



00591

5

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE UN CANAL DE K⁺ DIRECTAMENTE MODULADO POR
GMPc EN LA RESPUESTA INDUCIDA POR EL SPERACT EN EL
ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR *S. purpuratus*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

BLANCA ESTELA GALINDO BARRAZA

Asesor: Dr. ALBERTO DARSZON

Cuernavaca, Mor.

278712

2000

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi familia,
en especial a mis papás, mamá Eva y papá Yeyo,
por su total apoyo, en todos los sentidos, siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Darszon, gracias por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por sus enseñanzas.

A Fabián, por estar presente aun en los momentos difíciles.

A los compañeros y amigos del laboratorio: Felipe, Daniel, Oti, Miguel, Takuya, Nacho, Carlos, Esme, Carmen, Arturo, Yuyú, Claudia, Pepe Luis, Lalo, Angelina, el Dr. Félix, Don Juan y Doña Francis, Xóchitl, por su amistad, por su apoyo y porque hicieron que estos años fueran aún mejores.

Al honorable Jurado, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A CONACyT, DGAPA-UNAM y DGEP por su apoyo económico.

**Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alberto Darszon,
en el Departamento de Genética Y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología,
UNAM. Cuernavaca, Morelos.**

ABREVIATURAS:

AMAONa	Agua de mar artificial sin Sodio
4-AP	4-Aminopiridina
BAPTA	Ácido 1,2- <i>bis</i> (<i>o</i> -aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético
CaM	Calmodulina
CaMKII	Protein-quinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
CCCP	Carbonil cianidem-clorofenilhidrazona
CNG	Dependiente de nucleótidos cíclicos
DCB	3',4'-Diclorobenzamil
diS-C ₃ (5)	3,3'-dipropiltiodicarbocianina, yoduro
diS-Ba-C ₂ (3)	<i>bis</i> -(1,3 dietiltiobarbiturato) trimetin-oxonol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
FDE	Fosfodesterasas
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GMP-PNP	5'-Guanililimidodifosfato
HA 1004	N-(2-guanidinoetil)-5-isoquinolin-sulfonamida
H-7	1-(5-isoquinolin-sulfonil)-2-metil piperazina
H-8	N-2-(Metilamino)etil-5-isoquinolin-sulfonamida
IBMX	Isobutil Metil Xantina
KN-62	1-[N,O- <i>bis</i> -(5-isoquinolin-sulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina 0
Lavendustina A	Ácido 5-amino-[(N-2,5-dihidroxibenzil)-N'-2-hidroxibenzil] salicílico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
Rp-8- <i>p</i> CPT-cGMPS	Guanosina 3', 5'-cíclico monofosforotioato, 8-(4-clorofeniltio)-Rp-Isómero
Ro-20-1724	4-(3-butoxi-4-metoxibenzil)-2-imidazolidinona
TFP	Trifluoperazina
W-7	N-(6-Aminohexil)-5-chloro-1-naftalensulfonamida
W-5	N-(6-Aminohexil)-1-naftalensulfonamida
W-12	N-(4-Aminobutil)-1-naftalensulfonamida

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Titulo	Página
FIGURA 1.	Fecundación.....	1
FIGURA 2.	El espermatozoide de erizo de mar <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	2
FIGURA 3.	Modelo que representa el Mecanismo hipotético de la Respuesta al speract del espermatozoide de erizo de mar <i>S. purpuratus</i>	6
FIGURA 4.	Obtención de los espermatozoides	11
FIGURA 5.	Preparación de Vesículas de Flagelo.....	14
FIGURA 6.	Espectrofluorómetro SLM-Aminco 8000.....	15
FIGURA 7.	Determinación del Potencial de Membrana.	17
FIGURA 8.	Hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo del espermatozoide de erizo de mar.....	21
FIGURA 9.	Efecto del pH externo en la Respuesta al Speract.	22
FIGURA 10.	Moduladores de Proteínas G en la Respuesta al Speract.	23
FIGURA 11.	Fórmula lineal de la Trifluoperazina (TFP) y del W-7.....	25
FIGURA 12.	Inhibición de la Respuesta al Speract por Antagonistas de Calmodulina.	26
FIGURA 13.	Efecto de la Eliminación del Ca^{2+} Intracelular en la Respuesta al Speract.....	27
FIGURA 14.	Efecto de los Inhibidores de Fosfodiesterasas Dependientes de Nucleótidos Cíclicos en la Respuesta al Speract.	28
FIGURA 15.	Cambios en el Potencial de Membrana Inducidos por Diferentes Nucleótidos Cíclicos Permeables y su Efecto en la Respuesta al Speract.	30
FIGURA 16.	La Respuesta del 8Br-GMPc en el Espermatozoide de Erizo de Mar Hinchado.....	31
FIGURA 17.	La selectividad iónica de las Respuestas al Speract y al 8Br-GMPc.	33
FIGURA 18.	Efecto del Ca^{2+} Extracelular en la Respuesta al Speract en las Vesículas de Flagelo.	35
FIGURA 19.	Inhibición de las Respuestas al Speract y al 8Br-GMPc por	

	Antagonistas de Canales de K^+ y 3,4, Diclorobenzamil (DCB).....	37
FIGURA 20.	Fórmula lineal del 3', 4' Diclorobenzamil (DCB).....	38
FIGURA 21.	Ba^{2+} , 4-AP y DCB Inhiben la Hiperpolarización Inducida por el Speract en el Espermatozoide Intacto.	39
FIGURA. 22.	El efecto de los inhibidores de protein-quinasas y fosfatasas en la respuesta al speract de las vesículas de flagelo.	41
● Tabla 1.	Efecto de los moduladores de canales de K^+ en la hiperpolarización Inducida por el speract.	36

INDICE

INDICE.....	vii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El Espermatozoide.....	1
1.2. Péptidos de la Gelatina del óvulo.....	3
1.3. Proteínas G y la Respuesta al Speract.....	7
1.4. Calmodulina.....	8
1.5. Los Nucleótidos Cíclicos y su Importancia en la respuesta al speract.....	9
1.5.a.1. Canales CNG y canales modulados por nucleótidos cíclicos.....	9
II. HIPOTESIS.....	10
III. OBJETIVO.....	11
IV. METODOLOGIA.....	11
IV.1. Obtención de los Espermatozoides.....	11
IV.2. Reactivos.....	12
IV.3. Preparación de Vesículas de Flagelo.....	12
IV.3.a. Aislamiento de los flagelos.....	12
IV.3.b. Aislamiento de Membranas de Flagelo.....	13
IV.4. Determinación de la Concentración de Proteína.....	15
IV.5. Mediciones de Potencial de Membrana.....	15
IV.5.a. Potencial de Membrana en las Vesículas.....	15
IV.5.b. Mediciones de Potencial de Membrana en el Espermatozoide Completo.....	17
IV.5.b.1. Potencial de Membrana en el Espermatozoide Intacto.....	17
IV.5.b.2. Potencial de Membrana en el Espermatozoide Hinchado.....	18
IV.5.b.3. Determinación del Contenido de GMPc en las Vesículas de Flagelo.....	18
V. RESULTADOS.....	20
V.1. Moduladores de Proteínas G en la Respuesta al Speract.....	22

V.2. Inhibidores de Calmodulina inhiben la Respuesta al Speract.....	24
V.3. Los Nucleótidos cíclicos Regulan la Respuesta al Speract.....	27
V.4. El Speract y el 8Br-GMPc Pueden Activar la Misma Vía de Permeabilidad.....	32
V.5. Moduladores de Canales de K ⁺ y de Canales Modulados Directamente por Nucleótidos cíclicos en la Respuesta al Speract de las Vesículas de Flagelo.....	35
V.6. DCB, Bario y 4-AP También Inhiben la Respuesta al Speract en el Espermatozoide Intacto.....	38
V.7. Inhibidores de Protein-Cinasas y Fosfatasas no Alteran la Hiperpolarización Inducida por el Speract en las Vesículas de Flagelo.....	40
VI. DISCUSIÓN.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	49
VIII. PERSPECTIVAS.....	50
IX. REFERENCIAS.....	51
X. APENDICE.....	60

RESUMEN

El Speract, un decapeptido proveniente de la gelatina del óvulo de erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, estimula de manera transitoria a la guanilil ciclasa de membrana del espermatozoide y activa un canal selectivo para K^+ que hiperpolariza la célula.

Se hicieron mediciones de potencial de membrana con colorantes fluorescentes sensibles a potencial de membrana, tanto en vesículas de flagelo como en el espermatozoide completo, para determinar si el GMPc modula directamente al canal responsable de la hiperpolarización. Nosotros encontramos que el speract hiperpolariza e incrementa el contenido de GMPc en las vesículas de flagelo. GTP γ S y GTP estimulan la hiperpolarización inducida por el speract en estas vesículas. El GDP β S, inhibidor de proteínas G, y otros activadores de proteínas G (aluminato, GMP-PNP y mastoparín) no incrementan la respuesta al speract. Por lo tanto, no parece estar participando una proteína G en la respuesta al speract. El IBMX, que preferentemente inhibe las fosfodiesterasas selectivas de GMPc del espermatozoide de erizo de mar, incrementó la respuesta inducida por el speract, en tanto que inhibidores de fosfodiesterasas selectivas de AMPc, (Ro-20-1724 y papaverina), no tuvieron efecto.

El 8Br-GMPc, un análogo del GMPc, permeable a la membrana, hiperpolarizó las vesículas; ni el 8Br-AMPc ni el diBu-AMPc, análogos permeables del AMPc, fueron capaces de hiperpolarizar. En el espermatozoide hinchado, el 8Br-GMPc también indujo una respuesta de características semejantes a la respuesta al speract. La hiperpolarización inducida por el speract y el 8Br-GMPc en las vesículas tiene la misma selectividad iónica ($K^+ > Rb^+ \gg Cs^+ > Li^+ > Na^+$) y se inhibe con dos bloqueadores de canales selectivos para K^+ directamente modulados por GMPc, 4-aminopiridina y 3,4-diclorobenzamil. Estos resultados sugieren que ambas respuestas involucran el mismo canal. Estos compuestos también inhiben la hiperpolarización inducida por el speract en el espermatozoide intacto. El mastoparín, activador de proteínas G y antagonista de calmodulina, inhibió la respuesta al speract en las vesículas, al igual que otros antagonistas de calmodulina (trifluoperazina, W-7, W-12 y W-5). Esto es indicio de la participación de la calmodulina en la vía de transducción de señales en la respuesta al speract. Además, altas concentraciones de inhibidores de protein-cinasas y fosfatasas no alteran la respuesta al speract de las vesículas de flagelo. En suma, los resultados indican que un incremento en la concentración de GMPc puede directamente abrir al canal de K^+ que hiperpolariza a las vesículas de flagelo y que un mecanismo similar opera en el espermatozoide completo.

SUMMARY

Speract, a decapeptide from *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin eggs, transiently stimulates a membrane guanylyl cyclase and activates a K^+ selective channel that hyperpolarizes the cell. Membrane potential recordings with fluorescent dyes in sperm flagellar vesicles were used to determine if cGMP directly modulates this channel. We find that speract hyperpolarizes and increases the cGMP content of flagellar vesicles. Though $GTP\gamma S$ and GTP stimulate the speract-induced hyperpolarization in these vesicles, $GDP\beta S$, and G protein activators did not affect the speract response. Thus, it is unlikely that a G protein participates in the speract response. IBMX, which preferentially inhibits cGMP-selective phosphodiesterases of sperm, enhanced the speract-induced response, while inhibitors that preferentially inhibit cAMP-selective phosphodiesterases do not alter responses to speract. 8Br-cGMP, a membrane-permeable analog of cGMP, hyperpolarized the vesicles; and permeant cAMP analogs do not hyperpolarize vesicles. The responses to speract and to 8Br-cGMP have similar ionic selectivities ($K^+ > Rb^+ \gg Li^+ > Na^+$) and sensitivities to the channel blockers 4-aminopyridine and 3,4 dichlorobenzamil, indicating that they likely result from opening of the same K^+ channel. Mastoparan, a G protein activator and calmodulin antagonist, inhibited the speract response in the vesicles, like other calmodulin antagonists (trifluoperazine, W-7, W-12 y W-5). These results pointed the calmodulin participation in the transduction signal pathway of the speract response. In addition, inhibitors of protein kinases and phosphatases fail to alter vesicle hyperpolarization by speract. Thus, an increase in cGMP concentration, measured in these vesicles, may directly mediate opening of the channel that hyperpolarizes sperm membrane vesicles. Similar mechanisms presumably operate in intact sperm.

Participación de un Canal de K^+ Directamente Modulado por GMPc en la Respuesta Inducida por el Speract en el Espermatozoide de Erizo de Mar *S. purpuratus*.

I INTRODUCCIÓN

En organismos de reproducción sexual la fecundación es el evento primordial requerido para la generación de un nuevo individuo. El óvulo y el espermatozoide son células terminales que están destinadas a morir a menos que se encuentren y se fusionen en el proceso de fecundación (Fig. 1). El espermatozoide activa al óvulo para comenzar su programa de desarrollo. Este proceso requiere del encuentro y reconocimiento de los gametos maduros. El mecanismo de la fecundación se ha estudiado a mayor profundidad en los invertebrados marinos, especialmente en los erizos de mar, un organismo de fecundación externa. Este tipo

de fecundación, que ocurre en el agua de mar, es más fácil de estudiar que la fecundación interna de los mamíferos que ocurre en el tracto reproductor femenino. El erizo de mar (Fig. 2A) es un excelente modelo de estudio de la fecundación y de las etapas tempranas del desarrollo, puesto que de él se pueden obtener una gran cantidad de gametos. De un erizo macho se obtienen $\sim 10^{10}$ espermatozoides y de la hembra $\sim 10^6$ óvulos.



FIGURA 1. Fecundación.

1.1 El Espermatozoide.

El espermatozoide es una célula muy especializada encargada de llegar hasta el óvulo

homólogo y fecundarlo mediante su fusión con él y el depósito de su información genética. Frecuentemente los espermatozoides son las células más pequeñas en los organismos de reproducción sexual.

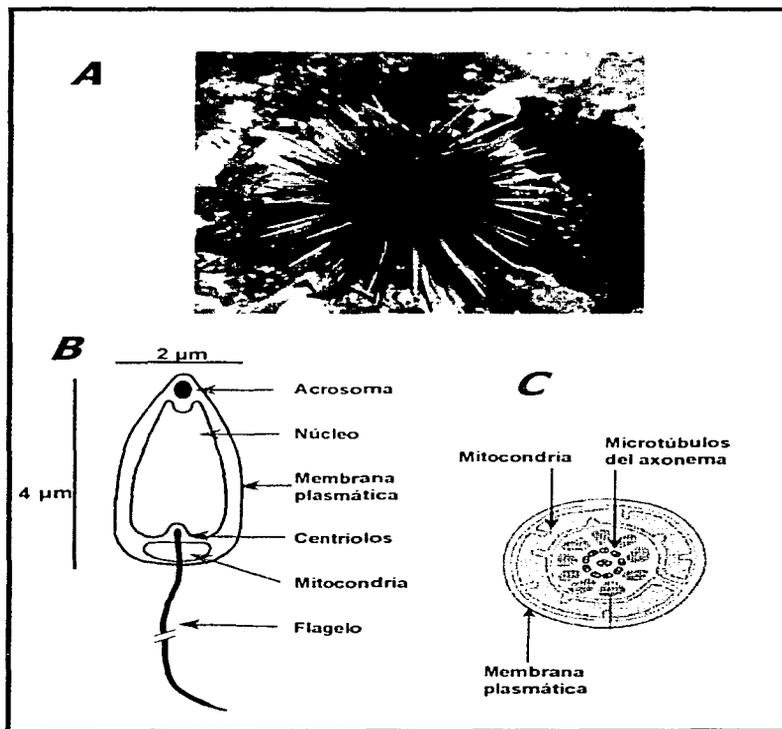


FIGURA 2. A. El erizo de mar de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* y B, esquema del espermatozoide de erizo de mar de la misma especie donde se muestran los principales componentes de la célula. C, el esquema muestra un corte transversal de la parte basal del flagelo donde el axonema se encuentra rodeado de la mitocondria.

El espermatozoide de erizo de mar constituye un modelo relativamente simple para estudiar el control iónico del movimiento flagelar así como las modificaciones bioquímicas y fisiológicas necesarias para la fecundación debido a que son organismos de fecundación externa y son bien conocidas las condiciones iónicas del medio en que ocurren la activación de la movilidad, la reacción acrosomal y la fecundación.

El espermatozoide de erizo de mar es una célula muy pequeña (Fig. 2B) que está compuesto de 2 partes principales: el flagelo y la cabeza. El flagelo, de aproximadamente 50 μm de longitud y 0.1 μm de diámetro, consiste en un complejo axonémico (axonema) y tiene como función impulsar al espermatozoide hacia el óvulo y lo ayuda a cruzar la cubierta de éste. El axonema del flagelo consta de un par de microtúbulos centrales rodeados de 9 pares de microtúbulos. La cabeza, de 3 a 4 μm de longitud por 2 μm de ancho, a su vez contiene sólo una mitocondria que proporciona la energía necesaria para el movimiento flagelar, ésta rodea al axonema en la parte basal del flagelo (Figs. 2B y 2C), el núcleo haploide cuya cromatina está altamente condensada y el gránulo acrosomal, el cual contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a pasar a través de la capa externa del óvulo.

La activación del espermatozoide para la fecundación consiste de 2 pasos principales: a) la activación de la movilidad de la célula y b) la inducción de la reacción acrosomal. En el espermatozoide de erizo de mar los canales iónicos tienen una importancia primordial en la activación de la respiración y de la movilidad en la quimiotaxis, así como en la reacción acrosomal, que son eventos fundamentales para que se lleve a cabo la fecundación. Los canales iónicos están presentes en la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar y en sus organelos internos. Para revelar los mecanismos moleculares involucrados en la comunicación entre el espermatozoide y el óvulo, es necesario entender cuál es el papel de estos sistemas de transporte iónico y cómo se regulan en cada uno de los procesos antes mencionados.

1.2 Péptidos de la Gelatina del Óvulo.

Los óvulos de erizo de mar miden ~ 100 μm de diámetro y están rodeados de una matriz extracelular hidratada, conocida como la capa de gelatina. El espermatozoide debe pasar a través de ella antes de poder contactar la membrana del óvulo. Esta capa de gelatina posee

componentes que activan al espermatozoide e inician la reacción acrosomal, necesaria para que pueda fecundar al óvulo. Además, debido a su viscosidad previene que muchos espermatozoides puedan llegar al mismo tiempo al óvulo al actuar como barrera. Esta capa también proporciona protección al óvulo ante daños externos provocados por la acción del medio en el que se libera.

El principal componente de la gelatina es un glicoconjugado de fucosa sulfatado, que se le ha denominado "factor" (SeGall y Lennarz, 1979, 1981; Vacquier y Moy, 1997), es el responsable de la exocitosis del gránulo acrosomal (reacción acrosomal). La capa de gelatina del óvulo de erizo de mar también contiene pequeños péptidos que tienen efectos muy importantes en la fisiología del espermatozoide, ya que lo preparan y lo guían hacia el óvulo (Garbers, 1989). Los péptidos más estudiados son el speract (de "sperm activating peptide"), (Gli-Feu-Asp-Leu-Asn-Gli-Gli-Gli-Val-Gli), un decapeptido aislado de la gelatina del óvulo de las especies de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough y Garbers, 1981 a) y de *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki, *et al.*, 1981) y el resact (de "sperm respiratory activating peptide"), (Cis-Val-Tre-Gli-Ala-Pro-Gli-Cis-Val-Gli-Gli-Gli-Arg-Leu), un péptido similar al speract, obtenido de los óvulos de la especie de erizo de mar *Arbacia punctulata*.

La participación de estos péptidos en la quimiotaxis se ha demostrado sólo en *A. punctulata*, donde el resact, a concentraciones nanomolares, atrae al espermatozoide en un evento que es especie específico, dependiente de Ca^{2+} y de la concentración del péptido (Ward, *et al.*, 1985). El resact es la primera molécula de estructura conocida y derivada del óvulo que se conoce como agente quimioattractante para el espermatozoide animal. El resact y el speract no tienen reacción cruzada con los espermatozoides de la especie que contiene el péptido contrario, aún cuando se usen a muy altas concentraciones. Estos péptidos regulan la movilidad estimulando la respiración (Ward, *et al.*, 1985; Cook, *et al.*, 1994) y el metabolismo de fosfolípidos del espermatozoide homólogo y en conjunto con otros factores de la gelatina del óvulo, promueven la fecundación (Suzuki y Garbers, 1984; Shimizu, 1990; Suzuki y Yoshino, 1992).

El speract, a concentraciones picomolares, activa la movilidad e induce un rápido incremento en la respiración en espermatozoides resuspendidos en agua de mar acidificada (pH 6.6) (Suzuki y Garbers, 1984). A concentraciones nanomolares estimula: la entrada de $^{22}Na^{2+}$ y

de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, la salida de H^+ y K^+ , así como el incremento en los niveles intracelulares de GMPc, AMPc y Ca^{2+} , así como el aumento del pH intracelular (pH_i) (Garbers, 1989; Darszon, *et al.*, 1999).

Experimentos de entrecruzamiento de proteínas ("crosslinking") indicaron que el speract se une a una glicoproteína de 77 KDa (Dangott y Garbers, 1984) que se encuentra en cercanía a la guanilil ciclasa (GC) del espermatozoide (Bentley, *et al.*, 1988), a la cual activa de manera transitoria (Bentley y Garbers, 1986, Garbers, 1989, Yuen y Garbers, 1992). El espermatozoide de erizo de mar tiene altas concentraciones de guanilil ciclasa, esta enzima es una glicoproteína que se encuentra localizada en la membrana plasmática del flagelo (Garbers y Gray, 1974, Gray y Drummond, 1976; Sano, 1976) y posee un solo dominio transmembranal. El estudio de los mecanismos de comunicación entre el óvulo y el espermatozoide de la especie de erizo de mar *A. punctulata* llevó al descubrimiento del primer miembro de la familia de guanilil ciclasas de membrana plasmática (Garbers, 1989). El resact se une directamente a la GC del espermatozoide de esta especie. La clonación de esta GC permitió la clonación de otros miembros de la familia de guanilil ciclasas, en mamíferos, que ahora conocemos como receptores de superficie para péptidos natriuréticos (Waldman, *et al.*, 1984; Winkvist, *et al.*, 1984) y receptores de enterotoxinas resistentes al calor. En algunos casos se conoce que la GC aunque presenta las características estructurales de un receptor, no es esta la proteína que funciona como tal sino una proteína asociada a la GC (Kuno, *et al.*, 1986; Paul, *et al.*, 1987; Takayanagi, *et al.*, 1987), esto mismo ocurre en el espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus*.

El speract incrementa, de manera transitoria, las concentraciones de GMPc y AMPc y produce una hiperpolarización transitoria y dependiente de K^+ en el espermatozoide de *S. purpuratus* (Garbers, 1989), así como en membranas de flagelo de esta célula (Lee, 1988), sólo que en este último caso no es transitoria (Fig. 3, trazo de la derecha). Dicha hiperpolarización estimula un intercambio Na^+/H^+ (Lee y Garbers, 1986) lo que da lugar a un incremento en el pH_i (Hansbrough y Garbers, 1981 b; Repaske y Garbers, 1983). El speract también incrementa la actividad de otros sistemas de transporte iónico que transitoriamente incrementan la concentración de Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y depolarizan al espermatozoide (Darszon, *et al.*, 1999) (ver Fig. 3).

