



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PRESENCIA Y PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
STIM Y ORAI EN LA FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE
DE RATÓN.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ANA ALICIA SÁNCHEZ TUSIE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PRESENCIA Y PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
STIM Y ORAI EN LA FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE
DE RATÓN.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ANA ALICIA SÁNCHEZ TUSIE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2010



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/323/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de abril de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **SÁNCHEZ TUSIE ANA ALICIA** con número de cuenta 402115917 con la tesis titulada **"Presencia y participación de las proteínas STIM y ORAI en la fisiología del espermatozoide de ratón."**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ**:

Presidente: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
Vocal: DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ
Secretario: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ
Suplente: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
Suplente: DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de junio de 2010.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/

Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- A los apoyos recibidos para el desarrollo de este proyecto (beca CONACyT, apoyo CONACyT 42605 y 49113, NIH R01 HD038082-07A1 y PAPIIT IN204109 y IN211809).
- A la Dra. Claudia Treviño, al Dr. Marco Tulio González, al Dr. Ignacio López y al Dr. Christopher Wood por ser miembros de mi Comité Tutor.

Es un orgullo ser mexicana y haber tenido la oportunidad de cursar un posgrado en nuestra máxima casa de estudios, patrimonio cultural de la humanidad, donde me desarrollé en áreas deportivas, artísticas, culturales y científicas. La UNAM es un ejemplo de la enriquecedora diversidad cultural de éste bello país, los catedráticos de ésta universidad son gente convencida de que la ciencia y la tecnología son la base de cualquier economía y que si México no se preocupa por formar científicos que generen conocimiento y que se preocupen por el cuidado del medio ambiente, no dejaremos de ser un país de maquila.

Gracias UNAM

Agradecimientos personales

A mi mamá por todo su cariño, apoyo y comprensión.

A Ernesto por compartir sus sueños conmigo.

A la Dra. Claudia Treviño por su asesoría constante en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Alberto Darszon por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

A Gerardo De Blas, a José Luis De la Vega, a Julio, a Arlet, a Yolo y a la Dra. Carmen Beltrán por todo su apoyo en los experimentos.

A los miembros del “*club del topper*”; Rocío, Arlet, Yolo, Julio, Espe, Francisco y Marina por hacer de la hora de la comida un ambiente muy ameno.

Y a todos los integrantes del laboratorio por su participación en los seminarios.

ÍNDICE

Índice.....	8
Índice de Figuras y Tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
Resumen en inglés (abstract).....	13
Introducción.....	14
Antecedentes.....	18
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	24
Materiales y Métodos.....	25
Separación de células espermatogénicas por gravedad unitaria (STA-PUT).....	25
Obtención de RNA y síntesis de cDNA.....	25
Obtención de espermatozoides.....	27
Western Blot.....	27
Purificación de Zona Pelúcida (ZP) de ratón.....	28
Ensayos de Reacción Acrosomal.....	28
Inmunofluorescencia Indirecta.....	29
Análisis Estadístico.....	30
Resultados.....	31
Discusión.....	43
Apéndices.....	46
Apéndice I.....	46
Apéndice II.....	47
Bibliografía.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Estructura del ovocito de mamífero.....	14
Figura 2. Estructura del espermatozoide de ratón.....	15
Figura 3. Mecanismo de señalización entre las proteínas STIM y Orai.....	18
Figura 4. Estructura y distribución intracelular de las proteínas STIM.....	19
Figura 5. Características estructurales de las proteínas Orai.....	21
Figura 6. Estructura de los canales TRPC.....	22
Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de nuestros genes de interés.....	26
Figura 7. Cuantificación de la Reacción Acrosomal.....	29
Figura 8. Electroforesis de RNA en gel de agarosa al 1%.....	31
Figura 9. Los dos genes de STIM y los tres de Orai se expresan en células espermatogénicas.....	32
Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las secuencias obtenidas y el gen de interés.....	32
Figura 10. Detección de STIM y Orai en homogenados proteicos de espermatozoides de ratón mediante Western blot.....	33
Figura 11. Detección de STIM1, Orai1, Orai2 y Orai3 en células HEK293.....	34
Figura 12. Inmunolocalización de las proteínas STIM & Orai en espermatozoides de ratón.....	36
Figura 13. Inmunolocalización de las proteínas STIM & Orai en espermatozoides de humano.....	37
Tabla 3. Reactivos que afectan la actividad de las proteínas STIM y de los canales Orai.....	38
Figura 14. El Gd^{3+} 1uM inhibe la Reacción Acrosomal inducida con ZP.....	39
Figura 15. El ML-9 5µM inhibe la Reacción Acrosomal al inducirlo con ZP.....	41
Figura 16. 25-75µM de 2-APB inhibe la RA inducida por ZP.....	42

Abreviaturas

ACs	Adenilato Ciclasa Soluble.
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
CatSper	Canal Catiónico del Espermatozoide.
Cav	Canal de Calcio modulado por Voltaje.
CCVD	Canales de Calcio Voltaje Dependientes.
DNAc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
DAG	Diacilglicerol
IP3	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pHi	Potencial de Hidrógeno intracelular
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PLC	Fosfolipasa C
RA	Reacción Acrosomal
RE	Reticulo Endoplásmico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
SERCA	ATPasa de Calcio del Reticulo Sarcoplásmico y Endoplásmico.
SNARE	Proteínas Receptoras de Unión a NSF soluble
SOC	Canal Operado por Pozas
TRP	Receptor de Potencial Transitorio
STIM	Molécula de Interacción del Estroma (del inglés STromal Interacting Molecule)
ZP	Zona Pelúcida

RESUMEN.

La fecundación es el evento biológico más importante en los organismos de reproducción sexual. El gameto masculino pasa por una serie de cambios morfofisiológicos, necesarios para que realice su función con éxito. Hay tres procesos fundamentales que el espermatozoide debe llevar a cabo para ser capaz de fecundar un óvulo: 1) activación de la movilidad, 2) capacitación, y 3) reacción acrosomal (RA). Particularmente se sabe que los flujos de Ca^{2+} , son un requerimiento absoluto para la movilidad y la RA. Esta última implica un proceso de exocitosis que en los mamíferos consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide. El inductor natural de la reacción acrosomal es la ZP3, una glicoproteína de la matriz externa del óvulo (zona pelúcida) que activa entre otras cosas, una entrada de Ca^{2+} necesaria para que ocurra la RA y que es dependiente de Ca^{2+} externo. Existen evidencias de que esta entrada de Ca^{2+} está formada por dos componentes. El primero es una entrada de Ca^{2+} transitoria del orden de segundos que se cree que es llevada a cabo por Canales de Calcio Voltaje Dependientes (CCVD) y el segundo está constituido por una entrada sostenida de Ca^{2+} . Se ha propuesto que la segunda entrada de Ca^{2+} esta mediada a través de canales de Ca^{2+} operados por el vaciamiento de pozas internas (SOC). El vaciamiento de pozas intercelulares de Ca^{2+} permite la activación de canales permeables a este ion en la membrana plasmática. La inhibición de los SOCs reduce la RA [1] y existen evidencias de que los canales SOC son de suma importancia para la fecundación [2]. Sin embargo, a pesar de su importancia fisiológica, el mecanismo y componentes moleculares de este tipo de respuestas no se conocen completamente. Un avance reciente en el entendimiento de la composición molecular de los SOC ha sido el descubrimiento de dos familias de proteínas transmembranales, STIM (con dos miembros) y Orai (con tres miembros). STIM1 actúa como un sensor de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) y/o como activador de Orai, el cual constituye el propio canal [3] que, al ser activados, permiten una entrada altamente selectiva a Ca^{2+} , no activada por voltaje, denominada I_{CRAC} (por sus siglas en inglés; release activated calcium current) en células no excitables. STIM1 presenta un dominio de unión a Ca^{2+} (llamado "mano EF") en el amino terminal que reside en el lumen del RE. La reducción del Ca^{2+} en el RE resulta en una oligomerización de STIM1 y la subsecuente activación de los canales permeables a Ca^{2+} [4]. Dado que los canales tipo SOC son de suma importancia para la RA es importante determinar la identidad molecular de los canales involucrados en este proceso en el espermatozoide de ratón. En el presente trabajo determinamos la presencia y posible participación de las proteínas STIM y Orai en la fisiología del espermatozoide de ratón. Mediante RT-PCR se identificaron los genes STIM1, STIM2, Orai1, Orai2, Orai3 en células espermatogénicas de ratón. Mediante Western Blot se identificaron las proteínas STIM1, STIM2, Orai1, Orai2, Orai3 en espermatozoides de ratón y se determinó su localización subcelular mediante inmunocitoquímica. Así mismo, la preincubación de los espermatozoides con; $1\mu\text{M}$ de Gd^{3+} ó $25\text{-}75\mu\text{M}$ de 2-APB dos bloqueadores de los canales Orai, ó $5\mu\text{M}$ de ML-9, un inhibidor de STIM, bloquea de manera significativa la RA inducida por zona pelúcida. Con éste tipo de aproximaciones y debido principalmente a; la complejidad del espermatozoide como modelo de estudio, a la dificultad que enfrentamos para establecer la especificidad de los anticuerpos comerciales y a la poca especificidad de los inhibidores es difícil concluir de forma definitiva la presencia de las proteínas STIM y Orai en el espermatozoide de ratón y su participación en la cascada

de señalización de la reacción acrosomal. Sin embargo, la evidencia de este trabajo en su conjunto sugiere que estos canales si están presentes y pudieran jugar un papel importante en la fisiología del espermatozoide. El desarrollo en curso de nuevos y más específicos inhibidores será de gran utilidad para continuar con la caracterización de estos canales en el espermatozoide.

Resumen en inglés (Abstract)

During mammalian fertilization, increases in the sperm intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) are important for the dialogue established between sperm and egg. ZP3 (Zona Pellucida Protein 3) is recognized as the natural acrosome reaction (AR) inducer. The current model of the signaling cascade that culminates with the AR proposes that ZP3 binding generates a biphasic Ca^{2+} response. Voltage-gated (Cavs) or CatSper Ca^{2+} channels are believed to mediate the initial phase, while store depletion-activated Ca^{2+} entry (SOC) is thought to mediate the second and sustained phase. During the last decades TRPC channels were proposed to be responsible for SOC currents, until recent findings suggesting that STIM and Orai proteins are the Ca^{2+} store sensor and a plasma membrane Ca^{2+} channel subunit, respectively. In the present work, we determined by RT-PCR the expression of STIM1, STIM2, Orai1, Orai2 and Orai3 genes in mouse spermatogenic cells. Using Western Blot we detected STIM1-2 and Orai1-3 proteins in epididymal mouse sperm extracts. Using immunocytochemistry, we also determined the subcellular distribution of STIM1-2 and Orai2-3 in mouse and human sperm. These results suggest that complexes composed by STIM and Orai proteins are present in mouse and human sperm. The Orai channels are conformed by homo or heterotetramers and display notable differences in their properties despite a high degree of sequence similarity. SOC inhibitors lack optimal specificity and pharmacological tools are under development. However, Gd^{3+} is considered the most reliable SOC inhibitor in the low micromolar range ($1\mu\text{M}$). Another widely used SOC inhibitor in the range of $25\text{-}75\mu\text{M}$ is 2-APB. Additionally, ML-9 (initially described as a myosin-light-chain kinase inhibitor) blocks SOC activity. Surprisingly, Gd^{3+} and ML-9 compounds were unable to inhibit the thapsigargin-induced AR (artificial SOC activation) but all the inhibitors used in the present work reduced the AR induced by zona pellucida the natural AR inducer. Elucidating the molecular components of the SOC activity involved in the sperm acrosome reaction will contribute to understand fertilization.

INTRODUCCIÓN.

La fecundación es el evento biológico más importante en los organismos de reproducción sexual, en el cual los gametos masculino y femenino se fusionan generando un nuevo individuo.

El óvulo es la célula sexual femenina que de manera particular presenta una gran cantidad de citoplasma donde se concentran todas las proteínas, ribosomas, RNAt, RNAm, factores morfogénicos y todos los elementos necesarios para iniciar la formación de un nuevo individuo después de la fecundación. Los óvulos de la mayoría de los mamíferos están cubiertos por una capa extracelular denominada zona pelúcida (ZP) constituida por tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 en el caso del ovocito de ratón. La ZP está rodeada por células foliculares (células del cúmulus o acompañantes), las cuales forman la corona radiada del ovocito (Figura 1).

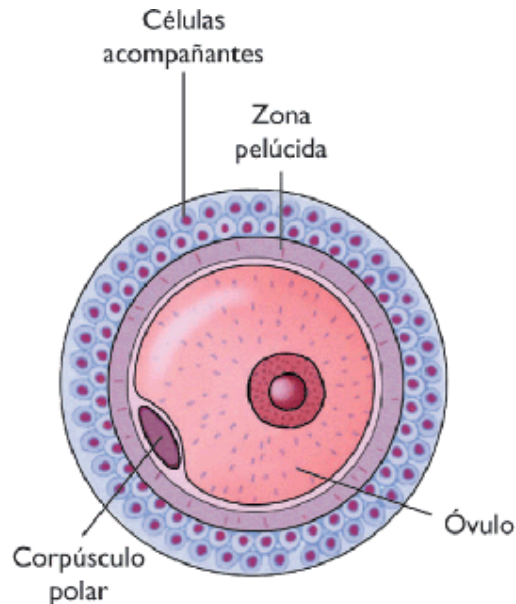


Figura 1. Estructura de un ovocito de mamífero. El óvulo está cubierto por una capa extracelular denominada zona pelúcida la cual está rodeada por células de la granulosa o acompañantes que sintetizan y secretan progesterona y prostaglandinas.

El espermatozoide es una célula haploide compuesta principalmente por cabeza y flagelo (Figura 2). En la *cabeza* se encuentra el acrosoma (vesícula ácida derivada del golgi) y el núcleo, ambos rodeados de una pequeña cantidad de citoplasma. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas (hialuronidasa y acrosina, entre otras) que le ayudan al espermatozoide a penetrar las capas externas del ovulo. El *flagelo* está compuesto por pieza media, principal y terminal. La pieza media posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina

helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide, produciendo ATP. A lo largo de la pieza media y principal se encuentra el axonema que provee de movimiento al espermatozoide gracias a la hidrólisis de ATP.

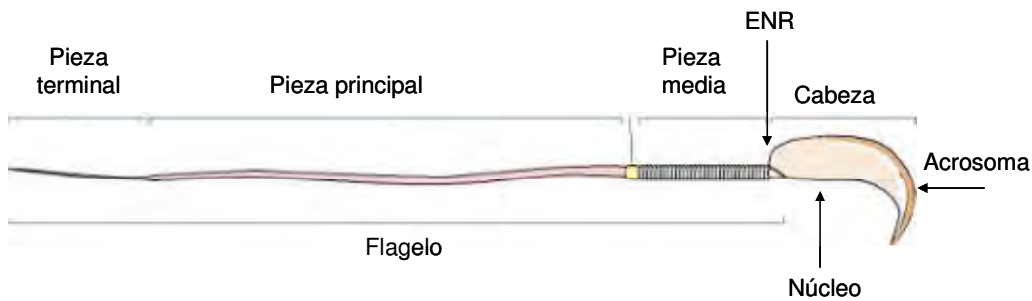


Figura 2. Estructura del espermatozoide de ratón. Se muestran los principales componentes del espermatozoide. En la cabeza se encuentra el núcleo altamente condensado y el acrosoma. En la parte posterior de la cabeza se localiza la Envoltura Nuclear Redundante (ENR). El flagelo del espermatozoide se divide en pieza media, pieza principal y pieza terminal.

