



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN COMPLEJOS DE SEÑALIZACIÓN QUE
MODIFICAN SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN CON LA MOVILIDAD DE LOS
ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ARLET DEL CARMEN LOZA HUERTA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MA. DEL CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM
DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS-UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, del grupo del Dr. Alberto Darszon en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM en Cuernavaca, Morelos, México.



Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN217409 e IN204112-3 para CB). Además, Arlet Loza Huerta contó con una beca de doctorado de CONACYT (2007-2012) y de DGAPA-UNAM (2012-2013).

A mi mamá!

Por estar siempre a mi lado a través de la distancia y darme la fuerza para seguir adelante y conseguir este gran logro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue resultado del apoyo invaluable de un gran grupo de trabajo del cual recibí consejos y críticas que fueron el pilar angular en mi formación profesional. Especialmente muestro mi respeto y admiración al *Dr. Alberto Darszon* que con sus conocimientos y experiencia me enseñó el modelo a seguir de un gran científico y me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio desde la licenciatura. Así mismo agradezco a la *Dra. Claudia Treviño* y al *Dr. Takuya Nishigaki*, que de una forma indirecta me dieron su apoyo incondicional y siempre estuvieron disponibles para aclararme cualquier duda.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutora la *Dra. Carmen Beltrán* que durante todo este tiempo ayudo a mi formación académica dándome las herramientas y el financiamiento ilimitado para la realización de mi proyecto. Le agradezco su dedicación para enseñarme el camino de una carrera como investigador y mostrarme que a base de mucho esfuerzo y sacrificios se llega a tener una satisfacción tan grande como concluir ésta etapa de mi vida profesional. Al igual que a su hijo *Tony Lievano* que con su gran dominio del inglés mejoró en gran medida la redacción de mis artículos.

A la *Dra. Rosario Vera* que gracias a su contribución, dedicación y excelentes comentarios ayudaron a la publicación de mi artículo; además de darme siempre palabras de aliento y motivación durante el proceso de su realización.

A los miembros de mi comité tutorial a la *Dra. Martha Robles*, al *Dr. Miguel Ángel Cevallos* y al *Dr. Marco González†*, que a lo largo de mi formación mostraron una completa disposición para orientarme y guiarme. Sus comentarios y supervisión fue importante para redondear este trabajo.

A mi jurado de examen profesional: *Dra. Maria Eugenia Márquez Torres*, *Dra. Rosa Laura Camarena Mejía*, *Dr. Roberto Coria Ortega* y *Dr. Jose de Jesús García Trejo* por su tiempo empleado para la revisión de mi tesis y buenos comentarios.

A la *Q.F.B. Xochitl Alvarado Affantranger* por su apoyo técnico en la adquisición de imágenes del microscopio confocal en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada.

A mis compañeros del laboratorio con los que compartí muchos momentos de alegría y tristeza, pero que siempre estuvieron apoyándome y demostrándome que por todo el tiempo que pasamos juntos somos casi una familia. Especialmente a *Yolo*, *Anita*, *Chio*, *Paulina*, *Oscar*, *Omar (Pamelo)* y *Julio Cesar* que son mis grandes amigos.

A *Ulises López Arce*, que en los últimos años de mi doctorado fue mi gran apoyo y motivación personal y académica. Los quiero mucho, a él y su familia.

A *Dios* y *mi familia* que son mi principal motor para cada día dar lo mejor de mí. A mi mamá *Maria del Carmen Huerta*, que es a quien dedico mi trabajo de tesis que al igual que yo supo sobre-llevar la distancia y siempre me apoyó en todos mis proyectos. A mi hermano *Edwin Loza* y mis adorables sobrinas *Romina* y *Renata* que los amo con todo mi corazón y ellas son mi mas grande alegría.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ASPECTOS GENERALES DE LA FECUNDACIÓN	1
1.2	EL ERIZO DE MAR	2
1.2.1	<i>Estructura del espermatozoide de erizo de mar</i>	4
1.2.2	<i>La fisiología del espermatozoide de erizo de mar</i>	6
1.2.3	<i>La regulación de la movilidad de los espermatozoides por el Speract</i>	8
1.2.4	<i>Las adenilato ciclasas</i>	12
1.3	LA PROTEÍNA DE INTERCAMBIO ACTIVADA POR AMPc (EPAC)	15
1.4	LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS	17
1.4.1	<i>Las proteínas cinasas</i>	18
1.4.1.1	<i>La cinasa dependiente de AMPc (PKA)</i>	20
1.4.1.2	<i>La proteína cinasa C (PKC)</i>	23
1.4.2	<i>Las proteínas fosfatasa</i>	24
1.4.3	<i>La fosforilación de proteínas en los espermatozoides</i>	27
1.5	LAS BALSAS LIPÍDICAS Y SU IMPORTANCIA	28
1.5.1	<i>Las balsas lipídicas en los espermatozoides</i>	32
1.6	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A NIVEL MOLECULAR	34
2	JUSTIFICACIÓN	36
3	HIPÓTESIS	37
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GENERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.2.1	<i>Investigar la participación de las AC's, la PKA y la PKC en la movilidad de los espermatozoides</i>	37
4.2.2	<i>Caracterizar los patrones de fosforilación de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad</i>	37
4.2.3	<i>Aislar complejos de señalización de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad</i>	37
4.2.4	<i>Detectar sustratos fosforilados por la PKA y/o por la PKC en los complejos de señalización de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad (inmóvil, móvil o estimulada con Speract)</i>	37
4.2.5	<i>Identificar a nivel molecular proteínas en complejos de señalización que cambian su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides</i>	37
5	MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1	REACTIVOS	38
5.2	OBTENCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS	39
5.3	ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS AC'S, LA PKA Y LA PKC EN LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS	39
5.4	AISLAMIENTO DE LOS FLAGELOS	40
5.5	AISLAMIENTO DE BALSAS LIPÍDICAS DE ESPERMATOZOIDEOS COMPLETOS Y DE FLAGELOS AISLADOS	40
5.6	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA:	42
5.7	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN BALSAS LIPÍDICAS DE ESPERMATOZOIDEOS EN GELES DE DOS DIMENSIONES (2-D)	43
5.8	WESTERN-BLOT	44
5.9	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN SERIE (LC-MS/MS)	44

5.10	BUSQUEDA EN BASE DE DATOS.....	46
5.11	CRITERIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
5.12	<i>INMUNOCITOQUÍMICA</i>	47
5.13	<i>DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN FLAGELOS AISLADOS</i>	48
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1	LA ADENILATO CICLASA SOLUBLE (SAC) PARTICIPA EN LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES Y EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS MISMOS POR LA PKA Y/O POR LA PKC.....	49
6.2	LAS ADENILATO CICLASAS TRANSMEMBRANALES (ACM) PARTICIPAN POCO EN LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....	53
6.3	LA PKA PARTICIPA EN LA MOVILIDAD Y EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADA A LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....	55
6.4	LA PKC PARTICIPA DE MANERA IMPORTANTE EN LA MOVILIDAD Y EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADA A LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....	59
6.5	LA PARTICIPACIÓN DE EPAC EN LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR ES MÍNIMA.....	65
6.6	LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR SE REGULA POR AUMENTOS DE LOS NIVELES DE AMPC QUE ACTIVAN A LA PKA.....	66
6.7	LA PKA Y LA PKC FOSFORILAN PROTEÍNAS IMPORTANTES PARA LA MOVILIDAD TANTO BASAL COMO LA ESTIMULADA CON SPERACT, DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....	70
6.8	EL SPERACT MODIFICA EL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE SUSTRATOS DE LA PKA Y/O DE LA PKC.....	74
6.9	LAS BALSAS LIPÍDICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR TIENEN SUSTRATOS DE LA PKA Y DE LA PKC QUE MODIFICAN SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN CON LA MOVILIDAD.....	77
6.10	IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LS-MS/MS) DE LOS SUSTRATOS DE LA PKA O DE LA PKC ASOCIADOS A LA MOVILIDAD EN LOS ESPERMATOZOIDES DE ERIZO DE MAR.....	86
6.11	INMUNOLocalización EN EL ESPERMATOZOIDE DE ALGUNAS PROTEÍNAS SECUENCIADAS DE LAS BALSAS LIPÍDICAS DEL ESPERMATOZOIDE.....	92
6.12	LOS FLAGELOS AISLADOS RESPONDEN AL SPERACT.....	96
6.13	IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS DE LA PKA Y DE LA PKC EN LAS BALSAS LIPÍDICAS DE LOS FLAGELOS AISLADOS DE ESPERMATOZOIDES.....	100
7	CONCLUSIONES	107
8	PERSPECTIVAS	107
9	BIBLIOGRAFIA	108
10	ANEXOS	128
10.1	ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS.....	128
10.2	TABLAS DE LAS DOSIS EFECTIVAS DE LOS INHIBIDORES Y ACTIVADORES.....	131
11	APENDICE	133

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fecundación en el erizo de mar.	1
Figura 1.2 El erizo de mar <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	4
Figura 1.3 Morfología del espermatozoide de erizo de mar.	5
Figura 1.4 Dibujo de un corte transversal del flagelo del espermatozoide de erizo de mar donde se observa la estructura y los componentes del axonema.	6
Figura 1.5 Dibujo del gradiente de Spermact generado por la capa de gelatina que rodea al óvulo del erizo de mar y cambios iónicos ($[Ca^{+2}]_i$, $[Na^+]_i$, pH_i) y del potencial de membrana (E_m) inducidos por la unión del Spermact a su receptor en el espermatozoide.	9
Figura 1.6 Modelo de la cascada de señalización del Spermact.	12
Figura 1.7 Clasificación de las 9 isoformas de las adenilato ciclasas de membrana (ACm) por su regulación en células somáticas de mamífero.	14
Figura 1.8 Regulación de la adenilato ciclasa soluble (sAC) en los espermatozoides de erizo de mar.	15
Figura 1.9 La estructura de Epac con sus dominios múltiples.	17
Figura 1.10 La proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA.	22
Figura 1.11 Esquema de las cinasas de la familia AGC.	23
Figura 1.12 Clasificación de las familias de la PKC.	25
Figura 1.13 Clasificación de las proteínas fosfatasa.	26
Figura 1.14 Dibujo de la membrana plasmática indicando cada uno de sus componentes y las balsas lipídicas.	29
Figura 5.1 Fotografías mostrando la obtención de los espermatozoides de erizo de mar <i>S. purpuratus</i>	39
Figura 5.2 Esquema del gradiente de Optiprep® para el aislamiento de las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.	42
Figura 6.1 La Adenilato Ciclasa soluble (sAC) participa de manera importante en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.	50
Figura 6.2 La sAC participa en la fosforilación de sustratos de la PKA y de la PKC en la movilidad basal de los espermatozoides y en la estimulada con Spermact.	53
Figura 6.3 Las Adenilato Ciclasas de membrana (ACm) participan poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.	55
Figura 6.4 La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) participa en la movilidad basal de los espermatozoides de erizo de mar.	57

Figura 6.5 La PKA participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la movilidad de los espermatozoides basal y en la estimulada con Speract y altera el patrón de fosforilación por PKC.....	60
Figura 6.6 La PKC es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.	61
Figura 6.7 La PKC participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la movilidad de los espermatozoides basal y en la estimulada con Speract y altera el patrón de fosforilación por PKA.	64
Figura 6.8 La Epac participa poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.	66
Figura 6.9 El AMPc producido durante la movilidad basal de los espermatozoides de erizo de mar actúa mediante la PKA.	67
Figura 6.10 La estimulación de la PKA o de Epac no revierte la movilidad de los espermatozoides incubados con un inhibidor de la PKA, H-89.....	68
Figura 6.11 La estimulación de la PKA revierte parcialmente la inhibición de la movilidad por la Queleritrina, un inhibidor de la PKC.	71
Figura 6.12 La PKA y la PKC participan en la activación de la movilidad modificando el grado de fosforilación de algunas proteínas de los espermatozoides.	73
Figura 6.13 El Speract cambia el grado de fosforilación de sustratos de la PKA y de sustratos de la PKC.....	76
Figura 6.14 La fracción 2 (F2) del gradiente de Optiprep corresponde a las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.	78
Figura 6.15 La PKA participa en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar fosforilando proteínas en sus balsas lipídicas.....	80
Figura 6.16 La PKC participa en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar fosforilando proteínas en sus balsas lipídicas.....	81
Figura 6.17 Patrón electroforético de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides de erizo de mar inmóviles, móviles y estimulados con Speract separadas en geles de 2-D.	82
Figura 6.18 Los sustratos de la PKA en las balsas lipídicas modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides.....	84
Figura 6.19 Sustratos fosforilados por la PKC en las balsas lipídicas modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides.....	86
Figura 6.20 Localización subcellular de las proteínas fosforiladas por la PKA o por la PKC, identificadas en las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar.	87
Figura 6.21 Esquema de la localización en el espermatozoide de erizo de mar de algunas proteínas identificadas en sus balsas lipídicas.....	90

Figura 6.22 Inmunolocalización de la flotilina 2, los sustratos de la PKA y los sustratos de la PKC en los espermatozoides de erizo de mar.	94
Figura 6.23 Inmunolocalización de las subunidades α , β y de la proteína inhibitoria (PI) de la F ₁ -ATPasa mitocondrial identificadas en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.	95
Figura 6.24 Inmunolocalización del VDAC y la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa identificada en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.	97
Figura 6.25 El Speract hiperpolariza la membrana plasmática de los flagelos aislados de los espermatozoides de erizo de mar.	98
Figura 6.26 La hiperpolarización inducida por el Speract en flagelos aislados se bloquea por una concentración alta de potasio.	99
Figura 6.27 El patrón electroforético de proteínas asociadas a las balsas lipídicas de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad cambia.	101
Figura 6.28 El patrón de fosforilación de los sustratos de la PKA en las balsas lipídicas de flagelos aislados se modifica con la movilidad.	102
Figura 6.29 El patrón de fosforilación de los sustratos de la PKC en las balsas lipídicas de los flagelos aislados se modifica con la movilidad.	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación de las proteínas cinasas considerando la actividad de su dominio.	19
Tabla 6.1 Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las manchas 1-4 de las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar bajo diferentes condiciones de movilidad.	88
Tabla 6.2 Sustratos de la PKA o de la PKC asociados a las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar que cambiaron su nivel de fosforilación con la movilidad e identificadas por LC-MS/MS.	89
Tabla 6.3 Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las 20 manchas detectadas con los anticuerpos anti-PKAs y anti-PKCs en las balsas lipídicas de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad.	105

ABREVIATURAS

2OHE, 2-Hidroxiestradiol

2'5'DDA, 2'5'Dideoxiadenosina

8Br-AMPC, 8-bromoadenosina 3'5'-monofosfato cíclico

OMe-pCPT, 8-(4-Clorofeniltio)-2'-O-metiladenosina 3',5'- monofosfato monosódico cíclico

AC₅₀, activación media máxima

AC, adenilato ciclasa

ACm, adenilato ciclasa de membrana

sAC, adenilato ciclasa soluble

AMA, agua de mar artificial

AMPC, adenosina monofosfato cíclico

ATP, adenosina trifosfato

BL, balsa lipídica

BFA, brefeldina A

BSA, albumina de suero bovino

CaCC, canal de cloro activado por calcio

CaKC, canal de potasio activado por calcio

CaM, calmodulina

CaMK, calmodulina cinasa

CC, creatina cinasa

[Ca⁺²]_i, concentración de calcio intracelular

DAG, diacil glicerol

DMSO, dimetil sulfóxido

DNAsa, desoxirribonucleasa

EGTA, ácido tetra-acético etilen glicol

EJ, gelatina del óvulo

Em, potencial de membrana

Epac, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPC

FDE, fosfodiesterasas

Fsk, forskolina

GC, guanilato ciclasa

GMPc, guanosina monofosfato cíclico

H-89, *N*-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

HEPES, ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacínil – etanosulfónico

IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina

IEF, isoelectroenfóque

IP3, inositol trifosfato

kDa, kilodaltones

KH-7, ácido propanoíco 2-(1H-benzimidazol-2-iltio)-2-[(5-bromo-2-hidroxifenil) metileno] hidracida

M, molar

mg , miligramos	Rp-cAMPS , adenosina 3'5-fosfotiolato-Rp
ml , mililitros	
mM , milimolar	rpm , revoluciones por minuto
MM , microdominios de membrana	SAP's , péptidos activadores de los espermatozoides
mOsm , miliosmoles	SDS , dodecil sulfato de sodio
MP , membrana plasmática	SQ22536 , 9-(Tetrahidro-2-furanil)-9H-purina-6-amina
MS , espectrometría de masas	
mV , milivoltios	SpHCN , canal del espermatozoide activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos
NBC , co-transportador sodio/bicarbonato	TetraKCNG , canal de potasio regulado por nucleótidos cíclicos de guanina e hiperpolarización
NCKX , intercambiador de sodio/calcio dependiente potasio	VDCC , canal de calcio regulado por voltaje
NHE , intercambiador sodio/protón	VDAC , canal aniónico dependiente de voltaje
nM , nanomolar	μl , microlitro
[Na⁺]_i , concentración de sodio intracelular	μM , micromolar
PA , poliacrilamida	
pH_i , potencial de hidrógeno intracelular	
PKA , proteína cinasa dependiente de AMPc	
PKC , proteína cinasa C	
PFS , polímero de fucosa sulfatada	
PPS , fosfatasa de serina-treonina	
PTK , proteína cinasa de tirosina	
PTP , fosfatasa de tirosina	
RA , reacción acrosomal	

RESUMEN

La fecundación es un evento crucial para la preservación de los organismos, la activación de la movilidad de los espermatozoides es un paso esencial para llevar a cabo dicho evento. La movilidad de los espermatozoides de erizo de mar se regula por el Speract (Sp, decapeptido secretado por la capa externa del óvulo). Tras la unión a su receptor en el flagelo de los espermatozoides, el Sp induce una serie de cambios iónicos y metabólicos en los espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* que regulan su movilidad. Uno de los cambios más importantes es un aumento de AMPc que activa a la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), que a su vez fosforila proteínas específicas. Cambios en la fosforilación de proteínas tanto dependientes como independientes de AMPc, han demostrado ser cruciales durante la activación de la movilidad de los espermatozoides. Durante muchos años y con base en resultados de experimentos en espermatozoides de erizo de mar tratados con detergente, la regulación de la movilidad asociada a la fosforilación de proteínas se atribuyó únicamente a la PKA. Ahora sabemos que la PKC es también importante para la movilidad de los espermatozoides intactos de *Lytechinus pictus*.

Dado que la fosforilación de proteínas es uno de los cambios más relevantes en la movilidad de los espermatozoides y que algunas proteínas de la cascada de señalización del Speract se localizan en las balsas lipídicas (BL); en este trabajo investigamos la participación de las adenilato ciclasas soluble (sAC) y de membrana (ACm) en la movilidad, así como la participación de la PKA y la PKC en la fosforilación de proteínas asociadas a la movilidad en espermatozoides intactos. Además, identificamos con anticuerpos específicos y mediante LC-MS/MS, los sustratos de la PKA y de la PKC asociados a BL cuyo grado de fosforilación cambió con la movilidad de los espermatozoides. Lo anterior lo hicimos en BL derivadas tanto de células completas como de flagelos aislados. Es interesante que en el primer caso se identificaron principalmente proteínas mitocondriales como la ATP sintasa, la Creatina cinasa, la NADH deshidrogenasa (ubiquinona), la flavoproteína 2, la Succinil-CoA ligasa y el canal aniónico dependiente de voltaje 2 (VDAC-2), entre otras. Sin embargo, en las BL derivadas de los flagelos aislados, se identificaron proteínas como el receptor del Speract, la fosfodiesterasa 5 (FDE5), la fosfatasa 1A (PP1A), la subunidad reguladora tipo II de la PKA y proteínas del axonema entre otras.

En este trabajo demostramos que la sAC, la PKA y la PKC participan en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar cambiando los niveles de fosforilación de algunas proteínas y que la PKA y la PKC muestran una comunicación cruzada en dicho evento. Nuestros resultados contribuyen de manera importante a entender cómo se regula la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. El hecho de haber identificado proteínas mitocondriales como sustratos de la PKA y de la PKC confirma la participación de este organelo en la fecundación.

ABSTRACT

Fertilization is a crucial event to the preservation of organisms. The activation of sperm motility is an essential step to carry out fertilization. Sea urchin sperm motility is regulated by Speract, a sperm-activating peptide (SAP) secreted from the outer egg coat. Upon binding to its receptor in the sperm flagellum, Speract induces a series of ionic and metabolic changes in *Strongylocentrotus purpuratus* spermatozoa that regulate their motility. One of these changes is an increase of cAMP that activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA) which in turn phosphorylates specific sperm proteins. cAMP-dependent and -independent changes in protein phosphorylation have been demonstrated to be crucial events during sperm motility activation. For many years, the regulation of motility-associated protein phosphorylation was attributed only to PKA; however all experiments were done in a demembrated-spermatozoa model. Now we know that PKC is also important for the intact sperm motility. Among these events, protein phosphorylation is one of the most relevant. Evidence also indicates that some proteins of the Speract signaling cascade are localized in low density detergent-insoluble membranes (LD-DIM).

In this study we investigated the participation of soluble (sAC) and transmembrane (ACm) Adenylyl Cyclases in the motility, as well as the PKA and PKC participation of motility-associated protein phosphorylation in an intact *S. purpuratus* spermatozoa model. Besides, LD-DIM derived proteins from immotile, motile or Speract-stimulated *S. purpuratus* sperm or isolated flagellums were resolved in 2-D gels and the PKA and PKC substrates detected with specific antibodies were identified by LC-MS/MS.

We showed that sAC, PKA and PKC are involved in sperm motility, displaying a cross-talk signaling between PKA and PKC activities. Moreover, differential PKA and PKC substrate phosphorylation levels between the LD-DIM isolated from sperm and isolated flagellums in different motility conditions were found and identified by mass spectrometry. The major of these proteins were mitochondrial proteins (ATP synthase, Creatine kinase, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, Succinyl-CoA ligase and the voltage-dependent anion channel 2 (VDAC-2)) among other. However, in LD-DIM from isolated flagellums we identified mainly the Speract receptor, phosphodiesterase (PDE5), phosphatase (PP1A), PKA type II regulatory subunit and axoneme proteins among others.

Our results contribute significantly to the understanding of how the sea urchin sperm motility is regulated. Mitochondrial proteins identified as PKA and/or PKC substrates, confirm the involvement of the mitochondria in fertilization.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la fecundación

La fecundación es el proceso mediante el cual el gameto haploide masculino (espermatozoide) y el gameto haploide femenino (óvulo) se fusionan para producir un nuevo organismo diploide genéticamente diferente (**Figura 1.1**). Es un evento fundamental en la vida de los organismos que dependen de la reproducción sexual para preservar su especie; y su éxito depende de una comunicación adecuada entre los gametos y el ambiente que los rodea. Una vez que los gametos se liberan, tienen escasos minutos u horas para encontrarse y llevar a cabo la fecundación, de lo contrario estos mueren. Dicho proceso consta de varios eventos secuenciales y esenciales: una vez que se dio el contacto y el reconocimiento de los gametos se da la regulación de la entrada de los espermatozoides, la fusión del material genético y finalmente la activación del cigoto para iniciar con el desarrollo (Yanagimachi, 1994).

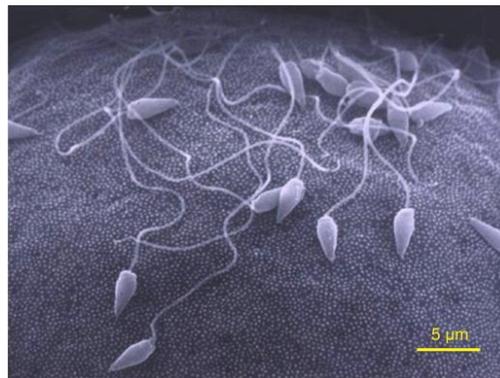


Figura 1.1 Fecundación en el erizo de mar.
Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido, tomada del poster de Lauren Palumbi, 2004.

Existen dos tipos de reproducción sexual: interna y externa. La reproducción sexual interna es característica de los mamíferos e involucra eventos consecutivos tales como: la migración de los espermatozoides a través del tracto genital femenino, la penetración de los espermatozoides a las células del cúmulus, la adhesión a la zona pelúcida, la inducción de la reacción acrosomal (RA) y la fusión de

las membranas plasmáticas del espermatozoide y del óvulo. Durante esta serie de eventos los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar al óvulo, ya que recién eyaculados son incapaces de hacerlo. Los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en el espermatozoide para poder fecundar a su óvulo homólogo se denomina *capacitación*; y algunos componentes necesarios para una capacitación completa son la presencia de bicarbonato (HCO_3^-), de albúmina y de Ca^{+2} (Darszon, Nishigaki, Beltrán & Treviño, 2011).

Por otro lado, la reproducción sexual externa es característica de organismos marinos, tales como el erizo de mar y la estrella de mar, entre otros. En los organismos de fecundación externa sus gametos se liberan al mar y en este ambiente se lleva a cabo la fecundación. La mayoría de los estudios para entender los mecanismos de la fecundación se han estudiado ampliamente en este tipo de organismos por la facilidad de obtener los gametos y acceso a todo el proceso de fecundación y desarrollo embrionario (Alberts et al., 2007).

1.2 El erizo de mar

Los erizos de mar son organismos del filo *Echinodermata* y clase *Echinoidea*. Son de forma globosa o discoidal, carecen de brazos y tienen un esqueleto interno cubierto sólo por la epidermis, constituido por numerosas placas calcáreas unidas entre sí rígidamente formando un caparazón, en las que se articulan las espinas móviles (**Figura 1.2**). Viven en todos los fondos marinos, hasta los 2 500 metros de profundidad. Fueron muy abundantes en diversas épocas geológicas desde su aparición en el Silúrico (periodo geológico de la era Paleozoica que comenzó hace 443 ± 1.5 millones de años y terminó hace 416 ± 2.8 millones de años), y comprenden unas 950 especies vivientes (Brusca & Brusca, 2003).

Los erizos poseen un tubo acuífero que se comunica con el exterior mediante la placa madreporica, situada junto al ano en la cara superior del erizo. Del sistema acuífero derivan los podios o pies ambulacrales capaces de extenderse más allá de las espinas y cuya función es la locomoción, captura de alimentos, respiración, etc. El caparazón calcáreo está dividido en diez secciones soldadas íntimamente entre

ellas que se dividen en cinco zonas radiales y cinco inter-radiales. En la parte superior encontramos cinco placas más pequeñas. Una de ellas es la placa madreporica y las demás son placas genitales. Las placas radiales e inter-radiales es donde están ancladas las espinas y donde hay unas perforaciones por las cuales la parte interior del erizo estará conectada con la exterior mediante los podios.

El aparato digestivo de los erizos está compuesto de un gran estómago y una boca situada en la parte inferior del erizo. En el interior y situada cerca de la boca, encontramos una compleja estructura esquelética y muscular contráctil llamada linterna de Aristóteles; está formada por cinco dientes y el esqueleto que junto con la musculatura les dan soporte. Esta estructura se utiliza para raspar algas del sustrato y para despedazar el alimento en fragmentos de tamaño adecuado. También usa los dientes para excavar refugios en sustratos duros y trepar por todo tipo de superficies. En el otro extremo del cuerpo está el ano, rodeado de diez placas: cinco grandes, en donde se localizan los orificios de sus órganos reproductores, y cinco pequeñas, formando el aparato apical.

Como los erizos de mar son organismos de fecundación externa, constituyen un excelente modelo para estudiar aspectos generales de la reproducción. Entre sus múltiples ventajas destacan la gran cantidad de gametos que producen; un erizo de mar macho puede producir hasta 10^{10} espermatozoides y la hembra hasta 10^6 óvulos. Su enorme producción de gametos permite aislar sus componentes celulares y caracterizarlos bioquímica y funcionalmente. Además, es importante mencionar que el genoma de la especie *S. purpuratus* está secuenciado y que de los 23 226 genes que constituyen el genoma del erizo, 7 077 comparte con el humano, lo que permite que algunos mecanismos moleculares y celulares sean compartidos entre los espermatozoides de ambas especies.

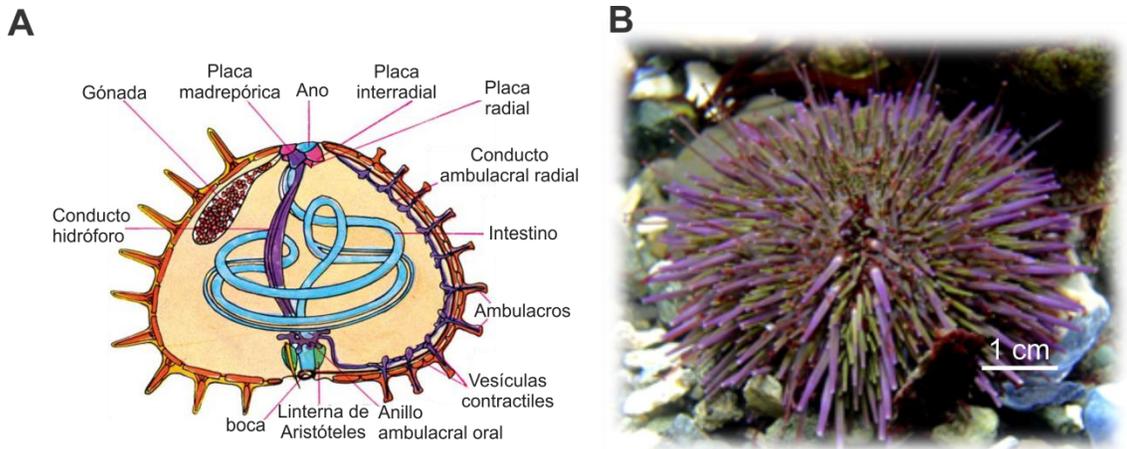


Figura 1.2 El erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.

A) Estructura interna y externa del erizo de mar. Modificada de: <http://www.asturnatura.com/articulos/equinodermos/erizos.php>. **B)** Fotografía de un erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.

1.2.1 Estructura del espermatozoide de erizo de mar

Los espermatozoides del erizo de mar son células muy pequeñas, terminales, muy especializadas y con una capacidad limitada para sintetizar proteínas (Dun, Aitken & Nixon, 2012; Kierszenbaum & Tres, 1975). La mayoría de sus transportadores iónicos y proteínas se sintetizan durante la diferenciación de las células espermatogénicas (progenitoras del espermatozoide); proceso denominado espermatogénesis.

Los espermatozoides tienen una cabeza ($4 \times 2 \mu\text{m}$) y un flagelo largo ($\sim 50 \mu\text{m}$). En la cabeza encontramos un gran núcleo, una vesícula acrosomal, un centriolo y en la base una sola gran mitocondria (**Figura 1.3**). Las dimensiones de cada uno de esos organelos varían entre género y especies. En el género *Strongylocentrotus* por ejemplo: el acrosoma es de $0.3 - 0.6 \mu\text{m}$, el núcleo es de $2 - 4.6 \mu\text{m}$ y la mitocondria varía entre 1 y $2.25 \mu\text{m}$ de diámetro (Drozdov & Vinnikova, 2010).

Por otra parte, el flagelo que es un componente indispensable para que el espermatozoide lleve a cabo su función está compuesto por el axonema. El axonema, considerado el aparato motor del espermatozoide, es una estructura de microtúbulos altamente organizada, compuesta por aproximadamente 250 proteínas que esta conservada durante la evolución en los flagelos y cilios (Inaba, 2003). Tiene una

estructura de 9 + 2 pares de microtúbulos, formados por un túbulo-A completo y un túbulo-B incompleto. Varias estructuras se unen a los 9 pares externos de estos microtúbulos y forman una red proteica altamente organizada (**Figura 1.4**).

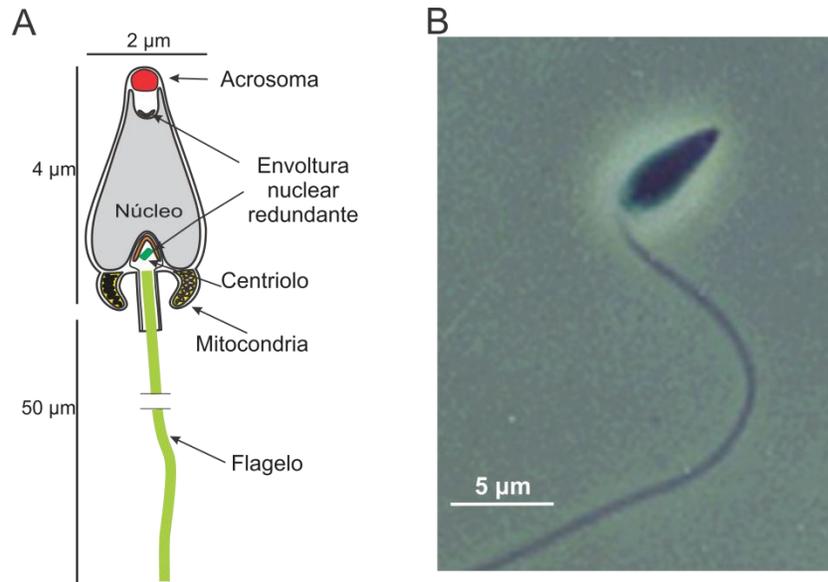


Figura 1.3 Morfología del espermatozoide de erizo de mar.

A) Esquema donde se indican las partes que forman al espermatozoide y sus dimensiones. (Modificada de Darszon et al., 2011). **B)** Micrografía de contraste de fases de un espermatozoide de erizo de mar (Castellano-Torres, 1993).

Algunos de los componentes de esta red proteica son:

a) *Los brazos de dineinas*: las dineinas son ATPasas, que al hidrolizar el ATP generan una fuerza motriz permitiendo que el espermatozoide se mueva. En el axonema se forman dos tipos de proyecciones; los brazos externos, compuestos por dos cadenas pesadas (~500 kDa), tres o cinco cadenas intermedias (120–60 kDa) y seis cadenas ligeras (30–8 kDa) que están asociadas con la calmodulina (proteína que une calcio). La otra proyección que forman las dineinas son los brazos internos, estos son más complejos que los anteriores porque incluyen múltiples componentes moleculares como la actina con una gran variedad de cadenas pesadas, intermedias y ligeras (Inaba, 2003). El desplazamiento de los microtúbulos generado por las

dineinas que se deslizan unidireccionalmente a través de la base del flagelo produce el batido flagelar.

b) *Las espigas radiales*: están encargadas de regular a los brazos internos de dineinas mediante fosforilación y defosforilación de proteínas. En estas proyecciones se ha identificado a la calmodulina, lo que indica que cambios en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) son importantes para el batido flagelar (Bannai, Yoshimura, Takahashi & Shingyoji, 2000). Algunas otras proteínas identificadas en esta parte del axonema son las kinesinas, las tektinas y las nexinas (Inaba, 2003). Las kinesinas son una familia de proteínas motoras que median el transporte intracelular anterógrado (inverso a las dineinas) sobre los microtúbulos. Las tektinas son proteínas en forma de filamentos que forman parte del doblete externo de microtúbulos en el axonema de los cilios y flagelos de diversos tipos celulares. Finalmente las nexinas son proteínas que unen el doblete de microtúbulos externos para coordinar el movimiento entre ellos (Boron, 2005).

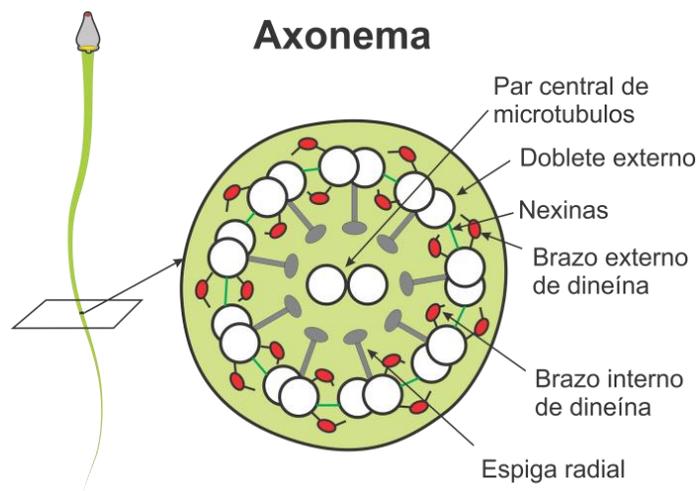


Figura 1.4 Dibujo de un corte transversal del flagelo del espermatozoide de erizo de mar donde se observa la estructura y los componentes del axonema.
(Modificada de Darszon et al., 2011).

1.2.2 La fisiología del espermatozoide de erizo de mar

El espermatozoide es una célula terminal, con un núcleo altamente condensado y ausencia de la síntesis de proteínas (Dun et al., 2012; Kierszenbaum &

Tres, 1975); aunque esto último aun es un punto en controversia (Gur & Breitbart, 2008). Todos sus transportadores iónicos y proteínas se sintetizan durante la diferenciación de las células espermatogénicas, progenitoras del espermatozoide. Con estas características su función es llevar a cabo la fecundación del óvulo homólogo para la generación de un nuevo organismo.

La cadena de reacciones que culminan en la fecundación se inicia en el espermatozoide que experimenta múltiples cambios fisiológicos al comunicarse con su óvulo homólogo. En los testículos o gónadas de los erizos de mar, los espermatozoides son inmóviles debido a una alta presión de CO₂ que mantiene el pH intracelular (pH_i) por debajo (~7.1) de los niveles necesarios para la activación de las dineinas (ATPasas en el flagelo) (Christen, Schackmann & Shapiro, 1982). Cuando los espermatozoides se liberan al agua de mar la presión de CO₂ disminuye, el pH_i comienza a subir (~7.6) por una salida de protones (H⁺) a través del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) que activa (6 veces) a las dineinas catalizando la hidrólisis del ATP; además se activa la respiración mitocondrial (50 veces) y por lo tanto los espermatozoides comienzan a nadar (Christen, Schackmann & Shapiro, 1983). Así mismo, hay una hiperpolarización de la membrana plasmática en los espermatozoides inducida por una baja concentración de iones K⁺ en el agua de mar, que activa al NHE contribuyendo al aumento en el pH_i y al mismo tiempo a la activación de las adenilato ciclasas (AC's). A la par, la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa mantiene bajos los niveles de Na⁺ y participa en la regulación del pH_i (Christen, Schackmann, & Shapiro, 1986; Gatti & Christen, 1985). El aumento en la actividad de las AC's, conduce a una elevación en los niveles de AMPc (Beltrán, Zapata, & Darszon, 1996; Bookbinder, Moy & Vacquier, 1990) que a su vez regula la actividad de canales iónicos (Galindo, Neill & Vacquier, 2005), activa a una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (Epac) (Amano, Lee, Goto & Harayama, 2007) ó activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) para fosforilar proteínas esenciales para la movilidad flagelar (Trimmer & Vacquier, 1986).

1.2.3 La regulación de la movilidad de los espermatozoides por el Speract

Los óvulos de los erizos de mar están cubiertos de una matriz extracelular llamada gelatina (EJ), compuesta principalmente por polímeros de fucosa sulfatada que inducen la reacción acrosomal (RA; esencial para que el espermatozoide fecunde al óvulo homólogo) y por péptidos activadores del espermatozoide (SAP's, de sus siglas en inglés, por ejemplo el Speract), que difunden en el agua de mar (Suzuki, 1995) y activan la movilidad de los espermatozoides produciendo una ligera acidificación (pH_i 6.2-6.8) del agua de mar (Ohtake, 1976). Estos péptidos se encuentran en los óvulos de diferentes especies y funcionan como ligandos especie-específica (Suzuki, 1995). La unión del SAP a su receptor en el flagelo del espermatozoide (**Figura 1.5**), induce cambios fisiológicos rápidos en los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), en el potencial de membrana (E_m), en el pH intracelular (pH_i) y en la concentración de calcio ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) y sodio intracelular ($[\text{Na}^+]_i$) de la célula (Darszon, 2008).

El Speract (decapéptido con los siguientes aminoácidos: GFDLNGGGVG), fue el primer SAP purificado e identificado estructuralmente de los óvulos de *Hemicentrotus pulcherrimus* (Suzuki, 1995) y *S. purpuratus* (Hansbrough & Garbers, 1981). La relevancia fisiológica de este decapeptido no se comprende del todo, ya que el Speract induce un efecto quimiotáctico en los espermatozoides de los erizos de mar *Lytechinus pictus* pero no en los de *S. purpuratus* (Guerrero et al., 2010). Está demostrado que los SAP's le facilitan al espermatozoide atravesar la capa de gelatina del óvulo homólogo (N. Suzuki & Garbers, 1984), además de promover la RA en algunas especies (Nishigaki, Chiba, Miki & Hoshi, 1996). Bajo condiciones fisiológicas, el espermatozoide puede detectar el gradiente del Speract hasta una distancia <5 mm de la periferia del óvulo. El Speract se va uniendo a sus receptores (10^4 – 10^6 dependiendo de la especie de erizo de mar) en el flagelo del espermatozoide gradualmente hasta saturarlos incluso antes de llegar al óvulo (Nishigaki & Darszon, 2000).

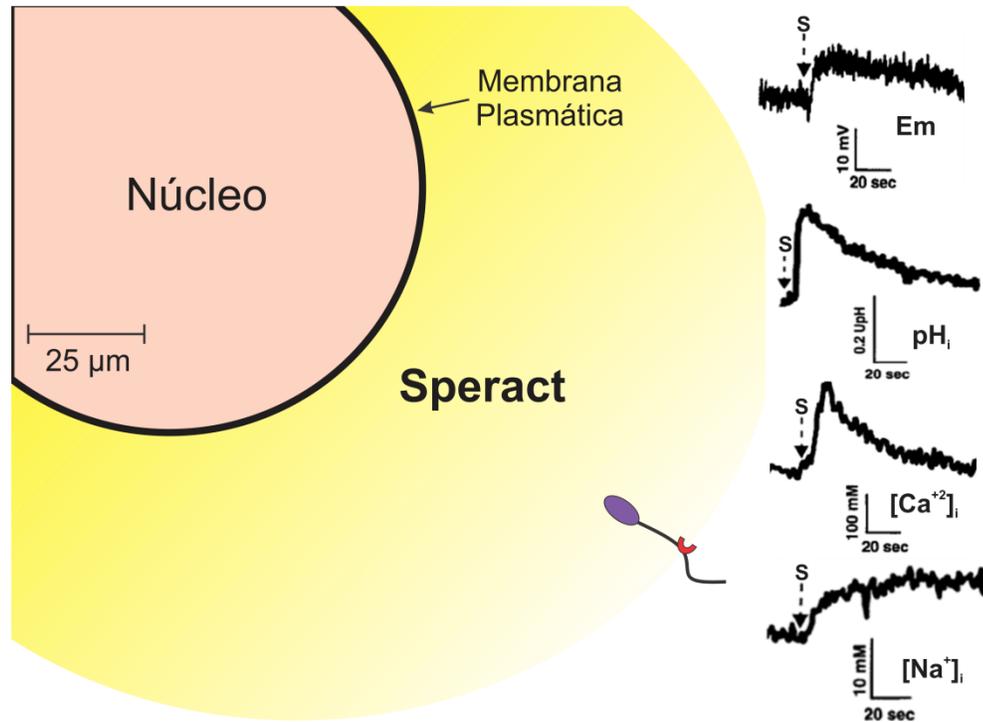


Figura 1.5 Dibujo del gradiente de Speract generado por la capa de gelatina que rodea al óvulo del erizo de mar y cambios iónicos ($[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$, pH_i) y del potencial de membrana (Em) inducidos por la unión del Speract a su receptor en el espermatozoide.