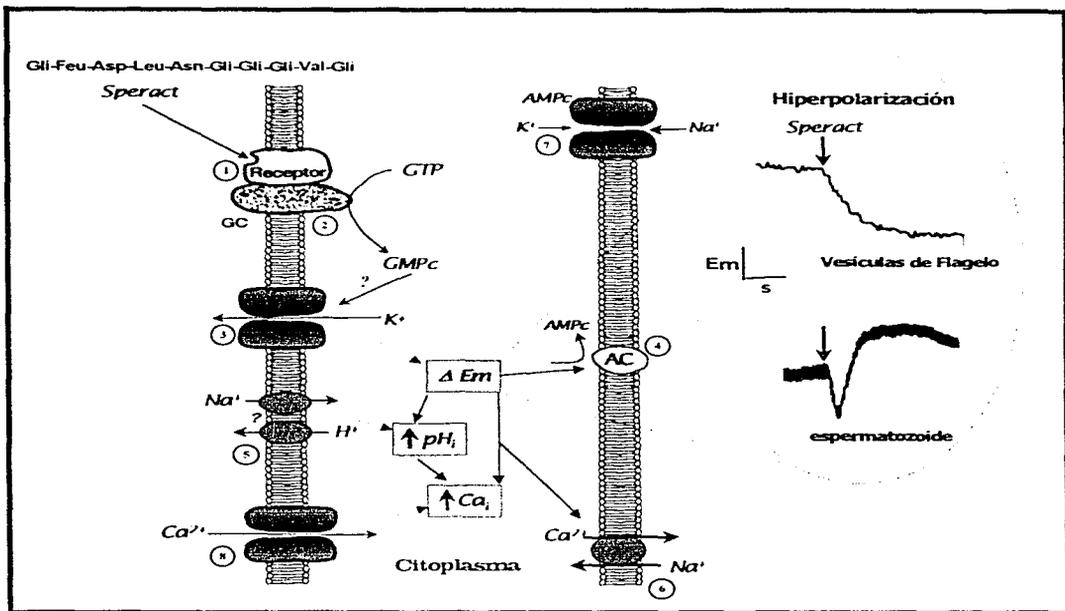


FIGURA 3. Modelo que representa el Mecanismo hipotético de la Respuesta al speract del espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus*. El Speract cuando se une a su receptor (1) activa indirectamente a la guanilil ciclasa (GC, 2). El incremento transitorio en [GMPc] podría abrir, directa o indirectamente, un canal de K⁺ (3) responsable de la hiperpolarización transitoria. Esta hiperpolarización puede estimular a la adenilil ciclasa (AC, 4), activar un intercambio Na⁺/H⁺ (5), posiblemente un intercambio Na⁺/Ca²⁺ (6) y un incremento en el pH intracelular (pH_i). Los cambios en el pH, pueden modular a la GC y a la AC, y probablemente a algunas cinasas, fosfatasas y fosfodiesterasas. El incremento en la [AMPc] activa a un canal poco selectivo para K⁺ y dependiente de AMPc, que pudiera estar involucrado en la depolarización inducida por el speract (7). La acción simultánea de los cambios de pH, y [AMPc] puede modular un canal de Ca²⁺ (8). El cambio en el potencial de membrana (ΔE_m) inducido por el speract (100 nM) en el espermatozoide completo y en las vesículas de flagelo de *S. purpuratus* se muestra en el lado derecho.

Se ha mostrado que el speract incrementa la concentración de GMPc, hiperpolariza al espermatozoide hinchado y abre canales de K^+ (Babcock, *et al.*, 1992; Cook y Babcock, 1993a), pero no se sabe si estos canales están modulados directamente por el GMPc (Darszon, *et al.*, 1999).

El receptor del speract se encuentra localizado más densamente en la membrana plasmática del flagelo (Cardullo, *et al.*, 1994; Garbers, 1989), lo que puede revelar su papel en la movilidad flagelar. Los flagelos del espermatozoide se pueden hinchar al resuspenderlos en un medio hipoosmótico, de tal forma que es posible preparar vesículas de membrana flagelar en cuyo medio intravesicular se incluyan compuestos que no son permeables a la membrana celular del espermatozoide, teniendo así control de los componentes del medio intravesicular. Cuando estas vesículas se sujetan a un gradiente de K^+ de adentro hacia afuera, y se abre un canal selectivo para K^+ , ocurre una hiperpolarización del potencial de membrana. Este cambio de potencial se puede medir con colorantes fluorescentes sensibles al potencial de membrana como es el diS-C₃-(5) (Lee, 1988). Estas vesículas son un sistema simplificado que permite estudiar el mecanismo por el cual el speract modula el o los canales responsables de la hiperpolarización en el espermatozoide.

1.3 Las proteínas G y la Respuesta al Speract

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas que funcionalmente acoplan receptores de la membrana (Gilman, 1987) a sus enzimas blanco o a canales iónicos. Estas proteínas constan de 3 subunidades, α , β y γ ; la subunidad α une e hidroliza GTP. En estado inactivo la proteína G existe como un trímero que tiene unido GDP a la subunidad α . Cuando se estimula por la unión a un receptor que a su vez fue activado por ligando, la subunidad α intercambia su GDP por GTP. Lo anterior provoca la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, llevando a la subunidad α y/o al dímero $\beta\gamma$ a unirse a las proteínas blanco. La proteína G vuelve a inactivarse cuando la subunidad α , que tiene actividad de GTPasa, hidroliza el GTP, quedando de nuevo con un GDP unido (Hepler y Gilman, 1992).

La respuesta inducida por el speract (hiperpolarización) en las vesículas de flagelo se incrementa cuando se cargan con GTP, agonista de proteínas G, o GTP γ S, un análogo del GTP

poco hidrolizable por lo que mantiene a la proteína G en estado activado. Esto llevó a Lee (1988) a proponer la participación de proteínas G en la respuesta al speract.

1.4 Calmodulina

La calmodulina, se encuentra en abundancia en el flagelo (Jones, *et al.*, 1978) del espermatozoide de erizo de mar donde se encuentra también el receptor al speract. Antagonistas de CaM inhiben la movilidad del espermatozoide humano (Aitken, *et al.*, 1988; Ahmad, *et al.*, 1995), perro y erizo de mar (Iwasa, *et al.*, 1987) y esta proteína se ha identificado en el espermatozoide de diversas especies (Feinberg, *et al.*, 1981; Jones, *et al.*, 1980; Tash, *et al.*, 1988).

La CaM es una proteína pequeña, de 16.7 KDa, que contiene cuatro sitios de unión a Ca^{2+} (Haiech, *et al.*, 1981). Es una proteína intracelular ubicua que tiene un papel vital en muchos aspectos de señalización celular (Levitán, 1999), transmite las señales del Ca^{2+} generadas en varias vías de señalización. La CaM, por ejemplo, puede unirse directamente a un canal iónico o puede tener otros blancos como cinasas o fosfatasa que regulen a su vez dicho canal. Esta proteína multifuncional puede unirse al menos a 30 diferentes enzimas y proteínas blanco tales como protein-cinasas, protein-fosfatasa y fosfodiesterasa dependientes de CaM, la sintetasa de óxido nítrico, la cinasa de cadena ligera de la miosina, así como ATPasas y proteínas estructurales del citoesqueleto (Jurado, *et al.*, 1999; James, *et al.*, 1995; Means, *et al.*, 1991; Vogel, 1994).

La CaM puede existir en diferentes estados de unión de Ca^{2+} , con 1, 2, 3 o 4 Ca^{2+} unidos en diferentes combinaciones, así, la mayoría de las enzimas que se activan con Ca^{2+} -CaM requieren que tenga unido al menos 3 o 4 Ca^{2+} . Aunque los estudios se han enfocado con mayor frecuencia a esta forma de la CaM que se une a Ca^{2+} , esta proteína puede existir libre de Ca^{2+} e interactuar con proteínas en una manera independiente de este catión (Rhoads y Friedberg, 1997). A esta forma se le llama ApoCaM. En este estado también puede tener un gran número de proteínas como blanco, siendo gran parte de ellas las mismas que modula la CaM y otras más, entre las que podemos citar a la neuromodulina, la neurogranina (Gerendasy, *et al.*, 1995) y la protein-cinasa dependiente de GMPc (Yamaki y Hidaka, 1980). La unión de la CaM a las enzimas puede ocurrir en la presencia de quelantes de Ca^{2+} , como lo son EDTA o EGTA. Un

ejemplo es la neuromodulina, que se une a CaM en presencia de EGTA ya que su afinidad es mayor a bajas concentraciones de Ca^{2+} o en ausencia de éste (Urbauer, *et al.*, 1995; Gerendasy, *et al.*, 1995).

1.5 Los Nucleótidos Cíclicos y su Importancia en la Respuesta al Spermatozoide

Los nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPc) se han implicado como segundos mensajeros intracelulares en la movilidad, metabolismo, capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide (Garbers y Kopf, 1980). Aunque el mecanismo exacto de acción de los nucleótidos cíclicos en estas células sólo se entiende parcialmente, ya que aunque se sabe que se incrementan los niveles de nucleótidos cíclicos durante los eventos antes mencionados, no se sabe mucho acerca de la forma en que modulan a las proteínas efectoras finales, los canales iónicos (Darszon, *et al.*, 1999). Éstos son los responsables de los cambios en la permeabilidad que ocurren durante estos procesos. Se desconoce si el efecto de los nucleótidos cíclicos es directamente sobre los canales, o bien, requieren de la acción de una proteína intermediaria como lo sería una cinasa o una fosfatasa dependiente de nucleótidos cíclicos.

1.5.a Canales CNG y canales modulados por nucleótidos cíclicos.

Los nucleótidos cíclicos usan diversos mecanismos para controlar la actividad de una variedad de canales iónicos. Los miembros de una familia designada como canales dependientes de nucleótidos cíclicos (canales CNG, de "Cyclic Nucleotides Gated") requieren de AMPC o GMPc para abrirse. Estos muestran características estructurales comunes con los miembros de la superfamilia de los canales dependientes de voltaje (Jan y Jan, 1990), a pesar de que no se abren por voltaje. La subunidad α de los canales CNG consta de 6 segmentos transmembranales (S1-S6) incluyendo el segmento S4, considerado parte del sensor de voltaje en los canales dependientes de voltaje, y la región formadora del poro (Zagotta, *et al.*, 1996). Tienen un gran dominio carboxilo terminal que posee un motivo de unión a nucleótidos cíclicos. Los canales CNG son hetero-oligómeros constituidos de al menos dos diferentes subunidades, α y β . Esto implica que las distintas combinaciones de subunidades pueden generar una diversidad de canales funcionales (Biel, *et al.*, 1995). La subunidad α (Kaupp, *et al.*, 1989) y

algunas subunidades β (Wiesner, *et al.*, 1998) de un canal directamente regulado por GMPc se clonaron e inmunodetectaron en el flagelo del espermatozoide de mamífero.

Los canales CNG tienen un papel muy importante en la transducción de señales en los sistemas visual (Yau y Baylor, *et al.*, 1989) y olfatorio (Zufall, *et al.*, 1994), pero también se han encontrado en una amplia variedad de tejidos no sensores, como el corazón, riñón, hígado, músculo y testículo (Biel, *et al.*, 1994; Distler, *et al.*, 1994; Finn, *et al.*, 1996; Feng, *et al.*, 1996; Weyand, *et al.*, 1994). Estos canales son catiónicos, poco selectivos, sin embargo, la homología estructural que guardan con los canales de K^+ dependientes de voltaje ha llevado al descubrimiento de canales de K^+ dependientes de voltaje que están regulados por nucleótidos cíclicos (Bruggemann, *et al.*, 1993; Latorre, *et al.*, 1991; Ganetzky, *et al.*, 1995).

Los canales iónicos sensibles a nucleótidos cíclicos (no dependientes de nucleótidos cíclicos) pertenecen a una familia relacionada con los canales CNG pero distante. Son canales que no son controlados de manera primaria por los nucleótidos cíclicos, pero son modulados por ellos. A esta familia pertenecen los canales de los fotorreceptores de estructura ciliada, de invertebrados como la escalopa, un molusco comestible de la especie *Pecten irradians*, comúnmente conocido como escalopa de bahía o escalopa de aguas poco profundas. Las células fotorreceptoras de este molusco responden a la luz dando una señal hiperpolarizante, como resultado de la apertura de canales de K^+ (Gomez y Nasi, 1994 a, b; McReynolds, 1976). Las conductancias de este tipo, selectivas a K^+ , son moduladas directamente por GMPc (Gómez y Nasi, 1995), el mismo compuesto que controla la corriente en los fotorreceptores de los bastones en vertebrados (Fesenko *et al.*, 1985).

II HIPOTESIS

El incremento en la concentración de GMPc que ocurre en el espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus*, durante la respuesta al speract, puede modular directamente al canal iónico selectivo para K^+ responsable de la hiperpolarización.

III OBJETIVO

Estudiar la modulación del canal de K^+ responsable de la hiperpolarización en la respuesta al speract.

- a) Determinar si este canal es modulado por proteínas G y/o es modulado por GMPc.
- b) Determinar si esta modulación ocurre directamente sobre el canal o mediante un evento de fosforilación.

IV METODOLOGÍA

IV.1 Obtención de los Espermatozoides.

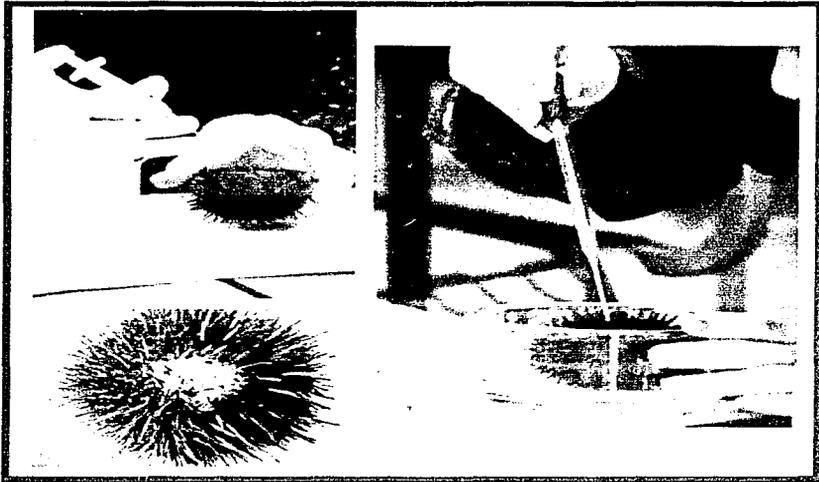


FIGURA 4. Obtención de los espermatozoides. Panel *superior-izq.*: Inyección intracelómica de KCl 0.5 M. Panel *inferior-der.*: Erizo de mar macho, los gametos se observan en color blanco (espermatozoides). *Der.*: Colección de los espermatozoides con una pipeta Pasteur.

Los erizos de mar de la especie *S. purpuratus* se obtuvieron de Marinus (Long Beach, CA.) y se mantuvieron en un acuario provisto de agua de mar artificial a una temperatura de 9 a 12°C.

Los espermatozoides de erizo de mar se obtienen por inyección intracelómica de 0.5 M de KCl y se colectan directamente de los gonoporos con una pipeta Pasteur (Fig. 4, der.). Se mantienen a 4°C hasta ser utilizados.

IV.2 Reactivos

Los colorantes para medir potencial de membrana, diS-Ba-C₃(3) y diS-C₃(5), se compraron a Molecular Probes (Eugene, OR), ambos se utilizaron disueltos en DMSO. El DCB se sintetizó como se describe en (Cragoe, *et al.*, 1967) y se disolvió en DMF. La valinomicina, los nucleótidos cíclicos permeables: 8Br-GMPc, 8Br-AMPc, diBu-GMPc y diBu-AMPc; el GTP-γS, mastoparín, NaF, AlCl₃, Ro-20-1724 e IBMX fueron de Sigma (St. Luis, MO). El H-7, H-8, Rp-8-pCPT-cGMPS, HA 1004, KN-62, Lavendustina A y Genisteina de Calbiochem (La Jolla, CA), y el speract sintético de Peninsula Laboratories (Belmont, CA). Los moduladores de canales de K⁺ fueron de Alomone Labs. (Jerusalem, Israel). El resto de los reactivos fueron de la más alta calidad disponible. Con excepción de la valinomicina y el IBMX, que se disolvieron en DMSO, todos los demás compuestos se disolvieron en Hepes 10 mM pH 8.0 con el objeto de prevenir algún cambio de pH debido a la adición del reactivo.

IV.3 Preparación de las Vesículas de Flagelo.

IV.3.a Aislamiento de los flagelos.

Las membranas de flagelo se aislaron de acuerdo al método de Lee (1984, 1985, 1988), modificado en el laboratorio del Dr. Darszon. El semen (1 ml) se diluye en 20 ml de agua de mar artificial fría (0 a 5°C) y sin sodio (AMA0Na pH 8.0: 460 mM Cloruro de colina, 27 mM MgCl₂, 28 mM Mg₂SO₄, 10 mM CaCl₂, 8 mM KCl, 2 mM KHCO₃, 10 mM Hepes pH 8.0) y se centrifuga a 250 g por 5 min, para eliminar los restos celulares provenientes de las paredes de la gónada e impurezas. La eliminación del Na⁺ en el agua de mar previene la activación de la movilidad. Los espermatozoides se sedimentaron al centrifugar el sobrenadante a 3,000 g por 5 min, se resuspendieron en 200 ml de AMA0Na pH 8.0 fría, se recuperaron al centrifugar a 2,000 g por

10 min (rotor JA-20) y se resuspendieron en 15 ml de AMA0Na pH 8.0 con 0.1 mM del inhibidor de proteasas, PMSF.

Los flagelos se separaron de las cabezas al hacer pasar la suspensión de espermatozoides, 10 veces, a través de una aguja hipodérmica del núm. 21. Los flagelos se aislaron de las cabezas centrifugando a 2,000 g durante 5 min (rotor JA-20). El precipitado, conteniendo las cabezas y espermatozoides completos, se reprocesó por el mismo procedimiento para recuperar más flagelos en el sobrenadante. Para eliminar cualquier remanente de cabeza o espermatozoide completo, los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a 2,000 g por 5 min (rotor JA-20). Con los flagelos aislados se formó un precipitado al centrifugar a 6,000 g (rotor JA-20) durante 30 min (ver Fig. 5). Se utilizó microscopia de contraste de fases para verificar la ausencia de cabezas de espermatozoides o espermatozoides intactos en la suspensión final de flagelos. En caso de que se observara una o más cabezas por campo se efectuó una centrifugación adicional a 2,000 g por 5 min (rotor JA-20).

IV.3.b Aislamiento de las membranas de flagelo.

Los flagelos se hincharon al diluirlos en 4 ml de medio intravesicular (40 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ y 10 mM Pipes pH 6.7) y se lisaron al homogenizarlos con 20 movimientos de homogenización con un vástago de Teflón (la luz entre la pared de la cámara y el vástago es de 0.08 - 0.13 mm). Los compuestos que no son permeables a la membrana, tales como el GTP γ S, GTP, GDP β S o NaF se introdujeron en las vesículas al adicionarlos al medio intravesicular antes de la homogenización. Los axonemas se eliminaron mediante centrifugación a 13,000 g por 4 min (centrífuga de mesa Eppendorf y en el cuarto frío). Las vesículas de membrana flagelar se colectaron por centrifugación a 130,000 g por 15 min (rotor 80 Ti, 4°C). En caso de que las vesículas se hayan cargado con algún compuesto, se incluye un paso adicional de lavado, antes de la resuspensión final, para eliminar del medio externo al compuesto impermeable. Para ello, las membranas se resuspenden en un volumen de 10 ml de medio externo (ME: 40 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ y 10 mM Pipes pH 6.7) y se centrifugan a 130,000 g por 15 min (rotor 80 Ti, 4°C). Finalmente se resuspenden en un volumen pequeño (300 - 400 μ l) de ME, para utilizarse el mismo día de la preparación o se almacenan a -70°C (ver Fig. 5) hasta su uso.

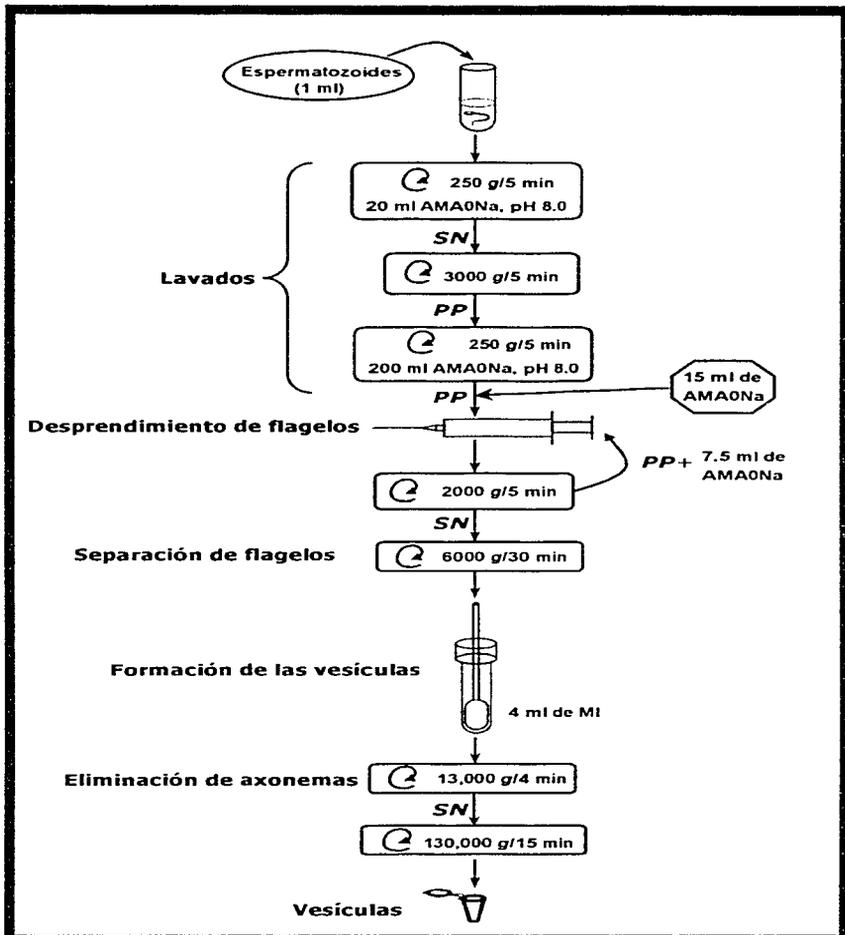


FIGURA 5. Preparación de Vesículas de Flagelo.

IV.4 Determinación de la Concentración de Proteína.

La concentración de proteína en las membranas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando seroalbúmina bovina como estándar.

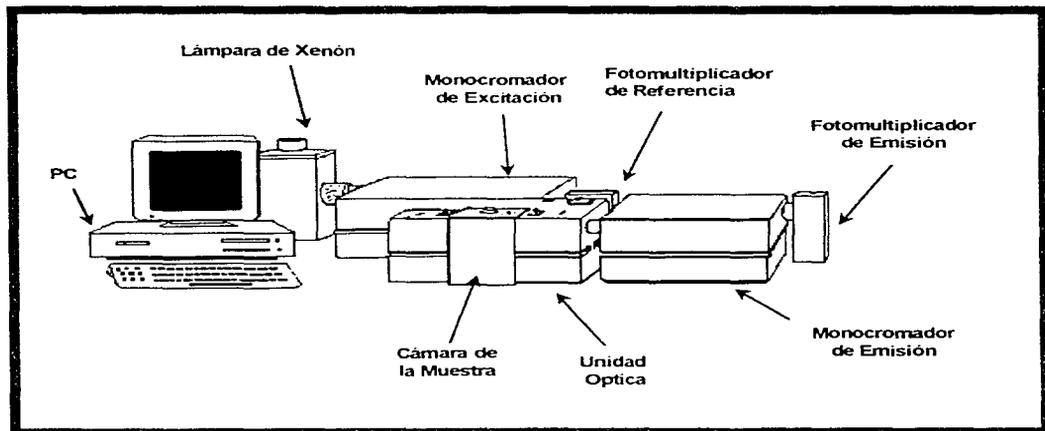


FIGURA 6. Espectrofluorómetro SLM-Aminco 8000.

IV.5 Mediciones de Potencial de membrana.

IV.5.a Potencial de Membrana de las Vesículas.

El potencial de membrana se determinó en un espectrofluorómetro SLM-Aminco-8000 (Fig. 6) conectado a un baño de circulación para mantener la temperatura constante (16°C). Para estas medidas se utilizaron el colorante fluorescente diS-C₃-(5) (125 nM), cargado positivamente, y sensible a potencial de membrana y la sonda aniónica diS-Ba-C₃-(3) (62.5 nM). La solución concentrada de cada una de las sondas se preparó en DMSO. La concentración final de DMSO en el ensayo fue de 0.12%.

La fluorescencia de diS-C₃(5) se excitó a 620 nm y se midió a 670 nm (González-Martínez y Darszon, 1987, Reynaud, *et al.*, 1993), mientras para el diS-Ba-C₂(3) se excitó a 540 nm y se midió a 580 nm. Cinco μ l de la suspensión de vesículas (2-4 mg de proteína/ml) se adicionaron a 1.6 ml del medio de ensayo de potencial de membrana (MEPM: 20 mM MgSO₄, 1.5 mM Ca(OH)₂, 0.5 mM CaCl₂, 20 mM Hepes pH 8.0 ajustado con N-metil-D-glucamina) conteniendo la sonda fluorescente. Los experimentos se llevaron a cabo en celdas de vidrio de forma cilíndrica y fondo plano, en agitación continua con una barra magnética y a 16°C. El registro se inicia cuando la señal de fluorescencia llega al equilibrio (2-4 min). Las adiciones de las diferentes sustancias se hicieron en pequeñas alícuotas (1-10 μ l). Los cambios de fluorescencia se calibraron de acuerdo al potencial de equilibrio del K⁺ generado en las vesículas en la presencia de valinomicina (0.5 μ M), un ionóforo de K⁺ (Fig. 7). Para la calibración se miden los cambios de fluorescencia inducidos por las diferentes adiciones de K⁺, en unidades arbitrarias (UAF), se grafican contra el potencial de equilibrio del K⁺ calculado mediante la ecuación de Nernst (Fig. 7C):

$$E = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{ion}]_e}{[\text{ion}]_i}, \text{ donde:}$$

R= Constante de los gases

T= Temperatura absoluta

Z= Valencia del ion

F= Constante de Faraday

[ion]_e = concentración externa del ion

[ion]_i = concentración interna del ion

Las adiciones de K⁺ para la calibración fueron: 0.3125, 0.625, 1.25 y 2.5 mM. Para los cálculos del potencial de equilibrio para el K⁺ se utilizó la concentración intravesicular de 40 mM.

