (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) se diluyeron 1:200 PBS-leche 2%. Para los experimentos control se incubó el anticuerpo primario con un exceso de 5 veces de su respectivo péptido antigénico. La señal se observó mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham) exponiendo a una placa radiográfica (X-OMAT-K, Kodak).

## RESULTADOS

***La expresión de los suCa<sub>v</sub>s se detectó en el testículo de *S. purpuratus*.***

Existe evidencia funcional y farmacológica de que los canales de Ca<sub>v</sub> participan en la RA y/o movilidad del espermatozoide de erizo de mar (Gonzalez-Martinez *et al.*, 1992; Strunker *et al.*, 2006; Kaupp *et al.*, 2007; Darszon *et al.*, 2008). Después de encontrar las secuencias parciales de los canales suCavs en el genoma de *S. purpuratus*, decidimos buscar la expresión de estos canales en el testículo de *S. purpuratus*.

Amplificamos los transcritos de los canales suCa<sub>v</sub>L1 y suCa<sub>v</sub>NL1 por RT-PCR utilizando ADNc generado a partir del ARN de testículo de *S. purpuratus* (Fig. 8). El fragmento amplificado para el canal suCa<sub>v</sub>L1 es del tamaño esperado (246 bp) y codifica para 73 aminoácidos que presentan 77% de identidad con los aminoácidos 388-459 del canal Ca<sub>v</sub>1.2 de rata (Fig. 8). El fragmento para el canal suCa<sub>v</sub>NL1 tiene alrededor de 651 pb y es de un tamaño menor al esperado (1100 pb). Sin embargo, la traducción de esta secuencia presenta una identidad alta con el canal Ca<sub>v</sub>2.3 de rata (44% de identidad y 59% de similitud) en dos segmentos que flanquean la región amplificada (Fig. 8). Esto puede ser el resultado de un producto alternativo del canal suCa<sub>v</sub>NL1.

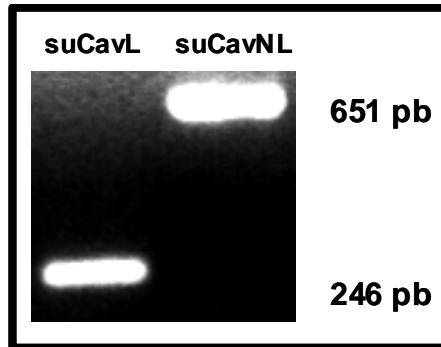


Figura 8. RT-PCR utilizando ADNc de *S. purpuratus*. El fragmento amplificado para suCavL es de 243 pb y el fragmento de suCavNL es de 651 pb.

Con los resultados anteriores decidimos realizar un alineamiento de estas dos secuencias de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales  $\text{Ca}_v$  del erizo de mar con la secuencia de mamífero más cercana, para analizar la similitud entre ambas especies.

De hecho, ambas secuencias del erizo presentan la estructura predicha consistente con otras subunidades  $\alpha_1$  de canales  $\text{Ca}_v$ . Las regiones TM encontradas en las secuencias parciales de su $\text{Ca}_v\text{L1}$  y de su $\text{Ca}_v\text{NL1}$  se muestran en la Fig. 9. El lazo entre las regiones TM 5 y 6 de cada dominio de la subunidad  $\alpha_1$ , da lugar a la formación del poro al formarse el tetrámero. Así mismo, el motivo EEEE está conservado en todas las subunidades  $\alpha_1$  de los  $\text{Ca}_v$  HVA, y forma el poro de selectividad para este tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El fragmento su $\text{Ca}_v\text{L1}$  muestra 2 de estos residuos de E (Fig. 9).



## ***Dos Ca<sub>v</sub>s en la base de datos del Genoma del Erizo de mar***

Los canales Ca<sub>v</sub>s son proteínas transmembranales involucradas en orquestar diversos procesos fisiológicos en el espermatozoide de erizo de mar (Darszon *et al.*, 2008). Debido a lo anterior decidimos buscar este tipo de canales en el espermatozoide de *S. purpuratus*.

Identificamos dos secuencias parciales (suCa<sub>v</sub>L1 y suCa<sub>v</sub>NL1) con alta homología a la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de Ca<sup>2+</sup> HVA (Ca<sub>v</sub>) en la base de datos del genoma de *Strongylocentrotus purpuratus* (NCBI BLAST/TBLASTN-Baylor University). suCa<sub>v</sub>L1 y suCa<sub>v</sub>NL1 tienen una secuencia parcial de 873 y 933 aminoácidos respectivamente.

Alineamos estas dos secuencias con otras 23 secuencias de subunidades  $\alpha_1$  de los canales Ca<sub>v</sub> de una variedad de especies, desde *C. elegans* hasta humano; con esta información construimos un filograma (Fig. 10). Este análisis filogenético confirma que estas dos secuencias son similares a la subunidad  $\alpha_1$  de los canales Ca<sub>v</sub> de otros organismos. La secuencia de suCa<sub>v</sub>L1 es similar a la clase 1 (tipo L), mostrando alta similitud con el canal Ca<sub>v</sub>1.2 (92%) de la secuencia de rata. La secuencia de suCa<sub>v</sub>NL1 es similar a la clase 2 (tipo no-L) con alta homología con el canal Ca<sub>v</sub>2.3 (93%) de mamífero (Fig. 10).



Realizamos experimentos tipo Northern blot con ARN total de testículo de *S. purpuratus* para ambos suCa<sub>v</sub>s. Con la sonda para suCa<sub>v</sub>L1 obtuvimos dos bandas de aproximadamente 7.0 y 3.2 Kb. La banda de 7.0 Kb es consistente con el tamaño del ARN de varios Ca<sub>v</sub>s tipo L. Para suCa<sub>v</sub>NL1, encontramos tres bandas de 6.0, 3.2 y 1.5 Kb, el tamaño de la banda de 6.0 Kb es similar al reportado para los Ca<sub>v</sub>s del tipo no L. Las otras bandas en ambos casos pueden ser productos de degradación (Fig. 11).

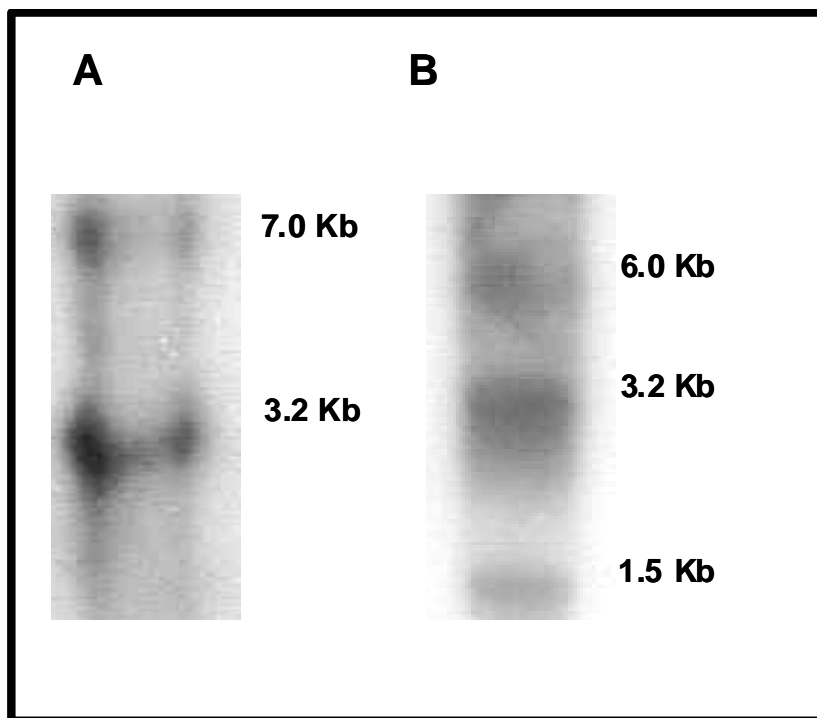


Figura 11. Los Ca<sub>v</sub>s suCa<sub>v</sub>L1 y suCa<sub>v</sub>NL1 se expresan en los testículos de *S. purpuratus*. Experimentos tipo Northern blot con RNA total de testículo de *S. purpuratus* para ambos suCa<sub>v</sub>s. (A) Sonda para suCa<sub>v</sub>L1 y (B) Sonda para suCa<sub>v</sub>NL1.

### ***Inmunolocalización de las proteínas de los canales of suCa<sub>v</sub>L1 and suCa<sub>v</sub>NL1 en el espermatozoide de S. purpuratus***

El erizo de mar es un invertebrado marino que se encuentra en la base del linaje del grupo de deuterostomados, el cual comprende equinodermos y cordados. Por lo tanto, evolutivamente el erizo de mar precede al grupo de los vertebrados (Neill, y Vacquier, 2004). Dado que no hay anticuerpos comerciales contra las proteínas del espermatozoide de erizo de mar, en este trabajo utilizamos anticuerpos generados contra secuencias de canales de rata. Realizamos una búsqueda en la base de datos del genoma del erizo de *S. purpuratus* de las secuencias de los péptidos utilizados para generar los anticuerpos que utilizamos en este trabajo, sin embargo, no encontramos dichas secuencias.

Debido a la alta homología de suCa<sub>v</sub>L con el canal Ca<sub>v</sub>1.2 tipo-L de rata y de suCa<sub>v</sub>NL con el canal Ca<sub>v</sub>2.3 tipo no -L también de rata, y con la idea de identificar la localización de los Ca<sub>v</sub> en el espermatozoide de erizo de mar, decidimos probar los anticuerpos disponibles de rata contra diferentes canales Ca<sub>v</sub>, en ensayos de inmunolocalización y Western blot en nuestro sistema. El conjunto de anticuerpos incluye un anticuerpo general que detecta un dominio presente en todos los canales Ca<sub>v</sub> HVA (anti-Pan).

Los resultados de inmunofluorescencia muestran que los anticuerpos anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti-Ca<sub>v</sub>2.3 y anti-Pan, tiñen de manera diferencial el



espermatozoide de erizo de mar (Fig. 12). El anti-Pan (Fig. 12A) tiñe la base de la cabeza donde se localiza la mitocondria, el acrosoma (punto fluorescente en la punta de la cabeza) y con un patrón de fluorescencia débil y punteado, el flagelo.

La tinción con anti-Ca<sub>v</sub>1.2 (Fig. 12B) se observa más intensa y distribuida uniformemente en el flagelo e imperceptible en la unión de la cabeza y el flagelo. En contraste, con el anti-Ca<sub>v</sub>2.3 (Fig. 12C) la señal se observa muy fuerte en el área de la mitocondria y presenta un punto intenso de fluorescencia en el área del acrosoma. En el flagelo la tinción con este anticuerpo se ve dispersa. La tinción diferencial del espermatozoide de erizo de mar utilizando los diferentes anticuerpos contra la subunidad  $\alpha_1$  de los canales Ca<sub>v</sub>, sugiere que estos canales pueden estar implicados en diferentes funciones tales como la movilidad y la RA. Con base en los resultados, es probable que el canal Ca<sub>v</sub> 1.2 participe en la movilidad y que el canal Ca<sub>v</sub> 2.3 esté participando en la RA del espermatozoide de erizo de mar.

Probamos la especificidad de los anticuerpos en el espermatozoide de erizo de mar mediante diferentes controles: Para los experimentos de inmunolocalización pre-incubamos los anticuerpos (anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti- Ca<sub>v</sub>2.3 y anti-Pan) con su péptido antigénico correspondiente antes de exponerlos a los espermatozoides. Bajo estas condiciones, ninguno de los tres anticuerpos muestra señal, indicando su especificidad (Fig. 13). Además, el hecho de que los péptidos antigénicos de anti-Ca<sub>v</sub>2.1, -Ca<sub>v</sub>2.3, -Ca<sub>v</sub>3.1 y -TRPC6 no bloquean la señal de anti-Ca<sub>v</sub>1.2 o de anti-Ca<sub>v</sub>2.3, confirman la especificidad de los anticuerpos (no se muestra).

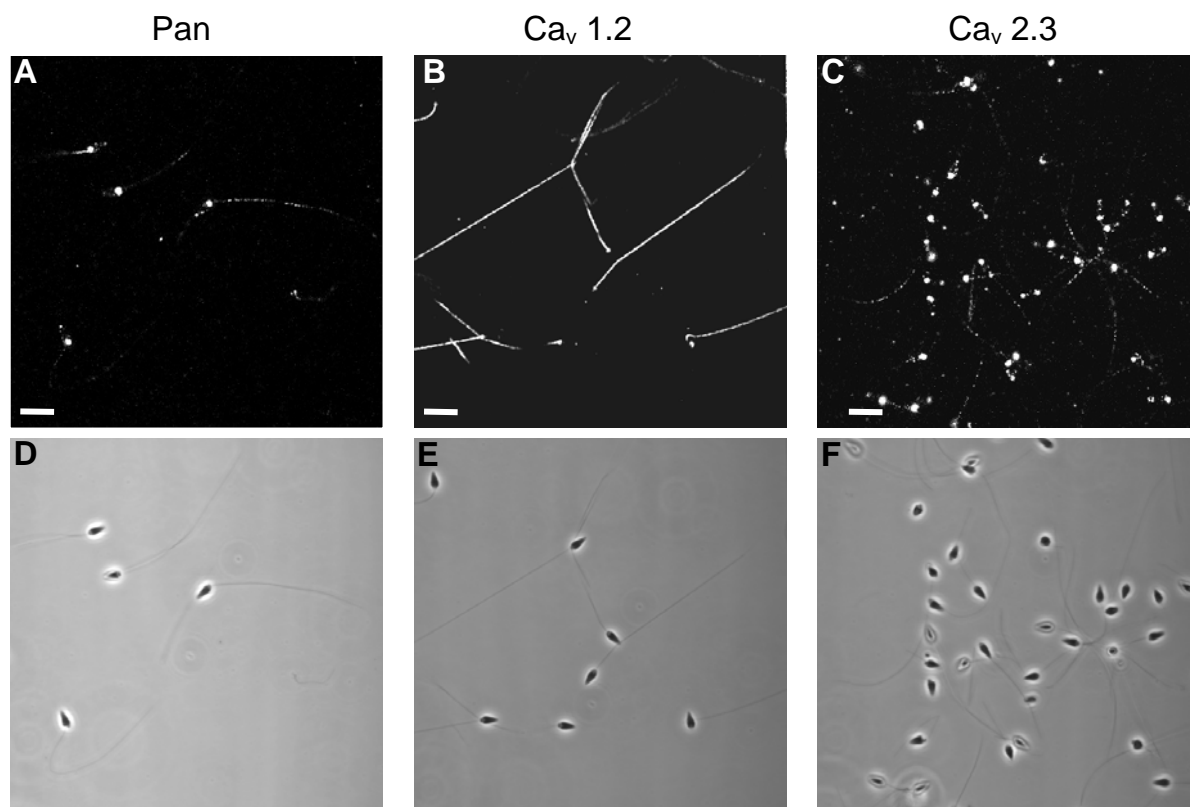


Figura 12. Inmunolocalización de canales Ca<sub>v</sub>s en el espermatozoide de *S. purpuratus*. La inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-Pan (A), anti-Ca<sub>v</sub>1.2 (B), anti-Ca<sub>v</sub>2.3 (C), se detectó en el flagelo, el área del acrosoma y el área de la mitocondria del espermatozoide de *S. purpuratus*. D, E y F imágenes correspondientes en contraste de fases.