El espermatozoide pasa por una serie de cambios morfofisiológicos, necesarios para que realice su función con éxito. Estos procesos fundamentales se pueden dividir en: activación de la movilidad, capacitación, y reacción acrosomal (RA). Cuando los espermatozoides de mamífero se liberan del epitelio seminífero son aún inmaduros e incapaces de tener movilidad progresiva y fertilizar al óvulo. El espermatozoide adquiere esas habilidades a medida que atraviesa el epidídimo. Durante esta etapa, denominada maduración, ocurren cambios funcionales en procesos metabólicos, entre otros, se han descrito eventos de fosforilación y desfosforilación de las proteínas motoras (microtúbulos conectados a dineínas) del axonema, que dan como resultado la activación de la motilidad [2]. Los espermatozoides que han madurado en el epidídimo son capaces de moverse activamente, pero no tienen la capacidad de fecundar. Esta la adquieren después de permanecer algún tiempo en el tracto genital femenino, durante la capacitación, en donde, entre otros cambios, se remueve el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, el pH y los niveles de Ca^{2+} intracelular se elevan, hay aumentos en la permeabilidad a K^+ , en los niveles de segundos mensajeros (AMPc, IP_3 , diacilglicerol) y se incrementa la fosforilación de un grupo de proteínas por diferentes cinasas [5]. El tercer evento importante es la RA, un proceso de excitosis que en los mamíferos consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, exponiéndose así el sitio de unión al óvulo y produciéndose la liberación de enzimas líticas acrosomales que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo [2]. Se sabe que los flujos iónicos a través de la membrana plasmática son importantes para que se lleve a cabo la RA. Estos flujos se producen a través de transportadores de membrana, como pueden ser canales iónicos, intercambiadores o ATPasas y contribuyen a modular la concentración de diversos iones. Particularmente se sabe que los flujos de Ca^{2+} , son un requerimiento absoluto para la movilidad y la RA [2].

El espermatozoide carece de retículo endoplásmico (ER) y presenta un núcleo altamente condensado, por lo que la regulación de las funciones mediante la transcripción y la traducción, son prácticamente nulas. Por lo tanto, la fisiología del espermatozoide depende principalmente de la actividad de las proteínas que generó durante el proceso de diferenciación. La regulación de dichas proteínas frecuentemente se da a través de segundos mensajeros, como el Ca^{2+} , que cumple un papel esencial en prácticamente todos los procesos intracelulares que ocurren en el espermatozoide después de la eyaculación.

El modelo actual de la RA propone a la ZP3 como el inductor natural de la RA y postula que la unión de esta glicoproteína a su(s) receptor(es) (e. g., β 1,4-galactosiltransferasa 1) ocasiona una respuesta de Ca^{2+} bifásica que involucra al menos tres tipos de canales permeables a Ca^{2+} , dos de los cuales se ubican en la membrana plasmática del espermatozoide. En el espermatozoide de ratón, la unión de la ZP3 a su receptor provoca un incremento rápido y transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que alcanza su cúspide a los 50 ms y vuelve a su estado basal en aproximadamente 200 ms [6]. La farmacología y cinética de este ingreso son consistentes con la apertura de canales de Ca^{2+} modulados por voltaje de la subfamilia 3 (Ca_v3), sin embargo evidencias recientes obtenidas con ratones nulos para al menos dos miembros de esta familia que resultan en ratones fértiles, cuestionan la participación de estos canales durante la RA [7]. El segundo incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la RA se caracteriza por ser lento y sostenido, y su duración puede ser de varios segundos e incluso minutos. El primer ingreso de Ca^{2+} ocasionado por ZP3, activa a una PLC δ 4 [8] que al metabolizar PIP2 produce diacilglicerol e IP_3 en el citoplasma. A su vez, el IP_3 se une a sus receptores ubicados en la membrana acrosomal externa y libera el Ca^{2+} que contiene éste reservorio [9]. Mediante un mecanismo aun no definido por completo, ésta liberación del Ca^{2+} ocasiona un segundo aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la apertura en la membrana plasmática de canales operados por pozas (SOCE por sus siglas en inglés Store Operated Calcium Entry o SOC) [10]. Existe un gran número de evidencias que apoyan la presencia de ésta entrada tipo SOCE en espermatozoides de mamífero y de erizo de mar, en todos los casos se observa una entrada de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} externo, que ocurre después de movilizar el Ca^{2+} de los reservorios internos [10-14]. Recientemente se reportó en estudios realizados en espermatozoides de ratón, que la cascada de señalización durante la RA continuaría con la activación de proteínas G pequeñas a través de EPAC así como el ensamble de complejos tipo SNARES que participarían en la fusión de las membranas acrosomal y plasmática [15].

Reportes previos muestran que la inhibición de los SOC disminuye la RA. Treviño *et al.*, 2006 muestran que al utilizar Ni^{2+} y SKF96365 en concentraciones inhibitorias para los SOC ocurre una disminución significativa en el porcentaje de RA al inducirla con Maitotoxina o Tapsigargina (dos fármacos que abren canales SOC) o con el inductor natural (ZP). Se ha sugerido a algunos miembros de la familia de receptores transientes canónicos (TRPC) como los canales responsables de la respuesta tipo SOC en células somáticas [16]. En el espermatozoide de ratón se expresan varios tipos de canales TRPC que se localizan en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide [17-20]. Sin embargo, recientemente se caracterizaron dos grupos de proteínas transmembranales que juegan un papel clave en la entrada operada por pozas internas en células somáticas;

STIM (con dos miembros) que funcionan como sensor de Ca^{2+} de los reservorios internos (Figura 3) y las proteínas Orai (con tres miembros) que se localizan en la membrana plasmática conformando al canal que genera corrientes altamente selectivas a Ca^{2+} (Figura 4) [21, 22]. Existen reportes en donde observan la interacción de éstas proteínas con los TRPC (Figura 6) [16, 23, 24].

Los canales SOC son de suma importancia para la RA por lo tanto, es importante determinar la identidad molecular de estos canales en el espermatozoide de ratón. La caracterización detallada de las moléculas que participan en la cascada señalización que induce la RA puede contribuir al entendimiento de ciertas patologías en los procesos de fecundación y su posible tratamiento. Así mismo, el estudio de estos procesos puede ayudar al desarrollo de anticonceptivos masculinos reversibles.

ANTECEDENTES.

Los cambios en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son una de las señales más utilizadas en las células para regular una gran cantidad de funciones celulares como la contracción muscular, la secreción y la expresión génica. Una entrada de Ca^{2+} ampliamente utilizada es la entrada de Ca^{2+} tipo SOCE que se controla por el contenido de Ca^{2+} del RE. En muchos tipos celulares, el vaciamiento de las pozas internas activa una corriente de Ca^{2+} (Hoth y Penner, 1992) (I_{CRAC}), y a la fecha es la corriente mejor caracterizada de los canales SOC. Esta corriente muestra una alta selectividad por Ca^{2+} con respecto a otros cationes [25].

La primera familia de proteínas propuesta como responsable de la corriente tipo SOC fue la de los canales TRP, los cuales al ser una superfamilia de más de 30 miembros, presentan una gran variedad en cuanto a su función, activación y regulación, pero al ser expresados de manera heteróloga, en general se caracterizan por ser canales catiónicos no selectivos, de ahí la controversia de que efectivamente los genes TRP sean los que codifiquen para la corriente I_{CRAC} (altamente selectiva a Ca^{2+}).

La reciente identificación de STIM como el sensor responsable de comunicar el vaciamiento del reservorio de Ca^{2+} a la membrana plasmática y de Orai como el canal activado por STIM que permite la entrada selectiva de Ca^{2+} explica la entrada tipo SOC (Figura 3).

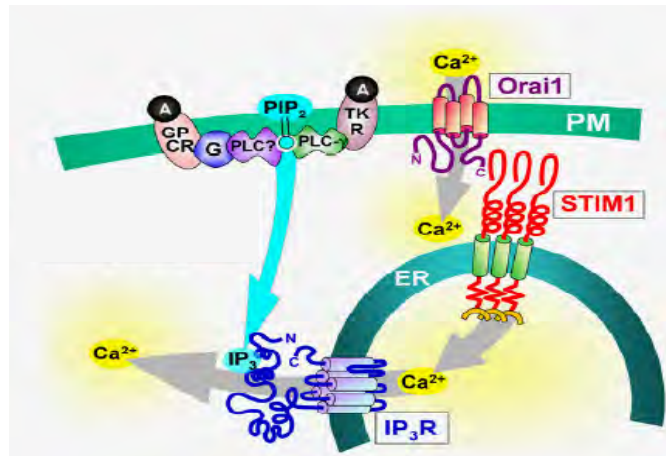


Figura 3. Mecanismo de señalización entre las proteínas STIM y Orai. Los receptores acoplados a Tirocinasas (TKR) o a Receptores acoplados a Proteínas G (GPCR) al ser activados por Agonistas (A) activan la Fosfolipasa C (PLC), la cual es capaz de catabolizar al Fosfatidil Inositol Bifosfato (PIP₂) generando Diacil Glicerol e Inositol Trifosfato (IP₃). El IP₃ es soluble en citosol y activa a su receptor (IP₃R) localizado en la membrana del Reticulo Endoplásmico (RE). El IP₃R funciona como un canal permitiendo la salida de Ca^{2+} del reservorio. La disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el lumen del RE causa que el Ca^{2+} se disocie de la mano EF de STIM1 (naranja), STIM1 se oligomeriza e interacciona con Orai permitiendo una entrada de Ca^{2+} selectiva. (Modificado de Hewavitharana et al., 2007).

El descubrimiento de la función de STIM1 se realizó de manera simultánea en dos laboratorios utilizando RNA interferente que afectaban la entrada tipo SOCE inducida por Tapsigargina, un inhibidor de las bombas SERCA del RE que genera el vaciamiento pasivo de los reservorios de Ca^{2+} y activa la entrada de Ca^{2+} [26, 27].

De manera más detallada, en respuesta a la disminución en la $[Ca^{2+}]$ del reservorio, STIM1 forma agregaciones cercanas a la membrana plasmática denominadas “puncta” que permiten la estimulación de los canales SOC (Figura 3) [28]. El N-terminal de STIM1 se localiza dentro del lumen del RE y contiene; la mano EF con afinidad al Ca^{2+} así como un *Sterile Alfa Motif* (SAM) que se sugiere como regulador de las agregaciones homoméricas [29]. En el C-terminal citosólico de STIM1, se encuentran dos regiones súper enrolladas, el dominio ERM (por sus siglas en inglés: ezrin-radixin-moesin) así como una región rica en lisina que es esencial para la activación de los canales SOC [29]. Tres estudios recientes han identificado al dominio ERM como el dominio activador esencial de los Orai [29] (Figura 4).

Cuando la $[Ca^{2+}]$ en el lumen del RE se reabastece, STIM1 colocaliza con microtúbulos, los cuales participan en la organización y remodelamiento del RE. Existen reportes donde al depolimerizar los microtúbulos, se afecta la distribución túbulo vesicular de STIM1 así como la organización estructural RE [29-31]. Además, en varios reportes se observa que los dominios ricos en prolina de STIM1 y STIM2 interactúan con la proteína de rastreo del extremo positivo de microtúbulos EB1 (End Binding Protein 1) y con la tubulina en el extremo positivo creciente de los microtúbulos [31]. Como cualquier proteína que se transporta en microtúbulos, STIM1 es capaz de recorrer largas distancias dentro de la célula. Así mismo se ha reportado que STIM1 se asocia a regiones en la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos denominadas balsas lipídicas ya que colocaliza con el gangliosido GM1 y con caveolinas [24, 32].

En *Drosophila melanogaster* y en *Caenorhabditis elegans* solo se encuentra STIM1, en anfibios, aves y mamíferos representativos se identificaron dos proteínas homólogas STIM1 y STIM2 (Figura 4) (en peces teleosteos son 4) [33, 34], lo que sugiere una duplicación génica en la transición de invertebrados a vertebrados. La secuencia del gen de STIM2 en humanos comparte un 61% de identidad con STIM1 [33].

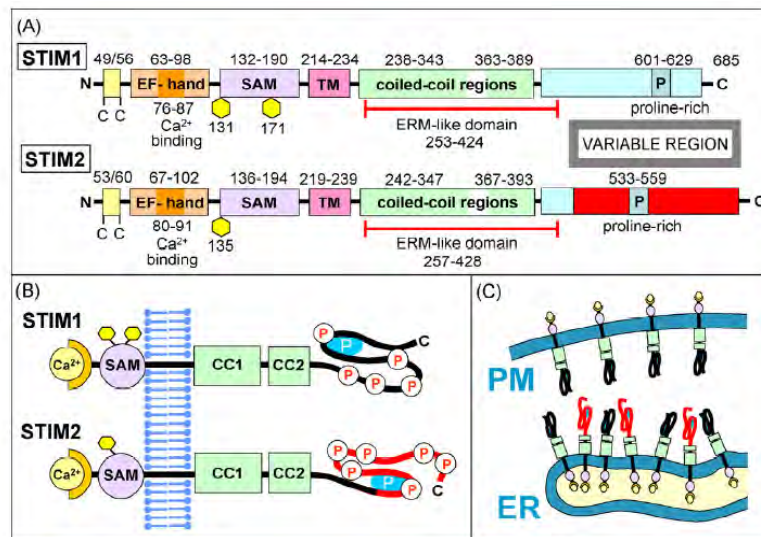


Figura 4. Estructura y distribución intracelular de las proteínas STIM. (A) Las proteínas STIM1 y STIM2 presentan una mano EF con afinidad al Ca^{2+} , un dominio SAM (Sterile Alfa Motif) con dos sitios de glicosilación en STIM1 y uno en STIM2. Presentan un dominio transmembranal, dos regiones súper enrolladas y una región variable con una zona rica en prolinas (azul) y varios sitios de fosforilación serina/treonina (P). (B) Orientación de STIM1 y STIM2 en la membrana. (C) STIM1 (C- terminal negro) se localiza tanto en membranas de los reservorios de Ca^{2+} como en la membrana plasmática mientras que STIM2 (C-terminal rojo) se localiza únicamente en el membranas de reservorios internos de Ca^{2+} (Modificada de Hewavitharana et al., 2007).