La escala corresponde al óvulo. El espermatozoide está amplificado para poder mostrar un dibujo del receptor del Speract (arco rojo) en el flagelo. Del lado derecho se muestran los trazos representativos de los cambios en el potencial de membrana (Em), en el pH (pH_i), en las concentraciones de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y de sodio ($[Na^+]_i$) intracelulares inducidos por la unión del Speract a su receptor en el flagelo del espermatozoide, determinados con fluoroforos sensibles a cada uno de dichos parámetros (Modificada de Darszon, 2008).

En los espermatozoides de *S. purpuratus* utilizando técnicas de entrecruzamiento ("cross-linking"), se identificó al receptor del Speract. Dicho receptor, es una proteína de 77 kDa cuya secuencia de aminoácidos muestra un segmento transmembranal cerca del carboxilo terminal y muchas cisteínas en el dominio extracelular de unión al Speract (Dangott & Garbers, 1984; Dangott, Jordan, Bellet & Garbers, 1989). La unión del Speract a su receptor activa una guanilato ciclasa soluble en detergente (G_{Cm}) (Bentley, Tubb & Garbers, 1986) que está unida a la membrana plasmática por un segmento transmembranal (Dangott et al., 1989).

La actividad de la G_{Cm} está regulada por cambios en su estado de fosforilación (Ward, Moy & Vacquier, 1986), debido a que tiene seis serinas

fosforiladas en el estado basal de los espermatozoides (Kaupp, Kashikar & Weyand, 2008). La unión del SAP a su receptor disminuye transitoriamente la actividad de la GCm, debido a la inactivación del receptor por la defosforilación de cuatro serinas (Bentley et al., 1986; Ramarao & Garbers, 1985; Suzuki & Garbers, 1984; Ward, Garbers & Vacquier, 1985). La actividad y estado de fosforilación de la GCm se regulan por el pH_i de los espermatozoides (Shimomura & Garbers, 1986). Los cambios en los niveles de GMPc (sintetizado por la GCm) después de la unión del SAP a su receptor se regulan tanto por la actividad de la fosfodiesterasa 5 (FDE5) (Su & Vacquier, 2006) como por la inactivación de la GCm.

Blanca Galindo y colaboradores identificaron un canal de potasio activado por GMPc (tetraKCNG) en vesículas de membrana plasmática de flagelos aislados de espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Galindo, de la Vega-Beltrán, Labarca, Vacquier & Darszon, 2007). Este canal es el responsable de la hiperpolarización inducida por la unión del Speract a su receptor en los espermatozoides de erizo de mar (Darszon, Guerrero, Galindo, Nishigaki & Wood, 2008). A la hiperpolarización le sigue una despolarización de la membrana plasmática, la cual se debe parcialmente a la entrada de calcio a los espermatozoides (Beltrán et al., 1996; Reynaud, De La Torre, Zapata, Liévano & Darszon, 1993) por la apertura de canales permeables a calcio inducida por el Speract (Cook & Babcock, 1993; Schackmann & Chock, 1986). Tanto la actividad de las adenilato ciclasas (AC's) como el calcio, son determinantes en la movilidad de los espermatozoides. El AMPc segundo mensajero producto de las AC's puede actuar de manera directa uniéndose a canales iónicos, activando a Epac (proteína de intercambio de nucleótidos de guanina) o de manera indirecta fosforilando proteínas a través de la PKA.

Con base en los resultados de experimentos de varios grupos de investigación (Cook & Babcock, 1993; Galindo et al., 2007, 2005; Garbers, 1989; Granados-Gonzalez et al., 2005; Kaupp & Seifert, 2001; Nomura, Beltrán, Darszon & Vacquier, 2005; Su & Vacquier, 2002), se propuso un modelo de la cascada de señalización inducida por el Speract (**Figura 1.6**). Algunas de las proteínas involucradas en esta vía de señalización son: el receptor del Speract, la GCm, el tetra-

KCNG, un intercambiador sodio/calcio dependiente de potasio (NCKX de sus siglas en inglés), un intercambiador sodio/protón (NHE, de sus siglas en inglés), un canal permeable a sodio activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (spHCN), canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), las adenilato ciclasas soluble (sAC) y transmembranales (ACm). Además se propone la participación de un canal de cloro regulado por calcio (CaCC) y un canal de potasio regulado por calcio (CaKC) (Wood et al., 2007). Se plantea que después de la unión del Spermact a su receptor en el flagelo del espermatozoide, se induce la síntesis de GMPc el cual se une y abre un canal de potasio (tetraKCNG) provocando una hiperpolarización del potencial de membrana (E_m). La hiperpolarización activa canales como el spHCN, remueve la inactivación de los canales VDCC, facilita la salida de calcio por el intercambiador NCKX y activa al intercambiador spNHE. La apertura de los canales spHCN contribuye a la despolarización de la membrana plasmática producto de la entrada de sodio, así como aumentos en la $[Ca^{+2}]_i$ debido a la actividad de los VDCC. Además, la actividad del intercambiador NHE induce un aumento en el pH_i . Tanto la alcalinización como aumentos en las concentraciones de Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) y bicarbonato ($[HCO_3^-]_i$) activan a la sAC. También el aumento en los niveles de calcio en el flagelo regulan el batido flagelar y el nado de los espermatozoides por un mecanismo aun no bien conocido que involucra proteínas del axonema. Se piensa que este modelo de señalización es cíclico porque el aumento de calcio también abre los canales CaCC y CaKC permitiendo una nueva hiperpolarización, removiendo nuevamente la inactivación de los VDCC y de esta forma se vuelve un ciclo hasta que uno o varios de los componentes de la cascada de señalización es bloqueado (Darszon et al., 2008).

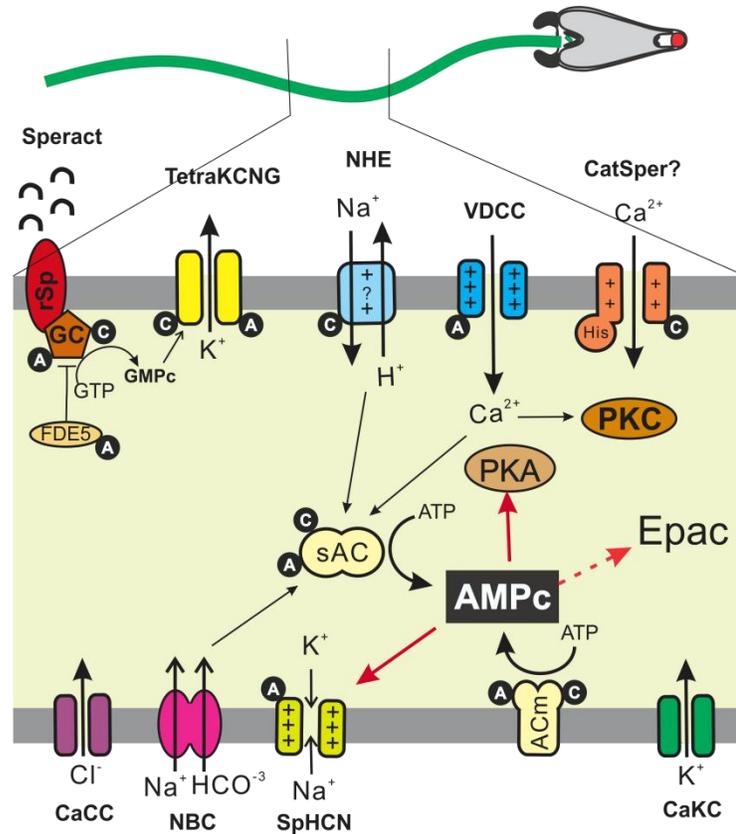


Figura 1.6 Modelo de la cascada de señalización del Speract.

Los círculos negros con la letra "A" o "C" indican las proteínas tienen sitios de fosforilación por la PKA o por la PKC respectivamente (Modificada de Darszon, A. 2008). rSp, receptor del Speract; GC, guanilato ciclasa; FDE5, fosfodiesterasa 5; TetraKCNG, canal de potasio activado por nucleótidos cíclicos de guanina e hiperpolarización; NHE, intercambiador sodio/protón activado por hiperpolarización; VDCC, canal de calcio dependiente de voltaje; CatSper?, canal de calcio específico de espermatozoide activado por depolarización y pH; CaCC, canal de cloro dependiente de calcio; NBC, co-transportador sodio/bicarbonato; SpHCN, canal catiónico activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos; CaKC, canal de potasio activado por calcio; sAC, adenilato ciclasa soluble; ACm, adenilato ciclasa transmembranal. (Modificada de Darszon, 2008).

1.2.4 Las adenilato ciclasas

Las adenilato ciclasas (AC's) son enzimas ubicuas responsables de la síntesis intracelular de AMPc, un segundo mensajero importante para un gran número de procesos biológicos en varios tipos celulares. En células somáticas de mamífero, existen nueve genes distintos que codifican para las adenilato ciclasas transmembranales (ACm), cuyo patrón de expresión y regulación es diferente en las células (Taussig & Gilman, 1995). Las ACm se regulan de manera diferencial por

proteínas G, por forskolina (compuesto no fisiológico extraído de la planta *Coleus forskohlii* (Hanoune & Defer, 2001), por cinasas (PKA y/o PKC) o por otras moléculas de señalización; tal y como se muestra en la **figura 1.7**. Otro tipo de AC's es la AC soluble (sAC), que se describió originalmente en extractos de testículo de mamífero (Braun & Dods, 1975) y posteriormente en espermatozoides (Buck, Sinclair, Schapal, Cann & Levin, 1999). La actividad de la sAC es dependiente de manganeso (Braun & Dods, 1975), es insensible a proteínas G y su afinidad por el ATP ($K_m \sim 1\text{mM}$) es 10 veces menor que la de las ACm (Johnson, Alvarez & Salomon, 1994).

En los espermatozoides de ratón se detectaron 5 (ACm1, ACm2, ACm3, ACm4 y ACm8) de las 9 isoformas de las ACm las cuales participan en el aumento de AMPc durante la capacitación (Baxendale & Fraser, 2003). Además se sabe que los ratones nulos del gen que codifica para la ACm3 son infértiles (Livera et al., 2005).

Es importante resaltar que de las 5 isoformas de las ACm (ACm1, XP_787811; ACm2, XP_780688; ACm3, XM_782404; ACm5, XP_787809 y ACm9, XP_798394) predichas en el genoma del erizo *S. purpuratus* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=7668&build=100.0; señaladas en rectángulos rojos en la **Figura 1.7**), cuatro (ACm1, ACm2, ACm5 y ACm9) se localizaron distribuidas de manera diferencial (mediante experimentos de inmunocitoquímica y de "Western blot" en membranas de cabeza o flagelos aislados) en los espermatozoides de erizo de mar. En el mismo trabajo se demostró la participación de la actividad de las ACm en la reacción acrosomal del espermatozoide de *S. purpuratus* (Beltrán et al., 2007).

La sAC presente en los espermatozoides, al igual que en células somáticas: 1) utiliza como co-factor el manganeso (Mn^{+2}); 2) es insensible a la activación por forskolina y 3) no se regula por proteínas G (Forte, 1983). Levin y colaboradores reportaron la purificación de la sAC en espermatozoides de rata, con una actividad específica de $\sim 20\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Buck et al., 1999). De manera interesante, el DNAC completo de la sAC predice una proteína de 187 kDa. La sAC del espermatozoide es una proteína soluble con dos dominios catalíticos de ciclasa cerca del amino terminal.

La secuencia de aminoácidos de estos dominios catalíticos es más similar a las AC's encontradas en bacterias y levaduras que a las ACm (Tesmer, 1997).

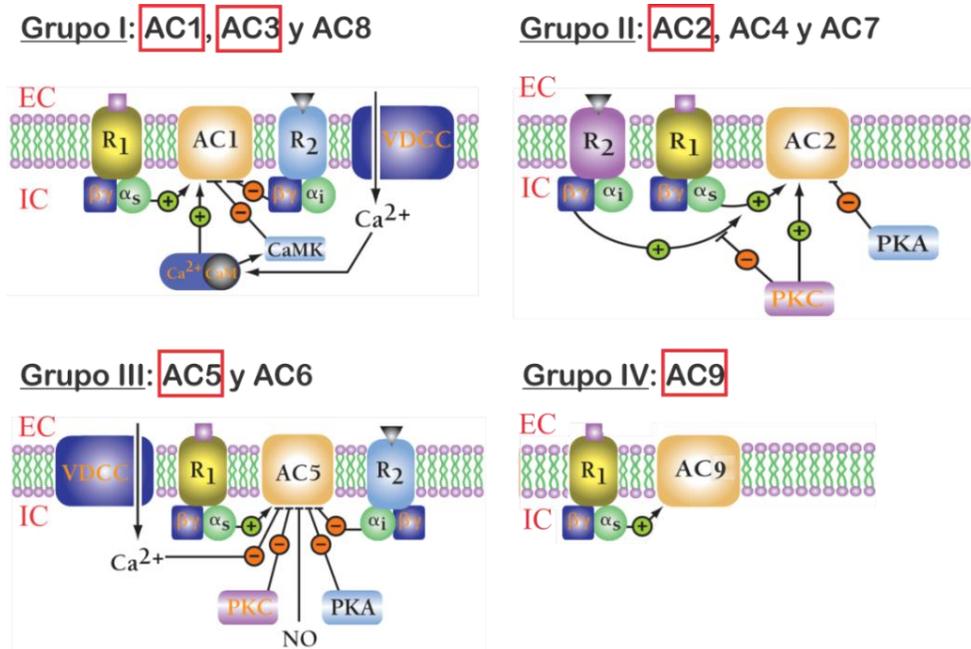


Figura 1.7 Clasificación de las 9 isoformas de las adenilato ciclasas de membrana (ACm) por su regulación en células somáticas de mamífero.

En los rectángulos rojos se indican las isoformas que se encuentran predichas en el genoma del erizo de mar *S. purpuratus* y con excepción de la ACm3, en el espermatozoide del erizo de la misma especie (Beltrán, 2007). R, receptores acoplados a proteínas G; VDCC, canales de calcio dependientes de voltaje; CaMK, calmodulina cinasa; IC, intracelular; EC, extracelular (Modificada de Sunahara, 2002).

Sabemos que la actividad de la sAC es importante para la fecundación ya que los espermatozoides de ratón que carecen de la sAC son infértiles porque tienen defectos en su movilidad y capacidad para fecundar al óvulo (Esposito et al., 2004); además de que los patrones de fosforilación en tirosinas durante la movilidad del espermatozoide están alterados (Luconi et al., 2005). En los espermatozoides de erizo de mar, también se identificó la actividad de una sAC cuya participación es esencial en la fecundación (Litvin, Kamenetsky, Zarifyan, Buck & Levin, 2003; Nomura et al., 2005). La actividad de la sAC (**Figura 1.8**) se regula por aumentos en la concentración de bicarbonato (Chen, 2000; Kaupp & Weyand, 2000), de calcio

(Jaiswal & Conti, 2003; Litvin et al., 2003), por la PKA (Bookbinder, Moy & Vacquier, 1991), por el pH (Beltrán et al., 1996; Cook & Babcock, 1993; Nomura et al., 2005) y de manera indirecta por una hiperpolarización de la membrana plasmática (Beltrán et al., 1996).

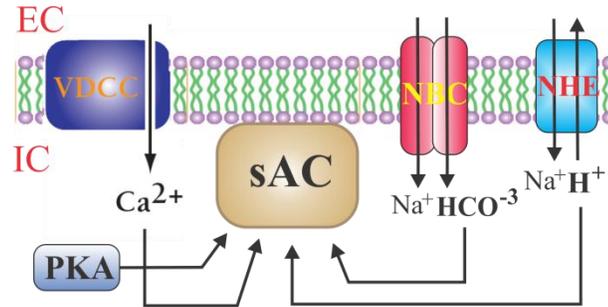


Figura 1.8 Regulación de la adenilato ciclasa soluble (sAC) en los espermatozoides de erizo de mar.

VDCC, canales de calcio dependientes de voltaje; NBC, co/transportador sodio/bicarbonato; NHE, intercambiador de sodio/protón; IC, intracelular; EC, extracelular. (Nomura et al., 2005; Kaupp et al., 2000).

1.3 La proteína de intercambio activada por AMPc (Epac)

El AMPc es un segundo mensajero intracelular que regula la actividad de un gran número de hormonas, neurotransmisores y otras moléculas de señalización. Desde su descubrimiento (Walsh, Perkins & Krebs, 1968), la PKA, se consideró el principal efector del AMPc en muchos tipos celulares participando en varios procesos fisiológicos (Beavo & Brunton, 2002). Sin embargo en 1998, se descubrió la actividad de un nuevo blanco del AMPc, una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina que se activa directamente por el AMPc, llamada Epac (de Rooij et al., 1998) la cual es insensible a inhibidores de la PKA (Bos, 2003).

La Epac regula una vía de señalización independiente a la de la PKA, activando a las proteínas Rap1. La proteína Rap1 pertenece a la familia de las proteínas G pequeñas Ras y se activa de manera indirecta por AMPc, por calcio y por DAG. Específicamente Rap1 se une tanto a GDP como a GTP, siendo su forma activa la unida a GTP y la inactiva la unida a GDP. La actividad de Epac como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, de sus siglas en Inglés), promueve la disociación de la

unión de GDP a Rap1 permitiendo la asociación con el GTP. Existen dos isoformas de Epac, la Epac1 y la Epac2 las cuales son producto de dos genes diferentes en mamíferos. Existe una gran similitud entre las secuencias de ambas isoformas y las dos contienen una región regulatoria en su N-terminal y una región catalítica en su C-terminal. Su región catalítica contiene un dominio de intercambio de Ras (REM), un dominio de asociación a Ras (Ra) y el clásico dominio de homología CDC25 responsable de la actividad de intercambio de nucleótidos. Además, la región catalítica de Epac1 y Epac2 comparten un dominio Deshevelled/Egl-10/Pleckstrin (DEP) responsable de su localización en la membrana plasmática y Epac1 tiene un dominio de unión de nucleótidos cíclicos (CBD), mientras que Epac2 contiene dos dominios CBD (**Figura 1.9**). Se sabe que mientras que la distribución de Epac1 es ubicua en diferentes tejidos, la de Epac2 es más limitada (de Rooij et al., 1998; Kawasaki, 1998). La selectividad y afinidad del dominio CBD es de gran importancia para activar a las proteínas dependientes de la cantidad y del tipo de nucleótido cíclico. En el caso de la proteína Epac, su dominio CBD une AMPc con una concentración de activación media máxima (AC_{50}) de 45 μ M (Rehmann, Schwede, Døskeland, Wittinghofer & Bos, 2003), mientras que en el caso del canal spHCN su AC_{50} es de 0.7 μ M (Kaupp & Seifert, 2001) y la PKA posee una AC_{50} de ~ 1 μ M (Bos, 2003).

En las células somáticas, Epac regula el proceso de adhesión (Enserink et al., 2004), la secreción de insulina, la exocitosis (Ozaki et al., 2000), la diferenciación, la proliferación celular (Kiermayer, Biondi, & Imig, 2005), la apoptosis, y la fagocitosis entre otros eventos fisiológicos importantes (Cheng, Ji, Tsalkova & Mei, 2008). Asimismo, se sabe que Epac participa en el batido flagelar de los espermatozoides de hámster (Kinukawa et al., 2006) y en la reacción acrosomal de los espermatozoides de humano (Branham, Mayorga & Tomes, 2006). Además, se identificó la vía de señalización AMPc-Epac en la cabeza de los espermatozoides de ratón (Amano et al., 2007) y está descrito que participa en diferentes eventos importantes para la fecundación de espermatozoides de mamíferos (Miro-Moran et al., 2012).

Aunque en el genoma del erizo de mar *S. purpuratus* está predicha la secuencia para una isoforma de Epac (XP_784278.3, similar a Epac2 de humano) y por

experimentos tipo western blot se detectó (Beltrán, no publicado); sabemos que dicha proteína está presente en el espermatozoide de dicha especie pero no hay ningún antecedente donde se muestre la participación de Epac en la fisiología del espermatozoide.

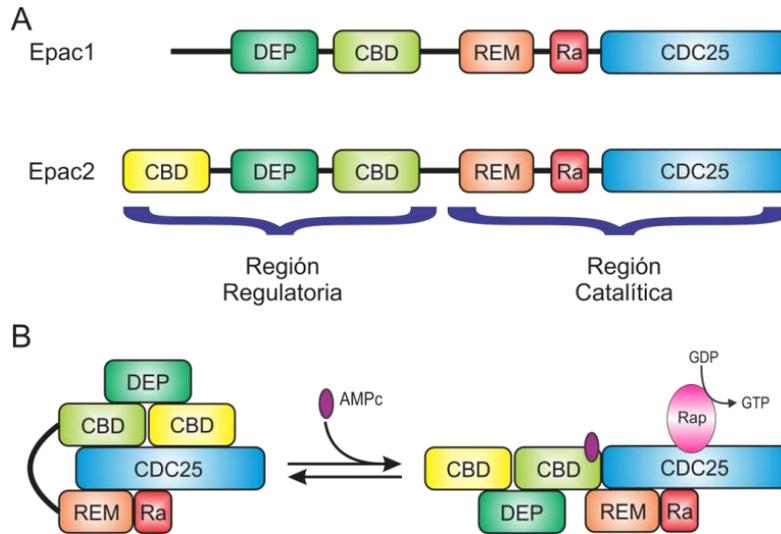


Figura 1.9 La estructura de Epac con sus dominios múltiples.

A) Dominios que conforman a Epac1 y a Epac2, indicando la región regulatoria con los dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CBD) y el dominio Deshevelled/Egl-10/Pleckstrin (DEP); y la región catalítica conformada por el dominio CDC25 responsable del intercambio de nucleótidos de guanina, dominio Ras (Ra) y el motivo de intercambio de Ras (REM). B) La activación de Epac2 por la estimulación con AMPc conduce a la apertura de la proteína permitiendo la interacción con Rap para que se lleve a cabo el intercambio Rap-GDP a Rap-GTP (Modificada de Bos, 2006).

1.4 La fosforilación de proteínas

Las enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación y de defosforilación son las cinasas y las fosfatasas respectivamente, las cuales constituyen una de las familias más grande de proteínas. En la reacción de fosforilación, el grupo terminal fosfato (γ) del ATP se transfiere a residuos de serina o treonina por una clase de cinasas (de las familias AGC y CaMK) o a residuos específicos de tirosinas por otro tipo de cinasas (de la familia de las PTK). Por lo general la reacción de fosforilación se lleva a cabo dentro de la célula (citoplasma), que es donde el grupo fosfato donado por el ATP es más abundante. Por otra parte, las fosfatasas revierten

el efecto de las cinasas al remover el grupo fosfato unido a la proteína blanco. Es importante mencionar que la frecuencia entre el estado fosforilado y defosforilado dependen de la actividad relativa de las cinasas y las fosfatasas, y que no en todos los casos es reversible (Berg, Stryer & Tymoczko, 2008).

La fosforilación reversible de proteínas es reconocida como el mecanismo principal para el control de eventos intracelulares en células eucariotas. Procesos tan diversos como el metabolismo, la contractibilidad, el transporte a través de membrana, la secreción, la transcripción/traducción de genes, la división celular y la fecundación; todos son regulados por esta modificación pos-traducciona. La fosforilación (o defosforilación) en residuos de serina, treonina o tirosina conduce a cambios conformacionales para la regulación de la actividad biológica de las proteínas. Se conoce la estructura y función de muchas cinasas y sus mecanismos de regulación. Algunas cinasas son específicas para un sustrato en particular; mientras que otras fosforilan muchas proteínas intracelulares.

1.4.1 Las proteínas cinasas

Las cinasas eucarióticas comprenden una de las superfamilias más grandes de proteínas y genes homologos. Dentro de esta superfamilia, hay cientos de miembros diferentes cuyas secuencias se conocen. Las cinasas conforman >1% de todas la proteínas codificadas en el genoma humano; aproximadamente una de cada tres proteínas en células de mamífero se fosforila (Hanks & Hunter, 1995; Hunter, 1987). Aunque hay una gran diversidad de estructuras, formas de regulación y sustratos específicos entre las cinasas; todas tienen características estructurales en común. Todas las cinasas conservan un motivo en su secuencia que da la clara evidencia de cómo estas enzimas pueden transferir el grupo fosfato- γ del ATP (o GTP) a un grupo hidroxilo (grupo alcohol para serina y treonina; y grupo fenólico para tirosina) de la proteína sustrato. La comparación de la secuencia en el fragmento catalítico (250–300 aminoácidos) de las cinasas fue utilizado para organizar estas enzimas en árboles filogenéticos y de esta forma agruparlos en subfamilias con funciones similares.

La actividad catalítica de estas enzimas está designada por su dominio cinasa. Se atribuyen tres funciones al dominio cinasa:

- 1) La orientación y unión del donador del fosfato- γ del ATP o GTP como un complejo con cationes divalentes (comúnmente magnesio (Mg^{+2}) o manganeso (Mn^{+2})).
- 2) La unión y orientación de la proteína (o péptido) sustrato.
- 3) La transferencia del fosfato- γ del ATP o GTP al residuo hidroxilo del aceptor (serina, treonina o tirosina) en la proteína sustrato.

Considerando la actividad de su dominio, las cinasas se dividen en cinco grupos como se observa en la **tabla 1.1**.

Tabla 1.1 Clasificación de las proteínas cinasas considerando la actividad de su dominio.

Nombre del grupo	Familia	Ejemplo de cinasa
• AGC	I Regulados por nucleótidos cíclicos	PKA, PKG
	II Dependiente de fosfolípidos y activado por diacilglicerol	PKC
	III Relacionado a PKA y PKC	RAC
	IV Fosforilan receptores acoplados a proteínas-G	β ARK, GPRK
	V En la gemación de levaduras similar a AGC	Sch, Ykr, Ypk1
	VI Fosforila la proteína ribosomal S6	S6K, RSK
	VII Gemación en levaduras	Dbf2, Dbf20
	VIII Florecimiento en plantas	PVPK1, AtPK5
• CaMK	I Reguladas por calcio/calmodulina	
	A. Multifuncional	CaMK1, EF2K
	B. Cinasas fosforilasas	PhK γ M, RSK
	C. Cinasa de la cadena ligera de miosina	SkMLCK, Titian
	D. En plantas	CDPK, atAK1
	E. En plantas con dominio ácido	ASK
	F. Otras relacionadas con CaMK	PskH1, Rck1
II Familia Snf1/AMPK	AMPK, p78	
• CMGC	I Dependientes de ciclinas (CDKs)	Cdk1, PCTAIRE
	II Erk (MAP cinasa)	Erk1, SAPK
	III Síntesis de glicógeno	GSK, Sgg
	IV Familia Clk	Clk, Srpk1

• PTK	I	Familia Src	Src, Lyn, Fyn
	II	Familia Brk	Brk
	III	Familia Tec	Tec, Btk
	IV	Familia Csk	Csk, MatK
	V	Familia Fes (Fps)	Fes/Fps, Fer
	VI	Familia Abl	Abl, Arg
	VII	Familia Syk/Zap	Syk, Zap70
	VII	Familia Jak	Tyk2, Jak
	IX	Ack	Ack
	X	Fak	Fak
	XI	Familia del receptor del factor de crecimiento epidermal	EGFR, ErbB
	XII	Familia de receptores Eph/Elk/Eck	Eph, Sek
	XIII	Familia Axl	Axl, Eyk
	XIV	Familia Tie/Tek	Tie, Tek
• Únicas	I	Familia Polo	Plk, Sak
	II	Familia MEK/STE7	MEK, Ste7
	III	Familia MEKK/Ste11	MEKK, Ste11
	IV	Familia Pak/Ste20	Pak, Ste20
	V	Familia Nima	Nek, Stk
	VI	Familia wee1/mik1	Wee1Hu
	VII	Familia para control de traducción	HR1, PKR
	VIII	Familia Raf	Raf-1, B-Raf
	IX	Familia de receptores Activina/TGF β	ActR-1, ALK-6
	X	Familia de receptores de el florecimiento de plantas	ZmPK1, Srk
	XI	Familia de mezcla de linaje	Mik
	XII	Familia de cinasa de caseína	CK1
	XIII	Familia PKN en procariontes	Pkn, Mos

AGC, grupo cuya actividad se regula por segundos mensajeros; CaMK, cinasas reguladas por calcio/calmodulina; CMGC, cinasas que participan en un proceso posterior a la activación por segundos mensajeros; PTK, cinasas que fosforilan específicamente residuos de tirosina; Únicas, Incluye una amplia gama de proteínas cinasas clonadas a partir de plantas que no se han podido clasificar en alguno de los cuatro grupos anteriores (Modificada de Hanks, SK. y Hunter, T. 1995).

1.4.1.1 La cinasa dependiente de AMPc (PKA)

En células eucariotas, la PKA es una de las primeras cinasas descubiertas y mejor caracterizada (Walsh et al., 1968). Sirve como modelo para la estructura y regulación de proteínas que tienen sitios de unión a AMPc así como para otras cinasas

(Taylor et al., 2004). La PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C); con cuatro tipos diferentes de subunidades R (RI α , RI β , RII α y RII β) y cuatro tipos diferentes de subunidades C (C α , C β , C γ y PrKX) (Taylor et al., 2004; Zimmermann, 1999). Las subunidades regulatorias pueden formar homodímeros o heterodímeros, y de esta forma contribuir a la diversidad molecular de la PKA. La holoenzíma o tetrámero (R₂C₂) es inactiva debido a que la subunidad catalítica inhibe la unión del AMPc al sitio de unión del fosfato en la subunidad regulatoria. El AMPc se une cooperativamente a los dos sitios A y B, presentes en la subunidad regulatoria. En la holoenzíma inactiva, sólo el sitio B está expuesto para la unión del AMPc, después de su unión al sitio B se induce la unión del AMPc al sitio A (Francis, Sharron, 2002). La unión de las 4 moléculas de AMPc en la holoenzíma R₂C₂ inactiva (dos moléculas de AMPc en cada una de las subunidades regulatorias) conduce a un cambio conformacional y la disociación del dímero de la subunidad regulatoria y dos monómeros de la subunidad catalítica (**Figura 1.10**), el cual convierte a la PKA en una enzima catalíticamente activa (Francis & Sharron, 2002; Kopperud et al., 2002; Taylor et al., 2004). La subunidad catalítica reconoce los residuos de serina (S) o de treonina (T) de las secuencias de aminoácidos, *RRxS* ó *RxxT* (donde *R*, es arginina; *S*, serina; *T*, treonina y *x*, es cualquier aminoácido) de las proteínas.

Una de las regiones más dinámicas de la estructura de las cinasas es el asa (loop en inglés) de activación, que contiene sitios de fosforilación críticos para su función. En ausencia de la fosforilación, esta asa adquiere una estructura irregular en una conformación no óptima para que se lleve a cabo la catálisis (Johnson, Noble & Owen, 1996). La actividad de muchas cinasas se regula por el estado de fosforilación de esta asa de activación. La subunidad catalítica de la PKA normalmente se encuentra ensamblada como una enzima activa con su asa de activación fosforilado (Shoji, Titani, Demaille & Fischer, 1979). Se sabe que existe un mecanismo regulatorio *in vivo* (**Figura 1.10B**) que involucra la fosforilación/defosforilación de la treonina 197 (Thr-197) que se encuentra en el asa de activación de la subunidad catalítica, esta fosforilación es un evento necesario para la maduración y actividad biológica óptima

de la PKA (Steinberg & Cauthron, 1993). Aunque la subunidad catalítica se fosforila también en la serina 338 y en otras serinas de la PKA, tanto en bacterias como en células de mamífero; estas fosforilaciones no afectan la actividad de la subunidad y tienen sólo efectos menores en la movilidad de la proteína en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PA-SDS) (Shoji et al., 1979; Steinberg & Cauthron, 1993; Yonemoto, Garrod, Bell & Taylor, 1993).

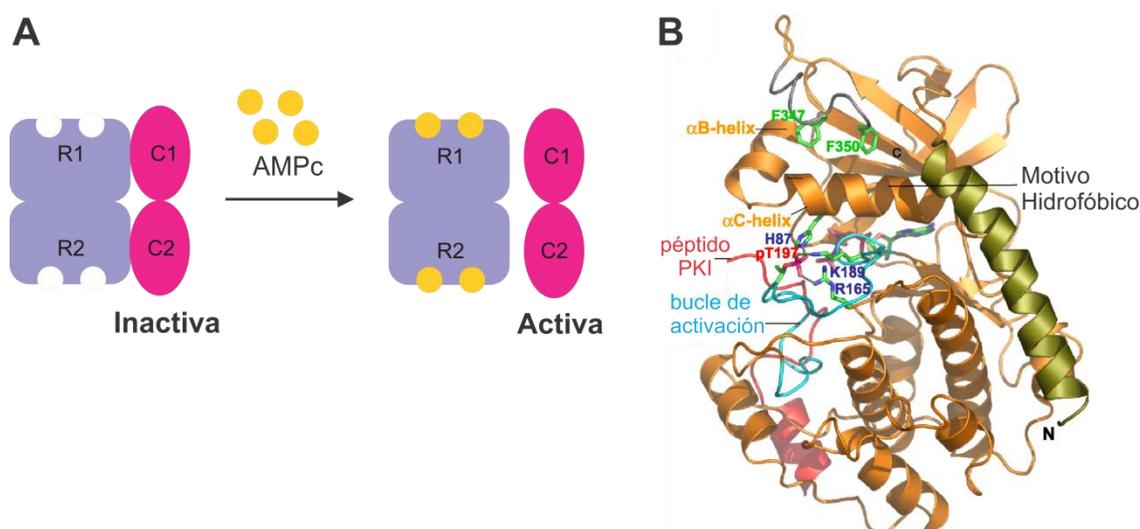


Figura 1.10 La proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA.

A) Esquema de la activación de la holoenzima PKA con sus subunidades regulatorias (R1, R2) y catalíticas (C1, C2) (tomada de la base de datos de proteínas “Protein Data Bank Japan”; **B)** Estructura tridimensional de la PKA, donde se indica el asa de activación y la treonina (pT197) fosforilada para la regulación de la actividad de la subunidad catalítica (Modificada de (Hanada, Feng, & Hemmings, 2004)).

La Thr-197 se encuentra dentro del subdominio VIII que está asociado con sitios de fosforilación en muchas otras cinasas de la familia AGC (**Figura 1.11**) incluyendo CDC2K, MAPK, MAPKK y muchas otras cinasas de tirosinas (Hanks & Hunter, 1995; Yonemoto et al., 1993). La secuencia de esta región está altamente conservada en las subunidades catalíticas de los mamíferos (isoformas C α , C β y C γ) (Beebe et al., 1990).

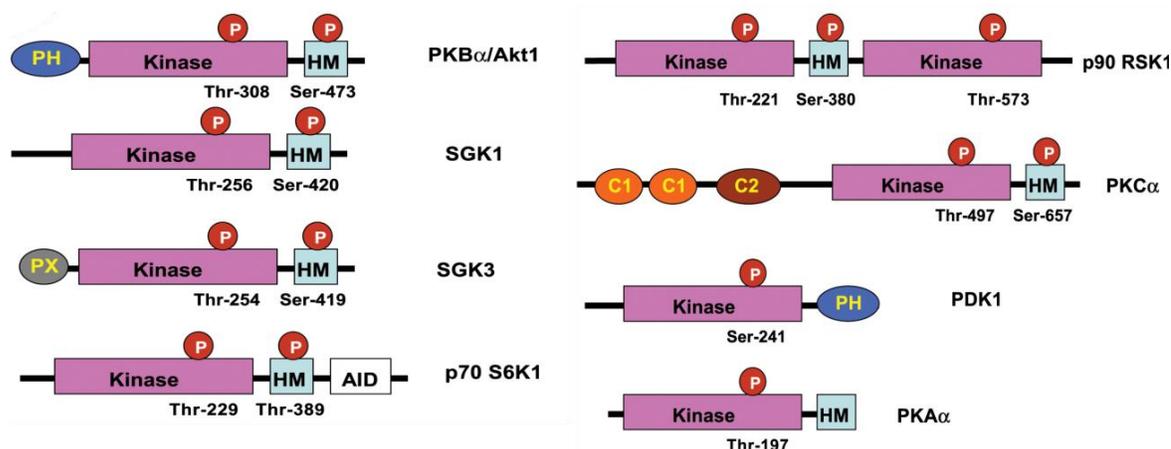


Figura 1.11 Esquema de las cinasas de la familia AGC.

Se muestra el dominio cinasa en el centro de la molécula con otros dominios como el PH (Pleckstrin homology) y el PX (phox) que actúan como sitios de unión de fosfoinosítidos y el motivo hidrofóbico (HM). Se indican los sitios de fosforilación (P) en el asa de activación del dominio cinasa y en el motivo hidrofóbico. Dominio auto inhibitorio (AID), dominio de unión de diacilglicerol/ésteres de forbol (C1), dominio de dirección a la membrana plasmática dependiente de calcio (C2) (Tomada de (Hanada et al., 2004)).

1.4.1.2 La proteína cinasa C (PKC)

La PKC es una familia de proteínas cinasas (grupo de cinasas AGC) activadas principalmente por la hidrólisis de lípidos (fosfatidilserina, diacilglicerol (DAG)) y calcio (Nishizuka, 1984). La PKC participa en la regulación de la función de otras proteínas a través de la fosforilación de residuos de serina y treonina en éstas (Kennelly & Krebs, 1991). Se identificó por primera vez en cerebro de rata y se definió como una enzima con actividad de cinasa de histonas (Inoue, Kishimoto, Takai & Nishuzuka, 1977).

Los miembros de la familia de la PKC son un polipéptido formado por una región regulatoria en el amino terminal (20–40 kDa) y una región catalítica en el carboxilo terminal (~45 kDa) separados por una bisagra que se proteoliza cuando la PKC se une a la membrana plasmática (Newton, 1993). La PKC se divide en 4 dominios conservados: C1, C2, C3 y C4 (Coussens et al., 1986); la función de cada uno de estos dominios se estableció por análisis bioquímicos y con mutaciones.

El dominio C1 es un motivo rico en cisteínas, duplicado en algunas isoformas, además en éste dominio se encuentra el sitio de unión para ésteres de forbol y DAG. Previo al dominio C1 se encuentra una secuencia denominada “pseudosustrato”. El dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento para los lípidos ácidos, y también el sitio de unión para calcio. Los dominios C3 y C4 forman la región catalítica donde se unen el ATP y el sustrato respectivamente (**Figura 1.12**).

Después de más de 30 años de análisis exhaustivos, a la fecha está definida como una superfamilia de PKC's dividida en tres sub-familias con base a su estructura y regulación: convencionales, nuevas y atípicas (Nishizuka, 1995).

- Convencionales: son las que se descubrieron primero y mejor caracterizadas, comprenden las isoformas α , β I, β II y γ . Esta sub-familia se caracteriza por ser reguladas por DAG y calcio; además son blanco para ésteres de forbol (PMA, en inglés) los cuales activan a la PKC eliminando el requerimiento de DAG y disminuyendo la concentración de calcio necesaria para su activación (Castagna, Takai & Kaibuchi, 1982).
- Nuevas: comprende las isoformas η , ϵ , δ y θ . Estas isoformas son estructuralmente similares a las convencionales, excepto que son insensibles a calcio porque el dominio C2 aunque mantiene su estructura, no tiene el grupo funcional de unión a calcio. Además, siguen siendo sensibles a DAG y ésteres de forbol.
- Atípicas: son las menos estudiadas que comprenden las isoformas λ , ι y ζ . Estas isoformas son insensibles a calcio y no responden a DAG y ésteres de forbol (Ono et al., 1989); ya que no tienen el dominio C2 y el dominio C1 sólo tiene un motivo rico en cisteína en vez de dos.

1.4.2 Las proteínas fosfatasas

La defosforilación es tan importante como la fosforilación, y prueba de esto es que las fosfatasas son componentes integrales de vías de señalización operadas por cinasas. Aunque poco son consideradas, tanto las fosfatasas de tirosina (PTP) como

las fosfatasa de serina-treonina (PSP), juegan papeles de gran importancia en la regulación de numerosos procesos celulares. Las fosfatasa controlan receptores celulares, cascadas de señalización, proteínas reguladoras en el citoplasma, factores de transcripción, procesos post-traduccionales y en algunos casos actúan como interruptores entre vías de señalización; activando una mientras inhibe la otra. En cada uno de estos procesos, las fosfatasa los regulan por una defosforilación en proteínas que son sustratos específicos para ellas como: enzimas, proteínas reguladoras, receptores, factores de transcripción, canales iónicos, etc. La mayoría de las veces, la defosforilación inactiva al sustrato, aunque en algunos otros casos, el sustrato se activa (Cho et al., 2013).

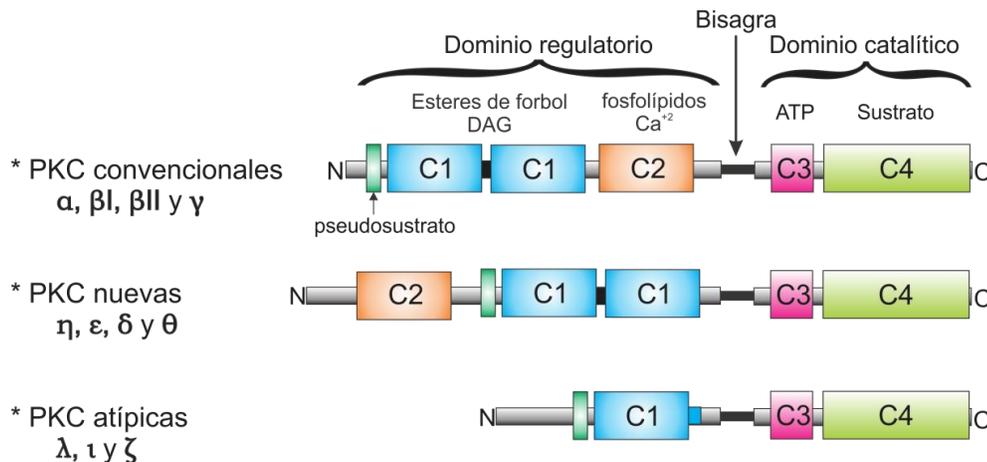


Figura 1.12 Clasificación de las familias de la PKC.