Con la misma idea buscamos las secuencias de los péptidos antigénicos correspondientes dentro de las secuencias parciales predichas de suCa<sub>v</sub>L1 y su-Ca<sub>v</sub>NL1 que habíamos encontrado. El único péptido antigénico presente en ambas secuencias de suCa<sub>v</sub>s, fue el de anti-Pan, el cual, corrobora la presencia de canales Ca<sub>v</sub> en el espermatozoide de erizo de mar. No podemos concluir que las secuencias de los epítopes de los otros anticuerpos (anti-Ca<sub>v</sub>1.2 y anti-Ca<sub>v</sub>2.3) no se encuentran en el genoma del erizo *S. purpuratus*, ya que las secuencias de los suCa<sub>v</sub> que encontramos todavía están incompletas. El encontrar secuencias de canales Ca<sub>v</sub>s tipo L y no L, en el genoma de *S. purpuratus*, apoya nuestros resultados de la presencia de canales Ca<sub>v</sub> en el espermatozoide de erizo de mar.

Otra manera de investigar la presencia de los canales Ca<sub>v</sub>, en el espermatozoide de erizo de mar es mediante experimentos de Western blot. La figura 14 muestra las bandas obtenidas con los anticuerpos anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti-Ca<sub>v</sub>2.3 y anti-Pan en preparaciones de membranas del espermatozoide de *S. purpuratus*.

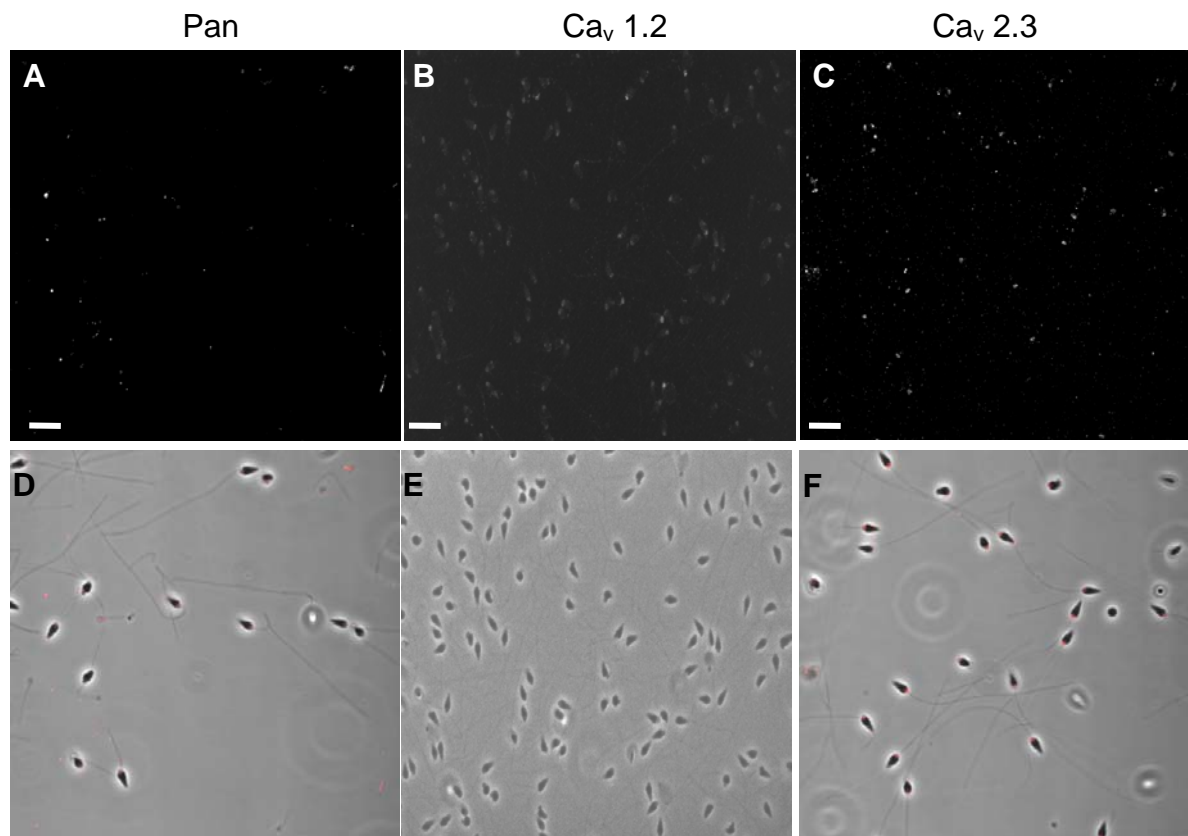


Figura 13. La señal observada con los anticuerpos para canales Ca<sub>v</sub>s, se elimina al preincubar los anticuerpos con el péptido antigénico (1:5) correspondiente (A, B y C), lo que indica que la señal es específica. (D, E y F) Imágenes correspondientes en contraste de fases.

Utilizando el anti-Pan, observamos dos bandas, una de 172 y otra de 129 kDa (Fig. 14A). Con el anti- $\text{Ca}_v1.2$  observamos dos bandas de aproximadamente 181 y 108 kDa (Fig. 14B). Por el contrario, el anti- $\text{Ca}_v2.3$  reveló solo una banda de 138 kDa (Fig. 14C). Las bandas detectadas se bloquean completamente cuando los anticuerpos se preincuban con su péptido antigénico correspondiente (1:5). Como se mencionó anteriormente, en este caso los péptidos antigénicos de otros canales  $\text{Ca}_v$  tampoco compiten con la tinción del anti- $\text{Ca}_v1.2$ . Los resultados obtenidos con esta técnica son consistentes con los de inmunocitoquímica.

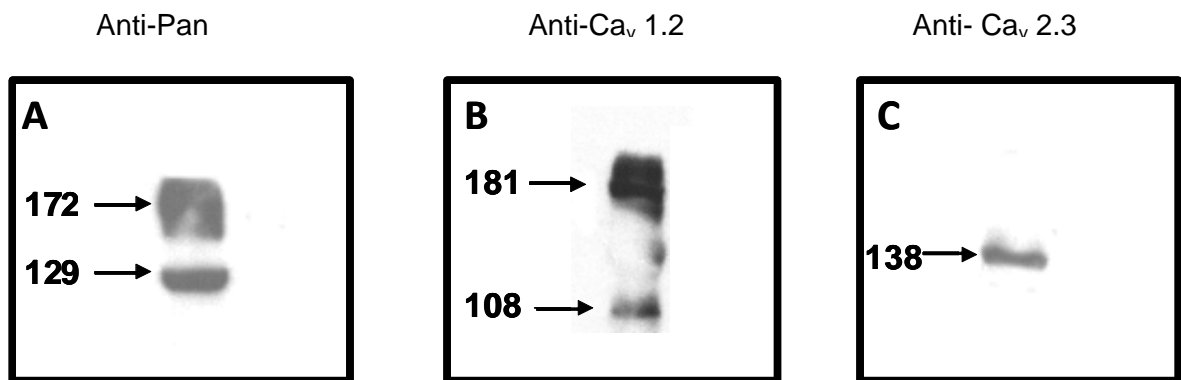


Figura 14. Western blots demostrando la expresión de las proteínas de los canales  $\text{Ca}_v$  en el espermatozoide de erizo de mar. Las membranas de espermatozoides de *S. purpuratus* se expusieron con los anticuerpos anti-Pan (A), anti- $\text{Ca}_v$  1.2 (B) y anti- $\text{Ca}_v$  2.3 (C) (Experimentos representativos). Todas las bandas detectadas se bloquean completamente cuando el anticuerpo se preincuba con su péptido correspondiente.

### ***Análisis de las proteínas de los canales TRPC en el espermatozoide de *S. purpuratus****

Considerando que se ha sugerido que los canales TRP participan en la movilidad del espermatozoide de mamífero (Treviño *et al.*, 2001; Castellano *et al.*, 2003.), hemos analizado la presencia de este tipo de canales en el espermatozoide de *S. purpuratus*. En el genoma de *S. purpuratus* encontramos secuencias predichas para canales tipo TRPC. Las secuencias que encontramos son secuencias predichas similares a TRPC6 isoforma2, variante delta 377-431, similar a TRPC5 y similar a TRPC3.

Esta información sugiere que este tipo de canales podría estar en el espermatozoide de erizo de mar. Con este antecedente, decidimos realizar experimentos de inmunolocalización utilizando anticuerpos contra canales TRP de mamíferos. Nuestros resultados de inmunolocalización mostraron la presencia (Fig. 15) de canales TRPC (TRPC3, TRPC5 y TRPC6) en el flagelo y en la punta de la cabeza del espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus*. Aunque los 3 anticuerpos tiñen el flagelo y las áreas del acrosoma y la mitocondria, la intensidad de la tinción parece ser diferencial. Con el anti-TRPC3 el orden es: área mitocondrial > área acrosomal > flagelo; con el anti-TRPC5 el orden es: flagelo ~ área mitocondrial > área acrosomal y con el anti-TRPC6 área mitocondrial ~ área acrosomal > flagelo.

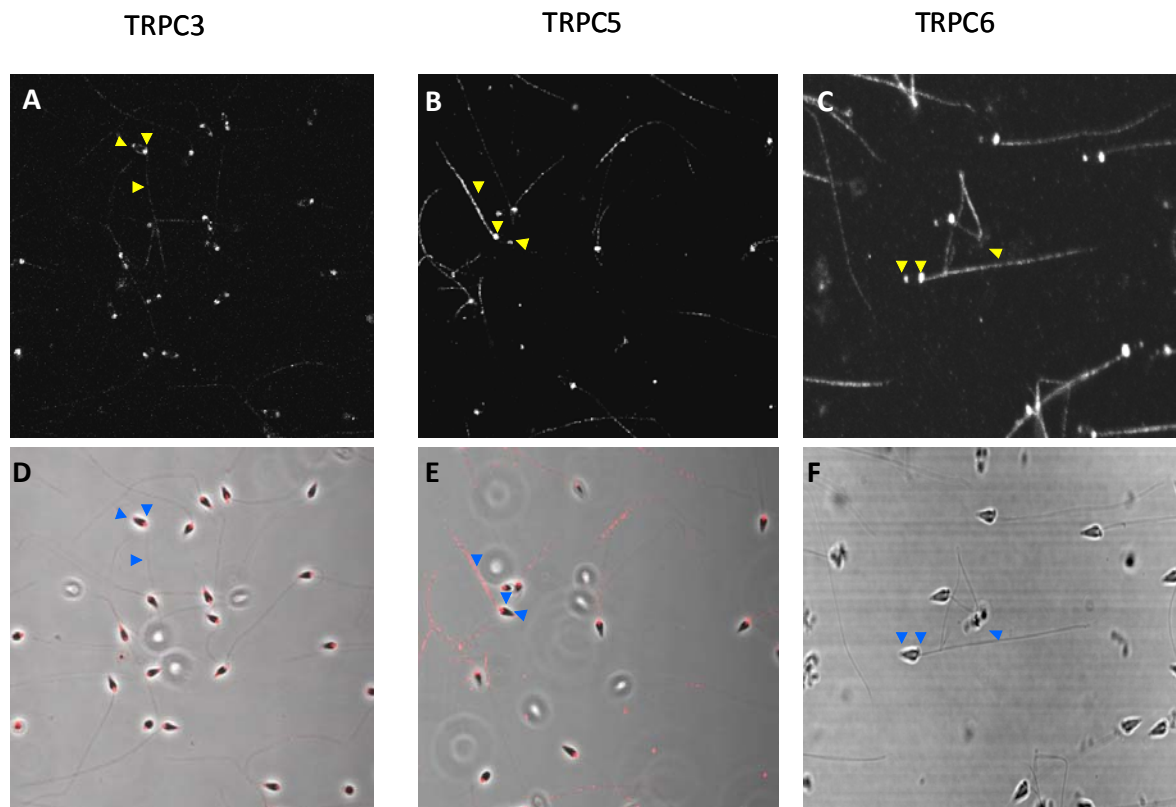


Figura 15. Inmunolocalización de canales TRPC en el espermatozoide de erizo de mar. La inmunofluorescencia de los anticuerpos anti- TRPC3 (A), TRPC5 (B) y TRPC6 (C), se detectó en el flagelo, el área del acrosoma y el área de la mitocondria del espermatozoide de *S. purpuratus*. (D, E y F) Imágenes correspondientes en contraste de fases.

Aunque también realizamos experimentos de inmunolocalización con los anticuerpos contra TRPC1 y TRPC4 no obtuvimos resultados concluyentes, y no fue posible investigar la presencia de TRPC2 y TRPC7 debido a que no existen anticuerpos comerciales contra ellos.

Cuando los anticuerpos se preincubaban con su péptido antigénico correspondiente, no se observa ninguna señal, lo que confirma la especificidad de los anticuerpos (Fig. 16).

