



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Relación espacio-temporal entre los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  y el pH intracelular inducidos por un regulador de la movilidad en el espermatozoide de erizo de mar**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**Doctor en Ciencias**

PRESENTA

**M. en C. Ana Laura González Cota**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Alberto Darszon Israel**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Arturo Hernández Cruz**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Dr. Christopher Wood**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alberto Darszon Israel, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con apoyo de las becas: CONACyT 128566 para el grupo de investigación y CONACyT 169872 y CB-1012/177138, y PAPIIT IN112514 e IN204112-3 para estudios de doctorado.

“... one can always enjoy life,  
with a small microscope and a few sea urchins.”

Jean Brachet

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alberto Darszon por permitirme realizar mis estudios de doctorado en su laboratorio, por su apoyo y su guía durante la realización de este proyecto y por su compromiso con mi formación académica.

A los miembros del consorcio de fisiología del espermatozoide, especialmente a la Dra. Carmen Beltrán, Dra. Claudia Treviño, Dr. Takuya Nishigaki y Dr. Ignacio López, gracias por ser un apoyo, por estar siempre dispuestos a ayudar y a intercambiar ideas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Arturo Hernández y al Dr. Christopher Wood por sus sugerencias, buenos consejos y por su apoyo durante todo el proceso. Un agradecimiento especial al Dr. Armando Gómez Puyou q.e.p.d, que lamentablemente no logró ver concluido el trabajo, por motivarme en cada reunión tutorial y estimular mi creatividad.

A los revisores de esta tesis: Dr. Luis Vaca Domínguez, Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, Dr. Enrique Salas Vidal, Dr. Luis Cárdenas Torres y Dr. Gustavo Martínez Mekler por sus observaciones, comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Al PAEP por los apoyos otorgados durante mis estudios de doctorado.

Al CONACyT por la beca para realizar mis estudios de doctorado.

A José Luis de la Vega por su apoyo técnico en el laboratorio.

A Leonel Linares por su apoyo con los trámites administrativos y a Juan Monroy y Antonio Blancas por su ayuda con el cuidado de los acuarios.

A Jalil Saab, Gloria Villa y Antonio Bolaños de la Unidad de Docencia por su apoyo con todos los trámites escolares.

A Gerardo Orta y a Carmen Santana, por su amistad y por motivarme a seguir adelante en los momentos difíciles. Gracias por su apoyo incondicional.

Con mucho cariño para mis papás,  
quienes siempre me han motivado y apoyado  
y son mi ejemplo a seguir.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIACIONES.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. 1. La fecundación en el erizo de mar. ....	5
1. 2. El espermatozoide de erizo de mar.....	7
1. 3. El pH y el Ca <sup>2+</sup> intracelular en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar. 8	
1. 3. 1 El pH intracelular y la activación del nado. ....	8
1. 3. 2 El Ca <sup>2+</sup> y el nado quimiotáctico. ....	11
1. 4. La vía de señalización del speract. ....	14
1. 4. 1 Cambios iónicos.....	14
1. 4. 2 Posibles vías de entrada de Ca <sup>2+</sup> en la respuesta al speract. ....	16
1. 4. 3 Los cambios de pHi en la respuesta al speract y su relación con los cambios en el Ca <sup>2+</sup> . ....	18
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3. 1. Objetivo general .....	21
3. 2. Objetivos particulares.....	21
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
4. 1. Obtención de los espermatozoides de erizo de mar .....	22
4. 2. Composición del agua de mar artificial.....	22
4. 3. Cargado de las células con los colorantes fluorescentes.....	22
4. 4. Adquisición de imágenes de fluorescencia.....	23
4. 5. Procesamiento de las imágenes y análisis.....	24
4. 6. Análisis estadístico .....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
5. 1. Caracterización de la respuesta de pHi inducida por el speract en célula única.....	26
5. 1. 1. El cambio de pHi inducido por el speract ocurre en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide. ....	26

5. 1. 2. El incremento de pHi inducido por el speract en la cabeza y el flagelo se inhibe por alto $K^+$ externo.....	27
5. 1. 3. El incremento de pHi inducido por el speract depende de la dosis. ....	29
5. 1. 4. El incremento de pHi inducido por el speract es independiente de $Ca^{2+}$ externo. ....	30
5. 1. 5. Cinética del incremento de pHi en respuesta al speract. ....	31
5. 2. Relación espacio-temporal entre el incremento de pHi y de $Ca^{2+}$ . ....	32
5. 2. 1. En espermatozoides individuales la alcalinización inducida por el speract precede al incremento de $Ca^{2+}$ . ....	32
5. 2. 2. La alcalinización inducida por $NH_4Cl$ provoca la entrada de $Ca^{2+}$ en el espermatozoide de erizo de mar.....	35
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
6. 1. El pH en la fisiología del espermatozoide .....	38
6. 2. Los cambios de pHi en el espermatozoide de erizo de mar en respuesta al speract.....	39
6. 3. Participación de CatSper, el canal de $Ca^{2+}$ dependiente de pHi, en la respuesta al speract. ....	44
6. 4. El pHi como nuevo elemento regulador para la generación de las oscilaciones de $Ca^{2+}$ en la respuesta al speract. ....	48
6. 5. Otros efectos de los cambios de pHi en la respuesta al speract .....	50
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>66</b>
Artículos publicados.....	66
Capítulo de libro .....	86



## RESUMEN

La fecundación es un proceso que requiere de la comunicación finamente coordinada entre el espermatozoide y el óvulo de una misma especie. En el erizo de mar, los péptidos derivados de la capa externa del óvulo, como el speract, coordinan la comunicación entre los gametos, en la cual los flujos iónicos tienen un papel fundamental. En particular, el speract induce una serie de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo que modula el batido flagelar y en consecuencia dirige el nado del espermatozoide hacia el óvulo. Estas oscilaciones son el resultado de la activación de una vía de señalización en la que ocurren cambios como: el incremento en el GMPc, la hiperpolarización de la membrana plasmática por la salida de  $\text{K}^+$ , la alcalinización del medio interno, el incremento de AMPc, la entrada de  $\text{Na}^+$  con la subsecuente despolarización de la membrana, y el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la manera precisa en la que estos elementos se coordinan para la generación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo del espermatozoide. En particular la identidad de los canales que median los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la función del pH interno (pHi) en la cascada del speract siguen en controversia. La relación de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  con los cambios de pHi podría ser clave en la regulación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y en el nado quimiotáctico, ya que recientemente se reportó que CatSper, un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de pHi, exclusivo de los espermatozoides y que en mamífero es esencial para la fecundación, se localiza en el genoma del erizo de mar y las proteínas que forman el canal se localizan en el flagelo de esta célula.

Por tanto, en el presente trabajo, utilizando colorantes fluorescentes, se estudió por primera vez la distribución espacio-temporal de los cambios de pHi inducidos por el speract a nivel de espermatozoides individuales. Se exploró la relación temporal con los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , en particular con los que ocurren en el flagelo, que es donde se localizan los elementos moleculares que participan en la vía del speract. Con esta estrategia encontramos que el speract causa un

incremento de  $pH_i$ , en la cabeza y en el flagelo, que es independiente de  $Ca^{2+}$  externo. Además, el incremento de  $pH_i$  precede al incremento de  $Ca^{2+}$  en el flagelo y en la cabeza, en la respuesta al speract. Confirmamos el resultado anterior activando la vía de señalización utilizando GMPc fotoactivable. Finalmente, encontramos que la alcalinización inducida con  $NH_4Cl$ , causa un incremento de  $Ca^{2+}$ , sin retraso, primero en el flagelo y después en la cabeza, lo que sugiere que hay un canal de  $Ca^{2+}$  regulado por  $pH_i$  en el flagelo. En conjunto nuestros resultados sugieren que en la respuesta al speract hay un aumento de  $Ca^{2+}$  regulado por el incremento de  $pH_i$ . Por lo que el  $pH_i$  podría contribuir a la regulación de la movilidad a través de la modulación de los cambios en el  $Ca^{2+}$  en la respuesta al speract.

## ABREVIACIONES

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	Concentración de calcio citosólica
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	Concentración de calcio externa
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>m</sub>	Concentración de calcio mitocondrial
AMA 0CaN	Agua de mar artificial cero Ca <sup>2+</sup> nominal
ADP	Adenosín difosfato
AMA	Agua de mar artificial
AMAbCa	Agua de mar artificial bajo Ca <sup>2+</sup> y bajo pH
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
CaCC	Canal de Cl <sup>-</sup> regulado por Ca <sup>2+</sup>
CaKC	Canal de K <sup>+</sup> regulado por Ca <sup>2+</sup>
Ca <sub>v</sub> s	Canales de calcio dependientes de voltaje
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CPT-I	Carnitina palmitoil transferasa - I
GC	Guanilato ciclasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
mCU	Uniportador de calcio mitocondrial
MM	Matriz mitocondrial
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NCKX	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> dependiente de K <sup>+</sup>
NCX	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
p-Lys	Poli-L-lisina
pHi	pH intracelular
RA	Reacción acrosomal

ROI	Región de interés
sAC	Adenilato ciclasa soluble
SAPs	Péptidos activadores del espermatozoide
sNHE	Intercambiador sodio protón del espermatozoide
S.E.M.	Error estándar del promedio
spHCN	Canal del espermatozoide activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos
Sp-AK	Adenilato cinasa del espermatozoide de erizo de mar
Sp-CK	Creatina cinasa del espermatozoide de erizo de mar
tetraKCNG	Canal de $K^+$ dependiente de nucleótidos cíclicos

# 1. INTRODUCCIÓN

La fecundación es el proceso por el cual los gametos, femenino y masculino (óvulo y espermatozoide), se fusionan para generar un nuevo individuo. Esta es indispensable para la perpetuación de las especies con reproducción sexual. Es un proceso complejo que depende de la comunicación altamente coordinada entre los gametos, en el cual el espermatozoide tiene un papel más dinámico que el óvulo, ya que parte de su función consiste en localizar y nadar hacia el óvulo para fecundarlo. Como parte de este proceso, el espermatozoide tiene que experimentar ciertos cambios fisiológicos que lo preparan para llegar y fusionarse con el óvulo, los más generales son: 1) la activación del nado; 2) la modulación del nado en respuesta a señales del óvulo y/o del ambiente; y 3) la reacción acrosomal (RA), proceso imprescindible para la fusión del espermatozoide con el óvulo en especies con acrosoma.

El estudio de estos procesos es importante debido a que el entender los mecanismos moleculares que los regulan nos puede llevar a comprender las causas de la infertilidad masculina y posiblemente a desarrollar tratamientos. También mejoraría nuestras posibilidades de preservar especies en vías de extinción mejorando las herramientas para lograr la reproducción asistida. Finalmente, la información derivada de estos estudios posiblemente permitiría identificar blancos potenciales para el desarrollo de fármacos anticonceptivos.

## 1. 1. La fecundación en el erizo de mar.

Desde que se descubriera en el siglo XIX, en el erizo de mar, que la fecundación implica el nado del espermatozoide hacia el óvulo y la subsiguiente fusión de sus núcleos (Briggs & Wessel 2006), los organismos marinos de fecundación externa, en particular el erizo de mar (figura 1-1), se han utilizado como modelo de estudio para la fecundación. De ahí que, procesos conservados en la mayoría de las especies como la activación del nado y la RA se hayan descubierto en estos organismos (Gray 1928; Dan 1952). La gran ventaja de trabajar con el erizo

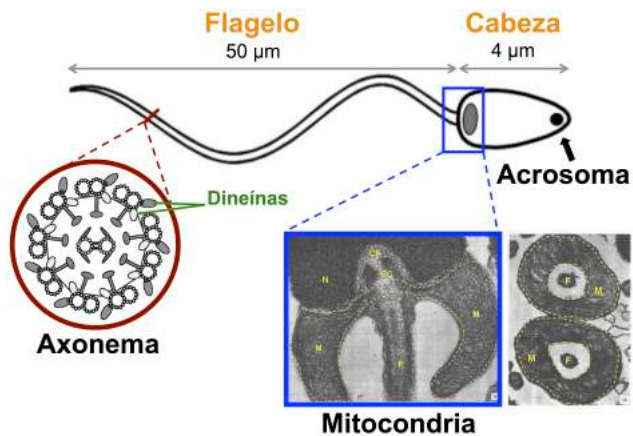
de mar es que al ser de fecundación externa, las condiciones en las que se lleva a cabo su fecundación se pueden reproducir y manipular fácilmente en el laboratorio. Además, cada erizo libera millones de gametos, alrededor de  $10^{12}$  en el caso de los machos y alrededor de  $10^7$  en el caso de las hembras, lo cual aporta material suficiente para casi cualquier tipo de estudio experimental (Trimmer & Vacquier 1986). En la actualidad, el erizo de mar sigue siendo un modelo importante ya que su genoma está completamente secuenciado (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006), lo que facilita los estudios bioquímicos, de biología molecular y bioinformáticos. Debido a que el erizo de mar comparte con los mamíferos un conjunto de proteínas que regulan el batido flagelar y que no poseen otros vertebrados como aves, anfibios y la mayoría de los peces (Cai & Clapham 2008; Romero, datos no publicados), este se ha vuelto un modelo importante para comprender el sistema de regulación de la movilidad del espermatozoide de mamífero. Además, es de las pocas especies en las que se ha descrito con detalle el nado quimiotáctico del espermatozoide en respuesta a señales del óvulo (Guerrero et al. 2010a; Ward et al. 1985). Lo anterior ha facilitado estudiar los mecanismos moleculares que regulan el batido flagelar y por ende, el nado dirigido del espermatozoide que es fundamental para la fecundación en animales marinos. Algunos de estos mecanismos son generales por lo que ayudan a mejorar nuestra comprensión del movimiento de flagelos y cilios en general (Inaba 2003; Gibbons 1981; Satir & Christensen 2007; Inaba 2015).



**Figura 1-1. Erizos de mar de la especie *Strongylocentrotus purpuratus*.**

## 1. 2. El espermatozoide de erizo de mar.

El espermatozoide es una célula terminal, altamente diferenciada y especializada para cumplir con su única función, la fecundación. En su proceso de diferenciación o espermatogénesis, el espermatozoide se compacta, eliminando todo lo no indispensable para su función (reduce su citosol, se deshace del sistema de endomembranas y del aparato de síntesis de proteínas), condensa su núcleo compactando el material genético y se forma el flagelo y el acrosoma, adquiriendo su morfología particular (Longo & Anderson 1969) (figura 1-2).



**Figura 1-2. Esquema simplificado del espermatozoide de erizo de mar.** En la parte de arriba se muestran las partes principales de su estructura. El flagelo y la cabeza, en la que se localiza el acrosoma (representado en negro) y la única mitocondria (en gris). En la parte de abajo se muestra la estructura básica del axonema (Inaba 2007) y una micrografía electrónica (Longo & Anderson 1969) que muestra una sección de la cabeza en la que se puede distinguir el núcleo (N), la mitocondria (M) y el nacimiento del flagelo (F).

La morfología del espermatozoide tiene un papel clave para que la fecundación se lleve a cabo de manera exitosa. El flagelo es la región del espermatozoide especializada en el movimiento, cuya función es imprescindible para la fecundación. En humano y ratón está demostrado que mutaciones que impiden el correcto batido del flagelo y por ende la movilidad causan infertilidad (Khelifa et al. 2014; Ren et al. 2001; Avenarius et al. 2009; Esposito et al. 2004; Schuh et al. 2004). El flagelo está formado por el axonema, que consiste en un arreglo de nueve pares de microtúbulos alrededor de un par central (Afzelius 1959; Inaba 2003) (figura 1-2). En este se localizan las dineínas, proteínas motoras del flagelo, que al hidrolizar ATP (por su función ATPasa) permiten generar el batido flagelar (Brokaw 1967; Gibbons & Fronk 1972; Gibbons 1981; Inaba 2003; Mohri & Ogawa 1975). La cabeza es la región inmóvil de la célula que contiene los organelos

y materiales que necesita la célula para sobrevivir y para cumplir con su función. En ella se localiza: en la parte apical, la vesícula acrosomal o acrosoma, que es importante para la fusión espermatozoide-óvulo; en la parte central, el material genético haploide dentro del núcleo; y en la base, la mitocondria, que es solo una en el espermatozoide de erizo de mar (Longo & Anderson 1969) (figura 1-2), y debido a que no hay glucólisis (Mita & Nakamura 1998) es su única fuente de ATP (Hansbrough & Garbers 1981; Christen et al. 1983). La síntesis de ATP mitocondrial es de vital importancia en la fisiología del espermatozoide, principalmente debido a que es el sustrato que utilizan las dineínas para generar el batido flagelar, del cual depende el nado y en consecuencia la fecundación.

Como se mencionó anteriormente, para que ocurra la fecundación el espermatozoide debe de identificar, localizar y nadar hacia el óvulo. Por tanto, la comunicación coordinada entre los gametos es primordial, particularmente entre las especies de fecundación externa que liberan sus gametos y se reproducen en un medio tan extenso como el océano. En su trayecto, la movilidad del espermatozoide está regulada por una serie de señales tanto del medio externo como del óvulo. Por tanto, además de nadar, el espermatozoide es capaz de detectar, interpretar y responder a estas señales. En general, estas señales se codifican como cambios en la permeabilidad iónica, entre los cuales los cambios en el pH y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tienen un papel fundamental en la fisiología del espermatozoide y en el proceso de fecundación.

### **1. 3. El pH y el $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar.**

#### **1. 3. 1 El pH intracelular y la activación del nado.**

El pH intracelular (pHi) es una propiedad particular del ambiente interno de cada célula. Este depende de la actividad de  $\text{H}^+$  libres en el citosol y afecta el estado de ionización de los ácidos y bases débiles presentes en péptidos, proteínas y biomoléculas intracelulares. Por tanto, el pHi influye prácticamente en todos los



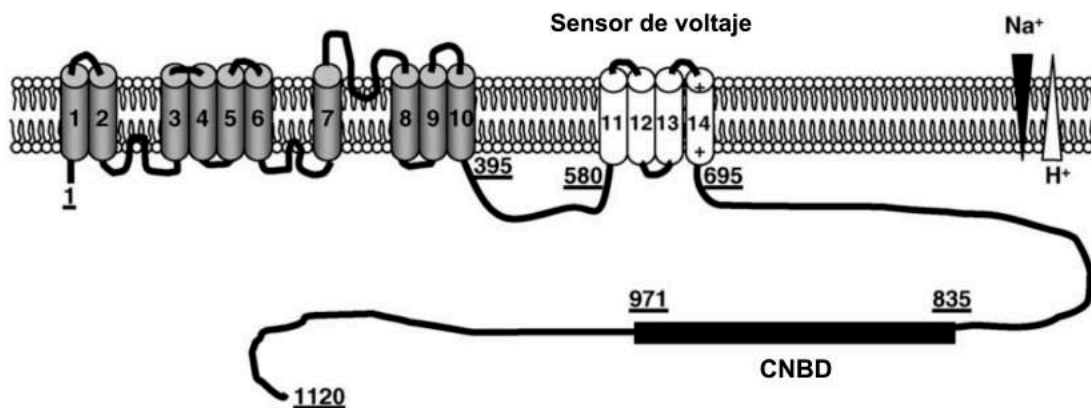
procesos celulares como en el metabolismo, el potencial de membrana, el crecimiento celular, el movimiento de sustancias a través de la membrana celular, el estado de polimerización del citoesqueleto y la habilidad para la contracción en las células musculares (Putnam 2011).

Debido a que la regulación del pHi es crítica para la supervivencia de la célula, estas conservan mecanismos altamente regulados para su control, entre los que se incluyen amortiguadores y sistemas de transporte que permiten el movimiento de ácidos y bases a través de las membranas, y que, en general, mantienen el pHi entre 6.8 y 7.2 en estado de reposo (Putnam 2011; Boron 2004). Aunque el pHi se mantiene constante la mayor parte del tiempo, cambios transitorios en el pHi pueden regular funciones fisiológicas específicas de manera clave en la señalización celular. En particular, en el espermatozoide del erizo de mar, el pHi es esencial para la regulación de las funciones básicas como el nado, la respiración y la síntesis de ATP (Nishigaki et al. 2014a).

Dentro de las gónadas, los espermatozoides se encuentran inmóviles, debido a la alta presión de CO<sub>2</sub> (Johnson et al. 1983). Una vez que los espermatozoides se liberan al mar (pH 8.0) (Johnson et al. 1983), se diluyen y esta tensión se disipa y se estimula la salida de H<sup>+</sup>, lo que en consecuencia eleva el pHi entre 0.4 y 0.5 unidades (Lee et al. 1983) llevando el pHi de 7.2 a 7.6 (Johnson et al. 1983). Este incremento de pHi estimula la actividad de las dineínas del axonema, las cuales son más activas a pH alcalino (7.5–8.0) (Christen et al. 1983; Shapiro & Tombes 1985). El incremento en la actividad de las dineínas estimula el batido flagelar y por tanto el nado del espermatozoide, en un proceso dependiente de pHi. La activación de las dineínas también tiene como consecuencia un aumento en el consumo de ATP y el incremento en los niveles de ADP, lo que cambia la relación ATP/ADP tras la activación del nado. Este cambio es la señal que estimula la síntesis de ATP activando la ATP sintasa mitocondrial y algunas hidrolasas del ciclo de Krebs, estimulando en consecuencia la respiración mitocondrial (Berg et al. 2002). Debido

a que en el espermatozoide de erizo de mar la mitocondria es la única fuente de ATP y las dineínas son las principales consumidoras, la movilidad y la respiración están estrechamente relacionadas y reguladas por el pHi (Christen et al. 1982; Shapiro & Tombes 1985).

Por otra parte, cambios artificiales en la composición iónica del agua de mar como la ausencia de Na<sup>+</sup> externo, pH externo (pHe) ácido (5.0) y alto K<sup>+</sup> externo (200 mM, que despolariza la membrana plasmática), acidifican el pHi del espermatozoide de erizo (Christen et al. 1982) e inhiben su movilidad. Adicionalmente, la aplicación de NH<sub>4</sub>Cl, que alcaliniza el medio interno, estimula la movilidad del espermatozoide aún en las condiciones anteriores (Lee et al. 1983), lo que establece la relación directa entre pHi y movilidad del espermatozoide. La dependencia de Na<sup>+</sup>, pHe y la inhibición por alto K<sup>+</sup> externo, sugieren la participación del intercambiador sodio protón del espermatozoide (sNHE por sus siglas en inglés), en este proceso. Este intercambiador se localiza en la membrana del flagelo (Lee 1984b), es un transportador exclusivo del espermatozoide (Wang et al. 2003) y tiene la particularidad de ser sensible a los cambios en el potencial de membrana (Lee 1984a) (figura 1-3).



**Figura 1-3. Modelo de la topología de membrana del sNHE.** En el amino terminal, marcadas en gris, se muestran las diez hélices transmembranales con homología a la familia de transportadores NHE. Adicionalmente, este intercambiador posee cuatro hélices transmembranales (en blanco) con homología al dominio sensor de voltaje de los canales dependientes de voltaje, el símbolo "+" en el segmento 14 indica la localización de las cargas positivas del sensor de voltaje. En el lado citosólico contiene un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD por sus siglas en inglés). Los números indican la posición de los aminoácidos de la secuencia primaria del sNHE de ratón. Figura modificada de Quill et al. 2006.

Para finalizar, es importante resaltar que, aunque es bien conocido el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero universal y como regulador de distintos procesos celulares, en estos procesos particulares, como el inicio de la movilidad y la estimulación de la respiración mitocondrial en el inicio de la movilidad en el espermatozoide de erizo de mar, el  $\text{Ca}^{2+}$  no participa (Hansbrough & Garbers 1981; Christen et al. 1982; Christen et al. 1983; Lee et al. 1983) y parecen estar regulados principalmente por los cambios en el pHi.

### **1. 3. 2 El $\text{Ca}^{2+}$ y el nado quimiotáctico.**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero universal para la señalización intracelular. Al unirse a las proteínas, cambia la estructura y la carga modificando su función, regulando diversos procesos celulares y funciones fisiológicas entre los que se encuentran la contracción y secreción, la proliferación celular, la fecundación, el desarrollo, y el aprendizaje y memoria, por citar algunos ejemplos. La eficiencia de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  reside en la capacidad que tiene la célula para mantener un gradiente de concentración de más de 20 mil veces entre el espacio citosólico (~ 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre) y el extracelular (~ 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la mayoría de los organismos, 10 mM en el agua de mar), lo cual genera la fuerza impulsora para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula. Esta diferencia de concentración se logra por la actividad de bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas que envían el  $\text{Ca}^{2+}$  fuera del citosol (hacia el espacio extracelular o hacia el interior de algunos organelos, como el retículo endoplásmico) o por la actividad de transportadores localizados en la membrana plasmática como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX, por sus siglas en inglés) que aprovechan el gradiente de  $\text{Na}^+$  para movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$ . El gradiente generado permite que una vez que se activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ingresar de manera muy rápida. El  $\text{Ca}^{2+}$  puede señalar distintos procesos en una misma célula debido en parte a la regionalización de los canales que permiten el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol y a la combinación de la actividad de distintos mecanismos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su salida, los cuales en

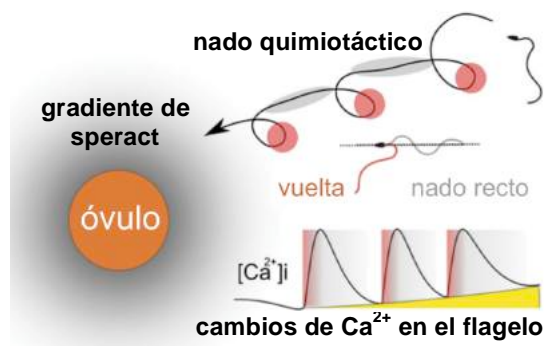
conjunto y con la participación de otros canales pueden modular de manera distinta la frecuencia de la señal, su amplitud y su localización (Clapham 2007; Berridge et al. 2000; Rizzuto & Pozzan 2006).

En general, en una célula existen distintos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , modulados por diversos factores incluyendo voltaje (canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje o  $\text{Ca}_v$ s), operados por pozas internas (SOCs), o multimodales como los de la familia TRP que regulan su actividad por distintos factores tanto físicos (como cambios de temperatura, y presión) como químicos (ligandos externos e internos), por mencionar algunos ejemplos. La combinación de grupos de ellos y/o su expresión específica en ciertos tipos celulares es lo que permite la versatilidad de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Clapham 2007; Berridge et al. 2000; Rizzuto & Pozzan 2006).

Una célula tan especializada como el espermatozoide también cuenta con un juego de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  importantes para su función, entre los que se encuentran los  $\text{Ca}_v$ s, TRPs, y CatSper, un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por pH que es exclusivo del espermatozoide y esencial para la fecundación en mamífero. Además existen otras entidades moleculares involucradas en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , como las bombas ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  y transportadores como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{K}^+$  (NCKX por sus siglas en inglés) y posiblemente el NCX (Darszon et al. 2011; Darszon et al. 2006). En el espermatozoide de erizo de mar el  $\text{Ca}^{2+}$  es crítico para la comunicación espermatozoide-óvulo. De particular relevancia son las oscilaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurren en el flagelo y que modulan el nado del espermatozoide en respuesta a los péptidos quimioatrayentes del óvulo, a los cuales se les conoce en general como péptidos activadores del espermatozoide (SAPs por sus siglas en inglés) (Suzuki 1995), como el speract (Darszon et al. 2008; Wood et al. 2007; Guerrero et al. 2010a; Guerrero et al. 2010b).

El speract es un decapeptido aislado de la capa externa del óvulo del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough & Garbers 1981), que regula la movilidad del espermatozoide y lo guía hacia el óvulo a través de cambios

bioquímicos y de permeabilidad iónica que incluyen cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Estos cambios finamente orquestados controlan la respuesta quimiotáctica del espermatozoide (Darszon et al. 2008; Guerrero et al. 2010b). El speract, induce una entrada de  $Ca^{2+}$  que se puede separar en dos componentes, un incremento de  $Ca^{2+}$  sostenido y una serie de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  que se originan en el flagelo del espermatozoide y que están superpuestas en el incremento sostenido (Wood et al. 2003). Las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  inducen cambios en la asimetría del flagelo que modulan directamente el batido flagelar causando cambios en la curvatura de la trayectoria del nado del espermatozoide (Wood et al. 2005; Wood et al. 2007; Guerrero et al. 2010a) (figura 1-4).



**Figura 1-4. Esquema simplificado del nado quimiotáctico.** El speract provoca oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en el flagelo (abajo) que modulan la forma del nado del espermatozoide (arriba). Los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  (rojo) están relacionados con vueltas pronunciadas del espermatozoide, mientras que la disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$  (gris) se relaciona con los periodos de nado recto. La combinación de vueltas pronunciadas con periodos de nado recto es lo que finalmente dirige al espermatozoide hacia el óvulo cuando nada en un gradiente de speract (representado como un degradado en gris alrededor del óvulo, izquierda). Figura modificada de Guerrero et al. 2010b.

La tasa de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  está relacionada con una mayor asimetría del flagelo (Cook et al. 1994; Wood et al. 2005; Wood et al. 2007; Alvarez et al. 2012), lo que provoca que el espermatozoide, que normalmente nada en círculos dé una vuelta más pronunciada redirigiendo su nado hacia la fuente de speract, es decir hacia donde se localiza el óvulo (figura 1-4). Mientras que, cuando disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$  del flagelo, el espermatozoide entra en un periodo de nado recto (figura 1-4). La combinación alternada de periodos de nado recto con vueltas pronunciadas es lo que dirige al espermatozoide hacia el óvulo (Guerrero et al. 2010a; Böhmer et al. 2005). Como el speract es un péptido difusible, se establece un gradiente de concentración alrededor del óvulo. Por tanto, cada vez que el espermatozoide da

una vuelta pronunciada se enfrenta nuevamente a una concentración más alta de speract que hace que se repita el ciclo de estimulación, generando con cada ciclo una nueva oscilación de  $Ca^{2+}$  (Guerrero et al. 2010b) (Figura 1-4).

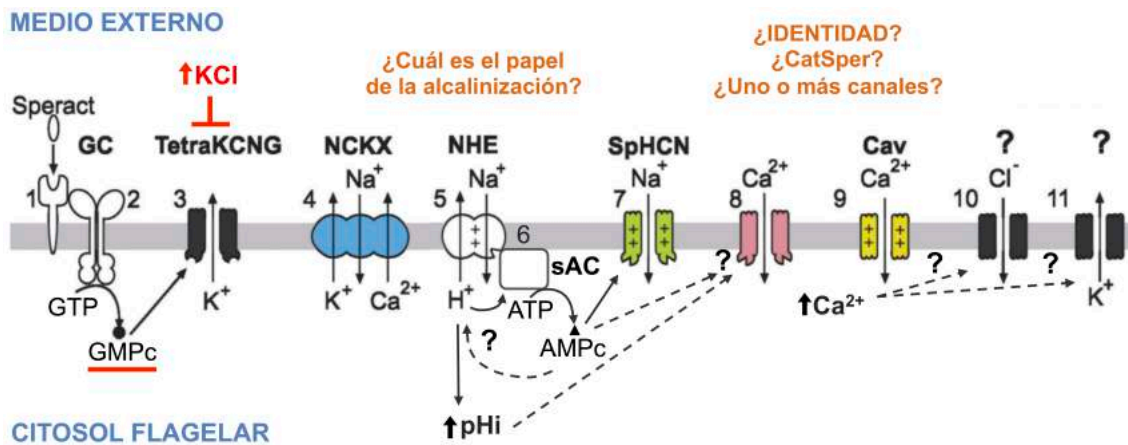
El perfil de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en la respuesta al speract es el resultado de la activación de una vía de señalización compleja, que ocurre principalmente en el flagelo del espermatozoide y en la que los cambios en la permeabilidad iónica tienen un papel fundamental (Darszon et al. 2008) (figura 1-5). Esta vía está conservada en distintas especies de espermatozoides que responden a SAPs especie-específicos, y por tanto se pueden comparar los cambios generales inducidos por el péptido resact en la especie de erizo de mar *A. punctulata*, con los observados en las especies de *S. purpuratus* y *L. pictus* en respuesta a speract (Darszon et al. 2008; Kaupp et al. 2003). La mayoría de la información en relación a los elementos que participan en la vía de señalización y los datos iniciales sobre el tema provienen de estudios realizados con la especie *S. purpuratus*, la cual utilizamos en el presente trabajo.

#### **1. 4. La vía de señalización del speract.**

##### **1. 4. 1 Cambios iónicos.**

Una vez que el speract se une a su receptor, que se localiza de manera exclusiva en el flagelo (Cardullo et al. 1994), este estimula la actividad de una guanilato ciclasa asociada al receptor, lo cual incrementa la síntesis de GMPc (Hansbrough & Garbers 1981). El GMPc activa directamente a un canal selectivo a  $K^+$  modulado por nucleótidos cíclicos (tetraKCNG) (Strünker et al. 2006; Galindo et al. 2007), provocando una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Babcock et al. 1992; Lee & Garbers 1986). Se piensa que la hiperpolarización activa al sNHE que en consecuencia alcaliniza el medio interno (Lee & Garbers 1986; Hansbrough & Garbers 1981) y que esta alcalinización estimula la actividad de una adenilato ciclasa soluble (sAC, por sus siglas en inglés) (Nomura et al. 2005), lo cual incrementa los niveles de AMPc (Hansbrough &

Garbers 1981). La hiperpolarización además activaría a un intercambiador NCKX (Su & Vacquier 2002) que provoca un descenso transitorio en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nishigaki et al. 2004) y a un canal de  $\text{Na}^+$  sensible a AMPc, el spHCN que despolariza la membrana plasmática del espermatozoide (Gauss et al. 1998). Finalmente ocurre un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que depende de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Schackmann & Chock 1986). Se ha propuesto que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  podría estimular la apertura de un canal de  $\text{Cl}^-$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) y/o un canal de  $\text{K}^+$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaKC), los cuales hiperpolarizarían nuevamente la membrana plasmática contribuyendo a que se repita el ciclo de la cascada de señalización (Wood et al. 2007; Espinal et al. 2011; Espinal-Enríquez et al. 2014).



**Figura 1-5. Cascada de señalización del speract.** 1) El speract (óvalo blanco) se une a su receptor localizado en la membrana del flagelo (barra gris). 2) Se estimula la síntesis de GMPc a través de la activación de una guanilato ciclasa (GC). 3) El incremento en GMPc activa al tetraKCNG, que provoca la salida de  $\text{K}^+$  causando una hiperpolarización de la membrana. 4 y 5) La hiperpolarización activa al intercambiador NCKX y al NHE que causa una alcalinización. 6) Posteriormente se activa la adenilato ciclasa soluble (sAC) que está regulada por pHi. 7) El cambio en el potencial y el incremento en AMPc activan al SpHCN que promueve la entrada de  $\text{Na}^+$  causando una despolarización de la membrana. 8 y 9) Finalmente ocurre una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, probablemente a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ s), y/o a través de CatSper, el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  específico del espermatozoide que es sensible a pHi, y/o a través de una vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que depende de AMPc. 10 y 11) Se ha propuesto que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  podría estimular la apertura de un canal de  $\text{Cl}^-$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) y/o uno de  $\text{K}^+$  regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaKC), los cuales contribuirían a la hiperpolarización de la membrana, permitiendo el reinicio del ciclo de la cascada de señalización. Se piensa que con cada ciclo de la cascada se genera una oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo. La identidad molecular de la vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su regulación aún se desconoce. Una concentración alta de  $\text{K}^+$  externo inhibe todos los pasos de la vía a excepción del incremento de GMPc. Figura modificada de Darszon et al. 2008.

En la figura 1-5, se muestra el modelo propuesto para la vía de señalización del speract (Darszon et al. 2008). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el mecanismo exacto que modula las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo. En particular se desconoce la función del cambio de  $\text{pHi}$  y si tiene una relación con los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$ , y las entidades moleculares que median los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta al speract y su regulación precisa siguen siendo un misterio.

#### **1. 4. 2 Posibles vías de entrada de $\text{Ca}^{2+}$ en la respuesta al speract.**

**Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.** Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje o  $\text{Ca}_v$ s son una familia de canales sensibles a los cambios en el potencial de membrana. Estos se abren en respuesta a una despolarización permitiendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula. Ensayos inmunocitoquímicos (Granados-Gonzalez et al. 2005) y farmacológicos (Wood et al. 2003), sugieren que algunos canales de la familia de los  $\text{Ca}_v$ s se expresan de manera funcional en el espermatozoide de erizo de mar. Por una parte, se han localizado transcritos de estos canales en los testículos de erizo de mar, y algunas proteínas que forman el poro de estos canales se han localizado específicamente en el flagelo de los espermatozoides mediante ensayos inmunocitoquímicos (Granados-Gonzalez et al. 2005). Adicionalmente, el  $\text{Ni}^{2+}$  y la nimodipina, inhibidores de estos canales, eliminan de manera específica las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por el speract en el flagelo dejando intacto el incremento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wood et al. 2003). Por lo que se ha sugerido que los  $\text{Ca}_v$ s tienen un papel fundamental en la regulación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de erizo de mar. Se ha propuesto que la despolarización inducida por la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del spHCN podría activar a  $\text{Ca}_v$ s presentes en el flagelo, y que posiblemente la hiperpolarización previa remueve su inactivación (Darszon et al. 2008) (figura 1-5). Sin embargo, la participación de los  $\text{Ca}_v$ s se ha puesto en duda debido a que no se ha logrado registrar la actividad de estos canales en espermatozoides maduros de ninguna especie. Por otra parte, los ensayos farmacológicos sugieren que además de los



Ca<sub>v</sub>s un segundo tipo de canales de Ca<sup>2+</sup>, no identificado hasta la fecha, participa en la regulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> sostenido en la respuesta al speract.

**Entrada de Ca<sup>2+</sup> dependiente de AMPc.** Evidencia farmacológica indica que el incremento en los niveles de AMPc induce una entrada de Ca<sup>2+</sup> en el espermatozoide de erizo de mar. Por una parte, experimentos en población de espermatozoides, es decir, en suspensión, muestran que la fotoactivación de AMPc permeable induce un incremento de Ca<sup>2+</sup> sostenido (Nishigaki et al. 2004). De manera complementaria, la papaverina, un inhibidor de las fosfodiesterasas que provoca la acumulación de AMPc, también induce un incremento de Ca<sup>2+</sup> sostenido en células en población (Cook & Babcock 1993). En este último trabajo, también se encontró que una alcalinización inducida con NH<sub>4</sub>Cl induce un incremento de Ca<sup>2+</sup> que se amplifica en presencia de la papaverina. Lo cual se podría explicar por la participación de la sAC dependiente de pH (Nomura et al. 2005). En otras palabras, en ese trabajo se propuso que el incremento de pHi en la respuesta al speract estimulaba la actividad de una AC (que podría ser la sAC) incrementando el AMPc y que este estimulaba, por un mecanismo desconocido hasta la fecha, la entrada de Ca<sup>2+</sup>. Por tanto, en este trabajo se proponía que el incremento de Ca<sup>2+</sup> estaba regulado de manera indirecta por el incremento de pHi a través del incremento del AMPc. Sin embargo, en la actualidad algunas de estas observaciones se podrían explicar por la participación de CatSper, el canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de pH y exclusivo de los espermatozoides, que en aquel entonces era desconocido.