Para calcular la magnitud de la hiperpolarización en presencia de inhibidores se tomó el valor de fluorescencia al cual se estabiliza la señal de fluorescencia, es decir el valor de hiperpolarización máxima.

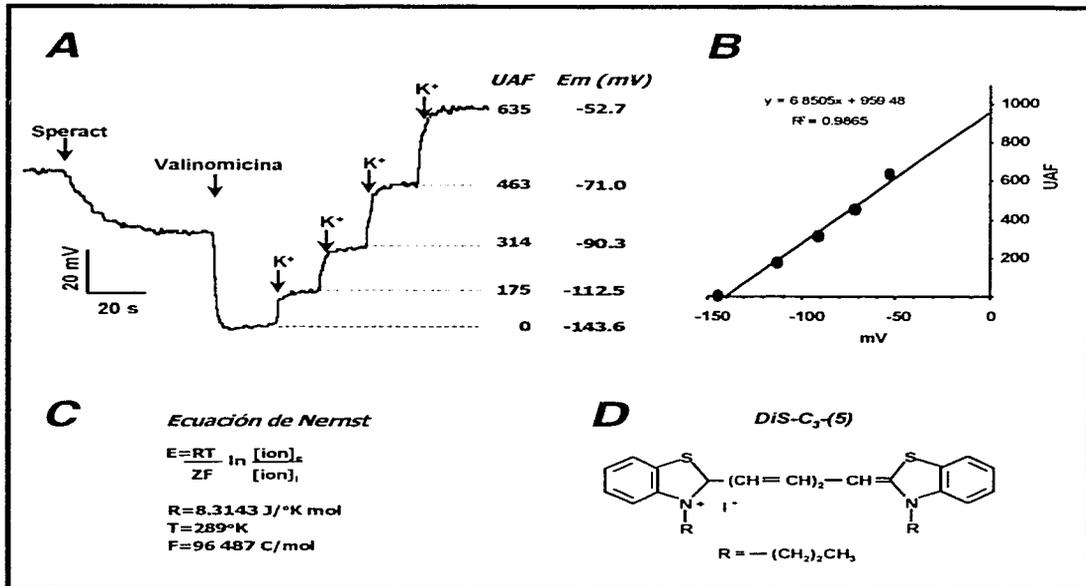


FIGURA 7. Determinación del Potencial de Membrana. El potencial de membrana se midió con la sonda fluorescente DiS-C₃-(5). **A)** Trazo de potencial de membrana en las vesículas de flagelo, que indica la adición de speract y la titulación con valinomicina y K⁺. Al lado derecho se indican los cambios en la fluorescencia, en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), resultado de las adiciones de K⁺ así como su equivalente en unidades de potencial de membrana (mV), que se calcula utilizando la Ecuación de Nernst para el potencial de membrana (C). Cada una de estas mediciones se grafica como se indica en B. **D)** Fórmula lineal del DiS-C₃-(5).

IV.5.b Mediciones de Potencial de Membrana en el Espermatozoide Completo

- *Potencial de membrana en el espermatozoide intacto.*

Para las mediciones de potencial de membrana del espermatozoide intacto se utilizó la sonda fluorescente diS-C₃-(5) (González-Martínez y Darszon, 1987, Reynaud, *et al.*, 1993) y

como medio de ensayo AMA0Na, pH 8.0. Los espermatozoides sin diluir se resuspendieron en proporción de 1:20 en agua de mar artificial con sólo 1mM de Ca^{2+} pH 7.0 (AMA1Ca²⁺, pH 7.0). Diez μl de esta suspensión se resuspenden en el medio de ensayo (AMA0Na, pH 8.0). Cuando la señal de fluorescencia llega al equilibrio, al cabo de 2-4 min., se adiciona un agente desacoplante CCCP (0.1 μM), que elimina la contribución de la mitocondria en el potencial de membrana de la célula al desacoplar la fosforilación oxidativa (Terada, 1981). Así, la señal que se registra corresponde sólo al potencial de membrana plasmática del espermatozoide. Para la calibración del potencial de membrana se adicionó 0.5 μM de valinomicina. Las adiciones de K^+ para la calibración fueron: 3.75, 7.5, 15 y 30 mM.

- *Potencial de membrana en el espermatozoide hinchado.*

Las medidas de potencial de membrana en el espermatozoide hinchado se hicieron de acuerdo a Babcock, *et al.*, (1992). Los espermatozoides (10 μl de la suspensión en AMA1Ca²⁺, pH 7.0) se hincharon al resusponderlos en agua de mar artificial diluida 1/10, pH 7.0, con 20 mM de Mg_2SO_4 . El CCCP y la valinomicina se utilizaron a la misma concentración que en las mediciones de potencial del espermatozoide intacto. Para la calibración se hicieron las siguientes adiciones de K^+ : 10, 20 y 40 mM.

Se usaron diferentes concentraciones de K^+ para calibrar los cambios de fluorescencia en el espermatozoide completo debido a que las condiciones iónicas son distintas, en un caso es agua de mar diluida y en otro es agua de mar sin Na^+ . La razón de usar estas condiciones y no el agua de mar completa, pH 8.0, se debe a que en AMA0Na, pH 8.0 o agua de mar artificial diluida 1/10, pH 7.0 la hiperpolarización inducida por el speract presenta una cinética más lenta por lo que se observa con más claridad.

IV.6 Determinación del Contenido de GMPc en las Vesículas de Flagelo.

El contenido de GMPc en las vesículas de flagelo se determinó por radioinmunoensayo. Las membranas de flagelo (300 μg) se resuspendieron en 20 ml de MEPM con 100 μM de IBMX. La suspensión se incubó con o sin speract (100 nM) durante 1 min a 14°C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 200,000 g por 15 min a 4°C, las membranas se resuspendieron en 200 μl de medio de ensayo y se hirvieron por 5 min. Después, el GMPc se extrajo a temperatura

ambiente con 2 volúmenes de etanol y agitando en el "vortex" durante 1 min, la suspensión se centrifugó a 16,000 g durante 20 min para separar el GMPc (sobrenadante) de las proteínas de la muestra. Para recuperar el GMPc contenido en este sobrenadante, se evaporó al vacío hasta obtener un residuo seco. El residuo se disolvió en 50 μ l de la solución amortiguadora proporcionada con el estuche de ensayo (TRK 500) y se procesó de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Amersham). Este ensayo se basa en la competencia entre el GMPc sin marcar y una cantidad conocida de GMPc marcado, con Tritio, por la unión a un anticuerpo de alta afinidad y específico para el GMPc. La cantidad del GMPc unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc presente en la muestra de ensayo. Se mide la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo, lo que permite el cálculo de la cantidad de GMPc sin marcar en la muestra y con estos datos construir una curva estándar. La separación del GMPc unido al anticuerpo de aquél no unido se realizó precipitando con sulfato de amonio, seguido de centrifugación. El precipitado, que contiene el GMPc unido al anticuerpo, se disolvió en agua y su actividad se determinó en un contador de beta-centelleo líquido. Finalmente, la concentración del GMPc no marcado en la muestra se determinó a partir de su correlación con los datos de la curva estándar.

V RESULTADOS

La mayor parte de los resultados aquí mostrados se encuentran en el trabajo publicado en la revista *Developmental Biology* (ver *Apéndice*).

La hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo es cualitativamente similar cuando se mide con el colorante diS-C₃-(5) o con diS-Ba-C₂-(3), como lo reportó Lee (Lee, 1988) y se ilustra en las figuras 8A y 8B. Sin embargo, es más difícil de calibrar el diS-Ba-C₂-(3) ya que forma complejos insolubles con la valinomicina (Rink, *et al.*, 1980; Zeng, *et al.*, 1995), mientras que el diS-C₃-(5) se puede calibrar fácilmente, y su señal de fluorescencia es más grande. Es por esta razón que se utilizó el diS-C₃-(5) para medir el potencial de membrana de las vesículas y del espermatozoide intacto, además de que este colorante es uno de los más usados para medir potencial de membrana (Laris, *et al.*, 1976; Tsien y Hladky, 1978; Rink, *et al.*, 1980).

Debido a que el potencial de membrana de las vesículas de flagelo y el del espermatozoide es negativo, la sonda catiónica se internaliza y disminuye su fluorescencia al interactuar con proteínas internas. Como el colorante es catiónico también entra a la mitocondria en los espermatozoides por lo que es necesario colapsar el potencial mitocondrial con un ionóforo de protones (Terada, 1981). Si se asume que en la presencia de la valinomicina, el potencial de membrana es igual al potencial de equilibrio del K⁺, entonces es posible calibrar los cambios de fluorescencia del diS-C₃-(5) (ver *Metodología*). Para tal efecto, se cambió el potencial de equilibrio del K⁺ al cambiar la concentración de K⁺ externo. En las Figuras 7A y 8A se puede observar cómo un incremento en la concentración de K⁺ externo, que disminuye el potencial de equilibrio para el K⁺, da como resultado un incremento en la fluorescencia. De los resultados de estos experimentos puede construirse una curva de calibración como la que se muestra en la Fig. 7B. El potencial de reposo de las vesículas de flagelo medido con este colorante fue de -80 ± 3 mV ($n = 110$) y la adición del speract resultó en una disminución de la fluorescencia, lo que indica una hiperpolarización inducida por el speract, misma que llega a su valor máximo (-31 ± 17 mV, $n = 136$) en 40 ± 6 s. y decae muy lentamente, en minutos. Por otro lado, el potencial de membrana de las vesículas de flagelo no cambió cuando se adicionó el solvente del speract (agua desionizada) o 100 nM de resact, un péptido que no induce ninguna

respuesta en los espermatozoides ni tampoco en los flagelos aislados de *S. purpuratus* (Lee y Garbers, 1986; Garbers, 1989), (Fig. 8A), lo cual indica la especificidad de la respuesta.

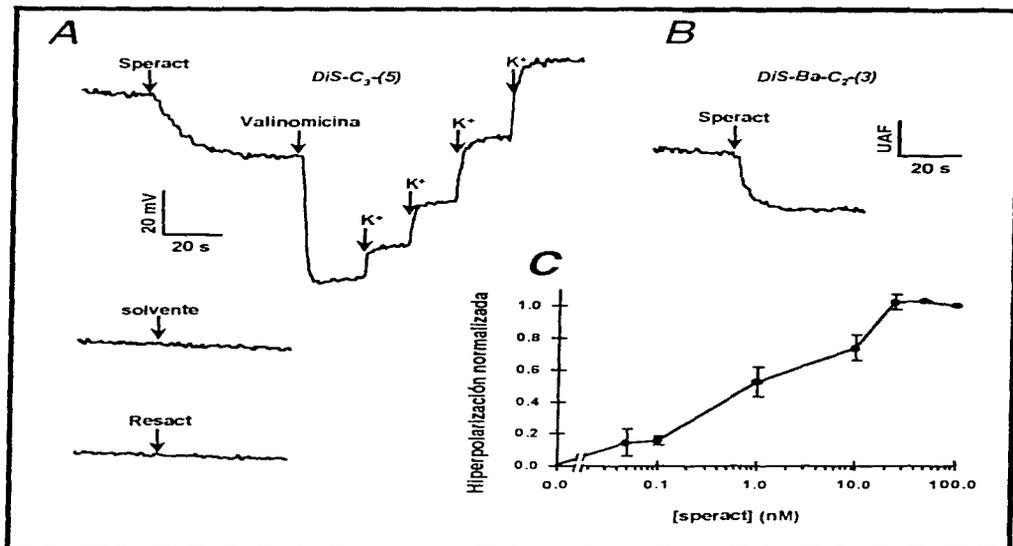


FIGURA 8. Hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo del espermatozoide de erizo de mar. Los trazos superiores son representativos de la hiperpolarización inducida por 100 nM de speract en las vesículas de flagelo, medida con diS-C₃-(5) (A) o diS-Ba-C₂-(3) (B). Ni el solvente del speract (A, segundo trazo) ni 100 nM de resact, un péptido homólogo de la especie *A. punctulata* (A, tercer trazo), indujeron la hiperpolarización. Las flechas indican las adiciones de cada compuesto. C) Dependencia de la concentración de la respuesta al speract medida con diS-C₃-(5). Este es el colorante que se utilizó para medir el potencial de membrana en los experimentos posteriores. Los valores representan el promedio \pm error est. de al menos 4 experimentos. Todos los trazos de potencial de membrana tienen las escalas de tiempo y de potencial de membrana, o en su defecto unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) cuando no es posible hacer una calibración debido a las condiciones de experimentación.

La Figura 8C muestra que a 0.8 nM de speract se obtuvo la mitad de la respuesta máxima al speract y la saturación ocurrió a ~25 nM. La respuesta al speract en las vesículas de flagelo no se inhibe por el cambio en el pH externo desde ~ 6.5 a 8.0, sólo se presenta una inhibición clara a pH 5.0 (Fig. 9).

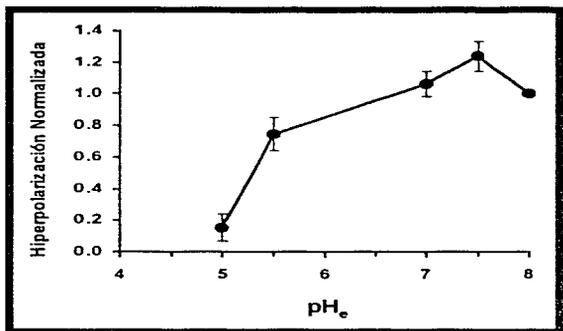


FIGURA 9. Efecto del pH externo en la Respuesta al Speract. La hiperpolarización inducida por el speract sólo se inhibe de manera importante a un pH externo (pH_e) <5.5. En el rango de pH_e de ~ 6.5 a 8.0 la hiperpolarización no muestra inhibición. La hiperpolarización (eje y) se normalizó con respecto al control donde el pH_e es 8.0. Se muestra el promedio +/- el error estándar de $n=3$.

V.1 Moduladores de Proteínas G en la Respuesta al Speract.

La inclusión de GTP (Lee, 1988) o $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (300 μM) en las vesículas de flagelo incrementó la respuesta al speract (Fig. 10). Si este incremento estuviera mediado por proteínas G, se esperaría que el $\text{GDP}\beta\text{S}$, un análogo no hidrolizable del GDP, inhibiera la hiperpolarización inducida por el speract, ya que por mantener a las proteínas G en su conformación trimérica (α, β, γ), constituye un inhibidor de estas proteínas, pero no ocurrió así (Lee, 1988) (Fig. 10A, 3^{er} trazo, y 10B).

Para explorar la participación de las proteínas G, se utilizaron otros activadores de proteínas G, como el aluminato, GMP-PNP (500 μM) y el mastoparín (10 μM). El GMP-PNP, al igual que el $\text{GTP}\gamma\text{S}$, es un análogo del GTP no hidrolizable por las proteínas G, sirve como un inhibidor efectivo de la actividad de GTPasa de estas proteínas, dejándolas en un persistente estado activado.

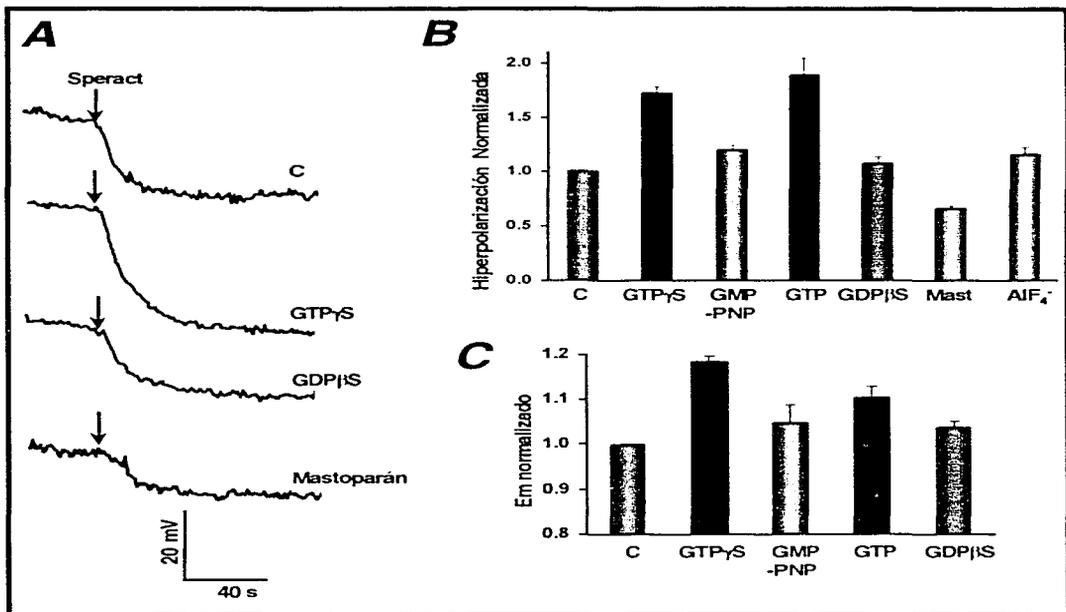


FIGURA 10. Moduladores de Proteínas G en la Respuesta al Speract en las Vesículas de Flagelo. **A)** La hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas control o en las precargadas con 300 μ M de GTP γ S o GDP β S (300 μ M), o expuestas a 10 μ M de mastoparán. **B)** Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos que se muestran en **A)**, además se muestra la respuesta al speract obtenida en las vesículas cargadas con GTP (300 μ M), GMP-PNP (500 μ M) y aluminato (AIF $_4^-$). El GTP, el GMP-PNP, el GTP γ S, el GDP β S, el GMP-PNP y el aluminato se introdujeron en las vesículas como se indica en *Metodología*, el mastoparán es permeable y se adicionó 10 min. antes del speract (25 nM). La hiperpolarización inducida por el speract se normalizó con respecto al control. **C)** Efecto del GDP β S (análogo del GDP) y del GTP y sus análogos GTP γ S y GMP-PNP, sobre el potencial de reposo de las vesículas. El potencial de membrana de reposo está normalizado con respecto al de las vesículas control sin cargar. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar de al menos 4 experimentos.

El mastoparán, un pequeño péptido anfifílico de 14 aminoácidos (Ile-Asn-Leu-Lis-Ala-Leu- Ala- Ala- Leu- Ala-Lis-Lis-Ile-Leu-NH₂), aislado del veneno de avispa, activa directamente a proteínas G (Higashijima, *et al.*, 1998). Este péptido cataliza el intercambio de nucleótido (GDP por GTP), de las proteínas G, ya que cuando el mastoparán se une a la membrana plasmática forma una α hélice de tal forma que imita la acción del dominio de regulación de los receptores que activan a las proteínas G. El aluminato (AlF₄⁻) activa proteínas G al unirse a la subunidad inactiva G α -GDP, cerca del sitio que ocuparía el fosfato gamma del GTP en la subunidad activa, G α -GTP (Sondek, *et al.*, 1994). Estos activadores no incrementaron la respuesta al speract (Fig. 10A y 10B), lo cual es inconsistente con la participación de proteínas G en esta respuesta. Por otro lado, el potencial de membrana de reposo de las vesículas cargadas con GTP o con GTP γ S se muestra más hiperpolarizado (Fig. 10C). Se presenta una hiperpolarización de ~ 17 mV en aquellas vesículas cargadas con GTP γ S y de ~ 10 mV en las que tienen GTP. Esto no sucede cuando se cargan con el análogo del GTP, el GMP-PNP o con el análogo del GDP, el GDP β S. Esto sugiere que el GTP γ S y en un menor grado el GTP pueden inducir hiperpolarización por ellos mismos, aun en la ausencia de speract.

La síntesis de GMPc por la GC en la célula depende de la disponibilidad del sustrato, el GTP. Es probable que el incremento observado en la respuesta al speract, con el GTP y el GTP γ S, se deba a que estos compuestos también puedan actuar como sustratos de la GC en las vesículas (Bentley, *et al.*, 1987; Sitaramayya, *et al.*, 1991), mientras el GMP-PNP no es un buen sustrato para esta enzima (Sitaramayya, *et al.*, 1991).

V.2 Inhibidores de Calmodulina Inhiben la Respuesta al Speract

La calmodulina (CaM) es una proteína intracelular, de bajo peso molecular (16.7 KDa) que se encuentra en abundancia en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar (Jones, *et al.*, 1978) donde también se encuentran el receptor al speract y la GC. El Mastoparán, además de ser agonista de proteínas G, es un antagonista de CaM, que se une a ésta en cada uno de sus dominios globulares, amino y carboxilo, inhibiendo el cambio conformacional que permite a la CaM unirse a la proteína blanco. El mastoparán inhibió la respuesta al speract (Figs. 10 y 12B), a las mismas concentraciones (IC₅₀ = 5 μ M) que se utilizan para inhibir a la CaM. Estos resultados nos llevaron a probar otros inhibidores de CaM: La trifluoperazina (TFP), una

fenotiazina utilizada como fármaco tranquilizante (Fig. 11, izq.), es un antagonista de CaM a concentraciones micromolares que inhibió la respuesta al speract con un $IC_{50} = 0.5 \mu M$. El W-7 ($IC_{50} = 1 \mu M$), el W-12 (N-(4-Aminobutil)-1-naftalensulfonamida) y el W-5 ($IC_{50} \sim 14 \mu M$), que también inhibieron la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo (Figs. 12A y 12C). El W-5 (N-(6-Aminohexil)-1-naftalensulfonamida) es un análogo del W-7 (N-(6-Aminohexil)-5-chloro-1-naftalensulfonamida), deficiente en un cloro, que se caracteriza por ser ~ 10 veces menos potente que el W-7 (Fig. 11, der.) para inhibir a CaM. En este caso, el W-5 fue mucho menos potente que el W-7 (~ 14 veces) para inhibir la respuesta al speract en las vesículas (Fig. 12C). En tanto que el W-12 también inhibe a CaM con menor potencia que el W-7. Estos resultados apoyan la posible participación de la CaM. Además, como la inhibición ocurrió a concentraciones a las cuales la acción de la CaM se inhibe por estos compuestos, estos resultados señalan que esta proteína podría estar participando en la vía de transducción de señales inducida por el speract.

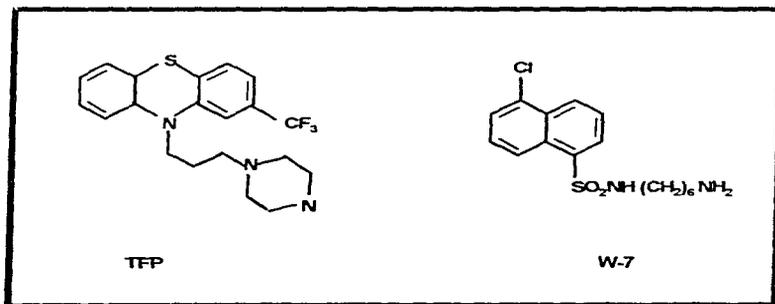


FIGURA 11. Fórmula lineal de la Trifluoperazina (TFP) y del W-7.