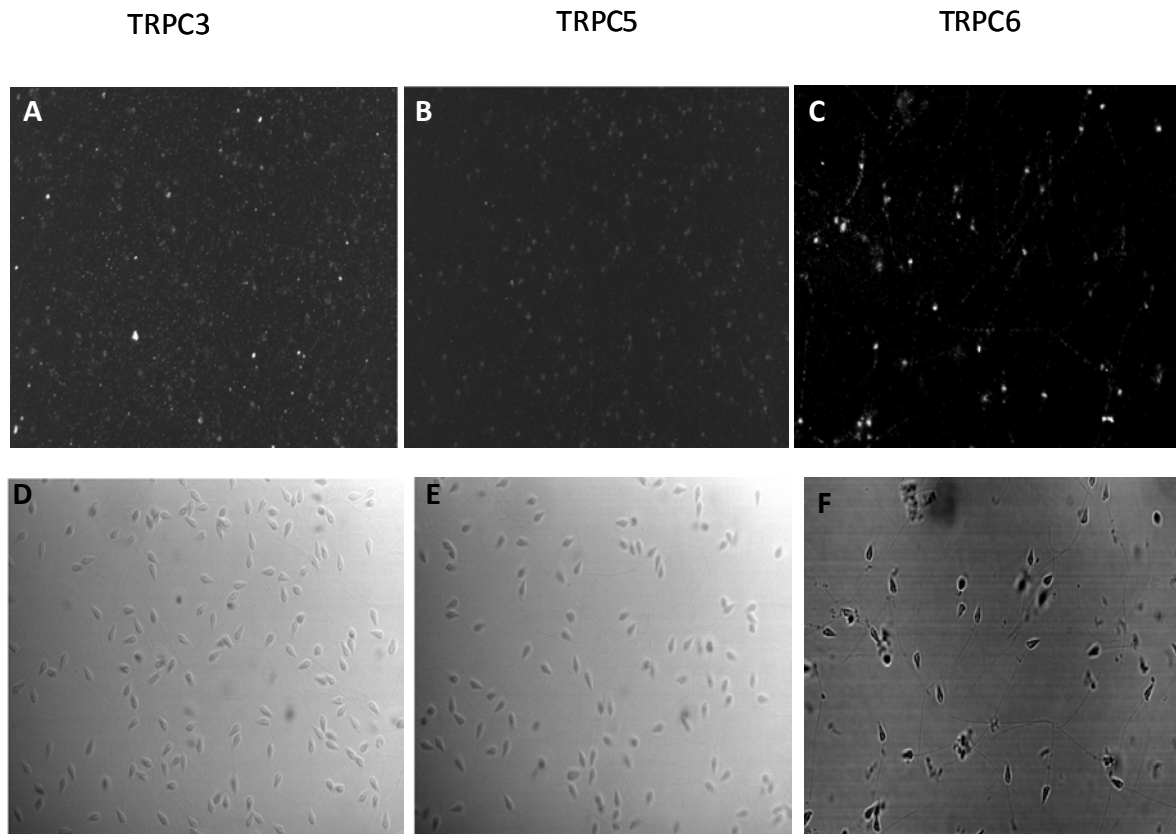


Figura 16. La señal observada para los canales TRPC se elimina al preincubar el anticuerpo con el péptido antigénico correspondiente (A, B y C) lo que indica que la señal es específica. Abajo se muestra la sobreposición de la fluorescencia con el contraste de fases (D, E) o solo la imagen correspondiente en contraste de fases (F).

Los experimentos tipo "western blot" (Figura. 17A, B, C) con preparaciones de membrana plasmática de flagelos mostraron que la señal de TRPC6 corresponde a una banda con Mr de ~140 kDa (Figura. 17 C), mientras la de TRPC3 a una Mr de ~ 109 kDa (Figura. 17 A). Ambas bandas se bloquean con el péptido antigénico correspondiente, lo cual nos sugiere que se trata de señales específicas.



Los experimentos con el Anti-TRPC5, revelaron una banda de  $\sim 115$  kDa (Figura. 17 B), la cual es específica de acuerdo con los resultados de experimentos control de competencia con el péptido antigénico.

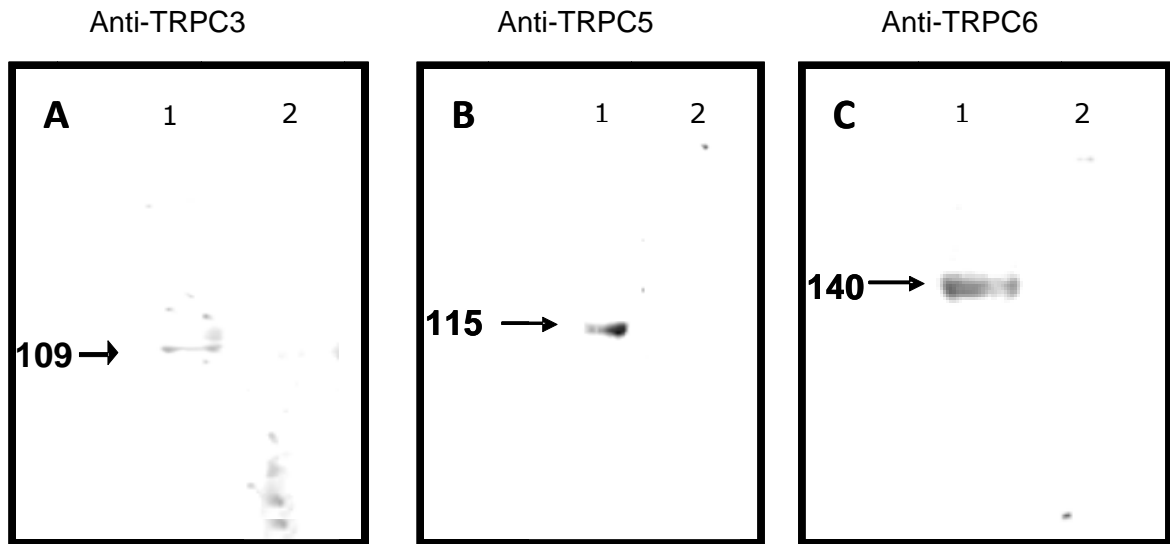


Figura 17. Western blots demostrando la expresión de las proteínas de los canales TRPC en el espermatozoide de erizo de mar. (1) Las membranas de espermatozoides de *S. purpuratus* se revelaron con los anticuerpos anti-TRPC3 (A), anti-TRPC5 (B) y anti-TRPC6 (C) (Alomone). (2) Todas las bandas detectadas se bloquean completamente cuando el anticuerpo se preincuba con su péptido correspondiente.

## DISCUSIÓN

Estudios funcionales sugieren la participación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar (Gonzalez-Martinez *et al.*, 1992; Darszon *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2005; Schackmann, 1989). La adición de antagonistas de canales  $\text{Ca}_v$  inhibe la RA inducida por los componentes de la capa que rodean al óvulo y dicha RA está influenciada por los cambios inducidos por speract como son la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , el potencial de membrana y la movilidad, indicando el papel principal de estos canales en estas funciones importantes del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2005; Garcia-Soto y Darszon, 1985; Nishigaki *et al.*, 2004; Reynaud *et al.*, 1993; Schackmann *et al.*, 1978; Wood *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado la presencia de las subunidades de estos canales  $\text{Ca}_v$  en el espermatozoide de mamífero (Goodwin *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 1999; Trevino *et al.*, 2004; Westenbroek y Babcock, 1999) y en muchas otras especies de invertebrados (Jeziorski *et al.*, 2000). Sin embargo, la identidad de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de erizo de mar no se había establecido previamente.

Nosotros encontramos dos secuencias parciales de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales  $\text{Ca}_v$  la primera de su $\text{Ca}_v\text{L}$  que comparte homología con los canales  $\text{Ca}_v$  tipo L, y la otra secuencia es similar a los canales  $\text{Ca}_v$  tipo No-L (su $\text{Ca}_v\text{NL}$ ), en el genoma de *S. purpuratus*.

Los canales  $\text{Ca}_v$  de *S. purpuratus* tienen la característica estructural general de los miembros de la superfamilia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$

dependientes de voltaje. Aunque las secuencias de suCa<sub>v</sub>L y de suCa<sub>v</sub>NL son parciales, suCa<sub>v</sub>L contiene una sección de la región del sensor de voltaje así como el residuo E que da origen al motivo EEEE cuando se forma el tetrámero y que se requiere para la selectividad a Ca<sup>2+</sup> de los canales Ca<sub>v</sub> (Heinemann *et al.*, 1994; Yang y Tsien, 1993). También, ambos suCa<sub>v</sub>s tienen los tres residuos EDY en el asa I-II que son importantes para la unión con la subunidad β (Fig. 9) (Bogdanov *et al.*, 2000). Además, el canal suCa<sub>v</sub>L contiene el motivo "IQ-like" de unión a calmodulina en el extremo C-terminal. Esto es potencialmente relevante ya que está reportado que la RA del espermatozoide de erizo de mar se inhibe por antagonistas de calmodulina (Guerrero *et al.*, 1998). Por lo anterior, no fue del todo inesperado que los anticuerpos contra los canales Ca<sub>v</sub> generados a partir de secuencias de rata detectaran estas proteínas en el espermatozoide de erizo de mar. Además, cuando las secuencias de suCa<sub>v</sub>L y de suCa<sub>v</sub>NL se alinearon solo con secuencias de canales Ca<sub>v</sub> de mamíferos, la especie más cercana en homología al erizo de mar fue la de rata.

Consistente con lo descrito anteriormente, nosotros identificamos en el testículo de erizo de mar dos transcritos de canales Ca<sub>v</sub>, uno tipo-L y el otro tipo No-L. Además, utilizando anticuerpos comerciales contra los canales Ca<sub>v</sub> de mamífero, detectamos en el espermatozoide de erizo de mar tanto por inmunocitoquímica, como por experimentos de Western blot, señales para Ca<sub>v</sub> con anti-Pan y específicamente Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>2.3, con los anticuerpos respectivos contra las proteínas de rata (Fig. 12). Ambos canales, el Ca<sub>v</sub>1.2 y el Ca<sub>v</sub>2.3 se detectaron previamente en el

espermatozoide de ratón (Wennemuth *et al.*, 2000) y de humano (Park *et al.*, 2003).

Estudios funcionales utilizando bloqueadores de canales  $Ca_v$  sugieren que en el espermatozoide de erizo de mar los canales  $Ca_v$  participan en la movilidad y/o en la RA. Como los canales  $Ca_v$  ( $suCa_vL$  y  $suCa_vNL$ ) están presentes en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide de esta especie, sugerimos que este tipo de canales pueden jugar un papel importante en la movilidad y/o en la RA.

Aunque el  $Ca^{2+}$  juega un papel importante en la RA del espermatozoide, también participa en la vía de señalización del speract. Shackmann y Chock. (1986) demostraron que el speract altera la  $[Ca^{2+}]_i$  en células en población. Estudios posteriores mostraron que el resact, un SAP aislado del óvulo del erizo *A. punctulata*, estimula la quimiotaxis del espermatozoide homólogo e incrementaba la  $[Ca^{2+}]_i$  (Cook *et al.*, 1994; Kaupp *et al.*, 2003).

Los resultados de experimentos donde midieron la  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides individuales de *S. purpuratus* (Wood *et al.*, 2003), sugieren que los SAP estimulan más de una vía de entrada de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide de esa especie. Las imágenes de la  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides individuales adheridos a un portaobjetos, muestran que el aumento en el  $Ca^{2+}$  es de naturaleza bifásica, esto consiste en fluctuaciones transitorias superimpuestas en un aumento tónico sostenido (Wood *et al.*, 2003). El aumento del  $Ca^{2+}$  en el flagelo, muestra una cinética diferente al

aumento que se observa en la cabeza. Esto sugiere la existencia de múltiples vías en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y que los componentes moleculares están distribuidos o activados de manera irregular, en diferentes subcompartimentos del espermatozoide. Los canales  $\text{Ca}_v$  pueden ser candidatos en la participación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células individuales. Bloqueadores de canales  $\text{Ca}_v$  como la nimodipina y el  $\text{Ni}^{2+}$ , inhiben la respuesta rápida del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo sin afectar el aumento tónico.

Puesto que la nimodipina y bajas  $[\text{Ni}^{2+}]$ , que inhiben los canales  $\text{Ca}_v$  tipo T en células espermátogénicas de ratón, afectan las fluctuaciones inducidas por speract, pero nisoldipina y  $\text{Cd}^{2+}$ , que bloquean los canales  $\text{Ca}_v$  tipo L, no lo hacen, Wood et al, propusieron que el aumento tónico se debe a la apertura de canales  $\text{Ca}_v$  LVA (o tipo T). Estos mismos autores propusieron un modelo nuevo en el cual el batido del flagelo aumenta por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de una vía sensible a nimodipina que no afecta el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por otras vías (Wood *et al.*, 2003; 2005).

Cuando se llevó a cabo este trabajo, existía poca información acerca de la identidad molecular de este tipo de canales. En el 2006, Strünker *et al*, encontraron la secuencia de un canal  $\text{Ca}_v$  tipo T ( $\text{Ca}_v3$ ), en el genoma de *S. purpuratus*, que pudiera estar participando en el aumento tónico que se mencionó anteriormente (Strünker *et al.*, 2006; Kaupp *et al.*, 2007). Además, en el espermatozoide de *A. punctulata*, la relación entre la hiperpolarización inducida por los SAP y el subsecuente aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ha implicado a un canal LVA como el mejor candidato en la fase

más temprana del aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . También se sugiere que los canales HVA contribuyen al aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por los SAP y su apertura se retrasa en comparación con los canales LVA (Strunker *et al.*, 2006).

Se ha detectado la presencia de múltiples tipos de TRPC en células espermatogénicas y en el espermatozoide de ratón (Trevino *et al.*, 2001). En el espermatozoide de humano se detectó la presencia de los canales TRPC1, 3, 4, 5 y 6. El uso de antagonistas para los canales tipo TRPC nos sugiere que los canales tipo TRPC contribuyen en la movilidad activada de manera parcial, sin participar notablemente en la movilidad hiperactivada del espermatozoide de humano (Castellano, Tesis de doctorado 2005). En espermatozoides de erizo de mar, no se había identificado su presencia, hasta ahora, con la realización de este trabajo.

Los hallazgos presentados en este trabajo son la primera evidencia de la expresión de los diferentes canales TRPC en el espermatozoide de erizo de mar de *S. purpuratus*. Su distribución diferencial también sugiere que participan tanto en la movilidad como en la RA del espermatozoide de erizo de mar.

Las proteínas TRPC se inmunlocalizaron principalmente en el flagelo y en el área de la mitocondria del espermatozoide, aunque también se tiñó el acrosoma. Estos datos proporcionan evidencia de heterogeneidad en la expresión de los canales TRPC en el espermatozoide de erizo de mar y

sugieren que pueden participar en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , participando en varios papeles fisiológicos de estas células. Los resultados de inmunocitoquímica para TRPC 3 y 6 son consistentes con la presencia de estos a nivel de RNAm, que se extrajo del testículo de *S. purpuratus* (resultados no publicados).