**CatSper.** CatSper es un canal de Ca<sup>2+</sup> moderadamente dependiente de voltaje y altamente dependiente de pHi, que se activa por alcalinización (Kirichok et al. 2006), es exclusivo del espermatozoide (Ren et al. 2001) y esencial para fertilidad en mamíferos, ya que organismos deficientes en este canal son infértiles debido a problemas en la movilidad de los espermatozoides (Ren et al. 2001; Smith et al. 2013; Nishigaki et al. 2014b). Este canal se encuentra en el genoma de *S. purpuratus* (Cai & Clapham 2008), y recientemente se demostró su expresión y

localización específica, por ensayos inmunocitoquímicos, en el flagelo de los espermatozoides de *A. punctulata* (Seifert et al. 2015), una especie de erizo de mar con una cascada análoga a la del speract inducida por el péptido resact. Por tanto, si consideramos que en la cascada del speract ocurre un incremento de pHi, existe la posibilidad de que CatSper medie la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto sólo puede ocurrir siempre y cuando se cumpla con las siguientes condiciones: 1) el incremento de pHi inducido por el speract debe ser independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula; 2) el incremento de pHi debe anteceder al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la cascada del speract; y 3) una alcalinización debe inducir un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$ . En espermatozoides en población el incremento de pHi en la respuesta al speract es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Reynaud et al. 1993) y la alcalinización inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (García-Soto & Darszon 1985; Guerrero & Darszon 1989; Cook & Babcock 1993). Observaciones que apoyan nuestra propuesta. Sin embargo, la secuencia de los cambios de pHi y de  $\text{Ca}^{2+}$  era un tema controvertido y existían datos contradictorios. Además, nunca se habían hecho mediciones de los cambios de pHi a nivel de espermatozoides individuales. Por lo que, al momento del inicio de este estudio, era difícil establecer la relación entre los cambios de pHi y los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  en los flagelos y la posible participación de CatSper en la cascada del speract. Considerando lo anterior, se volvía imprescindible establecer el orden de estos elementos en la cascada a nivel de células individuales, en particular en el flagelo, para entender el papel del pHi en la regulación de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta al speract.

#### **1. 4. 3 Los cambios de pHi en la respuesta al speract y su relación con los cambios en el $\text{Ca}^{2+}$ .**

Se ha propuesto que la alcalinización inducida en la cascada del speract está mediada por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dependiente de voltaje del espermatozoide (sNHE por sus siglas en inglés) (figura 1-3), y que este se activa tras la hiperpolarización causada por el speract (Lee & Garbers 1986). Al igual que el

receptor del speract (Cardullo et al. 1994), que el tetraKCNG (Galindo et al. 2007; Bonigk et al. 2009), y que CatSper (Seifert et al. 2015), el sNHE se localiza en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar (Lee 1984b; Lee 1984a). Lo que sugiere que el cambio de pHi inducido por el speract podría tener un papel muy importante en la modulación del nado del espermatozoide, posiblemente a través de la regulación de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cascada del speract.

Vale la pena resaltar que cuando se comenzó con el presente trabajo, no se había descrito el perfil de los cambios de pHi en espermatozoides individuales. Por tanto, se desconocía la relación entre los cambios de pHi y de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo. Sólo existían datos poblacionales provenientes de experimentos con espermatozoides en suspensión, los cuales eran contradictorios. En consecuencia, la función de la alcalinización en la cascada del speract no era clara. Por una parte, distintos trabajos de nuestro laboratorio sugerían que el cambio de pHi podría estar modulando los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Se había reportado una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de pHi en células en población (García-Soto & Darszon 1985) y medidas rápidas con espermatozoides de *S. purpuratus* en población mostraban que en un amplio rango de concentraciones de speract (pM a nM) el incremento de pHi precedía al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nishigaki et al. 2001; Nishigaki et al. 2004).

Por otra parte, otro grupo de investigación, con experimentos similares a los reportados por nuestro laboratorio, cuestionaba estos datos mostrando que para espermatozoides de *A. punctulata* y de *S. purpuratus* los péptidos (resact y speract, respectivamente) inducían primero un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  y posteriormente un incremento de pHi (Solzin et al. 2004). Además, en ese trabajo se cuestionaba la participación del sNHE y la importancia de la hiperpolarización en el incremento de pHi. Finalmente, concluían que el cambio de pHi era irrelevante para la quimiotaxis.

El trabajo antes mencionado causó una gran controversia en el campo de investigación. Por tanto, era necesario hacer una nueva investigación para aclarar el mecanismo de acción de los péptidos. Además, ahora se sabe que aunque los experimentos en población nos proporcionan información general de lo que está

pasando en la célula completa, tienen la desventaja de mostrar principalmente los cambios que ocurren en la cabeza de los espermatozoides (Wood et al. 2003). Por lo que en este punto, era indispensable investigar los cambios iónicos inducidos por el speract a nivel de célula única y tratar de establecer su relación temporal en el flagelo del espermatozoide, ya que es en esta región en donde a través de la cascada del speract se regula el nado.

La información de los cambios de  $pH_i$  en el flagelo es imprescindible para tratar de entender si el  $pH_i$  influye en el nado del espermatozoide y cuál es su papel en la cascada del speract. En este sentido, también se volvía importante determinar si la alcalinización podría estar modulando los flujos de  $Ca^{2+}$  que ocurren en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar en la vía de señalización del speract, ya que para comprender la respuesta quimiotáctica es necesario entender cómo ocurre la modulación de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en el flagelo que son las que finalmente controlan el nado del espermatozoide.

Por los motivos anteriormente expuestos, en este trabajo, estudiamos los cambios de  $pH_i$  inducidos por el speract a nivel de célula única y tratamos de establecer su relación temporal con los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , en particular en el flagelo del espermatozoide del erizo de mar.

## **2. HIPÓTESIS**

El incremento de pHi precede y modula los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que ocurren en el flagelo en la respuesta al speract en el espermatozoide de erizo de mar.

## **3. OBJETIVOS**

### **3. 1. Objetivo general**

Caracterizar el incremento de pHi en espermatozoides individuales de erizo de mar y establecer la relación espacio-temporal entre los incrementos en el pHi y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por el speract.

### **3. 2. Objetivos particulares**

- 1) Caracterizar espacial y temporalmente los cambios de pHi inducidos por el speract en espermatozoides individuales de erizo de mar.
- 2) Estudiar la correlación temporal entre los cambios de pHi y de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por el speract en las distintas regiones del espermatozoide de erizo de mar.
- 3) Determinar si el cambio en el pHi regula al menos a uno de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que elevan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al speract.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4. 1. Obtención de los espermatozoides de erizo de mar**

Se utilizaron erizos de mar de la especie *S. purpuratus* (Pamanes Inc., Ensenada, B.C., México). Los espermatozoides se obtuvieron por inyección intracelómica de 0.5 – 1 mL de KCl 0.5 M, se colectaron con una pipeta pasteur de vidrio o una micropipeta con puntas cortadas para evitar dañar a las células, se colocaron dentro un tubo eppendorf y se almacenaron en hielo hasta su uso dentro de las primeras 24 h después de su extracción.

### **4. 2. Composición del agua de mar artificial**

Los experimentos se realizaron en agua de mar artificial (AMA) (mM): NaCl 486, 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 y EDTA 0.1, pH 7.8; AMA alto K<sup>+</sup>: AMA con KCl 60 mM; o AMA cero Ca<sup>2+</sup> nominal (AMA 0CaN): AMA con EGTA 1mM y CaCl<sub>2</sub> 1.36 mM para obtener una [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> libre de 350 nM. En los pies de figura, en la sección de Resultados, se indica el tipo de AMA que se utilizó para cada experimento. En la mayoría de los experimentos se utilizó AMA, a menos que se indique otra cosa. Para cargar, diluir y resuspender las células después del lavado se utilizó AMA con bajo Ca<sup>2+</sup> y bajo pH (AMAbCa): AMA con CaCl<sub>2</sub> 1 mM y pH 7.0.

### **4. 3. Cargado de las células con los colorantes fluorescentes**

Los espermatozoides se cargaron con los colorantes fluorescentes permeables fluo-4-AM (20 µM) y BCECF-AM (20 µM) para medir los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y el pH<sub>i</sub>, respectivamente. Se utilizó un tiempo de cargado de 2.5 h a 14°C. Para los experimentos con GMPc fotoactivable, el Bhc-GMPc/Ac (GMPc fotoactivable permeable) (50 µM) se añadió a las células en proceso de cargado con los colorantes fluorescentes después de la primera hora de incubación y se incubaron por 1.5 h más. Después del cargado, las células se lavaron para remover

el exceso de colorante y finalmente se resuspendieron en el volumen de cargado justo antes de iniciar el experimento. Se utilizó AMAbCa.

#### **4. 4. Adquisición de imágenes de fluorescencia**

Todos los experimentos se realizaron con espermatozoides inmovilizados, completamente adheridos a un cubreobjetos que formaba la base de la cámara de registro. Esta estrategia nos permitió seguir los cambios de fluorescencia de cada espermatozoide en el campo de registro, en la misma región celular (cabezas y flagelos), a través del tiempo, de manera sencilla, en toda la serie de imágenes, tal como está reportado para este tipo de células (Wood et al. 2003). Para adherir los espermatozoides primero se colocó una gota de poli-L-lysina (p-Lys) 0.1% en el centro del cubreobjetos, se incubó por un tiempo mínimo de 5 min y un máximo de 4 h en una cámara húmeda, después se armó la cámara de registro y se lavó el exceso de p-Lys. Posteriormente se colocaron 10  $\mu$ l de espermatozoides cargados y diluídos 1:25 ó 1:50 en AMAbCa, se dejaron sedimentar y adherir por 30 s. Las células no adheridas se retiraron lavando con el AMA de registro utilizada en cada experimento. Para los registros de  $Ca^{2+}$  y pHi en paralelo, los espermatozoides se cargaron por separado con su respectivo colorante, una vez cargadas las células se mezclaron y posteriormente se adhirieron a los cubreobjetos. La temperatura en las cámaras de registro se mantuvo a 14 °C utilizando una micro-incubadora PMDI-2 (Harvard Apparatus) colocada en la platina del microscopio. El sistema de adquisición de imágenes se configuró de acuerdo con el descrito previamente (Nishigaki et al. 2006) y estaba formado por un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon Instruments) equipado con un objetivo Plan Apo 60x de inmersión en aceite 1.4 N.A. (Nikon), una cámara EMCCD iXon888 Ultra (Andor) para colectar las imágenes, un LED cyan (Lumileds Lighting) como fuente de iluminación estroboscópica y un juego de filtros Ex: D485/25x, DC: 505DCXRU, Em: HQ510LP (Chroma) para ambos fluoróforos. Las series de imágenes se capturaron utilizando el programa Andor iQ 1.8 (Andor), con una velocidad de adquisición de 20, 30 ó 40

ips (imágenes por segundo), según se indica en cada figura, y un tiempo de exposición de 2 ms. El speract, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y la ionomicina se adicionaron manualmente con una micropipeta. El GMPc se fotoactivó con un flash de luz UV proveniente de una lámpara JML-C2 (Rapp Opto Electronic) conectada al puerto lateral del microscopio a través de una guía de luz líquida de 2 mm y 0.47 N.A. controlada por medio del programa Andor iQ 1.8 (Nishigaki et al. 2004).

#### **4. 5. Procesamiento de las imágenes y análisis**

Para analizar los cambios de fluorescencia se seleccionaron regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) en las cabezas y flagelos de espermatozoides individuales y en el fondo de cada imagen utilizando el programa imageJ (Rasband, W.S. 1997–2014). Con este mismo programa se obtuvieron los valores de fluorescencia promedio por cada ROI en cada imagen. Posteriormente los datos se analizaron utilizando el software R v 3.1.0 (R Core Team 2014). Primero se restó el valor del fondo de cada imagen en cada ROI. Como en nuestras condiciones de registro la fluorescencia del BCECF decae de manera exponencial debido al fotoblanqueo se hizo una corrección. Para esto, los primeros datos del registro previos al estímulo (fluorescencia basal ó  $F_0$ ) en cada ROI se ajustaron con una función exponencial, el ajuste se extrapolo a todo el tiempo de registro (resto de los datos de la misma ROI) y posteriormente se le restó a todos los datos experimentales incluyendo  $F_0$  ( $F$ ) de esa misma ROI. Este procedimiento se hizo de manera individual en cada ROI. Posteriormente, se restó el valor promedio de fluorescencia que se obtuvo tras la adición del vehículo (AMA), para compensar el artefacto de adición. Finalmente, los datos corregidos se presentan como  $\Delta F$  Normalizado. Debido a que la relación señal-ruido con el BCECF es baja los datos se filtraron con un filtro digital de promedio móvil (MA por sus siglas en inglés) con una ventana de 5 puntos para reducir el ruido. Aunque el fluo-4 no presenta estos problemas se aplicó el mismo tratamiento a los datos obtenidos con este colorante con el fin de comparar los datos obtenidos con ambos colorantes. Posteriormente,



para facilitar la comparación entre distintas ROI de distintos experimentos, los datos se normalizaron con respecto al valor máximo de pHi (obtenido tras la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM, para las células cargadas con BCECF) o de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (obtenido tras la adición de ionomicina 5  $\mu\text{M}$ , para las células cargadas con fluo-4). Finalmente se calcularon los parámetros que se indican en cada figura.

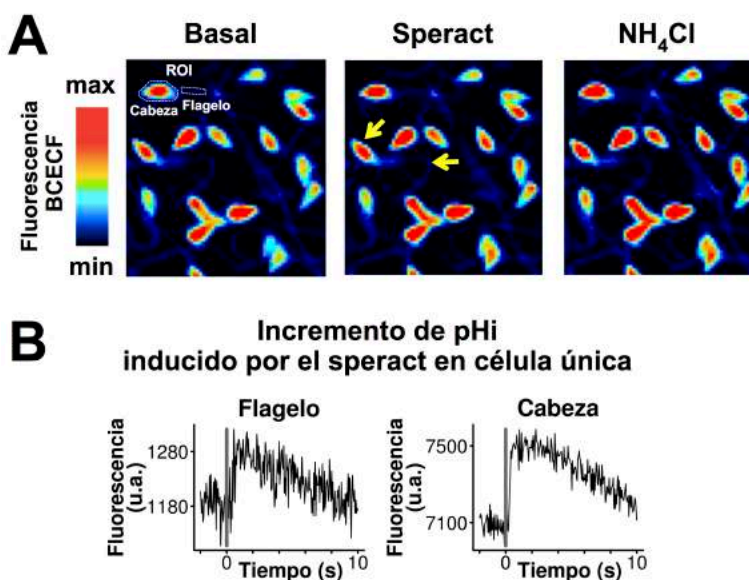
#### **4. 6. Análisis estadístico**

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes por condición, lo que implica el uso de cuando menos 3 erizos diferentes. Los datos numéricos representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio (S.E.M. por sus siglas en inglés). Las comparaciones entre grupos se hicieron utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de significancia de 95%. Se realizaron pruebas pareadas cuando se compararon cabezas y flagelos de la misma célula. Se aplicó una corrección de Bonferroni cuando se hicieron comparaciones múltiples. El análisis estadístico se hizo con el software R v 3.1.0 (R Core Team 2014).

## 5. RESULTADOS

### 5. 1. Caracterización de la respuesta de pHi inducida por el speract en célula única.

Cuando se comenzó con este trabajo no existían datos que describieran los cambios de pHi en espermatozoides individuales de erizo de mar en respuesta al speract. Por tanto, la primera fase de esta investigación consistió en caracterizar esta respuesta.



**Figura 5-1. Registro de los cambios de pHi inducidos por el speract en espermatozoides individuales de *S. purpuratus*.** A) Imágenes representativas de los espermatozoides cargados con BCECF antes de la aplicación del speract (izquierda), después de la aplicación del speract (centro) y en presencia de NH<sub>4</sub>Cl (control de alcalinización, derecha). En la imagen de la izquierda se muestra un ejemplo de la selección de las ROI. B) Trazos crudos que representan el cambio de pHi en respuesta al speract de la célula marcada con las flechas amarillas en A. La línea gris indica la adición del speract. En general, el incremento de pHi inducido por el speract no causó un incremento mayor al 10% en la fluorescencia. Se utilizó una velocidad de adquisición de 20 ips.

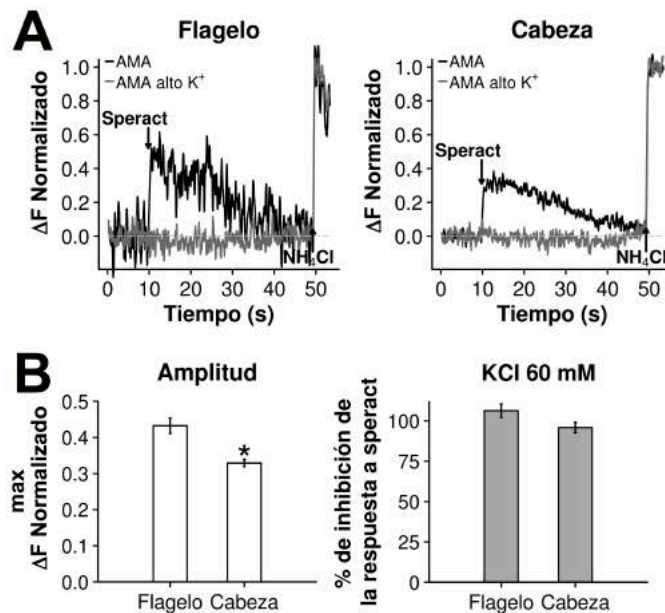
#### 5. 1. 1. El cambio de pHi inducido por el speract ocurre en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide.

La primera pregunta a responder era si el incremento de pHi en respuesta al speract ocurría en toda la célula o estaba regionalizado. Para contestar esto, utilizamos el colorante fluorescente sensible a pH, BCECF, que se distribuye en toda la célula (figura 5-1 A). Esto nos permitió medir de manera simultánea los cambios de pHi que ocurren en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide. En

este primer ensayo encontramos que el incremento de pHi inducido por el speract ocurre tanto en el flagelo como en la cabeza del espermatozoide (figura 5-1 B). Como control de alcalinización se utilizó NH<sub>4</sub>Cl que, como era de esperarse, también indujo un incremento de pHi en toda la célula (figura 5-1 A).

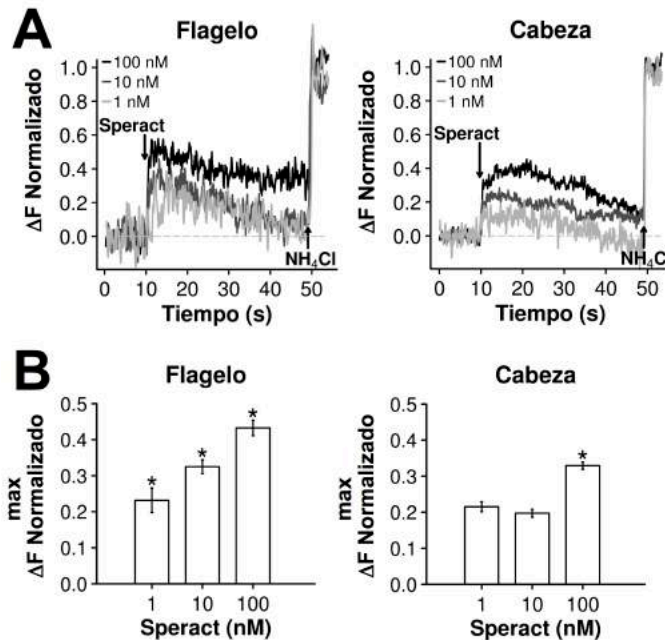
### 5. 1. 2. El incremento de pHi inducido por el speract en la cabeza y el flagelo se inhibe por alto K<sup>+</sup> externo.

En células en población el incremento de pHi inducido por el speract se inhibe en presencia de alto K<sup>+</sup> externo (Schackmann & Chock 1986). La adición de K<sup>+</sup> externo provoca una pequeña despolarización de la membrana e impide la hiperpolarización causada al abrir el tetraKCNG (Lee & Garbers 1986). Lo anterior inhibe la activación del sNHE y los eventos subsecuentes (Schackmann & Chock 1986) (figura 1-5).



**Figura 5-2. Inhibición por alto K<sup>+</sup> (KCl 60 mM) del incremento de pHi inducido por el speract.** A) Trazos representativos de los cambios de pHi inducidos por speract 100 nM en el flagelo y la cabeza del espermatozoide de erizo de mar en la condición control (AMA) y en presencia de AMA con 60 mM de KCl (AMA alto K<sup>+</sup>). En ambas condiciones se aplicó NH<sub>4</sub>Cl 10 mM como control de alcalinización y para normalizar las respuestas. B) Las barras blancas representan la amplitud del incremento inicial de pHi inducido por el speract. Las barras grises muestran el % de inhibición de la respuesta por alto K<sup>+</sup>. Las barras representan los promedios ± SEM de las mediciones. La amplitud se definió como el valor máximo alcanzado dentro de los primeros 3 s después de la adición del speract. Las amplitudes se midieron después de normalizar los trazos por NH<sub>4</sub>Cl. n = 166 C/92 F (AMA); n = 141 C/87 F (AMA alto K<sup>+</sup>). C = cabezas, F = flagelos. Se utilizó una velocidad de adquisición de 20 ips. \*P < 0.01. Se realizaron tres experimentos independientes.

Como era de esperarse, nuestros resultados en células individuales muestran que el incremento de pHi causado por el speract en el flagelo y en la cabeza se inhiben en presencia de alto K<sup>+</sup> externo (figura 5-2 A y B barras grises), al igual que en células en población. Esta observación confirma el requerimiento de la hiperpolarización para que ocurra la alcalinización. Por otra parte, es importante resaltar que el incremento de pHi causado por el NH<sub>4</sub>Cl no se inhibe en esta condición (figura 5-2 A trazo gris). Ambos resultados confirman que el incremento de pHi que observamos tras la aplicación del speract corresponde a una respuesta específica del péptido.



**Figura 5-3. Incremento de pHi inducido por distintas concentraciones de speract en flagelos y cabezas individuales del espermatozoide de erizo de mar.** A) Trazos representativos de los cambios de pHi de espermatozoides individuales expuestos a distintas concentraciones de speract (1, 10 y 100 nM) en AMA. Los trazos se normalizaron con respecto al valor máximo de cada respuesta de NH<sub>4</sub>Cl. B) Amplitud promedio del cambio de pHi medido durante los primeros 3 s de la respuesta al speract en cabezas y flagelos. Las amplitudes se midieron como en la figura 5-2. n = 99 C/29 F (1 nM); 95 C/69 F (10 nM); 166 C/92 F (100 nM). Se utilizó una velocidad de adquisición de 20 ips. \*P < 0.01. Se realizaron tres experimentos independientes.

### 5. 1. 3. El incremento de pHi inducido por el speract depende de la dosis.

Una vez establecidas las condiciones de registro de los cambios de pHi inducidos por el speract en cabezas y flagelos de espermatozoides individuales, investigamos si estos cambios dependían de la dosis del speract. En células en población el incremento de pHi inducido por el speract muestra un comportamiento dosis-dependiente en un rango de concentración de pM a nM (Babcock et al. 1992). En experimentos en células individuales se pueden detectar cambios en el calcio dependientes de la dosis a partir de concentraciones de speract de 100 pM hasta 100 nM (Wood et al. 2003). En nuestras condiciones de registro observamos incrementos de pHi dependientes de la dosis a partir de una concentración de speract de 1 nM en el flagelo (figura 5-3). Es importante mencionar que en estas condiciones no logramos detectar cambios de pH en respuesta a concentraciones de speract por debajo de 1 nM en los flagelos.

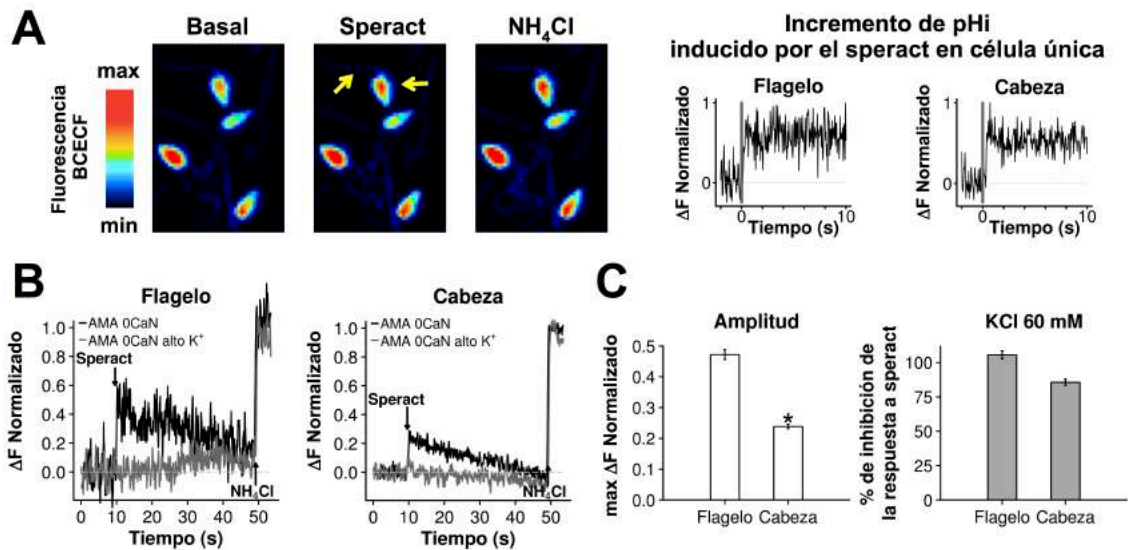
Por otra parte, encontramos que el porcentaje de respuesta también depende de la dosis de speract. A mayor concentración de speract incrementa la proporción de células en las que se puede detectar una respuesta (tabla 5-1). Debido a que nuestro principal interés en este trabajo consistió en estudiar los cambios de pH en los flagelos, para los siguientes experimentos utilizamos una concentración de speract de 100 nM que nos permite estudiar las respuesta en el mayor número de células posible.

Speract (nM)	1	10	100
Región			
Flagelo (%)	33 ± 6	57 ± 14	84 ± 7
Cabeza (%)	72 ± 11	86 ± 9	99 ± 1

**Tabla 5-1. Proporción de células que responden a distintas concentraciones de speract.** Una respuesta de pHi se definió como el incremento sostenido en la fluorescencia del BCECF por arriba de su fluorescencia basal posterior a la aplicación del speract. El número de células que responden al speract incrementa con la concentración de speract. No se lograron detectar respuestas con concentraciones por debajo de 1 nM. Se analizaron 421 cabezas y 319 flagelos de tres experimentos independientes.

### 5. 1. 4. El incremento de pHi inducido por el speract es independiente de Ca<sup>2+</sup> externo.

En células en población se ha demostrado que el incremento de pHi inducido por el speract no depende de la presencia de Ca<sup>2+</sup> externo (Reynaud et al. 1993). Por tanto, el siguiente paso era investigar la dependencia al Ca<sup>2+</sup> del incremento de pHi en la cabeza y el flagelo en espermatozoides individuales. Para esto registramos los cambios en el pHi en presencia de AMA 0CaN que contiene 350 nM de Ca<sup>2+</sup> libre, concentración que iguala la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> del espermatozoide de erizo de mar e impide el ingreso neto de Ca<sup>2+</sup> externo en la respuesta al speract (Wood et al. 2003).

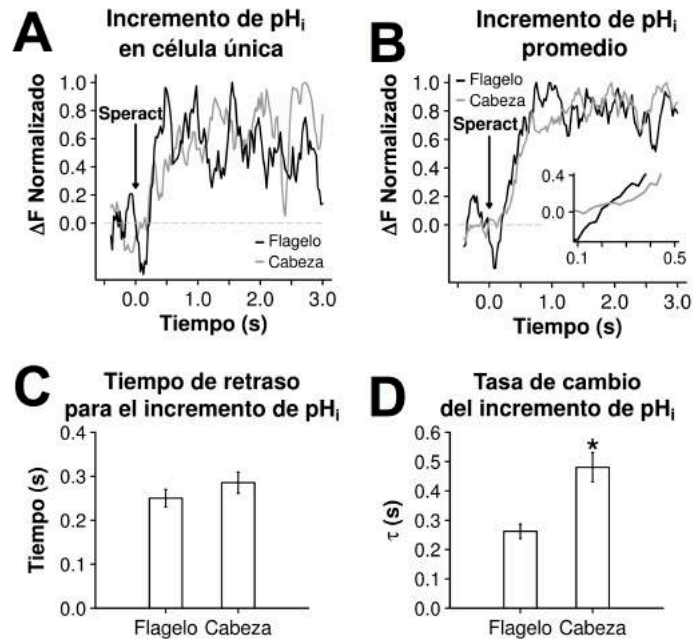


**Figura 5-4. Registro de los cambios de pHi inducidos por el speract en ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo (condición 0CaN).** A) Izquierda: Imágenes representativas de los espermatozoides cargados con BCECF antes de la aplicación del speract (izquierda), después de la aplicación del speract (centro) y en presencia de NH<sub>4</sub>Cl (control de alcalinización, derecha) en la condición de AMA 0CaN. Derecha: Trazos normalizados por su propio máximo que representan el cambio de pHi en respuesta al speract de la célula marcada con las flechas amarillas en la imagen central. La línea gris en los trazos indica la adición del speract. B) Trazos representativos de los cambios de pHi inducidos por speract 100 nM en el flagelo y la cabeza del espermatozoide de erizo de mar en la condición control (AMA 0CaN) y en presencia de AMA 0CaN con 60 mM de KCl (AMA 0CaN alto K<sup>+</sup>). En ambas condiciones se aplicó NH<sub>4</sub>Cl 10 mM como control de alcalinización y para normalizar las respuestas. C) Las barras blancas representan la amplitud del incremento inicial de pHi inducido por el speract. Las barras grises muestran el % de inhibición de la respuesta por alto K<sup>+</sup>. Las barras representan los promedios ± SEM de las mediciones. La amplitud se definió como el valor máximo alcanzado dentro de los primeros 3 s después de la adición del speract. Las amplitudes se midieron después de normalizar los trazos por NH<sub>4</sub>Cl al igual que en la figura 3. n = 337 C/178 F (AMA 0CaN); 236 C/281 F (AMA 0CaN alto K<sup>+</sup>). Se utilizó una velocidad de adquisición de 20 ips. \*P < 0.01. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

En la figura 5-4 se muestra que en la condición de 0CaN en respuesta al speract hay un incremento de pHi tanto en la cabeza como en el flagelo (figura 5-4 A). Al igual que en presencia de AMA (figura 5-2), el incremento de pHi se inhibe en presencia de alto K<sup>+</sup> externo (figura 5-2 B trazos grises y 5-2 C barras grises). De manera interesante encontramos que la amplitud del incremento de pHi en el flagelo en la condición 0CaN es comparable a la que ocurre en presencia Ca<sup>2+</sup> externo ( $0.47 \pm 0.2$  y  $0.43 \pm 0.2$  respectivamente, figura 5-4 C y figura 5-2 B barras blancas). Sin embargo, el incremento de Ca<sup>2+</sup> en la cabeza resultó significativamente menor ( $0.24 \pm 0.1$  y  $0.32 \pm 0.1$ , respectivamente, figura 5-4 C y figura 5-2 B barras blancas). Lo que indica que en la cabeza el incremento de pHi depende parcialmente de Ca<sup>2+</sup>, y posiblemente hay al menos dos entidades moleculares regulando el incremento de pHi en la cabeza, una dependiente de Ca<sup>2+</sup> externo y una independiente.

### **5. 1. 5. Cinética del incremento de pHi en respuesta al speract.**

Finalmente, para concluir con la fase de la caracterización de los cambios de pHi inducidos por el speract en espermatozoides individuales, estudiamos su cinética en la cabeza y el flagelo. Para esto hicimos registros rápidos de pHi (40 ips) durante los primeros 3 s de la respuesta al speract, tiempo en el que se desarrolla la respuesta quimiotáctica en espermatozoides nadando (Guerrero et al. 2010a). En estos experimentos encontramos que, aún cuando aparentemente el pHi incrementa primero en el flagelo ( $250 \pm 20$  ms) que en la cabeza ( $285 \pm 23$  ms), la diferencia no es estadísticamente significativa (figura 5-5 C). En cambio, el incremento de pHi ocurre más rápido ( $\tau = 260 \pm 25$  ms) en el flagelo que en la cabeza ( $\tau = 480 \pm 49$  ms) (figura 5-5 B y 5-5 D).



**Figura 5-5. Análisis espacio-temporal de los cambios en el pHi inducidos por el speract.** A) Trazos representativos del incremento pHi inducido por el speract 100 nM en el flagelo (trazo negro) y la cabeza de un espermatozoide (trazo gris). B) Trazos promedio registrados en los flagelos (trazo negro) y cabezas (trazo gris) de un lote de células. Los trazos están normalizados por el incremento máximo en respuesta al speract. Los trazos promedio representan un experimento (11 células). Los insertos muestran los tiempos de inicio en una escala temporal expandida. C) Tiempos de retraso para el inicio de la respuesta de pHi en flagelos y cabezas de espermatozoides individuales. D) Constante de tiempo ( $\tau$ ) del incremento de pHi en respuesta al speract en flagelos y cabezas de espermatozoides individuales. Los trazos de cada ROI se ajustaron con el modelo de crecimiento exponencial:  $F_{max}(1 - e^{-k(t-t_0)})$ , donde  $F_{max}$  es el valor máximo de BCECF alcanzado después de la adición de speract,  $k$  es la constante de velocidad y  $t$  son los valores de tiempo; la  $\tau$  se calculó como  $1/k$ .  $n = 34$  células de 3 erizos distintos. Las imágenes se adquirieron a una velocidad de 40 ips. \* $P < 0.01$ .

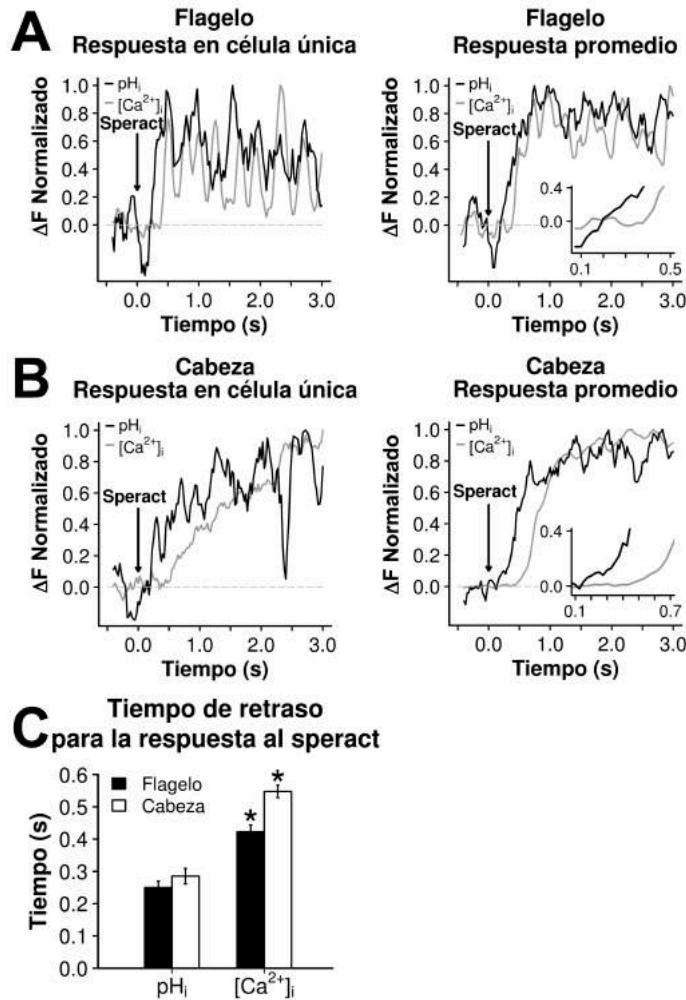
## 5. 2. Relación espacio-temporal entre el incremento de pHi y de Ca<sup>2+</sup>.

### 5. 2. 1. En espermatozoides individuales la alcalinización inducida por el speract precede al incremento de Ca<sup>2+</sup>.

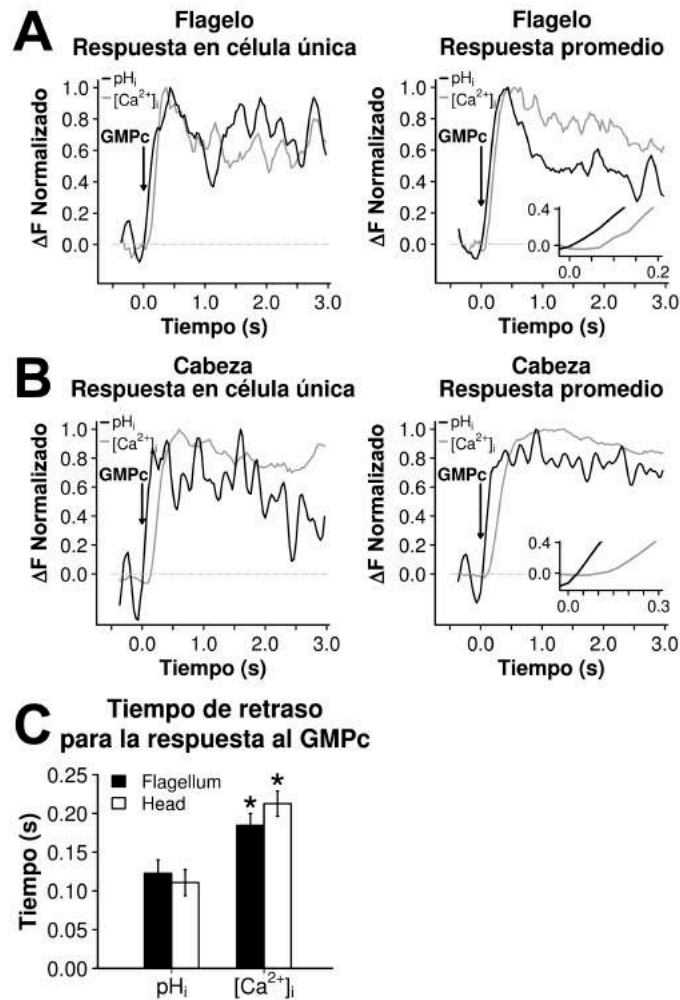
Para investigar la relación temporal entre el incremento de pHi y el de Ca<sup>2+</sup> inducido por speract se hicieron registros rápidos (40 ips) en paralelo (ver Metodología). Nuestros resultados indican que el pHi incrementa antes que el Ca<sup>2+</sup> en el flagelo y en la cabeza del espermatozoide (figura 5-6). El retraso para la respuesta de pHi fue de  $250 \pm 20$  ms, mientras que el retraso para la respuesta de Ca<sup>2+</sup> fue de  $422 \pm 21$  ms en el flagelo (figura 5-6 C). En la cabeza del



espermatozoide el retraso para la respuesta de  $pH_i$  fue de  $285 \pm 23$  ms y para la de  $Ca^{2+}$  fue de  $547 \pm 20$  ms (figura 5-6 C).



**Figura 5-6. Comparación temporal de los incrementos de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  inducidos por el speract en cabezas y flagelos de células individuales.** A) Trazos representativos del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $pH_i$  inducidos por el speract 100 nM en el flagelo de un espermatozoide (izquierda); trazos promedio registrados en los flagelos de un lote de células (derecha). B) Mismo que en A para cabezas. Los trazos están normalizados por el incremento máximo en respuesta al speract. Los trazos promedio representan un experimento (11 células para las mediciones de  $pH_i$  y 11 para  $[Ca^{2+}]_i$ ). Los insertos muestran los tiempos de inicio en una escala temporal expandida. C) Tiempos de retraso para el inicio de la respuesta de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  en las cabezas y flagelos de los espermatozoides.  $n = 34$  células para  $pH_i$  y 29 células para  $Ca^{2+}$  de 3 erizos distintos. Las comparaciones estadísticas se hicieron entre las mediciones de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  de la misma región. Los cambios de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  se midieron en paralelo tal como se explica en la sección de Metodología. Las imágenes se adquirieron a una velocidad de 40 ips. \* $P < 0.01$ .