En mamífero la PKC comprende 11 isoformas divididas en tres sub-familias cuyo dominio catalítico está conservado pero difieren en su dominio regulatorio (Spitaler & Cantrell, 2004).

Todas las fosfatasa de tirosinas (PTP) tienen el motivo, CXXXXXR (C5XR) que nunca cambia y el cual forma el sitio activo de su dominio catalítico. Estas fosfatasa son proteínas monoméricas y se dividen en tres grupos; las PTP transmembranales o similares a receptores, las PTP citosólicas y las fosfatasa duales (DSP) (**Figura 1.13**). Las DSP son diferentes de los otros dos grupos de PTP porque éstas defosforilan sitios de tirosina así como de serina/treonina. Todas las PTP transmembranales se caracterizan por tener los dominios D1 y D2 que expresan el

dominio catalítico de fosfatasa, sin embargo solamente el dominio D1 que es el más próximo a la membrana plasmática es catalíticamente activo. Las PTP transmembranales se clasifican de acuerdo a sus segmentos extracelulares (ectodominios) proporcionándoles un amplio rango de funciones biológicas (Fischer, Charbonneau & Tonks, 1991). De la misma forma, las PTP citosólicas se clasifican de acuerdo a los dominios que las forman, los cuales funcionan como una señal de localización que dirige a las enzimas ya sea al núcleo o al citoesqueleto. (Gomperts, 1968)

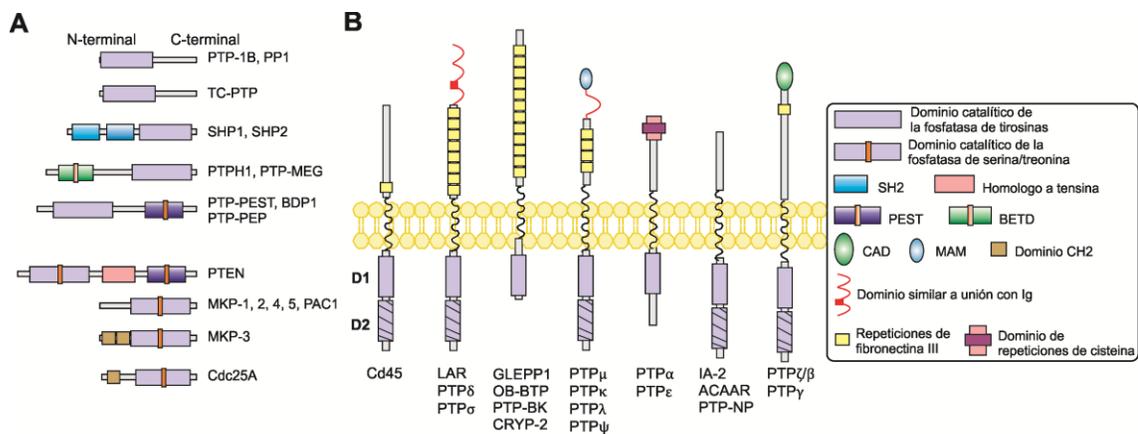


Figura 1.13 Clasificación de las proteínas fosfatasa.
A) Solubles y **B)** Transmembranales (Modificada de Fischer et al., 1991).

Por otro lado, las fosfatasa de serina/treonina (PSP) son proteínas oligoméricas que se caracterizan por su asociación con subunidades blanco. Esto las dirige a una localización en particular, y por lo tanto restringe su actividad a un rango limitado de sustratos (Cohen & Cohen, 1989). Existen tres familias de PSP: las fosfoproteínas fosfatasa (PPPs), las fosfoproteínas fosfatasa activadas por magnesio (PPMs) y las fosfatasa a base de aspartato (FCPs, TFIIF stimulated CTD phosphatases). Las PPPs se caracterizan por la presencia de un único dominio catalítico conservado con tres diferentes variantes de aminoácidos (-GDxHG-...-GDxVxRG-...-GNH-). Estas proteínas poliméricas se activan cuando una simple subunidad catalítica interactúa con una o más subunidades regulatorias.

1.4.3 La fosforilación de proteínas en los espermatozoides

Desde la identificación de cinasas y fosfatasas en los espermatozoides (Lee & Iverson, 1972; Tash et al., 1988) se ha considerado la importancia de la fosforilación de proteínas en la regulación de la movilidad. En 1973 se demostró la relación entre los niveles de AMPc y la movilidad de los espermatozoides, a la par del descubrimiento de la actividad de cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Garbers, First & Lardy, 1973) en espermatozoides de bovino. Posteriormente en un modelo de espermatozoides permeabilizados con el detergente Tritón X-100, se obtuvieron evidencias que confirmaron la participación directa del AMPc en la regulación de la movilidad (Murofushi, Ishiguro, Takahashi, Ikeda & Sakai, 1986; Tash & Means, 1983; Tash, Hidaka & Means, 1986; Tash, 1989). De esa manera se identificó a la axokinina, una proteína en el axonema del flagelo, que se fosforila de manera dependiente de los niveles de AMPc cuando la movilidad de los espermatozoides se activa con ATP (Tash & Means, 1982). De la misma manera, se identificaron otras proteínas como: la subunidad regulatoria 2 (RII) de la PKA (Noland, Abumrad, Beth & Garbers, 1987) y la calmodulina (CaM) (Tash & Means, 1983) como proteínas fosforiladas asociadas a la movilidad de los espermatozoides. En ese tiempo, se atribuyó a las ~250 proteínas que conforma el axonema (Inaba, 2003) la regulación de la movilidad de los espermatozoides por cambios en su estado de fosforilación debido a aumentos en los niveles de AMPc y calcio (Darszon, 2008; Tash, 1989). Por consecuencia, se creía que tener contacto directo con las proteínas del axonema permeabilizando las células con detergente, era la estrategia más apropiada para estudiar la fosforilación de proteínas durante la movilidad de los espermatozoides. Sin embargo, dichas condiciones no son fisiológicas, ya que se sabe que las vías de señalización que involucran a las cinasas, en muchos casos están mediadas por la membrana plasmática. Posteriormente los resultados de experimentos exponiendo los espermatozoides intactos a diferentes condiciones iónicas para mantenerlos inmóviles o móviles, demostraron que la activación de la movilidad aumentaba la fosforilación de algunas proteínas principalmente del flagelo (Bracho, Fritch & Tash, 1998). De manera similar a lo reportado en células permeabilizadas, en el modelo de espermatozoides intactos

también se demostró que además de la señalización por AMPc-PKA y calcio, el pH también es un factor importante para la regulación de la movilidad mediante la fosforilación de proteínas (Nakajima, Morita, Takemura, Kamimura & Okuno, 2005). Más recientemente se demostró que es la PKC y no la PKA, la cinasa que fosforila proteínas en el flagelo principalmente al activarse la movilidad de espermatozoides intactos de erizo de mar *Lytechinus pictus* (White, de Lamirande & Gagnon, 2007). Hasta ahora, la identidad, regulación y funciones de muchas proteínas importantes en la movilidad de los espermatozoides se desconoce.

1.5 Las balsas lipídicas y su importancia

Por muchos años se consideró que las membranas biológicas eran un “mosaico fluido” donde los lípidos están dispersos homogéneamente en el plano de la membrana y las proteínas flotan inmersas en la membrana con un movimiento lateral libre (Singer & Nicolson, 1972). Sin embargo, en los años 90’s varios trabajos propusieron un nuevo modelo para entender la naturaleza de las membranas biológicas (Jacobson, Sheets & Simson, 1995; Simons & Meer, 1988). Este modelo, como se muestra en la **figura 1.14** implicaba la segregación lateral de membranas biológicas en dominios discretos con diferentes estados físicos: donde la mayor parte de las membranas están desorganizadas en un estado líquido-desordenado, mientras que los dominios llamados “microdominios de membrana” forman plataformas rígidas en un estado líquido-ordenado con ensambles dinámicos de colesterol y esfingolípidos flotando en el lado exoplasmático de la bicapa (Harder & Simons, 1997). El estado físico de los microdominios de membrana (MM) es consecuencia de su composición de lípidos; ya que estos MM están enriquecidos en colesterol y glucoesfingolípidos así como glicerofosfolípidos con un alto grado de saturación en sus cadenas de ácidos grasos (Brown & London, 1998; Meder, Moreno, Verkade, Vaz & Simons, 2006). Los MM incluyen a: las *caveolas*, que son invaginaciones (50-100 nm) de la membrana plasmática en forma de matraz enriquecidas con la proteína caveolina (Lisanti et al., 1994) y a las balsas lipídicas (BL) que son microdominios

lineales resistentes a detergentes (DIGs, Detergent-Insoluble Glycolipid-enriched domain de sus siglas en inglés).

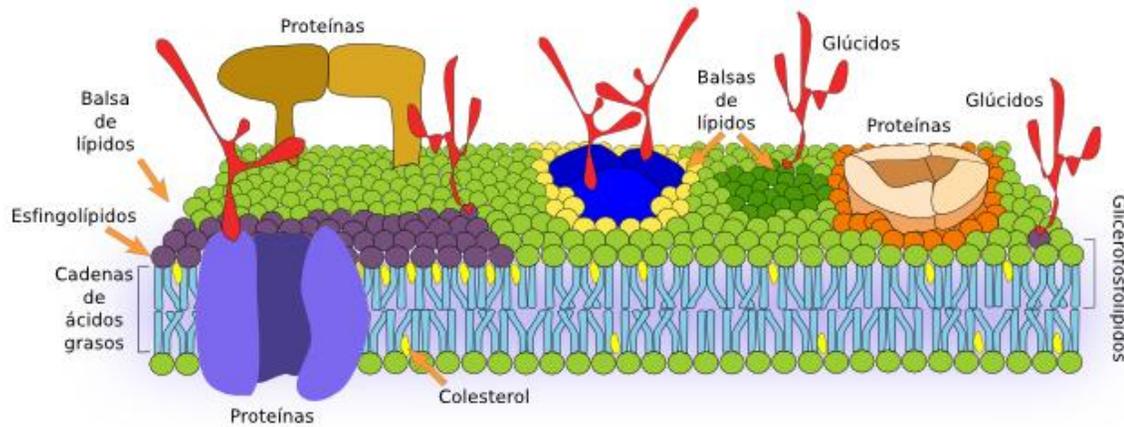


Figura 1.14 Dibujo de la membrana plasmática indicando cada uno de sus componentes y las balsas lipídicas.
(Tomada del Atlas de histología vegetal y animal. “La célula”).

Las metodologías utilizadas para el aislamiento de las BL son controversiales. La naturaleza dinámica y su tamaño pequeño (5-200 nm, bajo una resolución espacial de un microscopio de luz estándar)(Gaus et al., 2003; Pike, 2003), impide observarlas en células vivas y por lo tanto hace dudar de su existencia (Munro, 2003). Sin embargo, se observó en algunos tipos celulares una separación de fases de la membrana plasmática similares a estructuras específicas como filopodios o sitios de activación de linfocitos T (Gaus et al., 2003; Gaus, Chklovskaja, Fazekas de St Groth, Jessup & Harder, 2005; Kindzelskii, Sitrin & Petty, 2004). A la fecha se acepta que existen pequeños MM plasmática, los cuales tienden a agruparse bajo ciertos estímulos fisiológicos formando complejos más grandes. Los estudios que sustentan esta idea están basados en metodologías biofísicas y de fluorimetría sofisticados (Kusumi, Koyama-Honda & Suzuki, 2004; Rao & Mayor, 2005; Simons & Toomre, 2000). Además, la existencia de las BL está probada gracias a la utilización de una gran variedad de técnicas de microscopía con alta resolución como microscopía de transferencia de energía resonante por fluorescencia (FRET, de sus siglas en inglés), de recuperación de fluorescencia después del foto-blanqueo (FRAP, de sus siglas en

inglés), de rastreo de una sola partícula (SPT) y de fuerza atómica (AFM) que permiten visualizar la organización y movilidad de los lípidos y proteínas en la membrana plasmática (Bruckbauer et al., 2007; James, Hennessy, Berge & Jones, 2004; Jones et al., 2010).

Existen varios métodos bioquímicos para el aislamiento de las BL ó microdominios resistentes a detergentes (DRMs, de sus siglas en inglés) ó microdominios de baja densidad insolubles en detergentes no iónicos (LD-DIM, de sus siglas en inglés). Aunque estos métodos implican la ruptura de las células y reorganización de la membrana plasmática, son muy utilizados para obtener los MM que representan a las BL (Pike, 2004). Un método clásico para el aislamiento de las BL se basa en su propiedad de ser resistentes a la solubilización con detergentes no iónicos (como Tritón X-100) a bajas temperaturas (4°C) (Brown & Rose, 1992); y éstas se pueden aislar como una fracción de baja densidad después de la centrifugación en un gradiente de densidad (sacarosa u Optiprep®) (Yuan, Takeuchi & Salant, 2002). Los métodos basados en el aislamiento de BL con detergentes son una estrategia fácil y muy utilizadas, sin embargo son criticados porque por si mismos pueden inducir la formación de microdominios o micelas (Chamberlain, 2004; Lichtenberg, Goñi & Heerklotz, 2005; Sot, Collado, Arrondo, Alonso & Goñi, 2002) y porque diferentes detergentes aíslan diferentes tipos de microdominios (Chamberlain, 2004). No obstante, se sabe que los MM aislados con detergentes corresponden a las BL y son funcionales (Munro, 2003; Pike, 2004). Por otra parte, también se conocen métodos para el aislamiento de BL sin el uso de detergente. El método más utilizado se basa en la ruptura suave de la membrana plasmática por sonicación, seguido por el aislamiento de las BL en una fracción ligera de un gradiente de densidad (Smart, Ying, Mineo & Anderson, 1995; Song et al., 1996). Ambos métodos, tanto el que involucra detergente como el que no, se utilizaron en el mismo tipo celular y el análisis de sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas permitió mostrar resultados similares (García-Marcos et al., 2006).

El papel más importante de las BL en la superficie de las células es su función en la transducción de señales. Las BL son descritas como “plataformas fluidas

de señalización” que segregan componentes de la membrana plasmática y compartimentalizan proteínas. Si se considera que 1) los procesos de señalización son muy rápidos, 2) que los componentes involucrados en estos procesos tienen normalmente una expresión baja y 3) que las interacciones deben ser muy específicas y reguladas finamente; por lo tanto la compartimentalización, como ocurre en las BL, debe ser necesaria para explicar estas propiedades de la transducción de señales (Muallem & Wilkie, 1999; Ostrom & Insel, 2004). La presencia en las BL de muchas proteínas que participan en la señalización celular apoya la idea de que estos dominios juegan un papel muy importante en la transducción de señales (Pike, 2003). Está bien establecido que en el caso de la vía de señalización de la cinasa de tirosinas, adaptadores, proteínas de andamiaje y enzimas se reclutan en el lado citoplasmático de la membrana plasmática como resultado de la activación por un ligando (Hunter, 1987). Si la activación de un receptor se lleva a cabo en la BL, el complejo de señalización se protege de la participación de otras enzimas que no se encuentren dentro de la BL (como fosfatasa) que podrían afectar el proceso de señalización (Simons & Toomre, 2000). En general, las BL reclutan proteínas en un nuevo microambiente, donde el estado de fosforilación se modifica por cinasas y fosfatasas locales regulando vías de señalización al alta o a la baja (Suzuki, 2012).

En las BL de varios tipos de células somáticas se identificaron canales iónicos cuya actividad está regulada por su presencia dentro de éstas. El canal activado por nucleótidos cíclicos e hiperpolarización HCN4, expresado en células HEK (Barbuti et al., 2004) y el canal de potasio dependiente de voltaje Kv2.1, del cerebro de rata (Martens et al., 2000); se identificaron en las BL. La localización y actividad de estos canales se modificó al desintegrar las BL utilizando un secuestrador de colesterol como la metil β -ciclodextrina. Así como estos ejemplos, hay otros más (Davies et al., 2006; Treviño, Serrano, Beltran, Felix & Darszon, 2001) donde la actividad de una molécula está regulada por su presencia en estas plataformas de señalización o BL.

1.5.1 Las balsas lipídicas en los espermatozoides

La evidencia inicial de la presencia de BL en el espermatozoide surgió de la identificación de una proteína marcadora de BL, la caveolina-1, en la cabeza y el flagelo de los espermatozoides de ratón y cobayo (Travis et al., 2001). Desde entonces, se consideran su participación en la regulación de la movilidad de los espermatozoides (Zhu & Inaba, 2011), la capacitación (Cross, 2004; Sleight et al., 2005) y la interacción espermatozoide-zona pelúcida del óvulo (Miranda, Allaire, Sosnik & Visconti, 2009; Zitranski et al., 2010). Se identificaron también en el espermatozoide otros marcadores como el gangliósido GM1, la flotilina y proteínas con afinidad a las BL debido a la presencia de glucosil-fosfatidil inositol (GPI, de sus siglas en inglés) como CD59, CD52, PRSS21 y SPAM1 (Bou Khalil et al., 2006; Nixon & Aitken, 2009; Sleight et al., 2005; Van Gestel et al., 2005). Mediante análisis bioquímicos del contenido de colesterol, de G_{MI} y de fosfolípidos en los espermatozoides de ratón, se identificaron al menos tres distintos sub-tipos de BL en este tipo celular (Asano et al., 2009).

Actualmente existen dos posturas contradictorias respecto al comportamiento temporal de las BL durante la capacitación de los espermatozoides de mamífero. Consistente con el dogma aceptado de que el colesterol, un componente integral de las BL, se libera prematuramente de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación; Sleight y colaboradores mostraron evidencias donde las BL se disocian después de la capacitación de los espermatozoides de ratón (Sleight et al., 2005). Por el contrario, otros laboratorios independientes sugieren que hay un incremento en la presencia de BL posterior a la capacitación de los espermatozoides (Bou Khalil et al., 2006; Nixon et al., 2011; Shadan, James, Howes & Jones, 2004). Esta aparente dicotomía puede reflejar simplemente las diferencias entre los métodos utilizados para su obtención, donde Sleight y colaboradores utilizaron Tritón X-100 y los demás un detergente no iónico más suave como Brij 35.

Es claro que la distribución espacial de las BL dentro de la membrana plasmática de los espermatozoides se altera dramáticamente por la capacitación

(Cross, 2004; Sleight et al., 2005; Thaler, Thomas & Ramalie, 2006). En espermatozoides no capacitados se observa una distribución homogénea de las BL, sin embargo este patrón se modifica por la capacitación de los espermatozoides en la región peri-acrosomal en la cabeza (Bou Khalil et al., 2006; Nixon & Aitken, 2009; Shadan et al., 2004). En este contexto varias técnicas como la espectrometría de resonancia electrónica se utilizan para demostrar que la capacitación es acompañada de un aumento en la fluidez de la membrana plasmática (Hinkovska-Galcheva & Srivastava, 1993). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se agregan lípidos y proteínas en MM se desconoce aún.

En 1999 Ohta y colaboradores aislaron por centrifugación (200 000 xg a 4°C durante 18 hrs) en gradientes de sacarosa, las BL de los espermatozoides de erizo de mar de tres diferentes especies: *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina* y *S. purpuratus*. Utilizando cromatografía de capa fina de alta resolución, mostraron que las BL de dichas células contienen 42-44% de fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilcolina (FC), 17-23% de colesterol (Col), 8.8-12% de fosfatidilserina (FS), 4.9-6.7% de diacilglicerol (DG), 5.2-7.4 de esfingomielina (EM) y 8.5-12% de glucoesfingolípidos como los sulfátidos (SF) y gangliósido (GL). Además encontraron que aproximadamente el 20% del total de lípidos y el 10% de las proteínas en los espermatozoides completos se encuentran en las BL, indicando que las BL están más enriquecidas en lípidos que en proteínas (Ohta et al., 1999). Por experimentos de "Western blot" en la fracción de las BL de espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se identificaron el receptor del Speract, el receptor de la gelatina (REJ-1), una proteína de 63 kDa (proteína anclada a GPI), la proteína $G_{s\alpha}$, la adenilato ciclasa (AC), la guanilato ciclasa (GC) y la PKA. Además, el receptor del Speract así como la proteína de 63 kDa (proteína anclada a GPI) y la proteína $G_{s\alpha}$ co-inminoprecipitan indicando su posible participación en la movilidad y en la respuesta al Speract en las BL (Ohta et al., 2000).

1.6 Identificación de proteínas a nivel molecular

Durante las última tres décadas, el campo de la proteómica ha emergido con mucha fuerza. Metodologías como la espectrometría de masas (MS) y los geles bidimensionales (2-D) abrieron nuevos horizontes en éste campo (Cañas, Piñeiro, Calvo, López-Ferrer & Gallardo, 2007). En 1970 se desarrolló por primera vez el uso de los geles 2-D como una estrategia para separar una mezcla compleja de proteínas (Kaltschmidt & Wittmann, 1970). El procedimiento de separación de proteínas en geles 2-D consiste en la combinación de dos tipos de electroforesis; la primera electroforesis (IEF, Isoelectroenfoque) consiste en separar las proteínas con base en su punto isoeléctrico; y la electroforesis en geles de PA-SDS para separarlas con base en su peso molecular. Por otra parte la MS es una técnica analítica con una alta sensibilidad y selectividad, cuyos espectros se producen en poco tiempo dando información sobre el peso molecular y la estructura del compuesto analizado. Aunque los estudios de MS se pueden utilizar para describir una sola proteína, incluso a nivel de caracterizar la mutación de un único aminoácido (Han, Little, David, Giblin & Schey, 2004); comúnmente son más utilizados en la caracterización de sistemas a gran escala conformados hasta por cientos de proteínas (Le Roch et al., 2004; Washburn, Ulaszek, Deciu, Schieltz & Yates, 2002). En los estudios de proteómica basados en MS por lo general se utilizan dos espectrómetros en serie (“*tandem MS/MS*”); el primer MS mide el cociente de la masa con la carga (m/z) de un péptido o proteína, y el segundo MS mide el cociente m/z de fragmentos de las moléculas que se midieron en el primer MS. Esta herramienta de MS/MS en serie es capaz de definir la secuencia de un péptido de manera inequívoca.

Los análisis de MS/MS generan miles de espectros en un periodo de tiempo corto, pero para que toda esta información sea útil tiene que interpretarse para la identificación de las proteínas en una mezcla original. Muchos algoritmos computacionales se han generado para asignar un espectro a una secuencia de péptidos y asociar esta secuencia de péptidos con una proteína. Hay dos estrategias principales para la asignación de espectros-péptidos. La primera y más utilizada involucra el uso de bases de datos para correlacionar los espectros con péptidos que

empatan perfectamente con los que se encuentran en las bases de datos ya publicadas. La segunda estrategia hace la interpretación de los espectros *de novo*, en la cual la secuencia de los péptidos se deriva directamente del espectro. Esta segunda estrategia se utiliza principalmente para la identificación de péptidos de organismos cuyo genoma no está secuenciado o para la identificación de péptidos con modificaciones post-traduccionales no predichas. Entre estos algoritmos para la identificación de MS/MS incluyen desde los que asignan una puntuación de confianza al péptido que coincide con el espectro, hasta los programas que utilizan algoritmos para asignar una puntuación a varios pasos de alineamientos tales como comparar el mejor alineamiento con el siguiente mejor alineamiento (Russell, Old, Resing & Hunter, 2004). Unos de los primeros programas y aun muy utilizado es el SEQUEST, un programa a base de algoritmos de puntuación (Eng, McCormack & Yates III, 1994). SEQUEST usa la masa del péptido intacto en el espectro de MS/MS para buscar secuencias FASTA de proteínas potenciales que podrían generar esa masa. Una vez que se genera una lista de posibles péptidos, se predicen patrones de fragmentación para cada masa potencial y se usan para establecer un espectro posible de MS/MS de ese péptido. El espectro observado se compara posteriormente con todos los espectros posibles para determinar cuál es el más apropiado. El algoritmo de puntuación utilizado por SEQUEST genera un valor de XCorr (valor de correlación cruzada) determinado por cómo un espectro confiable observado coincide con un espectro generado por computadora o esperado (Yates, Eng, McCormack & Schieltz, 1995). Otro software popular para la identificación de MS/MS es MASCOT (Perkins, Pappin, Creasy & Cottrell, 1999), que a diferencia de SEQUEST, este no es comercial y requiere de una licencia para su uso. Sin embargo, cada vez hay más programas libres para la identificación de los MS/MS están disponibles.

2 JUSTIFICACIÓN

Los erizos de mar son organismos marinos de fecundación externa que tienen sexos separados, de los cuales se pueden obtener fácilmente grandes cantidades de gametos. Se conoce el genoma de *S. purpuratus*, la especie con la cual trabajamos. Estas características hacen al erizo de mar un excelente modelo que ha revelado mecanismos generales en relación a la fecundación.

La fosforilación de proteínas es una modificación post-traduccional que regula la actividad de muchas proteínas. En el espermatozoide de erizo de mar un gran número de proteínas modifican su estado de fosforilación cuando se activa la movilidad del espermatozoide y/o cuando dicha célula se expone al Speract (péptido regulador de la movilidad); sin embargo, no se conoce la identidad molecular de la mayoría de ellas. Se sabe que en las balsas lipídicas se encuentra el receptor del Speract así como otras proteínas que participan en la cascada de señalización disparada por el Speract. Con estos antecedentes, nos propusimos identificar a nivel molecular proteínas en balsas lipídicas que regulan la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar por cambios en su estado de fosforilación. La identificación de estas proteínas nos permitirá entender mejor cómo en el espermatozoide se regula la movilidad, un tema fundamental para la fecundación. Además algunas de las proteínas tienen el potencial de llegar a ser blancos importantes para futuros tratamientos farmacológicos de infertilidad o contracepción, considerando que algunos mecanismos esenciales de la fecundación están conservados en el mamífero.

3 HIPÓTESIS

Hay proteínas en complejos de señalización que regulan la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar cambiando su estado de fosforilación. Es posible que la exposición de los espermatozoides a condiciones iónicas que modifican la movilidad altere el patrón de fosforilación de estas proteínas en las balsas lipídicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar proteínas en complejos de señalización de espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* cuyo estado de fosforilación cambia con la movilidad.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Investigar la participación de las AC's, la PKA y la PKC en la movilidad de los espermatozoides
- 4.2.2 Caracterizar los patrones de fosforilación de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad
- 4.2.3 Aislar complejos de señalización de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad
- 4.2.4 Detectar sustratos fosforilados por la PKA y/o por la PKC en los complejos de señalización de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad (inmóvil, móvil o estimulada con Speract)
- 4.2.5 Identificar a nivel molecular proteínas en complejos de señalización que cambian su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

H-89, 2'5'Dideoxiadenosina (2'5'DDA), SQ22536, Rp-adenosina-3',5' monofosforotionato (Rp-cAMPS) y bisindolilmaleimida (BIM) se compraron en Calbiochem, EMD Biosciences (San Diego, California). 2-Hidroxiestradiol (2OHE), 8-bromoadenosina 3'5-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), ortovanadato de sodio (Na_2VO_4), fluoruro de sodio (NaF), DNAsa y poly-HEME (poly("hidroxietil matacristalato)) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Queleritrina se compró en Alomone Labs (Jerusalén, Israel). Brefeldina A (BFA), anti-VDAC/Porina (ab34726), anti-flotilina 2 (ab96507) se compró de abcam (Massachusetts, EUA). El KH-7 lo donó el Dr. L.R Levin (Beltrán et al., 2007). El 8-pCPT-2'-O-Me-AMPC (OMe-pCPT) se adquirió en BioLog Life Science (Bremen, Alemania). Los anticuerpos primarios anti-fosfo (Ser) PKC sustratos (anti-PKCs Cat.2261) y anti-fosfo (Ser/Thr) PKA sustratos (anti-PKAs cat.9621) se compraron en Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-conejo (sc-2004) y anti-ratón (sc-2005) se compraron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); y los acoplados a Alexa anti-conejo (A11008) y anti-ratón (A11059) se adquirieron en Invitrogen. Los anticuerpos contra las subunidades α y β de la F_1 -ATPasa los preparó la Dra. Carmen Beltrán a partir de la proteína en las mitocondrias de corazón de bovino en el laboratorio de la Dra. M. Tuena de Gómez-Puyou. En ROCHE (Indianápolis, IN) se adquirieron los cocteles de inhibidores de proteasas "COMPLETE" libre de EDTA y de fosfatasa "PhosSTOP", así como los inhibidores de Calpaina I y II. El Speract se sintetizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Possani en el IBT-UNAM. Las soluciones stock de la mayoría de los reactivos se prepararon en dimetil sulfóxido (DMSO) y durante los experimento la concentración de DMSO utilizada nunca excedió el 0.01% (v/v). Los estándares de peso molecular se compraron de Fermentas Inc. (México, DF). Las membranas de PVDF son de Millipore Co. (Darmstadt, Germany). El reactivo para revelar por quimioluminiscencia fue de PIERCE, Thermo Scientific y los films de radiografía son de Kodak.

5.2 Obtención de los espermatozoides

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Marinus, Inc. Long Beach, CA, USA y Pamanes Inc. Ensenada, Baja California, México) se obtuvieron al inyectar 1-2 ml de KCl 0.5 M en la cavidad intracelómica. Las células se recolectaron con una pipeta Pasteur en tubos Eppendorf (espermatozoides secos) y se mantuvieron en hielo hasta su uso (máximo 12 hrs). Para los experimentos, los espermatozoides se diluyeron en agua de mar artificial (AMA en mM: NaCl 476, CaCl₂ 10, MgCl₂-6H₂O 26, KCl 10, MgSO₄-7H₂O 30, NaHCO₃ 2.5, Hepes 10, EDTA-2H₂O-2Na 0.1 pH 8) conteniendo 1 mM de CaCl₂ pH 7 (AMA1Ca), 1000 mOsm.

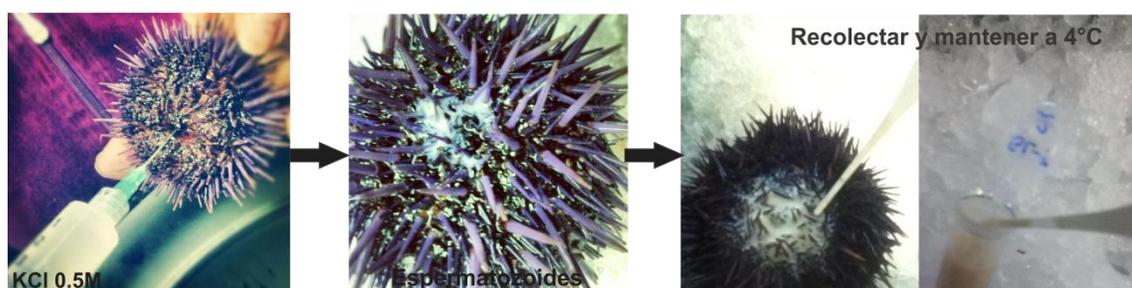


Figura 5.1 Fotografías mostrando la obtención de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*.

5.3 Análisis farmacológico de la participación de las AC's, la PKA y la PKC en la movilidad de los espermatozoides

Los espermatozoides de erizo de mar diluidos 1:4000 en agua de mar artificial (AMA) conteniendo baja concentración de calcio (AMA1Ca pH 7), se diluyeron nuevamente 1:100 en AMA (2×10^6 espermatozoides/ml) en presencia o ausencia (control) de inhibidores de la AC soluble (sAC), 2-Hidroxiestradiol (0.5, 1, 2.5 y 5 μ M) ó KH-7 (1, 10 Y 25 Mm); de las AC transmembranales (ACm), 2'5'Dideoxiadenosina (25, 75, 150 y 300 μ M) ó SQ22536 (0.5, 1 y 2 mM); de la PKA, H-89 (2.5, 5, 10 y 30 μ M) ó Rp-cAMPS (0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM); ó de la PKC, Queleritrina (2.5, 5 y 7.5 μ M) ó Bisindolilmaleimida (BIM, 0.05, 0.1 y 1 μ M). Lo anterior se hizo en cajas de petri de 35 mm x 10 mm CORNING® tratadas con Poli (2-hidroxietil metacrilato) (poli-HEMA) en etanol para evitar que los espermatozoides se peguen a

la base. Las cajas de petri con los espermatozoides se colocaron en una platina refrigerada a 12°C en un microscopio Eclipse TE300. La movilidad de los espermatozoides (aproximadamente 2–4 por campo) se registró en un campo oscuro, con un objetivo de 40X y utilizando una cámara Andor EMCCD (modelo Andor iXon, 2008). Las imágenes se colectaron con el software Andor iQ1.8 (Andor Bioimaging, NC) a 5 imágenes por segundo después de que los espermatozoides se diluyeron en presencia o ausencia del inhibidor. Las trayectorias de los espermatozoides se evaluaron usando el programa ImageJ 1.47c (Wayne Rasband, NIH, USA) con la función “MTrackJ” para calcular las velocidades de nado. La condición control son espermatozoides incubados con el mismo volumen de DMSO en el cual se solubilizaron los inhibidores (en todos los casos fue $\leq 0.01\%$ v/v).

5.4 Aislamiento de los flagelos

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* secos (500 μ l) se diluyeron 1:15 en AMA1Ca pH 7 y se centrifugaron tres veces (300 xg durante 5 min a 4°C) para recuperar en el sobrenadante final los espermatozoides libres de espinas y celomocitos (células inmaduras con alta concentración de proteasas). Los espermatozoides se obtuvieron del sobrenadante centrifugando a 3 500 xg 10 min a 4°C, y posteriormente se resuspendieron en 10 ml de AMA1Ca conteniendo 0.1 mM de PMSF (inhibidor de proteasas de serina). Los flagelos se separaron de los espermatozoides al pasar la suspensión 20 veces por una aguja del No. 21 y se obtuvieron en el sobrenadante por centrifugación a 3 500 xg 15 min a 4°C. El precipitado que contiene las cabezas y el resto de los espermatozoides completos, se resuspendió nuevamente en 6 ml de AMA1Ca y se repitió el procedimiento de separación de los flagelos con la aguja para recuperar el máximo. Los flagelos aislados se obtuvieron centrifugando a 32 000 xg 30 min a 4°C.

5.5 Aislamiento de balsas lipídicas de espermatozoides completos y de flagelos aislados

Se diluyeron (1:15) 3 ml de espermatozoides secos (6×10^{10}) de *S. purpuratus* en AMA bajo calcio (AMA1Ca pH 7) y se centrifugaron (300 xg 5 min a

4°C) dos veces para recuperar en el sobrenadante final las células libres de celomocitos. Los espermatozoides se dividieron en partes iguales en 3 tubos (19×10^9 /tubo) y se recuperaron en el precipitado por centrifugación ($3\,500 \times g$ 10 min a 4°C). Los tres precipitados se resuspendieron independientemente en tres condiciones diferentes: inmóvil (AMA/50 mM de KCl pH 6), móvil (AMA pH 8) y estimulados con Speract (AMA pH 8 conteniendo Speract 10 nM). Para el aislamiento de las balsas lipídicas de espermatozoides completos, los espermatozoides expuestos a las diferentes condiciones se centrifugaron inmediatamente ($60\,000 \times g$ 5 min a 4°C) después de la estimulación con el Speract y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador de lisis (Tritón X-100 1% en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 5 mM y NaCl 150 mM (TEN)) conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas (“Complete 1X” (de Roche que contiene tripsina, PMSF, pepstatina, leupeptina y aprotinina), inhibidores de Calpaina I y II (4 $\mu\text{g/ml}$), EGTA (1 mM) e inhibidores de fosfatasa (“PhosphoSafe Extraction” de Invitrogen, Na_2VO_4 1 mM y NaF 50 mM). Para aislar las balsas lipídicas de los flagelos, los flagelos aislados (método descrito previamente 5.4) se expusieron a las diferentes condiciones y finalmente el precipitado de los flagelos aislados se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador de lisis. La suspensión de los espermatozoides completos o de los flagelos aislados en el amortiguador de lisis se incubó durante 30 min a 4°C con mezclado suave en tubos Eppendor de 1.5 ml. Posteriormente, con un homogenizador especial para tubos Eppendor se dieron 20 golpes manteniendo las muestras en hielo y se centrifugó a $1\,500 \times g$ 5 min (Espermatozoides completos) o $3\,000 \times g$ 10 min (Flagelos aislados) a 4°C. Se descartaron los restos celulares en el precipitado y recuperamos inmediatamente el sobrenadante que contiene las proteínas solubles e insolubles en Tritón X-100, el cual se denominó solubilizado total de los espermatozoides (ST). El ST de cada una de las condiciones se mezcló con un volumen suficiente de Optiprep® para tener una concentración final de 40% y se transfirió a tubos de ultracentrífuga (Beckman Cat. 347357 de 11×34 mm) para el rotor TLS55 de Beckman. Sobre dicha suspensión se preparó un gradiente discontinuo de Optiprep® (30, 5 y 0% en TEN conteniendo

inhibidores de proteasas y fosfatasas) con un volumen total final de 2.45 ml como se muestra en la **Figura 5.2**.

Los gradientes de cada una de las condiciones de movilidad se centrifugaron a 60 000 xg durante 2 hrs a 4°C (30 000 rpm en el rotor TLS55) simultáneamente y al final se colectaron 7 fracciones de 360 µl cada una por la parte superior del tubo. Las balsas lipídicas se obtienen en la interface 5/30% del gradiente de Optiprep®, que corresponde a la fracción 2. Finalmente se midió la cantidad de proteína de cada una de las fracciones (RC DC Proteín Assay Kit de BioRad Cat. 500-0122).

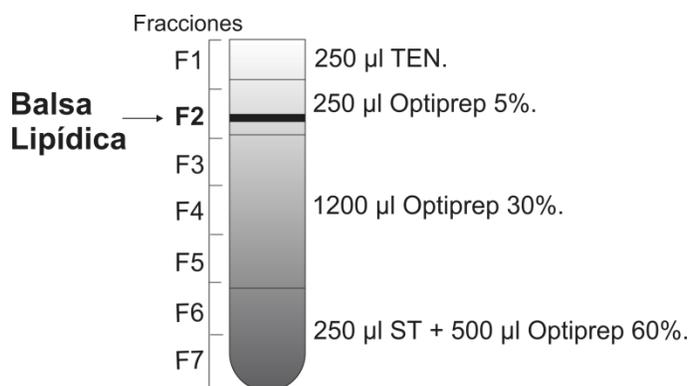


Figura 5.2 Esquema del gradiente de Optiprep® para el aislamiento de las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.

5.6 Cuantificación de proteína:

La determinación de proteína se hizo por dos métodos; uno semi-cuantitativo que utiliza papel filtro y azul de Coomassie y otro cuantitativo con el kit *RC DC Protein Assay* de Bio-Rad siguiendo el protocolo descrito. Para la determinación semi-cuantitativa se puso 1 µl de proteína en papel filtro (3MM, Whatman), el cual se dejó secar y posteriormente se tiñó con 0.5% de azul de Coomassie R-250 en metanol 50%/ácido acético 50% incubando por 10 minutos con agitación suave. El papel filtro se destiñó con Metanol 20%/ácido acético 7.5% incubando con agitación suave durante 30 minutos. La determinación de proteína se hizo comparando la intensidad de coloración azul de cada mancha con una curva

estándar de 0.2 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina de suero bovino (BSA) que se hizo en paralelo.

5.7 Separación de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides en geles de dos dimensiones (2-D)

Las proteínas de las balsas lipídicas (fracción 2 del gradiente de Optiprep®) obtenidas a partir de los flagelos aislados (400 μg por condición) o de los espermatozoides completos (100 μg por condición) inmóviles, móviles o estimulados con Speract 10 nM, se limpiaron tal y como se especifica en el protocolo de ReadyPrep 2-D CleanUp Kit de BioRad Cat. 163-2130, y se solubilizaron en 125 μl del amortiguador de rehidratación que contiene Urea 8 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Complete de Roche® 1X, DTT 50 mM y de anfolitos pH 3-10 0.2% (Bio-Lyte 3-10 Ampholyte 40% BioRad Cat.163-1112). La primera dimensión (1-D) o Isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en tiras de gel IPG (pH 3-10 lineal, 7 cm de BioRad Cat. 163-2000) en un equipo PROTEAN IEF System (BioRad Cat. 165-4000). Las tiras se hidrataron con cada una de las muestras y se cubrieron con aceite mineral (para evitar la evaporación de la muestra) durante 16 hrs a 20°C. Posteriormente las proteínas se enfocaron hasta 3000 Vh totales en un tiempo aproximado de 12 hrs. Después del IEF, las tiras se equilibraron en el amortiguador de equilibrio 1 (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, glicerol 20%) conteniendo DTT al 2% o Iodoacetamida 2.5% (Amortiguador de equilibrio 2) durante 10 min cada uno. Las tiras equilibradas se colocaron en la parte superior de mini-geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PA-SDS) al 10% y se sellaron con agarosa al 1% que contenía azul de Coomassie al 0.01%. Finalmente se corrió la segunda dimensión (2-D) para separar las proteínas por su peso molecular. De las balsas lipídicas obtenidas de los flagelos o los espermatozoides expuestos a cada una de las condiciones (inmóviles, móviles o estimulados con Speract) se corrieron muestras por triplicado, para tener tres geles idénticos de cada condición donde un gel se tiñó con plata (Dodeca Silver Stain Kit Bio-Rad No. de Cat. 161-0481) y los otros dos se transfirieron a membranas de PVDF para hacer western-blot.

5.8 Western-Blot

Las proteínas de las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar que se separaron por pH (1-D) y por peso molecular (2-D) en geles de PA-SDS al 10%. Se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore) durante una hora a 0.5 mA por gel en una cámara de transferencia semi-seca (Serial No. 221BR BioRad) utilizando un amortiguador de transferencia (glicina 190 mM, Trisma base 25 mM pH 8.6). Los sitios inespecíficos de las proteínas transferidas a las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino o leche al 5% en el amortiguador TBS (Trisma base 25 mM, NaCl 138 mM pH 7.6) que contiene 0.05% del detergente no iónico Tween-20 (TBS-T) por 2 hrs a temperatura ambiente. Después del bloqueo las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-sustratos fosforilados por la PKA (Ser/Thr) (Anti-PKAs) que reconoce los motivos RRXS* ó RXXT*, Anti-sustratos fosforilados por la PKC (Ser) (Anti-PKCs) que reconoce el motivo (R/K)XS*(Hidrofóbico)(R/K) y anti-flotilina 2 diluidos en el mismo amortiguador del bloqueo. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario hecho contra conejo (Goat Anti-Rabbit HRP 1:10 000) en TBS-T durante 2 hrs a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron con TBS-T y después con TBS tres veces durante 10 min cada uno. Las proteínas unidas al anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate Cat. 34080 Thermo Sc.) exponiendo las membranas por diferentes tiempos a un film de autoradiografía.