Por otro lado se confirmó la presencia de TRPC 3, 5 y 6 mediante estudios de Western blot. La presencia de estos canales es importante para establecer la participación de estos canales en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar.

Resultados del laboratorio mostraron la presencia de distintos TRPCs, no sólo en la cabeza sino también en el flagelo del espermatozoide de ratón y de humano (Trevino *et al.*, 2001; Castellano, *et al.*, 2003) lo que sugiere que este tipo de canales puede estar implicado en determinar la movilidad del espermatozoide. Además existe un reporte que indica que los SOCs regulan la quimiotaxis y la movilidad en espermatozoides de ascidia (Yoshida *et al.*, 2003). Aunque en este trabajo no investigamos la participación funcional de los canales TRPC en la movilidad, resultados del grupo de trabajo muestran que 20  $\mu\text{M}$  de SKF96365, bloqueador de este tipo de canales, inhibe la movilidad del espermatozoide de *S. purpuratus* (C. Wood, resultados no publicados). Es necesario explorar más a fondo la participación de los canales TRPC en la movilidad del espermatozoide de erizo de mar.

En el espermatozoide de erizo de mar, la RA está asociada con la apertura secuencial de dos tipos diferentes de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Guerrero y Darszon, 1989). El primero es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a dihidropiridinas. El segundo canal de  $\text{Ca}^{2+}$  es dependiente de  $\text{pH}_i$ , permeable a  $\text{Mn}^{2+}$  y se bloquea por  $\text{Ni}^{2+}$  (González-Martínez *et al.*, 1992). El espermatozoide de erizo de mar no tiene retículo endoplásmico, el acrosoma tiene el papel de poza interna; se sabe que altas concentraciones de inhibidores de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (SERCA), como la tapsigargina y el ácido ciclopiazónico, pueden inducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por SOCs. Esto sugiere que el segundo canal que participa en la RA es un canal tipo SOC (González-Martínez *et al.*, 2001). Durante la RA del espermatozoide de erizo de mar aumenta el IP3 (sus receptores podrían estar en el acrosoma) (Zapata *et al.*, 1997), que puede regular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares permitiendo la activación de canales SOC de manera similar a lo que sucede en el espermatozoide de mamífero (Nilius y Voets, 2005).

Durante el desarrollo de este trabajo, detectamos la presencia de TRPC 3, 5 y 6 en la región de la mitocondria. Recientemente se demostró que inhibidores mitocondriales (CCCP, CGP, Antimicina A y Oligomicina) activan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo al espermatozoide de erizo de mar; estos resultados sugieren la participación funcional de la mitocondria del espermatozoide de erizo de mar en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente a través de los canales SOCs en estas células (Ardon *et al.*, 2009). El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activado por los inhibidores mitocondriales, se bloquea por SKF96365 y  $\text{Gd}^{2+}$ , que son inhibidores de canales SOC (Parekh y Putney, 2005) y no se afecta de manera significativa por bloqueadores de



canales  $Ca_v$  como verapamil y nimodipina. Se ha confirmado la presencia de un canal SOC sensible a SKF96365 en el espermatozoide de erizo de mar (Hirohashi y Vaquier, 2003).

Nuestros resultados preliminares muestran la presencia de canales TRPC 3, 5 y 6 en la región del acrosoma del espermatozoide de *S. purpuratus*, lo cual sugiere que este tipo de canales pudiera estar participando en la RA del espermatozoide de erizo de mar.

## CONCLUSIONES

- Encontramos dos tipos de canales  $Ca_v$  y tres TRPC, en el espermatozoide de *S. purpuratus*.
- Los canales  $Ca_v$  que encontramos en el espermatozoide de erizo de mar fueron uno tipo L (suCavL) y el otro del tipo no L (su CavNL).
- Los canales tipo TRPC, que encontramos fueron TRPC3, TRPC5 y TRPC6, en el espermatozoide de erizo de mar.
- Los canales que encontramos se encuentran localizados de manera diferencial en el espermatozoide de erizo de mar.
- Estos canales  $Ca_v$  y TRPC, pueden estar participando en la movilidad y/o RA del espermatozoide de erizo de mar.

## **PERSPECTIVAS**

Realizar estudios del efecto de los bloqueadores de los canales tipo TRPC sobre la movilidad del espermatozoide de erizo de mar.

Estudiar el efecto de los bloqueadores de canales HVA y LVA, en el espermatozoide de *L. pictus*, sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células individuales pegadas y en movimiento.

## LITERATURA CITADA

Albert, D. M., Scheef, E. A., Wang, S., Mehraein, F., Darjatmoko, S. R., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2007). Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48**, 2327-2334.

Ambudkar, I. S. (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans.* **35**, 96-100.

Ardon, F., Rodriguez-Miranda, E., Beltran, C., Hernandez-Cruz, A., and Darszon, A. (2009). Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca(2+) in sea urchin sperm. *Biochim Biophys Acta.* **1787**, 15-24.

Arikkath, J. and Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* **13**, 298-307.

Babcock, D. F., Bosma, M. M., Battaglia, D. E., and Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K<sup>+</sup> channels by the egg peptide speract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 6001-6005.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., and Forti, G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* **5**, E110-E123.

Beltran, C., Darszon, A., Labarca, P., and Lievano, A. (1994). A high-conductance voltage-dependent multistate Ca<sup>2+</sup> channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Lett.* **338**, 23-26.

Beltran, C., Zapata, O., and Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry.* **35**, 7591-7598.

Beltran, C., Vacquier, V. D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L. R., and Darszon, A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* **358**, 1128-1135.

Benoff, S. (1998). Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci.* **3**, D1220-D1240.

Berg, J. M. and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. **271**, 1081-1085.

Berridge, M. (2004). Conformational coupling: a physiological calcium entry mechanism. *Sci STKE*. **2004**, e33.

Bettger, W. J. and O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci*. **28**, 1425-1438.

Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., and Stefani, E. (1998). Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr*. **30**, 357-375.

Bohmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., and Kaupp, U. B. (2005). Ca<sup>2+</sup> spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *Embo J*. **24**, 2741-2752.

Bookbinder, L. H., Moy, G. W., and Vacquier, V. D. (1990). Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase. *J Cell Biol*. **111**, 1859-1866.

Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 14955-14960.

Bourinet, E., Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J., and Zamponi, G. W. (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J*. **81**, 79-88.

Branham, M. T., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem*. **281**, 8656-8666.

Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *J Cell Biol*. **82**, 401-411.

Brokaw, C. J. (1987). Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J Cell Biochem.* **35**, 175-184.

Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J., and Levin, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 79-84.

Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., and Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 14864-14868.

Castellano, L. E., Trevino, C. L., Rodriguez, D., Serrano, C. J., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Felix, R., and Darszon, A. (2003). Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* **541**, 69-74.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 521-555.

Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* **26**, 13-25.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev.* **55**, 579-581.

Choi, Y., Chen, H. V., and Lipton, S. A. (2001). Three pairs of cysteine residues mediate both redox and zn<sup>2+</sup> modulation of the nmda receptor. *J Neurosci.* **21**, 392-400.

Christen, R., Schackmann, R. W., and Shapiro, B. M. (1982). Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Biol Chem.* **257**, 14881-14890.

Clapper, D. L., Davis, J. A., Lamothe, P. J., Patton, C., and Epel, D. (1985). Involvement of zinc in the regulation of pHi, motility, and acrosome reactions in sea urchin sperm. *J Cell Biol.* **100**, 1817-1824.

Cook, S. P. and Babcock, D. F. (1993). Activation of Ca<sup>2+</sup> permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *J Biol Chem.* **268**, 22408-22413.

Cook, S. P. and Babcock, D. F. (1993). Selective modulation by cGMP of the K<sup>+</sup> channel activated by speract. *J Biol Chem.* **268**, 22402-22407.

Cook, S. P., Brokaw, C. J., Muller, C. H., and Babcock, D. F. (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol.* **165**, 10-19.

Dan, L., Lifang, Y., and Guangxiu, L. (2007). Expression and possible functions of a novel gene SPATA12 in human testis. *J Androl.* **28**, 502-512.

Darszon, A., Lievano, A., and Beltran, C. (1996). Ion channels: key elements in gamete signaling. *Curr Top Dev Biol.* **34**, 117-167.

Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev.* **79**, 481-510.

Darszon, A., Beltran, C., Felix, R., Nishigaki, T., and Trevino, C. L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* **240**, 1-14.

Darszon, A., Wood, C. D., Beltran, C., Sanchez, D., Rodriguez, E., Gorelik, J., Korchev, Y. E., and Nishigaki, T. (2004). Measuring ion fluxes in sperm. *Methods Cell Biol.* **74**, 545-576.

Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Trevino, C. L., Felix, R., and Beltran, C. (2005). Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol.* **243**, 79-172.

Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernandez-Gonzalez, E. O., Nishigaki, T., Trevino, C. L., Wood, C., and Beltran, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* **131**, 977-988.

Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J. J., Hernandez-Cruz, A., and Trevino, C. L. (2006). T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in sperm function. *Cell Calcium*. **40**, 241-252.

Darszon, A., Trevino, C. L., Wood, C., Galindo, B., Rodriguez-Miranda, E., Acevedo, J. J., Hernandez-Gonzalez, E. O., Beltran, C., Martinez-Lopez, P., and Nishigaki, T. (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*. **65**, 229-244.

Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., and Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol*. **52**, 595-606.

Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A., and Visconti, P. E. (2003). Involvement of a  $\text{Na}^{+}/\text{HCO}_3^{-}$  cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*. **278**, 7001-7009.

DiPolo, R. and Beauge, L. (1999). Metabolic pathways in the regulation of invertebrate and vertebrate  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Biochim Biophys Acta*. **1422**, 57-71.

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., and Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. **25**, 533-535.

Farach, H. A., Jr., Mundy, D. I., Strittmatter, W. J., and Lennarz, W. J. (1987). Evidence for the involvement of metalloendoproteases in the acrosome reaction in sea urchin sperm. *J Biol Chem*. **262**, 5483-5487.

Felix, R. (1999). Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_2\delta$  auxiliary subunit: structure, function and regulation. *Receptors Channels*. **6**, 351-362.

Florman, H. M., Arnoult, C., Kazam, I. G., Li, C., and O'Toole, C. M. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*. **59**, 12-16.



Galindo, B. E., Beltran, C., Cragoe, E. J., Jr., and Darszon, A. (2000). Participation of a K(+) channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of stronglycentrotus purpuratus sea urchin sperm. *Dev Biol.* **221**, 285-294.

Galindo, B. E., Vega-Beltran, J. L., Labarca, P., Vacquier, V. D., and Darszon, A. (2007). Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun.* **354**, 668-675.

Garbers, D. L., Lowe, D. G., Dangott, L. J., Chinkers, M., Thorpe, D. S., Bentley, J. K., Ramarao, C. S., Goeddel, D. V., and Singh, S. (1988). The membrane form of guanylate cyclase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **53 Pt 2**, 993-1003.

Garbers, D. L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu Rev Biochem.* **58**, 719-742.

Garcia-Soto, J. and Darszon, A. (1985). High pH-induced acrosome reaction and Ca<sup>2+</sup> uptake in sea urchin sperm suspended in Na<sup>+</sup>-free seawater. *Dev Biol.* **110**, 338-345.

Garcia-Soto, J., Mourelle, M., Vargas, I., De la Torre, L., Ramirez, E., Lopez-Colome, A. M., and Darszon, A. (1988). Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> uptake. *Biochim Biophys Acta.* **944**, 1-12.

Gatti, J. L. and Christen, R. (1985). Regulation of internal pH of sea urchin sperm. A role for the Na/K pump. *J Biol Chem.* **260**, 7599-7602.

Gaudet, R. (2008). TRP channels entering the structural era. *J Physiol.* **586**, 3565-3575.

Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature.* **393**, 583-587.

Gonzalez-Martinez, M. and Darszon, A. (1987). A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* **218**, 247-250.

Gonzalez-Martinez, M. T., Guerrero, A., Morales, E., De la Torre, L., and Darszon, A. (1992). A depolarization can trigger  $Ca^{2+}$  uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in *L. pictus* sea urchin sperm. *Dev Biol.* **150**, 193-202.

Gonzalez-Martinez, M. T., Galindo, B. E., De la Torre, L., Zapata, O., Rodriguez, E., Florman, H. M., and Darszon, A. (2001). A sustained increase in intracellular  $Ca^{2+}$  is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev Biol.* **236**, 220-229.

Goodwin, L. O., Leeds, N. B., Hurley, I., Cooper, G. W., Pergolizzi, R. G., and Benoff, S. (1998). Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol Hum Reprod.* **4**, 215-226.

Guerrero, A., Garcia, L., Zapata, O., Rodriguez, E., and Darszon, A. (1998). Acrosome reaction inactivation in sea urchin sperm. *Biochim Biophys Acta.* **1401**, 329-338.

Gunaratne, H. J., Nomura, M., Moy, G. W., and Vacquier, V. D. (2006). A sodium bicarbonate transporter from sea urchin spermatozoa. *Gene.* **375**, 37-43.

Hansbrough, J. R., Kopf, G. S., and Garbers, D. L. (1980). The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochim Biophys Acta.* **630**, 82-91.

Hansbrough, J. R. and Garbers, D. L. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J Biol Chem.* **256**, 1447-1452.

Hardie, R. C. (2007). TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J Physiol.* **578**, 9-24.

Harvey, R. J., Thomas, P., James, C. H., Wilderspin, A., and Smart, T. G. (1999). Identification of an inhibitory Zn<sup>2+</sup> binding site on the human glycine receptor alpha1 subunit. *J Physiol.* **520 Pt 1**, 53-64.

Heinemann, S. H., Schlieff, T., Mori, Y., and Imoto, K. (1994). Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Braz J Med Biol Res.* **27**, 2781-2802.

Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., Levin, L. R., Williams, C. J., Buck, J., and Moss, S. B. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell.* **9**, 249-259.

Hirohashi, N. and Vacquier, V. D. (2002). Egg fucose sulfate polymer, sialoglycan, and speract all trigger the sea urchin sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* **296**, 833-839.

Hirohashi, N. and Vacquier, V. D. (2002). Egg sialoglycans increase intracellular pH and potentiate the acrosome reaction of sea urchin sperm. *J Biol Chem.* **277**, 8041-8047.