Roos et al., 2005 observó que al impedir la expresión de la proteína de STIM1, pero no de STIM2, se reduce la entrada de Ca^{2+} operada por el vaciamiento de pozas en células HeLa por lo que se pensó que STIM1 y STIM2 presentaban funciones opuestas. STIM2 activa el flujo de Ca^{2+} ante disminuciones menores en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RE. Brandman et al., 2007 realizaron un tamizaje utilizando siRNA con el objetivo de identificar los reguladores basales de la $[\text{Ca}^{2+}]$. Este grupo identificó a STIM2 como el regulador positivo más importante ya que al disminuir la expresión de STIM2 mediante RNAi, observan una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]$ basal y que al sobreexpresar STIM2, pero no STIM1, se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$ basal [35]. Las manos EF de STIM1 y STIM2 presentan afinidades al Ca^{2+} muy similares pero presentan diferentes propiedades de oligomerización [36]. Aparentemente, STIM2 presenta dos modos de operación; uno dependiente del vaciamiento de pozas y otro que es regulado por la interacción con la calmodulina [37]. Además, el ratón knockout de STIM1 presenta efectos devastadores ya que el embrión muere en el útero o inmediatamente después de nacer por falla respiratoria a pesar de que aparentan tener un desarrollo embrional normal [38] [39] mientras que el ratón knockout de STIM2 nace pero muere entre la semana 4 y 5 después de nacer [40].

La oligomerización de STIM1 activa a las proteínas Orai. La evidencia de la interacción física entre STIM y Orai se obtuvo por primera vez en estudios de co-inmunoprecipitación [41]. Posteriormente mediante transferencia de energía (FRET por sus siglas en inglés) se observó la interacción entre la molécula aceptora y donadora que se acoplaron al C- terminal de STIM y Orai1, respectivamente [42].

Orai1 se reportó y nombró por primera vez por Feske et al., en el 2006 al utilizar una combinación de mapeo de genes en una familia que padece de una inmunodeficiencia atribuida a la pérdida de función de la corriente *I_{crac}* así como en un estudio del genoma de *Drosophila melanogaster* utilizando células S2. Casi simultáneamente, otros dos grupos que también analizaban el genoma de células S2, reportaron que Orai es esencial para la entrada de Ca^{2+} operada por reservorios intracelulares y para *I_{crac}* [41] [43]. Cuando Orai y STIM se co-expresan se genera una corriente inusualmente grande de *I_{crac}* [44-46].

En mamífero se encuentran dos proteínas adicionales, Orai2 y Orai3. Orai2 funciona de manera similar a Orai1 al co-expresarse con STIM1 en células HEK293 [47]. Al igual que Orai1, Orai2 y 3 se localizan en la membrana plasmática. Cada proteína contiene cuatro segmentos transmembranales con un N y un C-terminal

citoplásmico que no presentan similitud con ningún otro tipo de canal iónico reportado hasta la fecha (Figura 5). En experimentos bioquímicos ([48, 49] las proteínas Orai se encuentran predominantemente como un dímero estable. Sin embargo, en varios estudios observan la funcionalidad del canal en una conformación de tetrámero [48, 50].

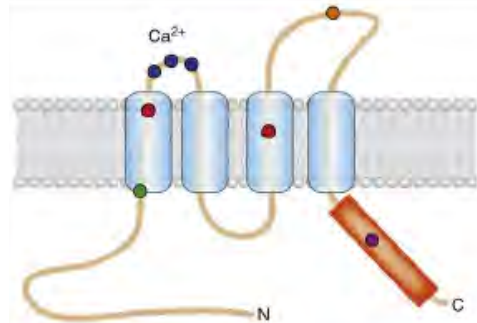


Figura 5. Características estructurales de las proteínas Orai. Presentan 4 dominios transmembranales con un N y un C terminal citoplásmico. Los residuos ácidos (Asp110 y Asp112 y Asp114 en humano) localizados en el lado extracelular entre las hélices transmembranales 1 y 2 (punto azul) y los dos residuos Glu106 y Glu190 localizados entre los segmentos transmembranales 1 y 3 (punto rojo) determinan la selectividad catiónica del poro. La región C terminal es importante para la activación por STIM1 (punto morado). Análisis de pacientes que presentan una inmunodeficiencia combinada (SCID) presentan la mutación Arg91Trp (punto verde). Únicamente Orai1 presenta un sitio de glicosilación (punto naranja). (Modificado de Varnai et al., 2008).

Las tres proteínas Orai poseen un dominio súper enrollado en el C-terminal [51] mientras que el N-terminal de Orai1 contiene una región rica en prolinas/argininas [49]. A pesar de la similitud en secuencia, las tres proteínas Orai presentan notables diferencias. Orai1 es el constituyente más importante de la entrada de Ca^{2+} en la mayoría de las células y su eliminación genera el impacto más fuerte en SOCE [47, 49]. Orai2 y Orai3 presentan corrientes entrantes similares pero de menor tamaño al coexpresarse con STIM1, además de presentar diferentes perfiles de inactivación, de permeabilidad y de sensibilidad al 2-APB, un inhibidor de las corrientes SOC [52].

Varios estudios sugieren que STIM1 y Orai pueden interactuar con proteínas TRPC y así determinar su función como canal SOC [24, 53, 54]. Los canales TRPC presentan una activación dual; generan una entrada de Ca^{2+} regulada por receptor (Receptor Operated Calcium Entry o ROCE) [55] o también pueden activar una entrada de Ca^{2+} inducida por el vaciamiento de reservorios intracelulares de Ca^{2+} (SOCE) [56]. Los canales TRPC (Figura 6), pertenecen a la gran familia de canales TRP. Los TRP están conformados por tetrámeros, cada uno con seis segmentos transmembranales, el poro de selectividad se encuentra entre el segmento 5 y 6 que permite el paso de cationes monovalentes no selectivos que en su gran mayoría permiten el paso de Ca^{2+} , el dominio TRP se encuentra del lado C-terminal y los grupos de anclaje se encuentran en el N-terminal. En general, los canales TRPC se activan por la estimulación de la PLC o por DAG.

López J.J et al., en el 2006 reportó una interacción entre STIM1 y TRPC1 en plaquetas de humano. En otro estudio se observó que el dominio citoplasmático de STIM1 se puede unir a algunos miembros de TRPC [57]. En éstos estudios demuestran que STIM1 puede activar a TRPC1 y TRPC4 y que al bloquear la expresión de STIM1 (knock-down) inhiben directamente a TRPC1, TRPC4 y TRPC5 pero no a TRPC7 [57]. La interacción funcional entre TRPC1 endógeno y STIM1 se describió en células de músculo liso, en las que al eliminar la expresión de TRPC1 se disminuye la entrada tipo SOCE [58]. Además, la sobre-expresión de STIM1 citosólica incrementa la actividad tipo SOC de TRPC1 mediante una asociación física entre estas proteínas [57].

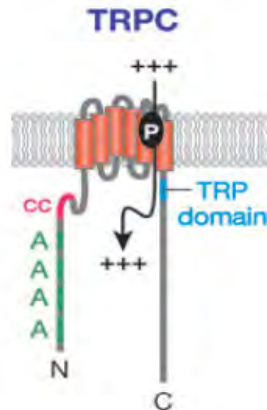


Figura 6. Estructura de los canales TRPC. En naranja se indican los seis segmentos transmembranales con el poro de selectividad (P) entre el segmento 5 y 6. En el lado N terminal se indican en verde cuatro repeticiones de sitios de anclaje (A), en rosa se indica una región súper enrollada y en azul se indica el dominio TRP del lado C-terminal (C).

Otros estudios sugieren que STIM1 regula directa o indirectamente a todos los canales TRPC, excepto a TRPC7 [59]. STIM1 parece controlar la activación de los canales TRPC vía receptor, pero no afecta la conducción iónica de los canales *per se* [59]. Además, la heteromultimerización dependiente de STIM1 de canales TRPC (1 con 3; 4 con 6, etc.) confiere al canal resultante propiedades tipo SOC.

Recientemente se sugirió el papel de las balsas lipídicas en la formación de los complejos STIM1-TRPC1 así como la regulación de los SOC [32]. Datos experimentales sugieren que la formación del complejo macromolecular SOC se realiza en balsas lipídicas de membrana plasmática [32, 60]. Incluso, hay evidencias sólidas donde la disrupción de balsas lipídicas afecta a SOCE [24, 61, 62].

Con base en todas estas evidencias Vaca en el 2010 propone un gran complejo macromolecular que participa en SOCE y que renombra como el Complejo de Entrada de Ca^{2+} Operado por Pozas Internas (SOCIC por sus siglas en inglés, Store Operated Calcium Influx Complex). En este complejo macromolecular, además de incluir a STIM, Orai y TRPC1, incluye a; la bomba SERCA, a EB1, a la calcio calmodulina (CaM), y a las balsas lipídicas. Se considera la bomba SERCA como miembro del complejo SOCIC ya que al inducir el vaciamiento de la poza utilizando Tapsigargina (Tg), un inhibidor de SERCA, se observa mediante FRET que STIM interacciona con Orai

y posteriormente SERCA rodea al complejo facilitando el reabastecimiento de la poza [63]. El otro miembro de SOCIC que se considera es la calmodulina (CaM), una proteína de bajo peso molecular que regula la transducción de la señal de Ca^{2+} en la mayoría de las células eucariotas. La CaM actúa como receptor para Ca^{2+} , ya que presenta cuatro sitios de unión al ion Ca^{2+} con una alta afinidad, pero siempre de forma reversible. Ésta se asocia a diferentes proteínas y en su estado unido a Ca^{2+} , modula sus actividades. Hace varios años se reportó que CaM modula SOC en el epitelio vascular [64] y a los TRPC (Montell, 1997) y recientemente se demostró que CaM modula SOCE controlando la comunicación entre RE y la activación de la entrada de Ca^{2+} [65]. Mullins et al., 2009 demostró que CaM y STIM interaccionan con Orai para inducir la inactivación dependiente de Ca^{2+} de los canales ICRC. Estos reportes proponen una nueva definición de los canales SOC que incluye nuevas entidades moleculares responsables de conferirles sus propiedades.

HIPÓTESIS.

Las proteínas STIM y Orai son componentes moleculares de los canales tipo SOC que participan en la RA en el espermatozoide de ratón.

OBJETIVOS.

- a) Identificar la presencia del mensajero de los genes STIM1, STIM2, Orai1, Orai2, Orai3 en células espermátogénicas de ratón mediante RT-PCR.
- b) Identificar mediante Western Blot las proteínas STIM1, STIM2, Orai1, Orai2, Orai3 en espermatozoides de ratón.
- c) Localizar mediante inmunocitoquímica a las proteínas STIM1, STIM2, Orai1, Orai2, Orai3 en espermatozoides de ratón y humano.
- d) Hacer ensayos de RA utilizando inhibidores disponibles de los SOC en espermatozoides de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Separación de células espermatogénicas por gravedad unitaria (STA-PUT).

[66]

Para cada separación, se sacrificaron mediante dislocación cervical diez ratones (*Mus musculus*, cepa CD1) de tres meses de nacidos, edad en la que se encuentran enriquecidas las células espermatogénicas de los últimos estadios de diferenciación (Espermatocitos en Paquiteno, Espermátidas Redondas y Espermátidas Condensantes). Se obtuvieron los testículos y se colocaron en medio EKRБ (120mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 4.8mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 1.3mM CaCl₂, 11mM glucosa; pH = 7.6, aminoácidos esenciales y no esenciales). Retiramos la túnica que los cubre los testículos. En 40 ml de medio, agregamos 15mg de colagenasa e incubamos a 33°C en agitación constante para disociar los túbulos seminíferos. Dejamos sedimentar en hielo y lavamos tres veces por decantación con 10ml de EKRБ. En 40ml de medio, agregamos 20mg de tripsina, 200µl de DNasa 20 µg/ml y agitamos a 33°C durante 15min. Con ayuda de un bulbo de plástico liberamos las células espermatogénicas de los túbulos seminíferos. Filtramos a través de una maya de Nitex de 80µm sobre un tubo que contiene 10ml de EKRБ con 0.5% de BSA y agregamos al filtrado 1.5mg del inhibidor de tripsina para detener la actividad de la tripsina. Centrifugamos a 1500rpm durante 10min y desechamos el sobrenadante. Resuspendimos las células en EKRБ 0.5 % de BSA a un tubo nuevo y las lavamos 2 veces más con el mismo medio. Filtramos nuevamente las células antes de cargarlas en el gradiente de BSA. Preparamos un gradiente lineal del 2 al 4%, se cargan las células. Esperamos 2 horas para que las células se separen migrando en el gradiente por gravedad. Colectamos 120 fracciones de 10ml/min. Centrifugamos las fracciones 8min a 1500rpm 4°C. Aspiramos 7ml del sobrenadante y con los 3ml restantes resuspendimos el pellet. Tomamos 10µl cada 2 fracciones y observamos al microscopio para identificar los diferentes estadios de diferenciación (Bellevé, A.R. 1993). Colectamos fracciones enriquecidas (85-95%) de espermatocitos en paquiteno, espermátidas redondas y condensantes para obtención de RNA.

Obtención de RNA y síntesis de cDNA.

Aislamos RNA a partir de poblaciones purificadas de células espermatogénicas utilizando el reactivo comercial Tri Reagent (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, resuspendimos la pastilla de células en 1-2ml de Tri Reagent, agregamos 0.2ml de cloroformo por cada ml de TRI Reagent, agitamos vigorosamente y dejamos reposar 15min a temperatura ambiente. Centrifugamos la mezcla a 12,000g durante 15min a 4°C. La centrifugación separa la mezcla en tres fases; una fase orgánica roja que contiene proteínas, una interfase que contiene DNA y una fase acuosa incolora que contiene RNA. Transferimos la fase acuosa a un tubo fresco y agregamos 0.5ml de Isopropanol por cada ml de Tri Reagent utilizado, mezclamos e incubamos a temperatura ambiente durante 15min. Centrifugamos a 12 000g por 10min a 4°C. El RNA precipitado forma una pastilla en el fondo del tubo. Retiramos el sobrenadante y lavamos la pastilla de RNA con 1ml de etanol

al 75% en agua DEPC (0.01 ml de Dietilpirocarbonato por cada 100 ml de agua) por cada ml de Tri Reagent utilizado. Centrifugamos a 7,500g durante 5min a 4°C y resuspendimos la pastilla de RNA en agua DEPC. La calidad del RNA total obtenido la visualizamos mediante electroforesis en un gel de agarosa donde se deben observar dos bandas principales que corresponden a los RNA que codifican para las dos subunidades ribosomales (Figura 8). El cDNA se sintetizó utilizando el kit SuperScript first strand synthesis system de Invitrogen a partir de RNA total utilizando oligo dT y las instrucciones del fabricante.