5.9 Identificación de proteínas por espectrometría de masas en serie (LC-MS/MS)

Las manchas (numeradas del 1 – 4 en **Fig. 6.17**) que se detectaron en los “Western blot” con los anticuerpos contra los sustratos para PKA o para PKC y que modificaron su nivel de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides, se cortaron de los géles teñidos con azul de Coomassie y se enviaron a secuenciar (The Proteomics Facility at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Canada). Las manchas se lavaron y se destiñieron toda la noche a temperatura ambiente (TA) con

0.5 ml de metanol 50%/ácido acético 5%. La digestión de las proteínas se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado (Hanna, Sherman, Kinter & Goldberg, 2000). Los fragmentos de los geles cortados se deshidrataron con 100 μ l de acetonitrilo (CH_3CN) durante 5 minutos a TA; el sobrenadante se descartó y los fragmentos de gel se dejaron secar. Las muestras se rehidrataron con 20 μ l de tripsina (25 ng/ μ l) hasta que la solución se absorbió (10 minutos) y posteriormente se agregó suficiente bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 , 50 mM) para cubrir el gel y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se agregó 20 μ l más de NH_4HCO_3 50 mM y se incubaron las muestras durante 10 minutos a TA; finalmente las muestras se centrifugaron y el sobrenadante con el extracto se transfirió a tubos Eppendorf limpios de 0.5 ml. Las proteínas en los geles se volvieron a re-extraer durante 10 minutos con 20 μ l de solución de extracción (ácido fórmico 5% en CH_3CN 50%) a TA. Las muestras se mezclaron en el vortex y se centrifugaron por 30 segundos. El sobrenadante se colectó sin tocar el gel precipitado y se combinó con el extracto previamente extraído. Las proteínas digeridas se desalaron con un protocolo modificado de extracción en fase sólida con puntas C18 Zip pipette de Millipore (Bredford, MA, USA). Para la unión y lavado de los péptidos, las muestras se aspiraron 60 veces y los péptidos se eluyeron con 15 μ l de ácido fórmico 1% en CH_3CN 50%. La mezcla de los péptidos se analizaron por nano LC-MS/MS usando un muestreador Finnigan MicroAS y un sistema de bombas Surveyor MS acoplado al equipo LTQ-Orbitrap Orbitrap (Thermo, San José, CA). Cuarenta microlitros de cada mezcla se cargaron en las columnas C18 (Symmetry300 C18 5 μ m, nano-Esi Trap Column, Waters, Boston, MA, USA) y se separaron a una velocidad de 3 μ l/minuto durante 15 minutos en ácido fórmico 1% en CH_3CN 5%. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente 5 – 35% del solvente B (ácido fórmico 0.1% en CH_3CN al 100%) durante 60 minutos con un flujo de 300 nl/min en las columnas BioBasic C18 PicoFrit (PFC7515/BI/10, New Objective). La adquisición de los datos se llevó a cabo con el programa XCalibur. Se hizo un rastreo usando las transformadas de Fourier para adquirir los promedios de Orbitrap, de 300 a 1800 m/z con un poder de resolución a 30 000 (400 m/z). Los 5 picos más intensos se aislaron

secuencialmente para experimentos en serie MS/MS en el equipo LTQ (linear ion trap) usando la disociación inducida por colisiones. El rango de la relación masa/carga fue de 380 a 2000 para los espectros MS con un valor nominal 1,000,000 de carga y de $\sim 1/3$ de la relación m/z a 2000 para los espectros MS/MS con un valor nominal de 10, 000 cargas. Para los eventos analizados dependientes de los datos, se utilizó un tiempo máximo de llenado de iones de 100 ms y 1 microscan. Para evitar la duplicación de datos de MS/MS para el mismo péptido, se estableció la exclusión dinámica a 2 y los iones seleccionados se colocaron en la lista de exclusión de 45 segundos. Los datos de los espectros MS/MS crudos, se convirtieron a archivos "DTA" con el programa "Thermo Electron Bioworks 3.2" y se analizaron mediante el programa Turbo SEQUEST (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los voltajes de nanopulverización de del lente-S se fijaron a 0.9–1.8 kV y 50 V respectivamente. La temperatura del capilar se fijó a 225°C. Las condiciones de MS/MS fueron: energía de colisión normalizada, 35 V; activación Q 0.25; tiempo de activación, 10 ms.

5.10 Búsqueda en base de datos

Los espectros de masas en serie se obtuvieron usando el programa Mascot Daemon versión 2.3.02. Todos las muestras de MS/MS se analizaron usando los programas Mascot (Matrix Science, London, UK) y X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version 2007.01.01.1). Para ambos programas (mascot y X! Tandem) se consideró la base de datos del genoma del erizo de mar *S_Purpuratus_20111201* asumiendo la digestión con tripsina y buscando fragmentos con una tolerancia de masa iónica de 0.6 Da y una tolerancia ionica aparente de 12 ppm. La oxidación de la metionina y la Iodoacetamida derivado de cisteínas se consideraron como modificaciones en Mascot y X! Tandem.

5.11 Criterio para la identificación de proteínas

Para validar los péptidos obtenidos de MS/MS y para la identificación de las proteínas, se utilizó el programa Scaffold (Scaffold_4.0.5, Proteome Software Inc.,

Portland, OR). La identificación de los péptidos se aceptó si tenían una probabilidad mayor al 50% utilizando el algoritmo *Peptide Prophet* (Keller, Nesvizhskii, Kolker & Aebersold, 2002) con la corrección Scaffold delta-mass. Para las identificaciones mediante “Mascot” se requiere que el valor iónico sea mayor que el valor de identidad asociado y de 20, 15 y 15 para péptidos con carga doble, triple y cuádruple respectivamente. La identificación por X! Tandem requiere que los valores de “-log (expect)” sean al menos mayores a 25. La identificación de las proteínas se aceptó si se podía establecer una probabilidad mayor al 99% y que contenían al menos 2 péptidos únicos identificados.

5.12 Inmunocitoquímica

Los espermatozoides se diluyeron 1:1000 en AMA1Ca pH7 y se centrifugaron dos veces (300 xg 5 min a 4°C). El sobrenadante con los espermatozoides limpios se centrifugó a 1000 xg 10min a 4°C. Se diluyeron los espermatozoides limpios 1:5000 en AMA pH 8, se colocó 100 µl de la suspensión en cada uno de los 3 pozos del portaobjetos (Electron Microscopy Sciences Cat. 63419-VIR) y se dejó sedimentar por 1 hr a 4°C. Transcurrido el tiempo, se descartó el exceso de líquido y las células pegadas se fijaron durante 10 min con paraformaldehído al 4% en AMA pH8. Las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se permeabilizaron por 10 min con Tritón X-100 0.1% en PBS. Los espermatozoides se lavaron nuevamente con PBS y posteriormente se bloquearon con BSA 2% en PBS durante 2 hrs a 4°C. Las células se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C diluidos en el mismo amortiguador de bloqueo. Los espermatozoides se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron durante 2 hrs con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa fluor-488 (anti-conejo ó anti-ratón) diluido 1:200 en PBS. Finalmente las células se volvieron a lavar con PBS, se eliminó todo el PBS y se le agregó a cada pozo 6 µl de citifluor para evitar el foto-blanqueo. Los pozos se cubrieron con cubreobjetos y se fijaron con barniz transparente para uñas. Los experimentos control se hicieron incubando los espermatozoides sólo con el anticuerpo secundario, debido a que no venden el péptido antigénico para los anticuerpos comerciales utilizados. Las muestras marcadas fluorescentemente se

observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510 META utilizando un objetivo de 100X.

5.13 Determinación del potencial de membrana en flagelos aislados

Las medidas de potencial de membrana flagelar se hicieron en un espectrofluorómetro SLM-Amicon usando un colorante fluorescente de carga positiva sensible a potencial, el Dis-C₃(5) con una longitud de onda de excitación y de emisión de 620 y 670 nm respectivamente (González-Martínez & Darszon, 1987). Se agregaron 5 µl de flagelos aislados (diluidos en AMA1Ca pH7) a 800 µl de AMA completa pH 8 conteniendo 1 µM de Dis-C₃(5) en una celda de vidrio redonda con base plana y agitación continua a 14°C. Se inició el registro de la fluorescencia y una vez estabilizado el potencial se adicionó Speract 10 o 100 nM. A la suspensión de flagelos aislados se les agregó 1 µM del ionóforo de K⁺, valinomicina, para igualar las concentraciones de K⁺ dentro y fuera de las células. Posteriormente agregamos diferentes concentraciones de KCl (en mM: 1.25, 2.5, 5, 10 y 20) para calibrar los cambios en la fluorescencia de acuerdo con el potencial de equilibrio del K⁺ utilizando la ecuación de Nernst ($E_m = [RT/zF] \cdot \ln [K^+]_e / [K^+]_i$) considerando una concentración intracelular de K⁺ en el flagelo de 219 mM (Lee, 1984).

Los trazos control se hicieron agregando los volúmenes correspondientes del disolvente de los compuestos utilizados (agua o DMSO), o bien despolarizando los flagelos con KCl 40 mM antes de agregar el Speract. Esto último debido a que está reportado que la despolarización de las células bloquea la respuesta hiperpolarizante inducida por el Speract (González-Martínez & Darszon, 1987).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 La adenilato ciclasa soluble (sAC) participa en la movilidad de los espermatozoides y en la fosforilación de proteínas de los mismos por la PKA y/o por la PKC

Se sabe que la movilidad de los espermatozoides involucra diferentes moléculas como canales iónicos, intercambiadores, segundos mensajeros (Ca^{+2} , GMPc y AMPc), adenilato ciclasas (AC's), fosfodiesterasas, cinasas, etc. (Chaudhry, Creagh, Yu & Brokaw, 1995; Christen et al., 1982; Darszon et al., 2008; Su & Vacquier, 2006; White et al., 2007); además de inducir la fosforilación de proteínas principalmente del flagelo (Bracho et al., 1998). Por mucho tiempo se describió que dicha fosforilación es dependiente de los niveles de AMPc (Bookbinder et al., 1991; Brokaw, 1987; Tash, 1982). El AMPc es un segundo mensajero sintetizado por las AC's. En los espermatozoides de erizo de mar se identificó una adenilato ciclasa soluble (sAC) (Nomura et al., 2005) y algunas isoformas de las adenilato ciclasas transmembranales (ACm) (Beltrán et al., 2007). Sabemos que la inhibición tanto de la sAC como de las ACm modifican el patrón de nado de los espermatozoides de erizo de mar *L. pictus* (Loza-Huerta, A. tesis de licenciatura) y la reacción acrosomal de espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Beltrán et al., 2007).

Para investigar la contribución de la sAC en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar; las células se incubaron en presencia de 2-Hidroxiestradiol (2OHE; (Zippin et al., 2003)) o de KH-7 (en inglés, 2-(1H-benzimidazol-2-ylthio)-2-[(5-bromo-2-hydroxyphenyl) methylene] hydrazide, propanoic acid (Hallows et al., 2009; Hess et al., 2005; Kumar, Kostin, Flacke, Reusch & Ladilov, 2009), inhibidores específicos de la sAC, y se evaluó la velocidad de nado circular de las células. Para esto tomamos como base las IC_{50} y las dosis efectivas probadas en otros sistemas experimentales (Beltrán et al., 2007; Hess et al., 2005; Hurh, Chen, Na, Han & Surh, 2004; Marquez & Suarez, 2008; Morita, Takemura, Nakajima & Okuno, 2006; White et al., 2007). La **figura 6.1** muestra que la velocidad de nado circular de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* es sensible a concentraciones creciente de los dos inhibidores de la sAC mencionados. Como se

observa en el panel **A**, cuando los espermatozoides se incubaron con 5 μM de 2OHE, la velocidad de nado de los espermatozoides se inhibió ~40% en el primer minuto y hasta un ~90% a los 30 minutos. Dicha concentración es muy baja si se compara con la concentración (150 μM) de este mismo inhibidor necesaria para inhibir la reacción acrosomal (RA) en espermatozoides de erizo de mar de la misma especie (Beltrán et al., 2007). Así mismo, la **figura 6.1B** muestra que cuando los espermatozoides se incubaron con el KH-7, la velocidad de nado se inhibió gradualmente al aumentar la concentración del inhibidor de 1 a 25 μM . Se observó una inhibición significativa en la velocidad de nado circular a partir de la concentración de 10 μM desde el primer minuto (30%) manteniéndose hasta los 30 minutos (50%). Con una concentración de 25 μM de KH-7 se observó una inhibición significativa del 60% el primer minuto, hasta obtener la máxima inhibición (95%) pre-incubando las células 30 minutos.

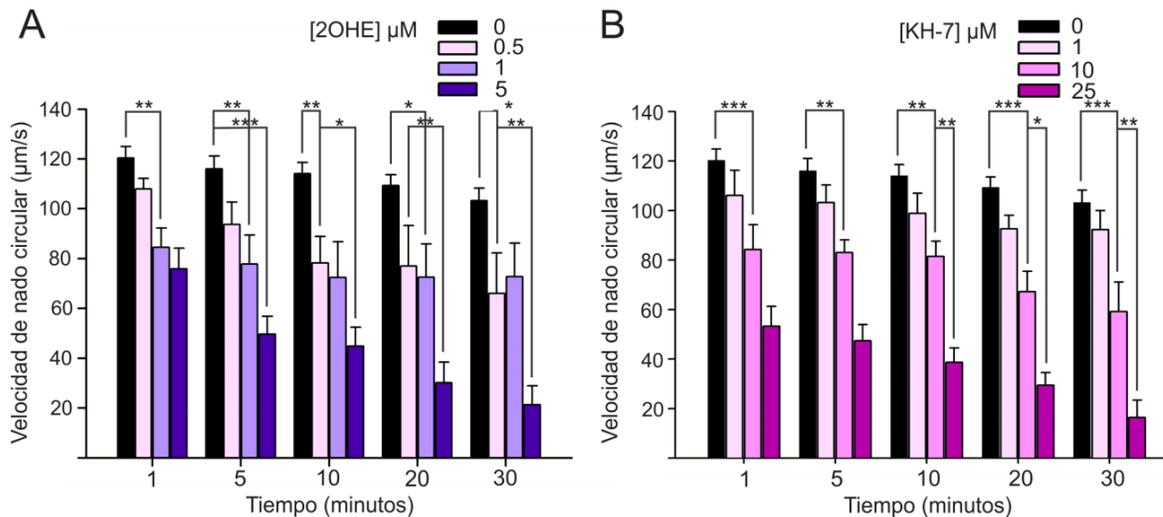


Figura 6.1 La Adenilato Ciclasa soluble (sAC) participa de manera importante en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH 8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 min en ausencia (0) ó presencia de diferentes concentraciones de 2 inhibidores de la sAC (**A**) 2-Hidroxiestradiol (2OHE) a 0.5, 1 y 5 μM y (**B**) K-H7 a 1, 10 y 25 μM . Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio \pm E.E. de los espermatozoides control diluidos en AMA pH8 que contiene el mismo volumen de DMSO (<0.1% v/v, AMA) que los inhibidores. N=4-8 experimentos por duplicado con espermatozoides de diferentes erizos. *** (P<0.001); ** (P<0.01); * (P<0.05).

Estos resultados nos indican que al igual que en la reacción acrosomal de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Beltrán et al., 2007), la sAC participa de manera importante en la movilidad. Demostrando que la síntesis del AMPc por la sAC es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. Uno de los blancos del AMPc, es la PKA. Además, está demostrado que la proteína cinasa C (PKC) fosforila proteínas en el flagelo importantes para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *L. pictus* (White et al., 2007); y que la unión del Speract a su receptor aumenta los niveles de AMPc (Darszon et al., 2008). Debido a lo anterior se hicieron experimentos tipo “Western blot” para detectar los sustratos de la PKA o de la PKC que modifican su estado de fosforilación al inhibir la sAC con inhibidores específicos y de esta forma eliminar la contribución del AMPc sintetizado por dicha enzima.

La **figura 6.2** muestra que la sAC participa en la fosforilación de los sustratos de la PKA y de PKC tanto cuando los espermatozoides están en condiciones basales de movilidad, como cuando las células se estimulan con Speract. Los experimentos tipo “Western blot” muestran que cuando los espermatozoides se diluyeron en agua de mar artificial (Móvil), el anticuerpo contra los sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs) (**A**) detectó seis bandas de ~180, 120, 80, 70, 50 y 45 kDa. Cuando las células se pre-incubaron con el inhibidor de la sAC (2OHE 5 μ M), el grado de fosforilación de todos los sustratos de la PKA disminuyó, excepto el de 80 kDa el cual aumentó. La estimulación de los espermatozoides móviles con 10 nM de Speract aumentó la fosforilación de las bandas de 120 y 80 kDa, disminuyó la de las bandas de 180 y 50 kDa, no se observó la fosforilación de la banda de 45 kDa y apareció una banda de 70 kDa comparando con la condición móvil. Sin embargo, cuando los espermatozoides pre-incubados con el 2OHE se estimularon con el Speract, se observó un aumento en la fosforilación de todos los sustratos de la PKA comparado con el grado de fosforilación observado sólo en presencia del inhibidor de la sAC (2OHE). Incluso el grado de fosforilación fue también mayor que el observado en los espermatozoides estimulados con Speract. Este resultado sugiere que el AMPc sintetizado por la sAC activa de forma directa a la PKA involucrada en la fosforilación

de proteínas que participan en la movilidad basal de los espermatozoides. Sin embargo, la estimulación de los espermatozoides con Speract revierte la inhibición en la fosforilación por la PKA producida por la presencia del 2OHE; sugiriendo que los cambios iónicos (específicamente aumento de calcio y de bicarbonato) inducidos por el Speract, reviertan la inhibición de la sAC ó disminuye la actividad de fosfatasas produciendo una nueva activación de la PKA para fosforilar proteínas.

Cuando se evaluó la participación de la sAC en el patrón de fosforilación de proteínas por la PKC (**B**), se observó que la incubación de los espermatozoides con 2OHE aumenta en general la fosforilación de los sustratos de la PKC. La estimulación de los espermatozoides con Speract redujo principalmente la fosforilación de los PKCs mayores a 72 kDa y aumentó el nivel de fosforilación de los sustratos <72 kDa comparado con la condición móvil. Pero cuando los espermatozoides se pre-incubaron con 2OHE y posteriormente se estimularon con Speract, el nivel de fosforilación detectado, en general fue menor que el detectado sólo en presencia del inhibidor, con excepción de la banda de ~75 kDa que mostró el menor grado de fosforilación. Contrario a lo obtenido en el experimento anterior (**Figura 6.2A**), en este caso la inhibición de la síntesis de AMPc por la sAC aumentó el nivel de fosforilación de los sustratos de PKC que participan en la movilidad de los espermatozoides. Sin embargo, el 2OHE sí inhibió la fosforilación por la PKC de algunas bandas cuando las células se estimularon con Speract.

El que al inhibir a la sAC se afectara sólo la fosforilación de los sustratos de la PKA de los espermatozoides en condiciones basales y no en los estimulados con Speract, sugiere que la sAC participa de manera diferencial en la regulación por fosforilación de proteínas que participan en la movilidad basal y la estimulada por Speract. Por el contrario, la fosforilación de los sustratos de la PKC no se afectó al inhibir a la sAC en condiciones basales de movilidad, pero si en los espermatozoides estimulados con Speract. Lo anterior confirma que la sAC localizada en el flagelo (Beltrán et al., 2007), es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar de *S. purpuratus*.

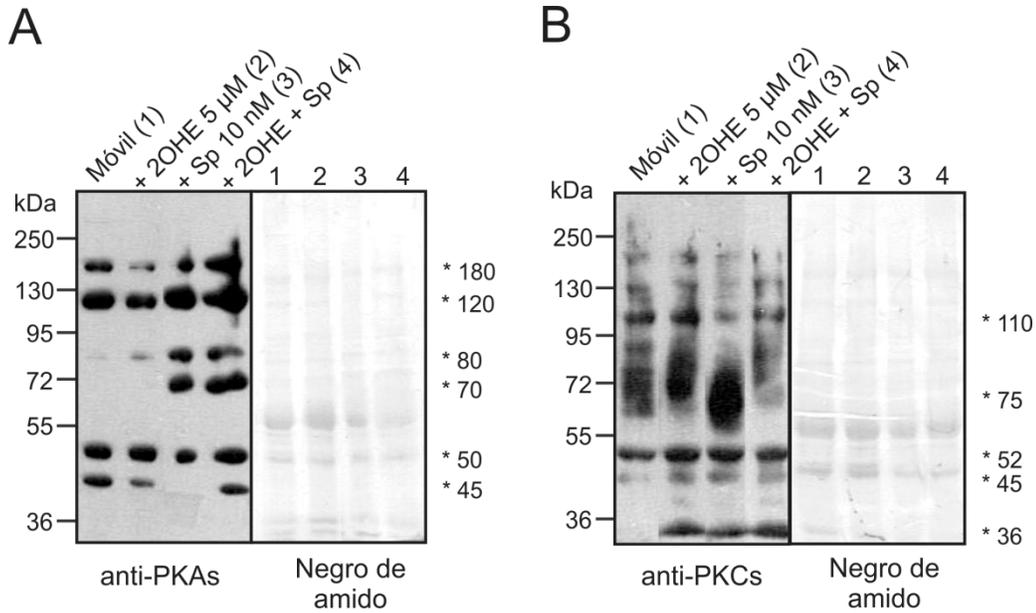


Figura 6.2 La sAC participa en la fosforilación de sustratos de la PKA y de la PKC en la movilidad basal de los espermatozoides y en la estimulada con Speract.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se incubaron durante 10 min a 14°C en AMA pH8 en ausencia (móvil) o presencia de un inhibidor de la sAC (2-Hidroxiestradiol, 2OHE), estimulado 10 seg con Speract 10 nM o pre-incubado con el 2OHE y posteriormente estimulado por 10 seg con Speract. Se precipitaron las proteínas (20 μg) y se hizo el "Western blot" revelando con anti-PKAs (1:500) (A) o con anti-PKCs (1:500) (B). Del lado derecho de cada WB se muestra la membrana teñida con negro de amido posterior a su revelado con quimioluminiscencia. Los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares (PM) de los estándares; y los del lado derecho con asterisco indican los sustratos fosforilados que modifican su estado de fosforilación con la movilidad. Los números entre paréntesis al final de las condiciones de cada carril en el WB, corresponden a los carriles de la membrana teñida con negro de amido.

6.2 Las Adenilato Ciclasas transmembranales (ACm) participan poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar

Está descrito que el espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus* posee algunas isoformas de las adenilato ciclasas de membrana (ACm1), cuya actividad participa en la reacción acrosomal (Beltrán et al., 2007). En mi trabajo de tesis de licenciatura demostré que inhibidores de las AC's, tanto de la sAC como de las ACm, modificaban el patrón de nado de los espermatozoides de *L. pictus*. Con este antecedente decidimos utilizar inhibidores específicos contra las ACm para investigar la participación de dichas enzimas en la velocidad de nado de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*.

Utilizamos la 2'5'Dideoxiadenosina (2'5'DDA) que es un inhibidor permeable que se une de manera no competitiva al sitio P de las ACm, al igual que el inhibidor SQ22536. La diferencia entre ambos inhibidores es que el SQ22536 tiene una IC_{50} mayor (200 μ M) que la IC_{50} del 2'5'DDA (45 μ M). Las concentraciones de estos inhibidores, se seleccionaron tomando como base tanto sus IC_{50} 's como las concentraciones utilizadas en otros tipos celulares y en el espermatozoide de erizo de mar (Beltrán et al., 2007; Schuh et al., 2006).

La **figura 6.3A** muestra que la incubación de los espermatozoides de erizo de mar con diferentes concentraciones (75, 150 y 300 μ M) de 2'5'DDA, no afectó la velocidad de nado de los espermatozoides incluso después de incubar las células durante 30 minutos. Es importante mencionar que 150 μ M de 2'5'DDA inhibe el 49% de la reacción acrosomal (RA) y un 37% los niveles de AMPc en los espermatozoides de esta misma especie (Beltrán et al., 2007). Por el contrario, la **figura 6.3B** muestra que la incubación de los espermatozoides durante 10 minutos con 1 mM de SQ22536, el otro inhibidor de las ACm, inhibe significativamente (~25%) la velocidad de nado de las células. La misma figura muestra que si duplicamos la concentración del SQ22536 (2 mM) la inhibición sólo aumentó ligeramente (~30%) y se mantuvo entre los 10 y los 30 minutos de incubación.

Estos resultados nos indican que las ACm participan poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*. Es importante mencionar que de las 9 isoformas de las ACm que están descritas en células somáticas (Hanoune & Defer, 2001); solamente la ACm2 y la ACm9 se encuentran en el flagelo de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (Beltrán et al., 2007), sugiriendo su participación en la movilidad. Es importante aclarar que con nuestros resultados no podemos descartar la participación de las ACm en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* debido a que solo estamos evaluando la velocidad de nado circular y sabemos que el espermatozoide tiene al menos 3 tipos de movilidad (circular, en su lugar e inmóvil). A diferencia de en los espermatozoides de mamífero (Baxendale & Fraser, 2003; Livera et al., 2005) cuya participación en la fecundación es clara, en los espermatozoides de erizo de mar no se encontró una

participación importante en la movilidad basal utilizando esta estrategia experimental.

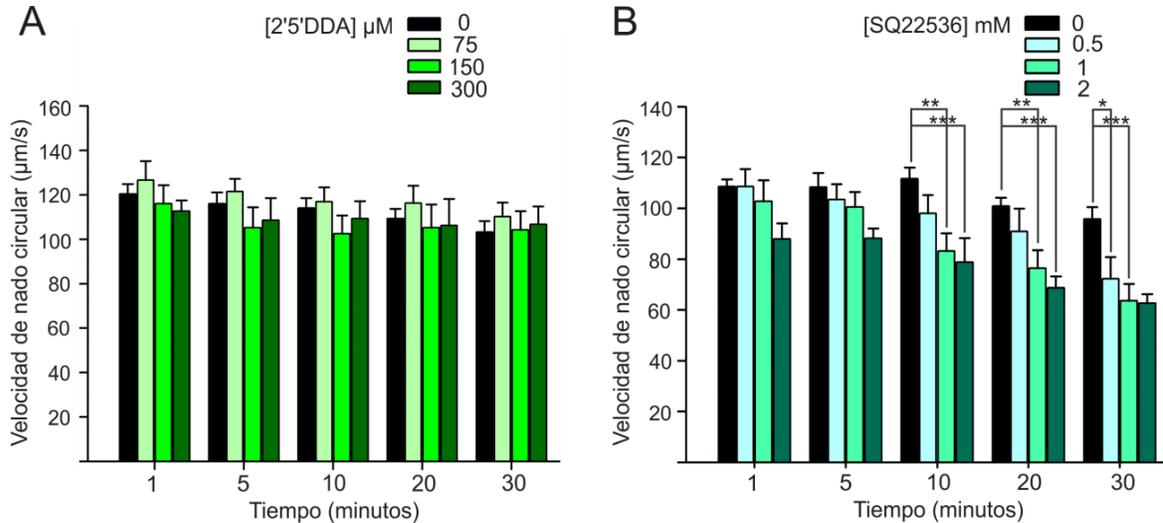


Figura 6.3 Las Adenilato Ciclasas de membrana (ACm) participan poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH 8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos en ausencia (0) ó presencia de diferentes concentraciones de 2 inhibidores de las ACm: (A) el 2'5'Dideoxiadenosina (2'5'DDA) a 75, 100 y 150 μM y (B) el SQ22536 a 0.5, 1 y 2 mM. Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio ± E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que los inhibidores (<0.1% v/v). n= 3-6 experimentos por duplicado con espermatozoides de diferentes erizos. *** (P<=0.001); ** (P<=0.01); * (P<=0.05).

6.3 La PKA participa en la movilidad y en la fosforilación de proteínas asociada a la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar

La PKA es la cinasa activada por el AMPc que participa en diversos eventos de señalización (Seino & Shibasaki, 2005). Algunos trabajos muestran que la activación de la movilidad en los espermatozoides está relacionada con aumentos en la fosforilación de proteínas en los espermatozoides (Bracho et al., 1998) de manera dependiente (Bookbinder et al., 1991; Brokaw, 1987) e independiente de los niveles de AMPc (Hayashi, Yamamoto, Yonekawa & Morisawa, 1987; Luconi et al., 2005) y que en ésta participan múltiples cinasas (Chaudhry et al., 1995). Además, está reportado que la sAC del espermatozoide de erizo de mar se fosforila por la PKA

(Bookbinder et al., 1991). Con estos antecedentes nos propusimos investigar la participación de la PKA en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* intactos, utilizando inhibidores específicos para dicha enzima como el H-89 y el Rp-cAMPS. El H-89 es un inhibidor potente para la PKA, permeable a la membrana plasmática, que compite por el sitio de unión del ATP, con una constante inhibitoria (K_i) de 48 nM y que se ha utilizado en un amplio rango de concentraciones que van desde 10 μ M en espermatozoides de salmón (Morita et al., 2006) hasta 60 μ M en espermatozoides de macaco (Baumber & Meyers, 2006). Sin embargo, es importante hacer notar que a concentraciones mayores de 30 μ M también puede inhibir otras cinasas como PKC, Rho o CaMK (Davies, Reddy, Caivano & Cohen, 2000). El Rp-cAMPS es otro inhibidor selectivo para la PKA que compite por el sitio de unión del AMPc con una $K_i=11 \mu$ M, lo que lo hace menos potente que el H-89 pero más selectivo. Este inhibidor se ha utilizado a concentraciones que van de 100 μ M a 1 mM en espermatozoides de bovino (Uguz, Vredenburg & Parrish, 1994) y a 200 μ M en espermatozoides de humano (O'Flaherty, de Lamirande & Gagnon, 2006).

La **figura 6.4A** muestra que cuando los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se incubaron en presencia de 10 μ M de H-89, la velocidad de nado se inhibió significativamente (~40%) desde el primer minuto y que dicha inhibición se mantuvo sin cambios significativos hasta los 30 minutos. De la misma manera, se observó una inhibición significativamente mayor (~50%) con 30 μ M del inhibidor desde el primer minuto de incubación la cual aumentó (90%) a los 30 minutos. De manera similar, la **figura 6.4B** muestra que cuando los espermatozoides se incubaron con diferentes concentraciones (0.2, 0.5 y 1mM) de Rp-cAMPS, sólo se observó una inhibición significativa (~25%) con 0.2 mM desde el primer minuto y con 1 mM a los 10 min de incubación. Nuestros resultados confirman que la PKA participa en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar intactos.

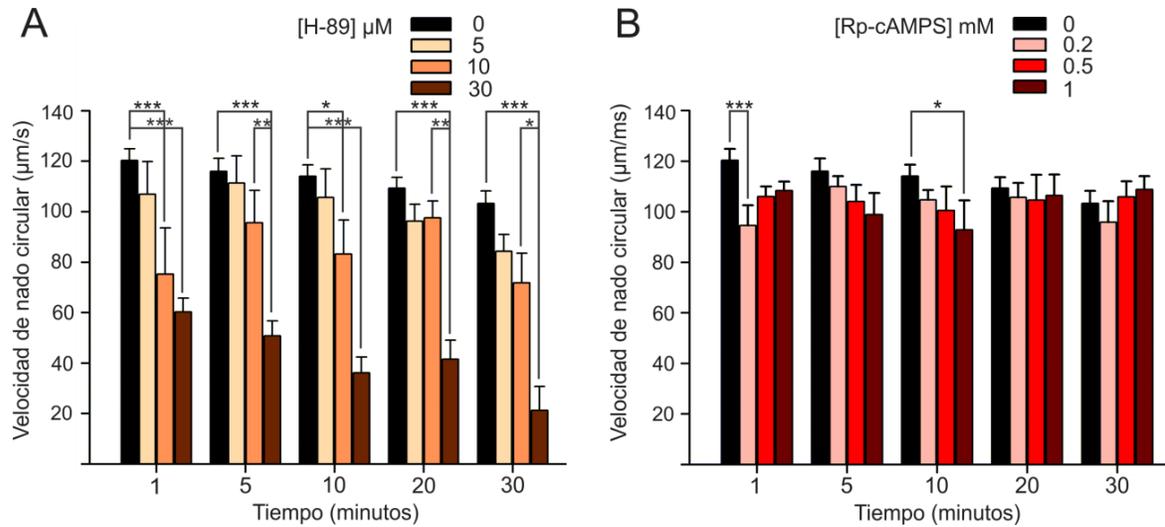


Figura 6.4 La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) participa en la movilidad basal de los espermatozoides de erizo de mar.

Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH 8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos en ausencia (0) ó presencia de diferentes concentraciones de los 2 inhibidores de la PKA: **A)** el H-89 a 5, 10 y 30 μM y **B)** el Rp-cAMPS a 0.2, 0.5 y 1 mM. Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio ± E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que los inhibidores (<0.1% v/v). n=3-4 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. *** (P<=0.001); ** (P<=0.01); * (P<=0.05).

Como se mencionó previamente, los resultados que relacionan los cambios en la fosforilación de proteínas con la movilidad de los espermatozoides, no representa un modelo fisiológico dado que se hicieron en espermatozoides permeabilizados (Bookbinder et al., 1991; Hayashi et al., 1987; J. S. Tash et al., 1986). Para evaluar los cambios en la fosforilación de proteínas asociados a la movilidad de los espermatozoides intactos, se hicieron experimentos tipo “Western blot” con los anticuerpos que detectan los sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs) y/o por la PKC (anti-PKCs).

La **figura 6.5** muestra que la PKA participa en la fosforilación de proteínas detectadas por anti-PKAs (**A**) y por anti-PKCs (**B**) de los espermatozoides tanto en condiciones basales de movilidad como en los estimulados con Speract. En el panel **A**, de los espermatozoides móviles el anticuerpo contra los sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs), detectó cuatro bandas con Mr de ~120, 80, 50 y 45 kDa. Cuando las células se pre-incubaron con 30 μM de H-89 (concentración que inhibe la movilidad

de los espermatozoides) la fosforilación de todas las bandas disminuyó. Al estimular los espermatozoides con 10 nM de Speract, aumentó la fosforilación de las bandas de 120, 80 y 50 kDa en comparación con la condición móvil. Sin embargo, cuando los espermatozoides pre-incubados con el H-89 se estimularon con el Speract, se observó sólo el aumento en los niveles de fosforilación de las bandas de 50 y 45 kDa en tanto que los niveles de fosforilación de las bandas de 120 kDa disminuyó y la de 80 kDa se mantuvo comparado con el grado de fosforilación observado sólo en presencia del H-89. El resumen de estos cambios en el grado de fosforilación en los sustratos de la PKA se muestran en la grafica de barras del lado derecho del Western blot, indicando cuales son significativos. Cuando se evaluó la participación de la PKA en el patrón de fosforilación de sustratos de la PKC con el anticuerpo anti-PKCs (**Figura 6.5B**), se observó que la incubación de los espermatozoides con H-89 inhibe parcialmente la fosforilación de los sustratos de la PKC (>280, 110, 75 y 36 kDa) observados en los espermatozoides móviles, excepto en el caso de la banda de 54 kDa que no presentó ningún cambio y en la de 52 kDa para la cual el grado de fosforilación aumentó. La estimulación de los espermatozoides con Speract redujo la fosforilación de las bandas con Mr de 280 y 36 kDa y aumentó la de la banda de 52 kDa, comparando con la condición móvil. Por el contrario, cuando los espermatozoides se pre-incubaron con el inhibidor de la PKA (H-89) y posteriormente se estimularon con Speract, no se observó la fosforilación de la banda con Mr 280 kDa y disminuyó la fosforilación de la banda de 36 kDa. Además, se detectaron tres bandas adicionales fosforiladas con una Mr entre 50 y 36 kDa comparando con la fosforilación detectada sólo con H-89. De igual forma que en panel anterior (**Figura 6.5A**), del lado derecho del “Western blot” se muestra la grafica de barras con los cambios en la fosforilación de los sustratos de la PKC cuyo nivel de fosforilación cambia con la movilidad de los espermatozoides.

Nuestros resultados muestran que existen sustratos de la PKA que modifican su estado de fosforilación en asociación tanto con la movilidad basal de los espermatozoides como al estimularlos con Speract (**Fig. 6.5A**). Además, el que la inhibición de la PKA afecte la fosforilación de proteínas por la PKC (**Fig. 6.5B**), sugiere una comunicación cruzada o “*cross-talk*” entre las vías de señalización de la PKA y de

la PKC como está reportado en diferentes tipos celulares (Breitbart, Rubinstein & Etkovitz, 2006; Kamp & Hell, 2000) y durante la capacitación de los espermatozoides de mamífero en la regulación de la polimerización de actina (Breitbart et al., 2006; G. Cohen, Rubinstein, Gur & Breitbart, 2004). También es importante considerar que muchas proteínas tienen sitios de fosforilación tanto para la PKA como para la PKC, indicando que se pueden regular por ambas cinasas; como es el caso de los canales de calcio activados por voltaje (VDCC) en musculo cardiaco (Kamp & Hell, 2000).

6.4 La PKC participa de manera importante en la movilidad y en la fosforilación de proteínas asociada a la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar

Existe sólo un reporte en espermatozoides intactos (con membrana plasmática) de erizo de mar *L. pictus*, donde se muestra la participación de la PKC en el inicio y mantenimiento de la movilidad de las células lo cual atribuyen a aumentos en la fosforilación de 4 sustratos de la PKC (28, 65, 100 y 200 kDa) en el flagelo, aunque dichas proteínas no se identificaron (White et al., 2007). Con estos antecedentes nos propusimos investigar si la PKC participa en la movilidad de los espermatozoides intactos de erizo de mar *S. purpuratus*. Para dar respuesta a esta incógnita, utilizamos como herramienta dos inhibidores específicos de la PKC, la Queleritrina y la Bisindolilmaleimida I (BIM).

La Queleritrina es un potente inhibidor permeable a la membrana plasmática que se une al dominio catalítico de unión al ATP de la PKC impidiendo su traslocación a la membrana plasmática, con una IC₅₀ de 0.6 µM y que es al menos 100 veces más selectivo para PKC que para otras cinasas. Este inhibidor se ha utilizado a concentraciones de 10 µM en espermatozoides de humano (Thundathil, de Lamirande & Gagnon, 2002) y de 0.5 a 5 µM en espermatozoides de erizo de mar (White et al., 2007). El otro compuesto probado es la BIM, que es un inhibidor altamente selectivo y competitivo para el sitio de compuerta para la PKC con una K_i de 10 nM. Su mecanismo de acción es igual que el de la Queleritrina, sin embargo, éste es selectivo para las isoformas α, βI, βII, γ, δ y ε de la PKC.

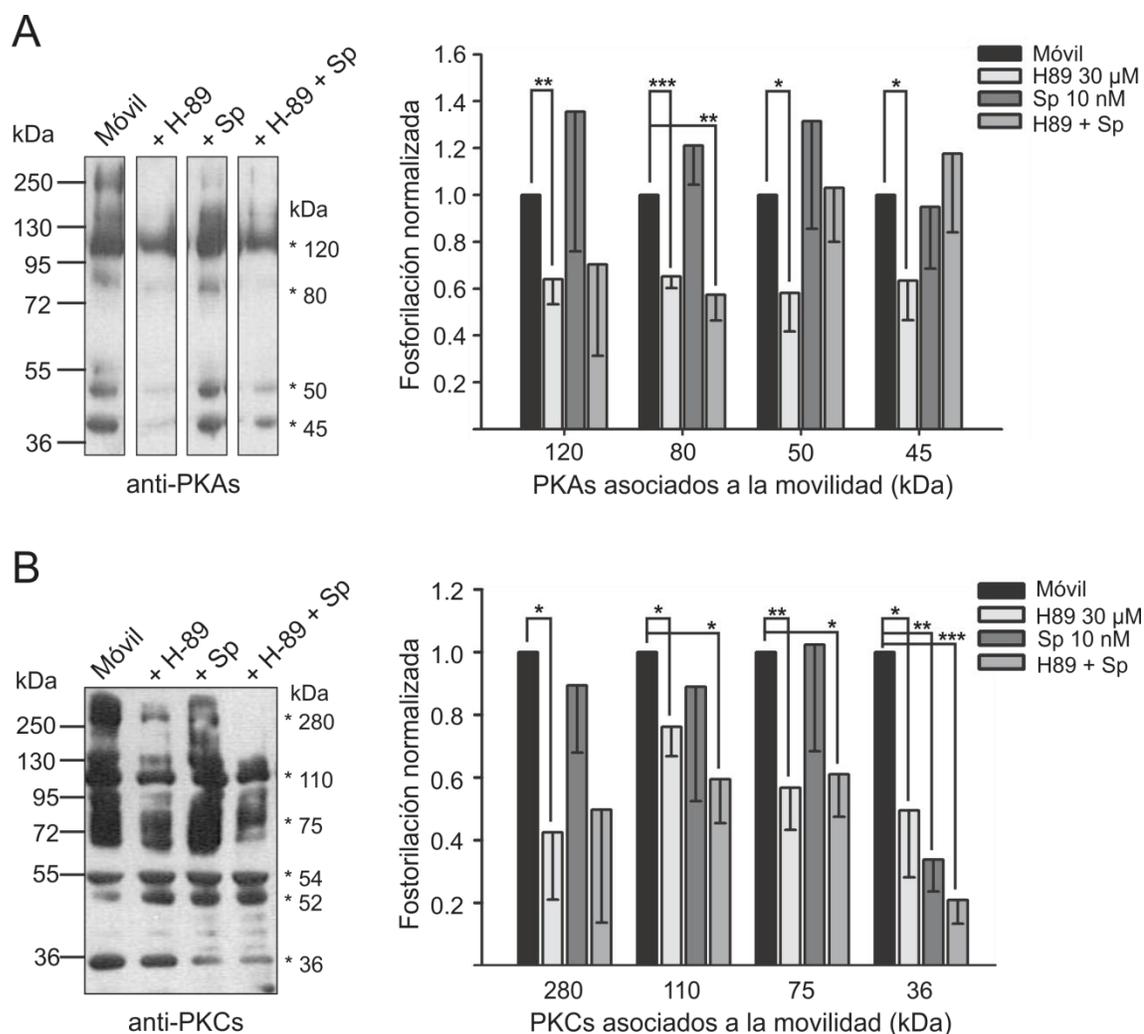


Figura 6.5 La PKA participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la movilidad de los espermatozoides basal y en la estimulada con Speract y altera el patrón de fosforilación por PKC.