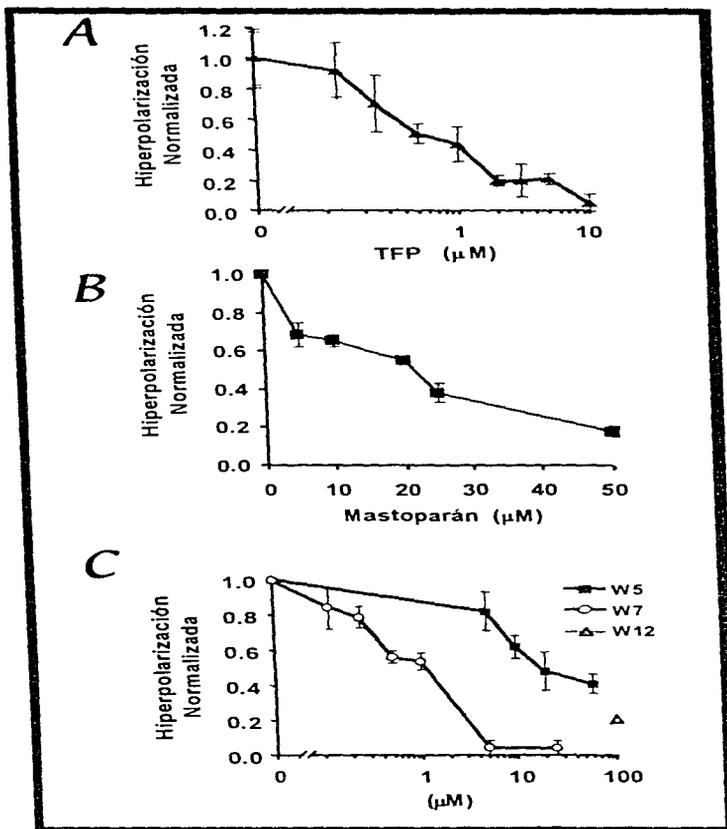


FIGURA. 12. Inhibición de la Respuesta al Speract por Antagonistas de Calmodulina en las Vesículas de Flageto. La inhibición de la hiperpolarización inducida por el speract por los antagonistas de CaM: TFP y mastoparan se muestran en (A) y (B) respectivamente, W-5, W-7 y W-12 (sólo 100 μM) en (C). Todos los compuestos son permeables, se solubilizaron en DMSO, y se agregaron 2 min antes del speract. La hiperpolarización (eje y) se normalizó con respecto a la respuesta al speract sin inhibidores. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos.

Para valorar la dependencia de Ca^{2+} de la respuesta al speract, se disminuyó el Ca^{2+} en las vesículas. Se utilizó el quelante EGTA, a una concentración de 10 mM, tanto en el medio interno como externo. También se usó BAPTA, un quelante rápido de Ca^{2+} , a una concentración de 2 mM en ambos medios. Para los dos quelantes, los experimentos se realizaron en un medio de ensayo libre de Ca^{2+} y en presencia del quelante. Al disminuir el Ca^{2+} con el BAPTA, sólo hubo un 28% de inhibición de la hiperpolarización inducida por el speract y los experimentos en presencia de EGTA (10 mM) no afectaron la respuesta (Fig. 13).

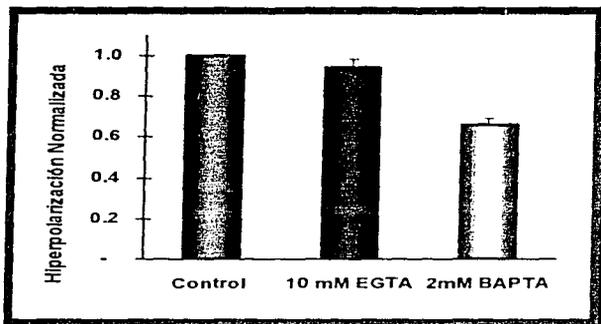


FIGURA 13. Efecto de la Eliminación del Ca^{2+} Intracelular y Extracelular en la Respuesta al Speract en las Vesículas de Flagelo. Las barras muestran la hiperpolarización inducida por el speract normalizada con respecto al control en ausencia de quelantes. Tanto el EGTA como el BAPTA se incluyeron en el medio intravesicular y estuvieron presentes en el medio de ensayo. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos.

V.3 Los Nucleótidos Cíclicos Regulan la Respuesta al Speract.

Cook y Babcock, (1993a) reportaron que el IBMX, un inhibidor de fosfodiesterasas (FDEs), es más selectivo para las FDEs de GMPc en el espermatozoide de erizo de mar. Este compuesto aumentó el incremento en la concentración de GMPc, así como la hiperpolarización que se observa en respuesta a la adición de speract en el espermatozoide hinchado (Cook y Babcock, 1993a). Cuando se agregó IBMX (100 μM) a las vesículas, 1min antes del speract, se incrementó en un 80 % la hiperpolarización inducida por este péptido en las vesículas de flagelo (Fig. 14A y 14B). El primer trazo de la Fig. 14 muestra la respuesta al speract control e incluye la adición del solvente, el DMSO. Por otro lado, dos inhibidores más específicos para las FDEs

selectivas de AMPc, papaverina y Ro-20-1724 (Cook y Babcock, 1993a), a 100 μM no afectaron la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo (Fig. 14A y 14B).

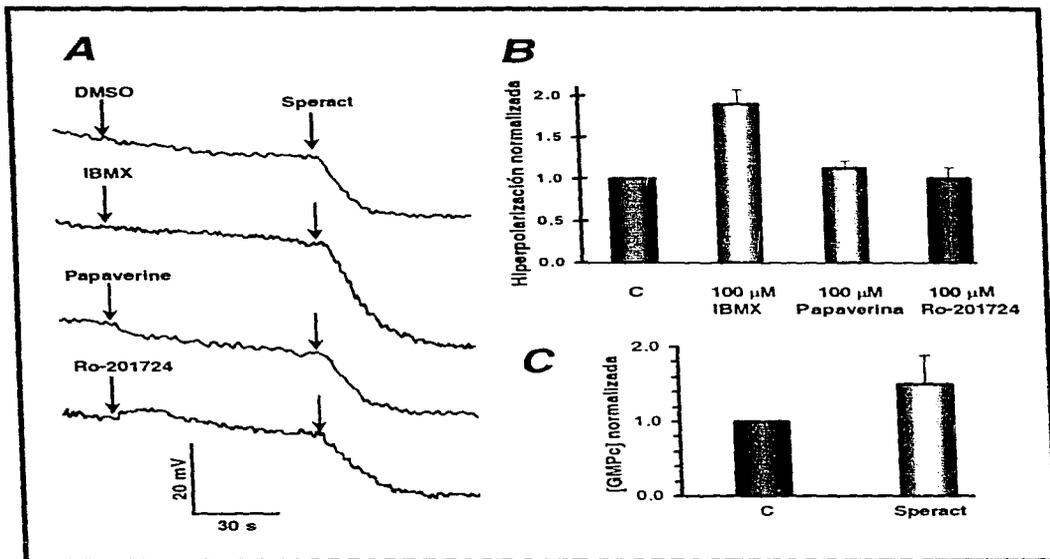


FIGURA 14. Efecto de los Inhibidores de Fosfodiesterasas de Nucleótidos Cíclicos en la Respuesta al Speract en Vesículas de Flagelo. Los inhibidores de fosfodiesterasas (100 μM) se adicionaron 1 min. antes de agregar el speract (25 nM). El panel (A) muestra los trazos de potencial de membrana donde se utilizaron el DMSO (control), IBMX (100 μM), papaverina (100 μM) o Ro-20-1724 (100 μM). El panel (B) muestra un resumen de los resultados expuestos en (A). La hiperpolarización (eje y) se normalizó con respecto a la respuesta al speract sin inhibidores. El panel (C) ilustra el incremento en la concentración de GMPc inducido por el speract en las vesículas de flagelo (ver Metodología). La concentración de GMPc determinada antes de la adición del 100 nM de speract se normalizó y comparó con el valor obtenido 1 min. después de agregar el péptido.

Estos resultados son consistentes con la idea de que un incremento en la concentración de GMPc abre canales selectivos a K⁺ responsables de la hiperpolarización inducida por el speract. Como se esperaba, se detecta un incremento en la concentración de GMPc en las vesículas, cuando se agrega speract en presencia de 100 μM de IBMX (Fig. 14C), indicando que existe sustrato para la GC.

Se ha propuesto que hay una correlación entre el incremento en los niveles de GMPc inducido por el speract y la hiperpolarización que produce (Cook y Babcock, 1993a; Labarca, *et al.*, 1997); sin embargo no hay reportes de experimentos que muestren que análogos permeables de GMPc puedan inducir una hiperpolarización dependiente de K⁺ en el espermatozoide de enzo de mar o en vesículas de flagelo.

El 8Br-GMPc, un nucleótido cíclico permeable y resistente a la hidrólisis, es un buen activador de canales CNG (Koch y Kaupp, 1985), aun más potente que el mismo GMPc. Por otro lado, Koch y Kaupp, (1985), mostraron que los análogos de GMPc que están modificados en la ribosa, en la porción fosfodiéster o pirimidica de la molécula, como es el caso del diBu-GMPc, no son efectivos como agonistas de canales CNG. Al igual que el speract, el 8Br-GMPc, y no el 8Br-AMPC, estimula la respiración y la oxidación de ácidos grasos (Hansbrough, *et al.*, 1980) en el espermatozoide de *S. purpuratus*. En las vesículas de flagelo, el 8Br-GMPc (300 μM) produjo una gran hiperpolarización (1.6 veces la respuesta al speract), y redujo la respuesta al speract a menos de la mitad (Fig. 15A, trazos primero y segundo; 15B). La respuesta inducida por el 8Br-GMPc se inhibió cuando se aumentó el K⁺ externo a 10 mM (Fig. 15A, der.). Por otro lado, 300 μM diBu-cGMP indujo una hiperpolarización pequeña en las vesículas de flagelo y redujo en ~30 % la respuesta al speract. A 1 mM este análogo causa una depolarización pequeña (Fig. 15B). En contraste, los análogos permeables de AMPc, 8Br-AMPC y diBu-AMPC, no indujeron por ellos mismos un cambio en el potencial de membrana ni alteraron la respuesta al speract (Fig. 15B). Estos resultados apoyan la hipótesis de que es el GMPc y no el AMPc el que regula la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo.

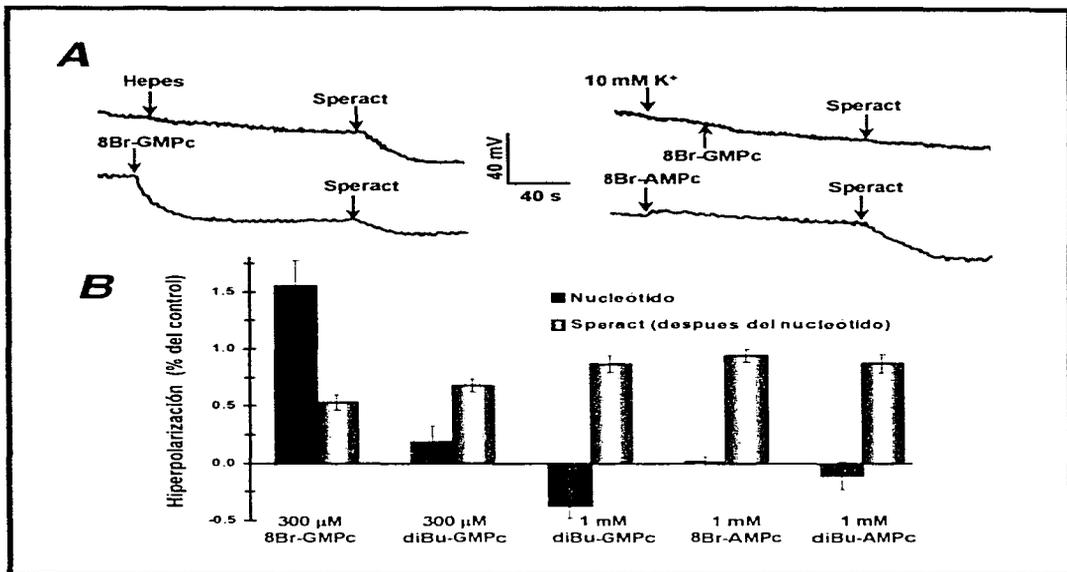


FIG. 15. Cambios en el Potencial de Membrana Inducidos por Diferentes Nucleótidos Cíclicos Permeables y su Efecto en la Respuesta al Speract en las Vesículas de Flagelo. El panel (A) muestra la respuesta al speract (25 nM), incluyendo la adición del solvente, (1^{er} trazo, control). La hiperpolarización causada por 8Br-GMPc (300 μM) y su efecto en la respuesta al speract se muestra en el 2^o trazo. En el 1^{er} trazo de la derecha se agregó 10 mM de K⁺ 1 min antes de adicionar el 8Br-GMPc, el K⁺ inhibió por completo la respuesta inducida por el 8Br-GMPc y la respuesta al speract. El último trazo muestra como el 8Br-AMPC (1 mM) no es capaz de producir una hiperpolarización o de reducir la respuesta del speract. **B)** El resumen de resultados obtenidos en los experimentos mostrados en (A). Las barras azules indican los cambios de potencial de membrana inducidos por los diferentes nucleótidos cíclicos permeables. Las barras amarillas indican la hiperpolarización inducida por el speract en la presencia de: 8Br-GMPc (300 μM), diBu-GMPc (300 μM ó 1 mM), 8Br-AMPC (1 mM) y diBu-AMPC (1 mM). La hiperpolarización (eje y) se normalizó con respecto a la respuesta al speract (25 nM) sin nucleótidos.

El espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus* puede hincharse en agua de mar diluida 10 veces con 20 mM de MgSO₄. Las células hinchadas son casi esféricas, de un diámetro de ~ 4 μm, y se pueden cargar con sondas fluorescentes para pH_i, Ca²⁺ y para

potencial de membrana (Reynaud, *et al.*, 1993). El espermatozoide hinchado puede regular su potencial de membrana, pH_i , Ca^{2+} y potencial de membrana. Además, los cambios en el potencial de membrana inducidos por el speract en el espermatozoide hinchado son más grandes y más fáciles de analizar que aquellos registrados en el espermatozoide normal (Babcock, *et al.*, 1992).

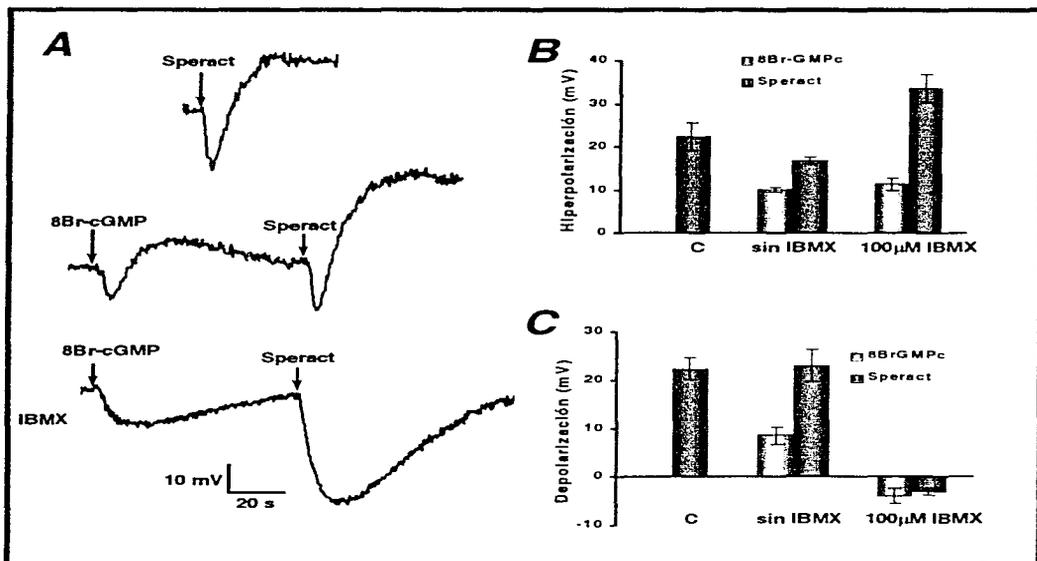


FIGURA. 16. La Respuesta al 8Br-GMPc en el Espermatozoide de Erizo de Mar Hinchado. Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se hincharon en agua de mar artificial diluida 1/10, pH 7.0 más 20 mM de Mg_2SO_4 , como se indica en *Metodología*. Los cambios en el potencial de membrana se midieron usando diS-C₃(5) como describieron Babcock y cols. (1992). (A) Los trazos muestran los cambios en el potencial de membrana con speract (100 nM) y 8Br-GMPc (1 mM) como indican las flechas. Las barras representan la hiperpolarización (B) y la depolarización máximas (C) inducidas por el speract y el 8Br-GMPc, tanto en presencia como en ausencia de 100 μM de IBMX.

En el espermatozoide hinchado, 1mM de 8Br-GMPc también produjo una respuesta semejante a la que induce 100 nM speract en estos espermatozoides (Fig. 16A), se observa una hiperpolarización seguida de una depolarización (Fig. 16B). Lo cual es indicativo de que la permeabilidad abierta por el 8Br-GMPc y el speract pudiera ser la misma.

En presencia de 100 μ M de IBMX la hiperpolarización inducida tanto por el 8Br-GMPc como por el speract, se mantiene durante mas tiempo y la repolarización es muy lenta y sólo llega a una fase próxima al potencial de reposo de la célula, sin llegar a depolarizar. Es decir que a diferencia de las respuestas que se dan en el potencial de membrana en ausencia de IBMX, donde si ocurre una depolarización neta, en presencia de IBMX no hay tal depolarización (Fig. 16A y 16C). Esto podría explicarse porque el incremento en el nivel del GMPc logrado con la adición del speract o del 8Br-GMPc, se mantiene debido a la inhibición de las FDE de GMPc por el IBMX. Como consecuencia se observa un retraso en la repolarización, y posiblemente de los efectos de modulación que puedan estar implicados en la depolarización. Estos experimentos se realizaron en el espermatozoide hinchado debido a que las condiciones iónicas son similares a aquellas usadas para los experimentos con las vesículas de flagelo.

V.4 ¿El Speract y el 8Br-GMPc Pueden Activar la Misma Vía de Permeabilidad?

La respuesta al 8Br-GMPc, al igual que la respuesta al speract, también se inhibe al cambiar el potencial de equilibrio del K^+ cuando se agrega 10 mM de K^+ en el medio de ensayo, sugiriendo que el mismo canal podría mediar ambas respuestas. Para explorar tal posibilidad nosotros comparamos la selectividad iónica de ambas respuestas en las vesículas de flagelo. Lee (1988), probó la capacidad del K^+ , Rb^+ y Cs^+ para inhibir la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo como una forma indirecta de estudiar su selectividad iónica. Sin embargo, no incluyó en ese estudio al principal catión en el agua de mar, el Na^+ . Si el K^+ se reemplaza por otro ion y este ion no puede pasar por el canal activado por el speract, entonces el cambio resultante en el potencial de membrana después de la adición del speract deberá ser el mismo, como si ese ion no estuviera presente. La Figura 17A muestra que 5 mM de Na^+ solamente cambia el potencial de membrana en $\sim 15\%$, en tanto que 1 mM de K^+ externo es suficiente para llevar a cabo un máximo de inhibición de la respuesta al speract.

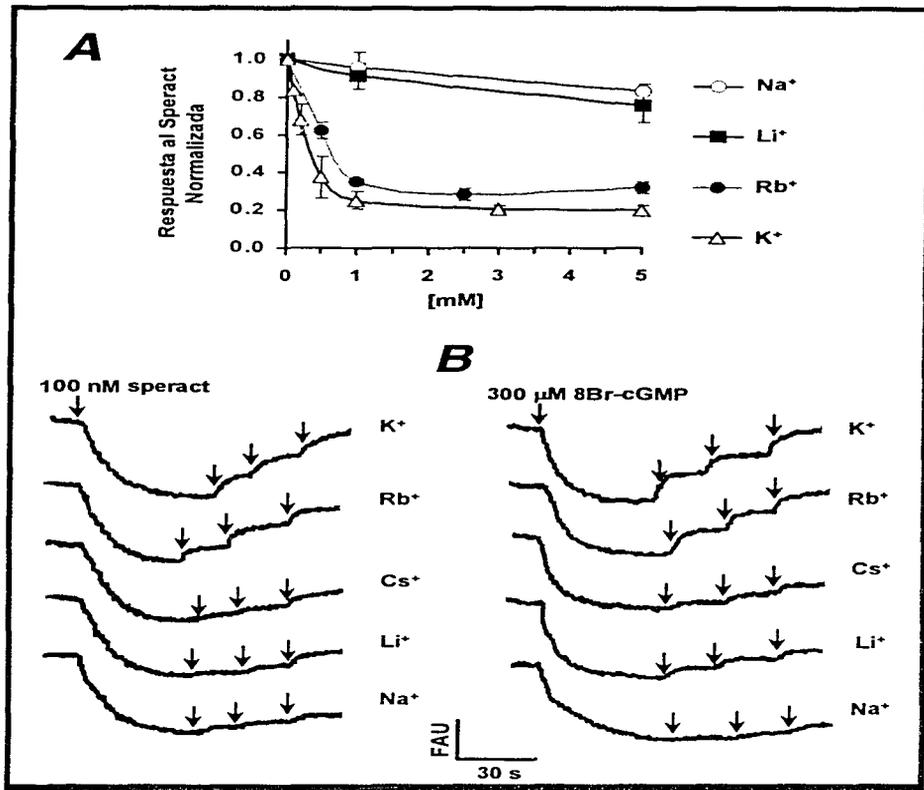


FIGURA. 17. La Selectividad Iónica de las Respuestas al Speract y al 8Br-GMPc en las Vesículas de Flagelo. (A) La inhibición de la respuesta al speract (100 nM) por diferentes iones monovalentes (K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Li⁺, Na⁺) en el medio externo. El ion se agrega antes del speract, en su forma de sal de Cl y a diferentes concentraciones como lo indica el eje x. El eje y representa la hiperpolarización normalizada. (B) Selectividad iónica de la hiperpolarización inducida por el speract (izquierda) y por el 8Br-GMPc (derecha). Cambios en el potencial de membrana inducidos por la adición (flechas) de 1.25, 2.5 y 5 mM de K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Li⁺ o Na⁺ después de agregar 100 nM de speract ó 300 μM de 8Br-GMPc en la ausencia de valinomicina. Los trazos son representativos de al menos 3 experimentos.

La secuencia de selectividad observada ($K^+ > Rb^+ > > Li^+ > Na^+$) confirma que la permeabilidad inducida por el speract es muy selectiva para K^+ . Puesto que en las membranas de flagelo la permeabilidad inducida por el speract permanece abierta por muchos segundos, la selectividad iónica se examinó también agregando 1.25, 2.5 y 5 mM de diferentes iones monovalentes después de exponer a las vesículas de flagelo a 100 nM speract (Fig. 17B, izq.). Se usó una concentración saturante del péptido para garantizar que la mayoría de los canales estuviesen abiertos. Así, se encontró una secuencia de selectividad similar a la que se describe arriba: $K^+ > Rb^+ > > Cs^+ > Li^+ > Na^+$. Resultados semejantes a éstos se obtuvieron en experimentos donde el 8Br-GMPc (300 μ M) se utilizó para inducir la hiperpolarización en las vesículas (Fig. 17B, der.). Estos resultados sugieren que el 8Br-GMPc y el speract abren la misma vía de permeabilidad selectiva para K^+ .

A diferencia de los canales CNG del fotorreceptor en vertebrado, que son catiónicos y cuya corriente de iones monovalentes se afecta fuertemente por el Ca^{2+} en el medio externo (Yau y Baylor, 1989; Zufall, *et al.*, 1994), los canales selectivos a K^+ sensibles a la luz y modulados por GMPc, de *Pecten irradians*, no muestran un bloqueo importante de la corriente en presencia de Ca^{2+} (Nasi y Gomez, 1999) a pesar de que comparten características importantes con los canales CNG. Para explorar el efecto de este catión en el canal responsable de la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas, se agregó el Ca^{2+} 1 min antes del speract (Fig. 18). La curva de la Figura 18 muestra que el Ca^{2+} externo tiene poco efecto sobre la respuesta al speract ya que a concentraciones tan altas como 30 mM en el medio externo inhiben sólo un 26% de la respuesta. Este resultado señala una característica más que comparten el canal de K^+ responsable de la respuesta al speract con los canales selectivos a K^+ directamente modulados por GMPc de los fotorreceptores de escalopa.

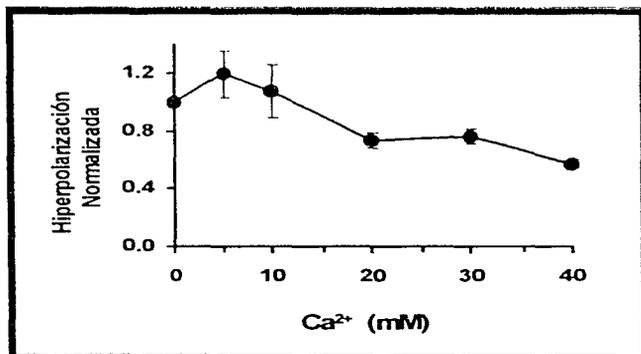


FIGURA 18. Efecto del Ca²⁺ Extracelular en la Respuesta al Speract en las Vesículas de Flagelo.

El eje y representa la respuesta al speract normalizada con respecto al control sin Ca²⁺. El Ca²⁺ se agregó 1 min antes del speract (100 nM). Se muestra el promedio +/- el error estándar de al menos 3 experimentos.

V.5 Moduladores de Canales de K⁺ y de Canales Modulados directamente por GMPc, en la Respuesta al Speract en las Vesículas de flagelo.