Usamos las secuencias de los genes de interés reportadas en NCBI para diseñar los oligos correspondientes por medio de un programa llamado "PRIMER PREMIER". Este programa nos permitió diseñar una gran cantidad de pares de oligos y seleccionar los que presenten las mejores propiedades para PCR (sin estructuras secundarias o posibilidad de dimerizaciones, tamaño adecuado, Tm, etc). (Tabla 1)

Oligo	Secuencia	TM óptima	Tamaño esperado
Stim1	sense 5' TTG ACT CGG CAT AAT 3' anti 5' CTC AGG AGC AGC ATA CCA T 3'	49.5°	423pb
Stim2	sense 5' TGA GAA ACA ATG GGA AGT 3' anti 5' TAA ATA GGC GGA AAG AAC 3'	52°	748pb
Orai1	sense 5' TGG TAG CGA TGG TG 3' anti 5' GCT CCT GGA ACT GC 3'	52.3°	519pb
Orai2	sense 5' CAC AAG GGC ATG GAT TAC 3' anti 5' GAA GAC CAC GAA GAT GAG AC 3'	56.1°	570pb
Orai3	sense 5' CAT ATT GAA GCC GTG AGC 3' anti 5' GGA TCG GTA GAA ATG TAG GG 3'	53.4°	429pb

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de nuestros genes de interés. A partir de las secuencias de los genes de interés reportadas en NCBI se diseñaron los oligos correspondientes utilizando el programa "PRIMER PREMIER". Este programa nos permite diseñar una gran cantidad de pares de oligos y seleccionar los que presenten las mejores propiedades para PCR (sin estructuras secundarias o posibilidad de dimerizaciones, tamaño adecuado, Tm, etc).

En la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), el cDNA de cada tipo celular se usó como templado de los oligos diseñados específicamente para nuestros genes de interés. El programa de PCR incluye 35 ciclos de amplificación, cada ciclo consta de incubaciones a 95°C 1 min, 55-58°C 1min y 72°C por 30seg. Los amplímeros se detectaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y expuesto a la luz UV. Se cortaron las bandas de interés del gel y purificamos el DNA mediante un kit de Qiagen y mandamos a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La identidad de las secuencias se estableció utilizando la base de datos del programa del NCBI-BLAST.

Obtención de espermatozoides.

Para cada experimento sacrificamos el número de ratones indicado en cada protocolo y extraímos los epidídimos, les hicimos un corte, los colocamos en un tubo de 2ml y agregamos 1ml de medio Whittens (1.2mM KH_2PO_4 , 1.2mM MgSO_4 , 5.4mM Dextrosa, 0.8mM Ácido Pirúvico, 4.8mM de Ácido Láctico, 20mM HEPES, 100mM NaCl, 4.7mM KCl, 25mM NaHCO_3 , 2mM CaCl_2 , BSA 5mg/ml). Incubamos a 37°C durante 10min. Tomamos 10 μ l de la parte superior, que contiene a los espermatozoides motiles y los diluimos en 990 μ l de H_2O . En la cámara de conteo celular colocamos 10 μ l de ésta dilución y cuantificamos el número de células presentes en el cuadrante central, se multiplican por el factor de dilución (100) y por el factor de la cámara (10,000). El número de células debe ser mayor o igual a 15 millones de células por ml.

Western Blot

Para cada experimento sacrificamos cuatro ratones (ver obtención de células). Tomamos 800 μ l de células que están a en una concentración de 15 millones de células por ml. Centrifugamos las células 1,500rpm durante 3min, desechamos el sobrenadante y agregamos a la pastilla 1ml del amortiguador de lisis (NP-40 1%, PMSF 1mM, Pestatina 1 μ g/ml, Leupeptina 2 μ g/ml, Aprotinina 4 μ g/ml, Benzamidina 50 μ g/ml, Inhibidor de Tripsina 10 μ g/ml, Complete 10 μ l/ml, Iodoacetamida 100 μ g/ml), resuspendemos las células y vertemos la muestra en un homogenizador de vidrio y damos 10 golpes a 4°C. Incubamos la muestra 20min a 4°C. Transferimos la muestra a tubos y centrifugamos a 14,000rpm 20min a 4°C. Recuperamos el sobrenadante y cuantificamos la concentración de proteína por el método de Bradford. Preparamos 2 minigeles de poliacrilamida SDS preparando el gel separador al 10% (2.5ml del Amortiguador pH 8.8, 3.3ml Acrilamida/Bis, 4.0ml del H_2O , 6 μ l TEMED y 72 μ l de Persulfato de Amonio (APS) al 20%). Una vez polimerizado agregamos el gel condensador al 4.5% (1ml del Amortiguador pH 6.6, 600 μ l de Acrilamida/Bis, 2.36ml de H_2O , 2.5 μ l de TEMED y 18.75 μ l del APS al 20%). En cada carril colocamos 500 μ g de proteína que calentamos previamente a 65°C 5min y corremos durante 2hrs a 100 volts en un amortiguador de corrida. Transferimos las proteínas electroforéticamente del gel a una membrana de Inmobilon P (Millipore) pretratadas en metanol, aplicando una corriente de 0.5 A durante 60min en semi-seco (Bio-Rad) utilizando un amortiguador de trasferencia (190 mM glicina, 25mM Trisma base, pH 8.6). Posteriormente bloqueamos los sitios de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos utilizando leche descremada al 3% con FBS al 0.1% disuelto en TBS-T. Incubamos estas membranas toda la noche a 4°C con cada uno de nuestros anticuerpos en una concentración de 1:100 (ProSci Inc o Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente incubamos con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology), la cual, cataliza la oxidación del luminol (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate detection of HRP Pierce Protein Research Products) en presencia de peróxido de hidrógeno. Ésta reacción se produce sobre una película auto radiográfica.

Purificación de Zona Pelúcida (ZP) de ratón.

Extrajimos los ovarios de 40 ratones hembra y los colocamos en hielo seco que almacenamos a -80°C hasta su preparación (periodo no mayor a un mes). Al momento de descongelarlos, colocamos los vasos de precipitados que contienen los ovarios en hielo (4°C). Agregamos 6ml de buffer de homogenización 1X a 20 ovarios (10X: 250mM Tris, 1500mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 10mM CaCl_2 , azida de sodio 0.2%; el medio se ajusta a pH 8.5), al cual antes ya se le agregó DNAsa 0.6mg/ml, inhibidor de tripsina mg/ml, hialuronidasa 0.6mg/ml (preparar 12ml, pesar 12mg de DNAsa y de hialuronidasa, 1.2mg del inhibidor de tripsina). Licuamos todo con ayuda de un homogenizador eléctrico durante 5 segundos. Agregamos 300 μl del stock del detergente NP-40 20% para llevar a una concentración final de 1% (Stock 20%, almacenar 4°C). Homogenizamos nuevamente con el homogenizador eléctrico durante 5 segundos. Disociamos el tejido con el homogenizador de émbolo sin retirar del hielo. Adicionamos 300 μl deoxicolato de sodio 20% para llegar a una concentración final del 1% en la muestra machacada y volvimos a utilizar el homogenizador de émbolo. En un tubo con rosca para centrifuga de 10ml agregamos 3.8ml de percoll al 90%. Encima del percoll agregamos la muestra homogenizada y agregamos percoll al 35% hasta llenar el tubo, agitamos vigorosamente. Centrifugamos a 19000rpm durante 1hr a 12°C . Separamos del gradiente las ZP con la aguja de una jeringa y las colocamos en un tubo de 15ml. Agregamos 15ml del medio 2 (150mM NaCl, 25mM Tris; el medio se ajusta a pH 8.5). Agregamos 75 μl de NP-40 y llenamos por completo el tubo falcon de 15ml con medio 2. Centrifugamos a 5000rpm durante 15min 4°C . Desechamos el sobrenadante y resuspendimos en medio 2, colocamos 250 μl primero y resuspendimos la pastilla, luego agregamos otros 250 μl . Centrifugamos la muestra a 8000rpm durante 10min. Se resuspende la pastilla en 40 μl de PBS/glicerol 50% y observamos al microscopio. Congelamos las muestras y las solubilizamos el mismo día del experimento.

Ensayos de Reacción Acrosomal

Sacrificamos 1 ratón (ver obtención de células). Para la RA se necesitan de 4-6 millones de células por ml, de no haber suficientes se sacrifica otro ratón. Las células se capacitan en medio Whittens (1.2mM KH_2PO_4 , 1.2mM MgSO_4 , 5.4mM Dextrosa, 0.8mM Ácido Pirúvico, 4.8mM de Ácido Láctico, 20mM HEPES, 100mM NaCl, 4.7mM KCl, 25mM NaHCO_3 , 2mM CaCl_2 , BSA 5mg/ml) 40min a 37°C . Los espermatozoides capacitados los dividimos en alícuotas de 30-50 μl . Sin retirarlos de la incubación a 37°C , adicionamos los inhibidores (Tabla 3) de los SOC y 10min después inducimos la reacción acrosomal (RA) con A-23187 15 μM o Tapsigargina 10 μM (Tg) o Zona Pelúcida (5ZP/ μl solubilizada 1hr a 60°C) e incubamos 30min más a 37°C . Agregamos formaldehído 10% disuelto en PBS en relación 1:1 llevando a una concentración final de 5% (30 μl). Incubamos 10min a temperatura ambiente para permitir la fijación. Centrifugamos 6min a 3000rpm, desechamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla en 30 μl de PBS, colocamos 20 μl de la muestra sobre un portaobjetos, Expandimos la gota con la punta y dejamos secar. Una vez seca, colocamos azul de coomassie R-250 y dejamos reposar unos segundos. Agregamos 10 μl de PBS/glicerol 1:1, colocamos el cubreobjetos, retiramos el exceso presionando el cubreobjetos

con papel y contamos al menos 100 células utilizando microscopia en contraste de fases para obtener el porcentaje de células reaccionadas (Figura 7).

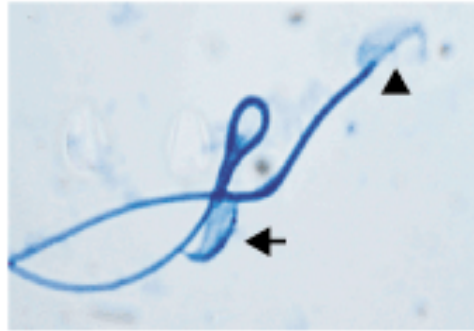


Figura 7. Cuantificación de la Reacción Acrosomal. Los espermatozoides se tiñen con azul de Coomassie el cual se une a determinados aminoácidos (arginina, histidina y aminoácidos aromáticos) tiñendo el acrosoma de las células. La flecha señala un espermatozoide no reaccionado. La cabeza de flecha indica un espermatozoide reaccionado.

Inmunofluorescencia Indirecta.

Tomamos 1ml de células (ver obtención de células) ($15\text{-}30 \times 10^6/\text{ml}$) y les agregamos 1ml de paraformaldehído al 8% disuelto en PBS. Colocamos las laminillas (TGH-virology de 3 pozos) en la cámara húmeda. Agregamos 120 μl de las células en paraformaldehído en cada pozo, extendiendo la gota y dejamos reposar 1hr a temperatura ambiente. Retiramos el paraformaldehído e hicimos 3 lavados con PBS con intervalos de 5min entre cada uno. Dejamos secar la muestra al aire y posteriormente permeabilizamos adicionando 100 μl de tritón al 0.1% e incubamos 10 min, hicimos 3 lavados con PBS con intervalos de 5min entre cada uno de los lavados. Al terminar el último lavado incubamos con 100 μl de gelatina al 5% durante 2hrs a temperatura ambiente. Incubamos los anticuerpos primarios con sus correspondientes péptidos antigénicos para realizar los experimentos control en una proporción 1:100 (en peso). Transcurridas las dos horas, agregamos los anticuerpos y los anticuerpos preincubados con los péptidos y se dejaron toda la noche en el cuarto frío. Al día siguiente, centrifugamos a 14,000rpm 4°C el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes Inc) durante 20min. Mientras tanto, retiramos los anticuerpos primarios haciendo 3 lavados con PBS con intervalos de 5min entre cada uno. Diluimos el anticuerpo secundario 1:100 en PBS, incubamos 1hr a temperatura ambiente. Retiramos el anticuerpo secundario e hicimos 3 lavados con intervalos de 5min entre cada uno. Agregamos 10 μl de citifluor, colocamos el cubreobjetos y sellamos con barniz de uñas transparente. Las imágenes se analizaron en un microscopio confocal de fluorescencia Bio-Rad MRC600, laser Kr-Ar, con tres líneas de excitación a 488nm, 568nm y 647nm., adaptado a un microscopio de epi-fluorescencia Axioskop de Zeiss de óptica infinita, con objetivo 40X/0,75 Ph2, DIC y 100X/1,3 Ph3 oil. Tiene acoplado un motor-Z para realizar cortes ópticos, un digitalizador de imágenes y cámara fotográfica. Asimismo, cuenta con software especializado para la reconstrucción de imágenes 3-D.

Análisis Estadístico.

Para evaluar el nivel de significancia de los datos aplicamos el análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post.hoc de comparación múltiple Tukey-Kramer. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ * $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Para explorar la expresión mediante biología molecular de los genes STIM y Orai se debe usar células espermatogénicas, ya que los espermatozoides maduros carecen de la maquinaria de síntesis de RNA y proteínas. El testículo contiene varios tipos celulares, por lo que es necesario separar las células espermatogénicas. Esta separación se logra mediante el sistema llamado STA-PUT o separación por gravedad unitaria. La separación consiste en pasar un homogenado testicular por un gradiente lineal de BSA y mediante gravedad se separan por tamaño y forma (ver materiales y métodos). Después de la separación de células espermatogénicas se obtuvo RNA total de los estadios de Paquiteno, Espermátidas Redondas y Espermátidas Codensantes y se verificó el estado y la integridad del mismo mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% (Figura 8).

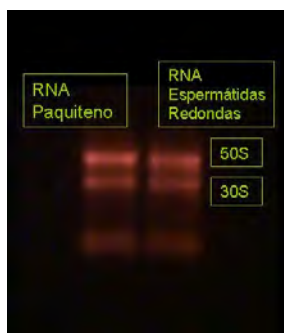


Figura 8. Electroforesis de RNA en gel de agarosa al 1%. La calidad del RNA total obtenido se visualiza mediante electroforesis en un gel de agarosa donde se observan dos bandas principales que corresponden al RNA que codifican para las dos subunidades ribosomales 50S y 30S lo que nos indica una buena integridad del RNA total.

El cDNA se sintetizó a partir del RNA aislado mediante la técnica de transcripción reversa, utilizando el Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase de invitrogen. La reacción de PCR se realizó poniendo en contacto el cDNA con los cebadores diseñados específicamente (Tabla 1) para nuestros genes de interés. Utilizamos RNA de los estadios de Paquiteno, Espermátidas Redondas y Espermátidas Condensantes y obtuvimos resultados similares en todos los casos (Figura 9).