Los espermatozoides de erizo de mar se incubaron durante 10 min a 14°C en AMA pH 8 en ausencia (móvil) o presencia de un inhibidor de la PKA (H-89 30 μM), estimulado o no con Speract 10 nM durante 10 seg. Las proteínas se precipitaron (20 μg) y se hizo el “Western blot” (WB) revelando con anti-PKAs (1:500) (A) o con anti-PKCs (1:500) (B). Del lado derecho de cada “WB” se muestra el análisis densitométrico de los cambios en el nivel de fosforilación de los sustratos de la PKA o de la PKC asociados a la movilidad de los espermatozoides. Los números del lado izquierdo del “WB” indican los pesos moleculares (PM) de los estándares; y los números del lado derecho con asterisco indican los sustratos fosforilados que modifican su nivel de fosforilación con la movilidad. n=4.

La **figura 6.6** muestra la participación de la PKC en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar intactos. Cuando los espermatozoides se incubaron con diferentes concentraciones de Queleritrina (2.5, 5 y 7.5 μM; **Figura 6.6A**). La

velocidad de nado de los espermatozoides de *S. purpuratus* se inhibió gradualmente con el tiempo (1 a 30 minutos) de incubación, al aumentar la concentración del inhibidor. De esta forma, se observó una inhibición significativa con 2.5 μM a partir de los 5 minutos (20%) y con 5 μM desde el primer minuto (20%) de incubación. El otro inhibidor de la PKC probado fue la BIM. Cuando los espermatozoides se incubaron con diferentes concentraciones (0.1, 1 y 5 μM) de dicho inhibidor, sólo se observó una inhibición significativa en el primer minuto, con 0.1 y 1 μM y a los 5 minutos de incubación con 1 μM . Este resultado nos indica que la PKC es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*, y que su participación en dicho evento parece ser más importante que la de la PKA.

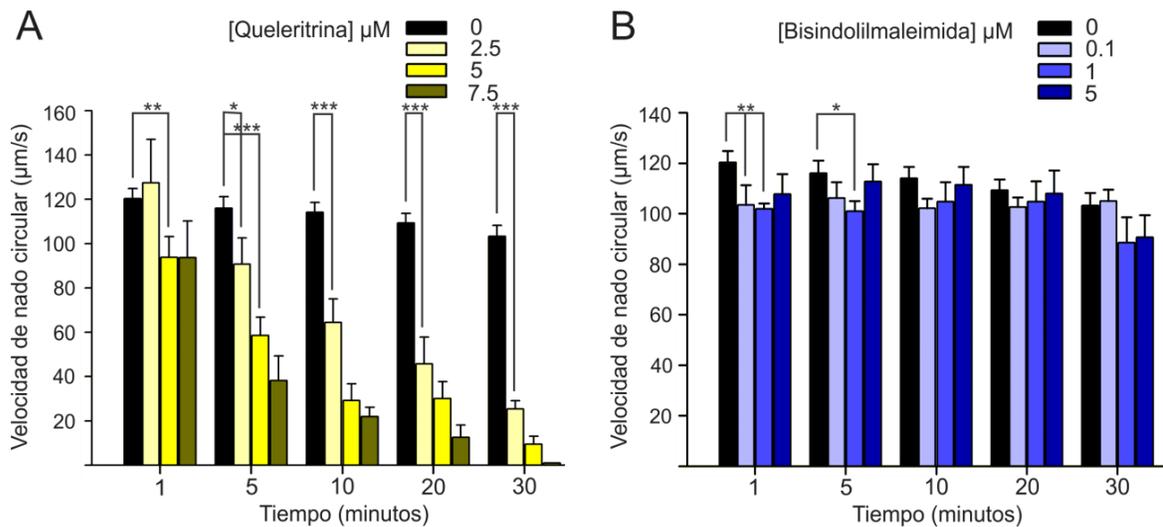


Figura 6.6 La PKC es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos en ausencia (0) ó presencia de diferentes concentraciones de dos inhibidores de la PKC: **A)** la Quelerritrina a 2.5, 5 y 7.5 μM y **B)** el bisindolilmaleimida 0.1, 1 y 5 μM . Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio \pm E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que los inhibidores (<0.1% v/v). n= 3-4 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. *** ($P \leq 0.001$); * ($P \leq 0.05$).

El hecho de que el efecto inhibitorio de la PKC fue gradual con respecto al tiempo, podría sugerir que la PKC participa en eventos no inmediatos en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. Además, el hecho de que con la BIM no se

observó una inhibición tan marcada como la que se observó con la Queleritrina, es porque este inhibidor sólo inhibe las isoformas que son dependientes de Ca^{+2} y DAG. Considerando que en el genoma del erizo de mar se encuentran una isoforma convencional (α), dos isoformas nuevas (δ y ϵ) y una isoforma atípica (ι); este resultado sugiere que la isoforma que no es regulada por Ca^{+2} y DAG (isoforma ι) participa en la movilidad de los espermatozoides. Más experimentos donde se evalúe la movilidad de los espermatozoides en ausencia de calcio son necesarios para confirmar esta hipótesis.

De manera similar a como evaluamos la participación de la PKA en la fosforilación de proteínas en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar, investigamos la participación de la PKC. La **figura 6.7** muestra que la PKC participa en la fosforilación de proteínas que son sustratos de la PKA y de la PKC en asociación con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. Cuando los espermatozoides se incubaron en condiciones basales de movilidad (móvil) se detectaron cuatro sustratos fosforilados por la PKA (Panel **A**) con una Mr de ~120, 80, 50 y 45 kDa. Sin embargo, cuando los espermatozoides se incubaron con la Queleritrina (inhibidor de la PKC) a una concentración (5 μM) con la cual se observó inhibición de la movilidad, hubo una inhibición en la fosforilación de todos los sustratos de la PKA comparado con los detectados en la condición móvil. La estimulación de los espermatozoides con Speract no mostró ningún cambio significativo en la fosforilación de los sustratos de PKA detectados en la condición móvil. Finalmente, en los espermatozoides preincubados con Queleritrina y posteriormente estimulados con Speract se observó un aumento en la fosforilación de todos los sustratos de PKA detectados en la condición donde sólo se incubó con Queleritrina. El resumen de los cambios en la fosforilación de los sustratos de la PKA de diferentes experimentos se muestran en la grafica de barras del lado derecho del "Western blot" (**Figura 6.7A**). En el mismo experimento se evaluó el patrón de fosforilación por la PKC (**Figura 6.7B**) donde se muestra que la inhibición de la PKC con Queleritrina inhibió la fosforilación de todos los sustratos (280, 110, 75, 52 y 36 kDa) de dicha enzima detectados con anti-PKCs en extractos de espermatozoides en

condiciones basales de movilidad (móvil). La estimulación con Speract mostró un patrón de fosforilación similar a la condición móvil. Por el contrario, en los espermatozoides que se preincubaron con la Queleritrina y posteriormente se estimularon con Speract, se observó la inhibición total de todas las bandas con una Mr ≥ 75 kDa y un aumento en el nivel de fosforilación de los PKCs con una Mr de 52 y 36 kDa con respecto a la condición donde los espermatozoides sólo se incubaron con la Queleritrina. El resumen de los cambios de diferentes experimentos se muestran en la gráfica de barras del lado derecho del WB (**Figura 6.7B**).

Nuestros resultados indican que la PKC es importante para la fosforilación de proteínas asociadas a la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar, además, confirman que existe una comunicación cruzada entre la PKC y la PKA. Es importante recordar que en el espermatozoide de erizo de mar, dos isoformas (ACm2 y ACm9) de las ACm se encuentran en el flagelo; de las cuales la ACm2 es estimulada por la PKC e inhibida por la PKA en cambio la ACm9 es inhibida por la PKC.

Está descrito que las diferentes isoformas de la PKC participan en la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides de mamífero (Kalive, Faust, Koeneman & Capco, 2010; Rodriguez Peña, Castillo Bennett, Soler, Mayorga & Michaut, 2013), así como en la hiperactivación de los espermatozoides de jabalí (Harayama & Miyake, 2006). Además, se sabe que la PKA y la PKC participan tanto de manera cooperativa (Harayama & Miyake, 2006) como opuesta (Rotman, Etkovitz, Spiegel, Rubinstein & Breitbart, 2010) en la regulación de la fisiología de los espermatozoides de mamífero. Como mencionamos antes en el caso de los espermatozoides de erizo de mar, la PKC y la PKA participan en la movilidad tanto de *L. pictus* (White et al., 2007) como de *S. purpuratus* (este trabajo). Aunque es clara la comunicación cruzada entre ambas cinasas (PKA y PKC) durante la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar, se necesitan más experimentos para determinar la temporalidad en la que participa cada una de ellas; como se describió en los espermatozoides de jabalí donde la PKA fosforila a la PKC para regular la hiperactivación (Harayama & Miyake, 2006).

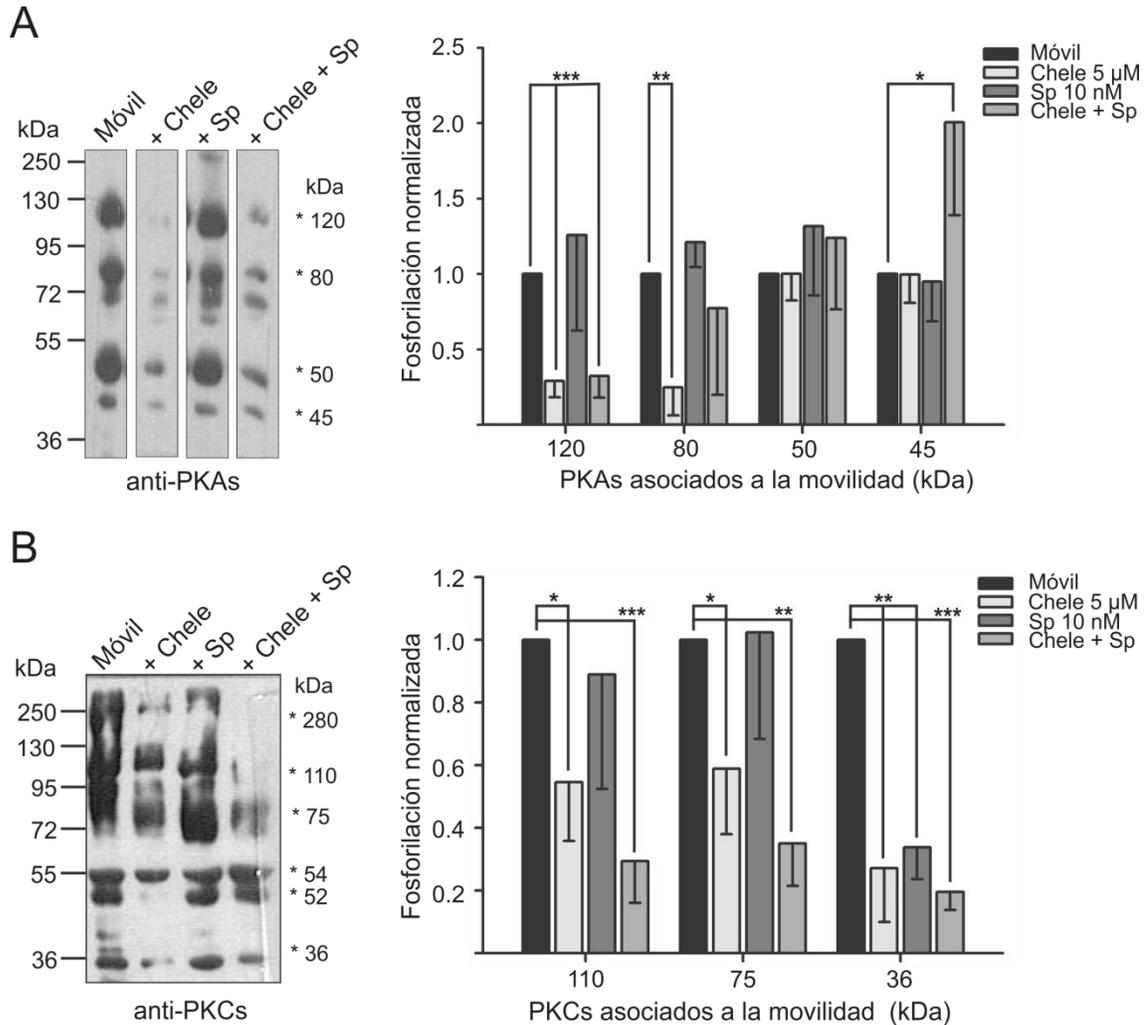


Figura 6.7 La PKC participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la movilidad de los espermatozoides basal y en la estimulada con Speract y altera el patrón de fosforilación por PKA.

Los espermatozoides de erizo de mar se incubaron durante 10 min a 14°C en AMA pH 8 en ausencia (móvil) o presencia de un inhibidor de la PKC (Quelerritrina 5 μ M), estimulado o no con Speract 10 nM durante 10 seg. Las proteínas se precipitaron (20 μ g) y se hizo el “Western blot” (WB) revelando con anti-PKAs (1:500) (A) o con anti-PKCs (1:500) (B). Del lado derecho de cada “WB” se muestra el análisis densitométrico de los cambios en el nivel de fosforilación de los sustratos de la PKA o de la PKC asociados a la movilidad de los espermatozoides. Los números del lado izquierdo del “WB” indican los pesos moleculares de los estándares; y los números del lado derecho con asterisco indican los sustratos fosforilados que modifican su nivel de fosforilación con la movilidad. n=4.

6.5 La participación de Epac en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar es mínima

El AMPc es un segundo mensajero fundamental en un gran número de vías de señalización de muchos tipos celulares; y el espermatozoide no es la excepción. En los espermatozoides de erizo de mar, los niveles de AMPc aumentan cuando se activa la movilidad o se induce la reacción acrosomal (RA) (Beltrán et al., 2007; Darszon et al., 2011). El AMPc tiene tres blancos reportados de importancia para la función del espermatozoide: los canales iónicos, la PKA y el Epac (de sus siglas en inglés, *Exchange Protein Directly Activated by cAMP*). Al igual que evaluamos la participación de la PKA (uno de los blancos del AMPc) en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar, quisimos investigar la participación de otro de los blancos del AMPc, la Epac. Sólo existe un par de reportes donde se demuestra que en los espermatozoides de mamífero Epac es importante tanto en la regulación del batido flagelar (Kinukawa et al., 2006) como en la reacción acrosomal (Branham et al., 2009).

Para investigar la participación de Epac en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*, las células se incubaron con el inhibidor Brefeldina A. La Brefeldina A es un antibiótico producido por el hongo *Eupenicillium brefeldianum* que en células de mamífero inhibe a Epac (Nebenführ, Ritzenthaler & Robinson, 2002). La **figura 6.8**, muestra que con 200 μ M de Brefeldina a 1 y 5 minutos de incubación se observó una inhibición significativa de la velocidad de nado de los espermatozoides. Nuestro resultado y que en el genoma del erizo de mar *S. purpuratus* se encuentra una isoforma de Epac, sugiere que esta proteína participa en baja proporción en la velocidad de nado de los espermatozoides de erizo de mar. Esta es la primera vez que se muestra evidencia de la participación de Epac en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar; se requieren más experimentos para caracterizar su participación.

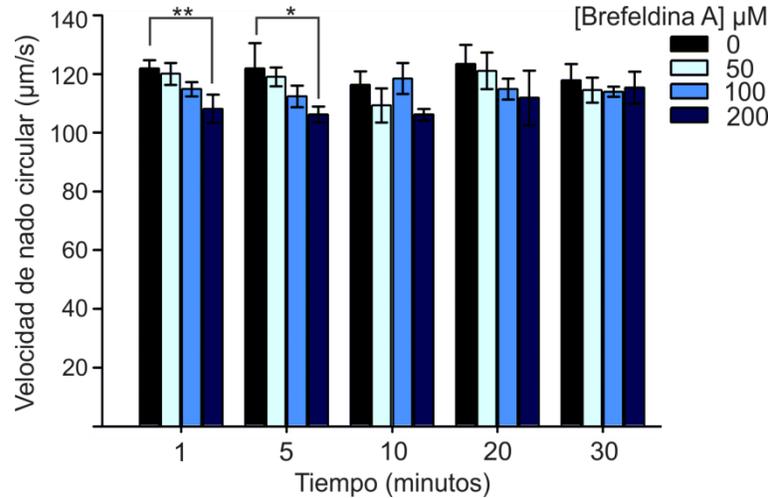


Figura 6.8 La Epac participa poco en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH 8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos en ausencia (0) ó presencia de diferentes concentraciones de un inhibidor de Epac, la brefeldina A a 50, 100 y 200 μM. Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio ± E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen de disolvente (DMSO) del inhibidor (<0.1% v/v). n=4 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. ** (P<=0.01); * (P<=0.05).

6.6 La movilidad de los espermatozoides de erizo de mar se regula por aumentos de los niveles de AMPc que activan a la PKA

Con base en las curvas dosis-respuesta de los inhibidores de la PKA y de la PKC mostradas en las secciones 6.3 y 6.4 de resultados, se determinó la concentración y el tiempo mínimo con los cuales se obtiene la mayor inhibición de la velocidad de nado circular de los espermatozoides. Considerando que los principales blancos del AMPc son la PKA, Epac y canales iónicos como el SpHCN, decidimos investigar cuál es la vía de señalización que sigue dicho segundo mensajero en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. Para esto, se evaluó la recuperación de la movilidad de los espermatozoides inhibidos con H-89 ó con Queleritrina, inhibidores de la PKA y de la PKC respectivamente, utilizando análogos permeables de AMPc que activan a la PKA (8Br-AMPc) o a Epac (OMe-pCPT).

Inicialmente, se evaluó si dichos análogos modifican la velocidad de nado circular de los espermatozoides en condiciones basales de movilidad. La **figura 6.9**

muestra que sólo el 8Br-AMPC y no el OMe-pCPT, aumentó la velocidad de nado cuando los espermatozoides se incubaron hasta 30 minutos con el 8Br-AMPC. Nuestro resultado sugiere que el AMPc sintetizado durante la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar activa a la PKA y no a otro blanco como al Epac. Confirmando la poca participación de Epac en la movilidad (**Figura 6.8**).

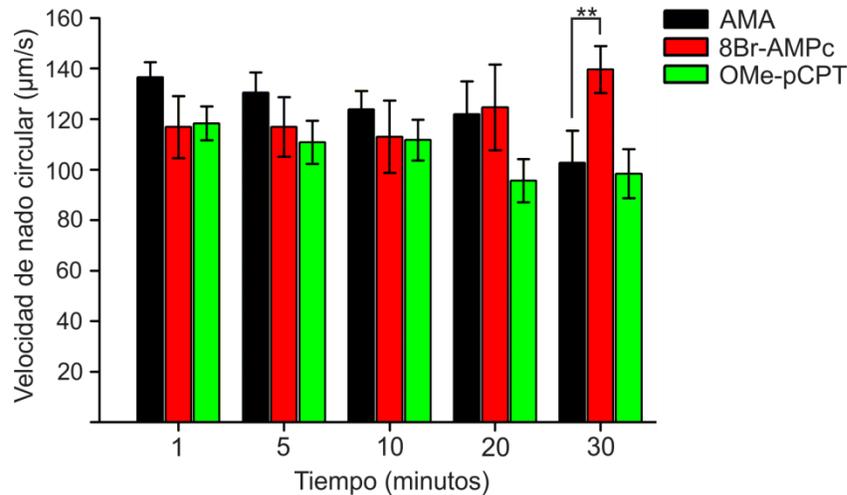


Figura 6.9 El AMPc producido durante la movilidad basal de los espermatozoides de erizo de mar actúa mediante la PKA.

Los espermatozoides de erizo de mar se diluyeron 1:400 000 en AMA completa pH 8 a 14°C y se incubaron durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos en presencia de análogos permeables de AMPc que activan a la PKA (8Br-AMPC 1mM) o que activan a Epac (OMe-pCPT 50µM). Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio \pm E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que el análogo (<0.1% v/v). n=9 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. ** (P<=0.01).

Para corroborar la participación de la PKA en la movilidad de los espermatozoides e investigar si en su ausencia se evidencia la participación de Epac en dicho evento. Los espermatozoides se pre-incubaron con un inhibidor de la PKA (H-89) y posteriormente se estimularon con un análogo de AMPc que activa a la PKA (8Br-AMPC) o a Epac (OMe-pCPT). La **figura 6.10** muestra que los espermatozoides inhibidos con H-89, aunque muestran una tendencia a recuperar la movilidad con los análogos de AMPc, los resultados no son significativos.

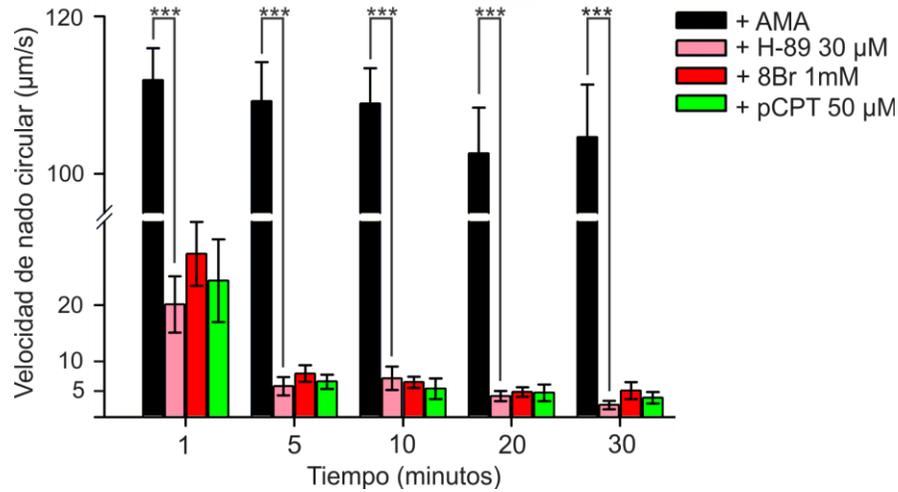


Figura 6.10 La estimulación de la PKA o de Epac no revierte la movilidad de los espermatozoides incubados con un inhibidor de la PKA, H-89.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se preincubaron con un inhibidor de la PKA (H-89 30 µM) durante 10 minutos a 14°C y posteriormente se incubaron en ausencia (AMA) ó presencia de H-89 ó con análogos del AMPc que activan a la PKA (**8Br** 1mM) o a Epac (**pCPT** 50 µM) durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos. Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio ± E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que el inhibidor (<0.1% v/v). n=4 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. *** (P<=0.001).

Si bien en los espermatozoides de jabalí, la inhibición de la movilidad por H-89 se revirtió por la incubación con el 8Br-AMPC (Bragado, Aparicio, Gil & Garcia-Marin, 2010), este efecto no se observó en los espermatozoides de erizo de mar como lo esperábamos. Sugiriendo que entre ambos sistemas, existen diferencias en la vía de señalización involucrada durante la movilidad. Posiblemente la diferencia en el pH fisiológico donde los espermatozoides de jabalí (pH 7.4) y de erizo de mar (pH 8) se mueven, afecta la regulación de la vía de señalización. Sin embargo, en espermatozoides de sapo (*Bufo arenarum*) que es un sistema cuyo pH fisiológico (8.2) es similar al de erizo de mar; aunque no investigaron el efecto en la movilidad, ellos no observaron la re-fosforilación de los sustratos de la PKA inhibidos con H-89 al estimular los espermatozoides con 8Br-AMPC (O'Brien, Krapf, Cabada, Visconti & Arranz, 2011).

Es importante mencionar que aunque el H-89 es un inhibidor reversible, el sitio de unión a la PKA del 8Br-AMPC y del H-89 es diferente. Posiblemente esta

característica no permite que el análogo de AMPc revierta el efecto inhibitorio del H-89 en la velocidad de nado de los espermatozoides de erizo de mar. El uso de un inhibidor mas específico o cuyo sitio de unión sea el mismo que el del análogo de AMPc y que sea reversible (por ejemplo Rp-cAMPS), sería necesario para descartar este efecto.

Como mostramos anteriormente, la PKC regula la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* (**Figura 6.6**), y su participación parece ser mayor que la de la PKA. Nuestros resultados (**Figura 6.5, Figura 6.7**), también sugieren que hay una comunicación cruzada entre la PKA y la PKC en la regulación de la fosforilación de proteínas asociada a la movilidad de los espermatozoides. Considerando que existe la comunicación cruzada entre la PKA y la PKC como ya está reportado en los espermatozoides de mamífero (Cohen et al., 2004; Harayama & Miyake, 2006; Rotman et al., 2010); decidimos confirmarla en la movilidad de los espermatozoides, específicamente en la velocidad de nado circular. Para esto, las células se pre-incubaron con un inhibidor de la PKC (Quelerritrina) y posteriormente se estimularon con los análogos de AMPc que activan a la PKA (8Br) o a Epac (pCPT). La **figura 6.11** muestra un aumento significativo en la re-activación de la velocidad de nado de los espermatozoides cuando se estimularon durante 5 y 10 minutos con el análogo del AMPc que activa a la PKA (8Br). El cual no se observó con el pCPT (activador de Epac) incluso a los 30 minutos de estimulación (**Figura 6.11**). Esto sugiere que la participación de la PKC en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar esta río abajo de la vía de señalización de la PKA, debido a que la inhibición de la PKC no afecta su señalización. Además, confirma nuevamente que la participación de Epac en este tipo de movilidad es nula. Con este resultado se concluye que si hay una comunicación cruzada entre la PKA y la PKC, considerando que aunque la participación de la PKC es muy importante en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*, la vía de señalización por la PKA también participa en este evento incluso en ausencia de la actividad de PKC.

Si bien la participación de la PKA en la movilidad de los espermatozoides se ha estudiado más que la participación de la PKC, la contribución de la PKC en la

reacción acrosomal de espermatozoides de mamífero es fundamental (Liu & Baker, 1997; Naor & Breitbart, 1997; Rotem et al., 1992). Sin embargo, hay algunos resultados tanto en espermatozoides de mamífero (Harayama & Miyake, 2006; Rotem, Paz, Homonnai, Kalina & Naor, 1990a, 1990b) como de erizo de mar (White et al., 2007) donde la PKC participa en la movilidad. Esto considerando la localización de algunas isoformas de la PKC en la cabeza (α , β II) o en el flagelo (ϵ) del espermatozoide de mamífero (Rotem et al., 1992). Además, tomando en cuenta que la isoforma PKC- ϵ se encuentra en el genoma del erizo de mar *S. purpuratus* (Bradham et al., 2006), sugiere su participación en la regulación de la movilidad a través de la fosforilación de proteínas localizándose en el flagelo del espermatozoide del erizo de mar; como lo indica también el resultado obtenido con la Bisindolilmaleimida I (**Figura 6.8**). Contrario a que el Speract induce fluctuaciones en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) en el flagelo que son importantes para la quimiotaxis de los espermatozoides de erizo de mar *L. pictus* (Wood, Darszon & Whitaker, 2003; Wood, Nishigaki, Furuta, Baba & Darszon, 2005). Sería interesante investigar a mayor detalle en el erizo de mar *S. purpuratus* cuál es la o las isoformas de PKC que participan en la movilidad, incluso hacer inmunolocalización de cada isoforma en el espermatozoide.

6.7 La PKA y la PKC fosforilan proteínas importantes para la movilidad tanto basal como la estimulada con Speract, de los espermatozoides de erizo de mar

Como se mencionó previamente, el inicio de la movilidad en los espermatozoides de erizo de mar está asociado a cambios en la fosforilación de proteínas (Bracho et al., 1998). Además en espermatozoides de *L. pictus* se detectaron en el flagelo por experimentos tipo “Western blot” 3 sustratos de la PKC que se fosforilan al iniciar la movilidad (White et al., 2007). Para investigar los cambios en la fosforilación de los sustratos de la PKA y de la PKC asociadas a la movilidad, los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se expusieron a condiciones de fuerza iónica donde se mantienen inmóviles (AMA 50 mM KCl pH6) o móviles (AMA pH8) y las proteínas de los espermatozoides expuestos a estas condiciones se precipitaron

para identificar dichos sustratos mediante experimentos tipo “Western blot” con anticuerpos específicos (Para PKA, RXXT ó RRXS; y para PKC, (R/K)XS(hidrofóbico)(R/K)) contra dichas proteínas.

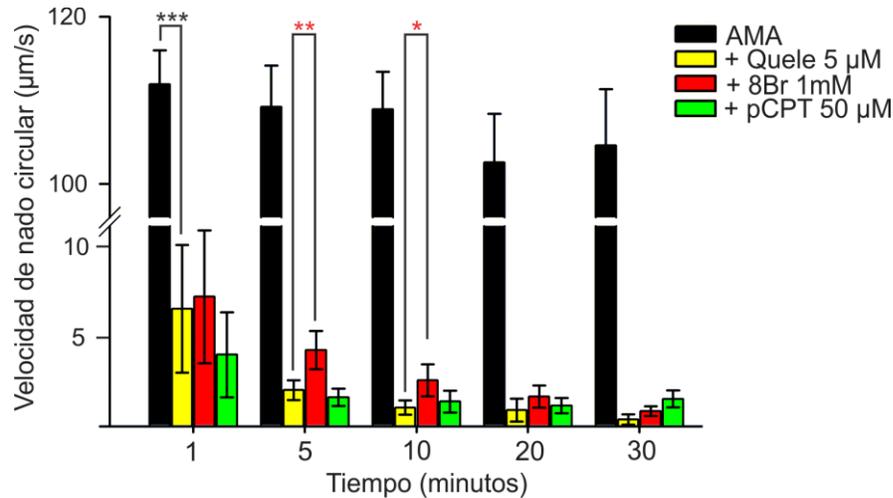


Figura 6.11 La estimulación de la PKA revierte parcialmente la inhibición de la movilidad por la Queleritrina, un inhibidor de la PKC.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se preincubaron con un inhibidor de la PKC (Queleritrina 5 µM) durante 10 minutos a 14°C y posteriormente se incubaron en ausencia (AMA), o presencia de Queleritrina 5 µM ó con análogos del AMPc que activan a la PKA (8Br 1mM) o a Epac (pCPT 50 µM) durante 1, 5, 10, 20 y 30 minutos. Las barras muestran la velocidad de nado circular promedio ± E.E. de los espermatozoides control (AMA) que contienen el mismo volumen del disolvente (DMSO) que el inhibidor (<0.1% v/v). n=4 experimentos con espermatozoides de diferentes erizos. *** (P<=0.001), ** (P<=0.01), * (P<=0.05).

La **figura 6.12** muestra que el patrón de fosforilación de sustratos de la PKA o de la PKC se modificó cuando los espermatozoides pasan de una condición de inmovilidad a una de movilidad basal. La **figura 6.12A** muestra que en la condición de inmovilidad se observaron seis sustratos de la PKA con Mr de ~180, 120, 95, 80, 50 y 45 kDa. Cuando los espermatozoides de erizo de mar se están moviendo la fosforilación de los sustratos de la PKA de 180, 120 y 80 kDa disminuyó y el sustrato de 95 kDa ya no se detectó. Del lado derecho del western blot, se muestra una gráfica de barras con los valores promedio de fosforilación normalizados de los sustratos que modificaron su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides. De manera similar, se detectaron cambios en la fosforilación de proteínas utilizando un

anticuerpo que detecta los sustratos fosforilados por la PKC (**Figura 6.12B, anti-PKCs**). En la condición donde los espermatozoides se mantienen inmóviles se detectaron varios sustratos fosforilados por la PKC, principalmente con una movilidad relativa (Mr) de >250, 230, 90, 75, 54 y 36 kDa. Cuando los espermatozoides son móviles la mayoría de los sustratos disminuyeron su fosforilación (230, 54 kDa) o ya no se fosforilaron (>250, 90 y 36 kDa) y sólo se observó un aumento en la fosforilación por la PKC en un grupo de bandas con ~75 kDa. Estos resultados sugieren que tanto la PKA como la PKC participan de manera diferencial en los cambios de fosforilación de proteínas cuando asociados a la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

Durante muchos años y basados en experimentos de espermatozoide tratados con detergente, la regulación de la movilidad asociada a la fosforilación de proteínas se atribuyó únicamente a la PKA (Bracho et al., 1998; Brokaw, 1987; Murofushi et al., 1986; Su, Chen, Zhou & Vacquier, 2005; Tash, 1989). Posteriormente se mostró que la PKC es más importante que la PKA para la fosforilación de proteínas en el flagelo en el inicio y mantenimiento de la movilidad de los espermatozoides intactos de *L. pictus*; indicando que el tratamiento de los espermatozoides con detergente, aunque permite un contacto directo con las proteínas del axonema, interfiere en las vías de señalización de la PKA y la PKC lo que explica que los resultados de experimentos en espermatozoides permeabilizados e intactos sean opuestos (White et al., 2007).

Nuestros resultados muestran un mayor número de sustratos de la PKC que de la PKA en la condición donde los espermatozoides son inmóviles. A diferencia de lo reportado previamente, observamos una disminución general en la fosforilación de los sustratos de ambas cinasas. Sólo se observó un aumento en la fosforilación del sustrato de la PKC de ~75 kDa asociado a la activación de la movilidad, similar al observado en los espermatozoides de erizo de mar *L. pictus* (White et al., 2007). Esto demuestra que existen diferentes sustratos de la PKA y de la PKC en los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*, que modifican su estado de fosforilación con cambios en la movilidad y que podrían modificar su función durante

éste proceso. Además sugieren que la regulación por la PKC es más importante porque el número de sustratos de la PKC que modifican su estado de fosforilación con la movilidad es mayor.

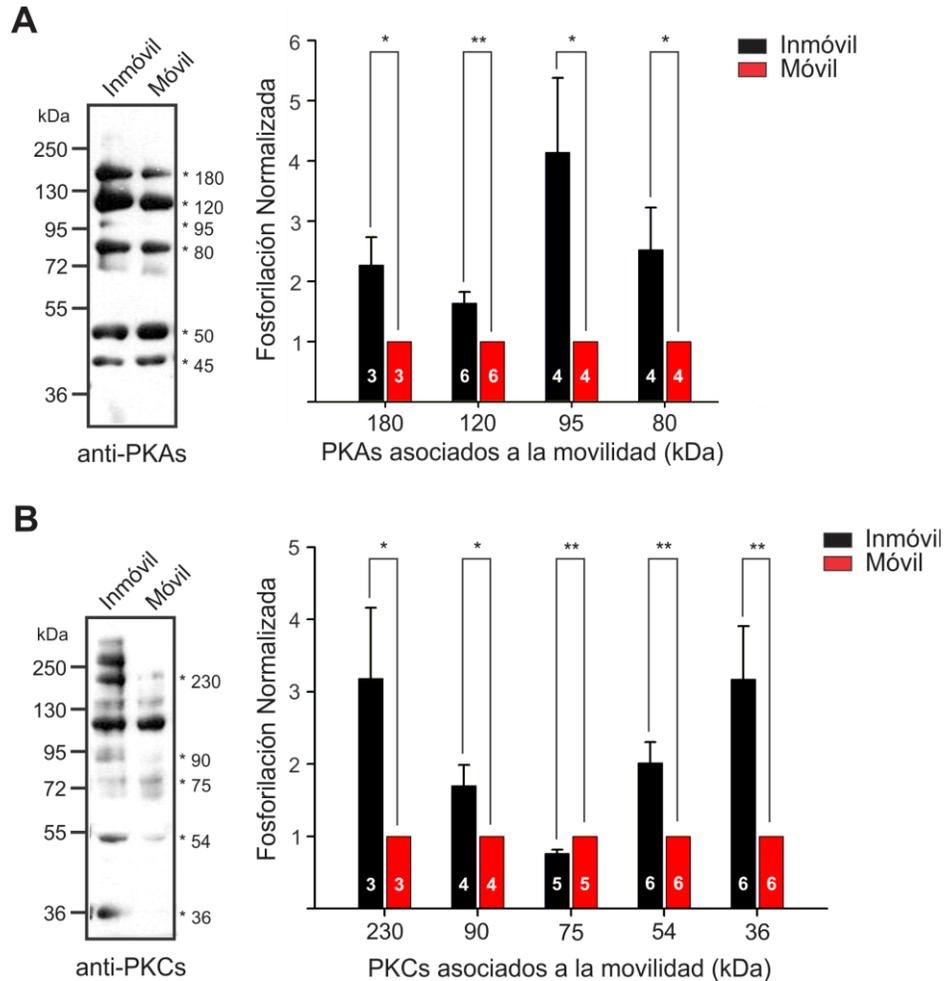


Figura 6.12 La PKA y la PKC participan en la activación de la movilidad modificando el grado de fosforilación de algunas proteínas de los espermatozoides.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se incubaron durante 10 min a 14°C en AMA 50 mM de KCl pH6 (inmóvil) o en AMA pH 8 (móvil). Los experimentos de “Western blot” se hicieron con 15 µg de las proteínas precipitadas con TCA 10% de cada una de las condiciones, se separaron en geles de PA-SDS al 10% y se revelaron con anticuerpos que detectan sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs) (A) o sustratos fosforilados por la PKC (anti-PKCs) (B). Los números del lado izquierdo del “Western blot” indican los pesos moleculares (PM) de los estándares y los del lado derecho los PM de los sustratos que modifican de manera significativa su estado de fosforilación por la activación de la movilidad. Del lado derecho de cada WB se muestran las gráficas con el promedio de los niveles de fosforilación normalizados con respecto al nivel de fosforilación ± E.E. observado en la banda de la condición móvil de cada experimento. En cada barra se muestra el número de experimentos con diferentes erizos donde se observó la fosforilación de esa banda. Los WB son representativos de 3-6 experimentos independientes. *** (P<0.001); ** (P<0.01); * (P<0.05).

6.8 El Speract modifica el patrón de fosforilación de sustratos de la PKA y/o de la PKC

El efecto del Speract (regulador de la movilidad del espermatozoide) en los espermatozoides de erizo de mar se ha estudiado ampliamente. Se sabe que el Speract induce fluctuaciones en las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) y que dichas fluctuaciones son importantes para el batido y la asimetría del movimiento del flagelo (Wood et al., 2003, 2005). Como se describió previamente, el receptor del Speract está acoplado a una guanilato ciclasa transmembranal (G_{Cm}) cuya actividad está finamente regulada tanto por cambios en su estado de fosforilación como de pH_i inducidos por la unión del Speract a su receptor (Bentley et al., 1986; Ramarao & Garbers, 1985; Suzuki & Garbers, 1984; Ward et al., 1985). A la fecha, se desconoce si el Speract induce un cambio en la fosforilación de otras proteínas utilizando concentraciones (nM) y tiempos (segundos) similares a los fisiológicos.

Para investigar esto, los espermatozoides de erizo de mar se estimularon durante 10 segundos con diferentes concentraciones de Speract para simular el gradiente formado en el agua de mar, y las proteínas de los espermatozoides expuestos a estas condiciones se precipitaron para identificar los sustratos de la PKA y de la PKC mediante experimentos tipo “Western blot” con anticuerpos específicos contra dichas proteínas. La **figura 6.13** muestra el patrón de fosforilación de proteínas revelado con anticuerpos que detectan sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs) o sustratos fosforilados por la PKC (anti-PKCs) en los espermatozoides control (móviles) o estimulados con distintas concentraciones (0.1, 1 y 10 nM) de Speract. La **figura 6.13A** muestra que en la condición basal (móvil) se fosforilan seis sustratos de la PKA con una M_r de ~180, 120, 80, 70, 50 y 45 kDa. La estimulación con las diferentes concentraciones de Speract modificaron de manera diferencial los patrones de fosforilación de estas proteínas. Dichos cambios se muestran en la grafica de barras del lado derecho donde en general se observa una disminución en la fosforilación de los sustratos de la PKA, excepto en las bandas de 120 y 80 kDa que aumentaron su fosforilación al estimular los espermatozoides con 10 nM de Speract y

la de 45 kDa que aumentó su nivel de fosforilación con 1 nM de Speract (**Figura 6.13A**).

De la misma forma se evaluó el estado de fosforilación de los sustratos de la PKC en respuesta al Speract. La **figura 6.13B** muestra que seis bandas principales en los espermatozoides móviles (M_r ~230, 110, 90, 75, 54, 36 kDa) cambiaron su estado de fosforilación al estimular las células con las diferentes concentraciones de Speract. La gráfica de barras del lado derecho del “Western blot” (**Figura 6.13B**), muestra un aumento en la fosforilación en las bandas de 230, con las 3 concentraciones de Speract; la banda de 110 kDa con 1nM de Speract y la banda de 36 kDa con 10 nM de Speract. El resto de los sustratos de PKC muestra (“Western blot” de **Figura 6.13B**) una disminución de la fosforilación en respuesta al Speract.

Este resultado nos sugiere que durante el nado de los espermatozoides hacia el óvulo, los cambios en la detección del gradiente de Speract, modifican de manera dosis-dependiente la fosforilación de los sustratos de la PKA y de la PKC. Sabemos que la mayoría de las proteínas que participan en la cascada de señalización del Speract (tetraKCNG, VDCC, SpHCN, NHE, etc.) tienen sitios posibles de fosforilación tanto para la PKA como para la PKC, identificados por análisis *in silico* (programa NetPhosK). En ausencia de síntesis de proteínas, como es el caso en el espermatozoide, la fosforilación de proteínas se vuelve un mecanismo importante para la regulación de la función de muchas proteínas. Por lo tanto este resultado indica que las proteínas que participan en la movilidad estimulada con el Speract regulan su función por cambios en su estado de fosforilación inducidos por la PKA o por la PKC.