Hirohashi, N. and Vacquier, V. D. (2003). Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle. *Biochem Biophys Res Commun.* **304**, 285-292.

Ikeda, M. and Guggino, W. B. (2002). Do polycystins function as cation channels? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **11**, 539-545.

Ikegami, S., Kobayashi, H., Myotoishi, Y., Ohta, S., and Kato, K. H. (1994). Selective inhibition of exoplasmic membrane fusion in echinoderm gametes with jaspisin, a novel antihatching substance isolated from a marine sponge. *J Biol Chem.* **269**, 23262-23267.

Inaba, K., Kagami, O., and Ogawa, K. (1999). Tctex2-related outer arm dynein light chain is phosphorylated at activation of sperm motility. *Biochem Biophys Res Commun.* **256**, 177-183.

Izumi-Nakaseko, H., Yamaguchi, S., Ohtsuka, Y., Ebihara, T., Adachi-Akahane, S., and Okamura, Y. (2003). DHP-insensitive L-type-like Ca channel of ascidian acquires sensitivity to DHP with single amino acid change in domain III P-region. *FEBS Lett.* **549**, 67-71.

Jeziorski, M. C., Greenberg, R. M., Clark, K. S., and Anderson, P. A. (1998). Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel alpha1 subunit from jellyfish. *J Biol Chem.* **273**, 22792-22799.

Jeziorski, M. C., Greenberg, R. M., and Anderson, P. A. (2000). The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca(2+) channels. *J Exp Biol.* **203**, 841-856.

Johnson, C. H. and Epel, D. (1983). Heavy metal chelators prolong motility and viability of sea urchin sperm by inhibiting spontaneous acrosome reactions. *Dev Biol.* **226**, 431-440.

Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R., and Florman, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* **3**, 499-502.

Kato, K. H., Takemoto, K., Kato, E., Miyazaki, K., Kobayashi, H., and Ikegami, S. (1998). Inhibition of sea urchin fertilization by jaspisin, a specific inhibitor of matrix metalloendoproteinase. *Dev Growth Differ.* **40**, 221-230.

Kaupp, U. B. and Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol.* **63**, 235-257.

Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol.* **5**, 109-117.

Kierszenbaum, A. L. (2000). Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Mol Reprod Dev.* **57**, 309-310.

Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*. **439**, 737-740.

Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltr'an, C., Li'evano, A., and Darszon, A. (1996). A cAMP regulated K<sup>+</sup>-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev Biol*. **174**, 271-280.

Lacinova, L., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2000). Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys*. **19**, 121-136.

Lee, H. C., Johnson, C., and Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol*. **95**, 31-45.

Lee, H. C. and Garbers, D. L. (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J Biol Chem*. **261**, 16026-16032.

Lewis, R. S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*. **446**, 284-287.

Lievano, A., Vega-SaenzdeMiera, E. C., and Darszon, A. (1990). Ca<sup>2+</sup> channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J Gen Physiol*. **95**, 273-296.

Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*. **309**, 897-903.

Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. **450**, 376-382.

Longo, F. J. and Anderson, E. (1969). Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. II. Development of the male pronucleus

and the association of the maternally and paternally derived chromosomes. *J Exp Zool.* **172**, 97-119.

Longo, F. J. and Anderson, E. (1969). Sperm differentiation in the sea urchins *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Ultrastruct Res.* **27**, 486-509.

Longo, F. J., Cook, S., McCulloh, D. H., Ivonnet, P. I., and Chambers, E. L. (1994). Stages leading to and following fusion of sperm and egg plasma membranes. *Zygote.* **2**, 317-331.

Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G., and Baldi, E. (2005). Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol Reprod.* **72**, 22-32.

Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., and Hanck, D. A. (2000). Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* **295**, 302-308.

Matsumoto, M., Solzin, J., Helbig, A., Hagen, V., Ueno, S., Kawase, O., Maruyama, Y., Ogiso, M., Godde, M., Minakata, H., Kaupp, U. B., Hoshi, M., and Weyand, I. (2003). A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Dev Biol.* **260**, 314-324.

Mengerink, K. J., Moy, G. W., and Vacquier, V. D. (2002). suREJ3, a polycystin-1 protein, is cleaved at the GPS domain and localizes to the acrosomal region of sea urchin sperm. *J Biol Chem.* **277**, 943-948.

Miljanich, G. P. and Ramachandran, J. (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **35**, 707-734.

Miller, R. L. and Vogt, R. (1996). An N-terminal partial sequence of the 13 kDa *Pycnopodia helianthoides* sperm chemoattractant 'startrak' possesses sperm-attracting activity. *J Exp Biol.* **199**, 311-318.

Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. **2005**, re3.

Morales, E., De la Torre, L., Moy, G. W., Vacquier, V. D., and Darszon, A. (1993). Anion channels in the sea urchin sperm plasma membrane. *Mol Reprod Dev*. **36**, 174-182.

Morisawa, M. (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoolog Sci*. **11**, 647-662.

Morisawa, S. and Morisawa, M. (1988). Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *J Exp Biol*. **136**, 13-22.

Neill, A. T., Moy, G. W., and Vacquier, V. D. (2004). Polycystin-2 associates with the polycystin-1 homolog, suREJ3, and localizes to the acrosomal region of sea urchin spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. **67**, 472-477.

Neill, A. T. and Vacquier, V. D. (2004). Ligands and receptors mediating signal transduction in sea urchin spermatozoa. *Reproduction*. **127**, 141-149.

Nilius, B. and Voets, T. (2005). TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch*. **451**, 1-10.

Nishigaki, T. and Darszon, A. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. *Dev Biol*. **223**, 17-26.

Nishigaki, T., Zamudio, F. Z., Possani, L. D., and Darszon, A. (2001). Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochem Biophys Res Commun*. **284**, 531-535.

Nishigaki, T., Wood, C. D., Tatsu, Y., Yumoto, N., Furuta, T., Elias, D., Shiba, K., Baba, S. A., and Darszon, A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca(2+) before its increase. *Dev Biol*. **272**, 376-388.

Nishioka, D., Porter, D. C., Trimmer, J. S., and Vacquier, V. D. (1987). Dispersal of sperm surface antigens in the plasma membranes of polyspermicly fertilized sea urchin eggs. *Exp Cell Res.* **173**, 628-632.

Nomura, M., Beltran, C., Darszon, A., and Vacquier, V. D. (2005). A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene.* **353**, 231-238.

O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., and Florman, H. M. (2000). Ca<sup>2+</sup> entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* **11**, 1571-1584.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* **260**, 9699-9705.

Okamura, Y., Izumi-Nakaseko, H., Nakajo, K., Ohtsuka, Y., and Ebihara, T. (2003). The ascidian dihydropyridine-resistant calcium channel as the prototype of chordate L-type calcium channel. *Neurosignals.* **12**, 142-158.

Okuno, M. and Brokaw, C. J. (1979). Inhibition of movement of triton-demembrated sea-urchin sperm flagella by Mg<sup>2+</sup>, ATP<sup>4-</sup>, ADP and P<sub>1</sub>. *J Cell Sci.* **38**, 105-123.

Paoletti, P., Ascher, P., and Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci.* **17**, 5711-5725.

Parekh, A. B. and Putney, J. W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* **85**, 757-810.

Park, J. Y., Ahn, H. J., Gu, J. G., Lee, K. H., Kim, J. S., Kang, H. W., and Lee, J. H. (2003). Molecular identification of Ca<sup>2+</sup> channels in human sperm. *Exp Mol Med.* **35**, 285-292.

Pedersen, S. F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* **38**, 233-252.



Perez-Reyes, E. (1999). Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci.* **56**, 660-669.

Perez-Reyes, E., Lee, J. H., and Cribbs, L. L. (1999). Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Ann N Y Acad Sci.* **868**, 131-143.

Publicover, S. J. and Barratt, C. L. (1999). Voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? *Hum Reprod.* **14**, 873-879.

Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* **7**, 1-12.

Putney, J. W., Jr. and Bird, G. S. (1993). The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev.* **14**, 610-631.

Putney, J. W., Jr. and McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels: from concepts to molecules. *Immunol Rev.* **231**, 10-22.

Ragozzino, D., Giovannelli, A., Degasperi, V., Eusebi, F., and Grassi, F. (2000). Zinc permeates mouse muscle ACh receptor channels expressed in BOSC 23 cells and affects channel function. *J Physiol.* **529 Pt 1**, 83-91.

Ramsey, I. S., Dellinger, M., and Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.* **68**, 619-647.

Reynaud, E., De la Torre, L., Zapata, O., Lievano, A., and Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Lett.* **329**, 210-214.

Robinson, R. B., Baruscotti, M., and DiFrancesco, D. (2003). Autonomic modulation of heart rate: pitfalls of nonselective channel blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**, H2865.

Rodriguez, E. and Darszon, A. (2003). Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *J Physiol.* **546**, 89-100.

Roe, J. L., Farach, H. A., Jr., Strittmatter, W. J., and Lennarz, W. J. (1988). Evidence for involvement of metalloendoproteases in a step in sea urchin gamete fusion. *J Cell Biol.* **107**, 539-544.

Salido, G.M., Sage, S.O y Rosado, J.A. (2009). TRPC channels and store-operated Ca(2+) entry. [\*Biochim Biophys Acta\*](#).**1793**, 223-230.

Sanchez, D., Labarca, P., and Darszon, A. (2001). Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP. *FEBS Lett.* **503**, 111-115.

Santi, C. M., Santos, T., Hernandez-Cruz, A., and Darszon, A. (1998). Properties of a novel pH-dependent Ca<sup>2+</sup> permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J Gen Physiol.* **112**, 33-53.

Schackmann, R. W., Eddy, E. M., and Shapiro, B. M. (1978). The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirements and movements. *Dev Biol.* **65**, 483-495.

Schackmann, R. W., Christen, R., and Shapiro, B. M. (1981). Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**, 6066-6070.

Schackmann, R. W. and Chock, P. B. (1986). Alteration of intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in sea urchin sperm by the egg peptide speract. Evidence that increased intracellular Ca<sup>2+</sup> is coupled to Na<sup>+</sup> entry and increased intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **261**, 8719-8728.

Schackmann, R. W. (1989). Ionic regulation of the sea urchin sperm acrosome reaction and stimulation by egg-derived peptides. In 'The Cell Biology of Fertilization'. (H. Schatte and G. SchattenEds. ) pp. 3-28. (Academic Press: San Diego.)

Schulz, J. R., Vega-Beltran, J. L., Beltran, C., Vacquier, V. D., and Darszon, A. (2004). Ion channel activity of membrane vesicles released from sea urchin sperm during the acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* **321**, 88-93.

Serrano, C. J., Trevino, C. L., Felix, R., and Darszon, A. (1999). Voltage-dependent Ca(2+) channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* **462**, 171-176.

Singh, S., Lowe, D. G., Thorpe, D. S., Rodriguez, H., Kuang, W. J., Dangott, L. J., Chinkers, M., Goeddel, D. V., and Garbers, D. L. (1988). Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature.* **334**, 708-712.

Smith, T. T. and Yanagimachi, R. (1991). Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil.* **91**, 567-573.

Soboloff, J., Spassova, M., Hewavitharana, T., He, L. P., Luncsford, P., Xu, W., Venkatachalam, K., van Rossum, D., Patterson, R. L., and Gill, D. L. (2007). TRPC channels: integrators of multiple cellular signals. *Handb Exp Pharmacol.* 575-591.

Solzin, J., Helbig, A., Van, Q., Brown, J. E., Hildebrand, E., Weyand, I., and Kaupp, U. B. (2004). Revisiting the role of H<sup>+</sup> in chemotactic signaling of sperm. *J Gen Physiol.* **124**, 115-124.

Stotz, S. C. and Zamponi, G. W. (2001). Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci.* **24**, 176-181.

Strunker, T., Weyand, I., Bonigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J. E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E., and Kaupp, U. B. (2006). A K<sup>+</sup>-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol.* **8**, 1149-1154.

Suzuki, N. and Garbers, D. L. (1984). Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biol Reprod.* **30**, 1167-1174.

Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoolog Sci.* **12**, 13-27.

Tatsu, Y., Nishigaki, T., Darszon, A., and Yumoto, N. (2002). A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide. *FEBS Lett.* **525**, 20-24.

Todorovic, S. M. and Lingle, C. J. (1998). Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol.* **79**, 240-252.

Trevino, C. L., Serrano, C. J., Beltran, C., Felix, R., and Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* **509**, 119-125.

Trevino, C. L., Felix, R., Castellano, L. E., Gutierrez, C., Rodriguez, D., Pacheco, J., Lopez-Gonzalez, I., Gomora, J. C., Tsutsumi, V., Hernandez-Cruz, A., Fiordeliso, T., Scaling, A. L., and Darszon, A. (2004). Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* **563**, 87-92.

Trimmer, J. S. and Vacquier, V. D. (1986). Activation of sea urchin gametes. *Annu Rev Cell Biol.* **2**, 1-26.

Vacquier, V. D. and Moy, G. W. (1997). The fucose sulfate polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Dev Biol.* **192**, 125-135.

Vacquier, V. D. (1998). Evolution of gamete recognition proteins. *Science.* **281**, 1995-1998.

Vallee, B. L. and Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *EMBO J.* **73**, 79-118.

Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem.* **76**, 387-417.

Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G. S. (1995). Capacitation in mouse spermatozoa. I: Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* **121**, 1129-1137.

Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. A., McLeroy, P., Moe, O. W., and Garbers, D. L. (2007). A sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 9325-9330.

Ward, C. R., Storey, B. T., and Kopf, G. S. (1994). Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem.* **269**, 13254-13258.

Ward, G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L., and Vacquier, V. D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol.* **101**, 2324-2329.

Wassarman, P. M., Jovine, L., and Litscher, E. S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* **3**, E59-E64.

Weiss, J. H., Sensi, S. L., and Koh, J. Y. (2000). Zn(2<sup>+</sup>): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 395-401.

Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., and Babcock, D. F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca<sup>2+</sup> channels in depolarization-evoked entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm. *J Biol Chem.* **275**, 21210-21217.

Westenbroek, R. E. and Babcock, D. F. (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev Biol.* **207**, 457-469.

Williams, C. J., Mehlmann, L. M., Jaffe, L. A., Kopf, G. S., and Schultz, R. M. (1998). Evidence that Gq family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol.* **198**, 116-127.