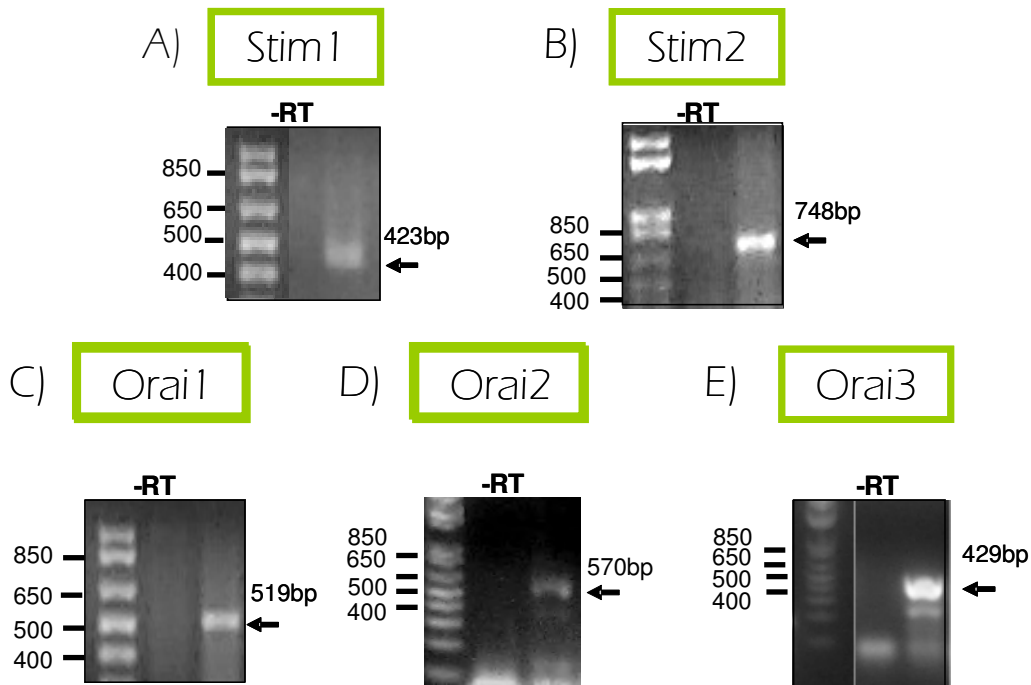


Figura 9. Los dos genes de STIM y los tres de Orai se expresan en células espermatozógenas. Se realizaron experimentos de RT-PCR aislando RNA de células espermatozógenas. Se muestra la electroforesis en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados para STIM1 (A), STIM2 (B), Orai1 (C), Orai2 (D) y Orai3 (E). En cada gel se indica (flecha) la banda amplificada y el tamaño en pares de bases (pb) con el siguiente orden de carga de izquierda a derecha; marcadores de peso molecular, control negativo para cDNA (sin reverso transcriptasa), cDNA de células espermatozógenas en estadio de Espermatóidas Redondas (n>3.)

Las bandas del tamaño esperado se purificaron y se mandaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología. Mediante una comparación con las bases de datos (BLAST) usando el programa público del NCBI determinamos el porcentaje de identidad de cada una de nuestras secuencias (Tabla 2).

	Tamaño	% identidad
STIM1	423pb	99%
STIM2	748pb	99%
Orai1	519pb	99%
Orai2	570pb	99%
Orai3	429pb	98%

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las secuencias obtenidas y el gen de interés.

Los resultados de PCR demuestran que los mensajeros para las proteínas de interés se expresan en células espermatozógenas. Para explorar si la proteína está presente en espermatozoides maduros, se preparó un homogenado proteico total de espermatozoides separados por swim-up. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y 15% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nylon para realizar ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos primarios específicos (Pro Science, Inc.) contra cada una de nuestras proteínas de interés en una dilución 1:250. Las señales se obtuvieron con anticuerpos secundarios acoplados a HRP (peroxidasa de rábano) y con el kit de quimiolumiscencia ECL y se expusieron en un Hiper-film-βmax (Figura 10).

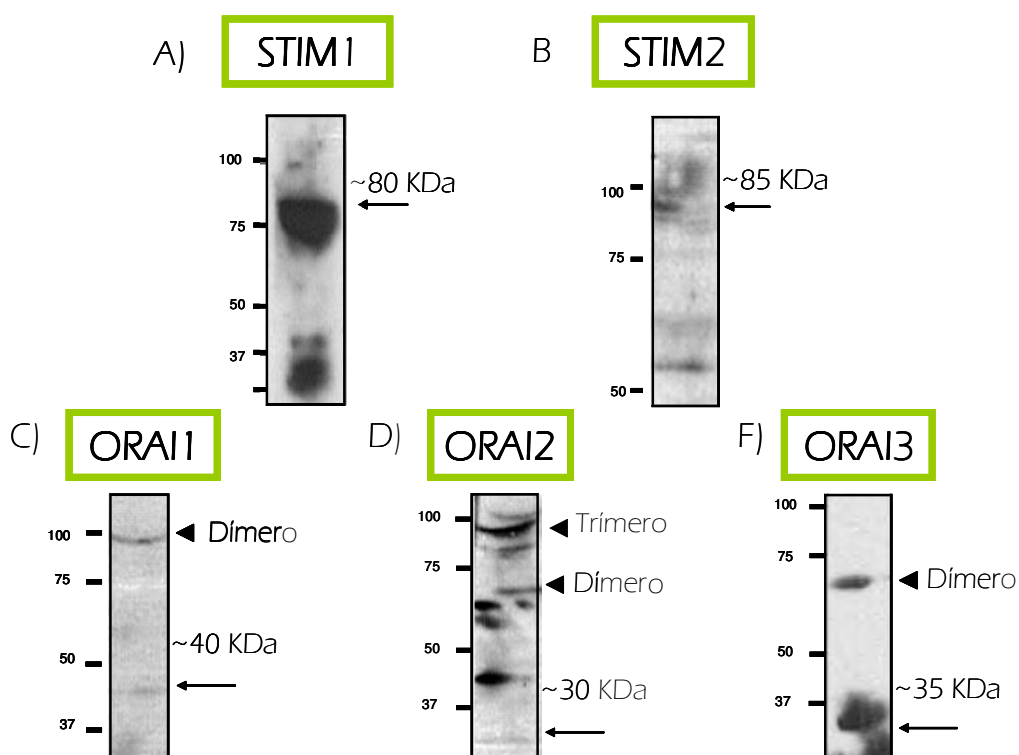


Figura 10. Detección de STIM y Orai en homogenados proteicos de espermatozoides de ratón mediante Western blot. Obtuvimos el homogenado proteico total de espermatozoides separados por swim-up. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nylon para realizar ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra STIM1 (A), STIM2 (B), Orai1 (C), Orai2 (D) y Orai3 (E). Se indican las bandas del tamaño esperado para cada proteína. STIM1 (n=3), STIM2 (n=3), Orai1 (n=4), Orai2 (n=3) y Orai3 (n=6).

En el caso de STIM1 identificamos una intensa banda del tamaño esperado de 80KDa junto con dos bandas entre 30 y 40 KDa. En STIM2 se observa la banda esperada de 85KDa y dos bandas tenues entre 60 y 70 KDa (Figura 10 A y B). Con el anticuerpo antiOrai1 detectamos una banda muy tenue del peso esperado (40kDa) junto con una banda de aproximadamente 90KDa que podría ser la detección del dímero (Fig. 9C). En Orai2 observamos muy tenuemente la banda del peso esperado (30KDa) además de

varias bandas adicionales de mayor peso molecular, la de 60 y 90 KDa podrían corresponder al dímero y al trímero, respectivamente, las demás pueden indicar inespecificidad del anticuerpo o la interacción de Orai2 con otras proteínas (Fig. 9D). En la figura 10E se observan dos bandas muy claras; una de ellas del peso esperado 35KDa para Orai3 y la segunda en 70KDa que podría ser el dímero. En todos los casos, al incubar el anticuerpo con el péptido observamos una disminución en la intensidad de las bandas compitiendo de manera parcial a excepción de Orai3, donde la competencia con el péptido es total (Apéndice I).

A pesar de que en todos los casos pudimos detectar bandas del peso esperado, los controles de especificidad no nos permitieron concluir de manera definitiva la presencia de las proteínas en espermatozoide de ratón. Para resolver esto, decidimos tratar de validar los anticuerpos de ProScience en otro tipo celular. Probamos los anticuerpos con un homogenado de células HEK293, donde se ha reportado la presencia de todas nuestras proteínas de interés de manera endógena (Figura 11).

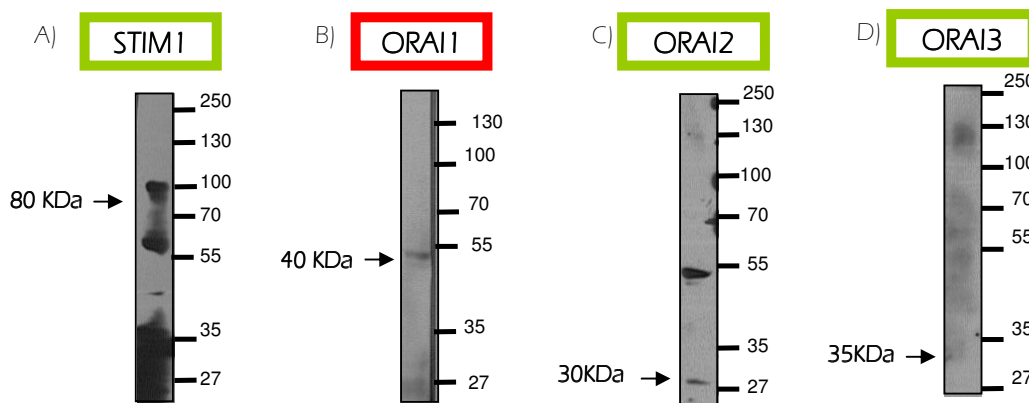


Figura 11. Detección de STIM1, Orai1, Orai2 y Orai3 en células HEK293. Se preparó un homogenado proteico total de células HEK292. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nylon para realizar ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra STIM1 (A), Orai1 (B), Orai2 (C) y Orai3 (D). Las flechas indican las bandas del tamaño esperado para cada proteína. Verde, tamaño del peso esperado. Rojo, fuera del peso esperado. STIM1 (n=3), Orai1 (n=4), Orai2 (n=3) y Orai3 (n=6).

En los homogenados proteicos totales de células HEK293 observamos para STIM1 la banda del peso esperado junto con una serie de bandas que van desde los 27KDa hasta los 100KDa. Para el caso de STIM2 (n>3) no logramos detectar una banda. Para Orai1 detectamos una banda intensa a los 50KDa, que esta fuera del peso esperado (40KDa). Para Orai2 detectamos la banda del peso esperado en 28KDa y otra más en 50KDa que podría representar al dímero. Finalmente, para el caso de Orai3 obtuvimos un patrón de bandeado muy difuso. Este último set de experimentos se realizó para corroborar la especificidad de los anticuerpos, desafortunadamente los resultados no fueron totalmente satisfactorios y decidimos adquirir otro set de anticuerpos de la compañía Santa Cruz Biotechnology con sus respectivos

péptidos y repetimos todos los experimentos. Lamentablemente con éste nuevo set de anticuerpos no obtuvimos mejores resultados (no mostrado).

Dado que el set de anticuerpos de ProScience fue mejor que el de Santa Cruz, fue el que usamos para los experimentos de inmunocitoquímica y tratar de determinar la localización subcelular de éstas proteínas en el espermatozoide de ratón. En la figura 11 podemos observar que la región del acrosoma se tiñe con STIM1, STIM2 y Orai2. STIM2 y Orai3 se observan en pieza media y Orai3 también tiñe la parte posterior de la cabeza. En estos casos, el anticuerpo compite con el péptido y no se observa señal al incubar sólo el anticuerpo secundario (Apéndice II). Para el caso de Orai1, el anticuerpo no compite con el péptido por lo que no podemos concluir con exactitud la localización celular de ésta proteína (no mostrado).

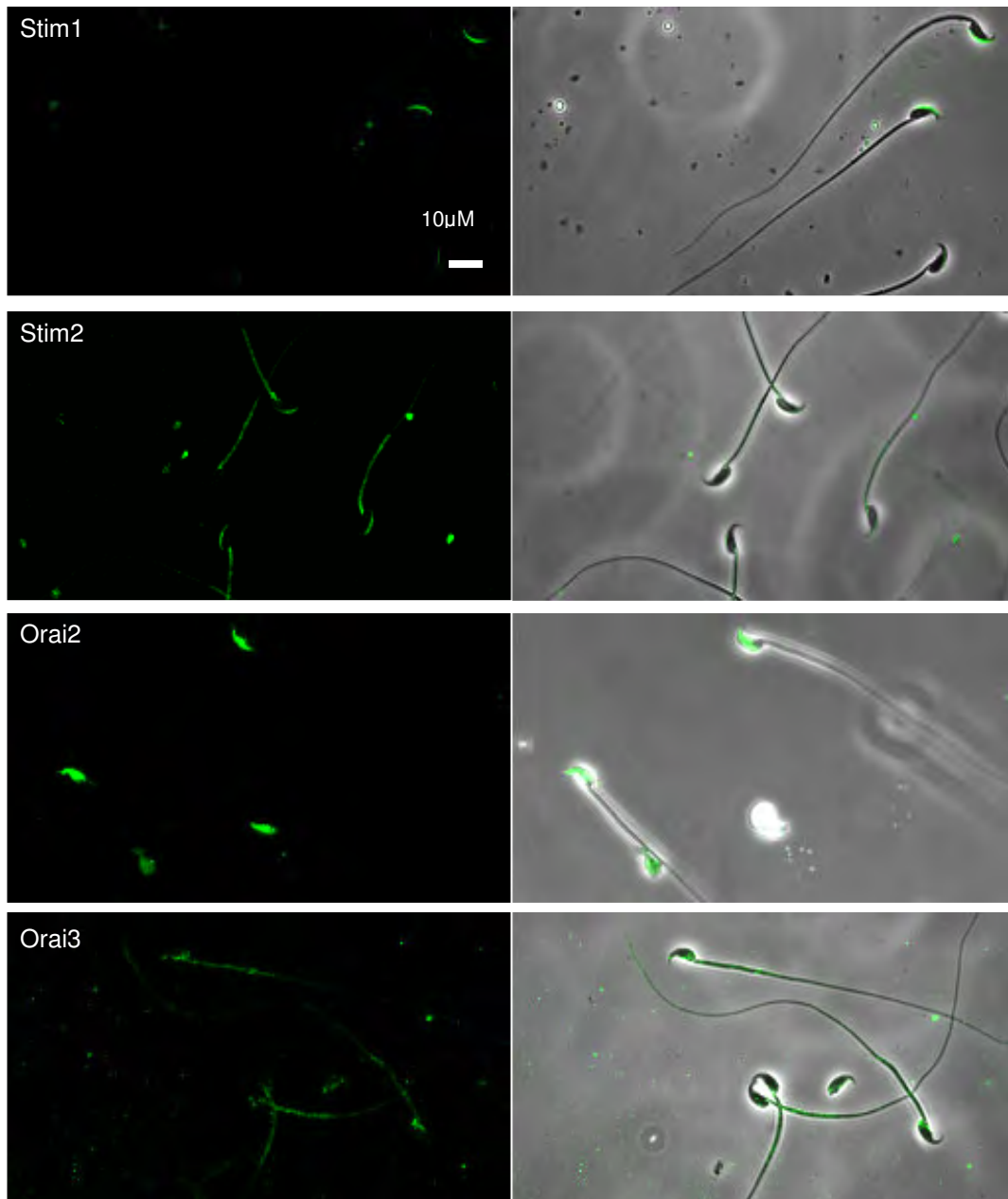


Figura 12. Inmunolocalización de las proteínas STIM & Orai en espermatozoides de ratón. Espermatozoides separados por swim-up se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos específicos para cada proteína de interés usando como anticuerpo secundario Alexa 488. Se muestran imágenes representativas de fluorescencia (izquierda) obtenidas con cada anticuerpo junto con la sobreposición correspondiente de contraste de fases (derecha). STIM1 se localiza en la región acrosomal; STIM2 en región acrosomal y en pieza media; Orai2 en la región postacrosomal mientras que Orai3 se observa en la parte posterior de la cabeza y en pieza media. Controles incubando solo con el anticuerpo secundario o con el péptido antigénico no mostraron tinción (Apéndice II). STIM1 (n=4), Orai2 (n=3) y Orai3 (n=2).