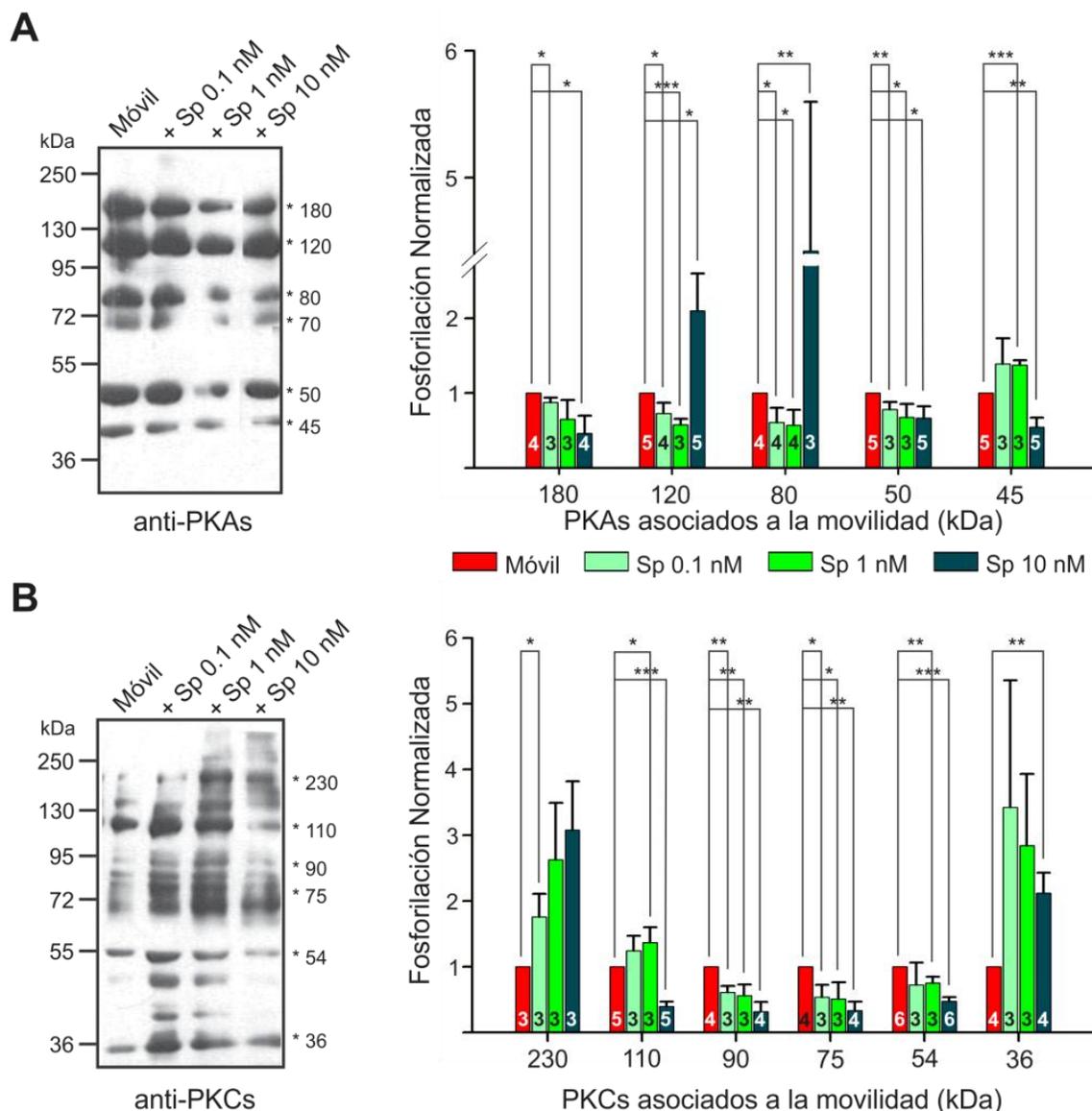


Figura 6.13 El Speract cambia el grado de fosforilación de sustratos de la PKA y de sustratos de la PKC.

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se incubaron durante 10 min a 14°C en AMA pH8 en ausencia (móvil) o presencia de concentraciones ascendentes de Speract (0.1, 1 y 10 nM) estimulándolos durante 10 seg. Al final de la incubación las muestras se procesaron como en la figura 6.13. Se hizo el “Western blot” revelando con anti-PKAs (1:500) (A) o con anti-PKCs (1:500) (B). Los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares (PM) de los estándares y los del lado derecho los PM de los sustratos que modifican de manera significativa su estado de fosforilación por la estimulación con Speract. Del lado derecho de cada “WB” se muestran las gráficas con los niveles de fosforilación normalizados \pm E.E. con respecto al nivel de fosforilación observado en la banda de la condición móvil de cada experimento. En cada barra se muestra el número de experimentos con diferentes erizos donde se observó la fosforilación de esa banda. Los “WB” son representativos de 3-5 experimentos independientes. *** ($P \leq 0.001$); ** ($P \leq 0.01$); * ($P \leq 0.05$).

6.9 Las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar tienen sustratos de la PKA y de la PKC que modifican su estado de fosforilación con la movilidad

Sabemos que hay fosforilación de proteínas al activarse la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar, y que se han detectado algunas proteínas en el flagelo que cambian su grado de fosforilación con la movilidad (Bracho et al., 1998; White et al., 2007); sin embargo se desconoce su identidad molecular. Como recordaremos las balsas lipídicas son plataformas de señalización que reclutan proteínas específicas que participan en una vía de señalización. En las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se identificaron (mediante experimentos de “Western blot”) diferentes proteínas, entre las que se encuentran el receptor del Speract, la PKA y la sAC entre otras (Ohta et al., 2000). Con estos antecedentes decidimos identificar a nivel molecular proteínas en las balsas lipídicas cuyo estado de fosforilación cambia con la movilidad de los espermatozoides. Para esto se aislaron las balsas lipídicas de espermatozoides expuestos a diferentes condiciones de movilidad (inmóviles, móviles o estimulados con Speract) y separamos sus proteínas en geles de dos dimensiones (2-D). Dicha técnica consiste en separar las proteínas primero por su punto isoeléctrico (Isoelectroenfoque, IEF) y después por su peso molecular. De esta manera, las proteínas que observamos en un gel teñido con azul de Coomassie y cuyo patrón de fosforilación detectado por “Western blot” con los anticuerpos que detectan sustratos de la PKA (anti-PKAs) o de la PKC (anti-PKCs) cambió, se cortaron y se enviaron a identificar por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

La **figura 6.14A** muestra la cuantificación de proteína (con azul de Coomassie en papel filtro (Minamide & Bamberg, 1990)) de las siete fracciones (F1-F7) obtenidas a partir de espermatozoides inmóviles, móviles ó estimulados con Speract, solubilizados con 0.1% de Tritón X-100 (ST, solubilizado total) y separadas por centrifugación en un gradiente de Optiprep®. Como se observa en esta **figura 6.14**, hay un enriquecimiento de proteínas en la F2 del gradiente, la cual corresponde a las balsas lipídicas, según reportes en otros tipos celulares (Yuan et al., 2002). Sin embargo para confirmar esta aseveración, se hizo un western blot utilizando un

anticuerpo que reconoce específicamente a la flotilina 2, proteína marcadora de las balsas lipídicas. La **Figura 6.14B** muestra como se esperaba, que la F2 contiene a la flotilina 2, confirmando que esta fracción corresponde a las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*.

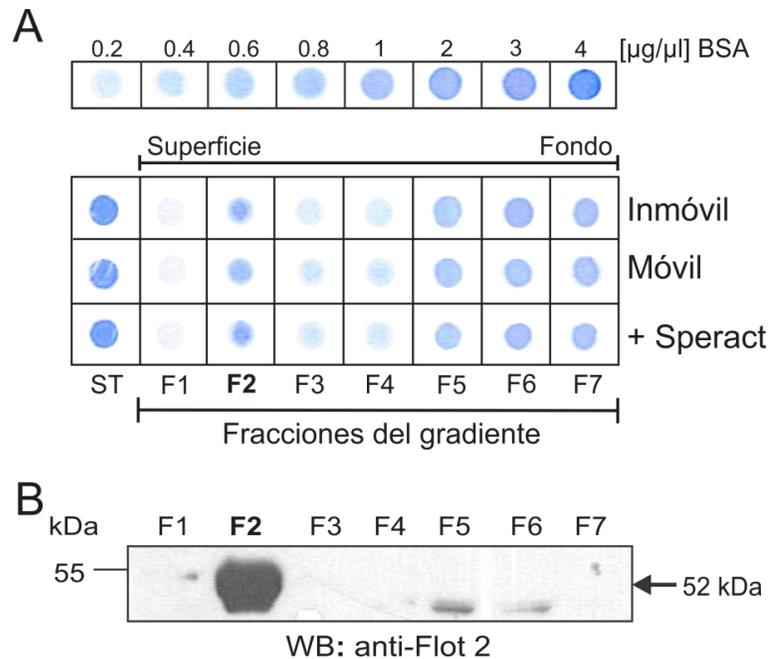


Figura 6.14 La fracción 2 (F2) del gradiente de Optiprep corresponde a las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.

A) La parte superior muestra la curva estándar con diferentes concentraciones (0.2 – 4 µg/µl) de albumina de suero bovino (BSA). En la parte inferior podemos ver la distribución de las proteínas en las fracciones (F1-F7) del gradiente de Optiprep® y del solubilizado total (ST) obtenido a partir de los espermatozoides inmóviles, móviles o estimulados con Speract, determinada en las proteínas fijadas en el papel filtro por tinción con azul de Coomassie R-250 (ver sección de métodos). **B)** “Western blot” con las proteínas de las fracciones del gradiente de Optiprep® con un anticuerpo contra la flotilina 2, la cual se localiza en la fracción 2 considerada la balsa lipídica.

Para saber si existen proteínas en las balsas lipídicas que modifican su estado de fosforilación por la PKA o por la PKC con la movilidad. Las proteínas de la fracción 2 que corresponde a las balsas lipídicas, aisladas de los espermatozoides inmóviles, móviles o estimulados con Speract, se separaron en geles de PA-SDS 10% para hacer experimentos de “Western blot” con anti-PKAs o con anti-PKCs. La **figura**

6.15 muestra que cambios en la movilidad de los espermatozoides modifica el patrón de fosforilación llevado a cabo por la PKA de las proteínas en las balsas lipídicas, pero no de las proteínas en la fracción soluble del gradiente (F7). En la fracción de las balsas lipídicas de espermatozoides inmóviles (I) se detectaron cuatro sustratos principales fosforilados por la PKA con Mr ~120, 80, 50 y 40 kDa. Cuando se activó la movilidad (M) la banda de 120 kDa aumentó su fosforilación, la de 80 kDa desapareció y las de 50 y 40 kDa disminuyeron su estado de fosforilación. Sin embargo cuando los espermatozoides se estimularon con Speract (S), la banda de 120 kDa aumentó aun mas su nivel de fosforilación, la de 80 kDa reapareció con un nivel de fosforilación aun mayor que el detectado en la condición de inmovilidad y las de 50 y 40 kDa disminuyeron su fosforilación comparada con la condición móvil (**Figura 6.15A**). Sin embargo, los sustratos de la PKA que se encuentran en la F7 del gradiente no modificaron su estado de fosforilación con la movilidad (**Figura 6.15B**); este experimento es un control para mostrar que existen otros sustratos de la PKA diferentes a los observados en las balsas lipídicas. Del lado derecho de cada uno de los “Western blots” se muestra un gel teñido con azul de Coomassie con la misma cantidad de proteína transferida a la membrana del “Western blot”. Como podemos ver los cambios observados en la fosforilación no se deben a cambios en la cantidad de proteína entre cada una de las diferentes condiciones.

De manera similar, se evaluaron los cambios en la fosforilación por la PKC de las proteínas de las balsas lipídicas, asociados a la movilidad de los espermatozoides. La **figura 6.16A** muestra que se detectaron siete (280, 148, 110, 90, 75, 55 y 40 kDa) sustratos principales de PKC en las balsas lipídicas de los espermatozoides inmóviles y que cuando se activó la movilidad el grado de fosforilación de dichos sustratos disminuyó. Sin embargo en las balsas lipídicas de los espermatozoides estimulados con Speract (S), tres sustratos de PKC mostraron un aumento (280 y 110 kDa), dos una disminución (90 y 75 kDa) y tres de ellos mantuvieron (148, 55 y 40 kDa) su nivel de fosforilación comparando con el grado de fosforilación observado en la condición móvil (M). Por otra parte, en la fracción soluble (F7) del gradiente de Optiprep, se observó un patrón de fosforilación por la

PKC diferente al observado en las BL, el cual también se modificó con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar (**Figura 6.16B**).

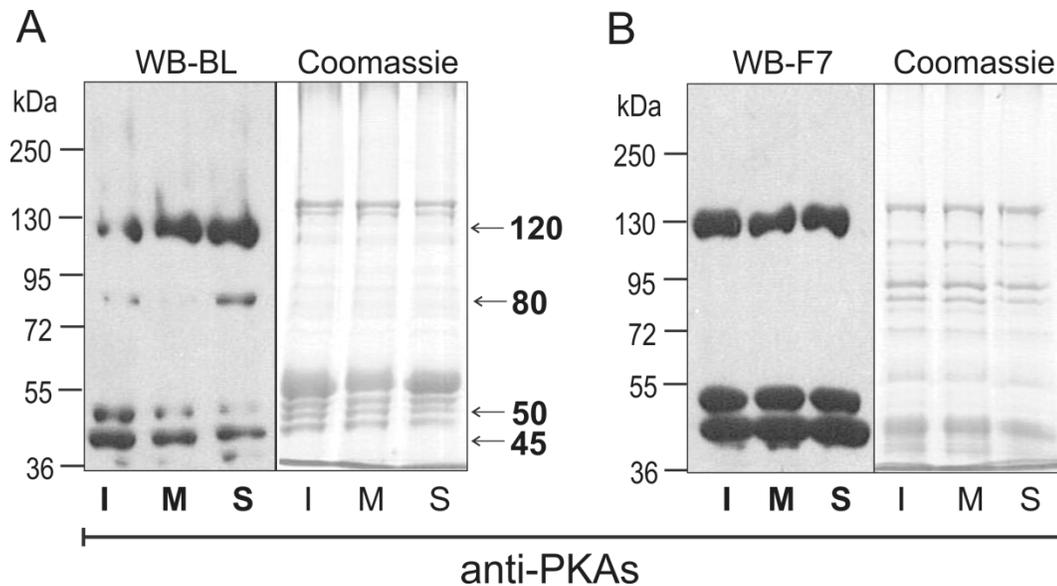


Figura 6.15 La PKA participa en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar fosforilando proteínas en sus balsas lipídicas.

A,B) El lado izquierdo de cada panel se muestran los “Western blots” (WB) de los sustratos fosforilados por la PKA **A)** en balsas lipídicas (BL) y **B)** en la fracción soluble del gradiente (F7) aislados de espermatozoides inmóviles (I), móviles (M) o estimulados con Speract (S) revelados con anti-PKAs. El lado derecho de cada WB muestra un gel teñido con azul de Coomassie con la misma cantidad de proteínas que se transfirieron a las membranas de los WB. Las flechas indican los pesos moleculares de los sustratos de la PKA (120, 80, 50 y 40 kDa) que modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides. Los WB son representativos de tres diferentes aislamientos de BL de espermatozoides de diferentes erizos de mar.

Para la identificación de los sustratos de la PKA y de la PKC que modifican su estado de fosforilación con la movilidad; en cada una de las tres condiciones de movilidad (inmóvil, móvil y estimulada con Speract) de los espermatozoides, las proteínas de las balsas lipídicas aisladas se separaron por triplicado y en paralelo en geles de 2-D. De cada condición, uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie coloidal como se muestra en la **figura 6.17**, y de los otros dos las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos anti-PKAs o anti-PKCs. Todo esto se hizo como una estrategia para obtener geles idénticos de la misma condición de movilidad de los espermatozoides y al final del procedimiento

poder alinearlos para comparar el gel teñido con la auto-radiografía del “Western blot” e identificar la mancha cuyo estado de fosforilación cambió con la movilidad.

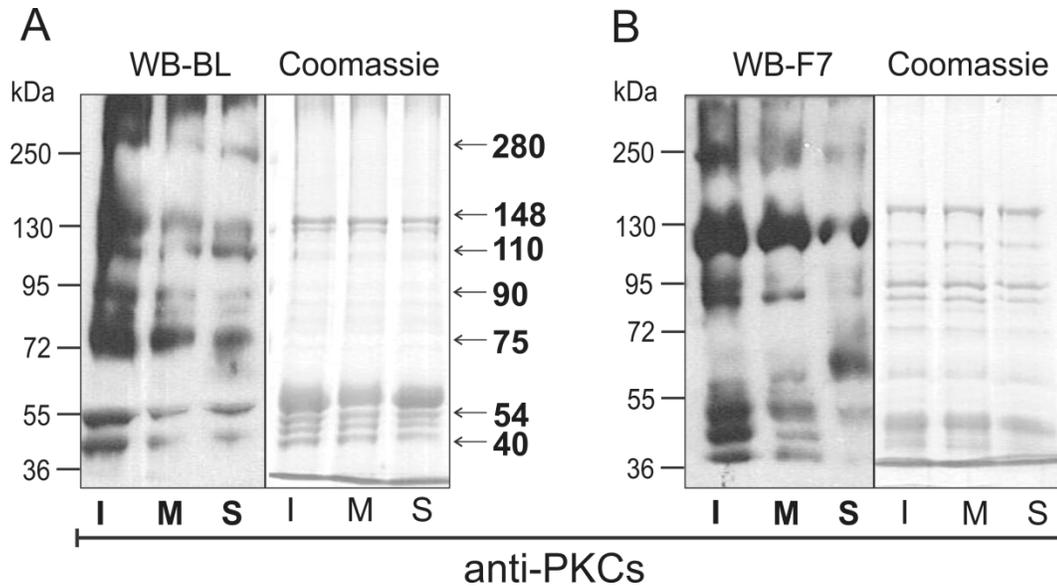


Figura 6.16 La PKC participa en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar fosforilando proteínas en sus balsas lipídicas.

A,B) El lado izquierdo de cada panel muestra los “Western blots” (WB) de los sustratos fosforilados por la PKC **A)** en balsas lipídicas (BL) y **B)** en la fracción soluble del gradiente (F7) aislados de espermatozoides inmóviles (I), móviles (M) o estimulados con Speract (S) revelados con anti-PKCs. El lado derecho de cada WB muestra un gel teñido con azul de Coomassie con la misma cantidad de proteínas que se transfirieron a las membranas de los WB. Las flechas indican los pesos moleculares de los sustratos de la PKA (280, 148, 110, 90, 75, 55 y 40 kDa) que modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides. Los WB son representativos de tres diferentes aislamientos de BL de espermatozoides de diferentes erizos de mar.

La **figura 6.17** muestra el patrón electroforético de las proteínas en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* inmóviles, móviles o estimulados con Speract, separadas en geles de 2-D y teñidas con azul de Coomassie coloidal. En los geles se marcaron con un círculo numerado las proteínas que cambiaron su estado de fosforilación entre alguna de las condiciones y que se enviaron a secuenciar por LC-MS/MS. Es importante mencionar, que aunque la cantidad de proteína (100 µg) de las balsas lipídicas en las tres condiciones que se cargó en los geles de 2-D fue la misma, después de la tinción se observaron diferencias en su patrón electroforético. Este resultado sugiere que cambios en la

movilidad de los espermatozoides correlaciona con una relocalización de algunas proteínas en las balsas lipídicas.

Existen reportes que demuestran que el arreglo de la membrana plasmática en balsas lipídicas, permite reclutar varias proteínas entre ellas canales iónicos para llevar a cabo una vía de señalización en particular (Ong & Ambudkar, 2011). La presencia de estas proteínas en las balsas lipídicas produce cambios en su función, ya sea directamente a través de interacciones lípido-proteína o alterando la cinética del canal debido a cambios en las propiedades físicas de la bicapa lipídica (Alioua et al., 2008; Dart, 2010; Fantini & Barrantes, 2009; Garg, Sun & Hu, 2009; Jiao, Garg, Yang, Elton & Hu, 2008). Probablemente durante los diferentes estados de movilidad a los que se expusieron los espermatozoides, sus balsas lipídicas reclutaron diferentes proteínas necesarias para que se llevara a cabo una vía de señalización en particular y de esta forma regular la movilidad.

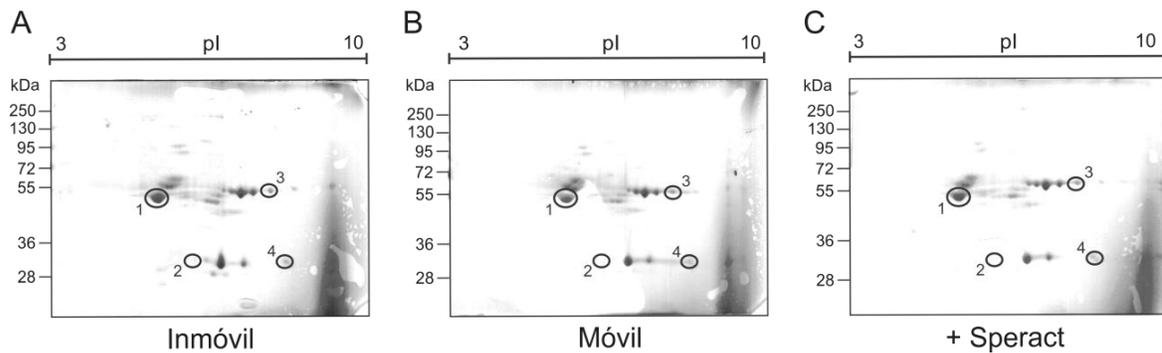


Figura 6.17 Patrón electroforético de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides de erizo de mar inmóviles, móviles y estimulados con Speract separadas en geles de 2-D.

Las proteínas (100 µg) de las balsas lipídicas de los espermatozoides inmóviles, móviles y estimulados con Speract 10 nM se separaron primero por su pI (IEF pH3-10, primera dimensión) y posteriormente por su peso molecular (geles de PA-SDS al 10%). Finalmente los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal. En los geles están marcadas en círculos las 4 manchas cuyo estado de fosforilación cambió en alguna condición y que se enviaron a secuenciar. Experimento representativo de 5 aislamientos de balsas lipídicas con espermatozoides de diferentes erizos.

Las proteínas de las balsas lipídicas separadas en los geles de 2-D, se transfirieron a membranas de PVDF y se revelaron con el anticuerpo anti-PKAs. Como se observa en la **figura 6.18**, el patrón de proteínas en las balsas lipídicas detectadas

con anti-PKAs de los espermatozoides inmóviles (**A**), móviles (**B**) o estimulados con Speract (**C**) es diferente. Se detectaron tres manchas como sustratos de la PKA (75, 50 y <28 kDa) con punto isoelectrico diferente en las balsas lipídicas de los espermatozoides inmóviles (**Figura 6.18A**); dos manchas de 50 kDa cada una en los espermatozoides móviles (**Figura 6.18B**) y tres manchas, dos de 50 kDa cada una y una de 36 kDa, en los espermatozoides estimulados con Speract (**Figura 6.18C**). Sin embargo, de todos los sustratos de la PKA detectados, sólo la mancha marcada con el número 1 incrementó su nivel de fosforilación entre las diferentes condiciones de movilidad, además de que se pudo detectar también con azul de Coomassie en los geles 2-D; condición necesaria para hacer la identificación de esa proteína por espectrometría de masas. Los cambios en la cantidad de proteína (geles de 2-D) y los niveles de fosforilación (“Western blot”) detectados entre las tres condiciones de movilidad de los espermatozoides se midieron por análisis de densitometría utilizando el programa ImageJ®. La **figura 6.18D** muestra los cambios en los niveles de fosforilación de la mancha 1 en las condición donde los espermatozoides están inmóviles, móviles o estimulados con Speract. Con el mismo tipo de análisis se midió la intensidad de la cantidad de proteína (**Figura 6.18E, barras negras**) en el gel 2-D y la intensidad de la fosforilación (**Figura 6.18E, barras grises**) en el “Western blot” de la mancha 1 en las tres condiciones de movilidad. Y aunque se observó una tendencia a aumentar los niveles de fosforilación al activar la movilidad (2.5 veces) o al estimular los espermatozoides con Speract (3 veces), los cambios entre estas condiciones no fueron significativos.

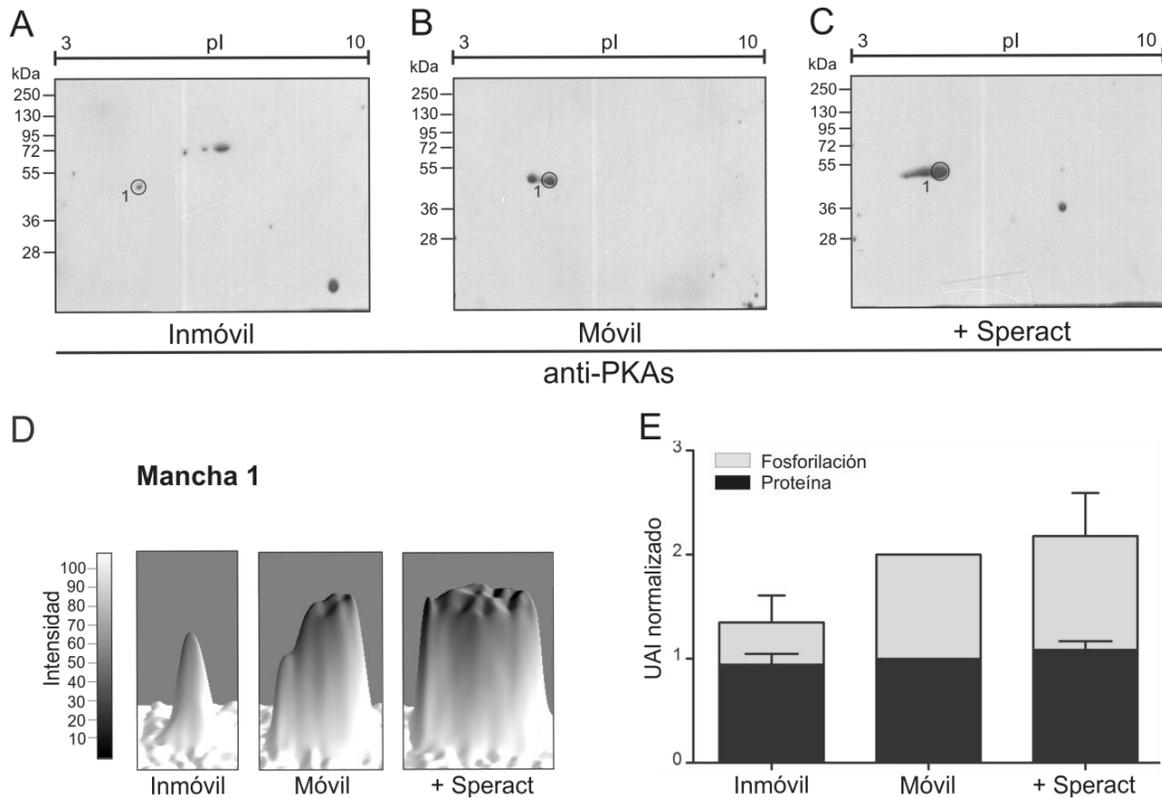


Figura 6.18 Los sustratos de la PKA en las balsas lipídicas modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides.

Western blot de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides inmóviles (A), móviles (B) o estimulados con Speract (C) separadas en geles de dos dimensiones y reveladas por quimioluminiscencia con el anticuerpo que detecta sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs). El círculo con el número 1 muestra la mancha cuyo nivel de fosforilación cambió con la movilidad y cuya cantidad de proteína se observó en los geles teñidos con azul de Coomassie. D) Análisis de densitometría de la mancha 1 de los niveles de fosforilación con el programa ImageJ. E) Grafica de barras que muestra en unidades arbitrarias de intensidad (UAI) de la cantidad de proteína (barra negra) en los geles teñidos con azul de Coomassie (Figura 6.17) y de la intensidad de fosforilación de la mancha 1 cuantificado por densitometría de las diferentes repeticiones. Las barras muestran el promedio \pm E.E. normalizadas con respecto a la condición control. Resultado representativo de 5 experimentos con BL aisladas de espermatozoides de diferentes erizos.

De manera similar, se detectaron los sustratos fosforilados por la PKC en las balsas lipídicas de los espermatozoides inmóviles (A), móviles (B) o estimulados con Speract (C). La **figura 6.19** muestra que existe un patrón de fosforilación diferencial entre las distintas condiciones de movilidad. Aunque se detectaron varios sustratos de la PKC con el anticuerpo anti-PKCs, sólo nos enfocamos en las manchas cuyo nivel de fosforilación se modificó con la activación de la movilidad (mancha 2, 32 kDa;

mancha 3, 55 kDa y mancha 4, 33 kDa) y se detectó en los geles 2-D teñidos con azul de Coomassie (**Figura 6.17**). Como se mencionó previamente, este es un requisito para poder llevar a cabo la identificación a nivel molecular de las proteínas. Como en el caso de los sustratos de la PKA, a las tres manchas reveladas con anti-PKCs se les hizo el análisis de intensidad de los cambios en la cantidad de proteína y en la fosforilación. La mancha 2, muestra una disminución (0.4 veces) del nivel de fosforilación al activar la movilidad de los espermatozoides, mientras que se observó un aumento significativo (0.8 veces) cuando los espermatozoides móviles se estimularon con Speract (**Figura 6.19D**). El análisis densitométrico de la mancha 3 (**Figura 6.19E**) no mostró cambios significativos en la fosforilación por la PKC al activar la movilidad ni al estimular los espermatozoides con Speract (0.2 veces). Finalmente, en la mancha 4 (**Figura 6.19F**) se observó una disminución no significativa (0.3 veces) de la fosforilación por la PKC al activar la movilidad. Por el contrario, cuando los espermatozoides móviles se estimularon con Speract, se observó un aumento significativo (2.3 veces) en la fosforilación de la mancha 4. Estos resultados sugieren que las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar contienen proteínas reguladas por la PKA y/o la PKC que participan en la regulación de la movilidad.

Al igual que en los experimentos mostrados en los geles de una dimensión (**Figura 6.15 y 6.16**) con las balsas lipídicas de los espermatozoides en las tres condiciones de movilidad, en este caso también se observó un mayor número de sustratos de la PKC (**Figura 6.19**) que de sustratos de la PKA (**Figura 6.18**). Estos resultados confirman que en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar, la regulación de las proteínas que participan en la movilidad por la PKC, es más importante que la regulación por la PKA. Contrario a lo que se reportó previamente para la activación de la movilidad o la estimulación con Speract donde se aumentan la fosforilación por la PKA (Bracho et al., 1998; Murofushi et al., 1986; Su et al., 2005). Aunque el aumento en la fosforilación de las proteínas por la PKA en las balsas lipídicas no fue significativo, sí se ve una tendencia clara. Al parecer un aumento en la fosforilación de los sustratos de la PKC se relaciona con la estimulación de los

espermatozoides con Speract; ya que en las tres manchas detectadas con anti-PKCs que seleccionamos, observamos ese efecto (**Figura 6.19**).

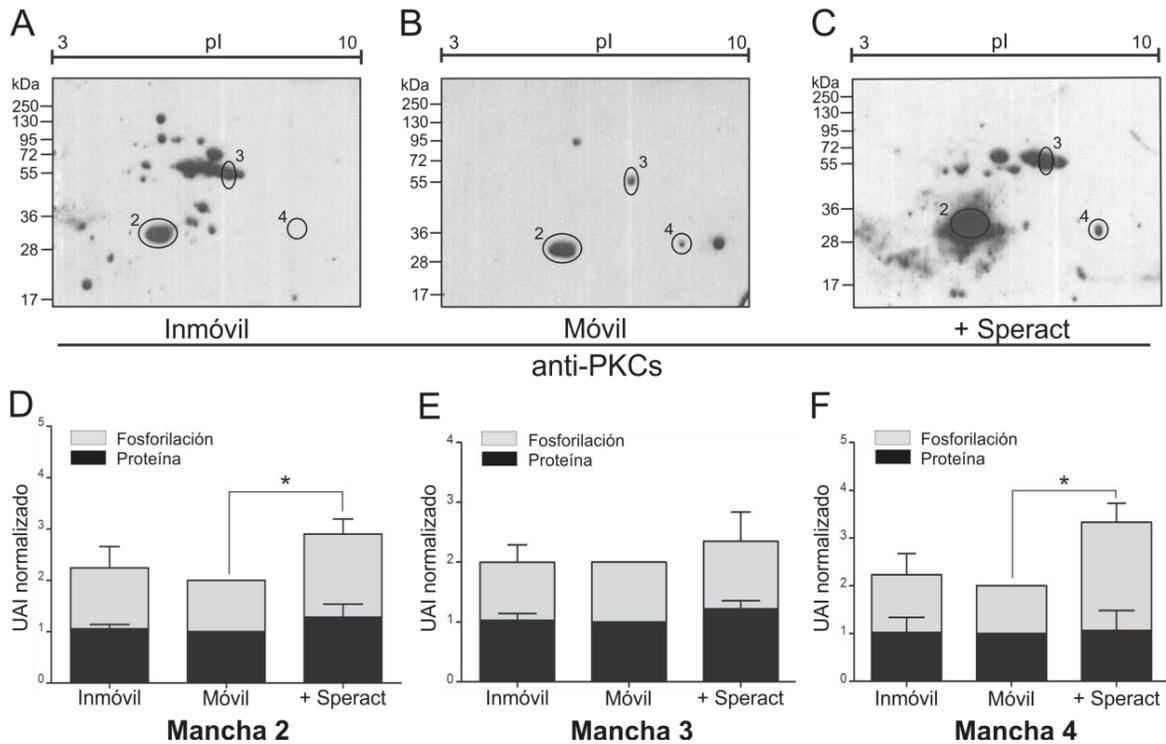


Figura 6.19 Sustratos fosforilados por la PKC en las balsas lipídicas modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides.

Western blot de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides inmóviles (**A**), móviles (**B**) o estimulados con Speract (**C**) separadas en geles 2-D y reveladas por quimioluminiscencia con el anticuerpo que detecta sustratos fosforilados por la PKC (anti-PKCs). Los círculos con los números 2, 3 y 4 muestran las manchas cuyo nivel de fosforilación cambió con la movilidad y cuya cantidad de proteína se observó en los geles teñidos con azul de Coomassie. **D-F**) Grafica de barras que muestra en unidades arbitrarias de intensidad (UAI) la cantidad de proteína (barra negra) en los geles teñidos con azul de Coomassie (Figura 6.17) y la intensidad de fosforilación de las manchas 2, 3 y 4 cuantificado por densitometría de las diferentes repeticiones con el programa ImageJ. Las barras muestran el promedio \pm E.E. normalizadas con respecto a la condición control. Resultado representativo de cinco experimentos con BL aisladas de espermatozoides de diferentes erizos.

6.10 Identificación por espectrometría de masas (LS-MS/MS) de los sustratos de la PKA o de la PKC asociados a la movilidad en los espermatozoides de erizo de mar

Para identificar las proteínas fosforiladas por la PKA detectadas con los anticuerpos anti-PKAs (mancha 1, **Figura 6.18**) o por la PKC, detectadas con anti-

PKCs (manchas 2, 3 y 4, **Figura 6.19**); las manchas se cortaron de los geles correspondientes 2-D teñidos con azul de Coomassie (**Figura 6.17**) y se enviaron a secuenciar por LC-MS/MS al “Institut de Recherches Cliniques” de Montreal, Canadá. De las cuatro manchas, se identificaron un total de 21 proteínas con un nivel alto de confianza (**Tabla 6.1**). Las proteínas se clasificaron de acuerdo a su localización en las células, considerando la ontología genética (Gene Ontology, GO) en la base de datos de “Uniprot-KB” en: de mitocondria (66%), de axonema (10%), de citoesqueleto (10%), de citoplasma (10%) o de la membrana plasmática (4%) (**Figura 6.20**). Es importante resaltar que el mayor número de proteínas identificadas por LC-MS/MS en las balsas lipídicas de los espermatozoides fueron proteínas mitocondriales. Este es el primer trabajo donde se identifican proteínas mitocondriales como sustratos de la PKA o de la PKC cuyo estado de fosforilación cambia con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

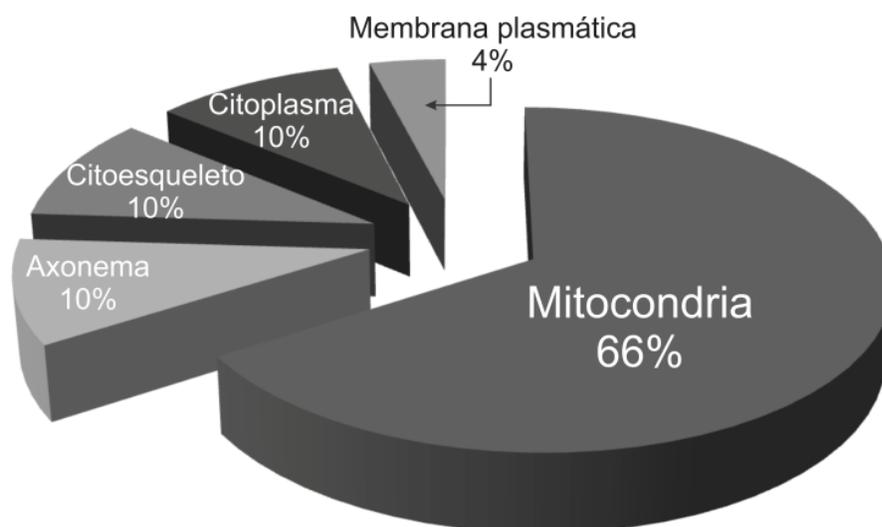


Figura 6.20 Localización subcelular de las proteínas fosforiladas por la PKA o por la PKC, identificadas en las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar.

Se identificaron un total de 21 proteínas en las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* por espectrometría de masas (LC-MS/MS), localizadas en la mitocondria (66%), el axonema (10%), el citoesqueleto (10%), el citoplasma (10%) y la membrana plasmática (4%) de las células.

Tabla 6.1 Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las manchas 1-4 de las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar bajo diferentes condiciones de movilidad.

Nombre de la proteína	No. Acceso	NPT	NPU	P. M.	% Cobertura	Fosforilación	Localización	Función
Mancha 1								
Creatina cinasa	gi 72154204	38	18	47	38	0.75 S-188 por PKA*	MM	Síntesis de fosfocreatina
Succinil-CoA ligasa subunidad β	gi 72015065	38	9	49	22	0.69 S-42 por PKA*	MM	Cataliza la ligación de succinato y CoA
Subunidad reguladora tipo II de la PKA	gi 47551027	14	6	42	15	0.84 S-81 por PKA*	Citoplasma	Participa en la señalización del AMPc
Tubulina subunidad β	gi 72065171	11	5	50	12	0.72 S-322 por PKA*	Citoesqueleto	Constituyente estructural
Actina Cy I, citoplásmica	gi 72167348	4	3	42	14	0.8 S-339 por PKA*	Citoplasma	Movilidad celular
Mancha 2								
Malato deshidrogenasa	gi 115651961	147	20	35	76	0.87 S-15 por PKC	MM	Síntesis de oxalacetato + NADH
ATP sintasa subunidad β	gi 184186105	99	20	56	52	0.90 T-344 por PKC	MIM	Fosforilación oxidativa
Similar a proteína acarreadora ADP, ATP	gi 115647170	28	19	33	55	0.84 S-245 por PKC	MIM	Transporte
NADH deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2	gi 72007636	107	16	27	66	0.83 T-22 por PKC*	MIM	Cadena respiratoria
Proteína 9 de la cabeza de espiga radial, homóloga	gi 115733045	33	12	31	49	0.84 T-266 por PKC	Axonema	Componente del axonema
Subunidad 5α de flavoproteína de transferencia de electrones	gi 115699035	32	11	35	38	0.81 S-17 por PKC	MM	Cadena respiratoria
Apolipoproteína similar-O isoforma 2	gi 115767124	35	8	27	30	0.81 S-107 por PKC	MIM	Secreción
Tubulina subunidad β	gi 72065171	37	15	50	37	0.81 T-374 por PKC*	Citoesqueleto	Constituyente estructural
Tubulina subunidad α2	gi 115896494	43	17	50	43	0.84 S-241 por PKC	Citoesqueleto	Constituyente estructural
Mancha 3								
ATP sintasa subunidad α	gi 47551121	1431	70	60	69	0.79 T-253 por PKC*	MIM	Fosforilación oxidativa
Flavoproteína NADH-ubiquinona oxidoreductasa 1	gi 115647097	143	30	51	60	0.81 T-28 por PKC	MIM	Fosforilación oxidativa
ENSANGP00000009431	gi 72141215	60	24	47	48	0.91 T-231 por PKC	MP	Andamiaje en la membrana
Creatina cinasa	gi 72154204	65	24	47	65	0.90 S-310 por PKC	MM	Síntesis de fosfocreatina
Mancha 4								
ATP sintasa subunidad γ	gi 72005324	565	39	30	92	0.91 T-247 por PKC	MIM	Fosforilación oxidativa
VDAC-2	gi 72005582	36	11	30	46	0.91 T-107 por PKC*	MEM	Transporte de iones
ENSANGP00000009431	gi 72141215	43	23	47	46	0.91 T-231 por PKC	MP	Andamiaje en la membrana
Proteína de fibras densas externas; isoforma 2	gi 72130183	30	14	27	71	0.75 T-72 por PKC	Axonema	Componente del flagelo
Succinato deshidrogenasa [ubiquinona] subunidad Fe-S	gi 72145768	23	11	32	32	0.93 S-121 por PKC	MIM	Fosforilación oxidativa
Proteína homóloga "Parkin coregulated gene"	gi 72020894	6	6	27	26	0.86 T-178 por PKC	MIM	Facilita la degradación de proteínas

NPT, número de péptidos totales de tres diferentes experimentos; NPU, número de péptidos únicos exclusivos de tres diferentes experimentos; P.M., peso molecular; % Cobertura, porcentaje de cobertura de la proteína con los péptidos identificados. Fosforilación, muestra el análisis con el programa NetPhos-K, indicando el nivel de fosforilación (siendo 1 el máximo) del número de aminoácido y la masa que lo fosforila (PKA o PKC); *, indica las proteínas que contienen el epítopo que reconocen los anticuerpos utilizados; Localización, indica la localización en las células de esa proteína (MIM, membrana interna mitocondrial; MEM, membrana externa mitocondrial; MP, matriz mitocondrial; MIP, membrana plasmática; citoplasma, citoesqueleto o axonema. En las manchas 3 y 4, la proteína ENSANGP00000009431, es una proteína similar a la follina-2 al hacer un análisis de BLAST. Esta tabla muestra el resumen de las proteínas identificadas que coincidieron en tres repeticiones con balsas lipídicas aisladas de diferentes espermatozoides de erizo de mar.

Para encontrar las posibles serinas (para PKC) o treoninas (para PKA o PKC) que se fosforilan en asociación con los cambios en la movilidad de los espermatozoides, en las secuencias de las proteínas identificadas por LC-MS/MS, se hizo un análisis con el programa NetPhos-K. Además, manualmente se buscó en las secuencias de las mismas proteínas identificadas el epítipo que reconoce el anticuerpo anti-PKAs (RXXT* ó RRXS*, X es cualquier aminoácido) en la mancha 1 (**Figura 6.18**) ó el anti-PKCs ((R/K)XS*(Hidr)(R/K); R, arginina; K, lisina; Hidr, aminoácido hidrofóbico (A, L, I, V, F, P, W, M)) en las manchas 2, 3 y 4 (**Figura 6.19**). En la **Tabla 6.2** se muestra un total de nueve sustratos que modificaron su estado de fosforilación por la PKA ó por la PKC con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar. En la mancha 1, cinco son sustratos de la PKA y en las manchas 2, 3 y 4 se detectaron dos, uno y uno sustratos de la PKC respectivamente. La **figura 6.21** ilustra la localización de estos sustratos de la PKA o de la PKC en los espermatozoides del erizo de mar.

Tabla 6.2 Sustratos de la PKA o de la PKC asociados a las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar que cambiaron su nivel de fosforilación con la movilidad e identificadas por LC-MS/MS.