**Figura 5-7. Comparación de los incrementos de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  inducidos por el GMPc en cabezas y flagelos de células individuales.** A) Trazos representativos del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $pH_i$  inducidos por GMPc fotoactivable en el flagelo de un espermatozoide (izquierda); trazos promedio registrados en los flagelos de un lote de células (derecha). B) Mismo que en A para cabezas. Los trazos están normalizados por el incremento máximo en respuesta al GMPc. Los trazos promedio representan un experimento (9 células para las mediciones de  $pH_i$  y 14 para  $[Ca^{2+}]_i$ ). Los insertos muestran los tiempos de inicio en una escala temporal expandida. C) Tiempos de retraso para el inicio de la respuesta de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  en las cabezas y flagelos de los espermatozoides.  $n = 28$  células para  $pH_i$  y 45 células para  $Ca^{2+}$  de 3 erizos distintos. Las comparaciones estadísticas se hicieron entre las mediciones de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  de la misma región. Los cambios de  $pH_i$  y  $Ca^{2+}$  se midieron en paralelo como en la figura 7. Las imágenes se adquirieron a una velocidad de 30 ips. \* $P < 0.01$ .

Para confirmar estos hallazgos activamos la vía de señalización del speract utilizando GMPc fotoactivable. Después de que el speract se une a su receptor, el GMPc incrementa (Hansbrough & Garbers 1981) y estimula la apertura del canal de  $K^+$  tetraKCNG (Galindo et al. 2000). Se piensa que la hiperpolarización resultante estimula al sNHE que está presente en el flagelo incrementando el  $pH_i$  y

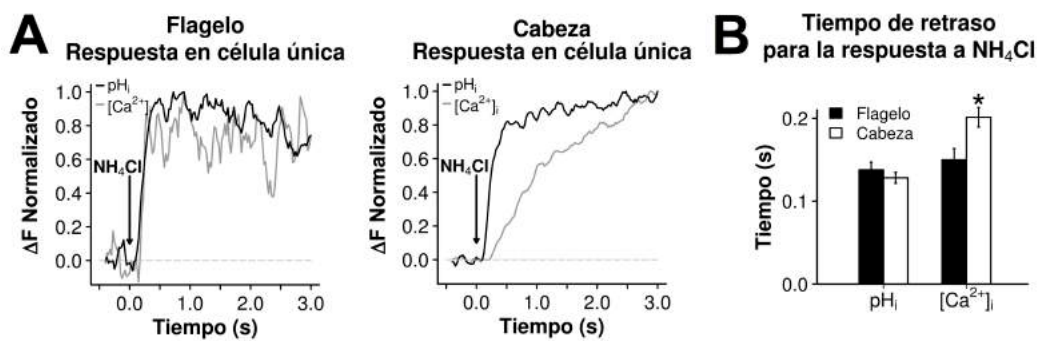
posteriormente el  $\text{Ca}^{2+}$  (tal como pudimos observar en la figura 10 en la respuesta al speract). Por lo tanto, la fotoactivación del GMPc enjaulado activa la cascada del speract saltando los pasos de unión al receptor y síntesis de GMPc. Además, el desenjaular al GMPc, tiene la ventaja de estimular de manera simultánea a todas las células en el mismo campo, lo que nos debería permitir discernir de una manera más clara si el pHi o el  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa primero.

Tal como era de esperarse, el GMPc provoca un incremento rápido de pHi tanto en la cabeza como en el flagelo (figura 5-7). Adicionalmente, encontramos que el pHi incrementa antes que el  $\text{Ca}^{2+}$ , con un tiempo de retraso de  $122 \pm 17$  ms para el pHi y de  $184 \pm 15$  ms para el  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo; y de  $110 \pm 16$  ms para el pHi y de  $213 \pm 16$  ms para el  $\text{Ca}^{2+}$  en la cabeza. En estos experimentos los tiempos de retraso resultaron más cortos que en presencia de speract debido a que, además del tiempo de mezclado, algunos pasos de la cascada, como la unión al receptor y la síntesis de GMPc, se evitan con este método. Los resultados con GMPc apoyan los hallazgos observados en la presencia de speract, y confirman que el pHi incrementa antes que el  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide.

### **5. 2. 2. La alcalinización inducida por $\text{NH}_4\text{Cl}$ provoca la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ en el espermatozoide de erizo de mar.**

Nuestros hallazgos hasta este punto y datos publicados recientemente con poblaciones de espermatozoides de *A. punctulata* (Seifert et al. 2015), son consistentes con la presencia y la participación de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de pHi, posiblemente CatSper, en la respuesta a speract. Por lo tanto, decidimos investigar si una alcalinización podría mimetizar el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el speract. Nosotros encontramos que una adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM evoca un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la cabeza y el flagelo del espermatozoide (figura 5-8 A). De manera interesante, aunque el pHi incrementa de manera simultánea en el

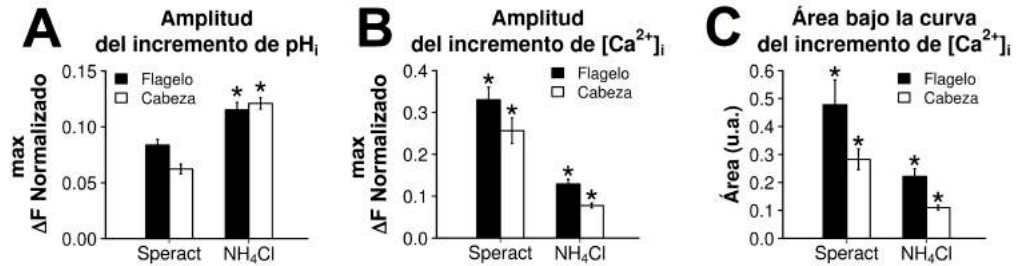
flagelo y en la cabeza ( $137 \pm 9$  ms y  $128 \pm 6$  ms, respectivamente) (figura 5-8 B), el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el speract ocurre antes en el flagelo que en la cabeza ( $150 \pm 13$  ms y  $201 \pm 10$  ms, respectivamente) (figura 5-8 B), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este hallazgo concuerda con la participación de CatSper en la cascada de señalización del speract y con la propuesta de que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inicia en el flagelo y después se propaga hacia la cabeza (Wood et al. 2003).



**Figura 5-8. Cambios de  $\text{pH}_i$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en la cabeza y el flagelo de espermatozoides individuales.** A) Trazos representativos del incremento de  $\text{pH}_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM en flagelos (izquierda) y cabezas (derecha) de espermatozoides individuales. Los trazos se normalizaron por el incremento máximo alcanzado con el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . B) Tiempo de retraso para el inicio de la respuesta de  $\text{pH}_i$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en flagelos y cabezas individuales. Las barras representan los promedios de 4 experimentos independientes.  $n = 102$  C/55 F para  $\text{pH}_i$ , y 63 C/29 F para  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cambios de  $\text{pH}_i$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se midieron en paralelo como en las figuras 5-6 y 5-7. Las imágenes se adquirieron a 40 ips. \* $P < 0.01$ . Las comparaciones estadísticas se hicieron entre distintas condiciones en la misma región del espermatozoide y entre distintas regiones para la misma condición.

Sin embargo, para nuestra sorpresa la alcalinización inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no reprodujo completamente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el speract. La amplitud y el área bajo la curva de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fue significativamente menor que en presencia de speract en la cabeza y en el flagelo (figura 5-9 B y 5-9 C). Notablemente, la alcalinización inducida por el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es significativamente mayor que la producida por el speract (figura 5-9 A). Estos últimos resultados sugieren que además del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{pH}_i$ ,

otras vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían estar participando en la cascada de señalización del speract.



**Figura 5-9. Comparación de los cambios de  $\text{pH}_i$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por el speract y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en la cabeza y el flagelo de espermatozoides individuales.** A) Amplitud promedio del cambio de  $\text{pH}_i$  inducido por el speract 100 nM y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM en flagelos y cabezas individuales. B) Mismo que en A, para el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . C) Área bajo la curva del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por speract 100 nM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM. Los datos que corresponden a la respuesta al speract se obtuvieron a partir de los trazos mostrados en la figura 7 y los de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de la figura 9. La comparación estadística se hizo entre distintos tratamientos en la misma región (A,B,C) y entre distintas regiones para el mismo tratamiento (B y C).

## 6. DISCUSIÓN

### 6. 1. El pH en la fisiología del espermatozoide

La regulación del pHi es fundamental para la función del espermatozoide y crítica para la movilidad (Nishigaki et al. 2014a). Como se mencionó anteriormente, dentro de las gónadas los espermatozoides se encuentran inmóviles y activan su movilidad una vez que se liberan al mar en un proceso que es dependiente de pHi (Johnson et al. 1983). El incremento de pHi activa a las dineínas, que son las proteínas motoras del axonema del flagelo, estimulando la movilidad de los espermatozoides. Por su actividad ATPasa, la activación de las dineínas provoca una reducción en la relación ATP/ADP que tiene como consecuencia el aumento en el consumo de oxígeno y en la respiración mitocondrial (Christen et al. 1983). Es claro que, el pHi es de fundamental importancia en la fisiología del espermatozoide, ya que influye en procesos esenciales para su función como la movilidad, la respiración y la síntesis de ATP. Teniendo esto en cuenta no es difícil imaginar que el pH podría tener un papel crítico en la modulación del nado quimiotáctico inducido por el speract, proceso clave para la fecundación en el erizo de mar. Sobre todo si consideramos que en la respuesta al speract hay un incremento de pHi y en el genoma del erizo de mar está presente CatSper, el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de pH y exclusivo del espermatozoide (Cai & Clapham 2008). Por tanto, es simple suponer que la alcalinización inducida por el speract podría estar regulando los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  que finalmente controlan el nado del espermatozoide, a través de la modulación de CatSper. En consecuencia, en este trabajo caracterizamos los cambios de pHi a nivel de espermatozoides individuales e investigamos su relación con los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta al speract, el péptido quimioatrayente del erizo de mar.

## 6. 2. Los cambios de pHi en el espermatozoide de erizo de mar en respuesta al speract

Cuando se comenzó con este trabajo existía una gran controversia en relación a la función de la alcalinización en la cascada de señalización del speract. Se había propuesto que esta alcalinización intracelular mediaba la interacción péptido-receptor modulando la afinidad (Nishigaki et al. 2001), que estimulaba la actividad de la adenilato ciclasa soluble del espermatozoide de erizo de mar (susAC) (Nomura et al. 2005) y la inactivación de la GC a través de una desfosforilación regulada por una fosfodiesterasa dependiente de pH (Cook & Babcock 1993; Suzuki et al. 1984; Ward & Vacquier 1983; Ward et al. 1986). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que la afinidad péptido-receptor está modulada por la ocupación del receptor y que la GC se autodesfosforila independientemente del incremento de pHi (Pichlo et al. 2014). Estas observaciones cuestionan las propuestas antes mencionadas.

Por otra parte, también se había propuesto por experimentos realizados con ionóforos y sustituciones iónicas en espermatozoides en población que el incremento de  $Ca^{2+}$  inducido por el speract era posterior y dependía del incremento de pHi (Schackmann & Chock 1986; Cook & Babcock 1993). En relación con esto último, experimentos en poblaciones de espermatozoides realizados con alta resolución temporal (ms) mostraban información contradictoria. En particular, en nuestro laboratorio se encontró para un amplio rango de concentraciones de speract (entre pM y nM) que el incremento de pHi precedía al incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  (Nishigaki et al. 2001; Nishigaki et al. 2004), lo cual era consistente con las propuestas anteriores. Sin embargo, otro grupo de investigación mostraba datos que indicaban que el incremento de pHi era posterior al cambio en el  $Ca^{2+}$ , en espermatozoides de *S. purpuratus* y *A. punctulata* en respuesta a speract y a resact respectivamente, y que además la alcalinización era dependiente de  $Ca^{2+}$  y no era relevante para la quimiotaxis, esto último para la especie de erizo de mar de *A.*

*punctulata* y el péptido resact (Solzin et al. 2004). Estos resultados contradecían las propuestas iniciales. Por tanto, la relevancia del cambio de pHi en la respuesta quimiotáctica se cuestionó durante más de dos décadas. Recientemente, cuando el manuscrito del artículo publicado con los datos mostrados en este trabajo se encontraba en preparación, este mismo grupo publicó un estudio cinético más detallado, en población de espermatozoides de *A. punctulata*, en el que se retractaron de los datos previamente expuestos y en el cual reportaron que el incremento de pHi efectivamente precede al del  $Ca^{2+}$  en la respuesta a resact y proponen que el incremento de pHi inducido por resact activa a CatSper, el canal de  $Ca^{2+}$  exclusivo del espermatozoide que se activa por un incremento de pHi, y que además este canal estaría regulando la quimiotaxis en *A. punctulata*. Por tanto, a la fecha, el estudio de los cambios de pHi empieza a adquirir una mayor importancia debido a que la evidencia mostrada por nuestro grupo y otros grupos de investigación, en distintas especies de erizo con cascadas de señalización homólogas, sugiere que el pHi podría tener un papel como regulador de los flujos de  $Ca^{2+}$  en la respuesta a los péptidos quimioatrayentes y de manera indirecta regular el nado del espermatozoide en estas especies en la respuesta quimiotáctica.

Sin embargo, aún con la información previamente expuesta, sería difícil establecer un modelo de la señalización en la respuesta al speract en el flagelo (región del espermatozoide especializada en el movimiento y en la que se localizan los elementos de la vía de señalización del speract) debido a la carencia de información cinética y espacial en relación a los cambios de pHi en espermatozoides individuales. El entender completamente cómo el speract regula la movilidad requiere de determinar los elementos de la cascada de señalización y su organización espacial y temporal. Por este motivo la caracterización de los cambios de pHi y su relación con los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por el speract en la cabeza y el flagelo del espermatozoide, que es en donde regulan el nado, seguía siendo relevante para comprender el mecanismo de acción de estos péptidos.



En este trabajo, como estrategia experimental utilizamos células adheridas a los cubreobjetos, que para los fines de este trabajo ofrecía más ventajas que el estudio de células nadando. Aunque es posible medir cambios en la fluorescencia en flagelos de espermatozoides móviles (Guerrero et al. 2010a), el análisis es complejo debido al cambio de posición de los flagelos en cada imagen y a que el número de células útiles para el análisis por experimento es menor que cuando se utilizan células pegadas. Por otra parte, está bien documentado que, para las medidas de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en el flagelo, la frecuencia y la farmacología son comparables en células inmóviles y en células nadando (Wood et al. 2003; Wood et al. 2005; Wood et al. 2007; Guerrero et al. 2010a; Guerrero et al. 2013), por tanto con ambas estrategias se obtienen resultados similares en cuanto a los elementos que participan en la cascada, su modulación y su secuencia. Además el análisis en células inmovilizadas resulta más simple debido a que cada célula permanece en las mismas coordenadas en toda la serie de imágenes, y se puede utilizar una densidad mayor de células por registro, lo cual resultaba ventajoso para nuestro estudio.

Con esta estrategia, en la primera parte de este trabajo caracterizamos los cambios de pHi en la respuesta al speract en los espermatozoides individuales. El primer hallazgo de este trabajo fue que en la respuesta al speract el pHi incrementa tanto en el flagelo como en la cabeza del espermatozoide (figura 5-1). Está bien documentado que el receptor del speract (Cardullo et al. 1994), el tetraKCNG, canal responsable de la hiperpolarización en respuesta al incremento de GMPc (Galindo et al., 2007, Strunker et al., 2009) y el sNHE, transportador dependiente de voltaje que alcaliniza el medio intracelular en consecuencia de la hiperpolarización (Lee 1984a; Lee 1984b) se localizan en el flagelo del espermatozoide. Por tanto, tal como lo muestran nuestros resultados, esperábamos ver un incremento de pHi en el flagelo. Además, nuestros datos son consistentes con la participación del sNHE y la dependencia de la hiperpolarización para su activación. El incremento de pHi en el

flagelo inducido por GMPc (que activa directamente al tetraKCNG), su tiempo de retraso ( $122 \pm 17$  ms) (Figura 5-7), comparado con el tiempo medio para alcanzar la hiperpolarización máxima inducida por GMPc (menos de 6 ms) (Strünker et al. 2006), y la inhibición de la alcalinización por alto  $K^+$  externo (Figs. 6 y 8), el cual bloquea la hiperpolarización, apoyan la participación del sNHE en los primeros pasos de la cascada de señalización del speract y la dependencia de la hiperpolarización. Estos hallazgos coinciden con resultados anteriores de experimentos con poblaciones de espermatozoides de nuestro laboratorio (Nishigaki et al. 2004) y modelos previos de la vía de señalización (Darszon et al. 2008; Lee & Garbers 1986; Schackmann & Chock 1986; Cook et al. 1994).

Por otra parte, experimentos de mediciones de  $Ca^{2+}$  muestran que, aunque los canales de  $Ca^{2+}$  que se han identificado en el espermatozoide de erizo de mar se localizan principalmente en el flagelo (Granados-Gonzalez et al. 2005; Seifert et al. 2015; Beltrán, datos no publicados) el incremento de  $Ca^{2+}$  ocurre en el flagelo y en la cabeza del espermatozoide (Wood et al. 2003). De manera consistente con la presencia de los canales en el flagelo, el incremento de  $Ca^{2+}$  ocurre primero en el flagelo del espermatozoide y después en la cabeza, lo cual podría explicarse por la difusión del  $Ca^{2+}$  desde el flagelo hacia la cabeza (Wood et al. 2003). Considerando que el sNHE se localiza en el flagelo, nosotros esperábamos observar un incremento de pHi primero ahí y posteriormente en la cabeza, tal como ocurre con el  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales nos fue imposible distinguir un retraso entre el inicio de la respuesta en el flagelo y el de la cabeza (figura 5-5 C). En cambio, encontramos que el pHi incrementa más rápido en el flagelo ( $\tau = 260 \pm 25$  ms) que en la cabeza ( $\tau = 480 \pm 49$  ms) (figura 5-5 D). Esto podría deberse a que el incremento de pHi inicia en el flagelo, o simplemente a la diferencia en capacidad buffer entre flagelo y cabeza dada por el distinto volumen citoplásmico. El que no logremos distinguir una diferencia en el tiempo de inicio se puede deber a dos cosas: 1) la difusión de los  $H^+$  en la célula sea tan rápida que

escape a nuestra resolución temporal (registros cada 25 ms), 2) a que existan otros transportadores en la cabeza que respondan a las señales iniciales de la respuesta al speract, como por ejemplo, al cambio en el potencial, de lo cual no hay ningún reporte hasta el momento.

Adicionalmente, nuestros datos indican que hay distintos transportadores que influyen sobre los cambios de pHi en la respuesta al speract y que se distribuyen de manera diferencial en la cabeza y en el flagelo del espermatozoide. Nuestros experimentos en AMA 0CaN (figura 5-4) revelaron que en la cabeza del espermatozoide la alcalinización depende parcialmente de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que en este medio el incremento de pHi en la cabeza es menor ( $0.24 \pm 0.1$ ) que en AMA ( $0.32 \pm 0.1$ ). Este efecto no se observa en el flagelo ( $0.47 \pm 0.2$  y  $0.43 \pm 0.2$ , respectivamente) (figuras 5-4 C y 5-2 B). Esto es interesante ya que previamente se reportó en experimentos en población una alcalinización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides de esta especie, en respuesta a FSP (polímero de fucosa sulfatada), el inductor fisiológico de la RA (evento excitotico imprescindible que prepara al espermatozoide para fusionarse con el óvulo). Tal como la quimiotaxis, la RA depende de  $\text{Ca}^{2+}$  y de pHi (Schackmann et al. 1978; García-Soto & Darszon 1985). Cuando se inhibe el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta reacción no ocurre ni la alcalinización del pHi ni la RA (Guerrero et al. 1998), dejando en claro que en este proceso la alcalinización depende del  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido a que para que ocurra la RA no es necesaria la participación del flagelo (Garbers 1981), lo más probable es que las entidades moleculares que participan en estos cambios iónicos se localicen en la cabeza. Por tanto, la entidad molecular encargada del cambio de pHi dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser la que participa en la cabeza en la respuesta al speract, según nuestros datos (figura 5-2 y 5-4). En otros tipos celulares se ha reportado que transportadores del tipo NHE (distintos a los que se han identificado en el espermatozoide) son sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de calmodulina y/o calcineurina (Orlowski & Grinstein 2004). Por tanto, sería importante investigar si algunos de

estos transportadores están presentes en el espermatozoide de erizo de mar, su localización y posteriormente tratar de determinar si en la respuesta quimiotáctica tienen alguna función particular, como por ejemplo ser intermediarios en la comunicación flagelo-cabeza.

### **6. 3. Participación de CatSper, el canal de $\text{Ca}^{2+}$ dependiente de pHi, en la respuesta al speract.**

Está claro que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un elemento clave en la respuesta quimiotáctica. Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurren en el flagelo en la respuesta al speract modulan la forma del flagelo controlando el nado del espermatozoide (Wood et al. 2003; Wood et al. 2007; Guerrero et al. 2010a). Sin embargo, hasta la fecha no se conocen las entidades moleculares que permiten los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  ni su mecanismo de regulación. Por una parte, se ha propuesto la participación de los  $\text{Ca}_v$ s en la respuesta al speract debido a su localización en el flagelo (Granados-Gonzalez et al. 2005) y a que inhibidores de estos canales, tales como el  $\text{Ni}^{2+}$  y la nimodipina, inhiben específicamente las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  del flagelo (Wood et al. 2003). Es importante señalar que dichos inhibidores no afectan el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  sostenido inducido por el speract ni en la cabeza ni en el flagelo (Wood et al. 2003; Wood et al. 2005), lo cual podría indicar la participación de otros canales, insensibles a esos inhibidores, en esta respuesta. De acuerdo con esto, otros investigadores han sugerido la participación de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por AMPc (Cook & Babcock 1993; Nishigaki et al. 2004); del cual, hasta el momento, se desconoce su identidad molecular. Por nuestra parte, los datos obtenidos en la presente investigación nos permiten sugerir la participación de un nuevo canal en la vía del speract, CatSper, el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivo del espermatozoide y regulado por pHi.

Tres de nuestras observaciones son consistentes con que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cascada de señalización del speract está causado por el incremento de pHi y por tanto con la participación de CatSper. (1) La alcalinización inducida por el

speract es independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 5-4); (2) el  $\text{pHi}$  incrementa antes que el  $\text{Ca}^{2+}$  una vez que estimulamos a los espermatozoides con speract o con GMPc (figuras 5-6 y 5-7) y (3) la alcalinización inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eleva la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el flagelo y en la cabeza del espermatozoide (figura 5-8). Estos hallazgos son consistentes con otros trabajos de nuestro laboratorio que documentan que en espermatozoides de erizo de mar en población una alcalinización induce una posterior entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (García-Soto et al. 1987; Guerrero & Darszon 1989). De manera interesante, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la alcalinización causada por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inicia en el flagelo, sin un retraso detectable en relación al incremento de  $\text{pHi}$ , mientras que el incremento en la cabeza ocurre más tarde (figura 5-8). Esto sugiere que la entidad molecular sensible al  $\text{pHi}$  y que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se localiza en el flagelo y está regulada directamente por el cambio de  $\text{pHi}$  y que posiblemente el incremento que se observa en la cabeza corresponde a la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el flagelo hacia la cabeza. Al igual que en el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la alcalinización, en la respuesta al speract el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inicia en el flagelo y posteriormente ocurre el incremento en la cabeza (Wood et al. 2003). En conjunto, todo lo anterior indica que la alcalinización inducida por el speract podría activar directamente a un canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente CatSper; que como ya se mencionó anteriormente, está presente en el genoma de *S. purpuratus* (Cai & Clapham 2008) y recientemente se ha propuesto que es crucial para la quimiotaxis de *A. punctulata* (Seifert et al. 2015).

Aunque nuestros datos indican que el  $\text{pHi}$  regula directamente una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el flagelo, no podemos dejar de considerar otras posibilidades. Ya que el speract también incrementa los niveles de AMPc (Hansbrough & Garbers 1981) y otros estudios documentan que hay un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por AMPc en el espermatozoide de erizo de mar (Cook & Babcock 1993; Nishigaki et al. 2004), no podemos descartar una regulación indirecta de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{pHi}$  en la respuesta al speract. Como el espermatozoide de erizo de mar posee una adenilato

ciclase soluble (susAC) dependiente de pH (Nomura et al. 2005), la alcalinización inducida por el speract podría activar la susAC incrementando los niveles de AMPc y después estimular la vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a AMPc. Finalmente, ya que se ha reportado que el sNHE de espermatozoide de mamífero contiene un dominio de unión a nucleótido cíclico (CNBD) (figura 1-3) (Wang et al. 2003), que también está presente en el sNHE de erizo de mar (alineamiento de secuencias, no mostrado) podríamos especular que, en caso de que dicho CNBD fuera funcional en el sNHE del espermatozoide de erizo de mar, un incremento en AMPc estimularía al sNHE y en consecuencia contribuiría al incremento de pHi que luego activaría al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a pHi, posiblemente CatSper. Si esto fuera así, explicaría la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de AMPc antes reportada (Cook & Babcock 1993) y a la vez sería consistente con una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  directamente regulada por pHi. Interesantemente, estudios recientes sobre la evolución de las proteínas exclusivas del espermatozoide y que se localizan en el flagelo muestran que los organismos que conservan a CatSper en su genoma, también conservan al sNHE y a la sAC (Romero, datos no publicados). Lo anterior parece indicar que hay una estrecha relación funcional y una posible regulación entre estas proteínas que se conserva a lo largo de la evolución en distintas especies. Es importante señalar que, en ratón, la ausencia de cualquiera de estas proteínas causa infertilidad debido a problemas en la movilidad del espermatozoide (Ren et al. 2001; Wang et al. 2003; Quill et al. 2006; Esposito et al. 2004). Desafortunadamente, en el erizo de mar, hasta la fecha no se ha logrado obtener organismos transgénicos, en parte debido a que son organismos muy sensibles en su etapa larvaria y generalmente no llegan a la etapa adulta en condiciones de laboratorio, por tanto es difícil evaluar de manera directa la participación de estas proteínas (CatSper, sNHE y la sAC) en la fecundación. Independientemente de esto, sería interesante tratar de establecer si hay una regulación sAC-sNHE-CatSper o AMPc-pHi- $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de erizo de mar. En este caso sería importante evaluar el efecto del AMPc, utilizando análogos permeables (por ejemplo) para determinar por una parte si este puede modular el

cambio de pHi y por otra, si en consecuencia ocurre una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estableciendo el orden de los eventos en el flagelo de los espermatozoides en experimentos en célula única, tal como lo hemos mostrado en el presente trabajo para la respuesta al speract.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que una segunda vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la cascada de señalización del speract más allá de la activada por pHi. Como la alcalinización inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es mayor que la producida por el speract y está acompañada por una despolarización del potencial de membrana (García-Soto et al. 1987), uno podría esperar que el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mimetizara la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por speract. Contrario a lo esperado, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  resultó significativamente menor que la inducida por speract (figura 5-9), posiblemente implicando la participación de un segundo elemento para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como ya se había mencionado anteriormente, el  $\text{Ni}^{2+}$  y la nimodipina, dos bloqueadores de  $\text{Ca}_v$ s, inhiben las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por el speract de manera selectiva, pero no inhiben el incremento sostenido (Wood et al. 2003), sugiriendo la participación de al menos un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  adicional insensible a dihidropiridinas y a  $\text{Ni}^{2+}$ . De acuerdo con esto, en espermatozoides de humano, la progesterona (hormona producida por los ovarios y presente en el aparato reproductor femenino) activa a CatSper de manera directa (Strünker et al. 2011; Lishko et al. 2011) induciendo una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que es insensible a  $\text{Ni}^{2+}$  y dihidropiridinas, pero sensible a mibefradil y NNC55-0396 (Strünker et al. 2011). Estos datos en conjunto nos permiten suponer que CatSper (por la dependencia de pHi) y posiblemente otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (probablemente  $\text{Ca}_v$ s, por la sensibilidad a  $\text{Ni}^{2+}$  y dihidropiridinas) actúan de manera concertada para modular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el speract. En relación con esto, sería interesante evaluar el efecto de mibefradil y NNC55-0396 sobre la respuesta al speract, para tratar de determinar la contribución de CatSper a las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Interesantemente, estos compuestos inhiben el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el speract en

espermatozoides de *S. purpuratus* en población (Beltrán, datos no publicados) y la respuesta quimiotáctica en *A. punctulata* (Seifert et al. 2015). Además, un estudio reciente predice a través de un modelo de redes Booleano de la vía de señalización que CatSper es el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que participa principalmente en la regulación de la movilidad en la respuesta al speract (Espinal-Enríquez et al. 2016, sometido). Por lo que habría que explorar sus efectos con más detalle a nivel de células individuales.

#### **6. 4. El pHi como nuevo elemento regulador para la generación de las oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}$ en la respuesta al speract.**

Aunque se requiere de una investigación más exhaustiva para determinar la identidad de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que dan forma a las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por el speract que regulan el batido flagelar y como consecuencia dan dirección al nado del espermatozoide, nuestros datos indican la posible participación de CatSper. Por tanto, habría que comenzar a considerar al pHi como un regulador de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de la regulación de CatSper en la respuesta a speract. Cabe aclarar que aunque se han identificado varios de los elementos que participan en la respuesta al speract, aún se desconoce cómo se integran todos los elementos para la generación de las oscilaciones. Las primeras propuestas señalaban que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  estaban reguladas por cambios en el potencial de membrana considerando la participación de  $\text{Ca}_v\text{s}$  (Strünker et al. 2006; Darszon et al. 2008; Guerrero et al. 2010). Si tomamos en cuenta que durante el nado quimiotáctico después de cada vuelta de cara al gradiente de speract, el espermatozoide se encontrará con una concentración ascendente de quimioatrayente (figura 1-4), el ciclo de estimulación y la cascada de señalización se repetirá una y otra vez, generando cada vez una oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y repitiéndose también el ciclo de hiperpolarización y despolarización (Guerrero et al. 2010b). Esta propuesta es consistente con la participación de los  $\text{Ca}_v\text{s}$ , en la que con cada hiperpolarización pasan del estado inactivado al cerrado, mientras que con cada despolarización se abren. Si este ciclo se repite habrá una oscilación por cada ciclo.



Considerando que en el flagelo hay un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{pHi}$  además de los  $\text{Ca}_v\text{s}$ , la hipótesis del ciclo de hiperpolarización-despolarización también podría aplicarse, pero ahora considerando la dependencia de voltaje del sNHE. En este caso podemos imaginar dos escenarios. En el primero, que haya oscilaciones de  $\text{pHi}$  en respuesta a los cambios en el potencial de membrana, si cada hiperpolarización activa al sNHE, esto provoca una alcalinización que estimula la apertura de CatSper. Este se abriría sólo en el momento en el que inicia la fase de repolarización de la membrana, ya que se ha observado que la apertura de CatSper requiere de una combinación de valores de  $\text{pHi}$  y potencial de membrana particulares. En realidad, el  $\text{pHi}$ , en el espermatozoide de erizo de mar ayuda a que este canal se abra a potenciales más negativos pero en la fase de repolarización de la membrana (Seifert et al. 2015), en la cual se propone que actúa el canal SpHCN despolarizando el potencial de membrana. Por tanto, en estas condiciones se abriría CatSper y también los  $\text{Ca}_v\text{s}$ . Posteriormente, tras la apertura de los  $\text{Ca}_v\text{s}$ , CatSper y el spHCN (figura 1-5) comienza una fase de despolarización y con esto bajaría la actividad del sNHE, posiblemente acidificándose el  $\text{pHi}$ , con lo que también se reduciría la actividad de CatSper y al comenzar el nuevo ciclo de hiperpolarización (al reencontrarse con el speract) cesaría la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y comenzaría de nuevo el ciclo con la alcalinización inducida por la actividad del sNHE. De esta manera CatSper y los  $\text{Ca}_v\text{s}$  contribuirían al componente oscilatorio de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Otra alternativa es que no haya participación de  $\text{Ca}_v\text{s}$  y que CatSper sea el único canal que contribuye a las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo hay evidencia (que ya se mencionó antes) de la participación de estos canales en la respuesta al speract, y en particular en las oscilaciones. Uno de los puntos débiles de estas alternativas es que no considera a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuyen al incremento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que tendríamos que pensar en la participación de un nuevo tipo de canales, que no hemos considerado a la fecha. Un segundo escenario, en el que se tomaría en cuenta la participación del  $\text{pHi}$  e incluiría el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  sostenido sería, por ejemplo, que el  $\text{pHi}$  no oscilara y

que el incremento de pHi sostenido estimulara un incremento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CatSper, y que más bien este incremento fuera importante para contribuir a la despolarización y ayudar a alcanzar un umbral de activación para los  $\text{Ca}_v$ s que estarían regulados parcialmente de manera indirecta por el pH y directamente por los cambios en el potencial de membrana cumpliendo completamente con el papel del componente oscilatorio del  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas simplemente son propuestas, y se requiere hacer los experimentos, farmacológicos e idealmente electrofisiológicos para confirmar la presencia funcional de estos canales y conocer su regulación. Esto para poder acercarnos a la comprensión del mecanismo real de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo anterior podría ser importante no sólo para el espermatozoide, sino también para la comprensión del funcionamiento de los cilios, cuyas estructuras son similares y algunos de los mecanismos, como la regulación del batido por oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  están conservadas (Inaba 2015). Es interesante que el mal funcionamiento de estos está relacionado con defectos en el desarrollo, infertilidad o algunos padecimientos como la fibrosis quística por citar algunos ejemplos (Fliegau et al. 2007).

## **6. 5. Otros efectos de los cambios de pHi en la respuesta al speract**

Independientemente de su posible participación en la regulación directa de los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$ , datos recientes de nuestro laboratorio indican que el pHi podría tener otras funciones en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar en la respuesta al speract, particularmente, relacionadas con el metabolismo mitocondrial. Ahora sabemos que el speract, a través de la alcalinización, induce un incremento de NADH y una despolarización de la membrana mitocondrial interna (MMI) (García-Rincón et al. 2016). El incremento de NADH parece corresponder a la alta demanda de ATP en el momento de la respuesta quimiotáctica, durante la cual hay un incremento en la velocidad del nado (Wood et al. 2007; Böhmer et al. 2005) y por tanto un mayor consumo de ATP. Hay que recordar que el batido flagelar del espermatozoide depende completamente de la función ATPasa de las dineínas,

cuya actividad a su vez depende del pH y de la concentración de ATP en el flagelo para cumplir con su función motora (Christen et al. 1983; Okuno & Brokaw 1979). También es importante recordar que en el caso del espermatozoide de erizo de mar la mitocondria es la única fuente de ATP y toda la energía que requiere proviene de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos debido a que en esta célula no hay glucólisis (Rothschild & Cleland 1952; Afzelius & Wenner-gren 1964; Hansbrough & Garbers 1981; Mita & Nakamura 1998). Por tanto, debe existir un sistema de retroalimentación preciso que le indique a la mitocondria que se requiere sintetizar ATP para mantener los niveles suficientes para el nado del espermatozoide hacia el óvulo y también un sistema que provea de los sustratos necesarios a la mitocondria para cumplir con esta tarea.

Está bien documentado que en diversos tipos celulares la síntesis de ATP mitocondrial se estimula a través de mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tarasov et al. 2012; Williams et al. 2015). En estos, tras un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  hay un subsecuente incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , el cual ingresa a la mitocondria a través del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (mCU por sus siglas en inglés), un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  localizado en la MMI (Poburko & Demaurex 2012). El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  estimula la actividad de un grupo de deshidrogenasas intramitocondriales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Denton 2009). Esto tiene como consecuencia el incremento de NADH, uno de los sustratos de la cadena respiratoria que estimula la respiración mitocondrial incrementando el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP. Incluso, en algunos tipos celulares se ha demostrado que la actividad de la ATP sintasa también está modulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Tarasov et al. 2012). Por tanto, uno podría suponer que si en la respuesta al speract hay un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , este, tal como en otras células, podría ingresar a la mitocondria del espermatozoide y modular la síntesis de ATP a través del incremento de NADH. Sin embargo, sorpresivamente, en el caso del espermatozoide del erizo de mar, el incremento de NADH en la respuesta al speract

es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en cambio, una alcalinización artificial inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mimetiza el incremento de NADH inducido por speract (García-Rincón et al. 2016).

Lo anterior se podría explicar en parte por la dependencia de  $\text{pHi}$  de las dineínas, las cuales al hidrolizar ATP de manera dependiente de  $\text{pHi}$  provocan un incremento en los niveles de ADP. Lo que conduciría a la activación de la ATP sintasa, la estimulación del ciclo de Krebs y el incremento en los niveles de NADH, para después alimentar a la cadena respiratoria y así mantener la síntesis de ATP como se explicó anteriormente. Sin embargo, no sólo este proceso está regulado por el  $\text{pHi}$ . Ahora sabemos que en espermatozoides de erizo de mar, la carnitina palmitoil transferasa-I (CPT-I), enzima asociada a la membrana mitocondrial externa (MME) y que media el transporte de ácidos grasos en su camino hacia la matriz mitocondrial (MM), también está regulada por el incremento de  $\text{pHi}$  en la respuesta al speract (García-Rincón et al. 2016). Por tanto, una vez que ocurre una alcalinización citosólica se promueve la translocación de los ácidos grasos hacia la MM estimulando la  $\beta$ -oxidación en la cual se produce NADH y Acetil Co-A. Este último producto se utiliza como sustrato en el ciclo de Krebs promoviendo la producción de NADH, lo cual estimula la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP. En consecuencia, es claro que el ciclo de síntesis-degradación de ATP está regulado por el  $\text{pHi}$  en el espermatozoide de erizo de mar a través de la estimulación del metabolismo mitocondrial.

Adicionalmente a la síntesis de ATP mitocondrial, en el flagelo se localiza un sistema enzimático llamado adenilato cinasa (Sp-AK), el cual lleva a cabo la función de sintetizar ATP y AMPc a partir de dos moléculas de ADP. Este sistema, junto con la lanzadera de fosfocreatina o creatina cinasa (Sp-CK), la cual utiliza la fosfocreatina para fosforilar el ADP flagelar (Tombes & Shapiro 1985), son críticos para mantener los niveles de ATP a lo largo de todo el flagelo (50  $\mu\text{m}$  de longitud, figura 1-2). Experimentos con espermatozoides desmembrados indican que, a

pHi 7.6 y con concentraciones saturantes de ADP y fosfocreatina, la Sp-AK contribuye con el 31% del ATP que se produce en el flagelo, mientras que la Sp-CK produce el 69% (Kinukawa et al., 2007). Sin estos sistemas, el ATP mitocondrial solamente alcanza a difundir hasta la tercera parte del flagelo, dejando inmóvil el resto (Tombes & Shapiro 1985). De manera muy interesante, la actividad de ambos sistemas está modulada por el pH, en particular, el sistema Sp-AK incrementa su actividad al incrementarse el pH, alcanzando su actividad media a pH 7.0 y su actividad máxima a pH 7.7 (Kinukawa et al., 2007), el cual corresponde al rango de pHi fisiológico de los espermatozoides de erizo de mar (móviles y tras la respuesta a speract) (Lee et al. 1983; Rodríguez & Darszon 2003). Esto no sólo es importante para que se sintetice ATP al momento de la respuesta quimiotáctica, cuando el requerimiento de este es máximo, también es importante para remover el ADP generado por la hidrólisis del ATP, que es un inhibidor de la actividad de las dineínas (Okuno & Brokaw 1979). Al parecer, todos los puntos relacionados con la función de las dineínas están finamente regulados por el pHi, comenzando con su actividad, la disposición de sustratos en la mitocondria para la síntesis de ATP y finalmente la remoción de los subproductos de su actividad que podrían inhibirlas. Parece lógico que la misma señal que activa su funcionamiento se encargue de proveer las condiciones necesarias para mantener su actividad.