Wood, C. D., Darszon, A., and Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J Cell Biol.* **161**, 89-101.

Wood, C. D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S. A., and Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J Cell Biol.* **169**, 725-731.

Wood, C. D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S. A., Whitaker, M., and Darszon, A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca<sup>2+</sup> spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol.* **306**, 525-537.

Wu, S., Zhang, M., Vest, P. A., Bhattacharjee, A., Liu, L., and Li, M. (2000). A mibefradil metabolite is a potent intracellular blocker of L-type Ca(2+) currents in pancreatic beta-cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **292**, 939-943.

Xu, G. M., Gonzalez-Perrett, S., Essafi, M., Timpanaro, G. A., Montalbetti, N., Arnaout, M. A., and Cantiello, H. F. (2003). Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem.* **278**, 1457-1462.

Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* **2**, 371-372.

Yanagimachi, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum Reprod.* **13 Suppl 1**, 87-98.

Yang, J. and Tsien, R. W. (1993). Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron.* **10**, 127-136.

Yoshida, M., Inaba, K., and Morisawa, M. (1993). Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians *Ciona savignyi* and *Ciona intestinalis*. *Dev Biol.* **157**, 497-506.

Yoshida, M., Ishikawa, M., Izumi, H., De Santis, R., and Morisawa, M. (2003). Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 149-154.

Zapata, O., Ralston, J., Beltran, C., Parys, J. B., Chen, J. L., Longo, F. J., and Darszon, A. (1997). Inositol triphosphate receptors in sea urchin sperm. *Zygote.* **5**, 355-364.

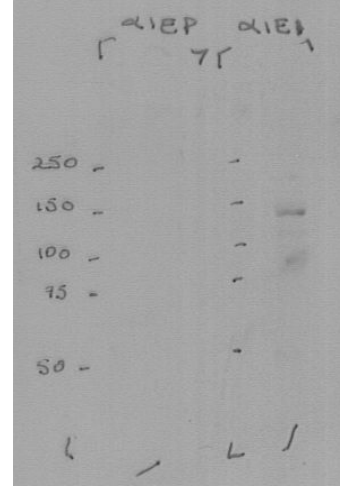
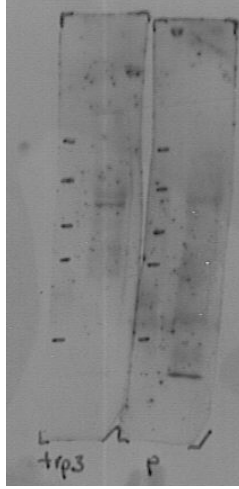
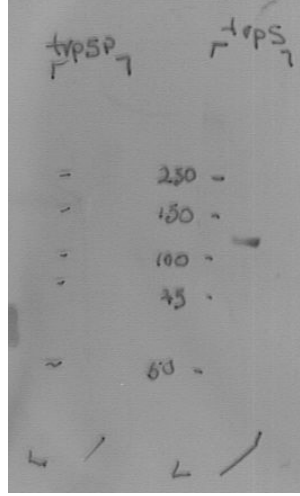
## **ANEXO I**

Coomassie

TRPC5

TRPC3

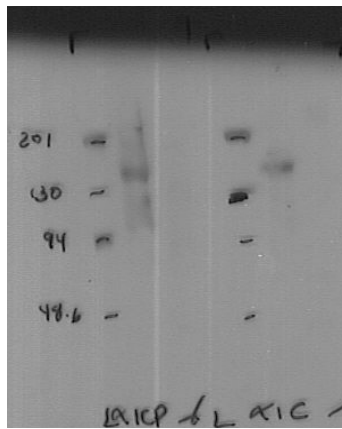
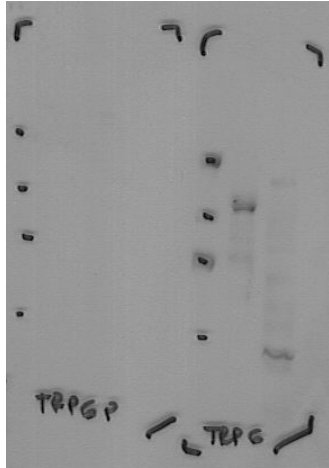
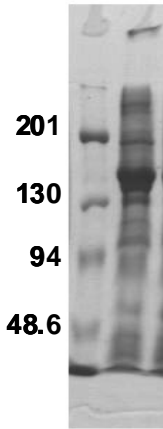
Cav2.3



Coomassie

TRPC6

Cav1.2





## **ANEXO II**

# Identification of voltage-dependent $\text{Ca}^{2+}$ channels in sea urchin sperm

G. Granados-Gonzalez<sup>a</sup>, I. Mendoza-Lujambio<sup>a,b</sup>, E. Rodriguez<sup>a,c</sup>,  
B.E. Galindo<sup>a</sup>, C. Beltrán<sup>a</sup>, A. Darszon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Institute of Biotechnology, UNAM, Avenida Universidad 2001, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Mor., Mexico

<sup>b</sup> National Medicine and Homeopathy School, IPN, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Institute of Cell Physiology, UNAM, Mexico City, Mexico

Received 15 September 2005; revised 17 October 2005; accepted 18 October 2005

Available online 2 November 2005

Edited by Maurice Montal

**Abstract** Functional evidence indicates that voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v$ ) channels participate in sea urchin sperm motility and the acrosome reaction (AR), however, their molecular identity remains unknown. We have identified transcripts for two  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits in sea urchin testis similar in sequence to  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.3$ . Antibodies against rat  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.3$  channels differentially label proteins in the flagella and acrosome of mature sea urchin sperm. The  $\text{Ca}_v$  channel antagonists nifedipine and nimodipine, which inhibit the AR, diminish the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevation induced by a  $\text{K}^+$ -induced depolarization in valinomycin-treated sperm. These findings reveal that  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.3$  channels could participate in motility and/or the AR in sea urchin sperm.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Speract; Calcium channels; Acrosome reaction; Motility

## 1. Introduction

Ionic flux regulates and controls sperm motility and the acrosome reaction (AR), two essential processes for fertilization in many species [1]. In sea urchins, the metabolic state and motility of sperm are modulated by small peptides called sperm-activating peptides (SAPs), which are released from the egg investments. These peptides facilitate gamete encounter and possibly the AR, acting in concert with other factors in the egg coat [2–4].

Speract, a 10 amino acid SAP from the egg jelly coat of *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* [5,6], elicits a series of ion permeability changes which include a fast decrease in intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) [7] followed by a transient increase that involves at least two  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems. The molecular identity of the transport mechanisms underlying these multi-phasic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes is unknown, but they possibly include voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$

( $\text{Ca}_v$ ) channels and  $\text{Ca}^{2+}$  transporters [7–12]. Furthermore, the AR, an exocytotic reaction necessary for sperm to fuse with the egg, is also dependent on regulated changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . During this reaction, the acrosome vesicle on the tip of the sea urchin sperm head fuses with the plasma membrane. The egg-coat component that induces the AR is a fucose sulfated glycoconjugate (FSG) [13]. Upon its binding to the sperm, FSG transiently opens a  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channel that is blocked by the  $\text{Ca}_v$  channel inhibitors verapamil and dihydropyridines [14]. Seconds later, a second channel, possibly a store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel insensitive to the latter blockers, activates and leads to vesicular fusion [15,16].

Because certain  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes triggered by speract [7,11] and FSG [16,17] are influenced by dihydropyridines and other  $\text{Ca}_v$  channel blockers, it has been proposed that  $\text{Ca}_v$  channels participate in these sperm processes. However, to date no  $\text{Ca}_v$  channel from sea urchin sperm has been unequivocally identified. Only two sea urchin sperm ion channels have been cloned and both are hyperpolarization and cyclic nucleotide gated channels, SpHCN1 [18] and SpHCN2 [19].

The major function of  $\text{Ca}_v$  channels is to convert membrane potential changes into intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals. The  $\text{Ca}_v$  channel permeation pathway is formed by its  $\alpha_1$  subunit, which is encoded by a family of at least 10 genes in mammals. Each  $\alpha_1$  subunit is composed of four repeated domains (I–IV), each containing six transmembrane alpha helices (S1–S6) surrounding a central pore [20,21].  $\text{Ca}_v$  channels fall into two major functional classes: high voltage-activated (HVA) and low voltage-activated (LVA) channels. HVA channels open following strong depolarizations and have been classified according to the biophysical and pharmacological characteristics of their currents into L-, N-, P/Q- and R-type. This class of channels is encoded by 7 members of the  $\alpha_1$  family:  $\text{Ca}_v1.1$  to 1.4 and  $\text{Ca}_v2.1$  to 2.3 [20,21]. The current through HVA channels may be modulated by alternative splicing of the  $\alpha_1$  subunit mRNA, by the presence of auxiliary subunits ( $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) and by post-translational modifications [20,22]. LVA  $\text{Ca}_v$  channels, also known as T-type, include  $\text{Ca}_v3.1$  to 3.3.

The known invertebrate  $\text{Ca}_v$  channels may be classified into similar  $\text{Ca}_v$  subclasses as in mammals, based on pharmacological sensitivities to organic and inorganic antagonists and channel kinetics [23]. Cloning of  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunits from various invertebrate species has helped to clarify the organization and evolution of metazoan  $\text{Ca}^{2+}$  channel genes [24].

The present report describes for the first time the presence of two  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits related to the mammalian HVA

\*Corresponding author. Fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon).

**Abbreviations:** ASW, artificial sea water;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , intracellular calcium concentration; AR, acrosome reaction;  $\text{Ca}_v$ , voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ ; SAP, sperm-activating peptide; HVA, high voltage-activated; LVA, low voltage-activated

Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>2.3 in sea urchin testes. These transcripts were detected by Northern blot and RT PCR. Mammalian antibodies to these two Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunits differentially recognized proteins along mature sea urchin sperm. Nifedipine and nimodipine, which influence motility and/or inhibit the AR, diminish the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase induced by a K<sup>+</sup>-induced depolarization in valinomycin-treated sperm, corroborating the presence of Ca<sub>v</sub> channels in these cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Gametes and reagents

*Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* sea urchins were obtained from Marinus (Long Beach, CA, USA) and from Pamanes Inc. (Ensenada, Baja California, Mexico). Spawning was induced by an intracoelomic injection of 0.5 M KCl. Dry sperm were collected and kept on ice until used. Artificial seawater (ASW) contained (mM): 450 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 26 MgCl<sub>2</sub>, 30 MgSO<sub>4</sub>, 2.5 NaHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES, 0.1 EDTA (pH 8.0, 950–1000 mOsm). Low Ca<sup>2+</sup> ASW pH 7.0 = ASW at pH 7.0 but with 1 mM instead of 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Nimodipine was from Tocris Cookson Inc. Nifedipine was from Sigma–Aldrich. 2-(2-(4-Nitrobenzyloxy) phenyl) isothiurea methanesulphonate (KB-R7943) was a gift from Dr. Vacquier (University of California, San Diego, CA, USA). Antibodies anti-Ca<sub>v</sub>2.1, 2.2, 2.3, 2.4; anti-Ca<sub>v</sub>1.2, 1.3; anti-Ca<sub>v</sub>3.1, 3.3 and anti-Pan were from Alomone Labs (Jerusalem Israel). Alexa 488, Alexa 594 and Fluor4-AM were from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). The rest of the reagents were of the highest quality available.

### 2.2. RT PCR experiments and cloning

RNA from *S. purpuratus* testes was extracted using TRIzol Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from total RNA by random hexamer-primer reverse transcription (Superscript II RNase H-Reverse transcriptase, Invitrogen). cDNA was then subjected to PCR amplification using Titanium Taq DNA Polymerase (Clontech). The primers used to amplify PCR fragments for the Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>2.3 (A1C forward: 5'-ATG CTG ACC GTG TTC CA-3', A1C reverse: 5'-ATC CTC CTC TAT CTG TTG CTT-3'; A1Eb forward: 5'-GCC CAG CAG ACA CCT AAC-3', A1Eb reverse: 5'-AAC ACG CAG TCA AAC ACG-3') were designed using as template those sequences from the sea urchin genome database (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/seaurchin/>) that aligned with rat Ca<sub>v</sub>1.2 and 2.3 sequences.

### 2.3. Sequence analysis

Amplified products were sequenced and blasted (tBLASTx) against the non-redundant GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in order to confirm their identity. The cDNA sequences were translated into the corresponding peptide sequences, and then analyzed by means of several computational bioinformatics tools: CLUSTALW in the BioEdit program was used for alignments; transmembrane regions and domains were predicted with SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) programs.

### 2.4. Phylogenetic analysis

Complete sequences from various organisms were used to generate a neighbor-joining phylogenetic tree (Fig. 2) of Ca<sub>v</sub> channels. Ca<sub>v</sub>3.1 from human was used as outgroup. The tree was made using the program MEGA3 [25] with 3000 replications and Poisson correction. GenBank Accession Nos. were: Q13698, human Ca<sub>v</sub>1.1; O57483, frog Ca<sub>v</sub>1.1; P22316, carp Ca<sub>v</sub>1.1; NP\_000710, human Ca<sub>v</sub>1.2; Q01815, mouse Ca<sub>v</sub>1.2; NP\_571975, zebrafish Ca<sub>v</sub>1.2; NP\_000711, human Ca<sub>v</sub>1.3; AAS20586, zebrafish Ca<sub>v</sub>1; P27732, rat Ca<sub>v</sub>1.3; NP\_005174, human Ca<sub>v</sub>1.4; NP\_062528, mouse Ca<sub>v</sub>1.4; NP\_000059, human Ca<sub>v</sub>2.1; NP\_037050, rat Ca<sub>v</sub>2.1; CAI11858, zebrafish Ca<sub>v</sub>2.1; NP\_000709, human Ca<sub>v</sub>2.2; NP\_671482, rat Ca<sub>v</sub>2.2; P56698, electric ray Ca<sub>v</sub>2.2; NP\_000712, human Ca<sub>v</sub>2.3; Q07652, rat Ca<sub>v</sub>2.3; P56699, electric ray Ca<sub>v</sub>2.3; AAD11470, coral; AAC63050, jelly fish; BAA13136 squid and BAA34927, ascidian. The Ca<sub>v</sub> channel cDNA

fragments access numbers are: DQ185022 for suCa<sub>v</sub>L and DQ185022 for suCa<sub>v</sub>NL. The predicted sea urchin Ca<sub>v</sub> sequences are: XP\_780220 for suCa<sub>v</sub>NL and XP\_783410 for suCa<sub>v</sub>L.