En el laboratorio también utilizamos el modelo de espermatozoide de humano para tratar de entender la fisiología del espermatozoide, no se sabe nada acerca de la presencia de estas proteínas por lo que decidimos de manera comparativa utilizar la misma batería de anticuerpos en espermatozoides humanos. Localizamos a STIM1 en el acrosoma y pieza media, a STIM2 en pieza media y en la parte posterior de la cabeza, a Orai2 principalmente en la región del acrosoma y Orai3 tiñe prácticamente todas las regiones de la célula (Figura 13). Orai1 no compitió con su péptido específico y por lo tanto no podemos determinar su ubicación en el espermatozoide (no se muestra).

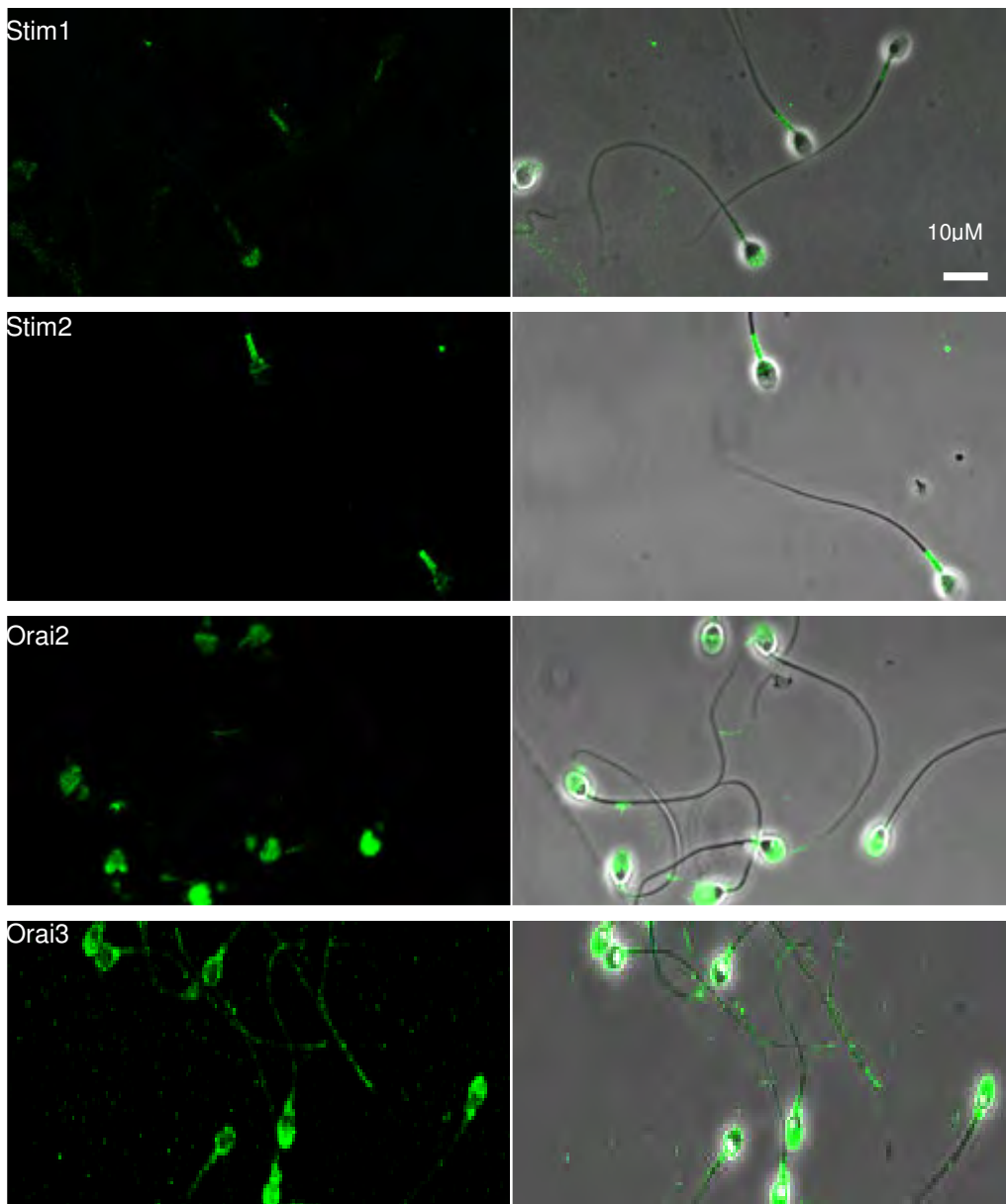


Figura 13. Inmunolocalización de las proteínas STIM & Orai en espermatozoides de humano. Espermatozoides separados por swim-up se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos específicos para cada proteína de interés usando como anticuerpo secundario Alexa 488. Se muestran imágenes representativas de fluorescencia (izquierda) obtenidas con cada anticuerpo junto con la superposición correspondiente de contraste de fases (derecha). STIM1 se localiza en cabeza y pieza media; STIM2 en la región post acrosomal y pieza media; Orai2 en la región acrosomal; Orai3 se observa tanto en la cabeza como en el flagelo. Controles incubando solo con el anticuerpo secundario o con el péptido antigénico no mostraron tinción (no mostrados). STIM1 (n=2), STIM2 (n=2) y Orai2-3 (n=2).

Finalmente, quisimos realizar ensayos funcionales que nos permitieran relacionar la presencia de estos canales con su participación en la fisiología del espermatozoide. Para lo cual, medimos RA en presencia de inhibidores que se han reportado como específicos o sugerentes de la participación de los SOC's y/o canales STIM/Orai (ver Tabla 3). Con este propósito, los espermatozoides de ratón se capacitaban durante 30min a 37°C, se incubaron 10min con los inhibidores y posteriormente incubamos 30 minutos más con los inductores de la RA: (ZP el inductor fisiológico) o con Tapsigargina, un inhibidor de la ATPasa de Ca²⁺ del retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA) que mimetiza la apertura de canales SOC por el vaciamiento de ésta poza e induce la excitosis del acrosoma. Las células se fijaron, se tiñeron con azul de Coomassie para cuantificar el porcentaje de la RA al microscopio (Figura 14 y 15).

Reactivo (µM)	Blanco	Efecto	Referencia
SKF96365			
10	SOC	Inhibición	Hirohashi & Vaquier, 2003
Gd³⁺			
1	Orai	Bloqueo	Luo et al., 2001, Bird et al, 2008
100	TRPCs	Bloqueo	Luo et al., 2001
ML-9			
IC50 10	STIM1	Impide movimiento	Smyth et al., 2008
2- APB			
3	SOC	Potenciación	DeHaven et al., 2008
50	STIM	Inhibición	Peinelt et al., 2008
50	Orai1	Inhibición rápida	
50	Orai2	Inhibición lenta	
50	Orai3	Potenciación	Schindl R, et al. 2008
50	Orai1	Activación transitoria	
IC50 42	IP ₃ R	Inhibición	Maruyama et al., 1997

Tabla 3. Reactivos que afectan la actividad de las proteínas STIM y de los canales Orai.

Los cationes divalentes y los lantánidos trivalentes inhiben las vías de entrada de Ca^{2+} . Entre éstos, el La^{3+} ($\text{IC}_{50}= 10\text{-}100\mu\text{M}$) y Gd^{3+} ($\text{IC}_{50} <1\mu\text{M}$) son los más utilizados. Existen varios reportes donde el Gd^{3+} y el La^{3+} en bajas concentraciones ($1\mu\text{M}$) eliminan las corrientes generadas por diferentes subunidades de proteínas Orai [67], a mayores concentraciones el Gd^{3+} ($100\mu\text{M}$) inhibe a los canales TRPC [68]. Al incubar los espermatozoides de ratón con $1\mu\text{M}$ de Gd^{3+} e inducir la RA con ZP, observamos una disminución significativa con respecto a la inducción por ZP ($p \leq 0.001$). Al disminuir ($0.5\mu\text{M}$) o aumentar la concentración ($3,5$ ó $100\mu\text{M}$) de Gd^{3+} se pierde la inhibición e incluso observamos una potenciación de la inducción de la RA. A diferencia del Gd^{3+} , el La^{3+} en concentraciones de $1, 10$ y $100\mu\text{M}$ no inhibe la RA inducida por ZP ni tampoco la potencia (Figura 14). El Gd^{3+} no inhibe la RA inducida por $10\mu\text{M}$ de Tg (Figura 14). Dado que la especificidad del bloqueo por estos iones es pobre, es recomendable tener un perfil farmacológico usando varios inhibidores por lo que utilizamos otros tipos de inhibidores de los SOC. De igual manera es importante siempre hacer los controles utilizando únicamente los inhibidores (sin inductor) para ver el efecto de su sola presencia ya que, en algunos casos, son capaces de inducir la RA.

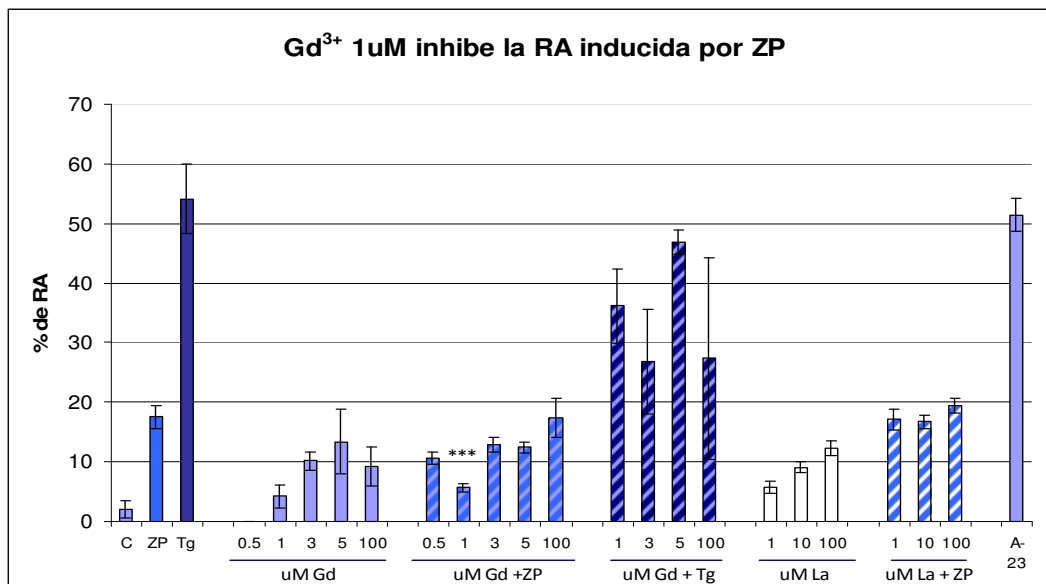


Figura 14. El Gd^{3+} $1\mu\text{M}$ inhibe la Reacción Acrosomal inducida con ZP. Los espermatozoides de ratón se capacitaron y se incubaron 10 min con diferentes concentraciones de Gd^{3+} o de La^{3+} . Posteriormente inducimos la RA con Tg ($10\mu\text{M}$) o ZP ($5\text{ZP}/\mu\text{l}$). Los experimentos control incluyen únicamente al solvente y a los inhibidores. El % de RA espontánea se restó de cada condición experimental. *** $p \leq 0.001$, $n \geq 3$.

A partir del descubrimiento de STIM1 como sensor de Ca^{2+} del RE, se han investigado numerosos agentes que inhiben de manera específica la función de STIM. Los microtúbulos juegan un papel importante en la organización de STIM1 en el RE y determinados compuestos que afectan microtúbulos pueden inhibir la entrada de Ca^{2+} operada por el vaciamiento de pozas [69]. Existen dos

compuestos en particular, que impiden el movimiento de STIM1 en respuesta al vaciamiento de la poza; ML-9 [1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl) homopiperazine] y el 2-APB (2-aminoethyldiphenyl borate) [67]. ML-9 es miembro de una serie de inhibidores de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) [70], que al igual que el ML-7 y la Wortmanina inhiben los incrementos de Ca^{2+} inducidos por Tg en músculo liso y en células endoteliales [71] sugiriendo la participación de MLCK en SOCE. El ML-9 previene el movimiento de STIM1 hacia la membrana plasmática en respuesta al vaciamiento de la poza y evita la formación de las agregaciones denominadas punta [72]. En células tratadas con ML-9, STIM1 es incapaz de unirse a membrana plasmática y de asociarse con microtúbulos. Cabe destacar que al sobreexpresar STIM1, la potencia del ML-9 se reduce [69]. En el mismo estudio, también inhiben las MLCK con Wortmanina o con ML-7, pero ninguno de éstos dos presenta una inhibición más potente la observan con el ML-9. Debido a la gran cantidad de sitios de fosforilación en STIM1 y STIM2, es posible que la fosforilación constitutiva de una cinasa sensible al ML-9 sea necesaria para la función de las proteínas STIM. Sin embargo, no podemos descartar la interacción directa del ML-9 con STIM o con una proteína de interacción, como la calmodulina.

Al incubar los espermatozoides de ratón con concentraciones menores al IC50 (5 μ M) reportado para el ML-9 (10 μ M) e inducir la RA con ZP observamos una disminución significativa con respecto a la inducción generada por ZP. Al incrementar la concentración de ML-9 (50, 100 ó 200 μ M) en vez de tener un efecto inhibitorio, se observa un mayor % de RA, incluso con el inhibidor en ausencia de inductor, hay una mayor RA, lo que parece indicar que esta sustancia tiene más de un blanco. De igual manera a lo observado con Gd^{3+} , el ML-9 5 μ M no inhibe la RA inducida por 10 μ M de Tg e incluso se observa una potenciación de la RA (Figura 15).