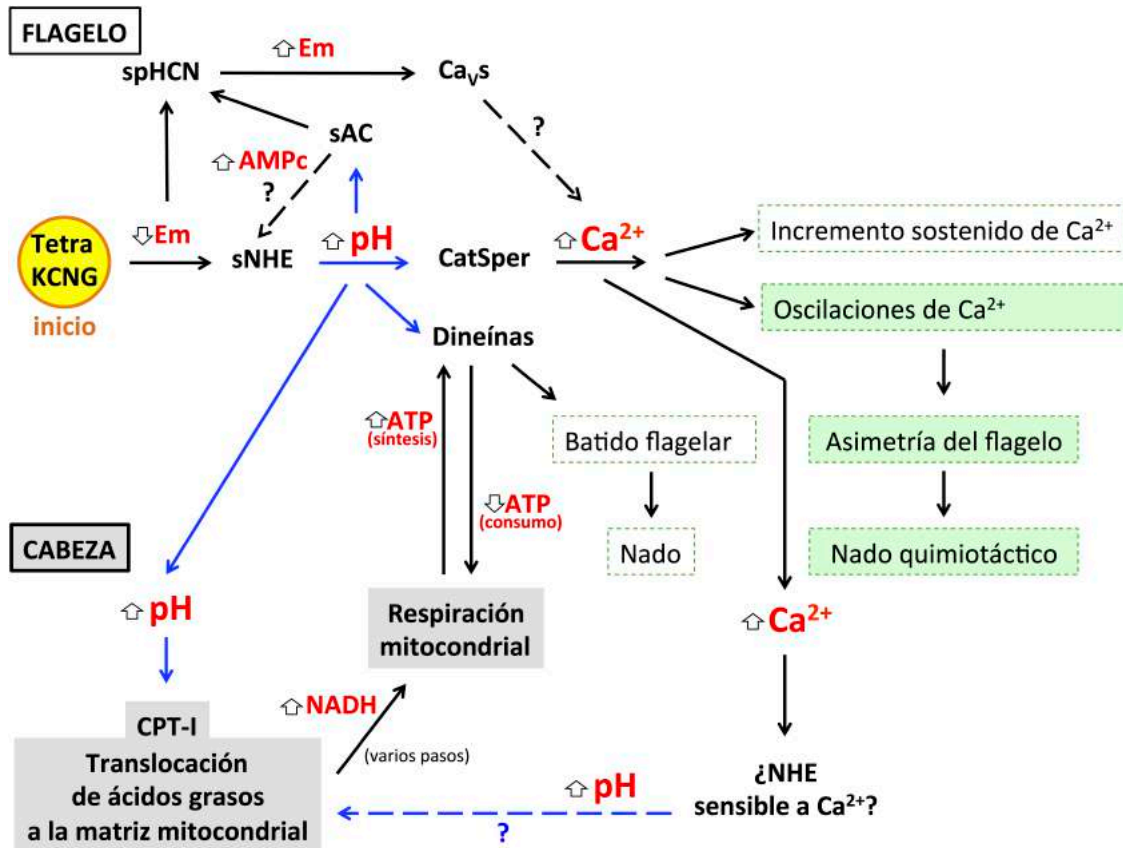
Por otra parte, parece estar clara la importancia del incremento de NADH debido a su estrecha relación con la síntesis de ATP necesaria para mantener el nado del espermatozoide. Sin embargo, lo que no se entiende bien es la posible función o relevancia de la despolarización de la MMI que ocurre en respuesta al incremento de pHi y como consecuencia de la translocación de los ácidos grasos hacia la MM (García-Rincón et al. 2016). En distintos sistemas celulares, el potencial mitocondrial modula el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la MMI que contiene transportadores que permiten la entrada y la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el mCU y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial o el  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . En estos sistemas, el potencial

negativo de la MMI (-180 mV) favorece la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la MM (Pizzo et al. 2012). Cambios en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial influyen en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas, contribuyendo a la señalización celular (Poburko & Demaurex 2012). Por tanto, el  $\text{pHi}$ , de manera indirecta podría tener un papel regulador de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriales y en consecuencia influir en el perfil de los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos que controlan el nado del espermatozoide.

Experimentos en población de espermatozoides de la especie *L. pictus*, en presencia de inhibidores mitocondriales que despolarizan el potencial de la MMI, como el desacoplante CCCP y el inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria Antimicina A (AA), indican que en el espermatozoide del erizo de mar la mitocondria tiene una contribución en la modulación de los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta al speract (González-Cota, datos no publicados). En particular la fase de descenso de la respuesta al speract es más rápida en presencia de tales inhibidores. Experimentos en presencia de CGP, inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, reproducen los resultados observados con CCCP y AA. En conjunto estos datos implican que durante la respuesta al speract, la mitocondria, a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, libera  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol contribuyendo a incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  en la fase de descenso de la respuesta (González-Cota, datos no publicados). Lo cual se ha visto en otros sistemas (Nita et al. 2015). Sería interesante hacer experimentos en células individuales para investigar la relación entre los cambios en el  $\text{pHi}$ , el potencial mitocondrial y el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y citosólico, para tratar de establecer si el cambio de potencial mitocondrial causado por el cambio de  $\text{pHi}$  influye sobre el calcio intracelular tal como parecen indicar los experimentos en población.

Considerando todo lo anterior parece ser que el  $\text{pHi}$  es un modulador central de la fisiología del espermatozoide de erizo de mar (figura 6-1), que se encarga de que los sistemas básicos se mantengan activos, tales como el nado, la síntesis de ATP, la disponibilidad de sustratos metabólicos y la respiración, y por otra parte,

potencialmente también podría regular procesos como el nado quimiotáctico a través de la regulación de canales iónicos como CatSper y posiblemente a través de la modulación de la actividad mitocondrial. Por tanto, el estudio del pH<sub>i</sub> es clave para entender la fisiología del espermatozoide.



**Figura 6-1. Modelo esquemático de la contribución del Ca<sup>2+</sup> y el pH interno en la fisiología del espermatozoide de erizo de mar en la respuesta al speract.** Por simplicidad sólo se muestran los cambios directamente relacionados con el incremento de pH<sub>i</sub> y los flujos de Ca<sup>2+</sup> e inicia a partir de la activación del tetraKCNG. En la parte superior se ubican los cambios que ocurren en el flagelo y en la parte inferior los que ocurren en la cabeza. Una vez que el speract se une a su receptor y tras la estimulación de la GC ocurre un incremento de GMPc que activa al tetraKCNG causando una hiperpolarización de la membrana plasmática (flecha hacia abajo). Esta hiperpolarización estimula al spHCN que causa una despolarización de la membrana plasmática (flecha hacia arriba) y al sNHE que induce un incremento de pH<sub>i</sub>. El cambio de pH<sub>i</sub> tiene varios efectos en el flagelo. Por una parte estimula a la sAC induciendo un incremento en AMPc que junto con la hiperpolarización activa al spHCN y contribuiría a la despolarización de la membrana plasmática. Nuestros datos indican que el incremento de pH<sub>i</sub> además estimula la apertura de un canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de pH, posiblemente CatSper, el cual contribuiría al incremento de Ca<sup>2+</sup> y posiblemente a la regulación de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> que modulan el nado quimiotáctico (recuadros en verde). Adicionalmente nuestros datos sugieren la participación de un segundo tipo de canal en la respuesta al speract, posiblemente los Ca<sub>v</sub>s. La hiperpolarización removería su inactivación y se activarían tras la despolarización causada por el spHCN contribuyendo al incremento de Ca<sup>2+</sup> en el flagelo. La presencia de un CNBD en el sNHE sugiere que el incremento de AMPc podría influir en el incremento de pH<sub>i</sub> y este a su vez en la modulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup>, posiblemente a través de CatSper, lo que explicaría la propuesta de la entrada de Ca<sup>2+</sup> modulada por AMPc.

Esto nos permite proponer que la regulación coordinada de estos flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  modulados en parte por el pHi contribuye a la generación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que regulan la quimiotaxis. Finalmente, el incremento de pHi en el flagelo activaría a las dineínas, proteínas motoras del flagelo, responsables del batido flagelar que mantiene el nado basal del espermatozoide. El aumento en el consumo de ATP por las dineínas estimula la respiración y síntesis de ATP mitocondrial manteniendo los niveles de ATP necesarios para el nado del espermatozoide. Nuestros datos indican que en la respuesta al speract, además del incremento de pHi en el flagelo, ocurre un incremento de pHi en la cabeza. Pensamos que este incremento estimula a la CPT-I, asociada a la MME, induciendo la translocación de los ácidos grasos hacia la MM y estimulando la  $\beta$ -oxidación y el ciclo de Krebs. En estos procesos se produce NADH, sustrato importante para la cadena respiratoria que en consecuencia estimula la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, tal como se ha propuesto recientemente (García-Rincón et al. 2016). Lo anterior representa un segundo mecanismo regulado por el pHi para mantener los niveles de ATP necesarios para el nado. Nuestras observaciones sugieren que en la cabeza, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  modula parcialmente el incremento de pHi, posiblemente a través de intercambiadores de la familia NHE sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto posiblemente contribuya a mantener un nivel de pHi óptimo para la actividad de la CPT-I y así asegurar el flujo de sustratos para la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Las flechas azules indican la participación del pHi. Las flechas punteadas indican propuestas o datos no confirmados. Los cambios en recuadros en gris indican eventos en los que participa la mitocondria que se localiza en la base de la cabeza.



## 7. CONCLUSIONES

- El incremento de pHi inducido por el speract ocurre tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide y se inhibe por alto  $K^+$  externo en ambas regiones.
- El aumento de pHi inducido por el speract en el flagelo es independiente de  $Ca^{2+}$  externo, mientras que el de la cabeza depende parcialmente del  $Ca^{2+}$  externo.
- El incremento de pHi precede a la elevación de  $Ca^{2+}$  en la respuesta inducida por el speract y el GMPc.
- La alcalinización inducida por  $NH_4Cl$  provoca una entrada de  $Ca^{2+}$ , primero en el flagelo y después en la cabeza del espermatozoide.
- En conjunto, los datos sugieren que el pHi modula los flujos de  $Ca^{2+}$  en la respuesta al speract.

## 8. PERSPECTIVAS

- Determinar la participación y contribución de CatSper y los  $Ca_v$ s en las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  inducidas por el speract utilizando herramientas farmacológicas, para tratar de entender su modulación.
- Evaluar la participación de CatSper en el nado quimiotáctico del espermatozoide de erizo de mar.
- Registrar las corrientes de CatSper en el espermatozoide de erizo de mar para demostrar su expresión funcional e investigar sus propiedades biofísicas y farmacológicas.
- Evaluar el efecto del AMPc en los flujos de  $Ca^{2+}$  y de  $H^+$  para tratar de entender su participación en la respuesta al speract en células individuales.
- Explorar la vía de alcalinización dependiente de  $Ca^{2+}$  en la cabeza del espermatozoide para identificar elementos en esta región que participan en la homeostasis del pHi.
- Inmunolocalizar a CatSper y al sNHE con alta resolución espacial para tratar de entender el acoplamiento funcional de ambas proteínas.
- Investigar si hay oscilaciones de pHi que pudieran estar regulando las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en el flagelo en respuesta al speract en el espermatozoide de erizo de mar.

## 9. REFERENCIAS

- Afzelius, B., 1959. Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 5(2), pp.269–78.
- Afzelius, B.A. & Mohri, H., 1966. Mitochondria respiring without exogenous substrate. A study of aged sea urchin spermatozoa. *Experimental cell research*, 42(1), pp.10–7.
- Avenarius, M.R. et al., 2009. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *American Journal of Human Genetics*, 84(4), pp.505–510.
- Babcock, D.F. et al., 1992. Early persistent activation of sperm K<sup>+</sup> channels by the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), pp.6001–5.
- Berg, J.M., Tymoczko J.L. & Stryer L, 2002. Biochemistry, 5th edition. New York: WH Freeman.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), pp.11–21.
- Böhmer, M. et al., 2005. Ca<sup>2+</sup> spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *The EMBO journal*, 24(15), pp.2741–2752.
- Bonigk, W. et al., 2009. An Atypical CNG Channel Activated by a Single cGMP Molecule Controls Sperm Chemotaxis. *Science Signaling*, 2(94), pp.ra68–ra68.
- Boron, W.F., 2004. Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education*, 28(1-4), pp.160–79.
- Briggs, E. & Wessel, G.M., 2006. In the beginning... Animal fertilization and sea urchin development. *Developmental Biology*, 300(1), pp.15–26.
- Brokaw, C.J., 1967. Adenosine Triphosphate Usage by Flagella. *Science*, 156(3771), pp.76–78.
- Cai, X. & Clapham, D.E., 2008. Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSperbeta. *PloS one*, 3(10), p.e3569.
- Cardullo, R.A. et al., 1994. Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Developmental biology*, 162(2), pp.600–7.
- Christen, R., Schackmann, R.W. & Shapiro, B.M., 1982. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Journal of biological chemistry*, 257(24), pp.14881–90.
- Christen, R., Schackmann, R.W. & Shapiro, B.M., 1983. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *The Journal of biological chemistry*, 258(9), pp.5392–9.

- Clapham, D.E., 2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), pp.1047–1058.
- Cook, S.P. et al., 1994. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Developmental biology*, 165(1), pp.10–9.
- Cook, S.P. & Babcock, D.F., 1993. Activation of Ca<sup>2+</sup> permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *The Journal of biological chemistry*, 268(30), pp.22408–13.
- Cook, S.P. & Babcock, D.F., 1993. Selective modulation by cGMP of the K<sup>+</sup> channel activated by speract. *The Journal of biological chemistry*, 268(30), pp.22402–7.
- Dan, J.C., 1952. Studies on the Acrosome. I. Reaction to Egg-Water and Other Stimuli. *Biological Bulletin*, 103(1), p.54.
- Darszon, A. et al., 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), pp.1305–1355.
- Darszon, A. et al., 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 131(6), pp.977–988.
- Darszon, A. et al., 2008. Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *The International journal of developmental biology*, 52(5-6), pp.595–606.
- Denton, R.M., 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(11), pp.1309–1316.
- Espinal, J. et al., 2011. Discrete Dynamics Model for the Speract-Activated Ca<sup>2+</sup> Signaling Network Relevant to Sperm Motility. *PLoS One*, 6(8), p.e22619.
- Espinal-Enríquez, J. et al., 2014. In silico determination of the effect of multi-target drugs on calcium dynamics signaling network underlying sea urchin spermatozoa motility. *PLoS One*, 9(8), p.e104451.
- Espinal-Enríquez, J. et al., 2016. Network model predicts that CatSper is the main Ca<sup>2+</sup> channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *PLoS One*, sometido.
- Esposito, G. et al., 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), pp.2993–2998.
- Fliegau, M., Benzing, T. & Omran, H., 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), pp.880–93.
- Galindo, B.E. et al., 2000. Participation of a K(+) channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of stronglyloccentrotus purpuratus sea urchin sperm. *Developmental biology*, 221(2), pp.285–94.
- Galindo, B.E. et al., 2007. Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K+ channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(3), pp.668–675.
- Garbers, D.L., 1981. The elevation of cyclic AMP concentrations in flagella-less sea urchin sperm heads. *The Journal of biological chemistry*, 256(2), pp.620–4.

- García-Rincón, J., Darszon, A. & Beltrán, C., 2016. Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*.
- García-Soto, J. et al., 1987. Internal pH can regulate Ca<sup>2+</sup> uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Developmental biology*, 120(1), pp.112–20.
- García-Soto, J. & 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. *Developmental biology*, 110(2), pp.338–45.
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U.B., 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685), pp.583–7.
- Gibbons, I.R., 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *The Journal of cell biology*, 91(3 Pt 2), p.107s–124s.
- Gibbons, I.R. & Fronk, E., 1972. Some properties of bound and soluble dynein from sea urchin sperm flagella. *Journal of Cell Biology*, 54(2), pp.365–381.
- Granados-Gonzalez, G. et al., 2005. Identification of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in sea urchin sperm.
- Gray, J., 1928. The effect of dilution on the activity of spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 5(4), pp.337–344.
- Guerrero, A. et al., 1998. Acrosome reaction inactivation in sea urchin sperm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1401, pp.329–338.
- Guerrero, A. et al., 2013. Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients. *Journal of cell science*, 126(Pt 6), pp.1477–87.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., et al., 2010a. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344(1), pp.52–65.
- Guerrero, A., Wood, C.D., et al., 2010b. Tuning sperm chemotaxis. *Biochemical Society transactions*, 38(5), pp.1270–4.
- Guerrero, A. & Darszon, A., 1989. Evidence for the activation of two different Ca<sup>2+</sup> channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *The Journal of biological chemistry*, 264(33), pp.19593–9.
- Hansbrough, J.R. & Garbers, D.L., 1981. Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 256(3), pp.1447–52.
- Inaba, K., 2015. Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution. *Cilia*, 4(1), p.6.
- Inaba, K., 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological science*, 20(9), pp.1043–1056.
- Inaba, K., 2007. Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1101, pp.506–26.

- Johnson, C.H. et al., 1983. A volatile inhibitor immobilizes sea urchin sperm in semen by depressing the intracellular pH. *Developmental biology*, 98(2), pp.493–501.
- Kaupp, U.B. et al., 2003. The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature cell biology*, 5(2), pp.109–17.
- Khelifa, M. Ben et al., 2014. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *American journal of human genetics*, 94(1), pp.95–104.
- Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D.E., 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 439(February), pp.737–740.
- Lee, H.C., 1984a. A membrane potential-sensitive Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 259(24), pp.15315–9.
- Lee, H.C., 1984b. Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 259(8), pp.4957–63.
- Lee, H.C. & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), pp.16026–16032.
- Lee, H.C., Johnson, C. & Epel, D., 1983. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental biology*, 95(1), pp.31–45.
- Lishko, P. V, Botchkina, I.L. & Kirichok, Y., 2011. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), pp.387–91.
- Longo, F.J. & Anderson, E., 1969. Sperm differentiation in the sea urchins *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of ultrastructure research*, 27(5), pp.486–509.
- Mita, M. & Nakamura, M., 1998. Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: an approach based on echinoid phylogeny. *Zoological science*, 15(1), pp.1–10.
- Mohri, H. & Ogawa, K., 1975. Tubulin and dynein in spermatozoan motility. In Afzelius, B. A. (Ed) *The functional anatomy of the spermatozoon*. Proceedings of the second international symposium. Wenner-Gren Center, Stockholm, August 1973. Headington Hill Hall: Pergamon Press, pp.161-168.
- Nishigaki, T. et al., 2004. A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca<sup>2+</sup> before its increase. *Developmental biology*, 272(2), pp.376–88.
- Nishigaki, T., José, O., et al., 2014a. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), pp.1149–58.
- Nishigaki, T. et al., 2006. Stroboscopic illumination using light-emitting diodes

- reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *BioTechniques*, 41(2), pp.191–197.
- Nishigaki, T. et al., 2001. Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(2), pp.531–5.
- Nishigaki, T., González-Cota, A.L. & Orta Salazar, G.J., 2014b. CatSper in Male Infertility. In *Pathologies of Calcium Channels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 713–728.
- Nita, L.I., Hershinkel, M. & Sekler, I., 2015. Life after the birth of the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX. *Science China Life Sciences*, 58(1), pp.59–65.
- Nomura, M. et al., 2005. A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene*, 353(2), pp.231–8.
- Okuno, M. & Brokaw, C.J., 1979. Inhibition of movement of tritium-demembrated sea-urchin sperm flagella by Mg<sup>2+</sup>, ATP<sup>4-</sup>, ADP and P<sub>1</sub>. *Journal of cell science*, 38, pp.105–23.
- Orlowski, J. & Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp.549–565.
- Pichlo, M. et al., 2014. High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor. *The Journal of cell biology*, 206(4), pp.541–57.
- Pizzo, P. et al., 2012. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis: Mechanism, role, and tissue specificities. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 464(1), pp.3–17.
- Poburko, D. & Demaurex, N., 2012. Regulation of the mitochondrial proton gradient by cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 464(1), pp.19–26.
- Putnam R.W., 2011. Intracellular pH regulation. In Sperelakis N. (Ed), *Cell physiology sourcebook, essentials of membrane biophysics*. San Diego, California: Academic Press, pp. 303–321.
- Quill, T.A., Wang, D. & Garbers, D.L., 2006. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250, pp.84–92.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rasband, W.S., 1997–2014. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Ren, D. et al., 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), pp.603–9.
- Reynaud, E. et al., 1993. Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH

- changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS letters*, 329(1-2), pp.210–4.
- Rizzuto, R. & Pozzan, T., 2006. Microdomains of Intracellular Ca<sup>2+</sup>: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological reviews*, 86(1), pp.369–408.
- Rodríguez, E. & Darszon, A., 2003. Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *The Journal of physiology*, 546(Pt 1), pp.89–100.
- Rothschild, L. & Cleland, K.W., 1952. The physiology of sea-urchin spermatozoa - the nature and location of the endogenous substrate. *Journal of Experimental Biology*, 29(1), pp.66–71.
- Satir, P. & Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*, 69, pp.377–400.
- Schackmann, R.W. & 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. *The Journal of biological chemistry*, 261(19), pp.8719–28.
- Schackmann, R.W., Eddy, E.M. & Shapiro, B.M., 1978. The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirements and movements. *Developmental biology*, 65(2), pp.483–95.
- Schuh, K. et al., 2004. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), pp.28220–28226.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp.941–52.
- Seifert, R. et al., 2015. The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *The EMBO journal*, 34(3), pp.379–92.
- Shapiro, B.M. & Tombes, R.M., 1985. A biochemical pathway for a cellular behaviour: pHi, phosphorylcreatine shuttles, and sperm motility. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 3(3), pp.100–3.
- Smith, J.F. et al., 2013. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca<sup>2+</sup> channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), pp.6823–8.
- Solzin, J. et al., 2004. Revisiting the role of H<sup>+</sup> in chemotactic signaling of sperm. *The Journal of general physiology*, 124(2), pp.115–24.
- Strünker, T. et al., 2006. A K<sup>+</sup>-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nature cell biology*, 8(10), pp.1149–54.
- Strünker, T. et al., 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca



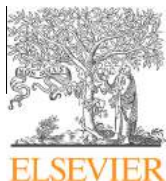
- 21 influx in human sperm. *Nature*, 471.
- Su, Y.-H. & Vacquier, V.D., 2002. A flagellar K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger keeps Ca<sup>2+</sup> low in sea urchin spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), pp.6743–6748.
- Suzuki, N. et al., 1984. A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 259(23), pp.14874–14879.
- Tarasov, A.I., Griffiths, E.J. & Rutter, G.A., 2012. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, 52(1), pp.28–35.
- Tombes, R.M. & Shapiro, B.M., 1985. Metabolite channeling: A phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*, 41(1), pp.325–334.
- Trimmer, J.S. & Vacquier, V.D., 1986. Activation of sea urchin gametes. *Annual review of cell biology*, 2, pp.1–26.
- Wang, D. et al., 2003. A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature cell biology*, 5(12), pp.1117–22.
- Ward, G.E. et al., 1985. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *The Journal of cell biology*, 101(6), pp.2324–9.
- Ward, G.E., Moy, G.W. & Vacquier, V.D., 1986. Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *The Journal of cell biology*, 103(1), pp.95–101.
- Ward, G.E. & Vacquier, V.D., 1983. Dephosphorylation of a major sperm membrane protein is induced by egg jelly during sea urchin fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(18), pp.5578–5582.
- Williams, G.S.B., Boyman, L. & Lederer, W.J., 2015. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, pp.35–45.
- Wood, C.D. et al., 2007. Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca<sup>2+</sup> spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental biology*, 306(2), pp.525–37.
- Wood, C.D. et al., 2005. Real-time analysis of the role of Ca<sup>(2+)</sup> in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *The Journal of cell biology*, 169(5), pp.725–31.
- Wood, C.D., Darszon, A. & Whitaker, M., 2003. Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *The Journal of cell biology*, 161(1), pp.89–101.

## APÉNDICE

### Artículos publicados

1. **González-Cota A.L.**, Silva P.Â., Carneiro J., Darszon A., 2015. Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in sea urchin spermatozoa, *FEBS Letters*, 589(16), pp.2146–2154.

2. Nishigaki, T., José, O., **González-Cota, A.L.**, Romero F., Treviño, C.L., Darszon A., 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), pp.1149–58.



## Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of $\text{Ca}^{2+}$ influx in sea urchin spermatozoa



Ana Laura González-Cota<sup>a</sup>, Pedro Ângelo Silva<sup>b</sup>, Jorge Carneiro<sup>b</sup>, Alberto Darszon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Mor., México

<sup>b</sup>Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 May 2015

Revised 18 June 2015

Accepted 18 June 2015

Available online 2 July 2015

Edited by Maurice Montal

#### Keywords:

Sperm

Sea urchin

Speract

Intracellular pH and  $\text{Ca}^{2+}$

Motility regulation

### ABSTRACT

**Speract, a peptide from the egg jelly coat of certain sea urchin species, modulates sperm motility through a signaling pathway involving several ionic fluxes leading to pHi and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increases.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in the flagellum regulate its beating pattern modulating sperm swimming. Recent evidence showed the importance of pHi in controlling  $\text{Ca}^{2+}$  influx and chemotaxis. However, spatio-temporal characterization of the flagellar pHi increase triggered by speract, and its correlation to that of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is lacking. Here, we show for the first time in single sea urchin spermatozoa that the speract-induced flagellar pHi increase precedes and is independent of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. Our results support a leading role of pHi in modulating the  $\text{Ca}^{2+}$  signals that govern sperm swimming.**

© 2015 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

### 1. Introduction

Speract, a decapeptide isolated from the jelly coat of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin eggs, regulates sperm motility through biochemical and ion permeability changes. Speract binds to its receptor stimulating cGMP synthesis, and this nucleotide activates a  $\text{K}^+$ -selective cyclic nucleotide dependent channel (tetraKCNNG) causing a membrane potential hyperpolarization that has been proposed to increase intracellular pH (pHi) and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (reviewed in [1]). Speract induces  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations that modulate flagellar beating and sperm swimming [2,3]. However, how pHi influences sea urchin sperm motility is not fully understood [4–6].

It has been proposed that the pHi increase might be caused by the activation of the voltage dependent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE)

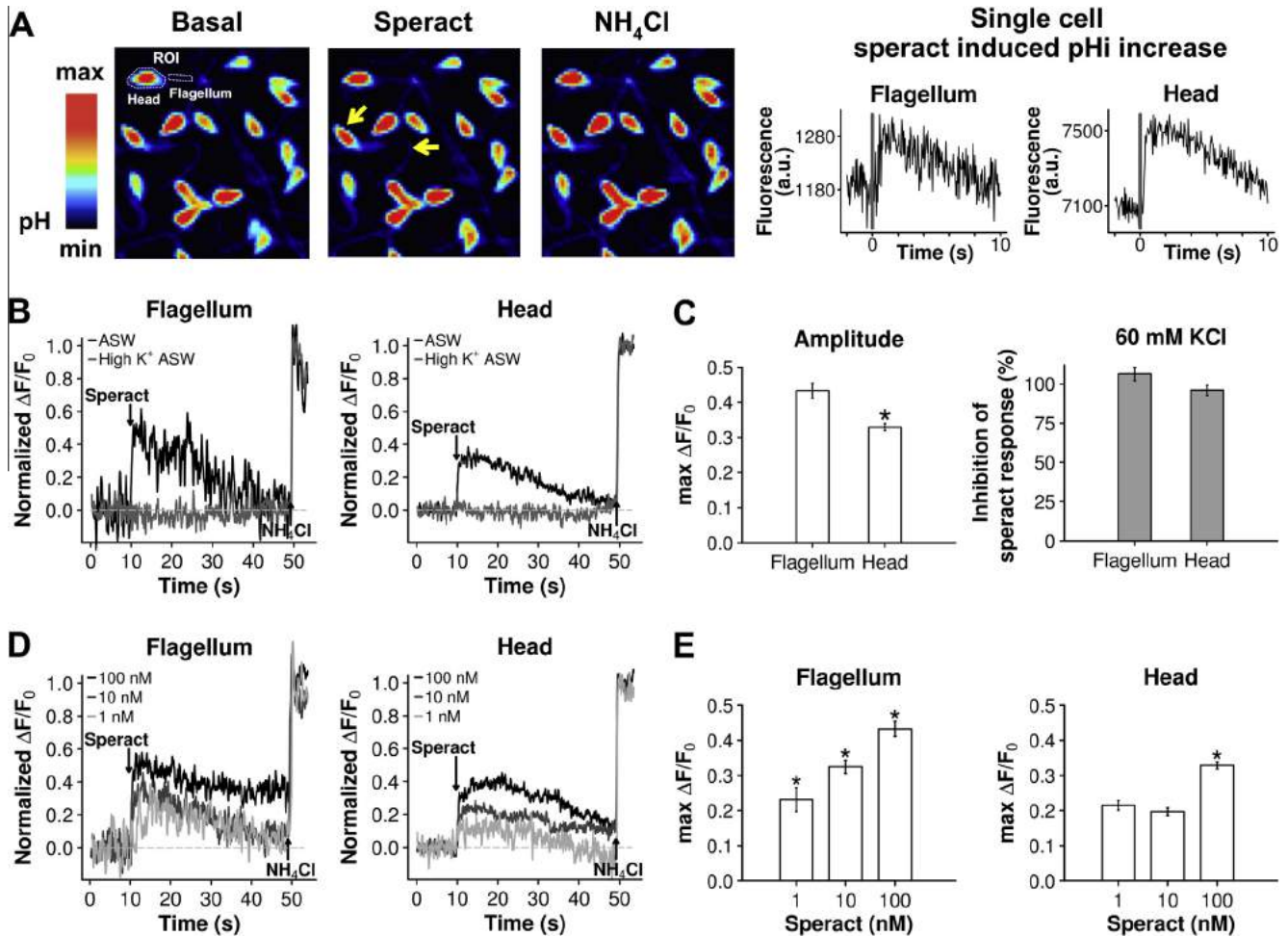
localized in the sperm flagella [7], upon the speract-induced hyperpolarization [8]. On the other hand, sea urchin sperm have been shown to possess a pHi dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx [6,9–11]. In this regard, our group found that speract from pM to nM concentrations increases pHi before  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in *S. purpuratus* sperm populations [12,13]. Although earlier sperm population studies in *Arbacia punctulata* concluded that pM resact (the corresponding chemoattractant peptide) first elevates  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and then pHi, and that this alkalization did not influence chemotaxis [14], recently the authors of this study reported that alkalization precedes the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation, and importantly, that it presumably stimulates CatSper, a sperm specific pHi-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel, which regulates chemotaxis in this species [6]. However, to date, there is no spatial or temporal information regarding the pHi changes induced by the chemoattractant peptides in single cells. In the case of the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fluo-4 it has been estimated that the sperm head signal contributes >80% of the entire sea urchin sperm fluorescence signal [15]; consequently, sperm population studies reflect predominantly fluorescence changes occurring in this cellular compartment. It is therefore crucial to determine and compare when and where speract induces pHi and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes using single cell measurements, to better understand how this peptide regulates sperm swimming.

**Abbreviations:** ASW, artificial seawater; NCaFASW, nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free ASW; susAC, sea urchin soluble adenylate cyclase

**Author contributions:** A.D. and A.L.G.C. conceived and supervised the study; A.L.G.C. designed and performed the experiments; all authors helped implementing the analysis; A.L.G.C., P.S. and J.C. analyzed data; A.L.G.C. and A.D. wrote the manuscript; all authors revised the manuscript.

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

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



**Fig. 1.** pH changes induced by speract in sperm heads and flagella. (A) Images of BCECF-loaded *S. purpuratus* sperm before stimulus (left) and after adding 100 nM speract (middle) or 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (right). The basal image also illustrates the outline of flagellar and head ROIs used. Images shown were corrected for photobleaching using the imageJ Bleach Corrector plugin for illustrative purposes. On the right, raw traces of the speract response from the sperm indicated by the yellow arrows; the gray bar indicates the time of speract addition. On average, the speract induced pH<sub>i</sub> rise never caused more than a 10% increase in  $F_0$ . From here on all traces were normalized and corrected for background and photobleaching according to Section 2. (B) Representative pH<sub>i</sub> traces of an individual sperm head and flagellum responding to speract and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in ASW (control) and in high  $\text{K}^+$  ASW (inhibitory condition). (C) White bars represent the average amplitude of the pH<sub>i</sub> increase (denoted as  $\text{max } \Delta F/F_0$ ) measured on normalized traces during the initial rise (first 3 s) of the speract response ( $n = 166$  heads (h)/92 flagella (f)). Gray bars represent inhibition % of the pH<sub>i</sub> increase amplitude in high  $\text{K}^+$  ASW relative to control ASW ( $n = 141$  h/87 f). (D) Representative traces of pH<sub>i</sub> changes from individual sperm exposed to different speract concentrations on ASW (1, 10 and 100 nM). (E) Average amplitude of the pH<sub>i</sub> increase measured during the first 3 s of the speract response in heads or flagella ( $n = 99$  h/29 f (1 nM); 95 h/69 f (10 nM); 166 h/92 f (100 nM)). Traces were normalized by the maximal value of each  $\text{NH}_4\text{Cl}$  response. Images were acquired at 20 fps.  $P < 0.01$ .

Here we studied for the first time the spatial and temporal distribution of the pH<sub>i</sub> increase induced by speract in single sea urchin sperm. We found that speract causes a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent pH<sub>i</sub> increase in the sperm flagellum and in the head. Furthermore, the pH<sub>i</sub> increase clearly precedes the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation in the sperm flagellum and head. This conclusion was confirmed by uncaging cGMP which also elevates pH<sub>i</sub> in the sperm flagellum and head before increasing  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The ability of alkalization to elevate  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was further supported by the finding that raising pH<sub>i</sub> with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  increases  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in the sperm flagellum prior to the head region. Our results suggest that the speract-induced pH<sub>i</sub> increase stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the flagellum, thus contributing to sperm motility regulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells, media and reagents

Sperm from *S. purpuratus* (Pamanes, S.A. de C.V., Ensenada B.C., México) were obtained by intracoelomic injection of 0.5–1 ml of 0.5 M KCl, collected and stored undiluted on ice until used within

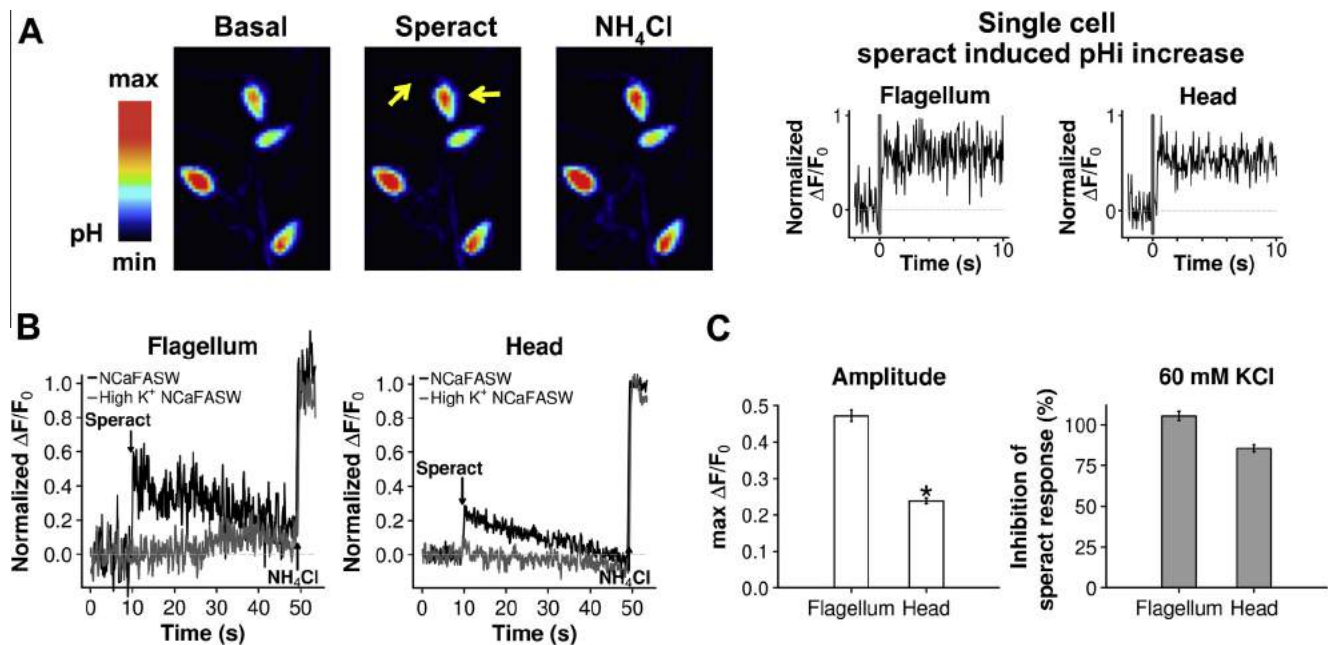
24 h. Complete artificial seawater pH 7.8 (ASW) contained (mM): 486 NaCl, 10 KCl, 10  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{MgCl}_2$ , 30  $\text{MgSO}_4$ , 2.5  $\text{NaHCO}_3$ , 10 HEPES and 0.1 EDTA. High  $\text{K}^+$  ASW contained 60 mM KCl. Low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW pH 7.0 contained 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free ASW (NCaFASW) was ASW pH 7.8 containing 1.36 mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 mM EGTA to approximately simulate the resting sea urchin sperm  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [15]. Free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was estimated using MaxChelator program (v.2.1, <http://maxchelator.stanford.edu>). Speract was

**Table 1**

Proportion of responsive cells per sperm region.

Speract (nM)	1	10	100
Sperm region			
Head (%)	72 ± 11	86 ± 9	99 ± 1
Flagellum (%)	33 ± 6	57 ± 14	84 ± 7

A pH<sub>i</sub> response was defined as the sustained increase in BCECF fluorescence above the base line reached after the speract addition as described in Materials and methods. The number of responsive cells increased with the speract concentration. pH<sub>i</sub> responses could not be detected for speract concentrations below 1 nM in the sperm flagellum. 421 sperm heads and 319 sperm flagellum were analyzed from three independent experiments.



**Fig. 2.** Speract-induced pH changes in “Nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free ASW (NCaFASW)”. (A) Images of BCECF-loaded *S. purpuratus* sperm before stimulus (left) and after adding 100 nM speract (middle) or 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (left). Images were corrected for photobleaching as in Fig. 1. On the right, traces of the speract response from the cell marked with yellow arrows; the gray bar indicates the time of speract addition. Traces were normalized by the maximal value of the speract response within the displayed time interval. (B) Representative traces of pH changes from an individual sperm head and flagellum in NCaFASW (control) and in presence of high  $\text{K}^+$  NCaFASW (inhibitory condition). Traces were normalized by the maximal value of the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  response. (C) White bars represent the average amplitude of the pH increase ( $\text{max } \Delta F/F_0$ ) measured as in Fig. 1 ( $n = 337$  h/178 f). Gray bars represent inhibition % of the pH increase amplitude in high  $\text{K}^+$  NCaFASW relative to control ( $n = 236$  h/281 f). Four independent experiments were performed. Images were acquired at 20 fps.  $^*P < 0.01$ .

synthesized by Dr. Tatsu Yoshiro (AIST, Japan). Esterified caged cGMP (Bhc-cGMP/Ac) was synthesized by Dr. Toshiaki Furuta [16]. BCECF-AM, Fluo-4-AM and pluronic F-127 were from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). Poly  $\text{l}$ -lysine (pLys) and other reagents, unless indicated, were from Sigma–Aldrich (Toluca, Edo. de México, México).