### 2.5. Immunolocalization

Sea urchin sperm were diluted (1:900) in ASW and the coelomocytes were removed. Sperm were bound onto glass slides coated with a bio-adhesive (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, USA) and allowed to settle for 60 min. Samples were immediately fixed with 4% paraformaldehyde in ASW pH 8.0 for 10 min, rinsed with PBS (3 times, 5 min), permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min, and blocked with 2% BSA for 1–2 h. Thereafter, samples were incubated overnight at 4 °C in a 1:50 dilution of primary antibodies and 2% BSA-PBS. After rinsing with PBS (3 times, 5 min), samples were incubated 1 h at RT with Alexa Fluor 594 or 488 goat anti-rabbit IgG, and rinsed again with PBS (3 times, 5 min) before they were examined with a confocal laser-scanning microscope (BioRad 600, Zeiss LSM 510 Meta). Control experiments were performed by pre-incubation of the primary antibodies with their respective antigenic peptides. Images shown are representative of at least three separate experiments under each condition.

### 2.6. Western immunoblotting

Sperm plasma membranes were isolated as in Garcia-Soto et al. [26]. They were dissolved in loading buffer and subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Ca<sub>v</sub> antibodies anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti-Ca<sub>v</sub>2.3 and anti-Pan were diluted 1:200. Control experiments were performed incubating the primary antibody with a fivefold excess of the antigenic peptide. Signals were detected with the ECL system (Amersham).

### 2.7. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measurements

Sperm population [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measurements were performed on a SLM 8000 Aminco spectrofluorometer with a temperature-controlled cell holder equipped with a magnetic stirrer, at 16 °C. Sea urchin sperm were loaded with Fluo-4 (excitation 505 nm and emission 525 nm) as previously reported [27]. 10  $\mu$ l of the sperm suspension were added to a round cuvette containing 1.6 ml ASW, pH 8.0 at 16 °C. The suspension was stirred constantly and left to equilibrate for 1 min before proceeding to the assay.

## 3. Results

### 3.1. Sequence analysis

Transcripts from both Ca<sub>v</sub> L-type and Ca<sub>v</sub> non-L-type could be amplified by RT PCR using *S. purpuratus* testes cDNA (Fig. 1A). The sequenced transcripts were blasted (tBLASTx) against the non-redundant database at NCBI and both have a high similarity with Ca<sub>v</sub> channels. One fragment, corresponding to Ca<sub>v</sub> L-type channels and named suCa<sub>v</sub>L, had the expected length (243 bp) and encodes a fragment of 81 amino acids (aa) that shows 78% identity with a 81 aa fragment (aa 354–434) from rat Ca<sub>v</sub>1.2 (NP\_058994) (Fig. 1B). The other non-L-type fragment, named suCa<sub>v</sub>NL, is 651 bp long and is shorter than the corresponding fragment in rat Cav2.3 (1580 bp), NP\_037050. However, the translated sequence has a high similarity with rat Ca<sub>v</sub>2.3 in two segments flanking the amplified region (similarity of 59% and 74%, respectively) (Fig. 1C). suCa<sub>v</sub>L shows the highest similarity (92%) with human Ca<sub>v</sub> L-type (A45290) and suCa<sub>v</sub>NL (57%) with Ca<sub>v</sub> non-L-type from snail AAO83841 (not shown).

Fragment suCa<sub>v</sub>L corresponds to the S6 of domain I from rat Ca<sub>v</sub>1.2 and fragment suCa<sub>v</sub>NL to the S1, S2 and S3 of domain II from rat Ca<sub>v</sub>2.3 (Fig. 1). With the use of the contigs from the sea urchin genome database, we predicted partial sequences for suCa<sub>v</sub>L and suCa<sub>v</sub>NL (data not shown). While the paper was in revision, the first annotation of the Sea Urchin Genome Project appeared at the NCBI site and we used our

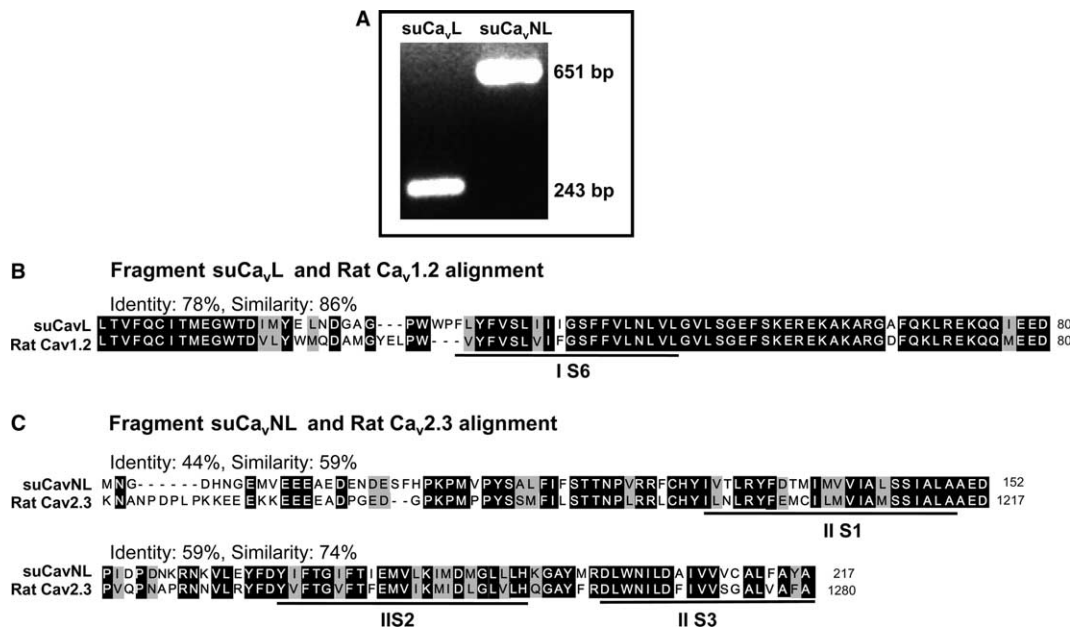


Fig. 1. suCa<sub>v</sub>L and suCa<sub>v</sub>NL are expressed in *S. purpuratus* sperm. (A) RT PCR using *S. purpuratus* testes cDNA. The amplified fragment for suCa<sub>v</sub>L is 243 bp long and the fragment for suCa<sub>v</sub>NL is 651 bp long. Their identity was confirmed by sequencing as L-type and non-L-type Ca<sub>v</sub> channels, respectively. (B) Alignment of suCa<sub>v</sub>L and rat Cav1.2, the transmembranal segment IS6 is underlined. This alignment gives a residue identity of 78%. (C) Alignment of suCa<sub>v</sub>NL and rat Ca<sub>v</sub>2.3, transmembrane regions IIS1, IIS2 and IIS3 are underlined. In this case, the amino acid sequence of suCa<sub>v</sub>NL aligns with the flanking regions of the intended region to be amplified; then, there are 352 residues in between. The sequence corresponding to the 5' flanking region (rat Ca<sub>v</sub>2.3, 1–778aa) is 44% identical and the 3' region (rat Ca<sub>v</sub>2.3, 1139–1280aa) has an identity of 59%. Black shaded amino acids are identical, grey shaded residues are similar according to matrix BLOSUM 62. Percentage of similarity and identity is shown for each alignment.

partial sequences to pull out the predicted sequences. This information will now make it easier to obtain the complete clones of these two channels in order to do functional assays by heterologous expression.

### 3.2. Phylogenetic analysis

The neighbor-joining phylogenetic tree originated with representative Ca<sub>v</sub> channel sequences (Fig. 2) shows that the suCa<sub>v</sub>L fragment falls into the L-type family and the suCa<sub>v</sub>NL is member of the non-L-type Ca<sub>v</sub> family. In addition, using the predicted sequences instead of the fragments, the topology of the tree remains identical (Fig. 2). These sea urchin Ca<sub>v</sub> channels do not belong to any of the groups already conformed by mammals, they seem to belong to different subgroups which diverged earlier than their mammal partners did.

### 3.3. suCa<sub>v</sub>s expression is detected in *S. purpuratus* testes

Northern blot analysis with total RNA from *S. purpuratus* testes from both suCa<sub>v</sub>s was performed. Two bands of around 7.0 and 3.2 Kb were obtained for suCa<sub>v</sub>L. The 7.0 Kb band is consistent with the length from most L-type Ca<sub>v</sub>s. With suCa<sub>v</sub>NL, we obtained three bands of around 6.0, 3.2 and 1.5 Kb; the 6.0 Kb band is consistent with the length from most non-L-type Ca<sub>v</sub>s (not shown).

### 3.4. Protein analysis of suCa<sub>v</sub>L and suCa<sub>v</sub>NL in *S. purpuratus* and *L. pictus* sperm

The high homology of suCa<sub>v</sub>L with rat L-type Ca<sub>v</sub>1.2 and suCa<sub>v</sub>NL with rat non-L-type Ca<sub>v</sub>2.3 encouraged us to test the commercially available rat antibodies against different Ca<sub>v</sub> channels, by immunolocalization and Western blot in sea urchin sperm. The set of antibodies included a general anti-

body that detects a domain present in all HVA Ca<sub>v</sub> channels (anti-Pan). Immunofluorescence was detected in sea urchin sperm flagella, acrosomes and mitochondria with anti-Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>2.3 and Pan antibodies (Fig. 3). Anti-Pan stained the base of the head where the mitochondrion is located, the acrosome (fluorescent dot) and the flagella with a weak and punctuated fluorescent pattern. Ca<sub>v</sub>1.2 staining was more pronounced and evenly distributed in the tail, and almost imperceptible in the tail-head connection. In contrast, Ca<sub>v</sub>2.3 displayed a very strong signal in the mitochondrial area and an intense fluorescent dot in the acrosome. Flagellar labelling with this antibody was sparse. The discrete staining patterns revealed by the different Ca<sub>v</sub> α1 subunit antibodies in sea urchin sperm suggest the expressed channels may be separately involved in different functions such as motility and the AR.

The antibodies employed were raised against rat Ca<sub>v</sub> channels. To test their specificity in sea urchin sperm we performed immunolocalization controls by incubating the antibodies with their corresponding antigenic peptide for anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti-Ca<sub>v</sub>2.3 and anti-Pan. Under these conditions none of the three antibodies gave a signal (not shown), confirming their specificity. Furthermore, antigenic peptides from Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.3, Ca<sub>v</sub>3.1 and TRPC6 could not block labelling by anti-Ca<sub>v</sub>1.2 or Ca<sub>v</sub>2.3 (except its corresponding peptide), thus, demonstrating the specificity of their inhibitory action. We then searched for the sequences of the corresponding antigenic peptides within the partial and the predicted sequences for suCa<sub>v</sub>L1 and suCa<sub>v</sub>NL1 we had found. The only antigenic peptide present in both suCa<sub>v</sub>s sequences was that of anti-Pan, which corroborates the presence of Ca<sub>v</sub> channels in sea urchin sperm. We cannot conclude that the other peptide sequences are absent, as the suCa<sub>v</sub> sequences are predicted but not confirmed and the cDNA sequences we found are still incomplete.

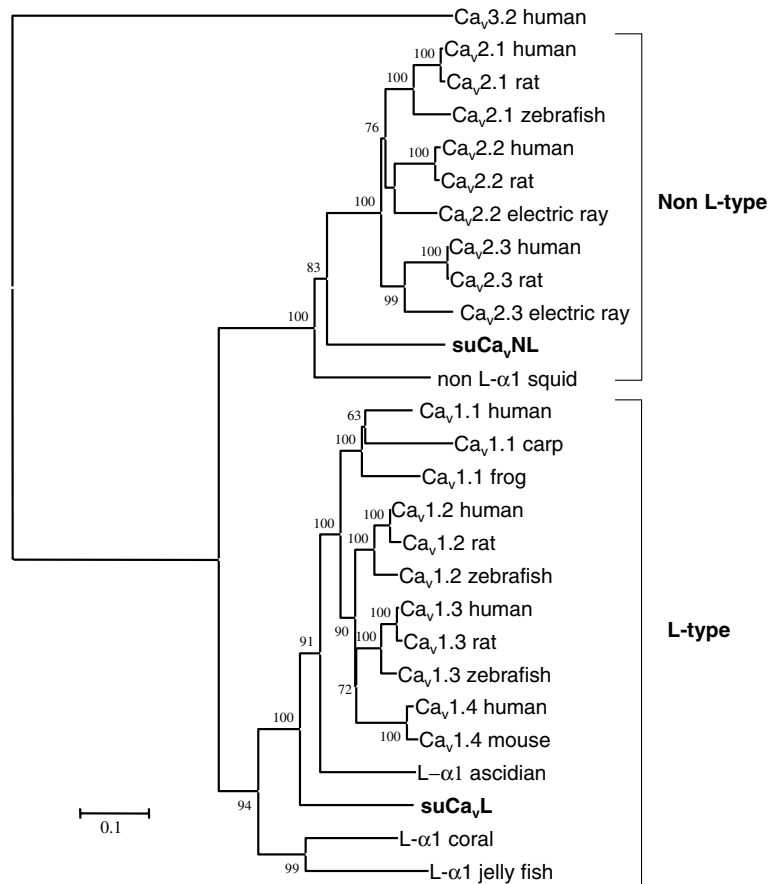


Fig. 2. Phylogenetic analysis of  $\text{Ca}_v^{2+}$  channel  $\alpha 1$  subunits. Neighbor-joining tree made with the alignment of 26 full length sequences from different species.  $\text{Ca}_v3.2$  from human was used as out group. The two sea urchin sequences are in bold. Numbers at interior nodes are bootstrap percentages from 3000 replications. Accession numbers for sequences are enlisted in Section 2.