Las herramientas farmacológicas tienen un papel muy importante en el estudio de los canales iónicos, ayudando a diseccionar los componentes que participan en las diferentes vías de transducción de señales y al establecimiento de las categorías de los canales iónicos.

Tomando en cuenta que el speract abre una vía de permeabilidad selectiva para K⁺, se probó una batería de moduladores de canales de K⁺ y de canales modulados directamente por GMPc (ver la Tabla 1). De estos compuestos únicamente Ba²⁺ (IC₅₀ ~ 100 μM; Fig. 19A), que es un inhibidor de canales de K⁺ no selectivo, y 4-aminopiridina (4-AP) (IC₅₀ = 4.1 mM; Fig 19B) inhibieron eficazmente la respuesta al speract en las vesículas de flagelo. 4-AP es un inhibidor de canales de K⁺ que a concentraciones milimolares puede bloquear una variedad de canales de K⁺. A concentraciones menores bloquea a los canales selectivos para K⁺ y directamente modulados por GMPc (Gomez y Nasi, 1994, 1995). Además el 3' 4' diclorobenzamil (DCB) (Fig. 20), otro bloqueador de canales CNG (Nicol, *et al.*, 1987) y de canales modulados por GMPc selectivos para K⁺ (Gomez y Nasi, 1997), inhibió la respuesta al speract (IC₅₀ = 1 μM; Fig. 19C). Tanto la 4-AP como el DCB bloquearon la hiperpolarización inducida por el 8Br-GMPc con una potencia similar a la mostrada en la respuesta al speract, (Fig. 19D).

Modulador de canales de K ⁺	Concentración	% de Inhibición de la Respuesta al Speract
Agitoxina-2	100 nM	26 ± 7
4-AP	5 mM	64 ± 4
Apamina	1 μM	0 ± 3
Carybdotoxina	100 nM	0 ± 5
Ba ²⁺	1 mM	87 ± 5
DCB	5 μM	61 ± 10
α-Dendrotoxina	1 mM	2 ± 6
β-Dendrotoxina	100 nM	5 ± 12
γ-Dendrotoxina	100 nM	8 ± 3
δ-Dendrotoxina	100 nM	21 ± 3
Dendrotoxina-I	200 nM	5 ± 5
Glibenclamide	100 nM	0 ± 6
Iberiotoxina	25 nM	0 ± 6
Kaliotoxina	100 nM	25 ± 11
Margatoxina	40 nM	17 ± 2
Noxiustoxina	100 nM	13 ± 2
Penitrem A	100 nM	0 ± 14
Pinacidil	500 μM	0 ± 18
Paxillina	100 nM	12 ± 11
Sulfato de Quinina	10 mM	16 ± 4
Toxina Sticodactyla	1 μM	15 ± 9
TEA adentro	40 mM	12 ± 4
TEA afuera	30 mM	0 ± 3
Tityustoxina-Kα	50 nM	26 ± 2

Tabla 1. Efecto de los Moduladores de Canales de K⁺ en la Hiperpolarización Inducida por el Speract en las Vesículas de Flagelo. Todos los compuestos se utilizaron a concentraciones saturantes y se agregaron 1- 5 min antes de la adición de 25 nM de speract.

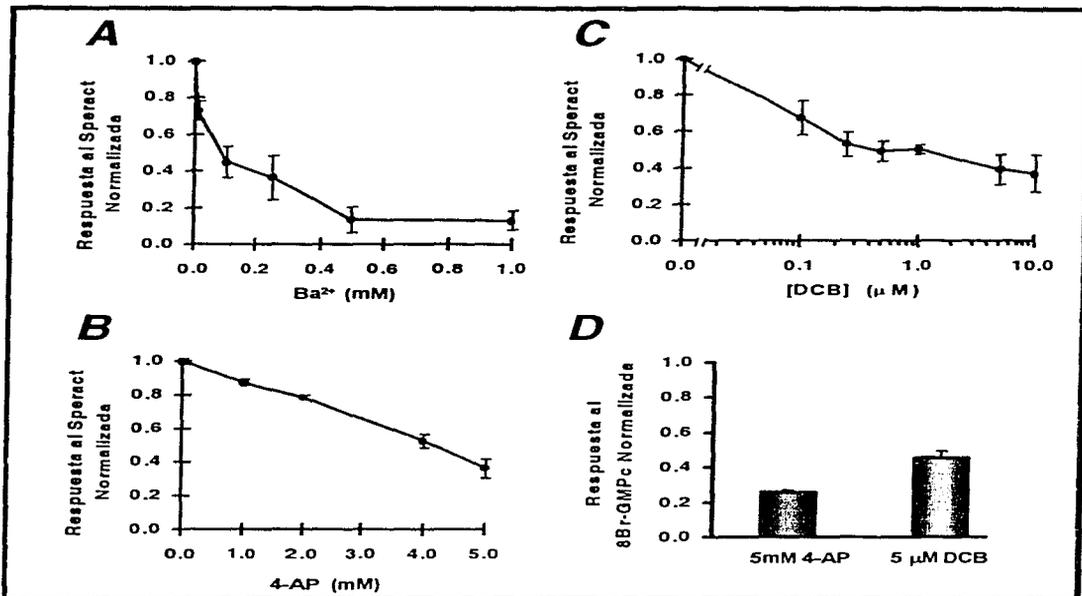


FIGURA 19. Inhibición de las Respuestas al Speract y al 8Br-GMPc por Inhibidores de Canales de K⁺ y 3,4, Diclórobencamil (DCB) en las Vesículas de Flagelo. El Ba²⁺ (A), la 4-AP (B) y el DCB (C) inhiben la respuesta al speract (hiperpolarización normalizada, eje y). La hiperpolarización se normalizó con respecto a la respuesta al speract sin inhibidores. Todos los antagonistas se agregaron 1 min antes del speract (25 nM). (D) La hiperpolarización inducida por el 8Br-GMPc también se inhibe con 4-AP (5 mM) y DCB (5 μM). Se muestra el promedio +/- el error estándar de al menos 4 experimentos.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que un canal selectivo para K⁺ y regulado por GMPc es responsable de la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo.

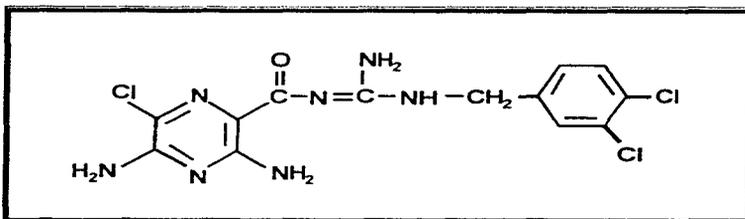


FIGURA 20. Fórmula lineal del 3', 4' Diclorobenzamil (DCB).

V.6 Ba^{2+} , 4-AP y DCB también Inhiben la Respuesta al Speract en el Espermatozoide Intacto.

La respuesta al speract en las vesículas de flagelo es diferente a la del espermatozoide completo, tanto en magnitud como en su cinética. Las mediciones de potencial de membrana con diS-C₂(5) en el espermatozoide de *S. purpuratus* indican que el speract induce una hiperpolarización transitoria de aproximadamente -7.5 mV y que llega a un máximo en ~ 4 s. El potencial de membrana entonces se depolariza ~ 15 mV por encima del valor del potencial de reposo (~-50 mV) (Beltrán, *et al.*, 1996; Labarca, *et al.*, 1997). En la depolarización podría contribuir un canal de K⁺ regulado por AMPc que deja pasar Na⁺ ya que es sólo 5 veces más selectivo para K⁺ que para Na⁺ (Labarca, *et al.*, 1996; Gauss, *et al.*, 1998).

Puesto que los experimentos con las vesículas de flagelo se hicieron sin Na⁺ externo, los espermatozoides se resuspendieron en agua de mar en la que este catión se sustituyó por colina (la concentración final de Na⁺ en el medio de ensayo fue de 6.0 mM). Bajo estas condiciones la hiperpolarización inducida por el speract es más grande (~ -15 mV) y más lenta (9 s) que en el agua de mar normal (Beltrán, *et al.*, 1996; Labarca, *et al.*, 1997) (Fig. 21A). La Figura 21B y 21C muestra que Ba^{2+} , 4-AP y DCB también inhibieron la respuesta al speract en el espermatozoide. Sin embargo, más de 50 mM de Ba^{2+} (no se muestra) únicamente inhibió un 50 % de la hiperpolarización, y el DCB parece unirse a más de un componente. Los IC₅₀s fueron 4.5 mM para el Ba^{2+} , 3.0 mM para la 4-AP, y 12 μM y ~50 μM para los componentes de alta y baja afinidad del DCB, respectivamente.

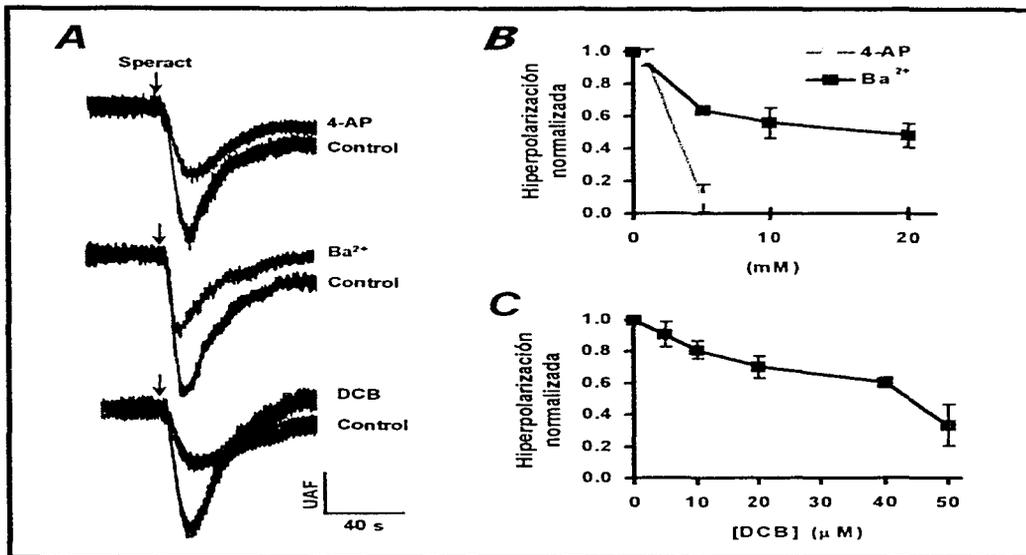


FIGURA 21. Ba²⁺, 4-AP y DCB Inhiben la Hiperpolarización Inducida por el Speract en el Espermatozoide Intacto. El potencial de membrana se midió con dis-C₃(5) en agua de mar artificial libre de Na⁺, pH 8.0 (ver Metodología). Los inhibidores de canales de K⁺ se agregaron 1 min. antes del speract (100 nM). En (A) se muestran trazos de potencial de membrana de la respuesta al speract en la presencia de 4-AP (3 mM), Ba²⁺ (10 mM) o DCB (20 μM), como se indica en el lado derecho. La parte (B) ilustra las curvas de inhibición de la respuesta al speract en presencia de varias concentraciones de Ba²⁺ o 4-AP. En la sección (C) se muestra la inhibición de la respuesta al speract por DCB. El eje y representa la hiperpolarización normalizada con respecto a la respuesta al speract (100 nM) sin inhibidores. Se muestra el promedio +/- el error estándar de al menos 4 experimentos.

Las distintas condiciones iónicas y la pérdida de componentes citoplásmicos y de la cabeza durante la preparación de las vesículas pueden ser la causa de las distintas selectividades a los bloqueadores en las vesículas y en el espermatozoide (Lee y Garbers, 1986). No obstante, es interesante mostrar que los bloqueadores que inhibieron la respuesta

inducida por el speract en las vesículas de flagelo, también inhibieron la respuesta en el espermatozoide intacto.

V.7 Inhibidores de Protein-Cinasas y Fosfatasa no Alteran la Hiperpolarización Inducida por el Speract en las Vesículas de Flagelo.

El canal selectivo para K^+ que abre el speract podría estar regulado directa o indirectamente por el GMPc, o bien por la CaM, mediante un evento de fosforilación. Esta posibilidad se exploró utilizando inhibidores de las protein-quinasas C, A, G, CaMKII y tirosin-quinasas. Estos compuestos no inhibieron de manera eficaz la respuesta al speract en las vesículas de flagelo, aun cuando se utilizaron a concentraciones altas (Fig. 22A). El H-7, es un inhibidor de protein-quinasas dependientes de nucleótidos ciclicos, inhibe a la protein-quinasa dependiente de AMPc (PKA), la protein-quinasa dependiente de GMPc (PKG) y a la protein-quinasa C (PKC), a concentraciones de $< 10 \mu\text{M}$ (Kawamoto y Hidaka, 1984). El H-8, es un inhibidor de protein-quinasas dependientes de nucleótidos ciclicos, es más específico que el H-7 para inhibir a este tipo de cinasas debido a que inhibe a la PKC a una concentración más alta que el H-7 (Hidaka, *et al.* 1984).

El Rp-8-pCPT-cGMPS es un inhibidor potente de la PKG (tipo α , β y II), permeable y resistente a la hidrólisis por fosfodiesterasas (Butt, *et al.*, 1994). El HA-1004, es un inhibidor potente de la PKG, PKA y la protein-quinasa II dependiente de CaM (CaMKII), siendo menos potente para inhibir a la PKC (Ishikawa, *et al.* 1985). El KN-62, inhibidor selectivo para la CaMKII. Se une directamente al sitio de unión de la CaM a la enzima (Tokumitsu, *et al.*, 1990). El HA 1004 es un inhibidor de la CaMKII, PKA, PKG y PKC.

La lavendustina A, es un inhibidor potente de tirosin-quinasas (a concentraciones nanomolar), permeable, con poco efecto sobre PKC y PKA (a concentraciones $> 200 \mu\text{M}$) (Onoda, *et al.*, 1990). La genisteína, un inhibidor de protein-tirosin-quinasas de amplio espectro (Akiyama, *et al.*, 1987), que también inhibe algunas cinasas al actuar como un inhibidor competitivo del ATP.

Debido a que no parece estar participando una cinasa, también se utilizaron algunos inhibidores de fosfatasa (Fig. 22B): el ácido okadaico, un potente inhibidor de las protein-fosfatasa 1 y 2A (Cohen, *et al.*, 1990); NaF, un inhibidor de fosfatasa inespecifico (Bollen y

Stalmans, 1988) y, Vanadato, un inhibidor de tirosin-fosfatasa (Gordon, 1991). Ninguno de estos compuestos afectó la respuesta inducida por el speract en las vesículas de flagelo (Fig. 22B).

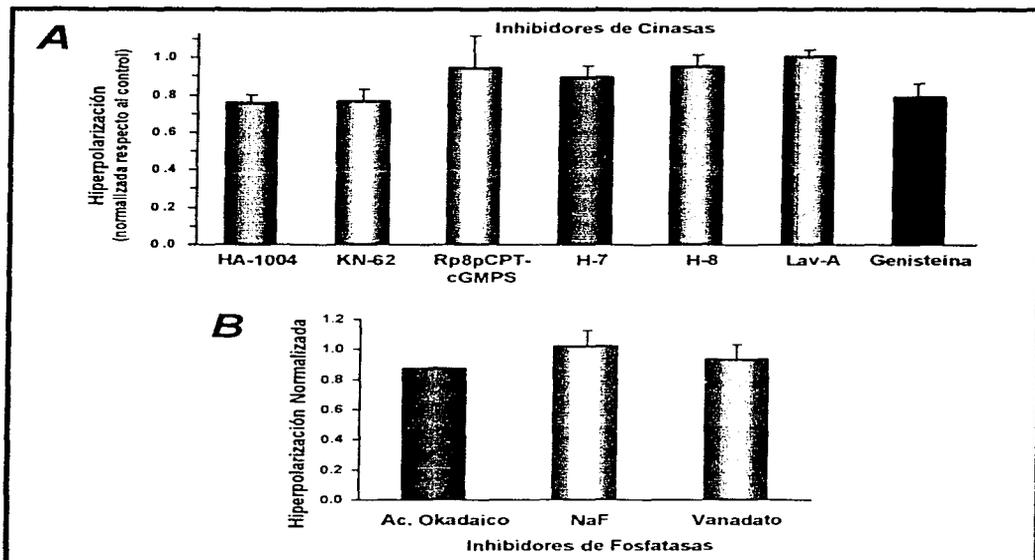


FIGURA 22. El efecto de los inhibidores de protein-quinasas (A) y fosfatasa (B) en la respuesta al speract de las vesículas de flagelo. Las barras representan la hiperpolarización normalizada inducida por 25 nM de speract en presencia de concentraciones saturantes de los inhibidores. (A) HA 1004 (60 μ M), KN-62 (4 μ M), Rp-8-pCPT-cGMPS (20 μ M), H-7 (40 μ M), H-8 (40 μ M), Lavendustina A (5 μ M) y Genisteina (10 μ M). (B) ácido okadaico (10 nM), NaF (20 mM, en el medio interno y externo) y vanadato (1 mM).

Estos resultados son inconsistentes con una vía indirecta que involucre cambios en el estado de fosforilación del canal, e indican que la modulación por GMPc del canal selectivo para K^+ activado por el speract puede ser directa.

VI DISCUSIÓN

Los péptidos que difunden desde la capa de gelatina que rodea al óvulo de erizo de mar tienen una influencia muy importante en la fisiología del espermatozoide. Uno de esos péptidos es el speract, estimula la salida de K^+ y el incremento en los niveles de los nucleótidos cíclicos, GMPc y AMPc, así como el aumento del $[Ca^{2+}]_i$, y el pH_i (Garbers, 1989; Darszon *et al.*, 1999).

La importancia de los canales selectivos para K^+ en la respuesta al speract se pone de manifiesto cuando se eleva la concentración de K^+ del agua de mar (30 – 50 mM de K^+ , la concentración de K^+ en el agua de mar normal es de 10 mM). Esto causa la inhibición de los cambios inducidos por el speract en el potencial de membrana (hiperpolarización), en el pH_i y en el $[Ca^{2+}]_i$, del espermatozoide (Darszon, *et al.*, 1999). Hay evidencias que correlacionan el incremento en los niveles de GMPc con la hiperpolarización dependiente de K^+ inducida por el speract en el espermatozoide de erizo de mar. Esto lleva a proponer que este decapeptido eleva la concentración del GMPc de manera transitoria, la cual a su vez activa un canal selectivo a K^+ responsable de la hiperpolarización del espermatozoide (Dangott y Garbers, 1984; Lee y Garbers, 1986; Lee, 1988; Garbers, 1989; Babcock, *et al.*, 1992; Yuen y Garbers, 1992; Cook y Babcock, 1993 a, b; Darszon, *et al.*, 1999). El speract activa un canal selectivo a K^+ en el espermatozoide hinchado (Babcock, *et al.*, 1992); sin embargo, no se ha demostrado que el blanco del GMPc sea un canal selectivo a K^+ .

Las vesículas de flagelo de espermatozoide de erizo de mar tienen receptores funcionales al speract, y representan un sistema simplificado apropiado para estudiar la respuesta al speract (Lee, 1988). El hecho de separar al espermatozoide en sus compartimentos de cabeza y flagelo, como se hace en este estudio al preparar las membranas de flagelo, da lugar a una mejor disección de los eventos asociados con la movilidad del espermatozoide de aquellos eventos asociados con la reacción acrosomal. Así, experimentos que tomen en cuenta este punto de vista, como en este trabajo, podrán aportar datos que nos lleven a distinguir si las propiedades de transporte iónico asociadas con la movilidad y la reacción acrosomal están específicamente asociadas a las regiones de la cola o de la cabeza, respectivamente.

La inclusión de GTP o GTP γ S en las vesículas de flagelo incrementa la hiperpolarización inducida por el speract (Lee, 1988). Basado en estos resultados, Lee (1988) sugirió que una

proteína G podría estar participando en la respuesta. Este autor propuso que el GTP está involucrado en el acoplamiento entre el receptor del speract y la hiperpolarización de la membrana, la cual pareciera estar mediada por la apertura de canales selectivos a K^+ . Sin embargo, al cargar las vesículas de flagelo con GDP β S (Lee, 1988), un inhibidor de proteínas G, o con activadores de proteínas G (aluminato, GMP-PNP o mastoparín) la respuesta al speract no se modifica de la manera esperada (Fig. 10). Estos resultados no apoyan el papel propuesto para las proteínas G en esta respuesta. Considerando que el GTP γ S, análogo del GTP, es también sustrato para la GC (Bentley, *et al.*, 1987; Sitaramayya, *et al.*, 1991; Brandwein, *et al.*, 1982), la explicación más aceptable es que este compuesto estimula la respuesta al speract al incrementar la disponibilidad del sustrato y aumentar la producción de GMPc. En contraste, el GMP-PNP, aunque también es análogo del GTP, no incrementa la respuesta al speract puesto que no es un buen sustrato de la GC (Sitaramayya, *et al.*, 1991). Además es posible medir la producción de GMPc inducida por el speract en estas vesículas (Fig. 14C), lo cual indica la existencia de sustrato para la GC.

Por otro lado, los hallazgos reportados en este trabajo muestran que la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas aumenta en presencia de IBMX, un inhibidor de FDEs que en el espermatozoide de erizo de mar ha mostrado ser más específico para las FDEs de GMPc (Cook y Babcock, 1993a), en tanto que la papaverina y el Ro-20-1724 que son inhibidores más específicos para las FDEs selectivas de AMPc (Lugnier, *et al.*, 1986; Cook y Babcock, 1993a) no afectaron la respuesta (Fig. 14A, 14B). Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en el espermatozoide hinchado (Cook y Babcock, 1993a) y en el espermatozoide de erizo de mar normal (Beltrán, *et al.*, 1996; Labarca, *et al.*, 1997). Lo anterior proporciona datos acerca de que es el GMPc y no el AMPc el nucleótido participante en la hiperpolarización inducida por el speract.

Con el propósito de apoyar esta hipótesis de que es el GMPc es el que media la hiperpolarización inducida por el speract (Garbers, 1989; Babcock, *et al.*, 1992; Cook y Babcock, 1993 a, b), se usaron análogos de AMPc y GMPc permeables a la membrana. El análogo del GMPc, el 8Br-GMPc (300 μ M), que es permeable a la membrana, activa canales CNG (Kaupp, 1995) y canales de K^+ directamente modulados por GMPc (Gomez y Nasi, 1995) hiperpolarizó las vesículas por sí mismo y disminuyó la subsecuente respuesta al speract (Fig. 15). Además,

el 8Br-GMPc, mas no otros nucleótidos como el 8Br-AMPC, el GMPc o el AMPc, estimula la movilidad del espermatozoide de *S. purpuratus* (Hansbrough, *et al*, 1980). Sin embargo, el diBu-GMPc, otro análogo permeable del GMPc que no activa a los canales CNG de los bastones de bovino (Koch y Kaupp, 1985), únicamente produjo una pequeña hiperpolarización a 300 μ M y depolarizó a una concentración de 1 mM. Además, como este análogo es capaz de activar a las protein-cinasas dependientes de GMPc (Cataidii, *et al.*, 1999) pero no de reproducir la respuesta al speract (Fig. 15), probablemente una cinasa de este tipo no tiene un papel importante en la respuesta al speract en las vesiculas. Finalmente, ni el 8Br-AMPC ni el diBu-AMPC produjeron una hiperpolarización en las vesiculas. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la hiperpolarización inducida por el speract es causada por un incremento en la concentración del GMPc (Lee y Garbers, 1986; Garbers, 1989; Babcock, *et al.*, 1992; Cook y Babcock, 1993 a, b).

También se encontró que la hiperpolarización inducida por el speract como por el 8Br-GMPc presentan la misma secuencia de selectividad iónica ($K^+ > Rb^+ > > Li^+ > Na^+$) y similar farmacología. Además, en el espermatozoide hinchado el 8Br-GMPc también produjo una respuesta semejante a la que induce 100 nM speract en estos espermatozoides (Fig. 16A). Estos resultados sugieren que el speract y el 8Br-GMPc abren la misma vía de permeabilidad en las vesiculas de flagelo, así como en espermatozoide de erizo de mar.

La farmacología de la respuesta al speract en estas vesiculas se determinó usando moduladores de canales de K^+ y bloqueadores de canales modulados por nucleótidos cíclicos. De la batería de moduladores de canales de K^+ dependientes de voltaje, sólo el Ba^{2+} y la 4-AP inhibieron la hiperpolarización inducida por el speract con $IC_{50\%}$ de 100 μ M y 4.1 mM, respectivamente. El DCB, un derivado de la amilorida y efectivo inhibidor de canales CNG (Nicol, *et al.*, 1987; Kolesnikov, *et al.*, 1990; Kolesnikov y Kosolapov, 1993) y de canales selectivos a K^+ directamente modulados por GMPc (Gomez y Nasi, 1997), también bloqueó la hiperpolarización inducida por el speract en las vesiculas de flagelo ($IC_{50} = 4 \mu$ M).