## 2.2. Spermatozoa preparation and single-cell imaging

### 2.2.1. Loading

Dry sperm were suspended 1:5 (v/v) in low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW containing 0.5% (w/v) pluronic F-127 and 20  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM or BCECF-AM, and incubated 2.5 h at 14 °C. In the caged cGMP experiments 50  $\mu\text{M}$  Bhc-cGMP/Ac was added after 1 h incubation with dyes, and further incubated for 1.5 h at 14 °C. Loaded sperm were centrifuged 6 min at 1000 $\times$ g and 4 °C to remove external dye, resuspended in 1:5 (v/v) low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW and stored in the dark on ice until used.

### 2.2.2. Immobilizing

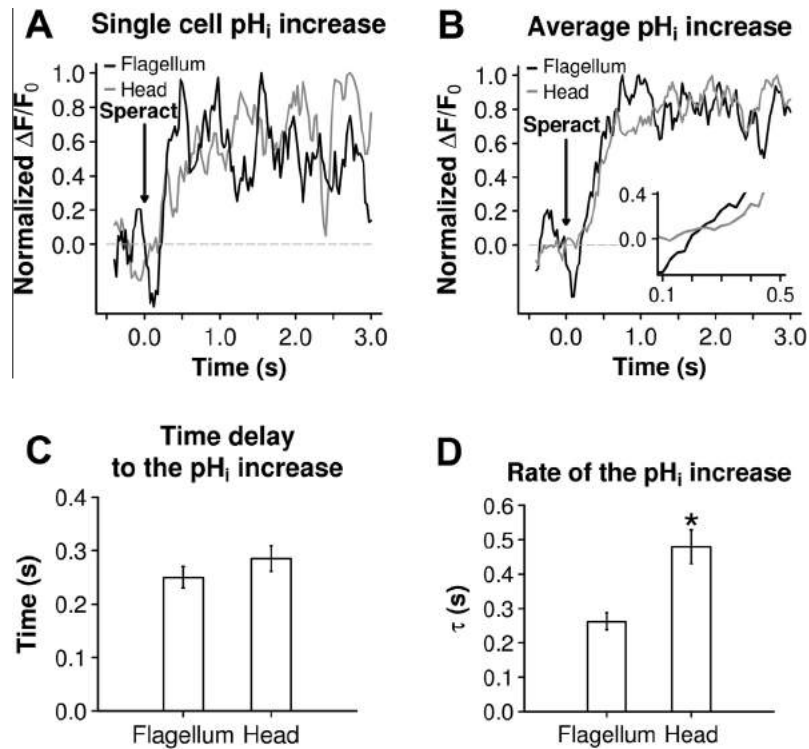
Coverslips coated with 10  $\mu\text{l}$  of a 0.1% (w/v) pLys solution on the center were incubated in a wet chamber 5 min–4 h to allow pLys binding without drying. The coverslips were then mounted on custom-made imaging chambers and the excess pLys washed with  $\text{H}_2\text{O}$  and then with low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW. 10  $\mu\text{l}$  of loaded sperm diluted 1:25 to 1:50 in low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW were added to the center of the chamber and left for 30 s. Unattached sperm were washed first with low  $\text{Ca}^{2+}$  ASW and then with recording ASW. Chambers were filled with 150  $\mu\text{l}$  of ASW unless otherwise indicated in the figure legends. Sperm separately loaded with Fluo-4 or BCECF were mixed together 1:1 (v/v) and then placed on the coverslip to measure  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and pH<sub>i</sub> in parallel. A fresh sperm dilution was used for each recording.

### 2.2.3. Imaging

Imaging chambers were placed on a PMDI-2 micro-incubator (TC-202A Bipolar temperature controller, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) mounted on an Eclipse TE300 microscope stage (Nikon Instruments, Melville, NY, USA) and maintained at 14 °C. The imaging system previously described [17] was used with minor modifications: Plan Apo 60 $\times$  1.4 N.A., oil immersion objective (Nikon), a LED-based stroboscopic light source and an iXon888 Ultra EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, NIR, UK). A Cyan LED (Luxeon V Star Lambertian, Lumileds Lighting LLC, San Jose, CA, USA) and the filter set: Ex: D492/18 $\times$ , DC: 505DCXRU, Em: HQ510LP (Chroma Technology, Rockingham, VT, USA) were employed to measure  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and pH<sub>i</sub> changes. Images were captured using the Andor iQ 1.8 software (Andor Technology) at 20, 30 or 40 frames/s (fps) (see Fig. Legends) with a 2 ms camera exposure time synchronized to the LED pulse duration and 2  $\times$  2 pixel binning. Speract and other substances were manually added. Caged cGMP was photoactivated as described in [12]. Total output energy of the flash lamp was 222 J.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) and ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ) were added at the end of each experiment to determine maximal BCECF and Fluo-4 fluorescence, respectively.

## 2.3. Image processing and data analysis

Regions of interest (ROI) were selected using imageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) [18]. In each ROI defined on either the head or the flagellum of individual sperm we measured at each time  $t$  the mean fluorescence  $F_{\text{raw}}(t)$ . To each  $F_{\text{raw}}(t)$  value we subtracted the mean fluorescence in the background ROI at the same instant obtaining a curve  $F(t)$ . An exponential function fitted to the values obtained before stimulation and extrapolated for the experimental time duration was then subtracted from  $F(t)$  to correct for



**Fig. 3.** Spatio-temporal analysis of the speract-induced pHi increase. (A) Representative traces of sperm pHi changes from an individual head and flagellum stimulated by 100 nM speract. (B) Average traces of the pHi change in heads and flagella induced by speract in one experiment ( $n = 11$  cells). Traces were normalized by the maximal value of the speract response within the displayed time interval. Inset shows the beginning of the response expanding the time scale. (C) Time delay for the pHi increase in head and flagellum after speract addition. The delay was determined manually as the time point where pHi distinctly begins to increase in traces of single heads and flagella from the same cell. (D) Time constant ( $\tau$ ) of the pHi increase from sperm heads and flagella. Traces from each ROI were fitted using the single-exponential growth model:  $F_{\text{max}}(1 - e^{-k(t - t_0)})$ , where  $F_{\text{max}}$  is the maximal BCECF value reached after the speract addition,  $k$  is the rate constant and  $t$  are the time values;  $\tau$  was calculated as  $1/k$ .  $n = 34$  cells from 3 animals. Images were acquired at 40 fps. \* $P < 0.01$ .

photobleaching and obtain  $F(t)$ . Then the offset induced by vehicle control addition was subtracted. The pHi and  $[Ca^{2+}]_i$  are reported as  $\Delta F/F_0$  where  $\Delta F$  is  $F(t)$ , and  $F_0$  is the fluorescence value of the fitted curve before speract addition. A five-point moving average filter was used for noise reduction. To allow comparison and averaging independent spermatozoa, BCECF and Fluo-4 data were equally treated and normalized using the maximal value obtained with  $NH_4Cl$  or ionomycin, respectively, per ROI. In BCECF/Fluo-4 parallel measurements, fluorophores were distinguished according to the cell response to  $NH_4Cl$  or ionomycin, which were added consecutively at the end of each experiment. As chemotaxis occurs during the first 3 s of the speract response [3], only the first 3 s of the pHi response were used for the kinetic analysis. Only paired (flagellum and head of the same cell) and responsive cells were considered for kinetic analysis. The pHi response was assessed comparing the BCECF fluorescence level before and after speract addition on each ROI, and was defined as the sustained and significant increase ( $P$ -value  $< 0.01$ ) in BCECF fluorescence above the base line reached after the speract addition. Analysis was performed using R software v 3.1.0 [19].

#### 2.4. Statistical analysis

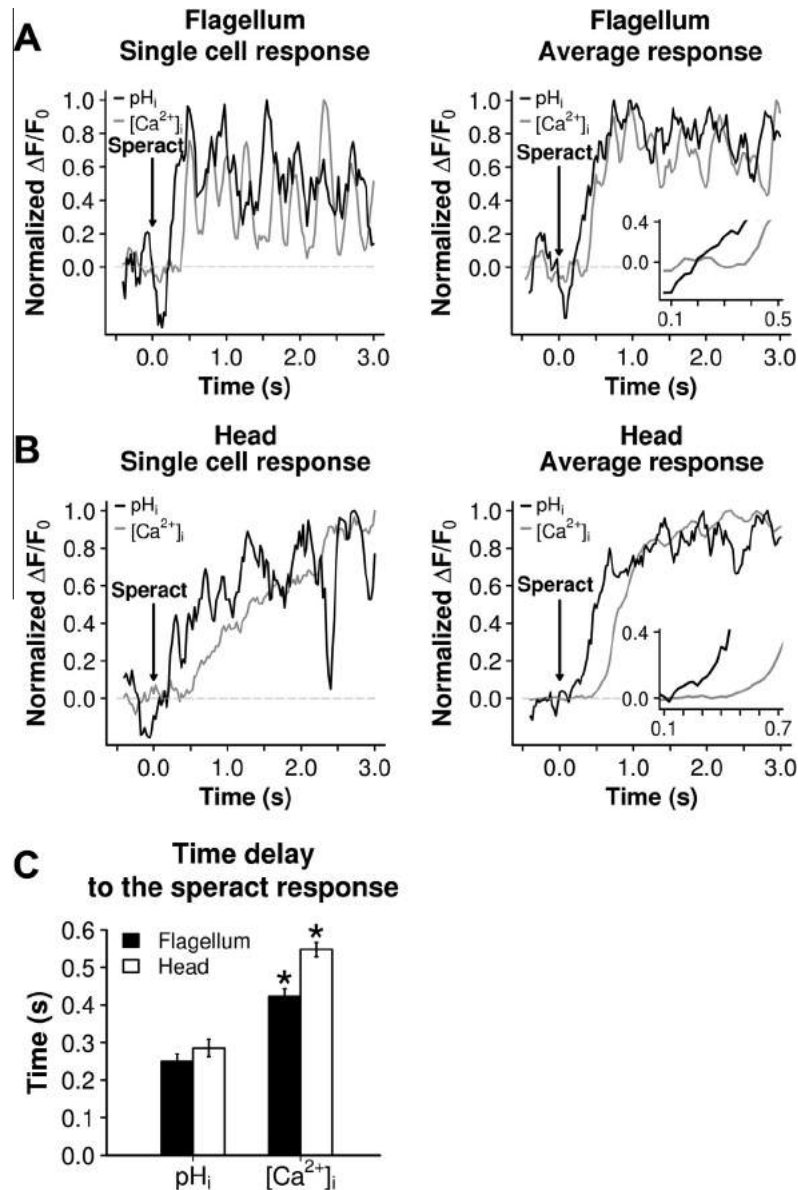
At least three sea urchins were independently used as sperm source. A minimum of nine cells were analyzed for each pHi and  $[Ca^{2+}]_i$  condition from each animal. Data are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) of the quantity measured in individual cells analyzed on each experiment. Comparisons between experimental groups were performed using two-sample non-parametric Mann–Whitney Test at a 95% significance level. Paired-tests were performed when comparing

head and flagellum in the same cell. Bonferroni correction was applied when performing multiple comparisons. Statistical analysis was performed using R software v 3.1.0 [19].

### 3. Results

#### 3.1. Speract-induced pHi changes in single sperm

Experimental conditions were developed to detect pHi changes induced by speract in single sperm including the flagellum. Fig. 1A shows a typical field with BCECF-loaded sperm before and after 100 nM speract stimulation, and following  $NH_4Cl$  addition as an alkalization control. At the right of the images we show the raw traces of the speract-induced pHi changes from the indicated sperm. High external  $K^+$  inhibits the pHi increase induced by speract in sperm population [20]; as anticipated, the speract-induced pHi response in the sperm head and flagellum was eliminated in high  $K^+$  ASW (Fig. 1B and C, gray traces and bars) while those induced by  $NH_4Cl$  were not (Fig. 1B), emphasizing the specificity of the speract response. Speract elevates pHi in the flagellum to a higher extent than in the head (max  $\Delta F/F_0 = 0.43 \pm 0.02$  and  $0.32 \pm 0.01$ , respectively;  $n = 3$ ; 166 heads, 92 flagella) (Fig. 1C, white bars). We detected dose-dependent pHi increases in the flagellum starting at 1 nM speract but not in the head at those lower concentrations (Fig. 1D and E). Also the proportion of responsive cells increased along with the speract concentration, however at low speract concentrations the flagellar responses were harder to detect (Table 1). As the main purpose of this study was to investigate the changes in the sperm flagellum we used 100 nM speract for the following experiments.



**Fig. 4.** Spatio-temporal relationship between the  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by speract in individual sperm. (A) Representative traces of the single cell response (left) and the average response (right) of the  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  changes induced by 100 nM speract on the sperm flagellum. (B) Same as A for sperm heads. Traces were normalized by the maximal value of the speract response as in Fig. 3. Average traces from one experiment ( $n = 11$  sperm for both pH and  $Ca^{2+}$  measurements). Inset shows the beginning of the response expanding the time scale. (C) The time delay for the  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  increases in heads and flagella estimated as in Fig. 3 ( $n = 34$  cells for pH and 29 for  $Ca^{2+}$  measurements from 3 animals).  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  changes were measured in parallel, as indicated in Section 2. Images were acquired at 40 fps. \* $P < 0.01$ . Comparisons were performed between  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  measurements of the same sperm region.

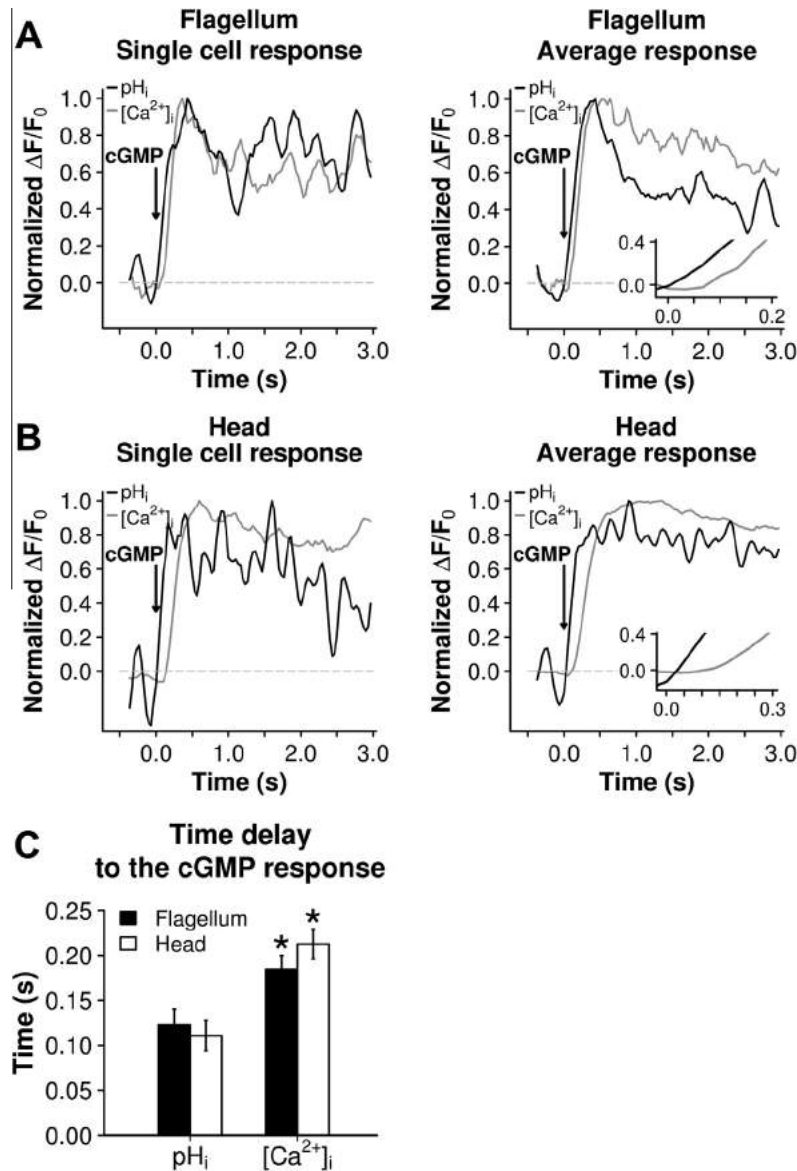
### 3.2. The speract-induced $pH_i$ increases in the sperm head and flagellum are independent of external $Ca^{2+}$

We examined the  $Ca^{2+}$ -dependence of the speract-induced  $pH_i$  increase at the single sperm level by recording responses in NCaFASW, a medium that equals the resting  $[Ca^{2+}]_i$  (350 nM) and completely prevents the speract-induced  $Ca^{2+}$  influx [15]. Under this condition speract raises sperm  $pH_i$  in the head and flagellum and, as in ASW, the  $pH_i$  increase is blocked by high  $K^+$  (Fig. 2). Though the  $pH_i$  increase in the sperm flagellum is not dependent on external  $Ca^{2+}$  ( $0.43 \pm 0.02$  in ASW and  $0.47 \pm 0.02$  in NCaFASW;  $n = 4$ ; 236 heads, 281 flagella), in the sperm head it was significantly reduced from  $0.32 \pm 0.01$  in ASW to  $0.24 \pm 0.01$  in NCaFASW (Figs. 1C and 2C, white bars). Thus, as the sperm head  $pH_i$  increase is partially  $Ca^{2+}$  dependent, probably there are at least

two different molecular entities regulating the  $pH_i$  increase in this compartment, one  $Ca^{2+}$ -dependent and another  $Ca^{2+}$ -independent. However, we can conclude that the alkalization triggered by speract in the sperm flagellum does not require  $Ca^{2+}$  influx.

### 3.3. $pH_i$ increases faster in the flagellum than in the head

To further characterize the  $pH_i$  increase induced by speract we studied its kinetics. For this purpose we imaged  $pH_i$  at 40 fps during the first 3 s of the speract response, which encompass the period in which speract-induced motility responses are observed in motile sea urchin spermatozoa [3]. We found that  $pH_i$  apparently rises first in the sperm flagellum ( $250 \pm 20$  ms) than in the head ( $285 \pm 23$  ms), albeit the time delay difference between the two compartments was not statistically significant (Fig. 3). In



**Fig. 5.** Comparison of the  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  changes induced by photolysis of caged cGMP in individual spermatozoa. (A) Representative traces of the single cell response (left) and the average response (right) of  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  changes from sperm flagella triggered by a UV flash on sperm loaded with the corresponding dye and caged cGMP. (B) The same as in A for sperm heads. Traces were normalized by the maximal value of the cGMP response as in Fig. 3. Average traces represent one experiment ( $n = 9$  cells for  $pH_i$  and 14 for  $Ca^{2+}$  measurements). Insets show the beginning of the responses expanding the time scale. (C) Time delay for the  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  increases induced by cGMP photolysis in heads and flagella ( $n = 28$  cells for  $pH_i$  and 45 for  $Ca^{2+}$  measurements from 3 animals). Changes of  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  were measured in parallel, as indicated in Section 2. Images were acquired at 30 fps.  $^*P < 0.01$ . Comparisons were performed between  $pH_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  measurements of the same sperm region.

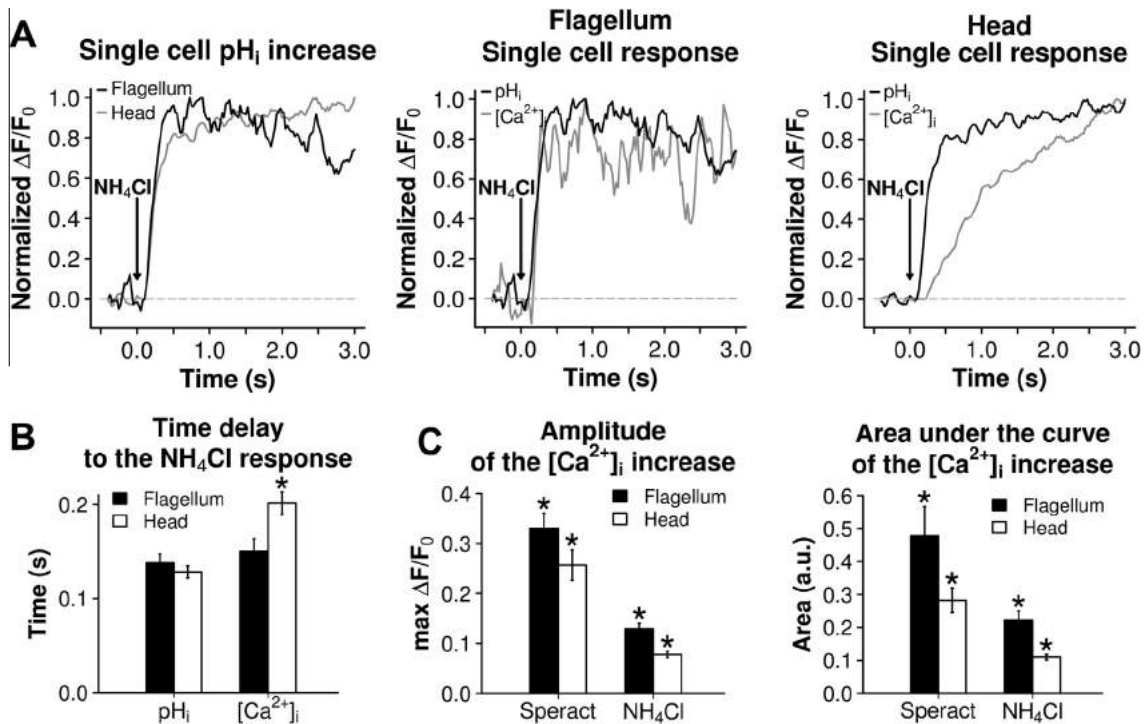
addition,  $pH_i$  increases significantly faster in the sperm flagellum ( $\tau = 260 \pm 25$  ms) than in the head ( $\tau = 480 \pm 49$  ms) (Fig. 3).

#### 3.4. The speract-induced $pH_i$ rise precedes the $Ca^{2+}$ increase in the flagellum and head

To investigate the temporal relationship between the speract-induced  $pH_i$  and  $Ca^{2+}$  increases, these changes were measured in parallel at 40 fps. We found that  $pH_i$  increases before  $[Ca^{2+}]_i$ . The time delay for  $pH_i$  was  $250 \pm 20$  ms and for  $[Ca^{2+}]_i$   $422 \pm 21$  ms in the sperm flagellum (Fig. 4A and C,  $n = 3$ ; 34 spermatozoa for  $pH$  and 29 for  $Ca^{2+}$  measurements). In the sperm head the delay was  $285 \pm 23$  ms for  $pH_i$  and  $547 \pm 20$  ms for  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 4B and C,  $n = 3$ ; 34 spermatozoa for  $pH$  and 29 for  $Ca^{2+}$  measurements).

To confirm these findings, we activated the speract signaling cascade by uncaging cGMP. After speract binds to its receptor this cyclic nucleotide increases [5] and stimulates the opening of a  $K^+$  channel [21,22]. It is thought that the resulting hyperpolarization stimulates the NHE present in the sperm flagellum [8] increasing  $pH_i$  and then, as shown in Fig. 4,  $[Ca^{2+}]_i$  elevates. Thus, uncaging cGMP, which has the additional advantage of simultaneously stimulating every cell in the imaging field in ms, should allow us to more clearly discern whether  $pH_i$  or  $[Ca^{2+}]_i$  is first to increase. As expected, our results confirmed that cGMP causes a fast  $pH_i$  increase in the sperm head and flagellum (Fig. 5). The cGMP-induced alkalization requires hyperpolarization as it is inhibited by high KCl (data not shown), as shown for the speract-induced  $pH_i$  response in Figs. 1 and 2. Additionally, we found that  $pH_i$  increases before  $[Ca^{2+}]_i$  with a time delay of





**Fig. 6.** Alkalinization-induced Ca<sup>2+</sup> influx in sperm heads and flagella. (A) Kinetic comparison of representative traces of pH<sub>i</sub> changes from the flagellum and head of an individual sperm stimulated by 10 mM NH<sub>4</sub>Cl (left). Representative traces of the single cell response of the pH<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes induced by 10 mM NH<sub>4</sub>Cl on the sperm flagellum (middle) and head (right). Traces were normalized by the maximal value of the NH<sub>4</sub>Cl response as in Fig. 3. (B) Time delay for the pH<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases induced by 10 mM NH<sub>4</sub>Cl in heads and flagella. Bars represent the means of 4 independent experiments ( $n = 102$  h/55 f for pH<sub>i</sub>; 63 h/29 f for Ca<sup>2+</sup> measurements). (C) Amplitude (left) and area under the curve (right) of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase induced by 100 nM speract and 10 mM NH<sub>4</sub>Cl in the sperm head and flagellum. Bars represent the means of these measurements for experiments previously shown on Fig. 4 for speract and 6A and B for NH<sub>4</sub>Cl. pH<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes were measured in parallel, as indicated in Materials and methods. Images were acquired at 40 fps. \* $P < 0.01$ . Comparisons were performed between different treatments on the same sperm region and between different regions of the same treatment.

122 ± 17 ms for pH<sub>i</sub> and 184 ± 15 ms for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in the sperm flagellum; and 110 ± 16 ms for pH<sub>i</sub> and 213 ± 16 ms for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in sperm head (Fig. 5C). Shorter time delays compared to speract were expected, since several reaction steps starting with peptide diffusion and ending in cGMP production were bypassed. These results with caged cGMP further support our findings that pH<sub>i</sub> increases before [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

### 3.5. An alkalinization induces a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in the sperm head and flagellum

Our findings [12] and recently published results in *A. punctulata* sperm populations [6] are consistent with the presence and involvement of a pH-dependent Ca<sup>2+</sup> channel, likely CatSper, in the sperm flagellum response to speract and cGMP. Therefore, we investigated if an alkalinization could mimic these responses. We found that a 10 mM NH<sub>4</sub>Cl addition evoked a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in sperm head and flagellum (Fig. 6A). Interestingly, although pH<sub>i</sub> increases simultaneously in the sperm flagellum and head (Fig. 6B), the pH<sub>i</sub> induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase occurred significantly earlier in the sperm flagellum than in the head (Fig. 6B). This finding agrees with participation of CatSper in the speract signaling cascade and with the proposal that the Ca<sup>2+</sup> increase initiates in the sperm flagellum and then propagates to head [15]. However, to our surprise the NH<sub>4</sub>Cl-induced alkalinization could not account for all the speract-induced Ca<sup>2+</sup> entry. The amplitude and area under the curve of the NH<sub>4</sub>Cl-induced Ca<sup>2+</sup> influx were significantly smaller (Fig. 6C) than the speract-induced Ca<sup>2+</sup> entry in head and flagellum. Notably, the alkalinization induced by NH<sub>4</sub>Cl is significantly larger than that produced by speract (data not shown).

These last results suggest that besides the pH-dependent Ca<sup>2+</sup> entry another Ca<sup>2+</sup> entry pathway could be participating on the speract signaling cascade.

## 4. Discussion

Regulation of pH<sub>i</sub> is fundamental for sea urchin sperm function and critical for motility (reviewed in [4]). Speract induces a pH<sub>i</sub> rise as part of its signaling cascade [8,20]. This intracellular alkalinization was proposed to mediate peptide receptor and guanylate cyclase inactivation through dephosphorylation [21,23–25], though recent results question this proposal [26]. Sea urchin sperm population experiments had yielded contradictory results regarding their pH<sub>i</sub> responses to egg peptides [12–14]. Recent agreement regarding the kinetic precedence of pH<sub>i</sub> over [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> lead Seifert et al. [6] to propose that the resact-induced pH<sub>i</sub> increase activates CatSper, the flagellar sperm specific pH<sub>i</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> channel, regulating *A. punctulata* sperm chemotaxis. Still, we lacked spatial and kinetic information regarding the pH<sub>i</sub> changes in single spermatozoon.

Fully understanding how speract regulates motility requires determination of the elements of the signaling cascade, and their spatial and temporal organization. Here we characterized the pH<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes triggered by speract in the sperm head and flagellum, where they regulate sperm swimming. Since the speract receptor is localized exclusively in the sperm flagellum [27], cGMP increases at this location will initiate signaling that will then propagate to the rest of the cell. The presence of the sperm voltage-dependent NHE at this site is consistent with its proposed participation in the pH<sub>i</sub> change [7]. However, we could not

resolve with statistical significance that the pHi increase initiates in the sperm flagellum (Fig. 3). On the other hand, the cGMP-induced pHi increase in the flagella, its time delay ( $122 \pm 17$  ms) (Fig. 5), compared to the half-rise time for the cGMP triggered hyperpolarization ( $\leq 6$  ms) [28], and the inhibition of the alkalinization by high  $[K^+]_e$  (Figs. 1 and 2) which blocks hyperpolarization, also support the participation of NHE in the first steps of the speract signaling cascade. These findings agree with previous results in sperm populations and former models [1,8,20,29].

Three of our observations are consistent with a speract-induced pHi increase causing flagellar  $Ca^{2+}$  influx. (1) The speract-induced alkalinization is independent of  $Ca^{2+}$  influx (Fig. 2), (2) pHi increases before  $[Ca^{2+}]_i$  upon sperm stimulation by either speract or cGMP (Figs. 4A and 5A) and (3) an  $NH_4Cl$  induced alkalinization elevates  $[Ca^{2+}]_i$  without delay first in the sperm flagellum and then in the head (Fig. 6A and B). Though sensitivity limitations restricted our single sperm pHi study to a high speract concentration, the kinetic precedence of pHi over  $[Ca^{2+}]_i$  found is consistent with sea urchin sperm population experiments using a wide range of peptide concentrations [12,6]. These findings are also in accordance with previous results in sea urchin sperm populations documenting an alkalinization induced  $Ca^{2+}$  influx pathway [6,9,10]. The speract-induced alkalinization could directly activate a  $Ca^{2+}$  channel such as CatSper, which is present in the *S. purpuratus* genome [30] and that has been proposed to be crucial for *A. punctulata* chemotaxis [6]. On the other hand, since speract also increases cAMP [31] and previous studies documented a cAMP-regulated  $Ca^{2+}$  increase in sea urchin sperm [12,32], an indirect regulation cannot be ruled out. As sea urchin sperm possesses a pH-dependent soluble adenylate cyclase (susAC) [33], the speract-induced alkalinization could activate susAC increasing cAMP levels and then stimulate a  $Ca^{2+}$  entry pathway. Since the mammalian sperm NHE contains a cyclic nucleotide binding domain [34], a cAMP rise could stimulate it and contribute to the pHi increase that in turn activates a pHi sensitive  $Ca^{2+}$  channel, possibly CatSper.

In addition, our results suggest that a second  $Ca^{2+}$  entry pathway participates in the speract signaling cascade besides the one activated by pHi. As the  $NH_4Cl$  induced alkalinization is larger than the one produced by speract and is accompanied by a membrane potential depolarization [35], one could expect that  $NH_4Cl$  would replicate the  $Ca^{2+}$  influx induced by speract. Contrary to expectations, the  $NH_4Cl$  alkalinization-induced  $Ca^{2+}$  influx was smaller than the one induced by speract (Fig. 6C), possibly implying the participation of a second  $Ca^{2+}$  entry element. Furthermore,  $Ni^{2+}$  and nimodipine, two  $Ca_v$  channel blockers, selectively inhibited the  $Ca^{2+}$  oscillations induced by speract but not the sustained increase [15]. Taken altogether these findings suggest that CatSper and possibly other  $Ca^{2+}$  channels (i.e.  $Ca_v$ s) act in concert to modulate the  $Ca^{2+}$  influx induced by speract. Nevertheless, further investigation is required to determine the identity of the  $Ca^{2+}$  transporters that shape the speract-induced  $Ca^{2+}$  oscillations and the sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase that regulate flagellar beating and swimming.

## Acknowledgements

The authors thank Toshiaki Furuta for caged cGMP, Tatsu Yoshiro for speract, and Christopher Wood and Takuya Nishigaki for comments. Ana L. González-Cota is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, and was supported by CONACyT 169872, CB-1012/177138 and PAPIIT IN112514, IN204112-3. The work was supported by CONACyT 128566.

## References

- [1] 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.
- [2] 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  $Ca^{2+}$  spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev. Biol.* 306, 525–537.
- [3] Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C.D. and Darszon, A. (2010) Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Dev. Biol.* 344, 52–65.
- [4] Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L. and Darszon, A. (2014) Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1149–1158.
- [5] Alvarez, L., Friedrich, B.M., Gompper, G. and Kaupp, U.B. (2014) The computational sperm cell. *Trends Cell Biol.* 24, 198–207.
- [6] Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N.D., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Poetsch, A., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N.D., Kremmer, E., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U.B. and Strünker, T. (2014) The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *EMBO J.*, 1–15.
- [7] Lee, H.C. (1984) A membrane potential-sensitive  $Na^+H^+$  exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259, 15315–15319.
- [8] Lee, H.C. and Garbers, D.L. (1986) Modulation of the voltage-sensitive  $Na^+/H^+$  exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J. Biol. Chem.* 261, 16026–16032.
- [9] García-Soto, J. and Darszon, A. (1985) High pH-induced acrosome reaction and  $Ca^{2+}$  uptake in sea urchin sperm suspended in  $Na^+$ -free seawater. *Dev. Biol.* 110, 338–345.
- [10] Guerrero, A. and Darszon, A. (1989) Evidence for the activation of two different  $Ca^{2+}$  channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 264, 19593–19599.
- [11] González-Martínez, M.T., Guerrero, A., Morales, E., de 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Solzin, J., Helbig, A., Van, Q., Brown, J.E., Hildebrand, E., Weyand, I. and Kaupp, U.B. (2004) Revisiting the role of  $H^+$  in chemotactic signaling of sperm. *J. Gen. Physiol.* 124, 115–124.
- [15] Wood, C.D., Darszon, A. and Whitaker, M. (2003) Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J. Cell Biol.* 161, 89–101.
- [16] Furuta, T., Takeuchi, H., Isozaki, M., Takahashi, Y., Kanehara, M., Sugimoto, M., Watanabe, T., Noguchi, K., Dore, T.M., Kurahashi, T., Iwamura, M. and Tsien, R.Y. (2004) Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation. *ChemBioChem* 5, 1119–1128.
- [17] Nishigaki, T., Wood, C.D., Shiba, K., Baba, S.A. and Darszon, A. (2006) Stroboscopic illumination using light-emitting diodes reduces phototoxicity in fluorescence cell imaging. *Biotechniques* 41, 191–197.
- [18] Rasband, W.S. (1997–2014) ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- [19] R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- [20] Schackmann, R.W. and Chock, P.B. (1986) Alteration of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  in sea urchin sperm by the egg peptide speract. Evidence that increased intracellular  $Ca^{2+}$  is coupled to  $Na^+$  entry and increased intracellular pH. *J. Biol. Chem.* 261, 8719–8728.
- [21] Cook, S.P. and Babcock, D.F. (1993) Selective modulation by cGMP of the  $K^+$  channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* 268, 22402–22407.
- [22] Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, E.J. and Darszon, A. (2000) Participation of a  $K^+$  channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 221, 285–294.
- [23] Suzuki, N., Shimomura, H., Radany, E.W., Ramarao, C.S., Ward, G.E., Bentley, J.K. and Garbers, D.L. (1984) A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259, 14874–14879.
- [24] Ward, G.E. and Vacquier, V.D. (1983) Dephosphorylation of a major sperm membrane protein is induced by egg jelly during sea urchin fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5578–5582.
- [25] Ward, G.E., Moy, G.W. and Vacquier, V.D. (1986) Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *J. Cell Biol.* 103, 95–101.

- [26] Pichlo, M., Bungert-Plümke, S., Weyand, I., Seifert, R., Bönigk, W., Strünker, T., Kashikar, N.D., Goodwin, N., Müller, A., Pelzer, P., Van, Q., Enderlein, J., Klemm, C., Krause, E., Trötschel, C., Poetsch, A., Kremmer, E. and Kaupp, U.B. (2014) High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor. *J. Cell Biol.* 206, 541–557.
- [27] Cardullo, R.A., Herrick, S.B., Peterson, M.J. and Dangott, L.J. (1994) Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Dev. Biol.* 162, 600–607.
- [28] Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, 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.
- [29] 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.
- [30] Cai, X. and Clapham, D.E. (2008) Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSper. *PLoS One* 3.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Nomura, M., Beltrán, C., Darszon, A. and Vacquier, V.D. (2005) A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene* 353, 231–238.
- [34] Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K. and Garbers, D.L. (2003) A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* 5, 1117–1122.
- [35] García-Soto, J., González-Martínez, M., de De la Torre, L. and Darszon, A. (1987) Internal pH can regulate Ca<sup>2+</sup> uptake and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 120, 112–120.



Contents lists available at ScienceDirect

# Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Review

### Intracellular pH in sperm physiology



Takuya Nishigaki, Omar José, Ana Laura González-Cota, Francisco Romero, Claudia L. Treviño, Alberto Darszon\*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 7 May 2014

Available online 2 June 2014

##### Keywords:

Sperm  
Intracellular pH  
Sperm motility  
Sperm chemotaxis

#### ABSTRACT

Intracellular pH (pHi) regulation is essential for cell function. Notably, several unique sperm ion transporters and enzymes whose elimination causes infertility are either pHi dependent or somehow related to pHi regulation. Amongst them are: CatSper, a Ca<sup>2+</sup> channel; Slo3, a K<sup>+</sup> channel; the sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and the soluble adenylyl cyclase. It is thus clear that pHi regulation is of the utmost importance for sperm physiology. This review briefly summarizes the key components involved in pHi regulation, their characteristics and participation in fundamental sperm functions such as motility, maturation and the acrosome reaction.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### Contents

1. Introduction	1149
2. Key molecules involved in sperm pHi regulation	1150
2.1. Soluble adenylyl cyclase	1151
2.2. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchangers	1151
2.3. Voltage gated H <sup>+</sup> channel	1151
2.4. Carbonic anhydrases	1152
2.5. Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) transporters	1152
2.6. pHi dependent ion channels, CatSper and Slo3	1153
3. Sperm functions where pHi regulation is critical	1153
3.1. Initiation of motility	1153
3.2. Sea urchin sperm chemotaxis	1153
3.3. Capacitation and hyperactivation	1155
3.4. The acrosome reaction	1155
4. Perspectives	1155
Acknowledgments	1156
References	1156

## 1. Introduction

Maintaining intracellular pH (cytoplasmic pH or pHi), within physiological boundaries is fundamental for cell function. Most cellular processes are influenced and operate within a restricted pHi range. Changes in pHi affect the ionization state of weak acids and bases which are present in most proteins and many biomolecules [1]. Therefore, as metabolic activity acidifies the cytosol and

cells can be exposed to a varying external pH (pHe), lack of pHi regulation can have severe functional consequences. In general, cells finely tune their pHi employing several dynamic mechanisms whose balance in terms of production, elimination, transport and buffering of H<sup>+</sup> determine its value at a certain time. Cells slow down or speed up the activity of a wide range of plasma membrane ion transporters that move acids and/or bases [2]. As anticipated, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and H<sup>+</sup> transporters are amongst the key players in pHi regulation.

Cells can exhibit drastic changes in transit from a dormant to an active state, a condition which often entails a sudden pH change.

\* Corresponding author. Fax: +52 7773172388.