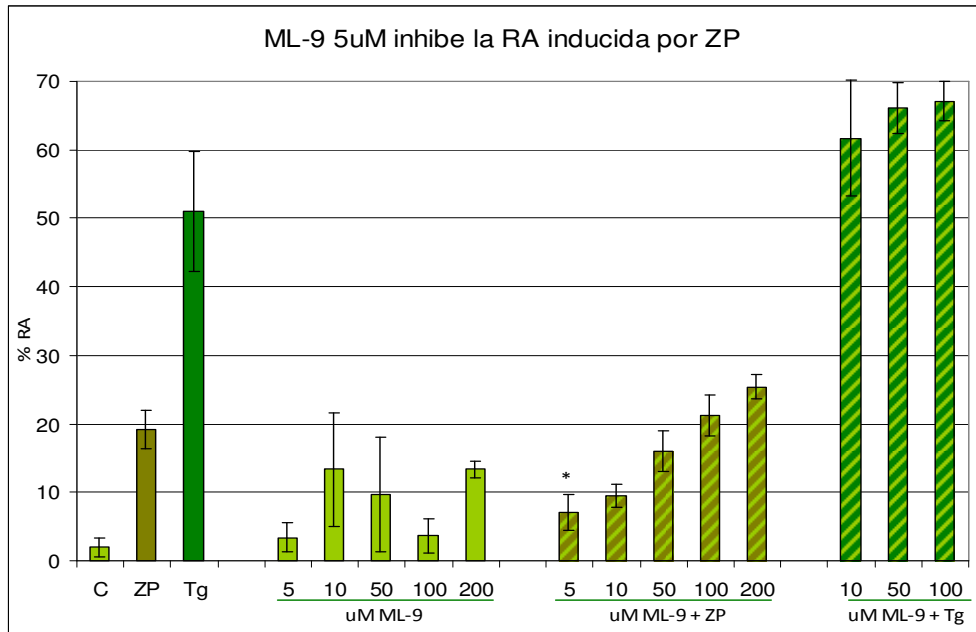


Figura 15. El ML-9 5 μ M inhibe la Reacción Acrosomal al inducirla con ZP. Los espermatozoides de ratón se capacitaron y se incubaron 10 min con diferentes concentraciones de ML-9. Posteriormente inducimos la RA con Tg (10 μ M) o con ZP (5ZP/ul). Los experimentos control incluyen únicamente al solvente y a los inhibidores. El % de RA espontánea se restó de cada condición experimental. * $p \leq 0.05$, $n \geq 3$.

El 2-APB es el inhibidor de la entrada de Ca^{2+} operada por pozas internas que más se ha utilizado para estudiar la entrada de Ca^{2+} tipo SOC [67]. El 2-APB se describió originalmente como un inhibidor de los receptores de IP_3 [73]. Posteriormente se demostró que inhibía la entrada de Ca^{2+} operada por pozas internas y se consideró como una evidencia que apoyaba la hipótesis de la interacción de los receptores de IP_3 con los canales operados por pozas internas en membrana plasmática [74]. Sin embargo, posteriormente un gran número de laboratorios publicaron evidencias donde el 2-APB inhibía de manera directa los canales responsables de las corrientes I_{CRAC} sin la necesidad de inhibir al receptor de IP_3 [75] [76] [77] [78, 79]. Además se reportó que en bajas concentraciones, el 2-APB causa la activación transitoria de las corrientes I_{CRAC} cuyo componente molecular son los canales formados por las proteínas Orai [77].

En experimentos donde se estudió la translocación de STIM1 utilizando microscopía TIRF, se observó que el 2-APB reducía el movimiento de STIM1 a regiones cercanas a la membrana plasmática y la formación de las agregaciones conocidas como “puncta” y que se favorecen con el vaciamiento de las pozas de Ca^{2+} [52].

Para cubrir los diferentes blancos del 2-APB utilizamos un rango de concentraciones donde se ha reportado que inhibe a los diferentes componentes de SOC (ver Tabla 3) [52, 73] [80, 81]). Al incubar los espermatozoides de ratón con 25, 50 y 75 μ M de 2APB e inducir la RA con ZP o Tg, se observa una disminución significativa dependiente de la dosis con respecto a la inducción generada por ZP o Tg (Figura 16).

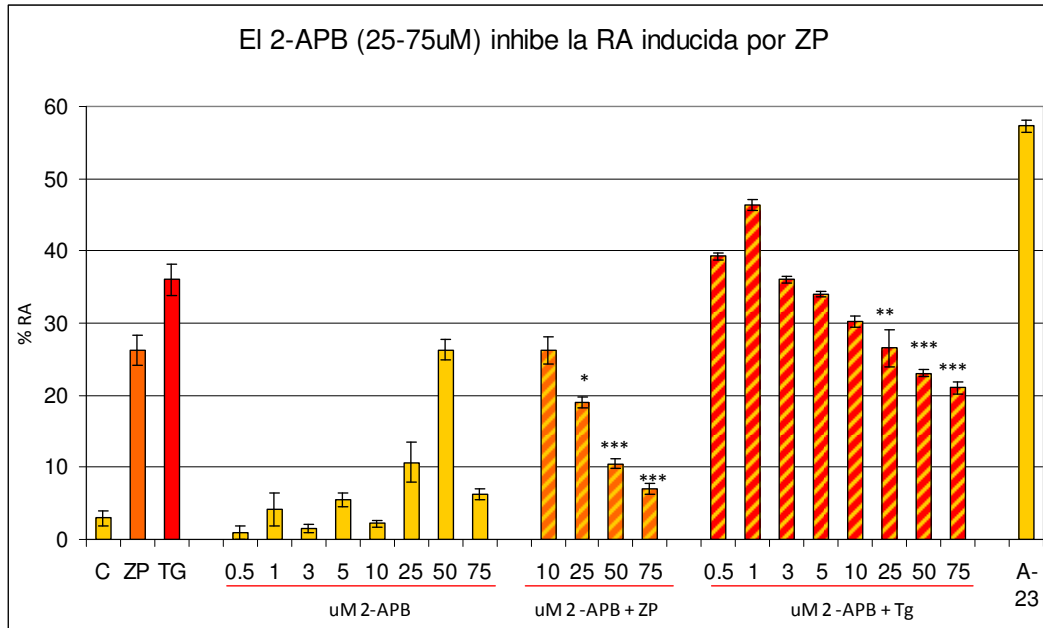


Figura 16. 25-75 μ M de 2-APB inhibe la RA inducida por ZP. Los espermatozoides de ratón se capacitaron y se incubaron 10min con las concentraciones indicadas de 2-APB. Posteriormente se indujo la RA con Tg (10 μ M) o con ZP (5 ZP/ μ l). Los experimentos control incluyen únicamente al solvente y a los inhibidores. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, $n \geq 3$.

En los ensayos de RA es importante destacar la variabilidad de respuestas que se obtienen entre diferentes poblaciones, un ejemplo de esto es la respuesta a 10 μ M de Tg en las tres gráficas anteriores (Figura 14-16) que varía de 55 \pm 15, 50 \pm 15 y 35 \pm 2 respectivamente, por tal motivo utilizamos el análisis de la varianza ANOVA donde se compara si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar, es decir, se analiza globalmente la influencia de cada variable independiente, generándose un único nivel de significación en nuestras pruebas estadísticas.

DISCUSIÓN.

La entrada de Ca^{2+} tipo SOC es un proceso importante y reconocido durante la inducción de la RA. Ahora se sabe que las familias STIM y Orai son componentes del complejo molecular que produce la entrada de Ca^{2+} tipo SOC en diversos tipos celulares. Con estos antecedentes planteamos la hipótesis de que estas proteínas estarían presentes en el espermatozoide de ratón.

Mediante RT-PCR logramos amplificar STIM1, STIM2, Orai1, Orai2 y Orai3 a partir de RNA aislado de determinados estadios de células espermatozóicas de ratón, particularmente: paquiteno, espermátidas redondas y espermátidas condensantes. Los productos de RT-PCR se mandaron secuenciar y mediante BLAST analizamos todas las secuencias obtenidas, en las cuales obtuvimos entre el 98 y 99% de identidad de las secuencias obtenidas con las secuencias esperadas, lo que confirma la presencia de los mensajeros en estas células. Es importante mencionar sin embargo, que la técnica de separación de células espermatozóicas por gravedad unitaria (STA-PUT), permite aislar poblaciones enriquecidas de hasta el 95% de pureza, pero no está libre de la presencia de otros tipos celulares, como podrían ser células de Sertoli y debido a que la técnica de RT-PCR es altamente sensible, no podemos descartar estar amplificando mensajeros que provienen de otros tipos celulares. Para comprobar que las proteínas STIM y Orai están presentes en el espermatozoide maduro realizamos ensayos de Western Blot en los que se observamos bandas del peso esperado en todos los casos. Como se ha reportado en otros tipos celulares, observamos más de una banda que podrían corresponder, en el caso de las proteínas Orai, a la formación dímeros, que es la conformación más estable [48], trímeros o tetrámeros (conformación funcional del canal). Los anticuerpos son una herramienta muy valiosa para detectar proteínas, sin embargo, ahora se reconoce que los anticuerpos a pesar de ser diseñados para detectar una sola proteína, dependiendo del sistema celular donde se prueben, pueden conducir a falsos positivos, por lo que controles rigurosos se vuelven indispensables para concluir de manera inequívoca la identidad de las proteínas detectadas, así mismo se pueden usar técnicas confirmatorias como sería el uso de la proteómica. Además no siempre los anticuerpos funcionan tanto para Western blot como para inmunocitoquímica o inmunoprecipitación, y con frecuencia esto se debe determinar de forma empírica. Para validar la funcionalidad de un anticuerpo uno de los controles fundamentales es que el anticuerpo compita con su péptido específico. En los experimentos de Western blot, sólo Orai3 compite adecuadamente con su péptido. Esta batería de anticuerpos funcionó mejor en las inmunocitoquímicas ya que los péptidos antigénicos compitieron la señal en todos los casos, con excepción de Orai1. En conjunto nuestros resultados de biología molecular, Western Blot e inmunocitoquímica nos permiten sugerir que algunos miembros de las familias STIM y Orai están presentes en el espermatozoide de ratón. Para poder confirmar con mayor certeza la presencia de nuestras proteínas podríamos purificar las bandas detectadas y mandarlas secuenciar. Una manera alternativa de validar la funcionalidad de los anticuerpos es probándolos los anticuerpos en ratones knock out para cada una de estas proteínas, sin

embargo, como se mencionó en la introducción, los ratones nulos de STIM y Orai presentan defectos devastadores y no sobreviven hasta la edad reproductiva.[38-40].

Otra aproximación que utilizamos para evaluar la participación de STIM y Orai fue medir directamente la RA en ausencia y presencia de los inhibidores reportados de la función de estas proteínas. Es importante mencionar que el descubrimiento de estas proteínas es muy reciente y de gran importancia para la función de muchos tipos celulares. Sin embargo el desarrollo de inhibidores específicos, aunque deseable, no es siempre expedito. A la fecha se han reportado compuestos capaces de inhibir la actividad de STIM o el funcionamiento de Orai, como es el caso de ML-9, Gd^{3+} , SKF96365 o 2-APB. Sin embargo, en todos los casos, estos mismos compuestos pueden tener otros blancos y contamos con una ventana no muy amplia de concentraciones que nos permiten distinguir entre un blanco y otro, por lo que no es la función de un solo inhibidor, sino un perfil farmacológico lo que nos permite sugerir la participación de estos canales. Para establecer este perfil en la farmacología de la entrada tipo SOC en la RA, utilizamos algunos de estos inhibidores cuyo blanco fuera STIM y Orai pero que no se hubieran probado con anterioridad en la RA de espermatozoide de ratón. Utilizamos Gd^{3+} , ML-9 y 2-APB e indujimos la RA con ZP (el inductor natural) y con Tg para mimetizar el vaciamiento de pozas que ocurre durante la RA, con la predicción que el perfil sería similar al de la ZP. Sorprendentemente, tanto el Gd^{3+} ($1\mu M$) como el ML-9 ($5\mu M$) inhiben de manera significativa la RA inducida por ZP, pero no por Tg. Por su parte, el 2-APB ($25-75\mu M$) inhibe la RA inducida con Tg y con ZP. Estos resultados sugieren un efecto diferencial al inducir el vaciamiento de las pozas con Tg y con ZP. Posiblemente la Tg al vaciar las pozas sin regulación y de forma irreversible, induce la apertura de una mayor cantidad y variedad de canales sensibles al vaciamiento que requieren de bloqueadores más generales de los SOC como el SKF96365 y el 2-APB y su efecto no puede inhibirse con compuestos que bloquean a un tipo de Orai o a STIM en particular, como son el Gd^{3+} y el ML-9. Dentro de los avances que se han realizado en el campo para diseñar inhibidores más específicos, Jun-Ichi Goto et al., en el 2010 identificaron dos isómeros estructurales análogos del 2-APB que son 100 veces más potentes que el 2-APB. Éstos isómeros constan de dos moléculas de 2-APB conectadas por una unión y la única diferencia entre ambos isómeros es la unión que presentan las dos moléculas de 2-APB. Uno de éstos análogos activa e inhibe SOCE dependiendo de la concentración mientras que el otro lo inhibe. El análogo del 2-APB inhibe el vaciamiento de la poza regulado por STIM1 ya que a diferencia del 2-APB, éstos análogos no activan la corriente CRAC en ausencia de STIM1 ([82]). El diseño de este tipo de inhibidores es fundamental para entender el complejo de señalización SOCE en distintos tipos celulares.

Los resultados del presente trabajo en su conjunto nos permiten concluir que la actividad SOC que se presenta durante la inducción de la RA por ZP probablemente involucre a las proteínas STIM y Orai. De forma importante, establecimos por primera vez una diferencia farmacológica al inducir la RA por ZP y por Tg lo que permitirá entender este proceso en una forma más detallada.

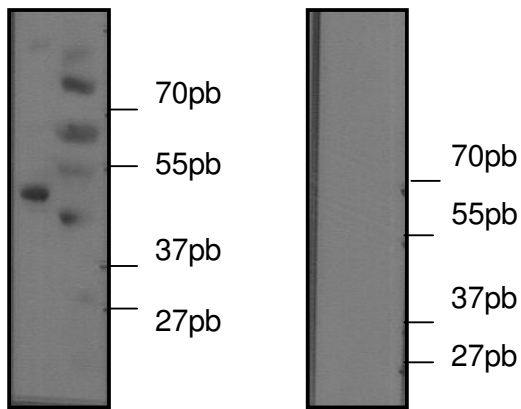
Este trabajo propone que las familias STIM y Orai están presentes en el espermatozoide de ratón y de acuerdo con la propuesta de Vaca y colaboradores [63], es muy probable que el complejo molecular SOC involucre a otras entidades como los canales TRPC que ya se han descrito en éstas células [2] e incluso, como lo proponen Liao y colaboradores ([60]), la presencia de estos complejos dentro y fuera de balsas lipídicas podría determinar su función SOCE o ROCE, por lo que sería de gran importancia establecer si hay interacción en el espermatozoide de ratón entre las proteínas STIM, Orai y TRPC durante la RA. El futuro mejoramiento de anticuerpos e inhibidores permitirá realizar experimentos de coimmunoprecipitación y RA que podrían contribuir a establecer esta interacción.