Nombre de proteína	No. Acceso	NPT	NPU	Fosforilación
Mancha 1 Sustrato fosforilado por la PKA				
* Creatina cinasa	gi 72154204	22	12	0.75 S-188 por PKA
* Subunidad β de la succinil-CoA ligasa	gi 72015065	20	8	0.69 S-42 por PKA
* Subunidad regulatoria tipo II de la PKA	gi 47551027	14	6	0.84 S-81 por PKA
* Subunidad β de la tubulina	gi 72065171	11	5	0.72 S-322 por PKA
* Actina Cy I, citoplásmica	gi 72167348	4	3	0.8 S-339 por PKA
Mancha 2 Sustrato fosforilado por la PKC				
* NADH deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2	gi 72007636	100	15	0.83 T-22 por PKC
* Subunidad β de la tubulina	gi 72065171	37	15	0.81 T-374 por PKC
Mancha 3 Sustrato fosforilado por la PKC				
* Subunidad α de la ATP sintasa	gi 47551121	1360	64	0.79 T-253 por PKC
Mancha 4 Sustrato fosforilado por la PKC				
* VDAC-2	gi 72005582	34	12	0.91 T-107 por PKC

No. Acceso en la base de datos del NCBI; NPT, Número de Péptidos Totales y NPU, Número de Péptidos Únicos Exclusivos de tres experimentos. Fosforilación, análisis de fosforilación con el programa NetPhos-K indicando el valor de fosforilación (siento 1 el máximo) y el aminoácido (serina, S ó treonina, T) fosforilado por la PKA ó la PKC.

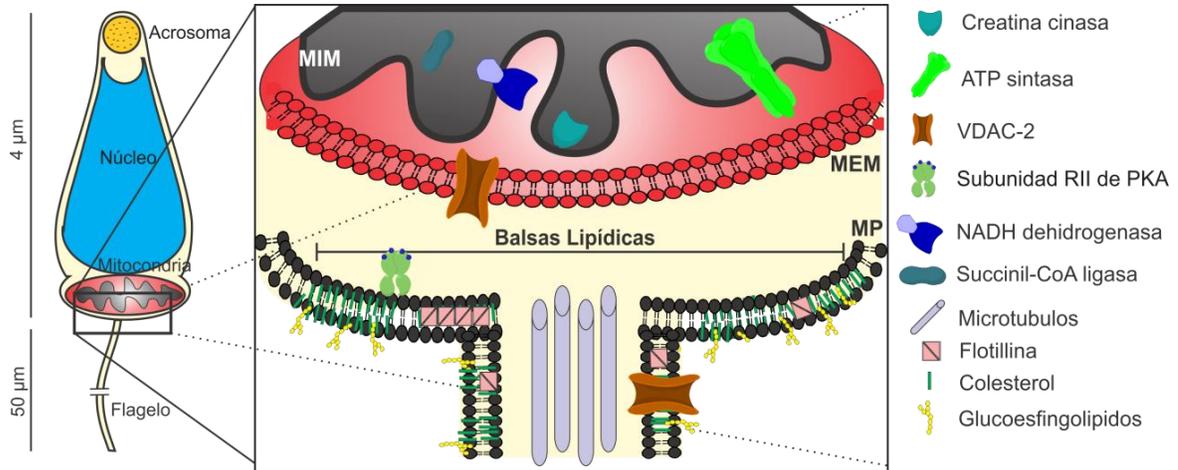


Figura 6.21 Esquema de la localización en el espermatozoide de erizo de mar de algunas proteínas identificadas en sus balsas lipídicas.

El dibujo muestra la ampliación de un segmento de la cabeza del espermatozoide que incluye parte de la mitocondria y el flagelo. En la ampliación se muestra la membrana interna mitocondrial (MIM), la membrana externa mitocondrial (MEM), la membrana plasmática (MP) y las balsas lipídicas (segmentos enriquecidos en esfingolípidos y colesterol) con diferentes proteínas identificadas por espectrometría de masas en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.

Uno de los sustratos de la PKA identificado en la mancha 1 fue la creatina cinasa (CC). Esta proteína participa en el metabolismo energético del espermatozoide catalizando la reacción reversible de transferencia de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP para generar ATP (Wallimann & Hemmer, 1994), necesario para mantener la actividad de las dineinas del flagelo y por ende la movilidad de los espermatozoides (Dorsten, Wyss, Wallimann & Nicolay, 1997). Aunque la CC es una enzima clave en la generación de energía para el espermatozoide, no está bien establecida la relación entre la concentración de ATP ([ATP]) y la fecundación en los espermatozoides de humano (Vigue, Vigue & Huszar, 1992). Sin embargo, está reportado que la actividad de la CC es alta en muestras de humano con bajo número de espermatozoides (Huszar, Vigue & Corrales, 1988). En el espermatozoide de erizo de mar, se purificaron y caracterizaron dos iso-formas de la CC; una se localizó en el flagelo (CC-F) y la otra en la mitocondria (CC-Mi) (Tombes & Shapiro, 1987). Aunque en este trabajo identificamos a la CC-Mi que co-purificó con las balsas lipídicas de los

espermatozoides de erizo de mar, no hay reportes de la presencia de esta cinasa en las balsas lipídicas de otros tipos celulares.

Otras proteínas mitocondriales que se identificaron como sustratos de la PKA (mancha 1) o sustratos de la PKC (mancha 2) son la Succinil CoA ligasa y la NADH deshidrogenasa respectivamente. Estas enzimas forman parte de los complejos I y II respectivamente, de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual es muy importante para la movilidad de los espermatozoides (Ruiz-Pesini et al., 1998). Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado anteriormente en las balsas lipídicas aisladas de diferentes células y órganos de mamíferos, donde se identificaron diferentes subunidades de los complejos I y II mitocondriales (Bae et al., 2004; Kim et al., 2006). Además se sabe que la actividad del complejo I se regulan por fosforilación de algunas de sus subunidades (revisado en (Janssen, Nijtmans, Van den Heuvel & Smeitink, 2006)). Finalmente, la otra proteína mitocondrial identificada en las balsas lipídicas de los espermatozoides como un sustrato de la PKC cuyo estado de fosforilación cambió con la movilidad, es el canal aniónico dependiente de voltaje 2 (VDAC-2). El VDAC-2 es una porina encontrada principalmente en la membrana externa de la mitocondria (Mannella & Colombini, 1984). Además, diferentes isoformas de VDAC se han identificado en células de Sertoli y de Leyding, en espermátocitos, en espermátidas, en las fibras densas externas del flagelo (Hinsch et al., 2004) y en la cabeza de espermatozoides maduros de bovinos (Triphan et al., 2008). En los espermatozoides de humano se identificaron las 3 isoformas del VDAC en el flagelo, las cuales son esenciales tanto para una estructura como para una movilidad normal (Liu, Zhang & Wang, 2010), donde VDAC-2 se fosforila en residuos de tirosina durante la capacitación (Ficarro et al., 2003). Se sabe que los ratones nulos de VDAC-3 son infértiles debido a alteraciones en la movilidad de sus espermatozoides (Sampson et al., 2001). Está descrito que el VDAC interactúa con proteínas del citoesqueleto (Guzun et al., 2012), contribuyendo a la integridad del citoesqueleto en el flagelo. Estos resultados sugieren que estas proteínas mitocondriales participan en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar mediante cambios en su estado de fosforilación por PKA o PKC.

Los espermatozoides de erizo de mar tienen solo una gran mitocondria (~1 μm de diámetro) en la base de la cabeza, la cual participa en la mayoría de los procesos importantes para la fecundación; como la movilidad, la reacción acrosomal, la regulación de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ y la producción de ATP (Ardón, Rodríguez-Miranda, Beltrán, Hernández-Cruz & Darszon, 2009; Schackmann & Chock, 1986). Estos reportes junto con nuestros resultados sugieren la participación de la mitocondria en la fisiología del espermatozoide en general y en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar en particular. La vía de señalización completa de $\text{CO}_2\text{-HCO}_3\text{-sAC-AMPC-PKA}$ dentro de las mitocondrias de células HeLa (Acin-Perez et al., 2009) es otra vía de señalización que soporta la universalidad de la mitocondria y nuestros resultados.

La subunidad regulatoria tipo II de la PKA se identificó como un sustrato de la PKA en las balsas lipídicas de espermatozoides de erizo de mar (**Tabla 6.2**); lo que confirma su presencia en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar (Ohta et al., 2000). Además se sabe que dicha subunidad se identificó en el axonema del flagelo de los espermatozoides de bovino (Vijayaraghavan, Olson, NagDas, Winfrey & Carr, 1997), que su actividad es regulada por fosforilación (Olsen et al., 2010; Rigbolt et al., 2011) y que está presente en balsas lipídicas de adipocitos (Ahmad et al., 2009). Finalmente, nosotros identificamos la actina citoplásmica Cy I y la cadena β de la tubulina como sustratos de la PKA en las balsas lipídicas que cambian su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides. Estas proteínas son componentes del citoesqueleto, y no es raro que su función se regule por fosforilación en los espermatozoides que son células especializadas en la movilidad.

6.11 Inmunolocalización en el espermatozoide de algunas proteínas secuenciadas de las balsas lipídicas del espermatozoide

Para hacer la validación de la presencia y localización de algunas de las proteínas secuenciadas, se hicieron experimentos de inmunolocalización con anticuerpos primarios específicos para cada proteína y secundarios marcados fluorescentemente. Dado que no hay anticuerpos comerciales contra las proteínas del

espermatozoide de erizo de mar, en este trabajo utilizamos anticuerpos comerciales contra proteínas de mamífero cuyo epítotope tiene una identidad mayor al 70% con la secuencia de las proteínas en el erizo de mar. Para esto, se hizo una búsqueda exhaustiva de anticuerpos comerciales y análisis de BLAST del epítotope en el genoma de erizo de mar *S. purpuratus* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=7668& build=2.1); y sólo se utilizaron los que cumplieron con dicho valor (70%) de identidad.

La **figura 6.22** muestra que los anticuerpos tanto para la flotilina-2 (proteína marcadora de las balsas lipídicas), como para los sustratos de la PKA y de la PKC tiñen el flagelo, la mitocondria y el acrosoma del espermatozoide, demostrando que las balsas lipídicas y proteínas fosforiladas por la PKA o la PKC se encuentran a lo largo de todo el espermatozoide de erizo de mar. Es importante hacer notar que en el flagelo se puede ver que el patrón de tinción de los sustratos fosforilados por la PKA o por la PKC es más continuo que el de la flotilina 2. Lo anterior confirma que la flotilina 2 se encuentra en balsas lipídicas.

De manera similar se validó la localización por inmunofluorescencia de la ATPasa mitocondrial en los espermatozoides de erizo de mar por Inmunofluorescencia. Para esto utilizamos anticuerpos preparados en conejos contra las subunidades α , β y la proteína inhibidora de la F_1 -ATPasa (IF_1) mitocondrial de corazón de res purificadas y separadas en geles de PA-SDS por la Dra. Carmen Beltrán en el laboratorio de la Dra. M. Tuena de Gómez Puyou en el IFC-UNAM. Como se esperaba, la **figura 6.23** muestra que los anticuerpos que detectan las subunidades α y β de la ATPasa marcaron exclusivamente a la mitocondria que se encuentra en la base de la cabeza de los espermatozoides de erizo de mar. En cambio, el anticuerpo que detecta la IF_1 además de la mitocondria, marcó también el acrosoma y todo el flagelo de los espermatozoides.

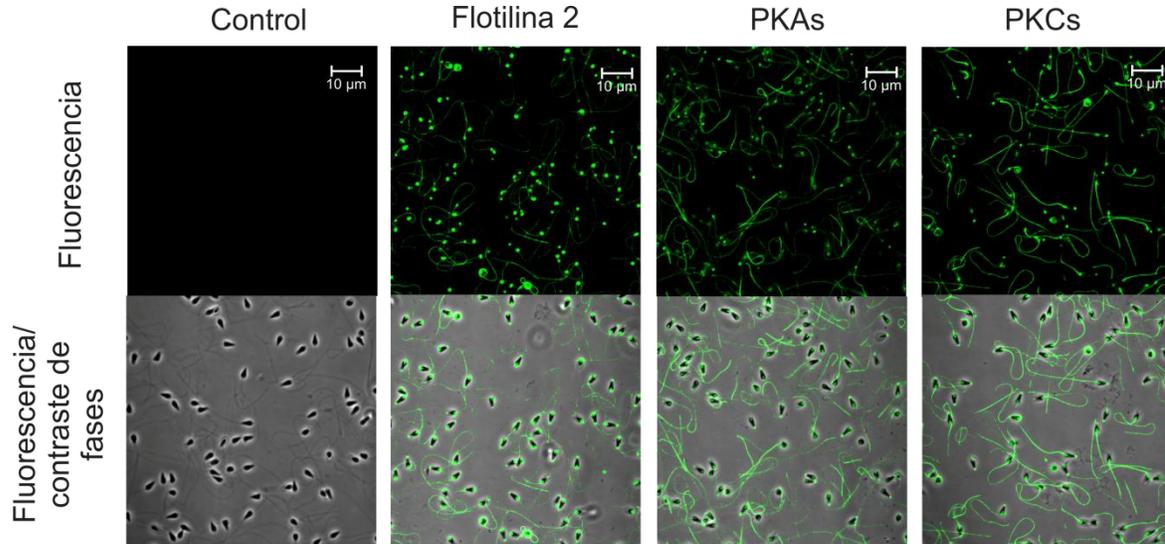


Figura 6.22 Inmunolocalización de la flotilina 2, los sustratos de la PKA y los sustratos de la PKC en los espermatozoides de erizo de mar.

Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de espermatozoides de *S. purpuratus* fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos que detectan la flotilina-2 (proteína marcadora de las balsas lipídicas), los sustratos fosforilados por la PKA (PKAs) o los sustratos fosforilados por la PKC (PKCs) y detectados con un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa. Las imágenes superiores muestran la fluorescencia detectada por microscopía confocal y las inferiores muestran la superposición de la fluorescencia con la imagen de contraste de fases del mismo campo tomadas con un objetivo de 100X. Como control se incubaron los espermatozoides sólo con el anticuerpo secundario en paralelo. Las imágenes son representativas de tres repeticiones con los mismos resultados.

Se sabe que las subunidades α , β y δ de la F_1 -ATPasa regulan su actividad por fosforilación en diferentes tipos celulares (Højlund et al., 2003; Struglics, Fredlund, Møller & Allen, 1998; Subota, Arziev, Nevinsky, & Konstantinov, 2011). Además, las subunidades del complejo F_1F_0 -ATPasa mitocondrial se han encontrado en balsas lipídicas aisladas por diferentes métodos (Bae et al., 2004; Kim et al., 2006). Como mencionamos anteriormente nuestros resultados muestran que las subunidades α y β de la F_1 -ATPasa se localiza solo en la mitocondria de los espermatozoides como se esperaba. Dado que está descrito que las balsas lipídicas no tienen proteínas mitocondriales, y que las mitocondrias no tienen balsas lipídicas ya que carecen de colesterol (Zheng, Berg & Foster, 2009); nuestro hallazgo apoya la propuesta de que la subunidad α identificada como un sustrato de la PKC (**Tabla 6.2**) en las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides de erizo de mar, co-purificó

con dichos microdominios. Aunque nos sorprendió detectar a la IF₁ en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, que no contiene mitocondrias, está reportado que también se encuentra en la membrana plasmática de células endoteliales (Cortés-Hernández et al., 2005), lo cual apoya nuestro resultado.

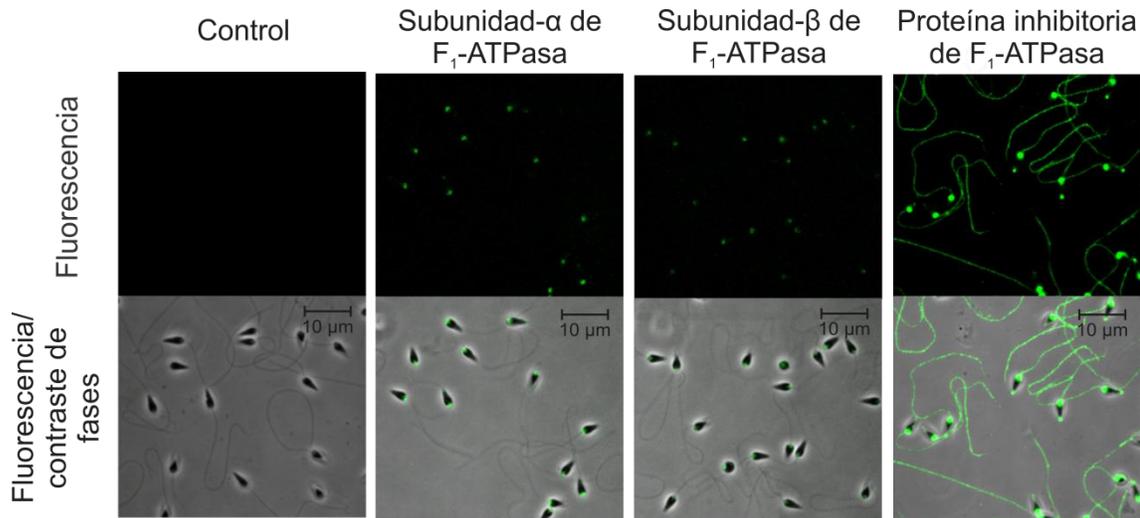


Figura 6.23 Inmunolocalización de las subunidades α , β y de la proteína inhibitoria (PI) de la F₁-ATPasa mitocondrial identificadas en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.

Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de espermatozoides de *S. purpuratus* fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos que detectan la subunidad alfa (α), la beta (β) o la proteína inhibitoria (PI) de la F₁-ATPasa y detectados con un anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo Alexa. Las imágenes superiores muestran la fluorescencia y las inferiores muestran la sobre-posición de la fluorescencia con la imagen de contraste de fases del mismo campo tomadas con un objetivo de 100X. Como control se incubaron los espermatozoides sólo con el anticuerpo secundario en paralelo. Las imágenes son representativas de tres repeticiones con los mismos resultados.

De manera similar, se hizo la inmunolocalización del VDAC-2, otra de las proteínas en las balsas lipídicas identificada como sustrato de la PKC que cambió su grado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar (Tabla 6.2). La figura 6.24 muestra la inmunolocalización de VDAC-2 utilizando un anticuerpo comercial hecho contra la proteína de mamífero (Abcam, Cat. ab34726). En la imagen se observa fluorescencia tanto en la mitocondria, como en el flagelo con un patrón de fluorescencia punteado característico de proteínas en las balsas

lipídicas. Esta localización del VDAC-2 está de acuerdo con lo reportado en espermatozoides de otras especies (Hinsch et al., 2004; Sampson et al., 2001; Triphan et al., 2008).

Durante el desarrollo de este trabajo, se mandaron a secuenciar 3 veces las manchas detectadas con anti-PKAs o con anti-PKCs en los WB de los geles 2-D en los cuales se separaron las proteínas en las balsas lipídicas aisladas de los espermatozoides en diferentes condiciones de movilidad y cuyo patrón de fosforilación cambió con la movilidad. De dichos experimentos sólo en una ocasión se identificó a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa como un sustrato de la PKC. Debido a lo anterior y a que la *Dra. Liora Shoshani* del CINVESTAV-Zacatenco en México, D.F. nos donó alícuotas de varios anticuerpos contra las dos subunidades (α y β) de la Na^+/K^+ -ATPasa de mamífero; se hizo la inmunolocalización para dicha bomba en los espermatozoides de erizo de mar. De los anticuerpos donados, sólo el ab7671 de “Abcam” dirigido contra la subunidad α inmunodetó en el espermatozoide de erizo de mar. Para nuestra sorpresa **figura 6.24** muestra que la Na^+/K^+ -ATPasa se localizó sólo en el área del acrosoma así como en la mitocondria. Hay reportes de actividad de esta bomba en la membrana plasmática de los espermatozoides de erizo de mar (Gatti & Christen, 1985), sin embargo en ninguna ocasión observamos fluorescencia en el flagelo.

6.12 Los flagelos aislados responden al Speract.

Como se mostró previamente, mediante proteómica de las balsas lipídicas de los espermatozoides completos, se identificaron a nivel molecular diferentes proteínas mitocondriales. Dichas proteínas posiblemente co-purificaron con las balsas lipídicas debido al protocolo utilizado para el aislamiento (Yuan et al., 2002). Además, creemos que debido al tamaño tan pequeño de los espermatozoides (55 x 4 μm) y la cercanía entre su única gran mitocondria (que ocupa prácticamente la base de la cabeza del espermatozoide) y la membrana plasmática (Longo & Anderson, 1969); al lisar las células completas se forman vesículas de membrana mitocondrial que migran a la misma densidad que las balsas lipídicas. Este evento de co-

purificación de proteínas mitocondriales en las balsas lipídicas se ha reportado en células HeLa y 3T3 (Bae et al., 2004; Bini et al., 2003; Zheng et al., 2009). Además está reportado que el receptor del Speract se encuentra en la membrana plasmática del flagelo de los espermatozoides de erizo de mar (Cardullo, Herrick, Peterson & Dangott, 1994). Debido a lo anterior y para descartar la contaminación de las proteínas mitocondriales, decidimos obtener las balsas lipídicas de los flagelos aislados de los espermatozoides de erizos de mar inmóviles, móviles o estimulados con Speract. Se sabe que los flagelos aislados de espermatozoides resuspendidos en AMA carente de Na^+ (0Na^+) pH 7.9 responden al Speract (Galindo et al., 2005; Lee, 1984), sin embargo necesitábamos saber si en las condiciones que nosotros utilizamos para separar los flagelos son funcionales (en AMA1Ca pH7).

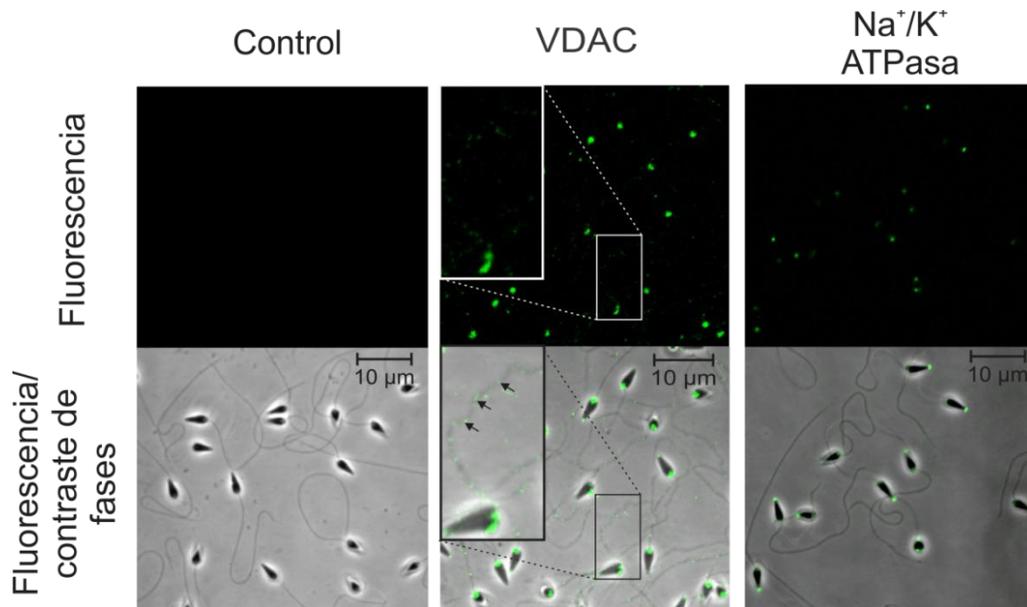


Figura 6.24 Inmunolocalización del VDAC y la Na^+/K^+ -ATPasa identificada en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar.

Imágenes representativas de fluorescencia por microscopía confocal de espermatozoides de *S. purpuratus* fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos que detectan el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) o a la sodio/potasio ATPasa (Na^+/K^+ -ATPasa), y detectados con un anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo Alexa. Las imágenes superiores muestran la fluorescencia y las inferiores la sobre-posición de la fluorescencia con la imagen de contraste de fases del mismo campo tomadas con un objetivo de 100X. Como control se incubaron los espermatozoides sólo con el anticuerpo secundario en paralelo. Las imágenes son representativas de tres repeticiones con los mismos resultados.

Cuando el Speract se une a su receptor que se encuentra en el flagelo de los espermatozoides (Cardullo et al., 1994), una de las primeras respuestas es la apertura de un canal de potasio (tetra-KCNG) cuya apertura hiperpolariza la membrana plasmática del espermatozoide (Galindo et al., 2007). La **figura 6.25** muestra que los flagelos aislados de espermatozoides de erizo de mar responden al Speract. La misma **figura 6.25A**, muestra dos trazos representativos de la hiperpolarización (en mV) de la membrana plasmática de los flagelos aislados producida por Speract 10 nM (trazo verde) ó por Speract 100 nM (trazo naranja). Como se puede observar (**Figura 6.25B**), tanto 10 nM (~40 mV) como 100 nM (~50 mV) de Speract hiperpolarizan la membrana plasmática del flagelo, sin que se vea una diferencia significativa entre las dos concentraciones del péptido probadas. Con este resultado decidimos utilizar la concentración de 10 nM de Speract para los siguientes experimentos.

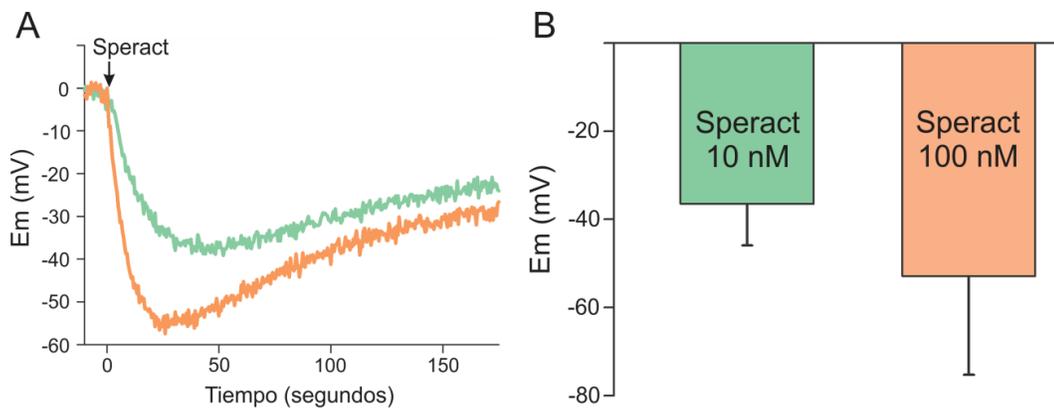


Figura 6.25 El Speract hiperpolariza la membrana plasmática de los flagelos aislados de los espermatozoides de erizo de mar.

Se determinó el potencial de membrana (E_m) en los flagelos aislados de los espermatozoides como se describe en “materiales y métodos”. (A) Son los trazos representativos de la hiperpolarización de la membrana de los flagelos aislados inducida por Speract 10 o 100 nM. La adición del Speract se hizo al tiempo cero. (B) Grafica de barras que resume los resultados obtenidos en el experimento (A) donde las barras representan los promedios de los cambios en el E_m inducidos por el Speract \pm E.E. de 6 preparaciones de flagelos de diferentes erizos por triplicado.

Está descrito que un aumento de la concentración extracelular de potasio ($[K^+]_e$, KCl) a 40 mM (considerando que el AMA contiene sólo 10 mM de KCl), bloquea la hiperpolarización de la membrana de los espermatozoides inducida por el Speract,

así como los eventos subsecuentes en la cascada de señalización (Cook & Babcock, 1993). La **figura 6.26** muestra que una $[K^+]_e$ de 40 mM en el AMA bloquea la hiperpolarización de la membrana producida por el Speract tanto 10 como 100 nM; indicando que la disminución en el potencial de membrana es real y no es debida a un artefacto de la adición del Speract. En la **figura 6.26A**, se muestra un trazo representativo del cambio en el potencial de membrana (E_m) de los flagelos aislados de los espermatozoides y en el inciso **B**), las gráficas de barras con los promedios \pm E.E. de cada condición. Lo anterior corrobora que los flagelos aislados de los espermatozoides son funcionales, y capaces de responder a diferentes condiciones iónicas correspondientes a diferentes grados de movilidad en la célula intacta. Por lo tanto, es posible aislar balsas lipídicas a partir de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad e identificar en ellas los sustratos de la PKA y/o de la PKC.

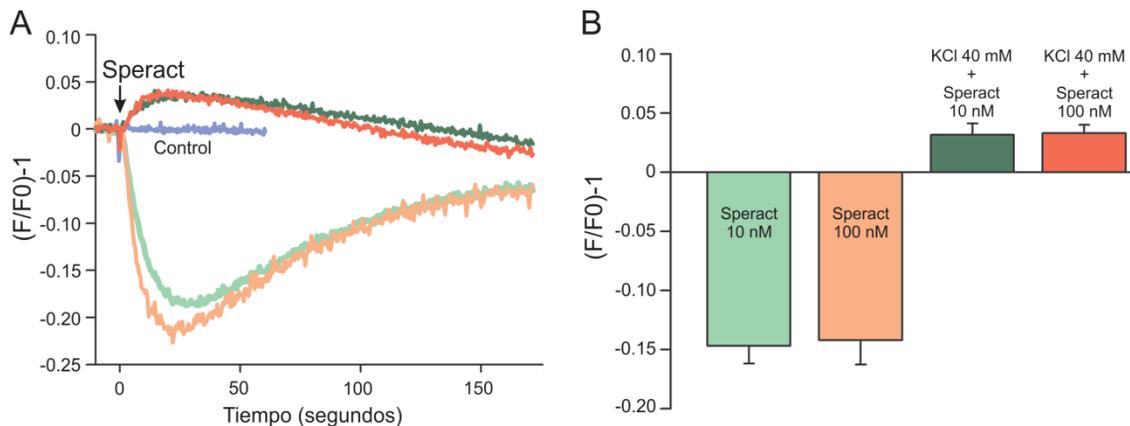


Figura 6.26 La hiperpolarización inducida por el Speract en flagelos aislados se bloquea por una concentración alta de potasio.

Se determinó el potencial de membrana en los flagelos aislados de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*. **A)** Trazos representativos de la hiperpolarización de la membrana plasmática de los flagelos aislados inducida por el Speract 10 nM (trazo pistache) y 100 nM (trazo salmón), la cual se bloquea con una concentración extracelular de 40 mM de cloruro de potasio (KCl) (trazos verde y rojo respectivamente). El trazo control es la adición del mismo volumen de disolvente del Speract (agua, trazo azul). La adición del Speract se hizo al tiempo cero. **B)** Gráfica que muestra el promedio \pm E.E. de los valores obtenidos de experimentos como en A). Las barras muestran los cambios en el potencial de membrana representados por valores de fluorescencia normalizados a 1 $((F/F_0)-1)$ inducidos por el Speract (10 y 100 nM) y bloqueados por el KCl de cuatro preparaciones de flagelos de diferentes erizos y los trazos se hicieron por triplicado.

6.13 Identificación de sustratos de la PKA y de la PKC en las balsas lipídicas de los flagelos aislados de espermatozoides

Dado que como mencionamos en la sección anterior 6.12, el receptor del Speract se encuentra en el flagelo del espermatozoide y que los flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad son funcionales porque responden al Speract. Decidimos purificar las balsas lipídicas a partir de los flagelos para identificar en dichas balsas los sustratos de la PKA y/o de la PKC. Lo anterior con la idea de evitar la co-purificación de proteínas mitocondriales con las balsas lipídicas, ya que como recordaremos, la mitocondria está en la cabeza del espermatozoide de erizo de mar.

La **figura 6.27** muestra el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en las balsas lipídicas de los flagelos expuestos a condiciones de inmovilidad, móviles o estimulados con Speract, separadas en geles de dos dimensiones (2-D). En este caso, se partió de 400 µg de proteína de las balsas aisladas; dicha cantidad de proteína corresponde a cuatro veces la cantidad de proteína de balsas lipídicas de espermatozoides completos utilizada para los geles 2-D. Debido a que con menos cantidad de proteína no se logró detectar ningún sustrato de la PKA ni de la PKC. Como podemos ver (**Figura 6.27**) al igual que en las balsas lipídicas obtenidas a partir de los espermatozoides completos, las de los flagelos aislados también presentan un cambio en el patrón electroforético con la movilidad. Sugiriendo que proteínas que se encuentran en las balsas lipídicas de los flagelos aislados modifican su localización con cambios en la movilidad de los espermatozoides.

Las proteínas de las balsas lipídicas de los flagelos aislados separadas en los geles 2-D, se transfirieron a membranas de PVDF y se hizo un “Western blot” contra los sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs). La **figura 6.28** muestra que cambios en la movilidad de los espermatozoides, modifica el grado de fosforilación de los sustratos de la PKA en las balsas lipídicas obtenidas a partir de flagelos aislados. En este caso se detectaron 16 manchas con el anticuerpo anti-PKAs entre las tres condiciones de movilidad, mismas que se cortaron del gel teñido con plata y se

enviaron a secuenciar por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Las proteínas identificadas en cada mancha se muestran en la **Tabla 6.3**, indicando el número de acceso NCBI de la proteína, el número total (NPT) y único (NPU) de péptidos identificados, el análisis de fosforilación con el programa NetPhos-K y el cambio en su nivel de fosforilación entre las tres condiciones de movilidad. La mayoría de las manchas que se detectaron en el “Western blot” contra sustratos de la PKA se fosforilaron en una sola condición de movilidad, es decir que no mostró cambios entre ellas; con excepción de las manchas 1, 2, 3, 8 y 11.

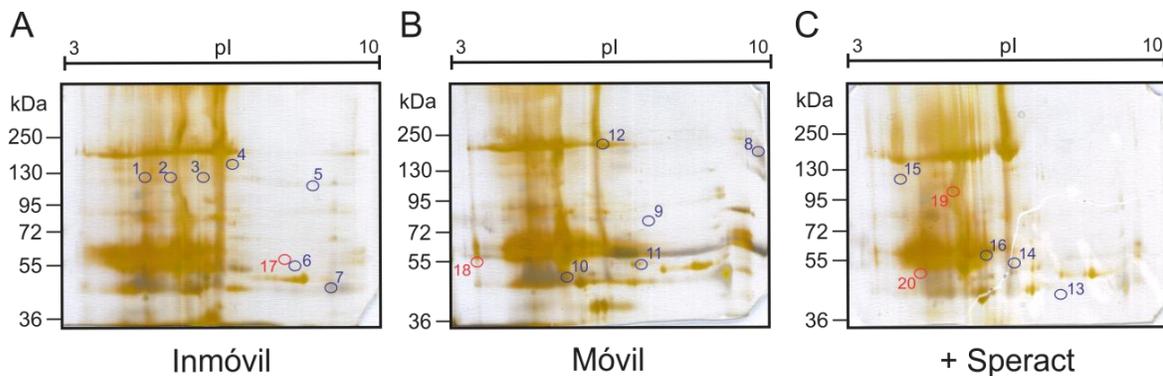


Figura 6.27 El patrón electroforético de proteínas asociadas a las balsas lipídicas de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad cambia.

Las proteínas (400 µg) de las balsas lipídicas de los flagelos aislados expuestos a condiciones de inmovilidad, móviles o estimulados con Speract 10 nM, se separaron primero por su pI (IEF pH 3-10, primera dimensión) y posteriormente por su peso molecular (geles de PA-SDS al 10%). Finalmente los geles se tiñeron con plata (Dodecan Silver Stain Kit de BioRad). En círculos numerados se identifican las manchas que se detectaron con los anticuerpos contra sustratos de la PKA (azul) y sustratos de la PKC (rojos) que se cortaron y enviaron a secuenciar por LC-MS/MS. n = 2

La mancha 1, se detectó en las balsas provenientes de flagelos inmóviles y móviles con un nivel similar de fosforilación, el cual aumentó cuando los flagelos se estimularon con Speract. La mancha 2, se detectó en la condición inmóvil con alto grado de fosforilación, disminuyendo al activar la movilidad y disminuyendo aun más en la condición donde los flagelos se estimularon con Speract. La mancha 3, se detectó en la condición de los espermatozoides inmóviles, su nivel de fosforilación disminuyó considerablemente al activarse la movilidad, y su fosforilación se perdió cuando los

flagelos se estimularon con Speract. La mancha 8, se fosforiló al activar la movilidad de los espermatozoides, pero disminuyó su nivel de fosforilación al estimularlos con Speract. Finalmente, la mancha 11 se detectó en la condición inmóvil y móvil con un grado de fosforilación bajo y similar, el cual desapareció al estimular con Speract.

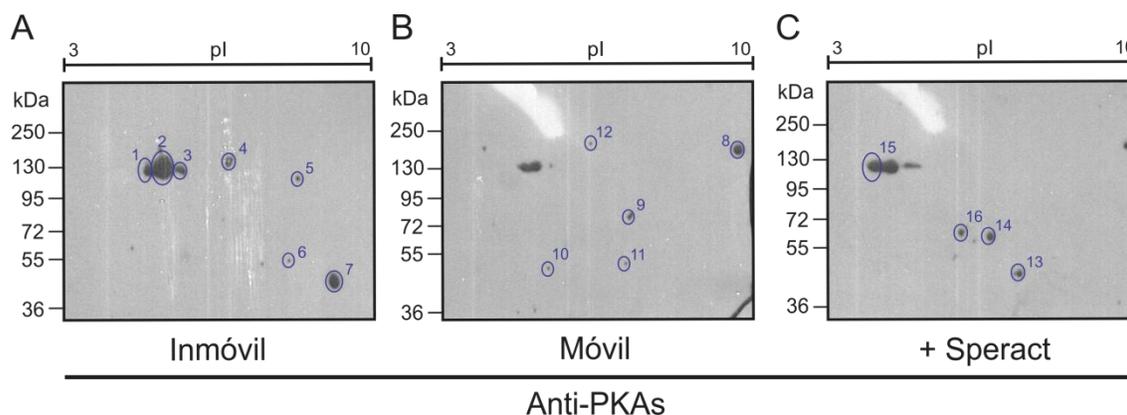


Figura 6.28 El patrón de fosforilación de los sustratos de la PKA en las balsas lipídicas de flagelos aislados se modifica con la movilidad.

Las proteínas (400 μg) de las balsas lipídicas de los flagelos aislados expuestas a condiciones de inmovilidad, móviles o estimulados con Speract 10 nM, se separaron en geles de 2-D, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo contra sustratos fosforilados por la PKA (anti-PKAs). Las manchas detectadas con el anticuerpo se marcaron en círculos azules numerados, y se enviaron a secuenciar. n = 2.

Al mismo tiempo se hizo el Western blot para detectar los sustratos fosforilados por la PKC (anti-PKCs) en las balsas lipídicas de los flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad. La **figura 6.29** muestra que existen pocos sustratos de la PKC en las balsas lipídicas de los flagelos aislados que modifican su estado de fosforilación con la movilidad. En este experimento sólo se pudieron seleccionar 4 manchas del gel de 2-D teñido con plata, las cuales se detectaron por WB en las tres condiciones de movilidad con el anticuerpo anti-PKCs para enviar a secuenciar por LC-MS/MS. Las proteínas secuenciadas en cada una de las cuatro manchas detectadas con el anticuerpo anti-PKCs se muestran en la **Tabla 6.3** con sus respectivos datos de secuenciación y análisis de fosforilación.

Estos resultados nos muestran que al contrario de lo que ocurre en las BL de los espermatozoides completos, las BL obtenidas a partir de los flagelos aislados

contienen un mayor número de sustratos de la PKA que de la PKC que modifican su nivel de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides. Posiblemente el enriquecer las proteínas del flagelo, descartando las proteínas mitocondriales en la cabeza de los espermatozoides completos, nos permitió detectar los sustratos de la PKA que se encuentran en menor proporción en la célula completa pero que son igual de importantes en la regulación de la movilidad de los espermatozoides mediante cambios en el nivel de fosforilación. Y en este caso, nuestro resultado coincide con los reportes previos que mostraron que la fosforilación por la PKA es importante para la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar (Bracho et al., 1998; Murofushi et al., 1986; Tash, 1982).

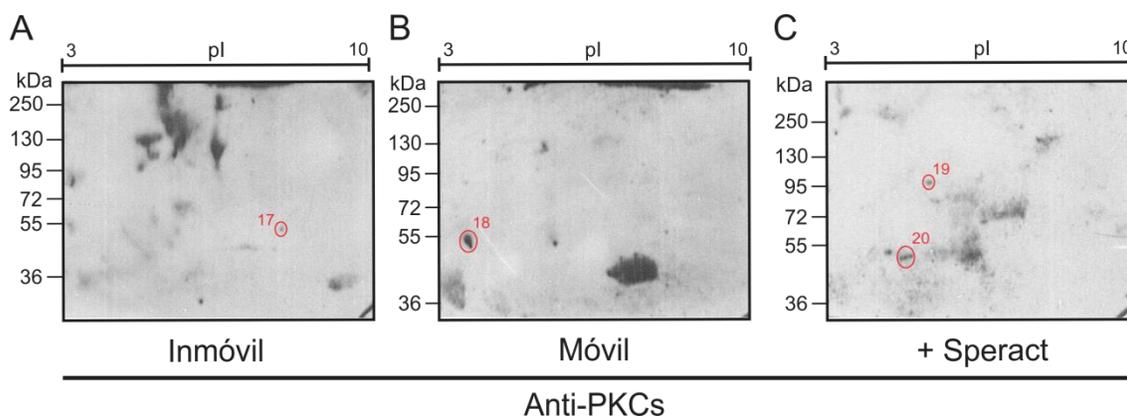


Figura 6.29 El patrón de fosforilación de los sustratos de la PKC en las balsas lipídicas de los flagelos aislados se modifica con la movilidad.

Las proteínas (400 µg) de las balsas lipídicas de los flagelos aislados expuestas a condiciones de inmovilidad, móviles o estimulados con Speract 10 nM, se separaron en geles de 2-D, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo que detecta sustratos fosforilados por la PKC (Anti-PKCs). Se marcaron en círculos numerados las manchas detectadas con el anticuerpo y que se enviaron a secuenciar. n=2.

La **Tabla 6.3** muestra todas las proteínas identificadas por LC-MS/MS en las manchas detectadas por los anticuerpos contra sustratos de la PKA (anti-PKAs) ó los sustratos de la PKC (anti-PKCs) mediante “Western blot” (**Figuras 6.28 y 6.29**). En esta tabla se indica el número de acceso en NCBI, el número de péptidos totales (NPT) y únicos (NPU) así como el porcentaje de cobertura de la proteína con los péptidos identificados. La misma **Tabla 6.3** también muestra el análisis de los sitios probables

de fosforilación con el programa NetPhos-K que hice para cada proteína y finalmente los cambios en el nivel de fosforilación observados en cada mancha.