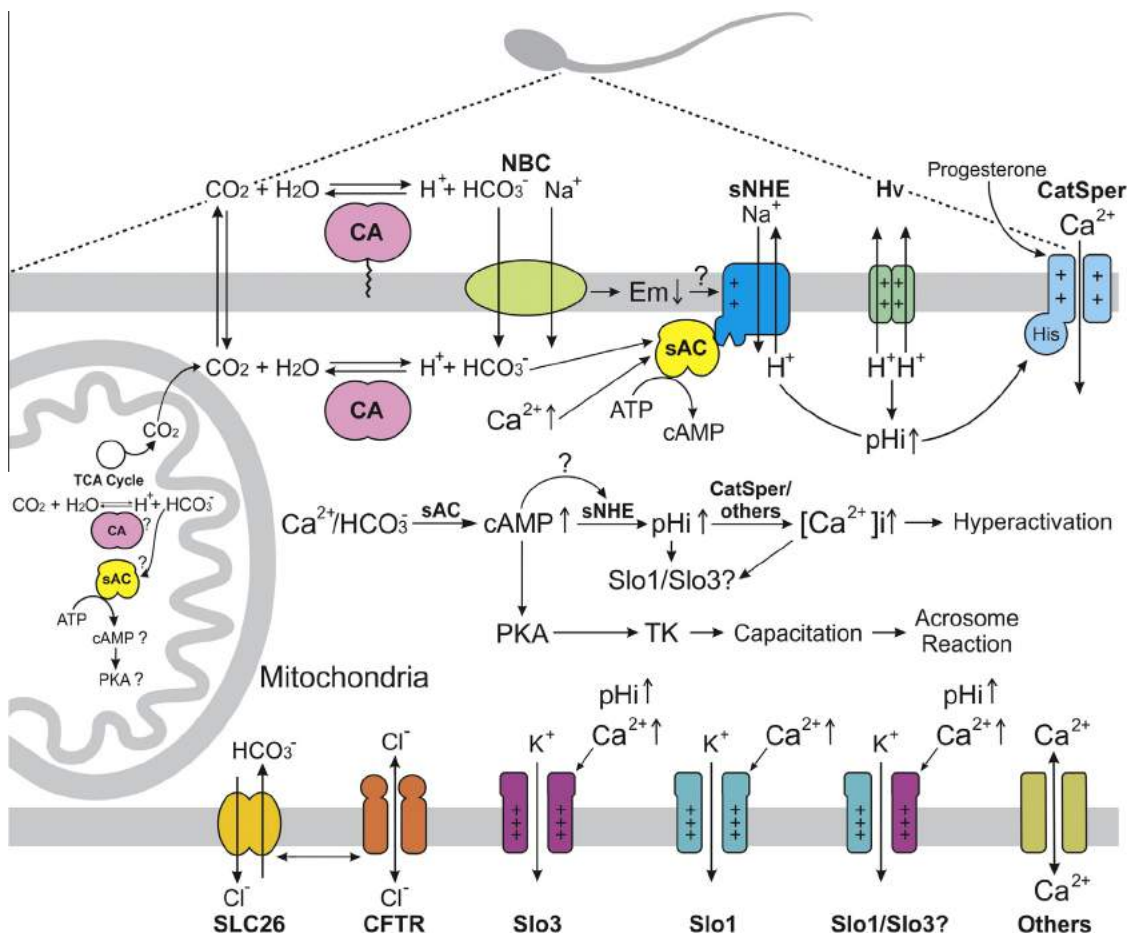
E-mail address: [darszon@ibt.unam.mx](mailto:darszon@ibt.unam.mx) (A. Darszon).

Spermatozoa (sperm) are a clear example as they are exposed to dramatic changes in the ionic composition of their surroundings during their journey towards fertilizing the egg. Mammalian sperm encounter an acidic media with a low  $\text{HCO}_3^-$  concentration in the epididymis, which keeps them quiescent, while in the female uterus and oviduct the luminal fluid contains a high  $\text{HCO}_3^-$  concentration and becomes increasingly alkaline, a condition required for fertilization (reviewed in [3]). It is worth noting that several unique sperm ion transporters and enzymes, whose elimination cause infertility, are either pHi dependent or somehow related to pHi regulation. Amongst them are: CatSper, a  $\text{Ca}^{2+}$  channel [4]; Slo3, a  $\text{K}^+$  channel [5]; the sperm specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger [6] and the soluble adenylyl cyclase [7,8] (Fig. 1). Thus, pHi regulation is of the utmost importance for sperm. Numerous strategies have evolved in the last 30 years to measure pHi. Their advantages and limitations are being continuously revised. These techniques involve determinations in cell populations or in single cells and include: (1)  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance (NMR), (2) weak

acid–base distribution, and (3) optical absorbance and fluorescence techniques [9,10]. In the last years pHi is being studied in sperm mostly using fluorescent probes. Here we will attempt to give a summarized critical panorama of the field with focus on the main molecular players of pHi regulation in sperm and on the functions where they participate.

## 2. Key molecules involved in sperm pHi regulation

The main ion transporters in charge of pHi regulation can be arranged into two groups: (1) membrane  $\text{H}^+$  transporters and (2)  $\text{HCO}_3^-$  transporters. The first group includes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers of the solute carrier 9 family (SLC9) [11] and  $\text{H}^+$  channels [12,13]. The second group is constituted by the  $\text{HCO}_3^-$  transporters of the SLC4 [14,15], SLC26 families [16] and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), which is also able to conduct  $\text{HCO}_3^-$  [17–21]. As carbonic anhydrases (CAs) catalyze  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  equilibrium, they are also considered.



**Fig. 1.** Model of mammalian sperm pHi regulation during capacitation/hyperactivation. The  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  are equilibrated inside the female tract by membrane associated carbonic anhydrases (CAs). The influx of  $\text{HCO}_3^-$  into the sperm is mediated by  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporters (NBC) and  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers (SLC26). Probably the cytoplasmic CAs also contribute to the  $\text{HCO}_3^-$  increase by conversion of cytosolic  $\text{CO}_2$ . Specifically, SLC26A3 and A6 isoforms appear to have a physical interaction with CFTR, which may permeate  $\text{HCO}_3^-$  besides  $\text{Cl}^-$ . Aside,  $\text{HCO}_3^-$  influx hyperpolarizes mouse spermatozoa in a  $[\text{Na}^+]_e$ -dependent manner via NBC.  $\text{HCO}_3^-$  activates (along with  $\text{Ca}^{2+}$ ) a soluble adenylyl cyclase (sAC) leading to a cAMP increase, which activates a PKA (that may also depend on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) and also may bind to the cyclic nucleotide binding domain of the sperm specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (sNHE) inducing a pHi increase in mouse. sNHE may also be stimulated by the hyperpolarization that occurs upon sperm capacitation. Unlike mouse, a voltage-dependent  $\text{H}^+$  channel ( $\text{H}_v$ ) may be involved in human sperm pHi increase. In both species, the pHi increase (among other factors) activates a sperm specific  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channel known as CatSper, which allows an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase essential for hyperactivation. We include an additional  $\text{Ca}^{2+}$  transporter to indicate that other systems participate in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulation. On the other hand,  $\text{K}^+$  channels Slo3 and Slo1 (or their heterotetramer) are activated by intracellular alkalinization and/or by  $\text{Ca}^{2+}$  (human sperm), contributing to the hyperpolarization that occurs during capacitation.  $\text{CO}_2$  is also generated inside mitochondria through the tricarboxylic acid cycle (TCA) and it may serve as substrate for intracellular or intramitochondrial sAC which in turn would trigger protein phosphorylation. Although mammalian sperm possess many mitochondria inside the midpiece, for didactic purposes only one mitochondrion is shown here.

### 2.1. Soluble adenylyl cyclase

The discovery of soluble adenylyl cyclase (sAC) has allowed a better understanding of how cells locally produce the fundamental second messenger cAMP. Additionally, as  $\text{HCO}_3^-$  directly regulates sAC, this enzyme is able to translate  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{pH}$  changes into cAMP levels. Furthermore, the sperm specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger described below has a cAMP binding site and forms a stable complex with sAC thus it is intimately related to cAMP metabolism (reviewed in [22]).

Unlike transmembrane ACs (tmACs), sAC is insensitive to forskolin (independent of G-protein) and activated by  $\text{HCO}_3^-$  [23] and  $\text{Ca}^{2+}$  [24]. In 1999, the primary structure of sAC from rat was determined, which lacks transmembrane segments [25]. Curiously, the catalytic domains of sAC are more similar to those of cyanobacteria ACs than to those found in eukaryotic tmACs. As anticipated, the AC activity of cyanobacteria is also upregulated by  $\text{HCO}_3^-$  [26].

A careful study of rat and mouse testis mRNA revealed that there are two alternative splicing products, which independently encode sAC<sub>t</sub> (truncated sAC) and sAC<sub>fl</sub> (full length sAC) [27]. It has been reported that sAC is essential for sperm function since sAC-null male mice are infertile due to a severe defect in sperm motility [7,8]. Although sAC gene is preferentially expressed in testis, sAC<sub>t</sub> is also found in somatic cells. It is localized in cytoplasm and/or intracellular organelles such as mitochondria and considered to play a role to monitor  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{pH}$  [28].

### 2.2. $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchangers

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers (NHEs), also known as  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters (NHA), are integral membrane proteins that catalyze the exchange of  $\text{Na}^+$  for  $\text{H}^+$  across lipid bilayers and are ubiquitously distributed in almost all living organisms. They contribute to the basic homeostatic mechanisms that control pHi, cellular volume and intra-organelle pH [29]. In mammals, the SLC9 gene family encodes 13 evolutionarily conserved NHEs divided into three subgroups (SLC9A, SLC9B and SLC9C) [30]. The subfamily SLC9A encompasses nine isoforms (NHE1–9), the SLC9B subgroup consists of two isoforms (NHA1 and NHA2) and the SLC9C subgroup consists of a sperm-specific NHE (sNHE) and a putative NHE (NHE11). It has been reported that mammalian spermatozoa express four isoforms of NHEs, NHE1 (SLC9A1), NHE5 (SLC9A5) [31], [32], sNHE (SLC9C1) [6] and the testis-specific NHE (NHA1/SLC9B1) [33].

In general, NHEs are composed of 12 transmembrane segments which catalyze the ion exchange and a cytoplasmic carboxyl terminal regulatory domain which interacts with several proteins including cytoskeleton-associated components, kinases and  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins [34]. In contrast, the sNHE is constituted by 14 putative transmembrane segments and a long cytoplasmic carboxyl terminus [6]. The sNHE lacks the first two transmembrane segments found in the other NHEs; instead it has 4 subsequent extra transmembrane segments, which are structurally similar to the voltage sensor domain found in voltage-gated ion channels [6]. This is of particular interest given that sea urchin spermatozoa have a voltage-dependent NHE in the flagellar plasma membrane [35,36]. In addition, the sNHE has a putative cyclic nucleotide binding consensus domain at the carboxyl terminus [6].

Although NHE1 was found in human and rat spermatozoa and NHE5 in rat spermatozoa [31,32], the physiological roles of these NHEs are unknown. On the other hand, sNHE was demonstrated to be essential for sperm function since its elimination causes infertility in male mice due to a severe defect on sperm motility [6]. Intracellular alkalization by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  partially recovered sperm motility of sNHE-null mice. In contrast, addition of membrane-permeable cAMP analogues almost fully recovered the sperm motility of the mutant sperm [6]. A careful study of sperm from sNHE-null

mice revealed that their sAC activity was highly diminished [37]. Notably, immunoblot analysis indicated that sAC<sub>fl</sub> is missing in this mutant although sAC<sub>t</sub> is apparently not affected. Further experiments suggested that sNHE is physically associated with sAC and both proteins reciprocally stabilize their protein expression in HEK293 cells [37]. In addition, proteomic analysis of sea urchin sAC-associated proteins revealed that sNHE is one of the major sAC-associated proteins [38]. These experimental results suggest that sAC and sNHE form a functional complex. Nevertheless, the localization of sAC reported so far, the midpiece of sperm flagellum [8], does not correspond to the localization of sNHE, the principal piece of sperm flagellum [6]. This discrepancy could be explained by the specificity of the antibody used for sAC immunostaining, which detects preferentially sAC<sub>t</sub> [28]. If this is the case, sAC<sub>t</sub> and sAC<sub>fl</sub> would be differentially localized in mammalian spermatozoa.

The fact that sNHE possesses a predicted cyclic nucleotide binding domain (CNBD) together with the physical interaction between sNHE and sAC suggests that cAMP regulates the activity of sNHE. However, some proteins found in prokaryotes and eukaryotes have a structurally almost identical domain to the CNBD that does not interact with cyclic nucleotides (cyclic nucleotide binding homology domains, CNBHD) [39], [40]. Therefore, biochemical experiments are required to examine if sNHE indeed has a functional CNBD. Interestingly, human sNHE lacks an arginine residue present in most CNBDs, which plays a critical role for the interaction with the phosphate group of a cyclic nucleotide [40]. Mouse and sea urchin sperm conserve this arginine residing in each predicted CNBD of sNHE, suggesting some functional differences between human sNHE and those of mouse and sea urchin. Further investigations are required to clarify these issues.

The testis-specific NHE identified by Liu et al. in 2010 [33] is now classified into a new family of NHE, NHA1 (SLC9B1). NHA1 has 12 transmembrane segments as other NHEs, but lacks the long cytoplasmic C-terminal. Immunofluorescence demonstrated that NHA1 is localized in the principal piece of sperm flagellum in mouse spermatozoa. Furthermore, anti-NHA1 antibody reduced sperm motility and the rate of *in vitro* fertilization. Therefore, NHA1 is proposed to regulate sperm motility. In order to define the physiological function of NHA1 in spermatozoa, it is desirable to analyze sperm function of NHA-1 knockout animals.

### 2.3. Voltage gated $\text{H}^+$ channel

In 2006, two groups independently identified a voltage-gated  $\text{H}^+$  channel ( $\text{H}_v$  channel) [41,42], which is composed of 4 transmembrane segments structurally similar to the voltage sensor domain commonly found in other voltage-gated ion channels. This channel exists as a homodimer with two  $\text{H}^+$  pores, since each subunit forms a  $\text{H}^+$  permeable pore. The  $\text{H}_v$  channel is activated by membrane potential depolarization and an outward  $\text{H}^+$  gradient across the plasma membrane. In addition, unsaturated fatty acids such as arachidonic acid enhance the  $\text{H}_v$  channel activity while  $\text{Zn}^{2+}$  potentially inhibits it [13].

Whole-cell patch-clamp recordings from human sperm revealed a relatively large voltage-dependent  $\text{H}^+$  conductance [12]. Western blotting and immunostaining confirmed that sperm possess  $\text{H}_v$  channels in the principal piece of the flagellum. The sperm  $\text{H}_v$  channel conserves all the biophysical properties displayed in somatic cells or heterologous systems, including being potentially inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$ . This last property is particularly important for sperm pHi regulation since it is known that human seminal fluid contains a millimolar range of  $\text{Zn}^{2+}$ , which should completely block the  $\text{H}^+$  conductance of the  $\text{H}_v$  channel, and it may account for the action of  $\text{Zn}^{2+}$  as a decapacitation factor [43]. In addition, sperm  $\text{H}_v$  channels are activated by the endocannabinoid anandamide,

which may explain part of its positive effects on mammalian reproduction [12].

Although human sperm display large  $H^+$  currents (100 pA/pF at +100 mV), those of mouse sperm are quite small (<10 pA/pF) [12]. These results indicate that human and mouse sperm regulate their pHi differently.

#### 2.4. Carbonic anhydrases

Besides the  $H^+$  carriers and the  $HCO_3^-$  transporters, the cells also depend on carbonic anhydrases (CAs) to properly regulate their pHi. CAs are ubiquitous metalloenzymes (depending on the isoform, they require  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  or  $Cd^{2+}$  as cofactor) present in the three life domains (bacteria, archaea and eukarya). The principal function of CAs is to catalyze the reversible reaction of carbon dioxide hydration to bicarbonate and proton ( $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ ). CAs are encoded by five gene families without apparent evolutionary relationship:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\zeta$ . The sixteen isoforms of  $\alpha$ CAs (ACI–ACXV) are the only CAs present in mammals showing distinct subcellular and tissue distribution, kinetic properties and sensitivity to inhibitors [44].

Despite the importance of CAs in the regulation of pHi in all living organisms, so far little information is available about their presence in mammalian sperm and even less is known about their function in the physiology of these cells (see Table 1).

The presence of different isoforms of  $\alpha$ CAs in mammalian spermatozoa suggests a possible role of these metalloenzymes throughout the development of male gametes or during the physiological events that occur prior to fertilization. In fact this seems to be the case at least for motility as a  $HCO_3^-$  intracellular increase, as well as a  $H^+$  decrease (both ions produced by the CAs' reaction)

**Table 1**  
Molecules involved in the regulation of pHi in mammalian sperm.

Molecule	Species/localization	Technique	Function	References
CAI	H	ELISA	–	[138]
CAII	H	ELISA	–	[138]
	H, M	Northern blot	–	[140]
	M	Western blot	–	
	H/PA; R/A	IC	–	[139]
	H, R	Western blot	–	
CAIV	M/A, ES, PA, MP*	SEM	–	[45]
	M	RT-PCR	Motility	[47]
	M	Western blot	–	
	M/A, ES, PA, MP, PP*	IC	–	
CAXII	M	PCR	–	[141]
	M/A	IC	–	
CAXIII	H, M	PCR	–	[142]
	H	IH	–	
sNHE	M	Northern blot	Motility	[6]
	M	Western blot	–	
	M/PP	IC	–	
NHA1	M/PP	IC	Motility	[33]
NHE1	M	Western blot	–	[31]
NHE4	M	Western blot	–	[35]
$H_v$	H/PP	Patch clamp	Motility	[12]
	H	ISH	–	
	H/PP	Western blot	–	
	H/PP	IC	–	
NBC	M	–	Capacitation	[61]
SLC26A3	M	RT-PCR	Capacitation	[21]
	M	Western blot	–	
	M/MP	IC	–	
SLC26A6	M	RT-PCR	Capacitation	[21]
	M	Western blot	–	
	M/MP	IC	–	

\*Only in corpus and cauda spermatozoa.

Species: H, human; M, mouse; R, rat.

Cellular localization: A, acrosome; ES, equatorial segment; P, postacrosomal region; MP, midpiece; PP, principal piece.

Technique: ISH, In situ hybridization; IC, immunocytochemistry; IH, immunohistochemistry; SEM, scanning electron microscopy.

are fundamental to this process in mammalian sperm [46]. However, the available studies that suggest the direct participation of CAs in the balance of these ions during motility are still scarce. It has been shown that mouse and human spermatozoa increase their flagellar beat frequency when exposed to  $CO_2$  and this effect is inhibited by ethoxzolamide (EZA; a specific CAs inhibitor) [47], [48]. It was also found that  $CAIV^{-/-}$  mouse sperm display a decrease in the total activity of CAs as well as a decrease in their response to  $CO_2$  [47].

It is worth mentioning that in marine organisms the participation of CAs in sperm motility has also been studied. In flatfish spermatozoa a 29 kDa CA isoform (probably CAII, considering its aminoacid sequence) was detected in high amounts. Application of EZA strongly affected sperm motility [49]. On the other hand, in spermatozoa from a certain type of squid, the production of  $H^+$  by a plasma membrane-anchored CA (along with an intracellular increase of  $Ca^{2+}$ ) is crucial in the chemotactic signaling pathway of these cells [50].

In many cell types certain CAs isoforms can form complexes with  $HCO_3^-$  transporters. In recent years this association has been called the bicarbonate transport metabolon, a complex of enzymes spatially close to each other that catalyze a series of reactions in a metabolic pathway; in this way the product of one enzyme is the substrate of the next, which allows the reaction to proceed efficiently [51].

#### 2.5. Bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) transporters

$HCO_3^-$  transporters constitute one of the main families of transmembrane proteins involved in the pHi regulation of mammalian cells. As mentioned previously, this family includes  $HCO_3^-$  transporters SLC4, SLC26, and CFTR [3]. The SLC4 transporter family includes the products of ten genes (SLC4A1–5 and SLC4A7–11). Nine SLC4 family members are integral membrane proteins that carry  $HCO_3^-$  (or carbonate) and at least one monoatomic ion (typically  $Na^+$  or  $Cl^-$ ), across the plasma membrane [52]. The physiological function of eight family members is already defined and they fall into three major phylogenetic subfamilies: (1) the  $Cl^-/HCO_3^-$  anion exchangers AE1–3 (SLC4A1–3), (2) the electrogenic  $Na^+/HCO_3^-$  cotransporters NBCe1 (SLC4A4) and NBCe2 (SLC4A5) and (3) the electroneutral  $Na^+/HCO_3^-$  cotransporters NBCn1 (SLC4A7), NDCBE (SLC4A8) and NBCn2 (SLC4A10). The function of the two remaining SLC4 members, AE4 (SLC4A9) and BTR1 (SLC4A11) is still not fully understood [52].

On the other hand, the mammalian SLC26 gene family comprises 11 genes (SLC26A1–A11) that encodes multifunctional anion exchangers and anion channels transporting a broad range of substrates including  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $OH^-$ ,  $I^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HCOO^-$  and  $C_2O_4^{2-}$ . Among SLC26A family,  $HCO_3^-$  permeable members represent the second major subfamily of  $HCO_3^-$  transporters: SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6–A9 and SLC26A11 [53].

The CFTR is the only member of the ABC family of transporters that acts as an ion channel; it has been shown to be permeable to  $HCO_3^-$  [54]. CFTR is found commonly in the apical membranes of epithelial cells and its mutations give rise to cystic fibrosis (CF), one of the most common genetic diseases in some human groups.

Although so far the available information about the molecular entities, the distribution and function of  $HCO_3^-$  transporters in mammalian sperm physiology is very limited, in the last years a few studies have improved our knowledge on this subject. AE2 (SLC4A2) is localized in the equatorial segment of mammalian sperm head [55,56]. On the other hand, mutations in human SLC26A3 produce congenital chloride diarrhea (CLD) and patients with CLD are subfertile, suggesting this transporter is important for sperm physiology [57]. In fact, SLC26A8, SLC26A3, as well as SLC26A6 and CFTR, have been identified in the midpiece of

mouse/guinea pig spermatozoa [18,21,58–60]. These transporters physically interact and participate in the pHi increase that takes place during capacitation [21]. Results from another study strongly suggest that an electrogenic  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter may also participate in the regulation of capacitation in mouse sperm [61]. In that report it was shown that  $\text{HCO}_3^-$  induces a  $\text{Na}^+$ -dependent hyperpolarization of the mouse sperm plasma membrane and this leads to a pHi increase which is sensitive to DIDS (an anion exchanger inhibitor). In the same species it was demonstrated that a  $\text{Na}^+$ -driven  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange is involved in the pHi regulation, possibly during capacitation [62].

In human spermatozoa the identification of  $\text{HCO}_3^-$  transporters remains unexplored.

### 2.6. pHi dependent ion channels, CatSper and Slo3

For over three decades it was known that progesterone and a component of the zona pellucida (ZP3) induce the acrosome reaction (AR, see below) with a strict requirement for an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rise. It was later established that the  $\text{Ca}^{2+}$  increase triggered by these biomolecules during the AR is influenced by pHi. Interestingly, artificial intracellular alkalinization of mouse sperm produced a  $\text{Ca}^{2+}$  increase [63] and addition of  $\text{HCO}_3^-$  increased the beat frequency of sperm [64]. Although it was not completely clear how pHi and  $\text{Ca}^{2+}$  changes influence each other to regulate sperm functions, it was proposed that there were channels sensitive to membrane potential and pHi. This notion was later confirmed and the importance of pHi regulation in sperm was strongly highlighted with the discovery of two pHi and voltage sensitive ion channels, CatSper and Slo3, that are exclusively expressed in spermatozoa and whose absence produces male infertility.

CatSper was identified in mouse sperm as a putative  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 2001 [4,65]. It was then shown that the activity of CatSper is required for hyperactivated motility and fertility although sperm from CatSper null mice can undergo the AR and fertilize zona free eggs [4,65,66]. After different approaches and strong efforts, whole-cell patch-clamp recordings in mature sperm became a reality in 2006 [67], such technique thus far has not detected other  $\text{Ca}^{2+}$  currents but those mediated by CatSper [68]. The characterization of CatSper has proven difficult due to the high promiscuity among its agonists and the lack of specific antagonists [69] and because heterologous expression has not been successful. However, it is clear that alkalinization increases CatSper activity and that progesterone activates it directly; this is true for human sperm. The ligands for CatSper channels from other species remain to be established.

In 1998 a pHi and voltage sensitive  $\text{K}^+$  channel (Slo3) highly expressed in mouse testis was described [70]. It was later reported that spermatozoa from Slo3 null mice exhibit several defects, including altered morphology, reduced motility and decreased AR efficiency [5], [71]. Recently, a  $\text{K}^+$  channel was also recorded in human sperm by two different groups; one claimed that the molecular identity of this channel is Slo3 [72] but the other presented evidence that this current resembled more closely the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel, Slo1 [73]. New results from our lab in human sperm revealed that there is a plasma membrane hyperpolarization associated to the capacitation process (see below) and that more than one type of  $\text{K}^+$  channel may be involved, possibly Slo1 and Slo3 [74]. Regardless of the molecular identity, these sperm specific channels may contribute to the changes on membrane potential, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and pHi, parameters that control not only the AR but other sperm functions. Further investigation is required to understand how and if these channels interact with each other forming a macro protein complex, a possibility that may explain recent findings of antagonist cross sensitivity displayed by CatSper and Slo3 and/or the molecular identity of the  $\text{K}^+$  current in human sperm [75].

## 3. Sperm functions where pHi regulation is critical

### 3.1. Initiation of motility

In most species, spermatozoa are stored immotile in the testis (or epididymis in the case of mammals). In general, it is believed that this quiescent sperm state is maintained by acidification of sperm pHi since the sperm dynein ATPases, motor proteins that generate the flagellar beat, are highly pH dependent [76,77]. The pH-motility regulation is relatively well studied in sea urchin sperm.

Sea urchin sperm remain immotile in the gonads due to a low pHi maintained by a high  $\text{CO}_2$  tension and initiate flagellar beating upon spawning [78]. When sperm are released into seawater (pH 8.0), a rapid  $\text{H}^+$  efflux occurs [79], elevating pHi from 7.2 to 7.6 [79]. This pHi increase activates axonemal dynein ATPases, which are highly active at alkaline pHi (7.5–8.0) [76]. As the mitochondrion is the only ATP source in sea urchin sperm and dynein ATPases are the main consumers, motility and respiration are tightly linked and regulated by pHi [80,81]. Both sperm pHi and motility depend on external ionic composition; for example low pH (5.0), high  $[\text{K}^+]$  (200 mM) or  $\text{Na}^+$ -free seawater lower sperm pHi to 5.7–6.6 [80] and prevent its motility. Notably, pHi alkalinization by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  addition restores sperm motility under these conditions [79], establishing the direct involvement of pHi as regulator of motility.

The pHi dependence on external pH and  $\text{Na}^+$ , and the inhibition of motility by high external  $\text{K}^+$  can be explained by the participation of the voltage-sensitive NHE present in the sea urchin sperm flagellum, which interestingly, can be activated by a membrane hyperpolarization [35,36]. Since sNHE (SLC9C1) possesses a voltage sensor domain [6] and peptide fragments of sNHE were detected in a proteomic analysis of sAC-associated proteins of sea urchin sperm [38], it is more likely that sNHE is the NHE that elevates pHi upon motility initiation in this species. Removal of tracer elements such as  $\text{Zn}^{2+}$  also lowers pHi retarding sperm motility initiation [82], which suggests that  $\text{Zn}^{2+}$  is involved, directly or indirectly, in the regulation of sNHE activity.

### 3.2. Sea urchin sperm chemotaxis

Sperm chemotaxis has been extensively studied in sea urchin spermatozoa. In this marine invertebrates, sperm are attracted toward the egg by sperm-activating peptides (SAPs) which are diffusible peptides released from the external coat of the egg (Review at [83]). SAPs stimulate sea urchin sperm motility and respiration in slightly acidified seawater (pH 6.2–6.8) [84], by increasing pHi [85], [86]. This property has been successfully used to screen for SAPs, and to date has led to the identification of hundreds of SAPs from numerous sea urchin species [83].

Currently, it is believed that mainly SAPs guide sperm toward the egg modulating their swimming behavior and, as a result, increasing the fertilization probability (review in [87]). Resact and speract are two of the best characterized SAPs that are chemotactic for two sea urchin species, *Arbacia punctulata* [88] and *Lytechinus pictus* [89], respectively. Both trigger a chemotactic response in a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent manner [88–90]. In particular,  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the flagellum is critical to shape the flagellar beat and the sperm swimming trajectory [91–95]. This  $\text{Ca}^{2+}$  influx is comprised of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations mounted on a sustained increase that initiate in the sperm flagella and travel toward the head [96]. Each oscillation transiently increases the flagellar asymmetry and causes the sperm to turn [91]. An orchestrated sequence of turns interspersed with periods of straighter swimming allows sperm to swim towards the chemoattractant source [88–90] and allows the sperm to locate the egg (Fig. 2, inset).

However,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes are the result of a complex signaling cascade shared, with some differences, by the sea urchin species



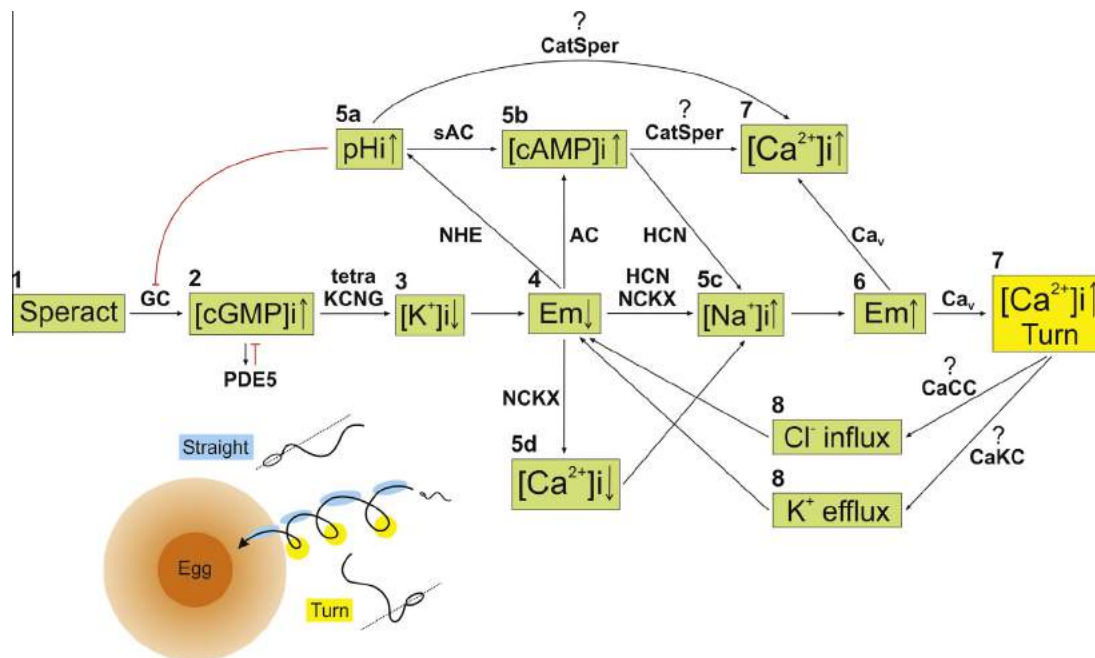
thus far studied [90,87]. In the signaling cascade of SAPs (Fig. 2), the cGMP-induced  $K^+$  efflux through a tetraKCNG/CNGK channel [97,98] is an initial and fundamental step. This  $K^+$  efflux leads to hyperpolarization of the sperm membrane potential ( $E_m$ ) and modulates the function of several ion transporters and enzymes as shown in Fig. 2. Indeed, when this  $K^+$  efflux is inhibited by high  $K^+$  seawater, all the sperm responses to SAPs, except for an enhanced accumulation of cGMP, are completely inhibited [99].

One important consequence of this  $E_m$  hyperpolarization is the pHi increase. This alkalinization, as motility initiation, is pHe dependent and inhibited by high  $[K^+]_e$  and by the absence of  $[Na^+]_e$  [86,100], thus the  $E_m$ -sensitive NHE (probably sNHE) is likely involved in the speract response. Our time-resolved kinetic measurements of speract induced pHi and  $[Ca^{2+}]_i$  changes using fast mixing device [101] and caged compounds (cGMP and speract) [102] revealed that the pHi increase induced by speract and cGMP occurs with a short delay (50–200 ms) always preceding the  $[Ca^{2+}]_i$  increase, supporting the idea that  $E_m$  hyperpolarization activates the sNHE. However, the physiological relevance of the pHi increase induced by SAPs on sperm chemotaxis is under debate.

At present, it is considered that the rate of  $[Ca^{2+}]_i$  change ( $d[Ca^{2+}]_i/dt$ ) determines the sea urchin sperm flagellar beating mode and swimming pattern [94]. It has been proposed that voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_v$  channels) are involved in the speract response [91,103]. Both high voltage-activated ( $Ca_v1$  and  $Ca_v2$  families) [104] and low voltage-activated ( $Ca_v3$  family) [103] transcripts were detected in sea urchin testis; specifically  $Ca_v1.2$

protein was localized in the sperm flagellum by immunofluorescence [104]. At a first glance, if only typical  $Ca_v$  channels were involved in sea urchin sperm chemotaxis, the change in pHi induced by SAPs might not have a great impact on it  $[Ca^{2+}]_i$  regulation. Actually, Solzin et al. [105] showed that the chemotactic behavior of *A. punctulata* sperm to resact was not altered in the presence of imidazole (10 mM), which was proposed to function as a pHi buffer. In addition, the authors did not detect an increase in sperm pHi by uncaging cGMP. However, we observed the opposite result, namely, an increase in pHi induced by uncaging cGMP in *A. punctulata* as well as *Strongylocentrotus purpuratus* sperm [87]. It must be noted also that pHi influences speract-receptor interaction [106], the activity of both GC and sAC [107,108] and the activity of PDE5 [109]. Therefore, pHi could modulate sea urchin sperm swimming in several ways.

On the other hand, in recent years CatSper, the sperm specific  $Ca^{2+}$  channel activated by alkaline pHi, has been shown to be essential for mouse and human fertility [4,110] reviewed in [111]. This channel is present in the *S. purpuratus* genome [112] and sperm from this species display a pHi dependent  $[Ca^{2+}]_i$  increase [113]. Therefore, it is worth exploring if CatSper participates in the speract cascade and if it is regulated by the pHi increase as in other species. The participation of pHi in chemotaxis could still turn out to be important. Consequently, further investigation is required, in particular single cell fast measurements, to reveal when and where the speract-induced pHi and  $[Ca^{2+}]_i$  increases occur within the flagellum and how they are related.



**Fig. 2.** The speract signaling cascade in sea urchin sperm. After binding to its receptor (1), speract stimulates a membrane guanylyl cyclase (GC), which elevates cGMP (2) that activates tetrameric cGMP-regulated  $K^+$  channels (tetraKCNG), causing a membrane potential ( $E_m$ ) hyperpolarization (4) due to  $K^+$  efflux (3). This  $E_m$  change may activate a  $Na^+/H^+$  exchanger (sNHE) (5a), remove inactivation from voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_v$ ), enhance hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCN), and facilitate  $Ca^{2+}$  extrusion (5d) by  $K^+$ -dependent  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers (NCKX). sNHE activation increases pHi (5a). HCN opening causes  $Na^+$  influx (5c) and contributes to depolarize  $E_m$  (6) activating  $Ca_v$ , which increase  $[Ca^{2+}]_i$  (7) and enhance asymmetric flagellar bending allowing sperm to turn. Possibly, the rise of  $[Ca^{2+}]_i$  also opens  $Ca^{2+}$ -regulated  $K^+$  channels (CaKC) and  $Ca^{2+}$ -regulated  $Cl^-$  channels (CaCC) (8), which then contribute to again hyperpolarize  $E_m$ , removing inactivation from  $Ca_v$  channels and opening HCN channels. During this period sperm swim in a straighter trajectory whose regulation is ill defined but critical for chemotaxis. This succession of events occurs cyclically, generating orchestrated transient  $[Ca^{2+}]_i$  increases (7) that produce a sequence of turns until one or more of the second messengers in the pathway are downregulated. The pHi (5a) and cAMP increases (5b) stimulate an undetermined  $Ca^{2+}$  influx pathway that contributes to the sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase (7), and possibly to the depolarization that accompanies the speract response. It is now worth exploring if CatSper participates in this process. Inset: A sperm drifting circular swimming trajectory in a chemoattractant gradient (orange shadow surrounding the egg) is stimulated periodically due to changes in the rate of chemoattractant capture. When swimming towards the egg in an ascending gradient, the onset of  $[Ca^{2+}]_i$  fluctuations is suppressed until the cell detects an ascending to descending gradient inversion. After a ~200 ms delay, the spermatozoon undergoes a transient  $[Ca^{2+}]_i$  increase just before reaching the gradient minima (yellow circles). The rate of change in  $[Ca^{2+}]_i$  ( $d[Ca^{2+}]_i/dt$ ) controls sperm trajectory. As a result, sperm turn (yellow) when they are swimming away from the egg and swim in a straighter trajectory (blue) while coming closer to the chemoattractant source (i. e., the egg jelly).

Furthermore, the lack of specific sNHE inhibitors has hampered examining the role of pHi in motility regulation and generally in sperm physiology, thus identifying such compounds is imperative. Since sNHE is essential for mouse fertilization, specific sNHE inhibitors might also function as contraceptives.

### 3.3. Capacitation and hyperactivation

Although mammalian spermatozoa acquire the capacity of flagellar motility in the epididymis [114], they remain quiescent in its acidic lumen which results from the V-ATPase activity found in its apical plasma membrane [115,116]. Upon ejaculation, sperm are exposed to the seminal fluid (pH around 7.5) which ensures sperm motility [115]. However, ejaculated mammalian spermatozoa are unable to fertilize the egg until a process of maturation, named capacitation, takes place. Under physiological condition, spermatozoa complete capacitation in the female reproductive tract, but it is possible to reproduce this process *in vitro* in an appropriate medium, containing  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and albumin. Soon after ejaculation, sperm swim progressively with symmetric, low amplitude and high frequency flagellar beat. In contrast, spermatozoa recovered from the ampulla of the oviduct, the site of fertilization, show vigorous motility with asymmetric, high amplitude and low frequency flagellar beat, termed hyperactivation [117]. Hyperactivation is essential for spermatozoa to achieve fertilization *in vivo* since it is necessary for their migration towards the ampulla in the oviduct [118]. This type of motility is also necessary to penetrate ZP during *in vitro* fertilization [4]. In this sense, hyperactivation can be considered as part of capacitation, though capacitation is more usually defined as a preparation for sperm to undergo the AR. It has been established that  $\text{Ca}^{2+}$  is fundamental for hyperactivation and CatSper is an essential channel in this process. However, it is still not clear what the physiological signals that induce hyperactivation are [117], but it is known that pHe and  $\text{HCO}_3^-$  changes are crucial factors. In the rhesus monkey, the pH and  $\text{HCO}_3^-$  concentration in the lumen of the oviduct during the follicular phase are 7.2 and 35 mM, respectively, and they increase to 7.6 and 90 mM during ovulation [119]. Therefore,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{H}^+$  transporters as well as CAs are considered crucial players for both capacitation and hyperactivation, as illustrated in Fig. 1. Since *in vitro* capacitation requires relatively long periods ( $\geq 30$  min in mouse and several hours in human), the metabolic state, such as mitochondrial  $\text{CO}_2$  production, could have an important role in this process, although currently there is no experimental evidence.