APÉNDICES

Apéndice I

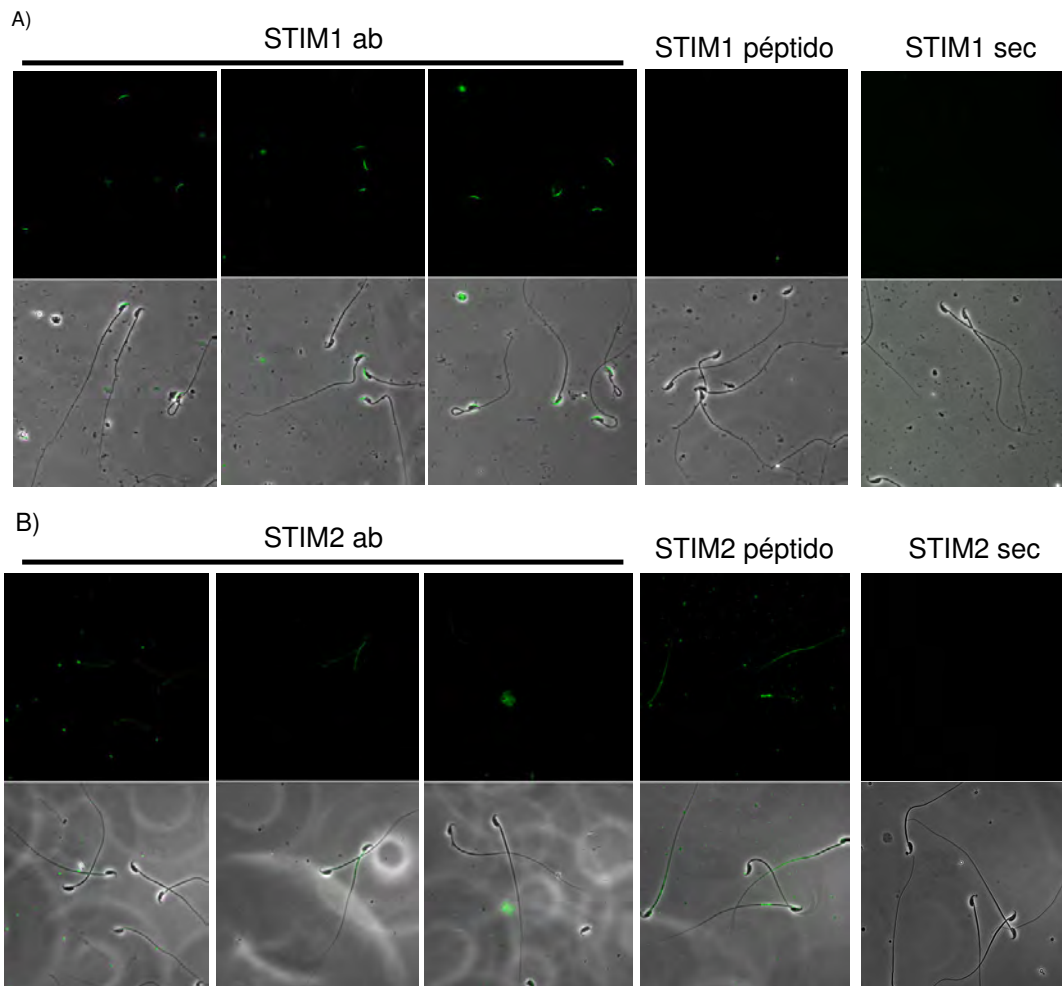
Competencia del anticuerpo Orai3 con su péptido específico. Obtuvimos el homogenado proteico total de espermatozoides separados por swim-up. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nylon para realizar ensayos de Western Blot. Del lado izquierdo se muestra la señal obtenida al utilizar el anticuerpo anti-Orai3. Del lado derecho se muestra la incubación del péptido con el anticuerpo (n=3).

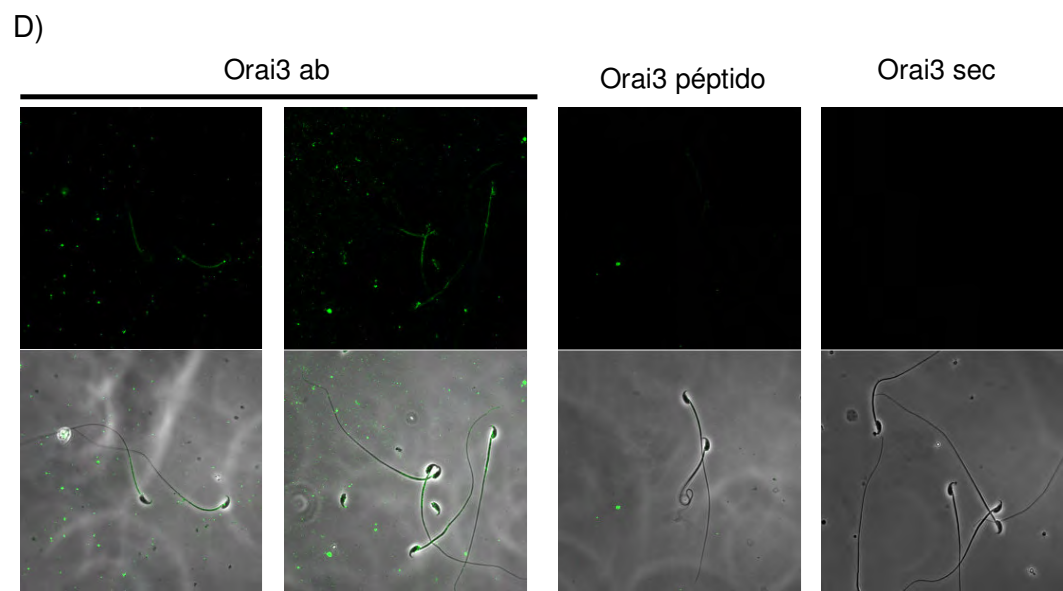
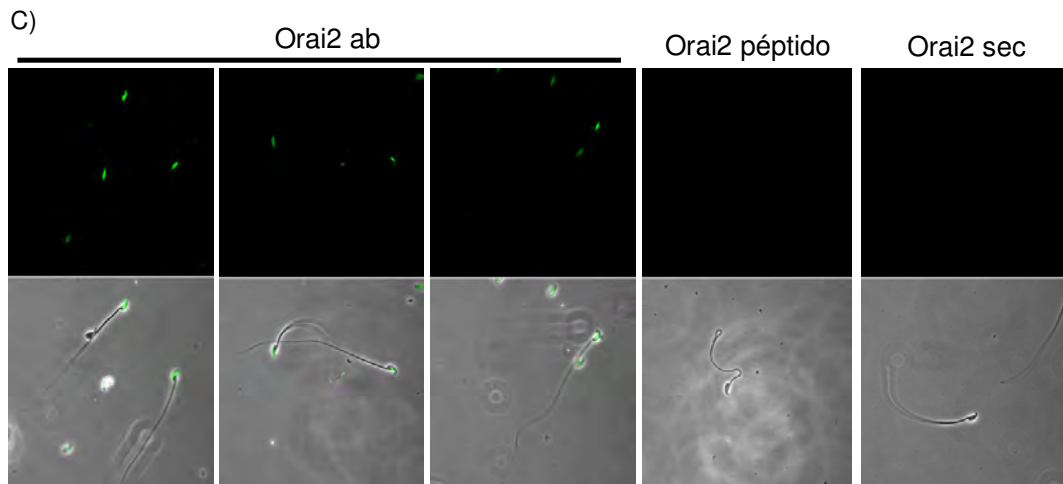
Orai3 31KDa



Apéndice II

Inmunolocalización de las proteínas STIM & Orai en espermatozoides de ratón. Espermatozoides separados por swim-up se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos específicos para cada proteína de interés usando como anticuerpo secundario Alexa 488. Se muestran imágenes representativas de fluorescencia (arriba) obtenidas con cada anticuerpo junto con la sobreposición correspondiente de contraste de fases (abajo). Del lado izquierdo se muestran la señal obtenida al incubar el anticuerpo de la proteína de interés. Del lado derecho se muestran los controles al preincubar el anticuerpo con el péptido específico así como la señal obtenida al incubar únicamente el anticuerpo secundario. STIM1 (n=2), STIM2 (n=2) y Orai2-3 (n=2).





Bibliografía:

1. Trevino, C.L., et al., *Maitotoxin potently promotes Ca²⁺ influx in mouse spermatogenic cells and sperm, and induces the acrosome reaction*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 449-56.
2. Darszon, A., et al., *Sperm channel diversity and functional multiplicity*. Reproduction, 2006. **131**(6): p. 977-88.
3. Lewis, R.S., *The molecular choreography of a store-operated calcium channel*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 284-7.
4. Wu, M.M., et al., *Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 803-13.
5. Visconti, P.E., *Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 667-8.
6. Amoult, C., et al., *Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6757-62.
7. Escoffier, J., et al., *Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice*. J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 753-63.
8. Fukami, K., et al., *Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm*. J Cell Biol, 2003. **161**(1): p. 79-88.
9. Walensky, L.D. and S.H. Snyder, *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm*. J Cell Biol, 1995. **130**(4): p. 857-69.
10. O'Toole, C.M., et al., *Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1571-84.
11. Blackmore, P.F., *Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm*. Cell Signal, 1993. **5**(5): p. 531-8.
12. Dragileva, E., S. Rubinstein, and H. Breitbart, *Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa*. Biol Reprod, 1999. **61**(5): p. 1226-34.
13. Hirohashi, N. and V.D. Vacquier, *Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(2): p. 285-92.
14. Ardon, F., et al., *Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca(2+) in sea urchin sperm*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(1): p. 15-24.
15. Branham, M.T., et al., *Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24825-39.
16. Abramowitz, J. and L. Birnbaumer, *Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels*. Faseb J, 2009. **23**(2): p. 297-328.
17. Jungnickel, M.K., et al., *Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 499-502.
18. Castellano, L.E., et al., *Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility*. FEBS Lett, 2003. **541**(1-3): p. 69-74.
19. Sutton, K.A., et al., *Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm*. Dev Biol, 2004. **274**(2): p. 426-35.
20. Stamboulian, S., et al., *Junctate, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels*. Dev Biol, 2005. **286**(1): p. 326-37.
21. Strange, K., et al., *Physiological roles of STIM1 and Orai1 homologs and CRAC channels in the genetic model organism Caenorhabditis elegans*. Cell Calcium, 2007. **42**(2): p. 193-203.
22. Wang, Y., et al., *Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(9): p. 1127-33.
23. Yuan, J.P., et al., *TRPC channels as STIM1-regulated SOCs*. Channels (Austin), 2009. **3**(4): p. 221-5.
24. Alicia, S., et al., *STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts*. Cell Calcium, 2008. **44**(5): p. 479-91.
25. Vaca, L., et al., *Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 1): p. C1501-5.
26. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 435-45.
27. Liou, J., et al., *STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
28. Luik, R.M., et al., *The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 815-25.

29. Baba, Y., et al., *Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16704-9.
30. Calloway, N., et al., *Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca²⁺ stores and on electrostatic interactions*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 389-99.
31. Grigoriev, I., et al., *STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER*. Curr Biol, 2008. **18**(3): p. 177-82.
32. Pani, B., et al., *Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17333-40.
33. Williams, R.T., et al., *Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 673-85.
34. Cai, X., *Molecular evolution and functional divergence of the Ca(2+) sensor protein in store-operated Ca(2+) entry: stromal interaction molecule*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e609.
35. Brandman, O., et al., *STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1327-39.
36. Zheng, L., et al., *Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(1): p. 240-6.
37. Parvez, S., et al., *STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation*. Faseb J, 2008. **22**(3): p. 752-61.
38. Varga-Szabo, D., et al., *The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1583-91.
39. Baba, Y., et al., *Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 81-8.
40. Oh-Hora, M., et al., *Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 432-43.
41. Yeromin, A.V., et al., *Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 226-9.
42. Muik, M., et al., *Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 8014-22.
43. Vig, M., et al., *CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel*. Curr Biol, 2006. **16**(20): p. 2073-9.
44. Zhang, S.L., et al., *Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9357-62.
45. Peinelt, C., et al., *Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(7): p. 771-3.
46. Soboloff, J., et al., *Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20661-5.
47. Mercer, J.C., et al., *Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24979-90.
48. Penna, A., et al., *The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 116-20.
49. Gwack, Y., et al., *Biochemical and functional characterization of Orai proteins*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16232-43.
50. Ji, W., et al., *Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13668-73.
51. Cahalan, M.D., et al., *Molecular basis of the CRAC channel*. Cell Calcium, 2007. **42**(2): p. 133-44.
52. DeHaven, W.I., et al., *Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19265-73.
53. Liao, Y., et al., *Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4682-7.
54. Liao, Y., et al., *Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/crac channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2895-900.
55. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 387-417.
56. Parekh, A.B. and J.W. Putney, Jr., *Store-operated calcium channels*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 757-810.
57. Huang, G.N., et al., *STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 1003-10.
58. Takahashi, Y., et al., *Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(4): p. 934-40.
59. Yuan, J.P., et al., *STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 636-45.

60. Liao, Y., et al., *A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3202-6.
61. Pani, B., et al., *Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(47): p. 20087-92.
62. Jardin, I., G.M. Salido, and J.A. Rosado, *Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1*. Channels (Austin), 2008. **2**(6): p. 401-3.
63. Vaca, L., *SOCIC: the store-operated calcium influx complex*. Cell Calcium. **47**(3): p. 199-209.
64. Vaca, L., *Calmodulin inhibits calcium influx current in vascular endothelium*. FEBS Lett, 1996. **390**(3): p. 289-93.
65. Vaca, L. and A. Sampieri, *Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42178-87.
66. Bellve, A.R., *Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells*. Methods Enzymol, 1993. **225**: p. 84-113.
67. Putney, J.W., Jr., *SOC: now also store-operated cyclase*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 381-2.
68. Luo, D., et al., *Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced [Ca²⁺]_i oscillations in HEK293 cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5613-21.
69. Smyth, J.T., et al., *Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 21): p. 3762-71.
70. Saitoh, M., et al., *Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase*. J Biol Chem, 1987. **262**(16): p. 7796-801.
71. Watanabe, H., et al., *Inhibition of agonist-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(3): p. 777-84.
72. Smyth, J.T., et al., *Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 762-72.
73. Maruyama, T., et al., *2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release*. J Biochem, 1997. **122**(3): p. 498-505.
74. Ma, H.T., et al., *Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1647-51.
75. Bakowski, D., M.D. Glitsch, and A.B. Parekh, *An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current I(CRAC) in RBL-1 cells*. J Physiol, 2001. **532**(Pt 1): p. 55-71.
76. Braun, F.J., O. Aziz, and J.W. Putney, Jr., *2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1304-11.
77. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors*. J Physiol, 2001. **536**(Pt 1): p. 3-19.
78. Ma, H.T., et al., *Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18888-96.
79. Iwasaki, H., et al., *2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) inhibits capacitative calcium entry independently of the function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. Receptors Channels, 2001. **7**(6): p. 429-39.
80. Peinelt, C., et al., *2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels*. J Physiol, 2008. **586**(13): p. 3061-73.
81. Schindl, R., et al., *2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20261-7.
82. Goto, J., et al., *Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca(2+) entry via STIM proteins*. Cell Calcium. **47**(1): p. 1-10.