El canal de K^+ involucrado en la respuesta al speract se bloquea con 4-AP y DCB, al igual que los canales selectivos a K^+ directamente modulados por GMPc que participan en la respuesta a la luz en los fotorreceptores de los cilios de escalopa (Gottow, *et al.*, 1994; Gomez y Nasi, 1995) y de las neuronas fotosensibles extraoculares, del ganglio abdominal del molusco

Onchidium verunculatum (Gottow, *et al.*, 1994). Los fotorreceptores ciliares de la escalopa marina se hiperpolarizan cuando se exponen a la luz, debido a un incremento en la conductancia selectiva a K^+ (Gomez y Nasi, 1997). Estos canales se bloquean con 4-AP ($IC_{50} = 0.6 \mu M$) (Gomez y Nasi, 1994) y DCB ($IC_{50} = 5 \mu M$) (Gomez y Nasi, 1997). El hecho de que 4-AP sea mucho más potente para bloquear al canal de K^+ regulado por GMPc de los fotorreceptores de escalopa que al canal activado por el speract sugiere la existencia de diferencias entre estos canales de K^+ . Por otro lado, los dos canales comparten una sensibilidad muy parecida para el DCB, así como una sensibilidad pobre al bloqueo por Ca^{2+} externo, a diferencia de los canales CNG que son muy sensibles al bloqueo por Ca^{2+} externo, lo que indica que pudieran estar relacionados. Las observaciones hechas en las vesículas de flagelo son compatibles con la participación de un canal selectivo para K^+ modulado por GMPc en la hiperpolarización inducida por el speract.

El Ba^{2+} , la 4-AP y el DCB también inhibieron la hiperpolarización inducida por el speract en el espermatozoide intacto. Estos experimentos se llevaron a cabo resuspendiendo las células en agua de mar con baja concentración de Na^+ para imitar las condiciones de experimentación empleadas con las vesículas de flagelo. Sin embargo, se requirieron concentraciones más altas de Ba^{2+} para inhibir la respuesta al speract, y la máxima inhibición fue de 50 % (Fig. 21). En el caso del DCB pueden observarse dos sitios de unión con IC_{50} s de 12 y 50 μM . Las diferencias en las potencias y en el modo de acción de los inhibidores, así como las diferentes respuestas observadas en las vesículas y el espermatozoide completo pueden deberse en parte a la pérdida de los componentes citoplásmicos y de la cabeza durante la preparación de las vesículas (Lee, 1985), a las diferentes condiciones iónicas de experimentación, así como a la compartimentalización de las respuestas. Si asumimos que la respuesta al speract sólo se da en el flagelo, al tener el espermatozoide completo también estamos viendo el efecto que tienen los diferentes compuestos (inhibidores o nucleótidos permeables) sobre las respuestas propias de la cabeza.

Para determinar si el GMPc regula directamente el canal de K^+ abierto por el speract o indirectamente al cambiar su estado de fosforilación, se probaron varios inhibidores de cinasas y de fosfatasas. Los inhibidores de protein-cinasas C, A, G, CaMKII y tirosin-cinasas, y de protein-fosfatasas, no alteraron de manera significativa a la respuesta al speract cuando se usaron a

altas concentraciones (Fig. 22). Estos experimentos indican que el GMPc modula directamente al canal selectivo para K^+ y no es mediante algún cambio en el estado de fosforilación del canal. La demostración definitiva de esta posibilidad requeriría de registros de "patch clamp" en parches de membrana del espermatozoide hinchado, con el lado interno hacia afuera. De esta manera podríamos añadir el GMPc al lado interno del canal y no tendríamos participación de los componentes del citoplasma. Si hay un efecto positivo entonces la modulación del GMPc es directa porque no hay proteínas del citoplasma que puedan participar como intermediarias.

Este trabajo sugiere la participación de un canal selectivo a K^+ directamente activado por GMPc en la hiperpolarización inducida por el speract en el espermatozoide de erizo de mar. En la fisiología del espermatozoide participan varios canales modulados por nucleótidos cíclicos (Gauss, *et al.*, 1998; Darszon, *et al.*, 1999). Un canal que es muy poco selectivo para K^+ ($PK^+/PNa^+ = 5$) y es directamente modulado por AMPc (Labarca, *et al.*, 1996) se estudió mediante el método de incorporación directa de canales desde membranas de flagelo a bicapas lipídicas planas. Recientemente Gauss y colaboradores (1998), clonaron y expresaron funcionalmente un canal del órgano reproductor de erizo de mar macho con propiedades similares, llamado SPIH. Este canal es aproximadamente 4 veces más permeable para K^+ que para Na^+ , se inmunodetectó en el flagelo del espermatozoide (Gauss, *et al.*, 1998) y bien podría participar en la fase repolarizante de la respuesta al speract, dejando pasar Na^+ , ya que el agua de mar contiene gran cantidad de este ion (Labarca, *et al.*, 1996; Darszon, *et al.*, 1999). Debido a que este canal se activa tanto por potenciales hiperpolarizantes (H) como por la unión de nucleótidos cíclicos (CN), es un miembro de la familia de canales denominados canales HCN (Clapham, 1998). Los canales de esta nueva familia son muy importantes en la conformación del ritmo autónomo de las neuronas y de la periodicidad de las oscilaciones en el trabajo neuronal de conjunto (Seifert, *et al.*, 1999).

El canal selectivo a K^+ involucrado en la respuesta al speract bien puede pertenecer a la familia de canales selectivos a K^+ , que son modulados directamente por GMPc. Desafortunadamente, no se han clonado los canales selectivos para K^+ directamente modulados por GMPc. Se ha propuesto que canales de este tipo, como los canales dependientes de luz de los fotorreceptores ciliares de invertebrado (Gomez y Nasi, 1997), podrían representar un puente entre los canales CNG (que son dependientes de nucleótidos cíclicos pero no de voltaje) y los

canales de K^+ dependientes de voltaje, lo que da un apoyo en el sentido funcional a la noción que se tiene acerca de un origen evolutivo común para las dos superfamilias (Kaupp, 1991; Guy, *et al.*, 1991; Yau, 1994).

Por otro lado, la CaM modula directamente a los canales CNG del fotorreceptor en los bastones del sistema visual y al canal CNG del receptor olfatorio. En estos canales, la CaM disminuye la afinidad del canal por el nucleótido cíclico, como consecuencia reduce la probabilidad de apertura del canal (Hsu y Molday, 1993; Liu, *et al.*, 1994). En contraste, los inhibidores de CaM probados aquí bloquean la hiperpolarización inducida por el speract en las vesículas de flagelo. Es decir, que si CaM participara de la misma manera como lo hace con los canales CNG, el inhibir a CaM no disminuiría la hiperpolarización, pero no ocurre de esta manera. Estos resultados pueden ser indicio de que el blanco de la CaM no es el canal de K^+ , sino otra de las proteínas que participan en la vía de transducción de la señal inducida por el speract. Por otro lado, al disminuir el Ca^{2+} con BAPTA la inhibición de la hiperpolarización fue relativamente pequeña si consideramos que se esperaría una fuerte inhibición de la respuesta si ésta fuera estrictamente dependiente de Ca^{2+} . Además, los experimentos en presencia de EGTA no afectaron la hiperpolarización. Es posible que CaM pudiera estar actuando en una forma independiente de Ca^{2+} , como lo hace la ApoCaM cuando se asocia y regula al receptor de IP₃, inhibiendo al canal en una forma independiente de la concentración de Ca^{2+} (Patel, *et al.*, 1997).

La CaM induce la activación de muchas enzimas, incluyendo protein-cinasas, fosfatasa y fosfodiesterasas (Cheung, 1980). Aunque en este caso la modulación por un evento de fosforilación se descartó cuando se usaron inhibidores de protein-cinasas dependientes de CaM y de fosfatasa y la respuesta al speract no se alteró, no estamos descartando la posibilidad de que CaM esté actuando sobre otro tipo enzima blanco la cual a su vez pueda modular al canal. Por otro lado es posible que los antagonistas de CaM pudiesen estar actuando directamente sobre el canal, puesto que hay algunas evidencias acerca de que los inhibidores de CaM, TFP y W-7, actúan directamente sobre canales iónicos, incluidos los canales CNG, más que a través de CaM (Klenne, 1994; Kihira, *et al.*, 1990; Ehrlich, *et al.*, 1988; Greenberg, *et al.*, 1987; Klockner y Isenberg, 1987; McCann y Welsh, 1987).

Por todo lo antes expuesto, resulta interesante estudiar a qué familia de canales de K^+ pertenece el canal selectivo para K^+ y regulado por GMPc del espermatozoide de erizo de mar, así como conocer si se encuentra modulado por CaM.

VII CONCLUSIONES

- A) Los resultados aquí presentados aportan nueva evidencia de que la conexión entre la activación del receptor del speract y la hiperpolarización no ocurre mediante proteínas G o por algún cambio en el estado de fosforilación.
- B) El aumento de GMPc inducido por el speract tiene acción directa sobre un canal selectivo para K⁺ responsable de la hiperpolarización, cuya secuencia de selectividad es: K⁺ > Rb⁺ >> Cs⁺, Li⁺, Na⁺.
- C) El canal selectivo para K⁺ en las vesículas de flagelo y en el espermatozoide intacto se bloquea por 4-AP y DCB, inhibidores de canales selectivos para K⁺ modulados directamente por GMPc. Estas observaciones indican que el canal responsable de la hiperpolarización en la respuesta al speract bien podría formar parte de una familia de este tipo.
- D) La CaM puede tener un papel importante en la transducción de señales inducida por el speract, puesto que antagonistas de ésta inhiben la respuesta al speract.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII PERSPECTIVAS

La generación de un nuevo individuo en especies de reproducción sexual depende del intercambio de información entre el óvulo y el espermatozoide, por lo tanto es muy importante entender los mecanismos moleculares que determinan la fecundación.

En el intercambio de señales entre el espermatozoide y el óvulo, los canales iónicos son un elemento clave. Con este trabajo se obtuvo información de la manera en que está modulado el canal de K^+ que participa en la respuesta al speract. Esta información ayudará a discernir los mecanismos moleculares que regulan los diferentes procesos necesarios para la fecundación en el erizo de mar.

Hasta ahora podemos hablar de la existencia de un canal de K^+ directamente modulado por GMPc que participa en la respuesta al speract y que comparte características con algunos tipos de canales regulados por nucleótidos cíclicos. Queda discernir a qué familia de canales pertenece y corroborar la modulación directa del GMPc sobre el canal en experimentos de "patch clamp", en el espermatozoide hinchado.

Es necesario conocer si la CaM está participando en la vía de transducción de señales inducida por el speract, o si la modulación del canal responsable de la hiperpolarización corresponde a una interacción directa de los inhibidores de CaM sobre el canal de K^+ . Para esto se pueden hacer experimentos con vesículas cargadas con CaM comparando el efecto que tienen los inhibidores en la respuesta de estas vesículas. Si CaM disminuye el efecto de los antagonistas, es probable si tenga una participación en la respuesta al speract.

Si es CaM la proteína que participa, es necesario estudiar a cual proteína está modulando (puede ser a la GC, al canal de K^+) y si esta modulación ocurre directamente sobre esa proteína o se requiere de una proteína intermediaria.

En el hombre la causa primordial de problemas de fecundación radica en alteraciones funcionales del espermatozoide. La disección de los mecanismos moleculares de transducción en los gametos del erizo de mar, seguramente continuará ayudando a comprender lo que sucede en el humano; además de contribuir al conocimiento sobre el intercambio de señales entre las células, uno de los problemas centrales de la biología moderna.

IX REFERENCIAS

- Ahmad, K., Bracho, G. E., Wolf, D. P., Tash, J. S. (1995). Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch. Androl.* **35**, 187-208.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Hulme, M. J., and Henderson, C. J. (1988). Analysis of calmodulin acceptor proteins and the influence of calmodulin antagonists on human spermatozoa. *Gamete Res.* **21**, 93-111.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595.
- Babcock, D. F., Bosma, M. M., Battaglia, D. E., and Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K^+ channels by the egg peptide speract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6001-6005.
- Beltran, C., Zapata, O., and Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry.* **35**, 7591-7598.
- Bentley, J. K., Tubb, D. J., Garbers, D. L. (1986) Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **261**, 14859-14862.
- Bentley, J. K., Khatra, A. S., and Garbers, D. L. (1987). Receptor-mediated phosphorylation of spermatozoan proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 15708-15713.
- Bentley, J. K., Khatra, A. S., and Garbers, D. L. (1988). Receptor-mediated activation of detergent-solubilized guanylate cyclase. *Biol. Reprod.* **39**, 639-647.
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 3505-3509.
- Biel, M., Zong, X., and Hofmann, F. (1995). Molecular diversity of cyclic nucleotide-gated cation channels. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **353**, 1-10.
- Bollen, M., and Stalmans, W. (1988). Fluorine compounds inhibit the conversion of active type-1 protein phosphatases into the ATPMg-dependent form. *Biochem. J.* **255**, 327-233.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**, 248-254.
- Brandwein, H. J., Lewicki, J. A., Waldman, S. A., and Murad, F. (1982). Effect of GTP analogues on purified soluble guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**, 1309-1311.
- Bruggemann, A., Pardo, L. A., Stuhmer, W. and Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K^+ and Ca^{2+} and modulated by cAMP. *Nature (London)* **365**, 445-448.

- Butt, E., Eigenthaler, M., and Genieser, H. G. (1994). (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **269**, 265-268.
- Cataldi, M., Secondo, A., D'Alessio, A., Samacchiaro, F., Colao, A. M., Amoroso, S., Di Renzo, G. F., and Annunziato, L. (1999). Involvement of phosphodiesterase-cGMP-PKG pathway in intracellular Ca²⁺ oscillations in pituitary GH3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1449**, 186-193.
- Cardullo, R. A., Herrick, S. B., Peterson, M. J., and Dangott, L. J. (1994). Sperm receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Dev. Biol.* **162**, 600-607.
- Clapham, D. E. (1998). Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* **21**, 5-7.
- Cheung, W. Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*. **207**, 19-27.
- Cohen, P., Holmes, C. F., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98-102.
- 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.
- Cook, S. P., and Babcock, D. F. (1993a). Selective modulation by cGMP of the K⁺ channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* **268**, 22402-22407.
- Cook S. P., and Babcock D. F (1993b). Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* **268**, 22408-22413.
- Cragoe, E. J. Jr., Woltersdorf, O. W., Bicking, J. B., Kwong, S. F., and Jones, J. H. (1967). Pyrazine diuretics. II. N-amidino-3-amino-5-substituted-6-halopirazinecarboamides. *J. Medical Chem.* **10**, 66-75.
- Dangott, L. J., and Garbers, D. L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* **259**, 13712-13716.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* **79**, 481-510.
- Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* **33**, 1275-1282.
- Ehrlich, B. E., Jacobson, A. R., Hinrichsen, R., Sayre, L. M., and Forte, M. A. (1988). Paramecium calcium channels are blocked by a family of calmodulin antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5718-5722.
- Feinberg, J., Weinman, J., Weinman, S., Walsh, M. P., Harricane, M. C., Gabrion, J., and Demaille, J. G. (1981). Immunocytochemical and biochemical evidence for the presence of calmodulin in bull sperm flagellum. Isolation and characterization of sperm calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta* **673**, 303-311.

- Feng, L., Subbaraya, I., Yamamoto, N., Baehr, W., and Kraus-Friedmann, N. (1996). Expression of photoreceptor cyclic nucleotide-gated cation channel alpha subunit (CNGCalpha) in the liver and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **395**, 77-81.
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. and Lyubarsky, Aa. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment). *Nature.* **313**, 310-313.
- Finn, J. T., Grunwald, M. E., and Yau, K. W. (1996). Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 395-426.
- Ganetzky, B., Warmke, J. W., Robertson, G., and Pallanck, L. (1995). New potassium channel gene families in flies and mammals: from mutants to molecules. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **50**, 29-39.
- Garbers, D. L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 719-742.
- Garbers, D. L., and Kopf, G. S. (1980) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **13**, 251-306.
- Garbers, D. L., and Gray, J. P. (1974). Guanylate cyclase from sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Methods Enzymol.* **38**, 196-199.
- Gauss, R., Seifert, R. and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Gerendasy, D. D., Herron, S. R., Jennings, P. A., Sutcliffe, J. G. (1995). Calmodulin stabilizes an amphiphilic alpha-helix within RC3/neurogranin and GAP-43/neuromodulin only when Ca^{2+} is absent. *J. Biol. Chem.* **270**, 6741-6750.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.
- Gomez, M. P., and Nasi, E. (1994a). The light sensitive conductance of hyperpolarizing invertebrate photoreceptors: a patch-clamp study. *J. Gen. Physiol.* **103**, 939-956.
- Gomez, M. P., and Nasi, E. (1994b). Blockage of the light-sensitive conductance in hyperpolarizing photoreceptors of the scallop. Effects of tetraethylammonium and 4-aminopyridine. *J. Gen. Physiol.* **104**, 487-505.
- Gomez, M. P., and Nasi, E. (1995). Activation of light-dependent K^+ channels in ciliary invertebrate photoreceptors involves cGMP but not the IP_3/Ca^{2+} cascade. *Neuron.* **15**, 607-618.
- Gomez, M. P., and Nasi, E. (1997). Antagonists of the cGMP-gated conductance of vertebrate rods block the photocurrent in scallop ciliary photoreceptors. *J Physiol (Lond)* **15**, 367-378.
- González-Martínez, M., and Darszon, A. (1987). A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* **218**, 247-250.
- Gordon, J. A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods. Enzymol.* **201**, 477-482.

- Gottow, T., Nishi, T., and Kijima, H. (1994). Single K⁺ channels closed by light and opened by cyclic GMP in molluscan extraocular photoreceptor cells. *Brain Res.* **662**, 268-272.
- Gray, J. P., and Drummond, G. I. (1976) Guanylate cyclase of sea urchin sperm: subcellular localization. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 31-38.
- Greenberg, D. A.; Carpenter, C. L. and Messing, R. O. (1987) Interaction of calmodulin inhibitors and protein kinase C inhibitors with voltage-dependent calcium channels. *Brain Res.* **404**, 401-404.
- Guy, H. R., Durell, S. R., Warmke, J., Drysdale, R., Ganetzky, B. (1991). Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**, 730.
- Haiech, J., Klee, C. B., Demaille, J. G. (1981). Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. *Biochemistry* **20**, 3890-3897.
- Hansbrough, J. R, Kopf, G S., Garbers, D. L. (1980). The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **630** 82-91
- Hansbrough, J. R., and Garbers, D. L. (1981a). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **256**, 1447-1452.
- Hansbrough, J. R. and Garbers, D. L. (1981b). Sodium dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. *J. Biol. Chem.* **256**, 2235-2241.
- Hepler, J. R., and Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 383-387.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., Ross, E. M. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* **263**, 6491-6494.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., and Sasaki, Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry.* **23**, 5036-5041.
- Hsu, Y. T., and Molday, R. S. (1993) Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. *Nature.* **361**, 76-79.
- Iwasa, F., Hasegawa, Y., Ishijima, S., Okuno, M., Mohri, T., and Mohri, H. (1987). Effects of calmodulin antagonists on motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Zool. Sci.* **4**, 61-72.
- Ishikawa, T., Inagaki, M., Watanabe, M., and Hidaka, H. (1985). Relaxation of vascular smooth muscle by HA-1004, an inhibitor of cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **235**, 495-299.
- Jurado, L. A., Chockalingam, P. S., and Jarrett, H. W. (1999). Apocalmodulin. *Physiol. Rev.* **79**, 661-682.

- Onoda, T., Isshiki, K., Takeuchi, T., Tatsuta, K., and Umezawa, K. (1990). Inhibition of tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor internalization by lavendustin A methyl ester in cultured A431 cells. *Drugs Exp. Clin. Res.* **16**, 249-253.
- James, P., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1995). Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted?. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 38-42.
- Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature*. **345**, 672.
- Jones, H. P., Lenz, R. W., Palevitz, B. A., and Cormier, M. J. (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **77**, 2772-2776.
- Jones, H. P., Bradford, M. M., McRorie, R. A., and Cormier, M. J. (1978). High levels of a calcium-dependent modulator protein in spermatozoa and its similarity to brain modulator protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **82**, 1264-1272.
- Kaupp, U. B. (1991). The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci.* **14**, 150-157.
- Kaupp, U. B. (1995). Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N. J., Kangama, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T., and Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature (London)* **342**, 762-766.
- Kawamoto, S., and Hidaka, H. (1984). 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 258-264.
- Kihira, M., Matzusawa, K., Tokuno, H. and Tomita, T. (1990) Effects of calmodulin antagonists on calcium- activated potassium channels in pregnant rat myometrium. *Br. J. Pharmacol.* **100**, 353-359.
- Kleene, S. J. (1994) Inhibition of olfactory cyclic nucleotide-activated current by calmodulin antagonists. *J. Pharmacol.* **111**, 469-472.
- Klockner, U., and Isenberg, G. (1987). Calmodulin antagonists depress calcium and potassium currents in ventricular and vascular myocytes. *Am. J. Physiol.* **253**, H1601-1611..
- Koch, K. W., and Kaupp, U. B. (1985). Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**, 6788-6800.
- Kolesnikov, S. S., Zhainazarov, A. B., and Kosolapov, A. V. (1990). Cyclic nucleotide-activated channels in the frog olfactory receptor plasma membrane. *FEBS Lett.* **266**, 96-98.
- Kolesnikov, S. S., Kosolapov, A. V. (1993). Cyclic nucleotide-activated channels in carp olfactory receptor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1150**, 63-72.
- Kuno, T., Andresen, J. W., Kamisaki, Y., Waldman, S. A., Chang, L. Y., Saheki, S., Leitman, D. C., Nakane, M., and Murad, F. (1986). Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor

and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* **261**, 5817-5823.

- Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Beltrán, C., Liévano, A., Sandoval, Y. and Darszon, A. (1997). *From ion channels to cell-to-cell conversations*, R. Latorre, ed., Plenum Publishing Corporation. New York, N.Y.
- Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A., and Darszon, A. (1996). A cAMP regulated K⁺-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev. Biol.* **174**, 271-280.
- Laris, P. C., Pershadsingh, H. A., and Johnstone, R. M. (1976). Monitoring membrane potentials in Ehrlich ascites tumor cells by means of a fluorescent dye. *Biochim. Biophys. Acta* **436**,475-488.
- Latorre, R., Bacigalupo, R., Delgado, R. and Labarca, P. (1991). Four cases of direct ion channel gating by cyclic nucleotides. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 577-597.
- Lee, H. C. (1984). Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **259**, 4957-4963.
- Lee, H. C. (1985). The voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *J. Biol. Chem.* **260**, 10794-10799.
- Lee, H. C. (1988). Internal GTP stimulates the speract receptor mediated voltage changes in sea urchin spermatozoa membrane vesicles. *Dev. Biol.* **126**, 91-97.
- 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.
- Levitan, I. B. (1999). It is calmodulin after all! mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron.* **22**, 645-648.
- Liu, M., Chen, T. Y., Ahamed, B., Li, J., and Yau, K. W. (1994) Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science.* **266**,1348-1354.
- Lugnier, C., Schoeffter, P., Le Bec, A., Strouthou, E., and Stoclet, J. C. (1986). Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1743-1751.
- Means, A. R., VanBerkum, M. F., Bagchi, I., Lu, K. P., and Rasmussen, C. D. (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol. Ther.* **50**, 255-270.
- McCann, J. D., and Welsh, M. J. (1987) Neuroleptics antagonize a calcium-activated potassium channel in airway smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* **89**,339-352.
- McReynolds, J. S. (1976). Hyperpolarizing photoreceptors in invertebrates. In *Neural Principles of Vision*, ed. F. Zettler, R. Weiler, pp. 394-409. Berlin: Springer-Verlag.