### 3.4. The acrosome reaction

The acrosome is a secretory vesicle localized in the apical region of the sperm head in most species, except for some such as teleosts. When sperm receive an appropriate stimulus, this vesicle undergoes exocytosis and releases its acrosomal contents including hydrolytic enzymes; this process is called the acrosome reaction (AR). The AR is a unique single exocytotic event since the outer acrosomal membrane and the plasma membrane fuse at multiple sites and are released from the cell as hybrid vesicles. As a consequence, only the inner acrosomal membrane becomes a new plasma membrane. It is believed that only the sperm that has undergone the AR can penetrate the egg coat and complete sperm–egg fusion [120]. It is known that  $\text{Ca}^{2+}$  is one of the key elements needed for AR since its discovery in marine invertebrates [121], though pHi is also crucial to achieve this reaction [122,123].

In mammals, a pHi rise is fundamental for the ZP-induced AR [123]. This pHi change is inhibited by pertussis toxin, suggesting the involvement of a G-protein (Gi). However, how this pHi increase is achieved remains unknown. On the other hand, recent studies using genetically manipulated mice, which express enhanced green

fluorescence protein (EGFP) in the acrosome, revealed that most fertilizing spermatozoa had undergone AR before their contact with ZP [124], questioning if ZP is the physiological inducer of the AR. As mentioned previously, CatSper, Slo3 and the sAC–sNHE complex have been described as sperm-specific important players related to pHi in mammalian spermatozoa. Particularly, CatSper is proposed to participate in the AR besides its role in the hyperactivated sperm motility [125–127]. Differences between *in vitro* and *in vivo* fertilization have been accumulating. Indeed, many proteins proposed to be involved in the AR are not essential for *in vivo* fertilization since their elimination using gene-targeted male mice does not result in infertility [128]. Therefore, although technically difficult, understanding the physiological process of mammalian internal fertilization requires examining it *in vivo*.

In contrast to mammalian AR, it is clear that in the sea urchin, the physiological inducer of the AR is a fucose sulfate polymer (FSP), a major component of egg jelly coat [129]. When FSP binds to its receptor, spermatozoa undergo exocytosis of the acrosomal vesicle and expose the internal face of the acrosomal membrane (now the membrane of the acrosomal tubule). Subsequently, polymerization of actin takes place in the subacrosomal space leading to the formation of the 1  $\mu\text{m}$  long acrosomal tubule. This process depends on the finely coordinated ionic flux changes evoked by FSP (reviewed in [46,130,131]).

FSP binding to its receptor, suRE[1], evokes Em changes and increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pHi,  $[\text{Na}^+]_i$ , cAMP,  $\text{IP}_3$  and NAADP (reviewed in [46]). External  $\text{Ca}^{2+}$  is necessary for the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase and the internal alkalinization (0.1–0.2 pH units), which are prerequisites for the AR to occur [121,122,132–134]. It is thought that at least two different  $\text{Ca}^{2+}$  channels, acting sequentially, mediate the  $\text{Ca}^{2+}$  entry necessary to induce the AR. The first one is probably a  $\text{Ca}_v$  channel considering its sensitivity to verapamil and dihydropyridines [122,135] and the second, which opens 5 s later, is a pHi-dependent channel activated by an alkalinization. Interestingly, this channel is inhibited by low  $[\text{Na}^+]_e$ , high  $[\text{K}^+]_e$  or TEA (a  $\text{K}^+$ -channel blocker) [135], conditions that also inhibit the voltage-sensitive NHE [100], probably sNHE. These latter findings suggest the involvement of sNHE in the AR. However, inhibition of the initial  $\text{Ca}^{2+}$  entry nearly completely blocks the pHi increase triggered by FSP, implying the participation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{H}^+$  extrusion mechanism [122]. As sNHE itself seems to be  $\text{Ca}^{2+}$  independent [85,86], the pHi increase associated to the AR may involve: (a) a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel, which could mediate the sNHE activation through Em changes; (b) cAMP produced by sAC, which possibly activates sNHE; and (c) another type of NHEs.

Besides modulating the activity of the second  $\text{Ca}^{2+}$  channel, the pHi increase promotes actin polymerization leading to the formation of the acrosomal tubule [136]. On the other hand, as the pHi increase depends on pHe, the AR is highly pHe dependent, being prevented at pHe 7.3–7.5 and completely induced near physiological pHe 7.6–8.0 [137], which suggests the possible involvement of a Hv channel since the  $\text{H}^+$  gradient across the plasma membrane, as well as Em depolarization activates this channel. Although the importance of pHi in the sea urchin AR has long been known, the molecular mechanism is not fully understood and further investigation is necessary to elicit the details.

## 4. Perspectives

The regulation of pHi is fundamental for sperm function. Now we know that certain sperm-specific proteins essential for fertilization are involved in pHi regulation or regulated by pHi. However, many questions regarding the physiological function of these proteins are still unanswered. Currently it is clear that there are differences between *in vitro* fertilization and what occurs in the

lumen of the oviduct that must be considered to fully understand this fundamental process. In fact, the pHi of the oviductal lumen dramatically elevates upon ovulation due to  $\text{HCO}_3^-$  production in the epithelial cells lining it. The pHi and ionic changes in the oviduct must be considered to understand the physiological sperm responses. In this sense, we still need to learn a lot about sperm pHi regulation by  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}^+$ , CAs and  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{H}^+$  transporters, as well as their modulators, to understand how these fundamental cells operate and achieve fertilization.

## Acknowledgments

The authors thank Jose Luis De la Vega, Juan García-Rincón, Graciela Cabeza Pérez, and Shirley Ainsworth, for technical assistance. We thank Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez, Alma Valle and Arturo Ocádiz for computer services. This work was supported by National Institute of Health (NIH) Grants R01 HD038082-07A1 (to Pablo Visconti subcontract to A.D.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) (2012/177138 to T.N. and 128566 to A.D., T.N. and C.T.); Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/UNAM) (IN225406 to A.D., IN203513 to T.N. and IN202212-3 to C.T.); The Alexander von Humboldt Foundation (to C.T.).

## References

- [1] W.F. Boron, Regulation of intracellular pH, *Adv. Physiol. Educ.* 28 (1–4 (December)) (2004) 160–179.
- [2] V.A. Ruffin, A.I. Salameh, W.F. Boron, M.D. Parker, Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons, *Front. Physiol.* 5 (January) (2014) 43.
- [3] Y. Liu, D.K. Wang, L.M. Chen, The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction, *Biol. Reprod.* 86 (4) (Apr. 2012) 99.
- [4] D. Ren, B. Navarro, G. Perez, A.C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, D.E. Clapham, A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility, *Nature* 413 (6856 (October)) (2001) 603–609.
- [5] C.M. Santi, P. Martínez-López, J.L. de la Vega-Beltrán, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, L. Salkoff, The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility, *FEBS Lett.* 584 (5 (March)) (2010) 1041–1046.
- [6] D. Wang, S.M. King, T.A. Quill, L.K. Doolittle, D.L. Garbers, A new sperm-specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger required for sperm motility and fertility, *Nat. Cell Biol.* 5 (12 (December)) (2003) 1117–1122.
- [7] G. Esposito, B.S. Jaiswal, F. Xie, M.M. Krajnc-Franken, T.J. Robben, A.M. Strik, C. Kuil, R.L. Philipsen, M. van Duin, M. Conti, J. Gossen, B.S. Jaiswal, M. van Duin, M. Conti, J. Gossen, B.S. Jaiswal, Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (9 (March)) (2004) 2993–2998.
- [8] K.C. Hess, B.H. Jones, B. Marquez, Y. Chen, T.S. Ord, M. Kamenetsky, C. Miyamoto, J.H. Zippin, G.S. Kopf, S.S. Suarez, L.R. Levin, C.J. Williams, J. Buck, S.B. Moss, The 'soluble' adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization, *Dev. Cell* 9 (2 (August)) (2005) 249–259.
- [9] A. Kotyk, Intracellular pH and its Measurement, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. 189.
- [10] F.B. Loisel, J.R. Casey, Measurement of intracellular pH, *Methods Mol. Biol.* 637 (2010) 311–331.
- [11] J. Orłowski, S. Grinstein,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers, *Compr. Physiol.* 1 (4 (October)) (2011) 2083–2100.
- [12] P.V. Lishko, I.L. Botchkina, A. Fedorenko, Y. Kirichok, Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel, *Cell* 140 (3 (February)) (2010) 327–337.
- [13] T.E. DeCoursey, Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family, *Physiol. Rev.* 93 (2 (April)) (2013) 599–652.
- [14] W.F. Boron, L. Chen, M.D. Parker, Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters, *J. Exp. Biol.* 212 (Pt 11 (June)) (2009) 1697–1706.
- [15] S.L. Alper, Molecular physiology and genetics of  $\text{Na}^+$ -independent SLC4 anion exchangers, *J. Exp. Biol.* 212 (Pt 11 (June)) (2009) 1672–1683.
- [16] A. Sindić, M.H. Chang, D.B. Mount, M.F. Romero, Renal physiology of SLC26 anion exchangers, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16 (5 (September)) (2007) 484–490.
- [17] D. Figueiras-Fierro, J.J. Acevedo, P. Martínez-López, J. Escoffier, F.V. Sepúlveda, E. Balderas, G. Orta, P.E. Visconti, A. Darszon, Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm, *J. Cell. Physiol.* 228 (3 (March)) (2013) 590–601.
- [18] E.O. Hernández-González, C.L. Treviño, L.E. Castellano, J.L. de la Vega-Beltrán, A.Y. Ocampo, E. Wertheimer, P.E. Visconti, A. Darszon, Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation, *J. Biol. Chem.* 282 (33 (August)) (2007) 24397–24406.
- [19] A.K. Stewart, A. Yamamoto, M. Nakakuki, T. Kondo, S.L. Alper, H. Ishiguro, Functional coupling of apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange with CFTR in stimulated  $\text{HCO}_3^-$  secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296 (6 (June)) (2009) G1307–G1317.
- [20] W.M. Xu, Q.X. Shi, W.Y. Chen, C.X. Zhou, Y. Ni, D.K. Rowlands, G. Yi Liu, H. Zhu, X.F. Wang, Z.H. Chen, S.C. Zhou, H.S. Dong, X.H. Zhang, Y.W. Chung, Y.Y. Yuan, W.X. Yang, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (23 (June)) (2007) 9816–9821.
- [21] J.C. Chávez, E.O. Hernández-González, E. Wertheimer, P.E. Visconti, A. Darszon, C.L. Treviño, Participation of the  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the  $\text{Cl}^-$  channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation, *Biol. Reprod.* 86 (1) (2012) 1–14.
- [22] T.A. Quill, D. Wang, D.L. Garbers, Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper, *Mol. Cell. Endocrinol.* 250 (1–2 (May)) (2006) 84–92.
- [23] N. Okamura, Y. Tajima, A. Soejima, H. Masuda, Y. Sugita, Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase, *J. Biol. Chem.* 260 (17 (August)) (1985) 9699–9705.
- [24] B.S. Jaiswal, M. Conti, Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (19 (September)) (2003) 10676–10681.
- [25] J. Buck, M.L. Sinclair, L. Schapal, M.J. Cann, L.R. Levin, Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1 (January)) (1999) 79–84.
- [26] Y. Chen, M.J. Cann, T.N. Litvin, V. Iourgenko, M.L. Sinclair, L.R. Levin, J. Buck, Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor, *Science* 289 (5479 (July)) (2000) 625–628.
- [27] B.S. Jaiswal, M. Conti, Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* 276 (34 (August)) (2001) 31698–31708.
- [28] J.H. Zippin, Y. Chen, P. Nahirney, M. Kamenetsky, M.S. Wuttke, D.A. Fischman, L.R. Levin, J. Buck, Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains, *FASEB J.* 17 (1 (January)) (2003) 82–84.
- [29] M. Donowitz, B. Cha, N.C. Zachos, C.L. Brett, A. Sharma, C.M. Tse, X. Li, NHERF family and NHE3 regulation, *J. Physiol.* 567 (Pt 1 (August)) (2005) 3–11.
- [30] D.G. Fuster, R.T. Alexander, Traditional and emerging roles for the SLC9  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers, *Pflugers Arch.* 466 (1 (January)) (2014) 61–76.
- [31] M.A. Garcia, S. Meizel, Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, *Mol. Reprod. Dev.* 52 (2 (February)) (1999) 189–195.
- [32] A.L. Woo, P.F. James, J.B. Lingrel, Roles of the Na, K-ATPase alpha4 isoform and the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in sperm motility, *Mol. Reprod. Dev.* 62 (3 (July)) (2002) 348–356.
- [33] T. Liu, J.C. Huang, W.L. Zuo, C.L. Lu, M. Chen, X. Sen Zhang, Y.C. Li, H. Cai, W.L. Zhou, Z.Y. Hu, F. Gao, Y.X. Liu, A novel testis-specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger is involved in sperm motility and fertility, *Front. Biosci. (Elite Ed)* 2 (3 (January)) (2010) 566–581.
- [34] J. Orłowski, S. Grinstein, Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family, *Pflugers Arch.* 447 (5 (February)) (2004) 549–565.
- [35] H.C. Lee, A membrane potential-sensitive  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa, *J. Biol. Chem.* 259 (24 (December)) (1984) 15315–15319.
- [36] H.C. Lee, The voltage-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe, *J. Biol. Chem.* 260 (19 (September)) (1985) 10794–10799.
- [37] D. Wang, J. Hu, I.A. Bobulescu, T.A. Quill, P. McLeroy, O.W. Moe, D.L. Garbers, A sperm-specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (22 (May)) (2007) 9325–9330.
- [38] M. Nomura, V.D. Vacquier, Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella, *Cell Motil. Cytoskeleton* 63 (9 (September)) (2006) 582–590.
- [39] T.I. Brelidze, A.E. Carlson, B. Sankaran, W.N. Zagotta, Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel, *Nature* 481 (7382 (January)) (2012) 530–533.
- [40] N. Kannan, J. Wu, G.S. Anand, S. Yooshep, A.F. Neuwald, J.C. Venter, S.S. Taylor, Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module, *Genome Biol.* 8 (12 (January)) (2007) R264.
- [41] M. Sasaki, M. Takagi, Y. Okamura, A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel, *Science* 312 (5773 (April)) (2006) 589–592.
- [42] I.S. Ramsey, M.M. Moran, J.A. Chong, D.E. Clapham, A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain, *Nature* 440 (7088 (April)) (2006) 1213–1216.
- [43] S. Aonuma, M. Okabe, M. Kawaguchi, Y. Kishi, Zinc effects on mouse spermatozoa and in-vitro fertilization, *J. Reprod. Fertil.* 63 (2 (November)) (1981) 463–466.
- [44] C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (12 (June)) (2010) 3467–3474.
- [45] E. Ekstedt, L. Holm, Y. Ridderstråle, Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage, *J. Mol. Histol.* 35 (2) (2004) 167–173.

- [46] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, C.L. Treviño, Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa, *Physiol. Rev.* 91 (4 (October)) (2011) 1305–1355.
- [47] P.M. Wandernoth, M. Raubuch, N. Mannowetz, H.M. Becker, J.W. Deitmer, W.S. Sly, G. Wennemuth, Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm, *PLoS One* 5 (11 (January)) (2010) e15061.
- [48] N. Mannowetz, P.M. Wandernoth, G. Wennemuth, Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation, *PLoS One* 7 (7 (January)) (2012) e41030.
- [49] K. Inaba, C. Dréanno, J. Cosson, Control of flatfish sperm motility by CO<sub>2</sub> and carbonic anhydrase, *Cell Motil. Cytoskeleton* 55 (3 (July)) (2003) 174–187.
- [50] N. Hirohashi, L. Alvarez, K. Shiba, E. Fujiwara, Y. Iwata, T. Mohri, K. Inaba, K. Chiba, H. Ochi, C.T. Supuran, N. Kotzur, Y. Kakiuchi, U.B. Kaupp, S.A. Baba, Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO<sub>2</sub>, *Curr. Biol.* 23 (9 (May)) (2013) 775–781.
- [51] W.F. Boron, Evaluating the role of carbonic anhydrases in the transport of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> related species, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2 (February)) (2010) 410–421.
- [52] M.F. Romero, A.P. Chen, M.D. Parker, W.F. Boron, The SLC4 family of bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) transporters, *Mol. Aspects Med.* 34 (2–3) (2013) 159–182.
- [53] S.L. Alper, A.K. Sharma, The SLC26 gene family of anion transporters and channels, *Mol. Aspects Med.* 34 (2–3) (2013) 494–515.
- [54] N. Cant, N. Pollock, R.C. Ford, CFTR structure and cystic fibrosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2014).
- [55] K. Holappa, M. Mustonen, M. Parvinen, P. Vihko, H. Rajaniemi, S. Kellokumpu, Primary structure of a sperm cell anion exchanger and its messenger ribonucleic acid expression during spermatogenesis, *Biol. Reprod.* 61 (4 (October)) (1999) 981–986.
- [56] S. Parkkila, H. Rajaniemi, S. Kellokumpu, Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells, *Biol. Reprod.* 49 (2 (August)) (1993) 326–331.
- [57] P. Höglund, S. Hihnal, M. Kujala, A. Tiitinen, L. Dunkel, C. Holmberg, Disruption of the SLC26A3-mediated anion transport is associated with male subfertility, *Fertil. Steril.* 85 (1 (January)) (2006) 232–235.
- [58] B. Rode, T. Dirami, N. Bakouh, M. Rizk-Rabin, C. Norez, P. Lhuillier, P. Lorès, M. Jollivet, P. Melin, I. Zvetkova, T. Bienvenu, F. Becq, G. Planelles, A. Edelman, G. Gacon, A. Touré, The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation, *Hum. Mol. Genet.* 21 (6 (March)) (2012) 1287–1298.
- [59] W.Y. Chen, W.M. Xu, Z.H. Chen, Y. Ni, Y.Y. Yuan, S.C. Zhou, W.W. Zhou, L.L. Tsang, Y.W. Chung, P. Höglund, H.C. Chan, Q.X. Shi, Cl<sup>-</sup> is required for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger (SLC26A3) and CFTR, *Biol. Reprod.* 80 (1 (January)) (2009) 115–123.
- [60] H.C. Chan, X. Sun, SLC26 anion exchangers in uterine epithelial cells and spermatozoa: clues from the past and hints to the future, *Cell Biol. Int.* 38 (1 (January)) (2014) 1–7.
- [61] I.A. Demarco, F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J.L. De La Vega-Beltran, J.W. Hockensmith, G.S. Kopf, A. Darszon, P.E. Visconti, Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation, *J. Biol. Chem.* 278 (9 (February)) (2003) 7001–7009.
- [62] Y. Zeng, J.A. Oberdorf, H.M. Florman, pH regulation in mouse sperm: identification of Na<sup>+</sup>(+), Cl<sup>-</sup>(-), and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation, *Dev. Biol.* 173 (2 (February)) (1996) 510–520.
- [63] C.M. Santi, T. Santos, A. Hernández-Cruz, A. Darszon, 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 (1 (July)) (1998) 33–53.
- [64] A.E. Carlsson, B. Hille, D.F. Babcock, External Ca<sup>2+</sup> acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility, *Dev. Biol.* 312 (1 (December)) (2007) 183–192.
- [65] T.A. Quill, D. Ren, D.E. Clapham, D.L. Garbers, A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (22 (October)) (2001) 12527–12531.
- [66] A.E. Carlsson, R.E. Westenbroek, T. Quill, D. Ren, D.E. Clapham, B. Hille, D.L. Garbers, D.F. Babcock, CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (25 (December)) (2003) 14864–14868.
- [67] Y. Kirichok, B. Navarro, D.E. Clapham, Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel, *Nature* 439 (7077) (2006) 737–740.
- [68] P.V. Lishko, Y. Kirichok, D. Ren, B. Navarro, J.J. Chung, D.E. Clapham, The control of male fertility by spermatozoan ion channels, *Annu. Rev. Physiol.* 74 (2012) 453–475.
- [69] C.L. Barratt, S.J. Publicover, Sperm are promiscuous and CatSper is to blame, *EMBO J.* 31 (7 (April)) (2012) 1624–1626.
- [70] M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito, L. Salkoff, Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (6 (February)) (1998) 3509–3516.
- [71] X.H. Zeng, C. Yang, S.T. Kim, C.J. Lingle, X.M. Xia, Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K<sup>+</sup> current in mouse spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (14 (April)) (2011) 5879–5884.
- [72] C. Brenker, Y. Zhou, A. Müller, F.A. Echeverry, C. Trötschel, A. Poetsch, X.-M. Xia, W. Böning, C.J. Lingle, U.B. Kaupp, T. Strünker, The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current of human sperm is mediated by Slo3, *Elife* 3 (2014) e01438.
- [73] N. Mannowetz, N.M. Naidoo, S.A.S. Choo, J.F. Smith, P.V. Lishko, Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa, *Elife* 2 (2013) e01009.
- [74] I. López-González, P. Torres-Rodríguez, O. Sánchez-Carranza, A. Solís-López, C.M. Santi, A. Darszon, C.L. Treviño, Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation, *Mol. Hum. Reprod.* (2014).
- [75] S.A. Mansell, S.J. Publicover, C.L.R. Barratt, S.M. Wilson, Patch clamp studies of human sperm under physiological ionic conditions reveal three functionally and pharmacologically distinct cation channels, *Mol. Hum. Reprod.* 20 (5 (May)) (2014) 392–408.
- [76] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration, *J. Biol. Chem.* 258 (9 (May)) (1983) 5392–5399.
- [77] V. Giroux-Widemann, P. Jouannet, I. Pignot-Paintrand, D. Feneux, Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with Triton X-100, *Mol. Reprod. Dev.* 29 (2 (June)) (1991) 157–162.
- [78] C.H. Johnson, D.L. Clapper, M.M. Winkler, H.C. Lee, D. Epel, A volatile inhibitor immobilizes sea urchin sperm in semen by depressing the intracellular pH, *Dev. Biol.* 98 (2 (August)) (1983) 493–501.
- [79] H.C. Lee, C. Johnson, D. Epel, M. Hall, H.M. Station, Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm, *Dev. Biol.* 45 (1 (January)) (1983) 31–45.
- [80] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *strongylocentrotus purpuratus*, *J. Biol. Chem.* 257 (24 (December)) (1982) 14881–14890.
- [81] B.M. Shapiro, R.M. Tombes, A biochemical pathway for a cellular behaviour: pHi, phosphorylcreatine shuttles, and sperm motility, *BioEssays* 3 (3 (September)) (1985) 100–103.
- [82] D.L. Clapper, J.A. Davis, P.J. Lamothe, C. Patton, D. Epel, Involvement of zinc in the regulation of pHi, motility, and acrosome reactions in sea urchin sperm, *J. Cell Biol.* 100 (6 (June)) (1985) 1817–1824.
- [83] N. Suzuki, Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs, *Zool. Sci.* 12 (1 (February)) (1995) 13–27.
- [84] H. Ohtake, Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. II. Sperm-activating substance obtained from jelly coat of sea-urchin eggs, *J. Exp. Zool.* 198 (3 (December)) (1976) 313–322.
- [85] J.R. Hansbrough, D.L. Garbers, Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin, *J. Biol. Chem.* 256 (5 (March)) (1981) 2235–2241.
- [86] D.R. Repaske, D.L. Garbers, A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa, *J. Biol. Chem.* 258 (10 (May)) (1983) 6025–6029.
- [87] A. Darszon, A. Guerrero, B.E. Galindo, T. Nishigaki, C.D. Wood, Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (5–6 (January)) (2008) 595–606.
- [88] G.E. Ward, C.J. Brokaw, D.L. Garbers, V.D. Vacquier, Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer, *J. Cell Biol.* 101 (6 (December)) (1985) 2324–2329.
- [89] A. Guerrero, T. Nishigaki, J. Carneiro, Y. Tatsu, C.D. Wood, A. Darszon, Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing, *Dev. Biol.* 344 (1 (August)) (2010) 52–65.
- [90] U.B. Kaupp, N.D. Kashikar, I. Weyand, Mechanisms of sperm chemotaxis, *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 93–117.
- [91] C.D. Wood, T. Nishigaki, T. Furuta, S.A. Baba, A. Darszon, Real-time analysis of the role of Ca<sup>2+</sup> in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm, *J. Cell Biol.* 169 (5 (June)) (2005) 725–731.
- [92] C.D. Wood, T. Nishigaki, Y. Tatsu, N. Yumoto, S.A. Baba, M. Whitaker, A. Darszon, 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 (2 (June)) (2007) 525–537.
- [93] M. Böhmer, Q. Van, I. Weyand, V. Hagen, M. Beyermann, M. Matsumoto, M. Hoshi, E. Hildebrand, U.B. Kaupp, Ca<sup>2+</sup> spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm, *EMBO J.* 24 (15 (August)) (2005) 2741–2752.
- [94] L. Alvarez, L. Dai, B.M. Friedrich, N.D. Kashikar, I. Gregor, R. Pascal, U.B. Kaupp, The rate of change in Ca<sup>2+</sup> concentration controls sperm chemotaxis, *J. Cell Biol.* 196 (5 (March)) (2012) 653–663.
- [95] N.D. Kashikar, L. Alvarez, R. Seifert, I. Gregor, O. Jäckle, M. Beyermann, E. Krause, U.B. Kaupp, Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm, *J. Cell Biol.* 198 (6 (September)) (2012) 1075–1091.
- [96] C.D. Wood, A. Darszon, M. Whitaker, Speract induces calcium oscillations in the sperm tail, *J. Cell Biol.* 161 (1 (April)) (2003) 89–101.
- [97] B.E. Galindo, J.L. de la Vega-Beltrán, P. Labarca, V.D. Vacquier, A. Darszon, SpetrakCNG: A novel cyclic nucleotide gated K<sup>+</sup> channel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (3 (March)) (2007) 668–675.
- [98] W. Böning, A. Loogen, R. Seifert, N. Kashikar, C. Klemm, E. Krause, V. Hagen, E. Kremmer, T. Strünker, U.B. Kaupp, An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis, *Sci. Signal.* 2 (94 (January)) (2009) 68.
- [99] T. Harumi, K. Hoshino, N. Suzuki, Effects of sperm-activating peptide I on hemacentrotus pulcherrimus spermatozoa in high potassium sea water, *Dev. Growth Differ.* 34 (2 (April)) (1992) 163–172.

- [100] H.C. Lee, D.L. Garbers, Modulation of the voltage-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract, *J. Biol. Chem.* 261 (34 (December)) (1986) 16026–16032.
- [101] T. Nishigaki, F.Z. Zamudio, L.D. Possani, A. Darszon, Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2 (June)) (2001) 531–535.
- [102] T. Nishigaki, C.D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Elias, K. Shiba, S.A. Baba, A. Darszon, A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  before its increase, *Dev. Biol.* 272 (2 (August)) (2004) 376–388.
- [103] T. Strünker, I. Weyand, W. Bönigk, Q. Van, A. Loogen, J.E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, U.B. Kaupp, A  $\text{K}^+$ -selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm, *Nat. Cell Biol.* 8 (10 (October)) (2006) 1149–1154.
- [104] G. Granados-Gonzalez, I. Mendoza-Lujambio, E. Rodriguez, B.E. Galindo, C. Beltrán, A. Darszon, Identification of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in sea urchin sperm, *FEBS Lett.* 579 (29 (December)) (2005) 6667–6672.
- [105] J. Solzin, A. Helbig, Q. Van, J.E. Brown, E. Hildebrand, I. Weyand, U.B. Kaupp, Revisiting the role of  $\text{H}^+$  in chemotactic signaling of sperm, *J. Gen. Physiol.* 124 (2 (August)) (2004) 115–124.
- [106] T. Nishigaki, A. Darszon, Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor, *Dev. Biol.* 223 (1 (July)) (2000) 17–26.
- [107] D.L. Garbers, Molecular basis of fertilization, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 719–742.
- [108] M. Nomura, C. Beltrán, A. Darszon, V.D. Vacquier, A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa, *Gene* 353 (2 (July)) (2005) 231–238.
- [109] Y.-H. Su, V.D. Vacquier, Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa, *Mol. Biol. Cell* 17 (1 (January)) (2006) 114–121.
- [110] J.F. Smith, O. Syritsyna, M. Fellous, C. Serres, N. Mannowetz, Y. Kirichok, P.V. Lishko, Disruption of the principal, progesterone-activated sperm  $\text{Ca}^{2+}$  channel in a CatSper2-deficient infertile patient, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (17 (April)) (2013) 6823–6828.
- [111] T. Nishigaki, A.L. González-Cota, G. Orta, CatSper in male infertility, in: N. Weiss, A. Koschak (Eds.), *Pathologies of Calcium Channels*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 713–728.
- [112] X. Cai, D.E. Clapham, Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSperbeta, *PLoS One* 3 (10 (January)) (2008) e3569.
- [113] O. Zapata, A. Darszon, A. Guerrero, L. García, E. Rodríguez, Acrosome reaction inactivation in sea urchin sperm, *Biochim. Biophys. Acta* 1401 (3 (March)) (1998) 329–338.
- [114] H. Mohri, R. Yanagimachi, Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. A study using demembrated sperm models, *Exp. Cell Res.* 127 (1 (May)) (1980) 191–196.
- [115] D.W. Carr, M.C. Usselman, T.S. Acott, Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison, *Biol. Reprod.* 33 (3 (October)) (1985) 588–595.
- [116] S. Breton, P.J. Smith, B. Lui, D. Brown, Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping ( $\text{H}^+$ -ATPase), *Nat. Med.* 2 (4 (April)) (1996) 470–472.
- [117] S.S. Suarez, Control of hyperactivation in sperm, *Hum. Reprod. Update* 14 (6 (2008)) 647–657.
- [118] K. Ho, C.A. Wolff, S.S. Suarez, CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir, *Reprod. Fert. Dev.* 21 (2 (January)) (2009) 345–350.
- [119] D.H. Maas, B.T. Storey, L. Mastroianni, Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), *Fertil. Steril.* 28 (9 (September)) (1977) 981–985.
- [120] R. Yanagimachi, Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, second ed., Raven, New York, 1994, pp. 189–317.
- [121] J.C. Dan, Studies on the acrosome. III. Effect of calcium deficiency, *Biol. Bull.* 107 (3 (December)) (1954) 335–349.
- [122] R.W. Schackmann, E.M. Eddy, B.M. Shapiro, The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirements and movements, *Dev. Biol.* 65 (2 (August)) (1978) 483–495.
- [123] C. Arnoult, Y. Zeng, H.M. Florman, ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization, *J. Cell Biol.* 134 (3 (August)) (1996) 637–645.
- [124] M. Jin, E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S. A. Baba, K. Chiba, N. Hirohashi, Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011). PMID 21383182.
- [125] J. Xia, D. Ren, Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels, *Biol. Reprod.* 80 (6 (June)) (2009) 1092–1098.
- [126] T. Strünker, N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, U.B. Kaupp, The CatSper channel mediates progesterone-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in human sperm, *Nature* 471 (7338 (March)) (2011) 382–386.
- [127] P.V. Lishko, I.L. Botchkina, Y. Kirichok, Progesterone activates the principal  $\text{Ca}^{2+}$  channel of human sperm, *Nature* 471 (7338 (March)) (2011) 387–391.
- [128] M. Ikawa, N. Inoue, A.M. Benham, M. Okabe, Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte, *J. Clin. Invest.* 120 (4 (April)) (2010) 984–994.
- [129] A.C. Vilela-Silva, N. Hirohashi, P.A. Mourão, The structure of sulfated polysaccharides ensures a carbohydrate-based mechanism for species recognition during sea urchin fertilization, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (5–6 (January)) (2008) 551–559.
- [130] L. Santella, F. Vasilev, J.T. Chun, Fertilization in echinoderms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 (3 (August)) (2012) 588–594.
- [131] V.D. Vacquier, The quest for the sea urchin egg receptor for sperm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 (3 (August)) (2012) 583–587.
- [132] R.W. Schackmann, R. Christen, B.M. Shapiro, Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (10 (October)) (1981) 6066–6070.
- [133] J. García-Soto, A. Darszon, High pH-induced acrosome reaction and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in sea urchin sperm suspended in  $\text{Na}^+$ -free seawater, *Dev. Biol.* 110 (2 (August)) (1985) 338–345.
- [134] J.S. Trimmer, R.W. Schackmann, V.D. Vacquier, Monoclonal antibodies increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in sea urchin spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (23 (December)) (1986) 9055–9059.
- [135] A. Guerrero, A. Darszon, Evidence for the activation of two different  $\text{Ca}^{2+}$  channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm, *J. Biol. Chem.* 264 (33 (November)) (1989) 19593–19599.
- [136] L.G. Tilney, D.P. Kiehart, C. Sardet, M. Tilney, Polymerization of actin. IV. Role of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{H}^+$  in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm, *J. Cell Biol.* 77 (2 (May)) (1978) 536–550.
- [137] R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*, *Dev. Biol.* 81 (1 (January)) (1981) 145–154.
- [138] S. Ali Akbar, K.H. Nicolaides, P.R. Brown, Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues, *Early Hum. Dev.* 51 (3 (July)) (1998) 205–211.
- [139] S. Parkkila, K. Kaunisto, S. Kellokumpu, H. Rajaniemi, A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa, *Histochemistry* 95 (5 (January)) (1991) 477–482.
- [140] P. Mezquita, C. Mezquita, J. Mezquita, Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (3 (March)) (1999) 199–205.
- [141] P. Halmi, J. Lehtonen, A. Waheed, W.S. Sly, S. Parkkila, Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues, *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 277 (1 (March)) (2004) 171–177.
- [142] J. Lehtonen, B. Shen, M. Vihinen, A. Casini, A. Scozzafava, C.T. Supuran, A.-K. Parkkila, J. Saarnio, A.J. Kivelä, A. Waheed, W.S. Sly, S. Parkkila, Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family, *J. Biol. Chem.* 279 (4 (January)) (2004) 2719–2727.

## Capítulo de libro

1. Nishigaki, T., **González-Cota, A.L.** & Orta Salazar, G.J., 2014. CatSper in Male Infertility. In *Pathologies of Calcium Channels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 713–728.

# Chapter 34

## CatSper in Male Infertility

Takuya Nishigaki, Ana Laura González-Cota  
and Gerardo José Orta Salazar

**Abstract** In 2001, two groups independently reported different components of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel named CatSper, which is expressed only in the testis and localized in the sperm flagellum. Now, we know that CatSper is a sperm-specific  $\text{Ca}^{2+}$  channel composed of four distinct pore-forming subunits accompanied with, at least, three auxiliary subunits. Although there is no heterologous expression system to study this CatSper channel, the elimination of any single subunit ever tried in transgenic mice results in male infertility, which indicates that each individual subunit is essential for the correct channel assembly. Whole-cell patch clamp recordings directly taken from spermatozoa revealed that CatSper is a moderately voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel and is activated by intracellular alkalinization and several extracellular ligands, i.e., progesterone and prostaglandin E in human spermatozoa. The spermatozoa of CatSper null mice exhibit a defect in hyperactivated flagellar motility, a vigorous flagellar movement required for fertilization under physiological conditions. In agreement with this, there are some families suffering from male infertility correlated with mutations in CatSper-related genes.

### 34.1 Introduction

The motility propelled by the flagellum is a special feature of spermatozoa and any defects in this function can lead to male infertility (Darszon et al. 2011). The flagellar beat is generated by the axoneme, which is also found in the cilium (or cilia) of epithelial cells in the whole body (Lindemann and Lesich 2010). Therefore, a defective mutation of a certain component in the axoneme can cause a

---

T. Nishigaki (✉) · A. L. González-Cota · G. J. Orta Salazar  
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad #2001, Colonia  
Chamilpa 62210 Cuernavaca, Morelos, México  
e-mail: takuya@ibt.unam.mx

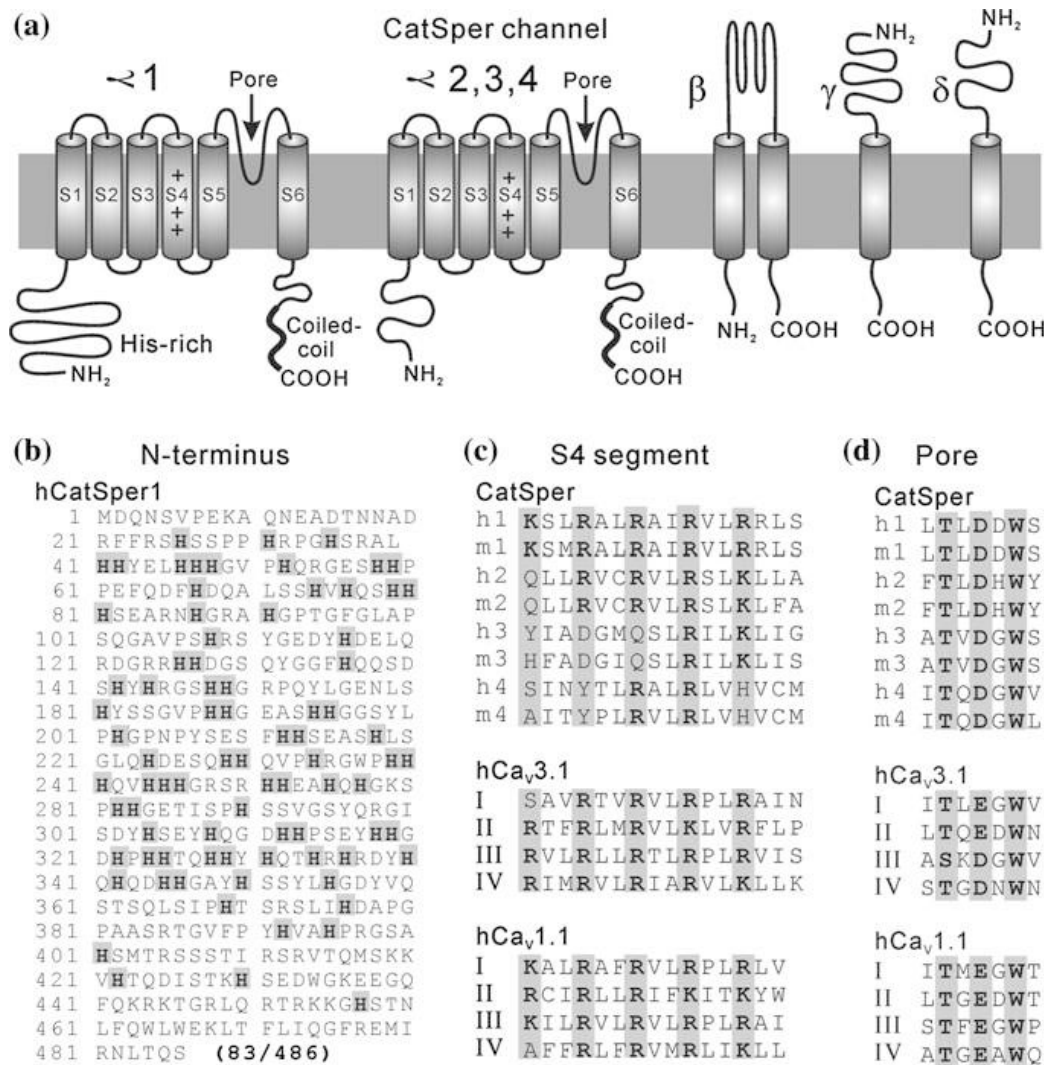
malfunction in sperm flagellar beating leading to male infertility accompanied with diminution of ciliary motion such as primary ciliary dyskinesia (Munro et al. 1994). On the other hand, there are several external factors that modulate the axoneme function such as ATP, pH,  $\text{Ca}^{2+}$ , and cAMP (protein phosphorylation depending on cAMP). Spermatozoa possess multiple sperm-specific proteins that control these factors: glycolytic enzymes (Miki et al. 2004), sodium-proton exchanger (Wang et al. 2003),  $\text{Ca}^{2+}$  channel (Ren et al. 2001),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Okunade et al. 2004), adenylyl cyclase (Buck et al. 1999), and protein kinase (Nolan et al. 2004), etc. Therefore, a mutation in those proteins can cause male infertility as a result of the abnormal regulation of sperm motility without any other defects in the body. In this chapter, we review the structure and the function of CatSper, a sperm-specific  $\text{Ca}^{2+}$  channel essential to male fertility, and some reports of male infertility related to mutations that affect this channel.