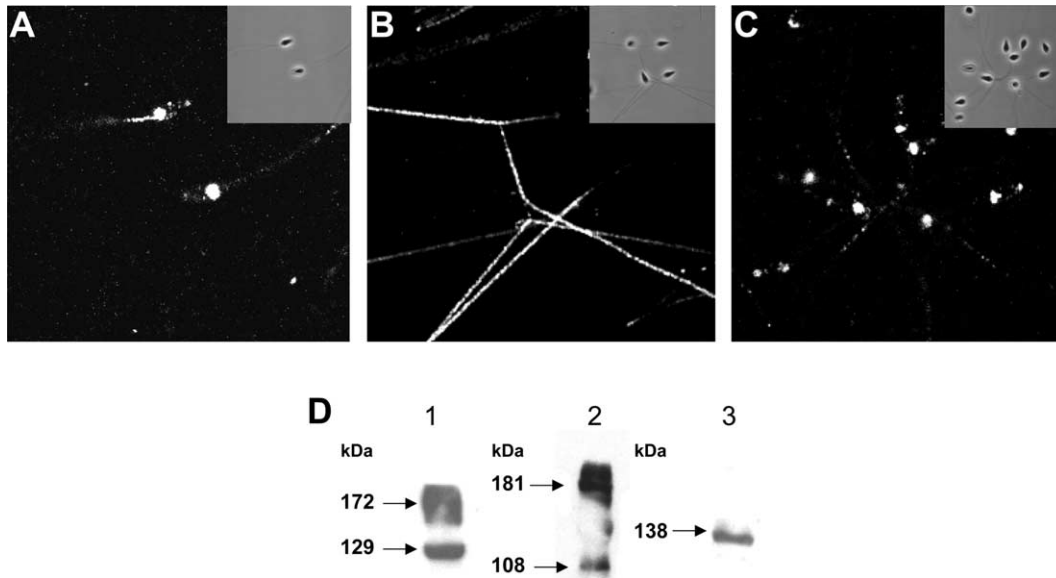


Fig. 3.  $\text{Ca}_v$  channels immunolocalization in sea urchin sperm. Representative confocal micrograph sperm stained with Pan (A),  $\text{Ca}_v 1.2$  (B) and  $\text{Ca}_v 2.3$  (C) specific antibodies showing the immunofluorescence localization of the proteins. Inset represents the corresponding phase contrast images. (D) Western blots demonstrating the expression of  $\text{Ca}_v$  proteins in sea urchin sperm, sperm flagellar membranes blotted with anti-Pan (1), anti- $\text{Ca}_v 1.2$  (2) and anti- $\text{Ca}_v 2.3$  (3) specific antibodies.



To further test the specificity of the  $\text{Ca}_v$  antibodies, Western blot analyses were performed with sea urchin flagellar membranes. The results are consistent with our immunofluorescence findings. All antibodies mentioned above (Section 2) were tested, but bands were only obtained with anti- $\text{Ca}_v1.2$ , anti- $\text{Ca}_v2.3$  and anti-Pan. Anti- $\text{Ca}_v1.2$  revealed two bands of approximately 181 and 108 kDa (Fig. 3D2). Anti- $\text{Ca}_v2.3$  stained one band of about 138 kDa (Fig. 3D3). Using anti-Pan, we observed two bands of 172 and 129 kDa (Fig. 3D1). All the bands detected, several of which are reported by the  $\text{Ca}_v$  antibody supplier, were completely blocked when the antibodies were incubated with their corresponding antigenic peptides (PEP). As before, the antigenic peptides from the other  $\text{Ca}_v$  channels could not compete with anti- $\text{Ca}_v1.2$  staining. It is worth noting that similar results (not shown) were obtained when the  $\text{Ca}_v$  antibodies were tested in *L. pictus* sperm.

### 3.5. $\text{Ca}_v$ channels are functionally present in sea urchin sperm

To investigate whether the  $\text{Ca}_v$  channels reported by the antibodies are functional in sea urchin sperm, we measured  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increases in sperm populations following depolarization in the presence and absence of dihydropyridines. These experiments were performed with *L. pictus* sperm, in which the  $\text{Ca}_v$  channel antibody staining patterns are very similar to those we report in *S. purpuratus* sperm (not shown). *L. pictus* sperm were hyperpolarized with 1  $\mu\text{M}$  valinomycin in

1 mM KCl ASW to remove  $\text{Ca}_v$  channel voltage-dependent inactivation [28]. Thereafter, the cells were depolarized by increasing external  $\text{K}^+$  to 20 mM. Fig. 4A illustrates the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by the  $\text{K}^+$  addition. Treatment with the  $\text{Ca}_v$  channel antagonists nifedipine (30  $\mu\text{M}$ ) or nimodipine (30  $\mu\text{M}$ ) inhibited 20–30% of the control  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. 20  $\mu\text{M}$  of KB-R7943, a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitor, did not affect  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Fig. 4B presents a summary of the results.

## 4. Discussion

Functional studies have implicated the participation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in sea urchin sperm physiology [1,16,17]. However, the identity of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in sea urchin sperm has not previously been established.  $\text{Ca}_v$  channel antagonists inhibit the AR induced by the egg investments and influence the sperm-induced changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , membrane potential and motility, indicating a relevant role for these channels in these important sperm functions [7,9,11,14,16,29,30]. Furthermore,  $\text{Ca}_v$  channel subunits are present in mature mammalian sperm [31–35] and in many invertebrate species [24].

The *S. purpuratus*  $\text{Ca}_v$  channels have the general structural characteristics of the members of the  $\text{Ca}_v$  channel superfamily. Even though the sequences of  $\text{suCa}_v\text{L}$  and  $\text{suCa}_v\text{NL}$  are partial, they contain a section of the domains I and II, respectively, and  $\text{suCa}_v\text{NL}$  has one of the conserved EEEE motif required for  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity of  $\text{Ca}_v$  channels [36]. It was thus not entirely unexpected that the antibodies against  $\text{Ca}_v$  channels generated from rat sequences could detect these proteins in the sea urchin sperm.

Consistent with the findings above described, we found in *S. purpuratus* testis one partial cDNA sequence for a  $\text{Ca}_v \alpha 1$  subunit ( $\text{suCa}_v\text{L}$ ) that shares homology with L-type channels, and another sequence that is similar to non-L-type  $\text{Ca}_v$  channels ( $\text{suCa}_v\text{NL}$ ).

Furthermore, using all the commercially available antibodies to mammalian  $\text{Ca}_v$  channels, we detected by immunocytochemistry as well as by Western blot, signals in sperm with anti- $\text{Ca}_v1.2$  and anti- $\text{Ca}_v2.3$ , and as anticipated with anti-Pan.  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.3$  have previously been detected in mouse [37] and human sperm [34].

Functional studies using  $\text{Ca}_v$  channels blockers in sea urchin sperm indicate that  $\text{Ca}_v$  channels participate in motility and/or the AR. Since the identified  $\text{Ca}_v$  channels  $\text{suCa}_v\text{L}$  and  $\text{suCa}_v\text{NL}$  are present in the sperm head and flagella of this species, we suggest that they may play an important role in motility and/or the AR.

**Acknowledgments:** We thank Xochitl Alvarado and Andres Saralegui for confocal imaging, Jorge Yáñez for DNA sequencing and Eugenio López for primer synthesis and Dr. Chris Wood for reading the manuscript. Supported by CONACyT and DGAPA-UNAM to G.G., A.D. and C.B. and FIRCA RO3 TW 00612 and the Wellcome Trust to A.D.

## References

- [1] Darszon, A., Beltran, C., Felix, R., Nishigaki, T. and Trevino, C.L. (2001) Ion transport in sperm signaling. *Dev. Biol.* 240, 1–14.
- [2] Morisawa, M. (1994) Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci.* 11, 647–662.

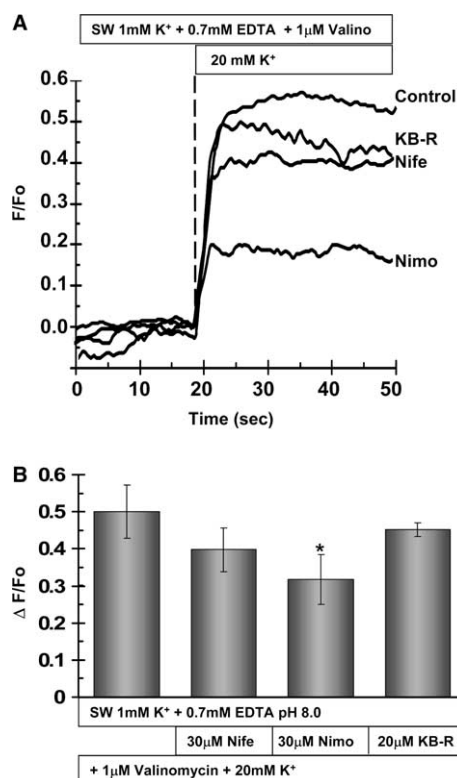


Fig. 4. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  experiments show the functional presence of  $\text{Ca}_v$  channels in sea urchin sperm. Sperm loaded with Fluo-4 (see Section 2) were suspended in SW 1 mM  $\text{K}^+$  0.7 mM EDTA plus 1  $\mu\text{M}$  valinomycin to hyperpolarize sperm and remove  $\text{Ca}_v$  channels inactivation.  $\text{Ca}^{2+}$  channel opening was evaluated by 20 mM  $\text{K}^+$  addition to depolarize membrane potential in presence of 30  $\mu\text{M}$  Nifedipine, 30  $\mu\text{M}$  nimodipine and 20  $\mu\text{M}$  KB-R7943 (A). The bars represent the means  $\pm$  S.E.M. of the increase in  $F/F_0$ . The difference between nimodipine and control were significant (\*  $P < 0.05$ ) ( $n = 7$ ) (B).

- [3] Miller, R.L. and Vogt, R. (1996) An N-terminal partial sequence of the 13 kDa *Pycnopodia helianthoides* sperm chemoattractant 'startrak' possesses sperm-attracting activity. *J. Exp. Biol.* 199, 311–318.
- [4] Vacquier, V.D. and Moy, G.W. (1997) The fucose sulfate polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 192, 125–135.
- [5] Hansbrough, J.R. and Garbers, D.L. (1981) Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256, 1447–1452.
- [6] Suzuki, N. (1995) Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool. Sci.* 12, 13–27.
- [7] Nishigaki, T. et al. (2004) A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  before its increase. *Dev. Biol.* 272, 376–388.
- [8] Cook, S.P. and Babcock, D.F. (1993) Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  permeability by cAMP is coordinated through the pH<sub>i</sub> increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* 268, 22408–22413.
- [9] Reynaud, E., De de La Torre, L., Zapata, O., Lievano, A. and Darszon, A. (1993) Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Lett.* 329, 210–214.
- [10] Kaupp, U.B. et al. (2003) The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat. Cell Biol.* 5, 109–117.
- [11] Wood, C.D., Darszon, A. and Whitaker, M. (2003) Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J. Cell. Biol.* 161, 89–101.
- [12] Solzin, J., Helbig, A., Van, Q., Brown, J.E., Hildebrand, E., Weyand, I. and Kaupp, U.B. (2004) Revisiting the role of  $\text{H}^{+}$  in chemotactic signaling of sperm. *J. Gen. Physiol.* 124, 115–124.
- [13] Vacquier, V.D. (1998) Evolution of gamete recognition proteins. *Science* 281, 1995–1998.
- [14] Schackmann, R.W., Eddy, E.M. and Shapiro, B.M. (1978) The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirements and movements. *Dev. Biol.* 65, 483–495.
- [15] Gonzalez-Martinez, M.T., Galindo, B.E., de De La Torre, L., Zapata, O., Rodriguez, E., Florman, H.M. and Darszon, A. (2001) A sustained increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 236, 220–229.
- [16] Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Trevino, C.L., Felix, R. and Beltran, C. (2005) Calcium channels and  $\text{Ca}^{2+}$  fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243, 79–172.
- [17] Schackmann, R.W. (1989) in: *The Cell Biology of Fertilization* (Schatte, H. and Schatten, G., Eds.), pp. 3–28, Academic Press, San Diego.
- [18] Gauss, R., Seifert, R. and Kaupp, U.B. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583–587.
- [19] Galindo, B.E., Neill, A.T. and Vacquier, V.D. (2005) A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 96–101.
- [20] Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.
- [21] Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P. and Perez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 579–581.
- [22] Arikath, J. and Campbell, K.P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 298–307.
- [23] Okamura, Y., Izumi-Nakaseko, H., Nakajo, K., Ohtsuka, Y. and Ebihara, T. (2003) The ascidian dihydropyridine-resistant calcium channel as the prototype of chordate L-type calcium channel. *Neurosignals* 12, 142–158.
- [24] Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M. and Anderson, P.A. (2000) The molecular biology of invertebrate voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Exp. Biol.* 203, 841–856.
- [25] Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150–163.
- [26] Garcia-Soto, J., Mourelle, M., Vargas, I., de De la Torre, L., Ramirez, E., Lopez-Colome, A.M. and Darszon, A. (1988) Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 944, 1–12.
- [27] Rodriguez, E. and Darszon, A. (2003) Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *J. Physiol.* 546, 89–100.
- [28] González-Martínez, M., Guerrero, M., Morales, E., de De La Torre, L. and Darszon, A. (1992) A depolarization can trigger  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in *L. pictus* sperm. *Dev. Biol.* 150, 193–202.
- [29] Garcia-Soto, J. and Darszon, A. (1985) High pH-induced acrosome reaction and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in sea urchin sperm suspended in  $\text{Na}^{+}$ -free seawater. *Dev. Biol.* 110, 338–345.
- [30] Wood, C.D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S.A. and Darszon, A. (2005) Real-time analysis of the role of  $\text{Ca}^{2+}$  in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J. Cell. Biol.* 169, 725–731.
- [31] Goodwin, L.O., Leeds, N.B., Hurley, I., Cooper, G.W., Pergolizzi, R.G. and Benoff, S. (1998) Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 215–226.
- [32] Westenbroek, R.E. and Babcock, D.F. (1999) Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev. Biol.* 207, 457–469.
- [33] Serrano, C.J., Trevino, C.L., Felix, R. and Darszon, A. (1999) Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett.* 462, 171–176.
- [34] Park, J.Y., Ahn, H.J., Gu, J.G., Lee, K.H., Kim, J.S., Kang, H.W. and Lee, J.H. (2003) Molecular identification of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in human sperm. *Exp. Mol. Med.* 35, 285–292.
- [35] Trevino, C.L. et al. (2004) Expression and differential cell distribution of low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 563, 87–92.
- [36] Heinemann, S.H., Schlieff, T., Mori, Y. and Imoto, K. (1994) Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2781–2802.
- [37] Wennemuth, G., Westenbroek, R.E., Xu, T., Hille, B. and Babcock, D.F. (2000)  $\text{CaV}2.2$  and  $\text{CaV}2.3$  (N- and R-type)  $\text{Ca}^{2+}$  channels in depolarization-evoked entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* 275, 21210–21217.