- Nasi, E., and Gomez, M. P. (1999). Divalent cation interactions with light-dependent K channels. Kinetics of voltage-dependent block and requirement for an open pore. *J. Gen. Physiol.* **114**, 653-672.
- Nicol, G. D., Shnetkamp, P. P., Saimi, Y., Cragoe, E. J., and Bownds, M. D. (1987). A derivative of amiloride blocks both the light-regulated and cyclic GMP-regulated conductances in rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **90**, 651-669.
- Patel, S., Morris, S. A., Adkins, C. E., O'Beirne, G., and Taylor, C. W. (1997) Ca²⁺-independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca²⁺ mobilization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **94**, 11627-32
- Paul, A. K., Marala, R. B., Jaiswal, R. K., and Sharma, R. K. (1987). Coexistence of guanylate cyclase and atrial natriuretic factor receptor in a 180-kD protein. *Science* **235**, 1224-1226.
- Repaske, D. R. and Garbers, D. L. (1983). A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa. *J. Biol Chem.* **258**, 6025-6029.
- Reynaud, E., de Delatorre, L., Zapata, O., Liévano, A., and Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Lett.* **329**, 210-214.
- Rink, T. J., Montecucco, C., Hesketh, T. R., and Tsien, R. Y. (1980). Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* **595**, 15-30.
- Rhoads, A. R. and Friedberg, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* **11**:331-340.
- Sano, M. (1976) Subcellular localizations of guanylate cyclase and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in sea urchin sperm. *Biochim. Biophys. Acta* **428**, 525-531.
- SeGall, G. K., and Lennarz, W. J. (1981). Jelly coat and induction of the acrosome reaction in echinoid sperm. *Dev. Biol.* **86**, 87-93.
- SeGall, G. K., and Lennarz, W. J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev. Biol.* **71**, 33-48.
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., and Kaupp, U. B. (1999). Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 9391-9396.
- Sitaramayya, A., Marala, R. B., Hakki, S., and Sharma, R. (1991). Interactions of nucleotide analogues with rod outer segment guanylate cyclase. *Biochemistry.* **30**, 6742-6747.
- Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1994). GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature.* **372**, 276-279.
- Suzuki, N., and Yoshino, K. (1992). The relationship between amino acid sequences of sperm-activating peptides and the taxonomy of echinoids. *Comp. Biochem. Physiol. [B]* **102**, 679-

- Suzuki, N., Garbers, D. L. (1984). Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biol. Reprod.* **30**, 1167-1174.
- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H., and Isaka, S. (1981). Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1238-1244.
- Takayanagi, R., Inagami, T., Snajdar, R. M., Imada, T., Tamura, M., Misono, K. S. (1987). Two distinct forms of receptors for atrial natriuretic factor in bovine adrenocortical cells. Purification, ligand binding, and peptide mapping. *J. Biol. Chem.* **262**, 12104-12113.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., and Means, A. R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J. Cell. Biol.* **106**, 1625-1633.
- Terada, H. (1981). The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 225-242.
- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M., and Hidaka, H. (1990). KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* **265**, 4315-4320.
- Tsien, R. Y., and Hladky, S. B. (1978). A quantitative resolution of the spectra of a membrane potential indicator, diS-C3-(5), bound to cell components and to red blood cells. *J. Membr. Biol.* **38**, 73-97.
- Urbauer, J. L., Short, J. H., Dow, L. K., and Wand, A. J. (1995). Structural analysis of a novel interaction by calmodulin: high-affinity binding of a peptide in the absence of calcium. *Biochemistry* **34**, 8099-8109.
- Vacquier, V. D., and Moy, G. W. (1997). The fucose sulfate polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **192**, 125-135.
- Vogel, H. J. (1994). Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. Cell Biol.* **72**, 357-376.
- Waldman, S. A., Rapoport, R. M., and Murad, F. (1984). Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.* **259**, 14332-14334.
- Ward, G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L., and Vacquier, V. D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* **101**, 2324-2329.
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Muller, F., Altenhofen, W., Hatt, H., and Kaupp U. B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.

- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B., and Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J. Cell. Biol.* **142**, 473-484.
- Winquist, R. J., Faison, E. P., Waldman, S. A., Schwartz, K., Murad, F., and Rapoport, R. M. (1984) Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 7661-7664.
- Yamaki, T., and Hidaka, H. (1980). Ca^{2+} -independent stimulation of cyclic GMP-dependent protein kinase by calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 727-733.
- Yau, K. W., and Baylor, D. A. (1989) Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 289-327.
- Yau, K. W. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3481-3483.
- Yuen, P. S., and Garbers, D. L. (1992). Guanylyl cyclase-linked receptors *Annu. Rev. Neurosci.* **15**, 193-225.
- Zagotta, W. N. (1996) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 235-263.
- Zeng, Y, Clark, E. N., and Florman, H. M. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* **171**, 554-563.
- Zufall, F., Firestein, S., Shepherd, G. M. (1994). Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 577-607.

IX APENDICE

Publicación en *Developmental Biology* .



Participation of a K⁺ Channel Modulated Directly by cGMP in the Speract-Induced Signaling Cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* Sea Urchin Sperm

Blanca Estela Galindo, Carmen Beltrán, Edward J. Cragoe Jr.,* and Alberto Darszon¹

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico and *P.O. Box 631548, Nacodoches, Texas, USA

Speract, a decapeptide from *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin eggs, transiently stimulates a membrane guanylyl cyclase and activates a K⁺ selective channel that hyperpolarizes sperm. However, previous studies of sperm and of sperm membrane vesicles reached conflicting conclusions about the mechanisms that open these channels. We find that speract hyperpolarizes and increases the cGMP content of flagellar vesicles. We confirm previous findings that intravesicular GTPγS and GTP enhance this hyperpolarization, but not GDPβS. The G protein activators AIF₁ and mastoparan also are ineffective. Thus, it is unlikely that a G protein participates in the speract response. In contrast, hyperpolarization responses to speract are increased by 3-isobutyl-1-methylxanthine, which preferentially inhibits cGMP-selective phosphodiesterases of sperm, and the 8Br-cGMP derivative hyperpolarizes vesicles in the absence of speract. The responses to speract and to 8Br-cGMP have similar ionic selectivities (K⁺ > Rb⁺ > Li⁺ > Na⁺) and sensitivities to the channel blockers 4-aminopyridine and 3,4-dichlorobenzamil, indicating that they likely result from opening of the same K⁺ channel. Inhibitors that preferentially inhibit cAMP-selective phosphodiesterases do not alter responses to speract, and permeant cAMP analogs do not hyperpolarize vesicles. In addition, inhibitors of protein kinases and phosphatases fail to alter vesicle hyperpolarization by speract. The increase in vesicular cGMP content produced by speract therefore may directly mediate opening of the channel that hyperpolarizes sperm membrane vesicles. Similar mechanisms presumably operate in intact sperm. © 2000 Academic Press

Key Words: sea urchin sperm; ion channel; CNG channel; speract.

INTRODUCTION

Sea urchin egg jelly contains small peptides which prepare and guide sperm in their journey toward the female gamete (Garbers, 1989). These include speract, a decapeptide (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) isolated from the egg jelly of *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki *et al.*, 1981) and *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough and Garbers, 1981). Cross-linking experiments indicated that speract binds to a 77-kDa protein closely coupled to sperm guanylyl cyclase (GC) and transiently activates this enzyme (Garbers, 1989; Yuen and Garbers, 1992). Speract increases

the cGMP² and cAMP levels and produces a K⁺-dependent transient hyperpolarization in *S. purpuratus* sperm (Garbers, 1989) and flagellar plasma membranes

²Abbreviations used: 4-AP, 4-aminopyridine; 8Br-cGMP, 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate, CaMKK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; cGMP, cyclic guanosine monophosphate, CNG, cyclic nucleotide gated, dibu-cGMP, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, N²,2'-O-dibutyl; DCB, 3',4'-dichlorobenzamil; diS-C₂(5), 3,3'-dipropylthiodicarbonyl iodine; diS-Ba-C₂(3), bis(1,3 diethylthiobarbiturate) trimethineoxonol; DMSO, dimethyl sulfoxide, GDPβS, guanosine 5'-O-(2-thiophosphate); GTPγS, guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate); H-7, 1,5-isoquinolinesulfonamide 4,2-methylpiperazine, H-8, N²-(methylaminoethyl)-5-isoquinoline sulfonamide; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; Rp-8-*p*CPT-cGMPs, guanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate.

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: (52-73) 172388. E-mail: darszon@ibt.unam.mx.

(Lee, 1988). This hyperpolarization stimulates Na^+/H^+ exchange (Lee and Garbers, 1986) that in turn increases intracellular pH (pHi). Speract also activates other ion transport systems which transiently increase intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and depolarize sperm (Darszon et al., 1999).

Though it has been shown that speract increases the cGMP concentration, opens K^+ channels, and hyperpolarizes swollen sperm (Babcock et al., 1992; Cook and Babcock, 1993a), it is not known if these channels are directly modulated by cGMP (Darszon et al., 1999). The speract receptor is found in the sperm flagellar plasma membrane (Dangott and Garbers, 1984; Garbers, 1989). Sperm flagella can be osmotically shocked to isolate membrane vesicles whose intravesicular medium becomes accessible to membrane-impermeable compounds and ions during the process. When subjected to an outward K^+ gradient, these flagellar vesicles undergo a speract-induced membrane potential hyperpolarization which can be measured with fluorescent dyes such as dipropylrhodoliumcarboxyanine ($\text{DiS-C}_2(5)$) (Lee, 1988). These vesicles are a simplified advantageous system to study the mechanism by which speract modulates the K^+ selective channel.

The hyperpolarization induced by speract in these flagellar membrane vesicles has been reexamined using a more extensive array of pharmacological tools selective for G proteins, K^+ channels, phosphodiesterases (PDEs), protein kinases, and phosphatases. In addition, the ability of permeable analogs of cGMP and cAMP to hyperpolarize the vesicles was determined. Our findings provide new evidence that the linkage between activation of the speract receptor and K^+ channel opening is not mediated by G proteins or by protein phosphorylation status, but instead by a direct action of cGMP on the channel.

MATERIALS AND METHODS

Gametes and Reagents

S. purpuratus sea urchins were obtained from Marlinus (Long Beach, CA). Sea urchin sperm were obtained by intracoelomic injection of 0.5 M KCl and kept undiluted on ice until assayed.

Bis-(1,3 diethylthiobarbiturate) trimetinoxonol ($\text{DiS-}C_2(3)$) and $\text{DiS-}C_2(5)$ dyes were from Molecular Probes (Eugene, OR). DCB was synthesized as described previously (Cragoe et al., 1967). Valinomycin, 8Br-cGMP, 8Br-cAMP, dIBu-cGMP, dIBu-cAMP, GTP γ S, mastoparan, Ro-20-1724, and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were from Sigma (St. Louis, MO). H-7, H-8, Rp8pCpP1-cGMPs, HA 1004, KN-62, Laverdustin A, and Genistein from Calbiochem (La Jolla, CA), and synthetic speract was from Penin-

sula Laboratories (Belmont, CA). K^+ channel modulators were from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). The rest of the reagents were of the highest quality available.

Isolation of Flagellar Membranes

Flagella membranes were isolated according to Lee (1984, 1985, 1988). Briefly, semen (1 ml) was diluted in 20 ml of cold sodium-free seawater (0.5*M* NaCl, 460 mM choline-Cl, 27 mM MgCl_2 , 28 mM MgSO_4 , 10 mM CaCl_2 , 8 mM KCl, 2 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES, pH 8.0). Cellular debris and leucocytes were removed by centrifugation at 250*g* for 5 min. Sperm were sedimented from the supernatant at 3000*g* for 5 min, resuspended in 200 μ l of cold 0*N*aSW, pH 8.0, collected at 2000*g* for 10 min, and resuspended in 15 μ l of 0*N*aSW, pH 8.0, with 0.1 mM PMSE. Flagella were detached from sperm by passing the sperm suspension 10 times through a 21 gauge hypodermic needle and separated from sperm heads by centrifugation at 2000*g* for 5 min. The pellet, containing heads and whole sperm, was reprocessed by the same procedure to recover more isolated flagella. To remove any remaining heads or whole sperm, the combined supernatants were centrifuged again at 2000*g* for 5 min. The isolated flagella were pelleted by centrifugation at 6000*g* for 30 min, swollen and lysed by dilution in 4 ml of intravesicular medium (40 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , and 10 mM Pipes, pH 6.7, with or without additional test reagents), and homogenized with a Teflon pestle. Axonemes were removed by centrifugation at 13,000*g* for 4 min. The flagellar membrane vesicles were collected by centrifugation at 130,000*g* for 15 min, resuspended in 40 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , and 10 mM Pipes, pH 6.7, and stored at -70°C until used.

Membrane Potential Measurements

Membrane potential was determined in a SLM-Aminco spectrofluorimeter using the positively charged fluorescent membrane potential sensitive dye $\text{DiS-C}_2(5)$ (125 nM) and the anionic probe $\text{DiS-}C_2(3)$ (62.5 nM), both dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final DMSO concentration was 0.12%. $\text{DiS-C}_2(5)$ fluorescence was excited at 620 nm and measured at 670 nm (González-Martínez and Darszon, 1987; Reynaud et al., 1993) while $\text{DiS-}C_2(3)$ was excited at 540 nm and measured at 580 nm. Five microliters of the vesicular suspension (2–4 mg of protein/ml) was added to 1.6 ml of membrane potential assay medium (MPAM) (20 mM MgSO_4 , 1.5 mM Ca(OH)_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES, pH 8.0, adjusted with *N*-methyl-D-glucamine). Round cuvettes (fitted test tubes) were used with continuous stirring at 16°C . After equilibration (2–4 min) the recording was started. Fluorescence changes were calibrated according to the K^+ equilibrium potential generated in the vesicles in the presence of the K^+ ionophore valinomycin in K^+ additions for this calibration were (in mM) 0.3125, 0.625, 1.25, and 2.5.

Membrane potential measurements in swollen sperm were performed as described by Babcock et al. (1992). Dry sperm were diluted 1:20 in artificial seawater with 1 mM Ca^{2+} , pH 7.0. Sperm (10 μ l of this suspension) were swollen by suspending them in 1/10 diluted artificial seawater plus 20 mM MgSO_4 , pH 7.0. The following K^+ additions were used for calibration (in mM): 10, 20, and 40. In all figures the values given represent the means \pm SEM of at least four experiments.

8-(4-chlorophenylthio)-Rp-isomer, Ro-20-1724, 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-midazolidinone, HA 1004, *N*-(2-guanidinoethyl)-5-isouquinolinesulfonamide, KN-62, 1-[*N,O*-bis-(5-isouquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, and Laverdustin A, 5-amino-[(*N*-(2,5-dihydroxybenzyl)-*N'*-2-hydroxybenzyl) salicylic acid.

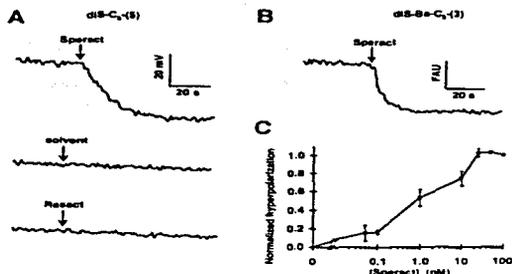


FIG. 1. Speract-induced hyperpolarization in sperm flagellar vesicles. The top traces are representative of the hyperpolarization induced by 100 nM speract in the flagellar vesicles measured with either (A) $dis-C_2(5)$ or (B) $dis-Ba-C_2(3)$. Neither the speract solvent (A, second trace) nor an irrelevant peptide, resact (100 nM) (A, third trace), induced hyperpolarization. Arrows indicate the additions of each compound. (C) Concentration dependence of the speract response measured with $dis-C_2(5)$. This membrane potential dye was used throughout. In all figures the values given represent the means \pm SEM of at least four experiments and all membrane potential traces are accompanied by the corresponding time and membrane potential scales or fluorescence arbitrary units (FAU) when calibration was not possible due to the experimental condition.

Determination of cGMP in Flagellar Membranes

The cGMP content was determined by radioimmunoassay of vesicle lysates. Flagellar membranes (300 μ g resuspended in 20 μ l of MPAM with 100 μ M of IBMX) were incubated with or without speract (100 nM) for 1 min at 14°C. Thereafter, the suspension was centrifuged at 200,000g for 15 min at 4°C; the membranes were resuspended in 200 μ l of MPAM and boiled for 5 min. They were then allowed to reach room temperature, and cGMP was extracted with 2 vol of ethanol by vortexing 1 min and allowing the suspension to stand for 5 min at room temperature. The suspension was centrifuged at 16,000g for 20 min and the cGMP-containing supernatant was removed and evaporated under vacuum until dry. The residue was dissolved in 50 μ l of the buffer provided with the assay kit (TRK 500) and processed according to instructions provided by supplier (Amersham).

RESULTS

The hyperpolarization induced by speract in the flagellar vesicles is qualitatively similar when measured with $dis-C_2(5)$ or $dis-Ba-C_2(3)$, as reported by Lee (1988) and illustrated in Figs. 1A and 1B. However, the $dis-Ba-C_2(3)$ signal is difficult to calibrate as it forms insoluble complexes with

valinomycin (Rink *et al.* 1980; Zeng *et al.* 1995) while $dis-C_2(5)$ is easily calibrated with valinomycin, and its signal is larger. For this reason $dis-C_2(5)$ was used throughout. Measurements with this dye indicated that the vesicle resting membrane potential was -80 ± 3 mV ($n = 110$) and that a maximal speract-induced hyperpolarization of -31 ± 17 mV was reached in 40 ± 6 s ($n = 136$). This hyperpolarization decayed in minutes. Neither solvent nor 100 nM resact, a peptide that does not induce a response in *S. purpuratus* sperm (Carbers, 1989), changed the flagellar vesicle membrane potential (Fig. 1A), indicating the specificity of the response. Figure 1C shows that the half-maximal response was obtained with 0.8 nM speract and saturation occurred at ~ 25 nM. The speract response of the vesicles was independent of external pH from 6.5 to 8.0, but was inhibited at pH 5.0 (data not shown).

Inclusion of GTP (Lee, 1988) (not shown) or GTP γ S (300 μ M) in the flagellar vesicles increased their response to speract (Fig. 2). If this enhancement was mediated by a G protein it would be expected that GDP β S, a G protein antagonist, would inhibit the speract-induced hyperpolar-

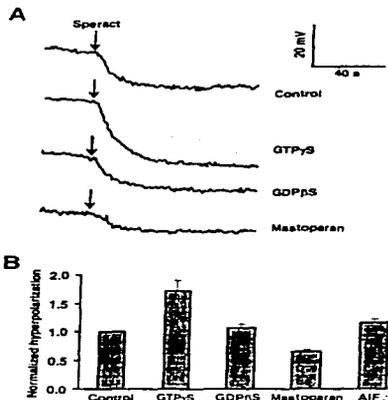


FIG. 2. G protein modulators in the speract response of flagellar vesicles. (A) Speract-induced hyperpolarization in control or pre-loaded vesicles with 300 μ M GTP γ S or GDP β S or exposed to 10 μ M mastoparan. GTP γ S and GDP β S were included inside the vesicles as indicated under Materials and Methods, mastoparan is membrane permeable and was added 10 min before speract (25 nM). (B) Summary of results obtained in experiments as in (A). The hyperpolarization induced by speract was normalized with respect to the control.

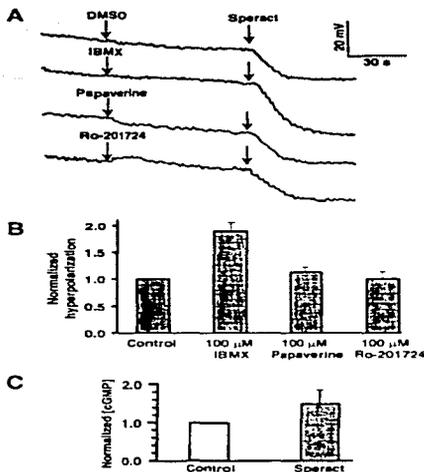


FIG. 3. Effect of phosphodiesterase inhibitors on the speract response. Phosphodiesterase inhibitors (100 μ M) were added 1 min before speract (25 nM). (A) Membrane potential traces for which DMSO (control), IBMX, papaverine, or Ro-201724 were used. (B) A summary of the results as in (A). Hyperpolarization (y axis) was normalized with respect to the speract response without inhibitors. (C) The speract-induced increase in cGMP concentration in the flagellar vesicles (see Materials and Methods). cGMP concentration determined before adding speract (100 nM) was normalized and compared to the value 1 min after adding the peptide.

ization, but it does not (Lee, 1988) (Fig. 2A, third trace, and Fig. 2B). Furthermore, other G protein activators, like aluminate (AlF_4^- ; 20 mM NaF/50 μ M AlCl_3) and mastoparan, did not enhance the speract response (Figs. 2A and 2B). It is likely that the enhancement of the speract response caused by GTP and GTP γ S is because they act as substrates of GC in the vesicles (Bentley *et al.*, 1987).

Cyclic Nucleotides Regulate the Speract Response

Cook and Babcock (1993a) reported that IBMX, a PDE inhibitor, is more specific for the cGMP-selective PDEs in sea urchin sperm. This compound enhanced the increase in cGMP concentration and the hyperpolarization observed during the speract response in swollen sperm

(Cook and Babcock, 1993a). As expected, IBMX (100 μ M) added 1 min before speract increased (80%) the hyperpolarization induced by this peptide in flagellar vesicles (Figs. 3A and 3B). For comparison, the first trace shows a control response to speract including the solvent addition. On the other hand, two inhibitors more specific for cAMP-selective PDEs, papaverine and Ro-201724 (Cook and Babcock, 1993a), had no effect at 100 μ M on the flagellar vesicle speract-induced hyperpolarization (Figs. 3A and 3B). These results are consistent with the contention that an increase in cGMP concentration opens K^+ -selective channels responsible for the speract-induced hyperpolarization of the vesicles. As anticipated, a speract-induced increase in the concentration of cGMP could be detected in the vesicles in the presence of 100 μ M IBMX (Fig. 3C).

Though a correlation has been established between the speract-induced increase in cGMP levels and the hyperpolarization it produces (Cook and Babcock, 1993a; Labarca *et al.*, 1997), experiments showing that permeable cGMP analogs can induce a K^+ -dependent hyperpolarization in sea urchin sperm or flagellar vesicles had not been reported. 8Br-cGMP, a good hydrolysis-resistant permeable agonist of CNG channels (Koch and Kaupp, 1985), is a more powerful activator of these kinds of channels than cyclic GMP itself. Koch and Kaupp (1985) showed that analogues of cGMP which are modified at the ribose, phosphodiester, or pyrimidine portion of the molecule, like diBu-cGMP, are ineffective as CNG channel agonists. 8Br-cGMP (300 μ M) produced a large hyperpolarization (1.6-fold the speract response) in these vesicles and decreased the following speract response (Fig. 4A, first and second traces, and Fig. 4B). The response induced by 8Br-cGMP was inhibited when external K^+ was raised to 10 mM (Fig. 4A, third trace). On the other hand, 300 μ M diBu-cGMP, which is not considered a good agonist for CNG channels of bovine rods (Koch and Kaupp, 1985), induced a small hyperpolarization in flagellar vesicles and an approximately 30% reduction in the speract response. At 1 mM this analog caused a small depolarization (Fig. 4B). In contrast, the permeable analogues of cAMP, 8Br-cAMP and diBu-cAMP, were unable to induce a change in membrane potential by themselves or alter the speract response (Fig. 4B). These results further support the proposal that cGMP and not cAMP regulates the speract-induced hyperpolarization in flagellar vesicles.

Furthermore, in swollen sperm, 1 mM 8Br-cGMP also produced a hyperpolarization and then a depolarization. This response is qualitatively similar to that induced by 100 nM speract in these cells (Fig. 5). Swollen sperm were used because their ionic conditions are closer to those of the flagellar vesicles. In addition, the membrane potential changes induced by speract in swollen sperm are larger and easier to analyze than those recorded in normal sperm (Babcock *et al.*, 1992).

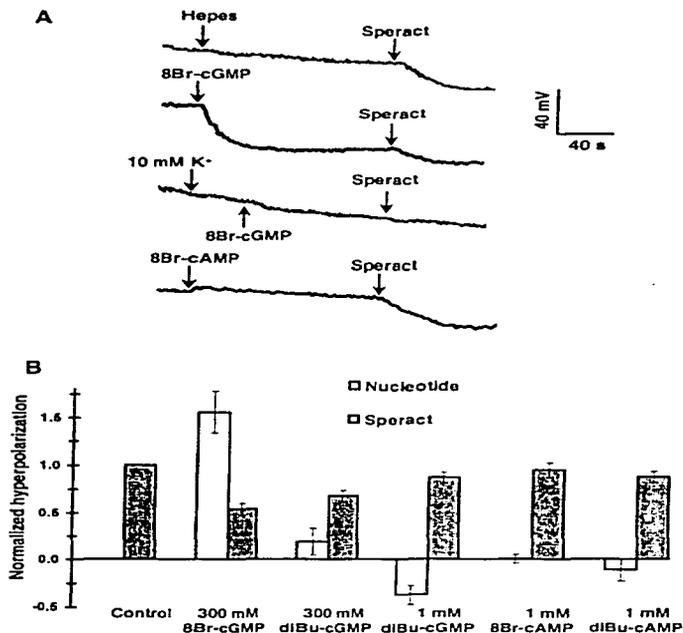


FIG. 4. Membrane potential changes induced by various membrane permeable cyclic nucleotides and their effect in the response to speract. (A) A control response to speract (25 nM), including the solvent addition (first trace). The hyperpolarization caused by 8Br-cGMP (300 μ M) and its effect on the speract response is shown in the second trace. In the third trace, 10 mM K^+ was added 1 min before 8-Br-cGMP; it totally inhibited the 8Br-cGMP and speract responses. The last trace shows how 8Br-cAMP (1 mM) is unable to produce a hyperpolarization. (B) Summary of results obtained in experiments as in (A). Filled bars indicate the speract-induced hyperpolarization; control or in presence of 8Br-cGMP (300 μ M), dIBu-cGMP (300 μ M or 1 mM), 8Br-cAMP (1 mM), or dIBu-cAMP (1 mM). Open bars indicate the membrane potential changes induced by the different permeable nucleotides. Hyperpolarization (y axis) was normalized with respect to the speract (25 nM) response without nucleotides.