## 34.2 Structure of CatSper

As seen in Fig. 34.1, CatSper is composed of four pore-forming  $\alpha$  subunits (Ren et al. 2001; Quill et al. 2001; Arias et al. 2003; Lobley et al. 2003), which have six transmembrane segments, and at least three auxiliary subunits,  $\beta$  (Liu et al. 2007),  $\gamma$  (Wang et al. 2009), and  $\delta$  (Chung et al. 2011). In the fourth segment (S4) of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunit, four or five positively charged residues are found every three amino acids, which is a typical feature of the S4 segment of voltage-gated channels. In contrast,  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  have only two (Fig. 34.1c), suggesting a correlation with the moderate voltage dependence of this channel described later. One of the striking features of CatSper is that the pore of the channel is composed of four separated polypeptides instead of a single polypeptide as known in other voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Another interesting feature is that  $\alpha 1$  subunit has many histidine residues in its N-terminal cytoplasmic domain (Fig. 34.1b), which is proposed to function as a pH sensor (Kirichok et al. 2006). All  $\alpha$  subunits have a pore-forming loop with the typical  $\text{Ca}^{2+}$  selective channel motif ([T/S]  $\times$  [D/E]  $\times$  W) (Fig. 34.1d). Interestingly, CatSper uses only aspartic acids in this motif (DDDD) instead of a mixture of aspartic acids and glutamic acids (EEDD) found in T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel ( $\text{Ca}_v3$ ) or only glutamic acids (EEEE) found in other voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$ ) in vertebrates (Senatore et al. 2013), which suggests a distinct cation selectivity of CatSper compared with typical voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

At present, three membrane proteins ( $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ) have been reported as auxiliary subunits of CatSper. The  $\beta$  subunit has two transmembrane segments and  $\gamma$  and  $\delta$  have a single transmembrane segment (Liu et al. 2007; Wang et al. 2009; Chung et al. 2011) (Fig. 34.1a). All three auxiliary subunits have large extracellular domains, which may serve as receptors for extracellular ligands, in contrast to small cytoplasmic tails.





**Fig. 34.1** Structure of CatSper. **a** Topology of pore-forming  $\alpha$  subunits (1 – 4) and auxiliary subunits ( $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ). **b** Amino acid sequence of cytoplasmic N-terminal region of mouse CatSper is shown with histidine residue as *bold* and *gray* shadow. **c** Amino acid sequences of S4 segments of human CatSper (h1 – h4), mouse CatSper (m1 – m4), human Ca<sub>v</sub>3.1 (hCa<sub>v</sub>3.1, I – IV) (Perez-Reyes et al. 1998) and human Ca<sub>v</sub>1.1 (hCa<sub>v</sub>1.1, I – IV) (Tanabe et al. 1987) are aligned with *gray* shadows in every three residues. Arginine and Lysine are expressed as *bold*. **d** Amino acid sequences of the pore region are aligned as in (c). Three important residues for Ca<sup>2+</sup> selective channels (T/S, E/D and W) are shown as *bold* and *gray* shadow

### 34.3 Aspects of Evolution

Amino acid sequences of all subunits of CatSper show a high level of diversity among different species (Table 34.1), which is a common feature of proteins specifically found in gametes (Swanson and Vacquier 2002). In general, transmembrane segments conserve their amino acid sequences, but relatively large cytoplasmic domains found in CatSper 1, 2, and 3 ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\alpha$ 3) and even large extracellular

**Table 34.1** Amino acid identity of CatSper subunits between mouse and human

CatSper subunit	% of identity
$\alpha 1$	55
$\alpha 2$	65
$\alpha 3$	66
$\alpha 4$	72
$\beta$	56
$\gamma$	55
$\delta$	51

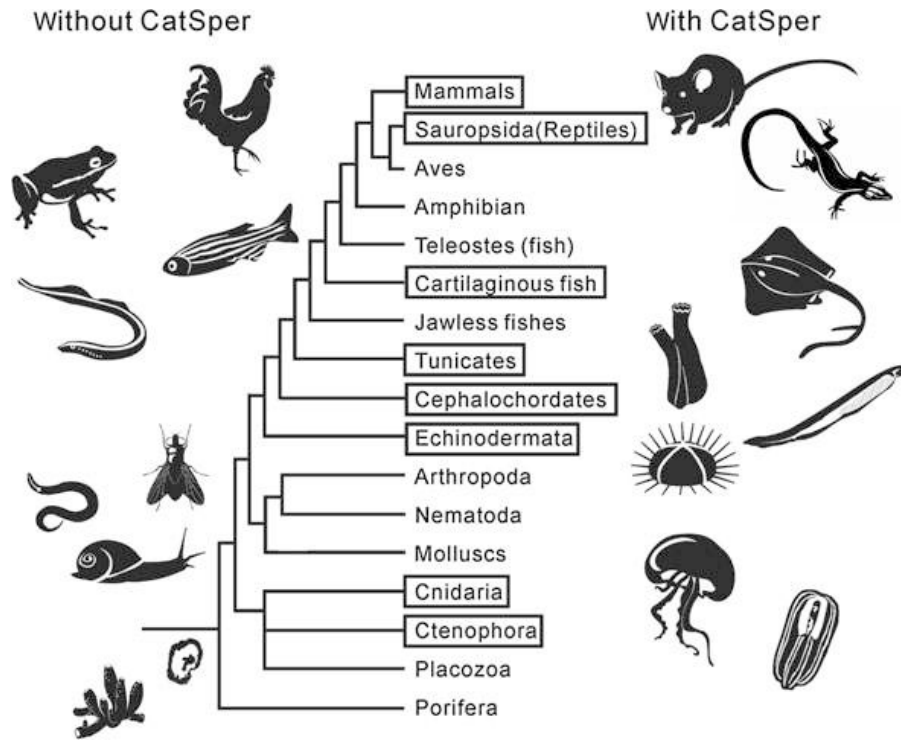
domains found in all auxiliary subunits ( $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ) show increased diversity in their amino acid sequences. As a consequence, CatSper4 ( $\alpha 4$ ) subunit, which have relatively small cytoplasmic domains, conserve their amino acid sequences better than any other subunits (Jin et al. 2005) (Table 34.1). The diversity found in  $\alpha 1$  subunit is mainly due to a variety of amino acid sequences found in the histidine-rich N-terminal domain. This domain also shows many indels (insertion and deletion) even among species of primates although its biological significance is unknown (Podlaha and Zhang 2003). The diversity found in the auxiliary subunits could reflect a difference of ligand specificity between species.

Another very peculiar point of CatSper in terms of evolution is its mosaic distribution in metazoa as shown in Fig. 34.2 (Cai and Clapham 2008). For example, among vertebrates, neither aves (birds) and amphibians nor teleosts (fish) have CatSper (all  $\alpha$  and  $\beta$  subunits) although cartilaginous fishes (ray) possess this channel. On the other hand, arthropoda (insects) and nematoda (*C. elegans*) do not have CatSper, but echinoderms (sea urchin) and cnidaria (sea anemone) conserve this channel. It is worth noting that the  $\delta$  subunit is found only in mammals and reptiles but not in other species (Chung et al. 2011), indicating that this subunit has a unique function in mammals and reptiles and is not an essential subunit for CatSper channel in many other species.

In the case of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, TRPP2 channel (PKD2 channel) is localized on the distal tip of the sperm flagellum and a targeted mutation of this channel results in male infertility without apparent alterations in sperm morphology (Watnick et al. 2003). A detailed analysis of sperm motility in this mutant revealed that those spermatozoa swim backwards in the female reproductive tract (Kottgen et al. 2011), which clearly indicates a crucial role of TRPP2 channel for sperm motility regulation in this species. It would be interesting to identify what type of  $\text{Ca}^{2+}$  channels are involved in sperm motility regulation in species that lack CatSper in their genome.

### 34.4 Biophysical Properties

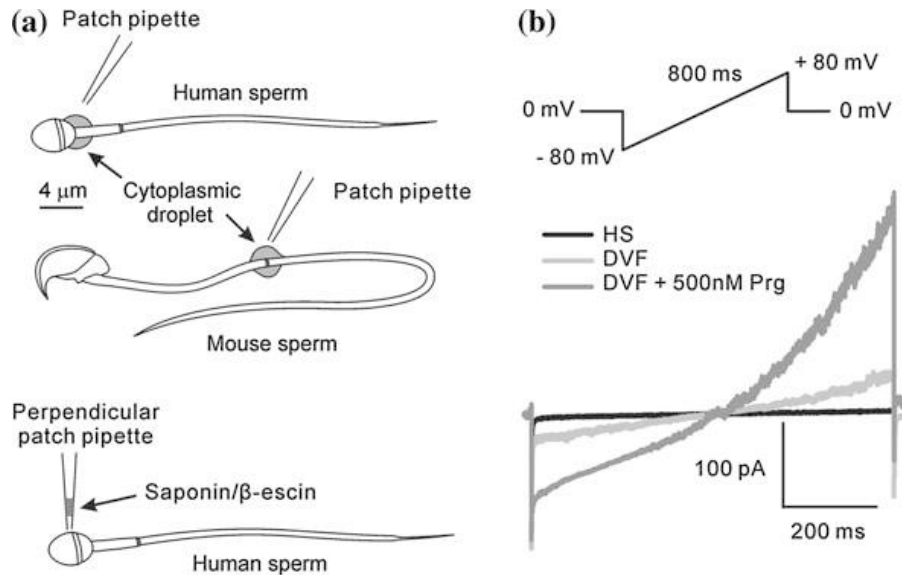
Elimination of any single subunit of CatSper that has been attempted (all  $\alpha$  and  $\delta$  subunits), in transgenic mice, results in male infertility accompanied with the lack of CatSper current in the spermatozoa (Qi et al. 2007; Chung et al. 2011; Jin et al.



**Fig. 34.2** Distribution of CatSper  $\alpha(1 - 4)$  and  $\beta$  subunits in metazoan. This figure indicates the distribution of CatSper orthologs in whole metazoan species, which was revealed by the bioinformatic analysis of genome DNA sequences (Cai and Clapham 2008). The species which conserve CatSper genes are in box. In order to recognize each species easily, animal images are illustrated separating species possessing CatSper on the *right side* and those lacking this channel on the *left*. Some animal images do not correspond to the exact species whose genome sequences are determined, but they represent popular species from the same taxonomic phylum or class

2007; Kirichok et al. 2006), indicating that each subunit is indispensable for the proper channel assembly and function. In CatSper1 ( $\alpha 1$  subunit) null mice, all other subunits including  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  are missing in the mature spermatozoa (Liu et al. 2007; Wang et al. 2009; Chung et al. 2011), suggesting that only the correctly assembled CatSper channel can be transferred to the appropriate place, the plasma membrane of the principal piece in the flagellum. When they fail to assemble a functional channel, they are likely to be degraded during spermatogenesis. On the other hand, all attempts ever made to express a functional CatSper channel in heterologous systems have been in vain, which indicates that there might still be an unidentified auxiliary subunit, including germ cell-specific chaperons. Otherwise, a certain particular environment created by a particular lipid compositions or special scaffolding proteins might be necessary for a proper CatSper assembly and function.

While there is no heterologous expression system for CatSper yet, the biophysical properties of this channel had remained unknown until the development of the whole-cell patch clamp recording directly from mouse spermatozoa was reported (Kirichok et al. 2006). The trick of this technique is to use the



**Fig. 34.3** Techniques of whole-cell patch clamp to spermatozoa and the typical CatSper current ( $I_{\text{CatSper}}$ ). **a** Upper part illustrates the sites of cytoplasmic droplet (gray shadow) where patch pipettes should be attached to, in human and mouse spermatozoa. Lower part illustrates a perforated whole-cell patch clamp after on-cell patch clamp mode (Orta et al. 2012). **b** A representative  $I_{\text{CatSper}}$  of human spermatozoon in response to a voltage-ramp, indicated above, under different conditions: standard solution for human sperm (HS, black), divalent cation-free solution (DVF, gray), and DVF in presence of 500 nM of progesterone (DVF + 500 nM Prg, dark gray)

cytoplasmic droplet, a residual cytoplasm occasionally found in mature spermatozoa (Fig. 34.3a), as a target for the patch clamp pipette. Even so, it is still difficult to do due to the small size and the motility of the cell (Lishko et al. 2013). Alternatively, it is possible to record a whole-cell current from mature spermatozoa using a perforated patch clamp on the sperm head (Orta et al. 2012). Although this method may be even more difficult to perform, it has the advantage of retaining the intracellular components of the cell. In addition, this method can be applied independently of the cytoplasmic droplet, which is not always present in mature spermatozoa.

Because of its small  $\text{Ca}^{2+}$  conductance and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation, CatSper current has been studied using monovalent cation current ( $\text{Na}^+$  or  $\text{Cs}^+$ ) in divalent cation-free (DVF) media (Fig. 34.3b). In this condition, the voltage dependence of the channel is not so prominent (Kirichok et al. 2006), which is at least partially explained by the surface-potential hypothesis; a shift of voltage-dependent curve toward the negative side in the absence of divalent cations (Hille 1991). Monovalent cation currents through CatSper ( $I_{\text{CatSper}}$ ) can be inhibited by addition of low concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  to the medium with  $\text{IC}_{50}$  of 65 nM in mouse (Kirichok et al. 2006) and 1.2  $\mu\text{M}$  in human (Smith et al. 2013), which is a typical feature of a  $\text{Ca}^{2+}$  selective channel. Voltage dependence of CatSper was determined in the presence of  $\text{Ba}^{2+}$ , which does not induce the rapid inactivation of the

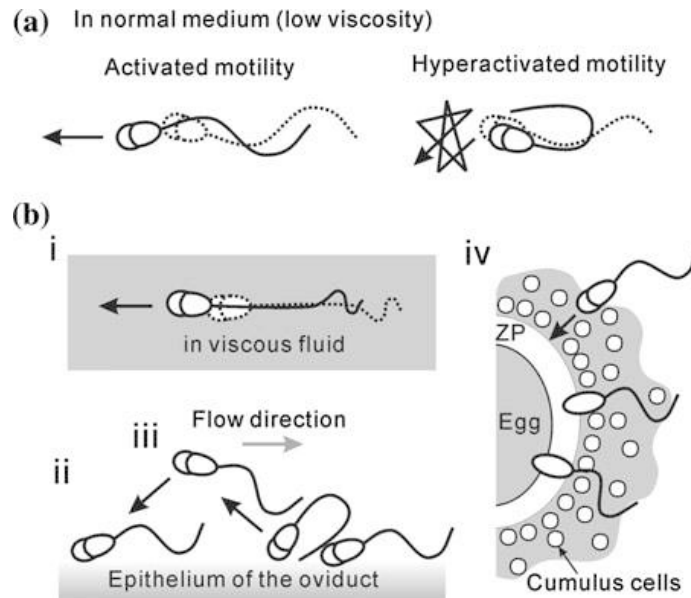
channel as  $\text{Ca}^{2+}$ . Using the tail current of  $\text{Ba}^{2+}$ , it was determined that the CatSper channel is a moderate voltage-dependent channel with a slope factor  $k \sim 30$  for mouse (Kirichok et al. 2006) and  $\sim 20$  for human (Lishko et al. 2011). It is a striking feature, in both murine and human CatSper, that the voltage-dependent curve markedly shifts to a more negative values by intracellular alkalinization, which is considered a physiological signal to activate this channel (Kirichok et al. 2006; Lishko et al. 2010).

Recently, it was reported that progesterone and prostaglandin E activate CatSper in human sperm but not in murine sperm (Fig. 34.3b) (Lishko et al. 2011; Strunker et al. 2011; Smith et al. 2013). Both hormones are physiological ligands for human sperm and have been known to immediately increase the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Thomas and Meizel 1989; Shimizu et al. 1998; Schaefer et al. 1998). The action of these ligands on spermatozoa had been a great mystery for a long time in the field of reproduction. On the other hand, several artificial compounds, such as odorants (bourgeonal and undecanal) and cyclic nucleotide analogs (8-Br-cGMP and 8-Br-cAMP), also activate human CatSper, indicating that human CatSper functions as a polymodal chemosensor (Brenker et al. 2012). In the case of murine sperm, it is demonstrated that albumin (BSA) and zona pellucida increase the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in a CatSper-dependent manner (Xia and Ren 2009a, b). The difference of ligand specificity between these species may be attributed to the diversity of the amino acid sequences of auxiliary subunits of CatSper ( $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ), which have large extracellular domains and are supposed to function as receptors for extracellular ligands.

At present, there are no specific blockers for CatSper. HC-056456 was reported as the first CatSper blocker ( $\text{IC}_{50}$ :  $\sim 3 \mu\text{M}$ ) although its specificity is unknown (Carlson et al. 2009). Mibefradil and NNC 55-0396, both T-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, in the 10–20  $\mu\text{M}$  range inhibit efficiently the CatSper current (Strunker et al. 2011; Lishko et al. 2011) and  $\text{Na}^+$  influx induced by removal of external  $\text{Ca}^{2+}$  in human spermatozoa (Torres-Flores et al. 2011). However, Mibefradil and NNC 55-0396 elevate the intracellular pH of spermatozoa by an unknown mechanism (Brenker et al. 2012). MDL12330A, known as an adenylyl cyclase inhibitor, was recently found to block CatSper (Brenker et al. 2012). Therefore, a more specific blocker for CatSper without any secondary effects, which potentially functions as a male contraceptive, is eagerly desired in the field of reproduction.

### 34.5 Physiological Function

Spermatozoa recovered from the oviduct show a vigorous flagellar movement called hyperactivated motility, which is indispensable for the fertilization and characterized by asymmetric, large amplitude, and low frequent flagellar beating (Suarez 2008) as illustrated in Fig. 34.4a. Several experimental evidences suggest that hyperactivated motility has four major roles in the process of the fertilization



**Fig. 34.4** Roles of hyperactivated motility in fertilization. **a** In normal experimental medium, immediately after spermatozoa are ejaculated they manifest a symmetric flagellar bend with high beat frequency called activated motility. In contrast, the hyperactivated motility is characterized by an asymmetric flagellar bend with low beat frequency. **b** Hyperactivated motility is required for four processes in mammalian fertilization: **i** Generate a propulsive force in viscous (or viscoelastic) environments, **ii** escape from the initial part of the isthmus of the oviduct, named sperm reservoir, **iii** swim against fluid flow, called rheotaxis, and **iv** penetrate through extracellular matrix of cumulus cells and the egg, named zona pellucida (ZP)

(Fig. 34.4b); (i) keep progressive motility in viscous environment (Suarez et al. 1991), (ii) detach from the initial part of the oviduct, lower isthmus, also called sperm reservoir (Suarez 1987), (iii) swim against fluid flow direction (rheotaxis) (Miki and Clapham 2013), and (iv) penetrate through extracellular matrix of the oocyte (Stauss et al. 1995). Murine spermatozoa lacking CatSper lose all these capacities together with fertility (Quill et al. 2003; Ren et al. 2001; Ho et al. 2009; Miki and Clapham 2013; Carlson et al. 2003), which confirms the physiological significance of hyperactivated sperm motility in this species. Therefore, the most obvious physiological role of CatSper is to induce and maintain the hyperactivated motility of the spermatozoa (Carlson et al. 2003). However, it is not completely understood what the physiological trigger(s) of sperm hyperactivation may be. There are several possibilities: (1) an increase in bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) concentration (Maas et al. 1977), which activates soluble adenylyl cyclase (Buck et al. 1999), (2) an increase in the fluid pH (Maas et al. 1977), (3) a specific ligand such as progesterone and prostaglandin E in human spermatozoa (Lishko et al. 2011; Strunker et al. 2011), (4) a decrease in  $\text{Zn}^{2+}$  concentration, which releases inhibition of voltage-gated proton channel (Lishko et al. 2010), and (5) a decrease in temperature (Bahat et al. 2005), which activates TRPM8 channel (De Blas et al. 2009). It is most likely that hyperactivated sperm motility is induced by several factors simultaneously and/or intermittently, which are generated concomitantly

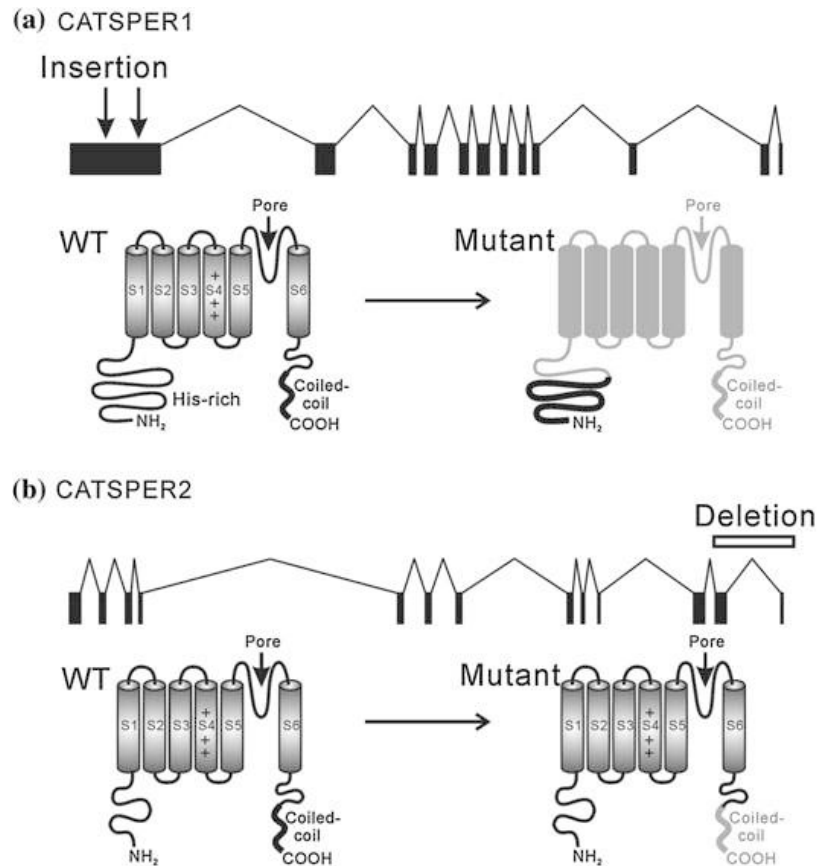
upon ovulation. Some of these factors are common among different species, but some are species-specific as the case of progesterone and prostaglandin E, which activate human CatSper but not murine. Further studies are required to understand the mechanism of induction of hyperactivation under physiological conditions.

Although the physiological roles of CatSper in mouse sperm are well established, those in human sperm are still not fully understood. In humans, not only  $\text{Ca}^{2+}$  influx through CatSper but also its release from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores is indispensable to maintain hyperactivation (Harper et al. 2004; Kirkman-Brown et al. 2004; Alasmari et al. 2013b). So far, it is known that CatSper is critical for sperm hyperactivation induced by progesterone (Lishko et al. 2011; Strunker et al. 2011; Smith et al. 2013; Alasmari et al. 2013a; Senatore et al. 2013; Servin-Vences et al. 2012) and this channel also seems essential for sperm to penetrate viscous media (Alasmari et al. 2013a). The positive correlation found in the success rate of in vitro fertilization (IVF) and progesterone-induced intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase (Alasmari et al. 2013a) would be a helpful information to understand the role of CatSper and to establish a diagnostic test to evaluate sperm capacity for fertilization.

On the other hand, progesterone and prostaglandin E were initially identified as physiological ligands to induce the acrosome reaction (AR) in human sperm (Osman et al. 1989; Schaefer et al. 1998; Shimizu et al. 1998). In murine model, it was reported that the egg coat (zona pellucida) induces an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in wild type but not in CatSper1 null mice spermatozoa (Xia and Ren 2009b) although the AR still can be induced by zona pellucida in the same transgenic mice. Even though there are some contradictory results, CatSper could play a role in the AR, which may provide another reason for the positive correlation between CatSper activity and the success rate of IVF (Alasmari et al. 2013a).

## 34.6 Channelopathy

In mouse, all  $\alpha$  subunits and  $\delta$  subunit were demonstrated to be essential for CatSper channel assembly and the absence of this channel results in male infertility due to a defect in sperm motility regulation, namely, lack of hyperactivated sperm motility. Therefore, a similar function of human orthologs might be expected in human sperm. As anticipated, mutations of two loci that encode CATSPER1 and CATSPER2 have been reported from some families associated with male infertility (Avidan et al. 2003; Avenarius et al. 2009; Zhang et al. 2007). Coincidentally, all of the patients were found to have a homozygous mutation, an autosomal recessive mutation, through a consanguineous marriage. This is probably owing to the fact that the pore-forming  $\alpha$  subunit of CatSper is composed of hetero-tetramers but not homo-tetramers like a voltage-gated  $\text{K}^+$  channel. Thus, a dominant negative mutation of  $\alpha$  subunit of CatSper should be difficult to encounter.



**Fig. 34.5** Sites of CATSPER mutations correlated to human infertility and their predicted proteins. **a** The genome structure of CATSPER1 is illustrated as 12 exons (*black bars*) and introns (*polygonal lines*). The *arrows* indicate the two separated insertion mutations found in male infertile patients. Both mutants have some extra bases in the first exon, which encodes the His-rich N-terminal cytoplasmic domain, and are supposed to produce truncated proteins by a frame shift of mRNA as illustrated (*light gray*). **b** Genome structure of CATSPER2 (13 exons). The *white box* over the last two exons represents the deleted region of this gene found in infertile patients (French family). This region encodes a coiled-coil motif of the cytoplasmic C-terminal domain (*light gray*)

In 2009, two consanguineous Iranian families were identified as carriers of a similar, but distinct, insertion mutation in exon 1 of CATSPER1 gene (Fig. 34.5a) localized at chromosome 11q13.1 (c.539-540insT or c.948-949insATGGC) (Avenarius et al. 2009), which encodes the histidine-rich N-terminal cytoplasmic domain. Both mutations cause frame shifts and generate premature stop codons. As a consequence, they are predicted to produce proteins lacking all the transmembrane segments and the pore-forming loop, as illustrated in Fig. 34.5a, almost equivalent to a deletion of the whole  $\alpha 1$  subunit. As is expected, the male homozygous carriers of these mutations are infertile although there is no detailed information about the sperm function of these patients.

Another locus of mutation of male infertility related to CatSper, as the most studied case, is found on the chromosome 15p15, which is also characterized with



non-syndromic deafness. This syndrome (male infertility and deafness) was first identified in a French family carrying a homozygous deletion of  $\sim 70$  kb in the chromosome 15p15 which affects three contiguous genes: the first 24 exons of IP6 K, a kinase expressed ubiquitously; the entire coding sequence of SRTC, a protein mainly expressed on inner ear stereocilia which is related to the deafness; and the last two exons of CATSPER2 (Avidan et al. 2003) (Fig. 34.5b). This mutation removes the last 225 bases of the mRNA which encode the cytoplasmic C-terminal region of CatSper2 including a coiled-coil region (Fig. 34.5b) predicted to be necessary for protein–protein interactions to form the channel pore complex (Quill et al. 2001; Loblely et al. 2003). As mentioned above, all pore-forming subunits ( $\alpha 1 - 4$ ) of CatSper are needed to assemble the functional murine CatSper channel (Qi et al. 2007). Therefore, CatSper2 and, in consequence, the entire CatSper channel complex had been expected to be absent in the CatSper2-deficient patient. Recently, this prediction was finally confirmed by detailed analysis of spermatozoa of one of these patients (II-2 in Avidan et al. 2003) using immunostaining and electrophysiological techniques (Smith et al. 2013). Namely, CatSper $\beta$  was unable to be detected by anti-CatSper $\beta$  antibody and CatSper current was absent from the spermatozoa of this patient. Furthermore, progesterone did not amplify any ionic current although the activities of other channels, K<sup>+</sup> channel (Slo3) and voltage-gated H<sup>+</sup> channel (Hv), were retained (Smith et al. 2013). Therefore, this study supports the idea that the principal Ca<sup>2+</sup> channel in human sperm is CatSper and it is activated by progesterone. This locus is likely to be a hot spot to provoke a deletion mutation because a duplicated copy of these genes is located adjacently as pseudogenes (Avidan et al. 2003). In agreement with this, it was reported that there are three more Iranian families with similar deletion mutations in this locus (Zhang et al. 2007) although the entire CATSPER2 gene was deleted in all three cases of Iranian families (Table 34.2). Combined, these reports provide strong evidences that link CatSper deficiencies to male infertility.

However, the phenotype of spermatozoa from the patients possessing the deletion mutation of the chromosome 15p15 is not exactly coincident with the phenotype of spermatozoa of transgenic mice lacking CatSper-related genes. In murine models, CatSper mutations did not cause any defects in spermatogenesis (number of matured spermatozoa) or sperm shape (Ren et al. 2001; Qi et al. 2007; Chung et al. 2011). Moreover, those mouse spermatozoa manifest normal-activated flagellar motility characterized by symmetric, low amplitude, and high frequent flagellar beating although they do not undergo hyperactivation (Carlson et al. 2003). In contrast, those patients suffer from asthenoteratospermia; disorders in sperm morphology and motility. Taking the phenotype of the transgenic mice into account, defects in sperm morphology and basal motility found in the patients with CATSPER2 mutation (Avidan et al. 2003; Zhang et al. 2007) could be attributed to a defect of another gene, including IP6 K, rather than different functions of CatSper between mouse and human. To date, there are only a few reported clinical cases that link CatSper to male infertility; two having defects on CATSPER1 (Avenarius et al. 2009) and four on CATSPER2 (Avidan et al. 2003; Zhang et al. 2007). Since all reported patients come from consanguineous families,

**Table 34.2** Clinical cases of infertility correlated to CatSper mutations

Mutated gene	Affected families	Number of patient	Mutation (Locus)	Associated defects	Reference
CatSper1 ( $\alpha 1$ )	Iranian L-1025	2	c.539-540insT (11q13.1)	Asthenoteratospermia/ low sperm count	Avenarius et al. (2009)
CatSper1 ( $\alpha 1$ )	Iranian L-968	1	c.948-949insATGGC (11q13.1)	Asthenoteratospermia/ low sperm count	Avenarius et al. (2009)
CatSper2 ( $\alpha 2$ )	French	3	Del(15) ~ 70 kb Deletion of the last two exons (12 and 13) (15q15.1-15q15.3)	Deafness/ asthenoteratospermia/ no CatSper current	Avidan et al. (2003); Smith et al. (2013)
CatSper2 ( $\alpha 2$ )	Iranian D_SM	4	Del(15) ~ 100 kb Deletion of the entire gene (15q15.1-15q15.3)	Deafness/ asthenoteratospermia	Zhang et al. (2007)
CatSper2 ( $\alpha 2$ )	Iranian L-705	1	Del(15) ~ 100 kb Deletion of the entire gene (15q15.1-15q15.3)	Deafness/ asthenoteratospermia	Zhang et al. (2007)
CatSper2 ( $\alpha 2$ )	Iranian L-1014	2	Del(15) ~ 90 kb Deletion of the entire gene (15q15.1-15q15.3)	Deafness/ Asthenoteratospermia	Zhang et al. (2007)

they could also carry defects on other genes. Considering some distinct phenotypes between the transgenic mice and human patients, it is difficult to conclude the deficiencies on CatSper as the direct cause of male infertility in these patients. Further information about patients of male infertility and CatSper-related gene mutations is required to answer this question.

On the other hand, although genetic analysis has not been carried out, a systematic analysis of sperm  $\text{Ca}^{2+}$  responses and hyperactivation from healthy donors and sub-fertile patients were recently reported (Alasmari et al. 2013a). In this work, sub-fertile patients were classified into two groups; patients who could fertilize by in vitro fertilization (IVF) (Stephoe and Edwards 1978) and those who required intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) (Palermo et al. 1992). ICSI is an advanced technique of assisted reproduction and usually applied for male patients who failed in IVF. While spermatozoa from almost all donors and IVF patients manifest progesterone-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase, spermatozoa of 27 % ICSI patients failed to respond to progesterone. Considering that CatSper is activated by progesterone in human spermatozoa (Lishko et al. 2011; Strunker et al. 2011), roughly 27 % of ICSI patients have some defects in CatSper. Genetic analysis of those patients would contribute to the understanding of the correlation between mutations in CatSper-related genes and male infertility.

### 34.7 Conclusion

Although it is possible to record CatSper channel current by whole-cell patch clamping directly from spermatozoa, it is still a difficult technique. On the other hand, *in vitro* spermatogenesis is not so efficient and is a time-consuming process (~40 days) (Sato et al. 2011). Currently, mutagenesis of a CatSper-related gene requires an approach using transgenic animals (murine models), which is a very expensive project. Therefore, to establish a heterologous expression system for CatSper channel is of primary interest and the most important obstacle to overcome in order to promote the study of CatSper channel research.

CatSper is an essential channel for male fertility, but there are only a few reports about male infertility correlated to alteration of CatSper genes. There are several reasons to explain this situation. One of them would be owing to the fact that genetic defects in male fertility had not been inherited to the next generation, which could have prevented genetic research about male infertility in general. This situation has been altered by application of intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), one of advanced assisted reproduction techniques (ARTs). Since ICSI is getting to be a popular ART these days (Wong and Ledger 2013), CatSper mutations will accumulate in the future (Devroey and Van Steirteghem 2004). Nevertheless, this defect is supposed to affect only spermatozoa not other organs in contrast to the case of patients of ciliopathies (Munro et al. 1994). Considering the advance of technology for whole-genome sequencing, the lists of gene alterations of CatSper channel are supposed to be amplified soon in the future, which may also contribute to the understanding of the structure and function relationship of CatSper channel.

**Acknowledgments** We thank Dr. Yuriy Kirichok for his explanation of the shift of voltage dependence of CatSper in divalent cation-free medium. We appreciate the help of Guadalupe Itzel Galán Enríquez for providing us animal illustrations in Fig. 34.2. We also thank Robyn Duckworth and Dr. Alberto Darszon for critical reading of our manuscript. This work is supported by grant of CONACyT (CB2012-177138) and PAPIIT (IN203513).

### References

- Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins da Silva S, Oxenham SK (2013a) The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod* 28(4):866 – 876
- Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S, Barratt CL (2013b) Ca<sup>2+</sup> signals generated by CatSper and Ca<sup>2+</sup> stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem* 288(9):6248–6258
- Arias JM, Murbartian J, Perez-Reyes E (2003) Cloning of a novel one-repeat calcium channel-like gene. *Biochem Biophys Res Commun* 303(1):31–36
- Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, Najmabadi H, Smith RJ (2009) Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 84(4):505–510

- Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS (2003) CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 11(7):497–502
- Bahat A, Eisenbach M, Tur-Kaspa I (2005) Periovalutary increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod (Oxford, England)* 20 (8):2118 – 2121
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahlting M, Muller A, Kaupp UB, Strunker T (2012) The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J* 31(7):1654–1665
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(1):79–84
- Cai X, Clapham DE (2008) Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSperbeta. *PLoS ONE* 3(10):e3569
- Carlson AE, Burnett LA, del Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, Moran MM, Babcock DF (2009) Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS ONE* 4(8):e6844
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003) CatSper1 required for evoked  $Ca^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):14864–14868
- Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2011) A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2:153
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL (2011) Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev* 91(4):1305–1355
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernandez-Gonzalez EO, Chirinos M, Larrea F, Beltran C, Trevino CL (2009) TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS ONE* 4(6):e6095
- Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10(1):19–28
- Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ (2004) Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 279(44):46315–46325
- Hille B (1991) Chapter 17 Modifiers of gating. In: *Ionic channel of excitable membranes*, 2nd edn. Sinauer Associates Inc., Massachusetts
- Ho K, Wolff CA, Suarez SS (2009) CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod Fertil Dev* 21(2):345–350
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W (2007) CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 77(1):37–44
- Jin JL, O'Doherty AM, Wang S, Zheng H, Sanders KM, Yan W (2005) Catsper3 and catsper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biol Reprod* 73(6):1235–1242
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated  $Ca^{2+}$  channel. *Nature* 439(7077):737–740
- Kirkman-Brown JC, Barratt CL, Publicover SJ (2004) Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem J* 378(Pt 3):827–832
- Kottgen M, Hofherr A, Li W, Chu K, Cook S, Montell C, Watnick T (2011) Drosophila sperm swim backwards in the female reproductive tract and are activated via TRPP2 ion channels. *PLoS ONE* 6(5):e20031
- Lindemann CB, Lesich KA (2010) Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 123(Pt 4):519–528
- Lishko P, Clapham DE, Navarro B, Kirichok Y (2013) Sperm patch-clamp. *Methods Enzymol* 525:59–83

- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y (2010) Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140(3):327–337
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y (2011) Progesterone activates the principal  $\text{Ca}^{2+}$  channel of human sperm. *Nature* 471(7338):387–391
- Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D (2007) CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* 282(26):18945–18952
- Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D (2003) Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: Characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 1(1):53
- Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr (1977) Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 28(9):981–985
- Miki K, Clapham DE (2013) Rheotaxis guides Mammalian sperm. *Curr Biol* 23(6):443–452
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(47):16501–16506
- Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Hendry WF, Cole PJ (1994) Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax* 49(7):684–687
- Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS (2004) Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit  $\alpha 2$  orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(37):13483–13488
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE (2004) Targeted ablation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 279(32):33742–33750
- Orta G, Ferreira G, Jose O, Trevino CL, Beltran C, Darszon A (2012) Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol* 590(Pt 11):2659–2675
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160(2):828–833
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810):17–18
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391(6670):896–900
- Podlaha O, Zhang J (2003) Positive selection on protein-length in the evolution of a primate sperm ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21):12241–12246
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE (2007) All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(4):1219–1223
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL (2001) A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(22):12527–12531
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):14869–14874
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413(6856):603–609
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T (2011) In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471(7339):504–507

- Schaefer M, Hofmann T, Schultz G, Gudermann T (1998) A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6):3008–3013
- Senatore A, Monteil A, van Minnen J, Smit AB, Spafford JD (2013) NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels. *PLoS ONE* 8(1):e55088
- Servin-Vences MR, Tatsu Y, Ando H, Guerrero A, Yumoto N, Darszon A, Nishigaki T (2012) A caged progesterone analog alters intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and flagellar bending in human sperm. *Reproduction* 144(1):101 – 109
- Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T, Bronson RA (1998) Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4(6):555–561
- Smith JF, Syritsyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV (2013) Disruption of the principal, progesterone-activated sperm  $\text{Ca}^{2+}$  channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(17):6823
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS (1995) Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53(6):1280–1285
- Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2(8085):366
- Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in human sperm. *Nature* 471(7338):382–386
- Suarez SS (1987) Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 36(1):203–210
- Suarez SS (2008) Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod update* 14(6):647–657
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44(2):375–381
- Swanson WJ, Vacquier VD (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev* 3(2):137–144
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328(6128):313–318
- Thomas P, Meizel S (1989) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem J* 264(2):539–546
- Torres-Flores V, Picazo-Juarez G, Hernandez-Rueda Y, Darszon A, Gonzalez-Martinez MT (2011) Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod* 26 (10):2626 – 2635
- Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL (2003) A new sperm-specific  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5(12):1117–1122
- Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D (2009) A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod* 81(3):539–544
- Watnick TJ, Jin Y, Matunis E, Kernan MJ, Montell C (2003) A flagellar polycystin-2 homolog required for male fertility in *Drosophila*. *Curr Biol* 13(24):2179–2184
- Wong MY, Ledger WL (2013) Is ICSI Risky? *Obstetrics and gynecology international* 2013:473289
- Xia J, Ren D (2009a) The BSA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol* 7:119
- Xia J, Ren D (2009b) Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol Reprod* 80(6):1092–1098
- Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H, Smith RJ (2007) Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet* 44(4):233–240