Speract and 8Br-cGMP May Activate the Same Permeability Pathway

Raising external K^+ to 10 mM inhibits both the 8Br-cGMP and the speract-induced hyperpolarization in flagellar vesicles, suggesting that the same channel may mediate both responses. To explore this possibility we

compared the ion selectivity of the two responses. Lee (1988) tested the capacity of K^+ , Rb^+ , and Cs^+ to inhibit the speract-induced hyperpolarization in sperm flagellar vesicles as an indirect way to study its ion selectivity. Unfortunately Na^+ , the major cation in seawater, was not included in such investigation. Figure 6A shows that

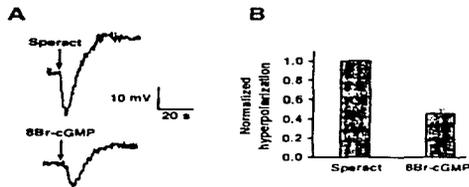


FIG. 5. 8Br-cGMP also hyperpolarizes swollen sea urchin sperm. *S. purpuratus* sea urchin sperm were swollen in 1:10 diluted artificial seawater, pH 7.0, plus 20 mM $MgSO_4$, as indicated under Materials and Methods. Membrane potential changes were measured using dS.C. (5) as described by Babcock *et al.* (1992). Traces show membrane potential changes with speract (100 nM) and 8Br-cGMP (1 mM) as indicated by arrows. Bars represent the hyperpolarization induced by speract and 8Br-cGMP. Hyperpolarization (y axis) was normalized with respect to the speract-induced hyperpolarization.

while 1 mM external K^+ is enough to achieve maximum inhibition of the speract response, 5 mM Na^+ inhibits only ~15%. The observed selectivity sequence ($K^+ > Rb^+ > Li^+ > Na^+$) confirms that the speract-induced permeability is quite selective for K^+ . Since in flagellar membranes the speract-induced permeability remains open for many seconds, the ionic selectivity was also examined adding several monovalent ions at 1.25, 2.5, and 5 mM after exposing the flagellar vesicles to 100 nM speract (not shown). A saturating concentration of the peptide was used to ensure that most channels would open. A selectivity sequence similar to that described above was found: $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+ > Na^+$. Similar results were obtained in experiments in which 8Br-cGMP (300 μM) was used to trigger vesicle hyperpolarization (Fig. 6B). These findings indicate that 8Br-cGMP and speract may activate the same K^+ selective channel.

Blockade of Speract Response in Flagellar Vesicles

Considering that speract opens a permeability pathway selective for K^+ , a battery of K^+ channel modulators was tested (see Table 1). Of these compounds only Ba^{2+} (IC_{50} ~100 μM ; Fig. 7A) and 4-AP (IC_{50} 4.1 mM; Fig. 7B) inhibited the speract response in sperm flagellar vesicles. K^+ channels directly modulated by cGMP can also be blocked by 4-AP (Gomez and Nast, 1994, 1995). Furthermore DCB, another blocker of CNG channels and K^+ -selective channels modulated by cGMP (Gomez and Nast, 1997), inhibited the speract response (IC_{50} 1 μM ; Fig. 7C). In addition, 4-AP and DCB also blocked the hyperpolarization induced by 8Br-cGMP with a similar potency (Fig. 7D). These results further support the proposal that a K^+ -selective channel

regulated by cGMP is responsible for the speract-induced hyperpolarization of the flagellar vesicles.

Protein Kinase and Phosphatase Inhibitors Do Not Alter the Speract-Induced Hyperpolarization in Sperm Flagellar Vesicles

The K^+ -selective channel opened by speract could be directly or indirectly regulated by cGMP. Inhibitors of protein kinases C, A, G, CaMKII; and tyrosine kinases did not alter the speract response of the flagellar vesicles even at high concentrations (Fig. 8A). Phosphatase inhibitors were also unable to alter this response (Fig. 8B). These findings are inconsistent with the indirect pathway involving changes in the phosphorylation state of the channel and indicate that the cGMP modulation is direct.

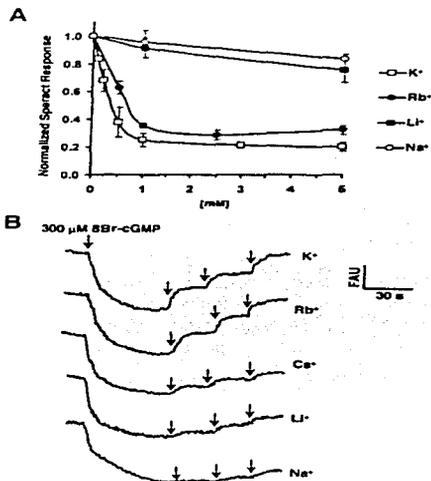


FIG. 6. Ionic selectivity of the speract and 8Br-cGMP responses. (A) Inhibition of the response to speract (100 nM) by different monovalent ions in the external medium. The y axis represents the normalized hyperpolarization. (B) Ionic selectivity of the 8Br-cGMP-induced hyperpolarization. Membrane potential changes induced by addition (arrows) of 1.25, 2.5, and 5 mM K^+ , Rb^+ , Ca^{2+} , Li^+ , or Na^+ after 300 μM 8Br-cGMP in the absence of valinomycin. The traces are representative of at least three experiments.

TABLE 1
Effect of K⁺ Channel Modulators in the Hyperpolarization Induced by Spermact

K ⁺ channel modulator	Concentration	% inhibition of the spermact response
Agitoxin-2	100 nM	26 ± 7
4-AP	5 mM	64 ± 4
Apamin	1 μM	0 ± 3
Charybdomotoxin	100 nM	0 ± 5
Ba ²⁺	1 mM	87 ± 5
DCB	5 μM	61 ± 10
α-Dendrotoxin	1 mM	2 ± 6
β-Dendrotoxin	100 nM	5 ± 12
γ-Dendrotoxin	100 nM	8 ± 3
δ-Dendrotoxin	100 nM	21 ± 3
Dendrotoxin-1	200 nM	5 ± 5
Glibenclamide	100 nM	0 ± 6
Iberiotoxin	25 nM	0 ± 6
Kallitoxin	100 nM	25 ± 11
Margatoxin	40 nM	17 ± 2
Naxustoxin	100 nM	13 ± 2
Penitrem A	100 nM	0 ± 14
Pinacidil	500 μM	0 ± 18
Paxillina	100 nM	12 ± 11
Quinine sulphate	10 mM	16 ± 4
Stichodactyla toxin	1 μM	15 ± 9
TEA inside	40 mM	12 ± 4
TEA outside	30 mM	0 ± 3
Tityustoxin-Kα	50 nM	26 ± 2

Note. All compounds were used at saturating concentrations and added 1–5 min before 25 nM spermact addition.

DISCUSSION

Small peptides contained in the egg jelly surrounding the sea urchin egg profoundly influence sperm physiology and modulate gamete encounter. These egg peptides, such as spermact, stimulate K⁺ efflux and increase the levels of cGMP, cAMP, [Ca²⁺], and pH_i (Garbers, 1989; Darszon *et al.*, 1999).

High K⁺ concentrations (30–50 mM) in seawater inhibit the spermact-induced changes in sperm membrane potential, pH_i, and [Ca²⁺] (Darszon *et al.*, 1999). These observations point to the importance of K⁺-selective channels in the response to spermact. On the other hand, increases in cGMP levels have been correlated with the K⁺-dependent hyperpolarization induced by spermact in sea urchin sperm. These results led to the proposal that this decapeptide transiently elevates cGMP concentration, which in turn activates a K⁺-selective channel responsible for hyperpolarizing sperm (Dangott and Garbers, 1984; Lee and Garbers, 1986; Lee, 1988; Garbers, 1989; Babcock *et al.*, 1992; Yuen and Garbers, 1992; Cook and Babcock, 1993a,b; Darszon *et al.*, 1999). It has been shown that spermact activates a K⁺-selective channel in swollen sperm (Babcock *et al.*, 1992).

However, it has not been demonstrated that the downstream target of cGMP is a K⁺-selective channel.

Sea urchin sperm flagellar membrane vesicles containing functional spermact receptors are a simplified system suitable to study the spermact response (Lee, 1988). Inclusion of GTP or GTPγS in the vesicles enhances the spermact-induced hyperpolarization (Lee, 1988, and this report). Based on these findings Lee (1988) proposed that GTP is involved in the coupling between the spermact receptor and the membrane hyperpolarization, which is most likely due to the activation of K⁺-selective channels. This author suggested that a G protein could participate in the response. Unexpectedly, loading of flagellar vesicles with GDPβS (Lee, 1988), an inhibitor of G proteins, or with activators of G proteins (aluminat and mastoparan) did not significantly influence the spermact response (Fig. 2). These results do not support the proposed role of a G protein in this response. Considering that GTP and GTPγS are substrates for the sperm GC (Bentley *et al.*, 1987), the most plausible explanation is that these compounds stimulate the spermact response, increasing the availability of substrate and enhancing cGMP production. Indeed, it is possible to measure spermact-induced production of cGMP in the vesicles (Fig. 3C).

IBMX, which preferentially inhibits the cGMP-selective PDEs in sea urchin sperm (Cook and Babcock, 1993a), enhanced the spermact-induced hyperpolarization of flagellar vesicles, while papaverine and Ro-20-1724, which are more specific inhibitors of cAMP-selective PDEs (Lugnier *et al.*,

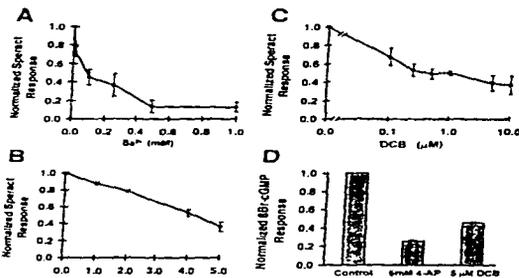


FIG. 7. Inhibition of the spermact and 8Br-cGMP responses by K⁺ channel antagonists and DCB. Ba²⁺ (A), 4-AP (B), and DCB (C) inhibit the spermact response (normalized hyperpolarization, y axis). The hyperpolarization was normalized with respect to the spermact response without inhibitors. All antagonists were added 1 min before spermact (25 nM). (D) The hyperpolarization induced by 8Br-cGMP is inhibited by 4-AP (5 mM) and DCB (5 μM).

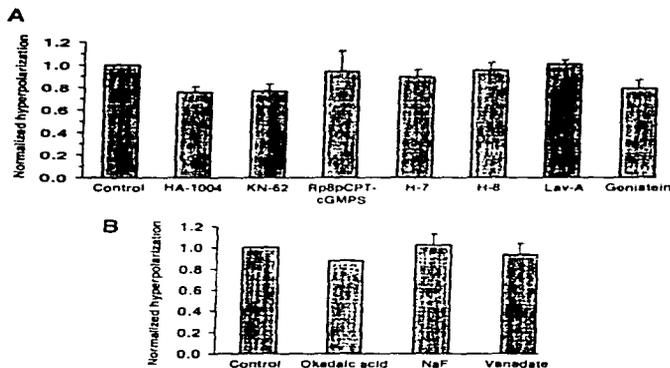


FIG. 8. Effect of protein kinase (A) and phosphatase (B) inhibitors on the response to speract of flagellar vesicles. Bars represent the normalized hyperpolarization induced by 25 nM speract in the absence and presence of saturating concentrations of the inhibitors. (A) HA 1004 (50 μ M), KN-62 (4 μ M), Rp-8-pCPT-cGMPs (20 μ M), H-7 (40 μ M), H-8 (40 μ M), Lavodustin A (5 μ M), and Gontistein (10 μ M). (B) Okadaic acid (10 nM), NaF (20 mM, in internal and external medium), and vanadate (1 mM).

1986; Cook and Babcock, 1993a), did not (Figs. 3A and 3B). These observations are in agreement with what was found in swollen (Cook and Babcock, 1993a) and in normal sea urchin sperm (Beltrán *et al.*, 1996; Labarca *et al.*, 1997). Furthermore, the membrane-permeable analogue of cGMP, 8Br-cGMP (300 μ M), known to activate CNG channels (Kaupp, 1995) and K^+ channels directly modulated by cGMP (Gomez and Nasi, 1995), hyperpolarized the vesicles by itself and reduced the speract response (Fig. 4). However, diBu-cGMP, another permeable analog of cGMP that does not activate the bovine rod CNG channel (Koch and Kaupp, 1985), produced only a small hyperpolarization at 300 μ M and actually depolarized at 1 mM. Since this analog can activate cGMP-dependent protein kinases (Cataldi *et al.*, 1999) but does not mimic the speract response (Fig. 4), a kinase of this type probably does not play a major role in the response. Finally, neither 8Br-cAMP nor diBu-cAMP caused a vesicle hyperpolarization. These results are consistent with the proposal that the speract-induced hyperpolarization is caused by an increase in cGMP concentration (Lee and Garbers, 1986; Garbers, 1989; Babcock *et al.*, 1992; Cook and Babcock, 1993a,b). In addition, it was found that the hyperpolarization induced by both speract and 8Br-cGMP displays the same selectivity sequence ($K^+ > Rb^+ > Li^+ > Na^+$). This ionic selectivity is also similar to that reported for the speract-induced hyperpolarization in intact sperm ($K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+$) (Babcock *et al.*, 1992).

Furthermore, 8Br-cGMP also induces a K^+ -dependent hyperpolarization in swollen sperm (Fig. 5). These findings suggest that speract and 8Br-cGMP open the same channel in sea urchin sperm flagellar vesicles and presumably in intact sperm.

The pharmacology of the speract response in these vesicles was determined using K^+ and/or cyclic nucleotide-modulated channel blockers. It is worth noting that from a battery of voltage-dependent K^+ channel blockers, only Ba^{2+} and 4-AP inhibited the speract-induced hyperpolarization with IC_{50} s of 100 μ M and 4.1 mM, respectively. DCB, an amiloride derivative and effective inhibitor of CNG channels (Nicol *et al.*, 1987; Kolesnikov *et al.*, 1990; Kolesnikov and Kosolapov, 1993), also blocked the speract-induced hyperpolarization in flagellar vesicles (IC_{50} 1 μ M).

K^+ selective channels directly modulated by cGMP participate in the light-induced hyperpolarization of scallop ciliary photoreceptors (Gottow *et al.*, 1994; Gomez and Nasi, 1995, 1997) and of the extraocular, photosensitive neurons from the abdominal ganglion of the mollusc *Orchidium verruculatum* (Gottow *et al.*, 1994). These channels are blocked by 4-AP (IC_{50} 0.6 μ M) (Gomez and Nasi, 1994) and DCB (IC_{50} 5 μ M) (Gomez and Nasi, 1997), as it occurs with the K^+ channel involved in the speract response. The fact that 4-AP is much more potent in blocking the K^+ channel regulated by cGMP from scallop photoreceptors than the channel activated by speract suggests

differences between them. On the other hand, the similar sensitivity of the two channels to DCB indicates they may be related. The observations made in sperm flagellar vesicles are consistent with the participation of a cGMP-modulated K⁺-selective channel in the speract-induced hyperpolarization.

Does cGMP regulate the K⁺ channel opened by speract directly or indirectly through a kinase? Inhibitors for protein kinases C, A, and G; CaMKII; and tyrosine kinases, and for protein phosphatases, were unable to alter the response of flagellar vesicles to speract even at high concentrations (Fig. 8). These experiments imply that cGMP directly modulates the K⁺-selective channel and not by changing its phosphorylation state. Inside-out patch clamp recordings in swollen sea urchin sperm could demonstrate the latter possibility; however, so far these experiments have not been possible.

CNG channels are hetero-oligomers composed of at least two different subunits, α and β . Distinct subunit combinations can generate functionally diverse channels (Biel *et al.*, 1995). CNG channels have been found in a variety of sensory and nonsensory tissues such as heart, kidney, liver, muscle, testis, and sperm (Biel *et al.*, 1994; Distler *et al.*, 1994; Weyand *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1996; Finn *et al.*, 1996). The α subunit (Kaupp *et al.*, 1989) and several β subunits (Wiesner *et al.*, 1998) of a channel directly regulated by cGMP have been cloned and immunodetected in mammalian sperm flagella.

Various channels modulated by cyclic nucleotides participate in sperm physiology (Gauss *et al.*, 1998; Darszon *et al.*, 1999). This report suggests the participation of a K⁺-selective channel directly activated by cGMP in the speract response in sea urchin sperm. Previously, a poorly selective K⁺ channel (pK⁺/pNa⁺ 5) directly modulated by cAMP was studied by incorporating flagellar sperm membranes in planar lipid bilayers (Labarca *et al.*, 1994). Recently Gauss *et al.* (1998) cloned and functionally expressed a channel from sea urchin testis with similar properties, named SPII. This channel was immunodetected in sperm flagella (Gauss *et al.*, 1998) and might participate in the repolarizing phase of the speract response (Labarca *et al.*, 1996; Gauss *et al.*, 1998). Because this channel is activated both by hyperpolarizing potentials (H) and cyclic nucleotides (CN). It is a member of a growing family of channels named HCN channels (Clapham, 1998). The channels of this new family are important in shaping the autonomous rhythmic activity of single neurons and the periodicity of network oscillations (Seiffers *et al.*, 1999).

Unfortunately K⁺-selective channels directly modulated by cGMP have not been cloned. It was proposed that the light-dependent channels from invertebrate ciliary photoreceptors might bridge the gap between cNG channels and voltage-dependent K⁺ channels (Gomez and Nasi, 1997). It will be interesting to study to which channel family the sea urchin sperm K⁺ channel regulated by cGMP belongs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, DGAPA-UNAM, the Howard Hughes Medical Institute, and the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology. The authors thank Ingo Weyand, Takuya Nishigaki, Benjamin Kaupp, Claudia Treviño, and Ricardo Felix for their suggestions.

REFERENCES

- Babecek, D. F., Bosma, M. M., Battaglia, D. E., and Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6001-6005.
- Beltan, C., Zapata, O., and Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylate cyclase. *Biochemistry* **35**, 7591-7598.
- Bontós, J. K., Khatri, A. S., and Garbers, D. L. (1987). Receptor-mediated phosphorylation of spermatozoan proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 15708-15713.
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3505-3509.
- Biel, M., Zong, X., and Hofmann, F. (1995). Molecular diversity of cyclic nucleotide-gated cation channels. *Nannyn Schmedeberges Arch Pharmacol* **353**, 1-10.
- Cataldi, M., Secondo, A., D'Alessio, A., Sarnacchiaro, F., Colao, A. M., Amoruso, S., Di Renzo, G. E., and Ammirato, L. (1999). Involvement of phospholipase-C-GMP-PKC pathway in intracellular Ca²⁺ oscillations in pituitary GH3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1449**, 186-194.
- Clapham, D. E. (1998). Not so funny anymore. Pacing channels are cloned. *Neuron* **21**, 5-7.
- Cook, S. F., and Babecek, D. F. (1993a). Selective modulation by cGMP of the K⁺ channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* **268**, 22402-22407.
- Cook, S. F., and Babecek, D. F. (1993b). Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pH increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* **268**, 22408-22413.
- Cragoe, E. J., Jr., Woltersdorf, O. W., Bickel, J. B., Kwong, S. F., and Jones, J. H. (1967). Pyrazine diuretics. II. N-Amidino-3-amino-5-substituted-6-tolopyridazinecarboxamides. *J. Med. Chem.* **10**, 66-75.
- Dangant, J. J., and Garbers, D. L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* **259**, 13712-13716.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* **79**, 481-510.
- Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* **33**, 1275-1282.
- Feng, L., Subbaaya, I., Yamamoto, N., Baehr, W., and Kraus-Friedman, N. (1996). Expression of photoreceptor cyclic nucleotide-gated cation channel alpha subunit (CNGCa) in the liver and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **395**, 77-81.
- Finn, J. L., Grünwald, M. E., and Yau, K. W. (1996). Cyclic nucleotide-gated ion channels. An extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 395-426.
- Garbers, D. L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 719-742.

- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Gomez, M. P., and Nasi, F. (1994) Blockage of the light-sensitive conductance in hyperpolarizing photoreceptors of the scallop. Effects of tetrabutylammonium and 4-aminopyridine. *J. Gen. Physiol.* **104**, 487-505.
- Gomez, M. P., and Nasi, F. (1995) Activation of light-dependent K^+ channels in ciliary invertebrate photoreceptors involves cGMP but not the IP₃ Ca²⁺ cascade. *Neuron* **15**, 607-618.
- Gomez, M. P., and Nasi, F. (1997) Antagonists of the cGMP-gated conductance of vertebrate rods block the photo current in scallop ciliary photoreceptors. *J. Physiol. (London)* **45**, 367-378.
- Gonzalez-Martinez, M., and Darszon, A. (1987) A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS Lett.* **218**, 247-250.
- Gottow, T., Nishi, T., and Kumita, H. (1994) Single K^+ channels closed by light and opened by cyclic GMP in mollusc an extracellular photoreceptor cells. *Brain Res.* **662**, 268-272.
- 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**, 1417-1452.
- Kaupp, U. B. (1995) Family of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U. B., Nudome, F., Lanabe, J., Loreda, S., Bonnik, W., Stuhmer, W., Cook, N. J., Kanagawa, K., Matsuo, H., Hirose, J., Miyata, F., and Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature (London)* **342**, 762-766.
- Koch, K. W., and Kaupp, U. B. (1985) Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**, 6788-6800.
- Kolesnikov, S. S., Zhamazayev, A. B., and Kosolapov, A. V. (1990) Cyclic nucleotide-activated channels in the frog olfactory receptor plasma membrane. *FEBS Lett.* **266**, 96-98.
- Kolesnikov, S. S., and Kosolapov, A. V. (1993) Cyclic nucleotide-activated channels in carp olfactory receptor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1150**, 63-72.
- Labarca, P., Santti, C., Zapata, O., Beltram, C., Lievano, A., Sandoval, Y., and Darszon, A. (1997) *In/From* ion channels: From Cell to Cell Conversations. (R. Latorre, Ed.) Plenum, New York.
- Labarca, P., Santti, C., Zapata, O., Morales, F., Beltram, C., Lievano, A., and Darszon, A. (1996) A cAMP-regulated K^+ selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Dev. Biol.* **174**, 271-280.
- Lee, H. C. (1984) Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **259**, 4957-4963.
- Lee, H. C. (1985) The voltage-sensitive Na^+ / H^+ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *J. Biol. Chem.* **260**, 10794-10799.
- Lee, H. C. (1988) Internal GTP stimulates the speract receptor-mediated voltage changes in sea urchin spermatozoa membrane vesicles. *Dev. Biol.* **126**, 91-97.
- 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.
- Lugnier, C., Schoffeleers, P., Le Bec, A., Strouthou, F., and Stoellet, J. C. (1986) Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1733-1751.
- Nicol, G. D., Shierkamp, P. P., Saurin, Y., Cragoe, F. J., and Bownds, M. D. (1987) A derivative of atropine blocks both the light-regulated and cyclic GMP-regulated conductances in rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **90**, 651-669.
- Reynaud, E., de Belatorre, T., Zapata, O., Lievano, A., and Darszon, A. (1993) Ionic bases of the membrane potential changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Lett.* **329**, 210-214.
- Runk, J. J., Montecino, C., Hesketh, J. R., and Tsion, R. Y. (1980) Amphipathic membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* **595**, 15-30.
- Seifert, R., Scheller, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., and Kaupp, U. B. (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9394-9396.
- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H., and Isaka, S. (1981) Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1238-1244.
- Wevand, I., Godde, M., Erings, S., Weimer, J., Mullet, F., Altenhofen, W., Hart, H., and Kaupp, U. B. (1994) Cloning and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.
- Wiesner, B., Weimer, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B., and Wevand, I. (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J. Cell. Biol.* **142**, 473-484.
- Yuen, P. S., and Garbers, D. L. (1992) Guanylyl cyclase-linked receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**, 193-225.
- Zeng, Y., Clark, E. N., and Florman, H. M. (1995) Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* **171**, 554-563.

Received for publication December 7, 1999

Revised February 17, 2000

Accepted February 21, 2000