Como se observa en la **Tabla 6.3**, el aislamiento de las balsas lipídicas de flagelos, permitió tener una muestra prácticamente carente de proteínas mitocondriales. La excepción en nuestros resultados fue la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S identificada en la mancha 19 como un sustrato de la PKC. Es posible que en el aislamiento de los flagelos quedaran restos de membrana plasmática de la cabeza y con ellos se purificó dicha proteína, ya que no existen reportes de su presencia en la membrana plasmática y se identificaron pocos péptidos. Todas las proteínas identificadas en las balsas lipídicas de los flagelos aislados son proteínas del axonema y solubles; para algunas de estas proteínas su participación en la movilidad de los espermatozoides ya está descrita.

Entre las proteínas identificadas en las balsas lipídicas de los flagelos aislados, se encuentra el receptor del Spermact, proteína importante para la regulación de la movilidad de los espermatozoides; confirmando que se encuentra en el flagelo (Cardullo et al., 1994), que se encuentra en balsas lipídicas (Ohta et al., 2000) y que regula su función por cambios en su estado de fosforilación (Hansbrough & Garbers, 1981). Además mostramos por primera vez que se fosforila al activarse la movilidad de los espermatozoides. La fosfodiesterasa 5 (FDE5), es una enzima que hidroliza el GMPc a GMP, se encuentra en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar y su función está regulada por fosforilación mediada por la PKA (Su & Vacquier, 2006). Nuestro resultado apoya lo reportado previamente, ya que identificamos a la FDE5 en las balsas lipídicas de los flagelos y observamos que su nivel de fosforilación por la PKA disminuye al activar la movilidad de los espermatozoides. La subunidad RII de la PKA también se identificó en las balsas lipídicas de los flagelos aislados fosforilandose al activar la movilidad de los espermatozoides, confirmando su previa detección por “Western blot” en las balsas lipídicas de los espermatozoides de erizo de mar (Ohta et al., 2000). Otras proteínas cuya importancia en la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar está reportada son: la fosfatasa PP1A, las dineinas y proteína de la cabeza de espiga radial del axonema. Estas proteínas en conjunto juegan un papel

importante en la activación/desactivación de las dineínas para la movilidad de los espermatozoides; la cual involucran una inhibición inducida por el ATP y activación por el ADP, mediante la fosforilación/defosforilación (PP1A) de proteínas unidas a los brazos externos de dineínas (Yoshimura, Nakano & Shingyoji, 2007). Nuestros resultados muestran que estas tres proteínas se defosforilan cuando los espermatozoides son estimulados con Speract.

Tabla 6.3 Proteínas identificadas por LC-MS/MS en las 20 manchas detectadas con los anticuerpos anti-PKAs y anti-PKCs en las balsas lipídicas de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad.

# mancha	Nombre de la proteína	No. Acceso	NPT	NPU	% Cober.	Fosforilación	Nivel de Fosforilación			
							Inmóvil	Móvil	+ Speract	
Sustratos fosforilados por la PKA:										
1	Cadena intermedia de la dineína	gij72013805	35	19	23	0.67	S-179 por PKA	2	2	3
	Melanotransferrina	gij115744213	13	9	18	0.74	T-102 por PKA			
	Cabeza de espiga radial del axonema	gij2905895	5	3	8	0.70	S-394 por PKA			
	Fosfatasa PP1A	gij72045279	5	4	26	0.68	S-99 por PKA			
2	Fosfodiesterasa 5	gij71067710	10	8	11	0.82	S-926 por PKA	3	2	1
3	Creatina cinasa flagelar	gij125302	11	10	10	0.63	T-736 por PKA	2	1	0
4	Proteína similar a kinesina 2	gij390331804	12	9	15	0.61	S-352 por PKA	2	0	0
5	Proteína 147 con dominios coiled-coil	gij390356835	7	6	10	0.62	T-189 por PKA	1	0	0
6	Flotilina 1	gij72141215	32	17	40	0.82	S-44 por PKA	1	0	0
7	Proteasa 8 específica para sentrina	gij72005346	2	1	7	0.73	S-42 por PKA	1	0	0
8	Proteína activadora de GTPasa SLIT-ROBO1	gij115665310	2	2	3	0.76	S-732 por PKA	0	2	1
9	Subunidad β de la tubulina	gij72065171	27	14	38	0.71	S-382 por PKA	0	2	0
10	Adenilato cinasa 1	gij126506320	28	20	52	0.70	S-763 por PKA	0	1	0
	Flotilina 2	gij390347106	27	18	30	0.74	S-95 por PKA			
	Actina	gij115943916	26	17	63	0.80	S-339 por PKA			
	Subunidad RII de la PKA	gij47551027	4	3	7	0.84	S-81 por PKA			
11	Flotilina 1	gij72141215	16	9	23	0.82	S-44 por PKA	1	1	0
12	Receptor del Speract	gij118063	8	5	3	0.77	S-451 por PKA	0	1	0
13	VDAC-2	gij72005582	5	3	4	0.64	S-258 por PKA	0	1	0
14	Antígeno 6 asociado al espermatozoide	gij72113568	2	2	2	0.67	S-494 por PKA	0	0	1
15	Proteína GA10590-PA	gij72032459	4	4	2	0.66	S-731 por PKA	0	0	3
16	Adenilato cinasa 8	gij390366422	50	27	13	0.57	S-379 por PKA	0	0	1
Sustratos fosforilados por la PKC:										
17	Proteína 105 con dominios coiled-coil	gij72016428	3	3	2	0.89	T-26 por PKC	1	0	0
18	Subunidad β de la tubulina	gij72065171	110	31	72	0.81	T-374 por PKC	0	2	0
	Subunidad α2 de la tubulina	gij115896494	24	12	40	0.84	S-241 por PKC			
19	Proteína relacionada con choque térmico	gij72142258	3	3	6	0.63	S-537 por PKC	0	0	1
	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S	gij115963524	3	3	4	0.77	S-687 por PKC			
20	Adenilato cinasa	gij126506320	14	10	26	0.54	S-899 por PKC	0	0	1
	Flotilina 1	gij72141215	8	8	22	0.82	S-44 por PKA			

NPT, número de péptidos totales de dos experimentos diferentes; NPU, número de péptidos únicos exclusivos de dos experimentos diferentes; % Cobertura, porcentaje de cobertura en la proteína con los péptidos identificados. Fosforilación, muestra el análisis con el programa NetPhos-K indicando el nivel de fosforilación (siendo 1 máximo), el número de aminoácido fosforilado y la cinasa que fosforila (PKA ó PKC) dicho aminoácido. Nivel de fosforilación, muestra la intensidad (0, nula; 1, baja; 2, media; 3, alta) de fosforilación de esa mancha comparando las tres condiciones de movilidad. Esta tabla muestra todas las proteínas identificadas en dos repeticiones, con balsas lipídicas de flagelos aislados expuestos a diferentes condiciones de movilidad (inmóviles, móviles o estimulados con Speract) obtenidos de espermatozoides de diferentes erizos de mar.

La **tabla 6.3** también muestra que tanto la Flotilina 1 como la 2 (proteínas marcadoras de BL), también se encuentran en las BL de los flagelos aislados, confirmando la presencia de dichos microdominios de membrana en el flagelo de los espermatozoides. Finalmente la **tabla 6.3** muestra que el canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC-2 también está presente en las balsas lipídicas obtenidas a partir de

los flagelos aislados. Este resultado confirma la presencia de VDAC-2 en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar específicamente en las balsas lipídicas, como se observó previamente en este trabajo en los experimentos de inmunolocalización (**Figura 6.24**); y está de acuerdo con lo reportado en espermatozoides de mamífero (De Pinto, Messina, Lane & Lawen, 2010; Hinsch et al., 2004; Liu et al., 2010; Sampson et al., 2001; Triphan et al., 2008).

Finalmente es importante recordar que como mencionamos en la introducción, en el espermatozoide de erizo de mar están presentes los dos tipos de Adenilil Ciclasas, tanto la soluble (sAC) (Nomura et al., 2005) como las isoformas de AC de membrana 1, 2, 5 y 9 (Beltrán et al., 2007), las cuales se regulan de diferente manera incluyendo al Ca^{2+} (Beltrán et al., 1996; Nomura et al., 2005) y a la fosforilación por PKA (Bookbinder et al., 1991) o por PKC. Además sabemos que la unión del Speract a su receptor, aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} (~200 mM) estimulando la actividad de la sAC (Beltrán et al., 1996) y posiblemente de la ACm1 e inhibiendo las actividades de las ACm5, ACm9 como en el caso de las isoformas de mamífero. Lo anterior repercute en los niveles de AMPc disponibles para activar a la PKA y por tanto en los niveles de fosforilación de diferentes proteínas.

Cabe aclarar que es posible que la baja inhibición de las ACm con los inhibidores clásicos de dichas enzimas en mamífero (2'5'DDA y SQ22536), se deba a que las ACm del espermatozoide de erizo de mar son más parecidas a las ACm del coral (Barott et al., 2013), las cuales son insensibles a forskolina, que a las de células somáticas de mamífero.

Nuestros resultados abren una ventana para entender con mayor detalle cómo algunas proteínas participan en la regulación de la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar modificando su estado de fosforilación. Además aunque ya está reportado que la mitocondria es importante para la fisiología del espermatozoide (Ardón et al., 2009; Schackmann & Chock, 1986), este es el primer trabajo que muestra que al menos parte de la participación de dicho organelo se debe a cambios en la fosforilación de diferentes proteínas mitocondriales.

7 CONCLUSIONES

- En la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus*
 - La sAC participa de manera más importante que las AC de membrana
 - Participan la PKA y la PKC
- Las balsas lipídicas contienen sustratos de la PKA y de la PKC en que modifican su grado de fosforilación con la movilidad
- Algunas proteínas mitocondriales que co-purifican con las BL se regulada por la PKA o por la PKC y podrían participar en la movilidad
- En las BL de los flagelos aislados la regulación de las proteínas por la PKA es más importante que por la PKC

8 PERSPECTIVAS

- Investigar el efecto de la ausencia de calcio en:
 - *La velocidad de nado circular de los espermatozoides expuestos o no a inhibidores de las AC's, la PKA y la PKC*
 - *La fosforilación de sustratos de la PKA y de la PKC en los espermatozoides bajo diferentes condiciones de movilidad*
- Confirmar los datos de proteómica en las balsas lipídicas de los flagelos aislados de erizo de mar expuestos a diferentes condiciones de movilidad

9 BIBLIOGRAFIA

- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R., & Manfredi, G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*, 9(3), 265–276.
- Ahmad, F., Lindh, R., Tang, Y., Ruishalme, I., Ost, A., Sahachartsiri, B., ... Manganiello, V. C. (2009). Differential regulation of adipocyte PDE3B in distinct membrane compartments by insulin and the beta3-adrenergic receptor agonist CL316243: effects of caveolin-1 knockdown on formation/maintenance of macromolecular signalling complexes. *The Biochemical journal*, 424(3), 399–410.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., p. 1392). New York: Garland Science.
- Alioua, A., Lu, R., Kumar, Y., Eghbali, M., Kundu, P., Toro, L., & Stefani, E. (2008). Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression. *The Journal of biological chemistry*, 283(8), 4808–4817.
- Amano, R., Lee, J., Goto, N., & Harayama, H. (2007). Evidence for existence of cAMP-Epac signaling in the heads of mouse epididymal spermatozoa. *The Journal of reproduction and development*, 53(1), 127–133.
- Ardón, F., Rodríguez-Miranda, E., Beltrán, C., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2009). Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca(2+) in sea urchin sperm. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(1), 15–24.
- Asano, A., Selvaraj, V., Buttke, D. E., Nelson, J. L., Green, K. M., Evans, J. E., & Travis, A. J. (2009). Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: Identification of three distinct sub-types of membrane rafts. *Journal of cellular physiology*, 218(3), 537–548.
- Bae, T. J., Kim, M. S., Kim, J. W., Kim, B. W., Choo, H. J., Lee, J. W., ... Ko, Y. G. (2004). Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics*, 4(11), 3536–3548.
- Bannai, H., Yoshimura, M., Takahashi, K., & Shingyoji, C. (2000). Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *Journal of cell science*, 113(5), 831–839.
- Barbuti, A., Gravante, B., Riolfo, M., Milanesi, R., Terragni, B., & DiFrancesco, D. (2004). Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circulation research*, 94(10), 1325–1331.
- Barott, K. L., Helman, Y., Haramaty, L., Barron, M. E., Hess, K. C., Buck, J., ... Tresguerres, M. (2013). High adenylyl cyclase activity and in vivo cAMP fluctuations in corals suggest central physiological role. *Scientific reports*, 3(1379), 1–7.
- Baumber, J., & Meyers, S. a. (2006). Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *Journal of andrology*, 27(4), 578–587.

- Baxendale, R. W., & Fraser, L. R. (2003). Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 66(2), 181–189.
- Beavo, J. a, & Brunton, L. L. (2002). Cyclic nucleotide research still expanding after half a century. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(9), 710–718.
- Beebe, S. J., Oyen, O., Sandberg, M., Frøysa, A., Hansson, V., & Jahnsen, T. (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular endocrinology*, 4(3), 465–475.
- Beltrán, C., Vacquier, V. D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L. R., & Darszon, A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochemical and biophysical research communications*, 358, 1128–1135.
- Beltrán, C., Zapata, O., & Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry*, 35(23), 7591–7598.
- Bentley, J. K., Tubb, D. J., & Garbers, D. L. (1986). Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase. *The Journal of biological chemistry*, 261(32), 14859–14862.
- Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2008). *Bioquímica* (p. 1026). Reverte.
- Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., ... Baldari, C. T. (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochemical Journal*, 369, 301–309.
- Bookbinder, L. H., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (1990). Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase. *The Journal of cell biology*, 111, 1859–1866.
- Bookbinder, L. H., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (1991). In vitro phosphorylation of sea urchin sperm adenylate cyclase by cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Molecular reproduction and development*, 28(2), 150–157.
- Boron, W. F. (2005). *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach* (p. 1319). Elsevier Science Health Science Division
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(9), 733–738.
- Bou Khalil, M., Chakrabandhu, K., Xu, H., Weerachatyanukul, W., Buhr, M., Berger, T., ... Tanphaichitr, N. (2006). Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental biology*, 290(1), 220–235.

- Bracho, G. E., Fritch, J. J., & Tash, J. S. (1998). Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 242(1), 231–237.
- Bradham, C., Foltz, K. R., Beane, W. S., Arnone, M. I., Rizzo, F., Coffman, J. A., ... Manning, G. (2006). The sea urchin kinome: a first look. *Developmental biology*, 300(1), 180–193.
- Bragado, M. J., Aparicio, I. M., Gil, M. C., & Garcia-Marin, L. J. (2010). Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa. *Journal of cellular biochemistry*, 109(1), 65–73.
- Branham, M. T., Bustos, M. A., De Blas, G. A., Rehmann, H., Zarelli, V. E. P., Treviño, C. L., ... Tomes, C. N. (2009). Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 284(37), 24825–24839.
- Branham, M. T., Mayorga, L. S., & Tomes, C. N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), 8656–8666.
- Braun, T., & Dods, R. F. (1975). Development of a Mn-2+-sensitive, “soluble” adenylate cyclase in rat testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(3), 1097–101.
- Breitbart, H., Rubinstein, S., & Etkovitz, N. (2006). Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Molecular and cellular endocrinology*, 252, 247–249.
- Brokaw, C. J. (1987). A lithium-sensitive regulator of sperm flagellar oscillation is activated by cAMP-dependent phosphorylation. *The Journal of cell biology*, 105, 1789–1798.
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, 111–136.
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533–544.
- Bruckbauer, A., James, P., Zhou, D., Yoon, J. W., Excell, D., Korchev, Y., ... Klenerman, D. (2007). Nanopipette delivery of individual molecules to cellular compartments for single-molecule fluorescence tracking. *Biophysical journal*, 93(9), 3120–3131.
- Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates* (2nd ed., p. 936). Sinauer Associates, Incorporated.
- Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J., & Levin, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 79–84.

- Cañas, B., Piñeiro, C., Calvo, E., López-Ferrer, D., & Gallardo, J. M. (2007). Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of chromatography. A*, *1153*, 235–258.
- Cardullo, R., Herrick, S., Peterson, M., & Dangott, L. (1994). Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Developmental biology*, *162*, 600–607.
- Castagna, M., Takai, Y., & Kaibuchi, K. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry*, *257*, 7847–7851.
- Castellano-Torres, L. E. (1993). *Induccion de la Reaccion Acrosomal del espermatozoide de erizo de mar mediante un sistema de célula permeabilizada*. Universidad de Guanajuato.
- Chamberlain, L. H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Letters*, *559*, 1–5.
- Chaudhry, P. S., Creagh, S., Yu, N., & Brokaw, C. J. (1995). Multiple protein kinase activities required for activation of sperm flagellar motility. *Cell motility and the cytoskeleton*, *32*(1), 65–79.
- Chen, Y. (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*, *289*(5479), 625–628.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., & Mei, F. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *40*(7), 651–662.
- Cho, I. H., Lee, M. J., Kim, D. H., Kim, B., Bae, J., Choi, K. Y., ... Song, W. K. (2013). SPIN90 dephosphorylation is required for cofilin-mediated actin depolymerization in NMDA-stimulated hippocampal neurons. *Cellular and molecular life sciences*, 1–15.
- Christen, R., Schackmann, R., & Shapiro, B. M. (1983). Metabolism of sea urchin sperm. *The Journal of biological chemistry*, *258*(9), 5392–5399.
- Christen, R., Schackmann, R. W., & Shapiro, B. M. (1982). Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Journal of biological chemistry*, *257*(24), 14881–14890.
- Christen, R., Schackmann, R. W., & Shapiro, B. M. (1986). Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *The Journal of Physiology*, *379*, 347–365.
- Cohen, G., Rubinstein, S., Gur, Y., & Breitbart, H. (2004). Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Developmental biology*, *267*(1), 230–241.
- Cohen, P., & Cohen, P. T. W. (1989). Protein phosphatases come of age. *The Journal of biological chemistry*, *264*(36), 21435–21438.

- Cook, S. P., & Babcock, D. F. (1993). Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *The Journal of biological chemistry*, 268(30), 22408–22413.
- Cortés-Hernández, P., Domínguez-Ramírez, L., Estrada-Bernal, A., Montes-Sánchez, D. G., Zentella-Dehesa, A., de Gómez-Puyou, M. T., ... García, J. J. (2005). The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(3), 844–849.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., ... Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*, 233(4766), 859–866.
- Cross, N. L. (2004). Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of reproduction*, 71(4), 1367–1373.
- Dangott, L. J., & Garbers, D. L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *The Journal of biological chemistry*, 259(22), 13712–13716.
- Dangott, L. J., Jordan, J. E., Bellet, R. a, & Garbers, D. L. (1989). Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2128–2132.
- Darszon, A. (2008). Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. In *Instituto de Biotecnología de la UNAM* (pp. 25–38).
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., & Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *The International journal of developmental biology*, 52, 595–606.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltrán, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4), 1305–1355.
- Dart, C. (2010). Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *The Journal of Physiology*, 588(17), 3169–3178.
- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran Van Minh, A., Foucault, I., ... Dolphin, A. C. (2006). The calcium channel alpha2delta-2 subunit partitions with CaV2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(34), 8748–8757.
- Davies, S., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*, 351, 95–105.
- De Pinto, V., Messina, A., Lane, D. J. R., & Lawen, A. (2010). Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS letters*, 584(9), 1793–1799.

- De Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 396(6710), 474–477.
- Dorsten, F. A., Wyss, M., Wallimann, T., & Nicolay, K. (1997). Activation of sea-urchin sperm motility is accompanied by an increase in the creatine kinase exchange flux. *Biochemical Journal*, 325, 411–416.
- Drozдов, A. L., & Vinnikova, V. V. (2010). Morphology of gametes in sea urchins from Peter The Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Developmental Biology*, 41(1), 47–57.
- Dun, M. D., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human reproduction update*, 18(4), 420–435.
- Eng, J. K., McCormack, A. L., & Yates III, J. R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *American Society for Mass Spectrometry*, 5, 976–989.
- Enserink, J. M., Price, L. S., Methi, T., Mahic, M., Sonnenberg, A., Bos, J. L., & Taskén, K. (2004). The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the alpha3beta1 integrin but not the alpha6beta4 integrin. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 44889–44896.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J., Strik, A. M., ... Gossen, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *PNAS*, 101(9), 2993–2998.
- Fantini, J., & Barrantes, F. J. (2009). Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(11), 2345–2361.
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V. A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., ... Visconti, P. E. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), 11579–11589.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H., & Tonks, N. K. (1991). Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, 253(5018), 401–406.
- Forte, R. (1983). Activation of Renal Adenylate Cyclase by Forskolin : Assessment Enzymatic Activity in Animal Models of the Secondary Hyperparathyroid State The effects of forskolin on kidney slice cyclic AMP content and membrane adenylate cyclase activity were studied in. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225(2), 898–905.
- Francis, Sharron, H. (2002). Mechanisms of autoinhibition in cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Frontiers in Bioscience*, 7, 580–592.

- Galindo, B. E., de la Vega-Beltrán, J. L., Labarca, P., Vacquier, V. D., & Darszon, A. (2007). Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K(+) channel. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(3), 668–675.
- Galindo, B. E., Neill, A. T., & Vacquier, V. D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(1), 96–101.
- Garbers, D. L. (1989). Cyclic GMP and the second messenger hypothesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1(2), 64–67.
- Garbers, D. L., First, N. L., & Lardy, H. A. (1973). Properties of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 875–879.
- García-Marcos, M., Pochet, S., Tandel, S., Fontanils, U., Astigarraga, E., Fernández-González, J. A., ... Dehaye, J.-P. (2006). Characterization and comparison of raft-like membranes isolated by two different methods from rat submandibular gland cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(6), 796–806.
- Garg, V., Sun, W., & Hu, K. (2009). Caveolin-3 negatively regulates recombinant cardiac K(ATP) channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(3), 472–477.
- Gatti, J.-L., & Christen, R. (1985). Regulation of Internal pH of Sea Urchin Sperm, 260(12), 7599–7602.
- Gaus, K., Chklovskaya, E., Fazekas de St Groth, B., Jessup, W., & Harder, T. (2005). Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *The Journal of cell biology*, 171(1), 121–131.
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E. P. W., Jones, A. S., Gelissen, I., Kritharides, L., & Jessup, W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15554–15559.
- Gomperts, B. D. (1968). Vectorial aspects of 2,3-diphospho-D-glycerate: 2-phosphohydrolase in the human red cell membrane. *Folia haematologica*, 90(2), 196–203.
- González-Martínez, M., & Darszon, A. (1987). A fast transient hyperpolarization occurs during the sea urchin sperm acrosome reaction induced by egg jelly. *FEBS letters*, 218(2), 247–250.
- Granados-Gonzalez, G., Mendoza-Lujambio, I., Rodriguez, E., Galindo, B. E., Beltrán, C., & Darszon, A. (2005). Identification of voltage-dependent Ca²⁺ channels in sea urchin sperm. *FEBS letters*, 579(29), 6667–6672.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Yoshiro, T., Wood, C. D., & Darszon, A. (2010). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344(1), 52–65.

- Gur, Y., & Breitbart, H. (2008). Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm. *Molecular and cellular endocrinology*, 282(1-2), 45–55.
- Guzun, R., Gonzalez-Granillo, M., Karu-Varikmaa, M., Grichine, A., Usson, Y., Kaambre, T., ... Saks, V. (2012). Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within mitochondrial interactosome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(6), 1545–1554.
- Hallows, K. R., Wang, H., Edinger, R. S., Butterworth, M. B., Oyster, N. M., Li, H., ... Pastor-Soler, N. M. (2009). Regulation of epithelial Na⁺ transport by soluble adenylyl cyclase in kidney collecting duct cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(9), 5774–5783.
- Han, J., Little, M., David, L. L., Giblin, F. J., & Schey, K. L. (2004). Sequence and peptide map of guinea pig aquaporin 0. *Molecular vision*, 10, 215–222.
- Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1697, 3–16.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, 9, 576–596.
- Hanna, S. L., Sherman, N. E., Kinter, M. T., & Goldberg, J. B. (2000). Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Microbiology*, 146(1), 2495–2508.
- Hanoune, J., & Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual review of pharmacology*, 41, 145–174.
- Hansbrough, J. R., & Garbers, D. L. (1981). Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. *The Journal of biological chemistry*, 256(5), 2235–2241.
- Harayama, H., & Miyake, M. (2006). A cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 73, 1169–1178.
- Harder, T., & Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current opinion in cell biology*, 9(4), 534–542.
- Hayashi, H., Yamamoto, K., Yonekawa, H., & Morisawa, M. (1987). Involvement of tyrosine protein kinase in the initiation of flagellar movement in rainbow trout spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 262(34), 16692–16698.
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., ... Moss, S. B. (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental cell*, 9, 249–259.

- Hinkovska-Galcheva, V., & Srivastava, P. N. (1993). Phospholipids of rabbit and bull sperm membranes: structural order parameter and steady-state fluorescence anisotropy of membranes and membrane leaflets. *Molecular reproduction and development*, 35(2), 209–217.
- Hinsch, K. D., Pinto, V. De, Aires, V. A., Schneider, X., Messina, A., & Hinsch, E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *The Journal of biological chemistry*, 279(15), 15281–15288.
- Højlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P. M., Fey, S. J., Roepstorff, P., Handberg, A., ... Beck-Nielsen, H. (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 278(12), 10436–10442.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell*, 50(January), 823–829.
- Hurh, Y.-J., Chen, Z.-H., Na, H.-K., Han, S.-Y., & Surh, Y.-J. (2004). 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 67, 1939–1953.
- Huszar, G., Vigue, L., & Corrales, M. (1988). Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic, and oligospermic men. *Biology of reproduction*, 38, 1061–1066.
- Inaba, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological science*, 20, 1043–1056.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues II. *J Biol Chem*, 252, 7610–7616.
- Jacobson, K., Sheets, E. D., & Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268(5216), 1441–1442.
- Jaiswal, B. S., & Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10676–10681.
- James, P. S., Hennessy, C., Berge, T., & Jones, R. (2004). Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *Journal of cell science*, 117(Pt 26), 6485–6495.
- Janssen, R. J. R. J., Nijtmans, L. G., Van den Heuvel, L. P., & Smeitink, J. A. M. (2006). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease*, 29(4), 499–515.

- Jiao, J., Garg, V., Yang, B., Elton, T. S., & Hu, K. (2008). Protein kinase C-epsilon induces caveolin-dependent internalization of vascular adenosine 5'-triphosphate-sensitive K⁺ channels. *Hypertension*, *52*(3), 499–506.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, *85*(2), 149–158.
- Johnson, R., Alvarez, R., & Salomon, Y. (1994). Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double column procedures. *Methods in enzymology*, *238*(1979), 31–56.
- Jones, R., Howes, E., Dunne, P. D., James, P., Bruckbauer, A., & Klenerman, D. (2010). Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Developmental biology*, *339*(2), 398–406.
- Kaliva, M., Faust, J. J., Koeneman, B. A., & Capco, D. G. (2010). Involvement of the PKC family in regulation of early development. *Molecular reproduction and development*, *77*(2), 95–104.
- Kaltschmidt, E., & Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal proteins. VII: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Analytical biochemistry*, *36*, 401–412.
- Kamp, T. J., & Hell, J. W. (2000). Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circulation Research*, *87*(12), 1095–1102.
- Kaupp, U., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual review of physiology*, *70*(October 2007), 93–117.
- Kaupp, U., & Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annual review of physiology*, *63*, 235–257.
- Kaupp, U., & Weyand, I. (2000). Cell biology. A universal bicarbonate sensor. *Science*, *289*, 559–560.
- Kawasaki, H. (1998). A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science*, *282*(5397), 2275–2279.
- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., & Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*, *74*(20), 5383–5392.
- Kennelly, P. J., & Krebs, E. G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *The Journal of biological chemistry*, *266*(24), 15555–15558.
- Kiermayer, S., Biondi, R., & Imig, J. (2005). Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Molecular biology of the cellbiology of the cell*, *16*, 5639–5648.

- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (1975). Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *The Journal of Cell Biology*, 65(2), 258–270.
- Kim, K. B., Lee, J. W., Lee, C. S., Kim, B. W., Choo, H. J., Jung, S. Y., ... Ko, Y. G. (2006). Oxidation–reduction respiratory chains and ATP synthase complex are localized in detergent-resistant lipid rafts. *Proteomics*, 6(8), 2444–2453.
- Kindzelskii, A., Sitrin, R., & Petty, H. (2004). Cutting edge: optical microspectrophotometry supports the existence of gel phase lipid rafts at the lamellipodium of neutrophils: apparent role in calcium signaling. *The Journal of Immunology*, 172, 4681–4685.
- Kinukawa, M., Oda, S., Shirakura, Y., Okabe, M., Ohmuro, J., Baba, S. A., ... Aoki, F. (2006). Roles of cAMP in regulating microtubule sliding and flagellar bending in demembrated hamster spermatozoa. *FEBS letters*, 580(5), 1515–1520.
- Kopperud, R., Christensen, A. E., Kjarland, E., Viste, K., Kleivdal, H., & Døskeland, S. O. (2002). Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. *The Journal of biological chemistry*, 277(16), 13443–13448.
- Kumar, S., Kostin, S., Flacke, J.-P., Reusch, H. P., & Ladilov, Y. (2009). Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(22), 14760–14768.
- Kusumi, A., Koyama-Honda, I., & Suzuki, K. (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*, (5), 213–230.
- Le Roch, K. G., Johnson, J. R., Florens, L., Zhou, Y., Santrosyan, A., Grainger, M., ... Winzeler, E. A. (2004). Global analysis of transcript and protein levels across the Plasmodium falciparum life cycle. *Genome research*, 14(11), 2308–2318.
- Lee, H. C. (1984). Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 259(8), 4957–4963.
- Lee, M., & Iverson, R. (1972). Protein kinase in sea urchin gametes and embryos. *Experimental Cell Research*, 75, 300–304.
- Lichtenberg, D., Goñi, F. M., & Heerklottz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in biochemical sciences*, 30(8), 430–436.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., ... Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of cell biology*, 126(1), 111–126.
- Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., & Levin, L. R. (2003). Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *The Journal of biological chemistry*, 278(18), 15922–15926.

- Liu, B., Zhang, W., & Wang, Z. (2010). Voltage-dependent anion channel in mammalian spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(4), 633–636.
- Liu, D. Y., & Baker, H. W. (1997). Protein kinase C plays an important role in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Molecular human reproduction*, 3(12), 1037–1043.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M. a, Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., ... Conti, M. (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Molecular endocrinology*, 19(5), 1277–1290.
- Longo, F., & Anderson, E. (1969). Sperm differentiation in the sea urchins *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 27, 486–509.
- Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G., & Baldi, E. (2005). Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyl cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biology of reproduction*, 72(1), 22–32.
- Mannella, C. A., & Colombini, M. (1984). Evidence that the crystalline arrays in the outer membrane of *Neurospora* mitochondria are composed of the voltage-dependent channel protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 774, 206–214.
- Marquez, B., & Suarez, S. S. (2008). Soluble adenylyl cyclase is required for activation of sperm but does not have a direct effect on hyperactivation. *Reproduction, fertility, and development*, 20, 247–252.
- Martens, J. R., Navarro-Polanco, R., Coppock, E. A., Nishiyama, A., Parshley, L., Grobaski, T. D., & Tamkun, M. M. (2000). Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), 7443–7446.
- Meder, D., Moreno, M. J., Verkade, P., Vaz, W. L. C., & Simons, K. (2006). Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 329–334.
- Minamide, L. S., & Bamburg, J. R. (1990). A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents. *Analytical biochemistry*, 190, 66–70.
- Miranda, P., Allaire, A., Sosnik, J., & Visconti, P. (2009). Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of Reproduction*, 80(5), 897–904.
- Miro-Moran, A., Jardin, I., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Tapia, J. a, & Aparicio, I. M. (2012). Identification and function of exchange proteins activated directly by cyclic AMP (Epac) in mammalian spermatozoa. *PLoS one*, 7(5), 1–11.

- Morita, M., Takemura, A., Nakajima, A., & Okuno, M. (2006). Microtubule sliding movement in tilapia sperm flagella axoneme is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphorylation. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63, 459–470.
- Muallem, S., & Wilkie, T. M. (1999). G protein-dependent Ca²⁺ signaling complexes in polarized cells. *Cell calcium*, 26(5), 173–180.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115, 377–388.
- Murofushi, H., Ishiguro, K., Takahashi, D., Ikeda, J., & Sakai, H. (1986). Regulation of sperm flagellar movement by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell motility and the Cytoskeleton*, 6(2), 83–88.
- Nakajima, A., Morita, M., Takemura, A., Kamimura, S., & Okuno, M. (2005). Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axonemal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm. *The Journal of experimental biology*, 208(23), 4411–4418.
- Naor, Z., & Breitbart, H. (1997). Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8(9), 337–342.
- Nebenführ, A., Ritzenthaler, C., & Robinson, D. (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology*, 130, 1102–1108.
- Newton, A. C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22, 1–25.
- Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W., & Hoshi, M. (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote (Cambridge, England)*, 4(3), 237–245.
- Nishigaki, T., & Darszon, a. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. *Developmental biology*, 223(1), 17–26.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308, 693–698.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal*, 9, 484–496.
- Nixon, B., & Aitken, R. J. (2009). The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), 8–13.
- Nixon, B., Mitchell, L. a, Anderson, A. L., McLaughlin, E. a, O'Bryan, M. K., & Aitken, R. J. (2011). Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *Journal of cellular physiology*, 226(10), 2651–2665.
- Noland, T. D., Abumrad, N. a, Beth, a H., & Garbers, D. L. (1987). Protein phosphorylation in intact bovine epididymal spermatozoa: identification of the type II regulatory subunit of cyclic

- adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase as an endogenous phosphoprotein. *Biology of reproduction*, 37(1), 171–180.
- Nomura, M., Beltrán, C., Darszon, A., & Vacquier, V. D. (2005). A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene*, 353(2), 231–238.
- O'Brien, E. D., Krapf, D., Cabada, M. O., Visconti, P. E., & Arranz, S. E. (2011). Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Developmental biology*, 350(1), 80–88.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free radical biology & medicine*, 40(6), 1045–1055.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Lennarz, W. J., & Kitajima, K. (1999). Isolation and characterization of low density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fraction from sea urchin sperm. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(3), 616–623.
- Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacquier, V. D., Lennarz, W. J., & Kitajima, K. (2000). Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm. *Glycoconjugate journal*, 17, 205–214.
- Ohtake, H. (1976). Respiratory Behaviour of Sea-urchin Spermatozoa I. Effect of pH and egg water on the respiratory rate. *J. Exp. Zool.*, 198, 303–312.
- Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., ... Mann, M. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling*, 3(104), 1–16.
- Ong, H. L., & Ambudkar, I. S. (2011). The dynamic complexity of the TRPC1 channelosome. *Channels*, 5(5), 424–431.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., & Nishizuka, Y. (1989). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(9), 3099–30103.
- Ostrom, R. S., & Insel, P. a. (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *British journal of pharmacology*, 143(2), 235–245.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., ... Seino, S. (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature cell biology*, 2(11), 805–811.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., & Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551–3567.

- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal Of Lipid Research*, 44, 655–667.
- Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *The Biochemical journal*, 378(Pt 2), 281–292.
- Ramarao, C. S., & Garbers, D. L. (1985). Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 260(14), 8390–8396.
- Rao, M., & Mayor, S. (2005). Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts. *Biochimica et biophysica acta*, 1746(3), 221–223.
- Rehmann, H., Schwede, F., Døskeland, S. O., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *The Journal of biological chemistry*, 278(40), 38548–38556.
- Reynaud, E., De La Torre, L., Zapata, O., Liévano, A., & Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS letters*, 329(1-2), 210–214.
- Rigbolt, K. T. G., Prokhorova, T. a, Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P. T., Kratchmarova, I., ... Blagoev, B. (2011). System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science signaling*, 4(164), 1–18.
- Rodriguez Peña, M. J., Castillo Bennett, J. V., Soler, O. M., Mayorga, L. S., & Michaut, M. A. (2013). MARCKS protein is phosphorylated and regulates calcium mobilization during human acrosomal exocytosis. *PloS one*, 8(5), 1–12.
- Rotem, R., Paz, G. F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., Judith, L., Breitbart, H., & Naor, Z. (1992). Ca²⁺-Independent Induction of Acrosome Reaction by Protein Kinase C in Human Sperm. *Endocrinology*, 131(5), 2235–2243.
- Rotem, R., Paz, G. F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., & Naor, Z. (1990a). Further studies on the involvement of protein kinase C in human sperm flagellar motility. *Endocrinology*, 127(5), 2571–2577.
- Rotem, R., Paz, G. F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., & Naor, Z. (1990b). Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7305–7308.
- Rotman, T., Etkovitz, N., Spiegel, A., Rubinstein, S., & Breitbart, H. (2010). Protein kinase A and protein kinase C(alpha)/PPP1CC2 play opposing roles in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction*, 140(1), 43–56.
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapeña, A. C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., ... López-Pérez, M. J. (1998). Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical chemistry*, 44(8), 1616–1620.

- Russell, S. a, Old, W., Resing, K. a, & Hunter, L. (2004). Proteomic informatics. *International review of neurobiology*, 61, 127–157.
- Sampson, M. J., Decker, W. K., Beaudet, A. L., Ruitenbeek, W., Armstrong, D., Hicks, M. J., & Craigen, W. J. (2001). Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39206–39212.
- Schackmann, R. W., & Chock, P. B. (1986). Alteration of Intracellular [Ca²⁺] in Sea Urchin Sperm by the Egg Peptide Speract. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(19), 8719–8728.
- Schuh, S. M., Carlson, A. E., McKnight, G. S., Conti, M., Hille, B., & Babcock, D. F. (2006). Signaling pathways for modulation of mouse sperm motility by adenosine and catecholamine agonists. *Biology of reproduction*, 74, 492–500.
- Seino, S., & Shibasaki, T. (2005). PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for cAMP-Regulated Exocytosis. *Physiological reviews*, 85, 1303–1342.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A., & Jones, R. (2004). Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(1), 253–265.
- Shimomura, H., & Garbers, D. L. (1986). Differential Effects of Resact Analogues on Sperm Respiration Rates and Cyclic Nucleotide Concentrationst. *Biochemistry*, 25(11), 3405–3410.
- Shoji, S., Titani, K., Demaille, J., & Fischer, E. (1979). Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 6211–6214.
- Simons, K., & Meer, G. Van. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197–6202.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), 31–39.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731.
- Sleight, S. B., Miranda, P. V., Plaskett, N. W., Maier, B., Lysiak, J., Scoble, H., ... Visconti, P. E. (2005). Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biology of reproduction*, 73(4), 721–729.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C., & Anderson, R. G. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10104–10108.

- Song, K., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., & Lisanti, M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *The Journal of biological chemistry*, 271(16), 9690–9697.
- Sot, J., Collado, M. I., Arrondo, J. L. R., Alonso, A., & Goñi, F. M. (2002). Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon. *Langmuir*, 18, 2828–2835.
- Spitaler, M., & Cantrell, D. A. (2004). Protein kinase C and beyond. *Nature immunology*, 5(8), 785–790.
- Steinberg, R., & Cauthron, R. (1993). Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Molecular and cellular biology*, 13(4), 2332–2341.
- Struglics, A., Fredlund, K. M., Møller, I. M., & Allen, J. F. (1998). Two subunits of the F₀F₁-ATPase are phosphorylated in the inner mitochondrial membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 243(3), 664–668.
- Su, Y. H., Chen, S. H., Zhou, H., & Vacquier, V. D. (2005). Tandem mass spectrometry identifies proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase when sea urchin sperm undergo the acrosome reaction. *Developmental biology*, 285(1), 116–125.
- Su, Y. H., & Vacquier, V. D. (2002). A flagellar K(+)-dependent Na(+)/Ca(2+) exchanger keeps Ca(2+) low in sea urchin spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6743–6748.
- Su, Y. H., & Vacquier, V. D. (2006). Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa. *Molecular biology of the cell*, 17, 114–121.
- Subota, I. Y., Arziev, S., Nevinsky, G., & Konstantinov, Y. M. (2011). Effect of redox conditions on the synthesis and phosphorylation of β -subunit of mitochondrial F₀F₁-ATPase of maize (*Zea mays*). *Biochemistry, biophysics and molecular biology*, 438(5), 144–146.
- Suzuki, K. G. N. (2012). Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes. *Biotechnology journal*, 7(6), 753–761.
- Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoological science*, 12, 13–27.
- Suzuki, N., & Garbers, D. L. (1984). Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biology of reproduction*, 30(5), 1167–1174.
- Tash, J. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biology of Reproduction*, 26, 745–763.

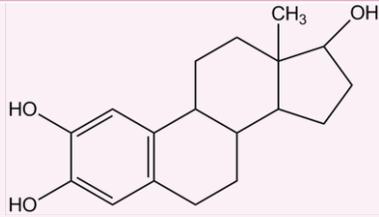
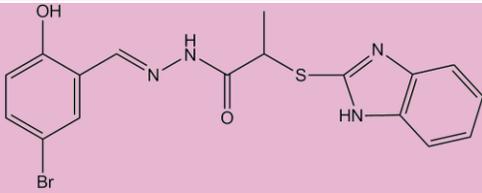
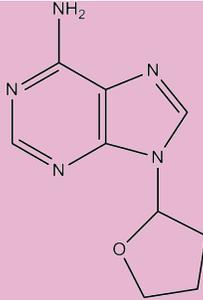
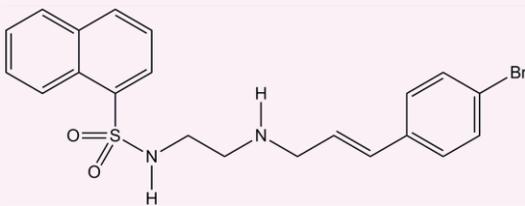
- Tash, J. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell motility and the cytoskeleton*, 14, 332–339.
- Tash, J., & Means, A. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biology of reproduction*, 26, 745–763.
- Tash, J., & Means, A. (1983). Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biology of reproduction*, 28, 75–104.
- Tash, J. S., Hidaka, H., & Means, a R. (1986). Axonin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility. *The Journal of cell biology*, 103(2), 649–655.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., & Means, a R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology*, 106(5), 1625–1633.
- Taussig, R., & Gilman, A. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), 1–4.
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., & Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, 1697(1-2), 259–269.
- Tesmer, J. J. (1997). Crystal Structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a Complex with Gs·GTPS. *Science*, 278(5345), 1907–1916.
- Thaler, C. D., Thomas, M., & Ramalie, J. R. (2006). Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Molecular reproduction and development*, 73, 1541–1549.
- Thundathil, J., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2002). Different signal transduction pathways are involved during human sperm capacitation induced by biological and pharmacological agents. *Molecular human reproduction*, 8(9), 811–816.
- Tombes, R. M., & Shapiro, B. M. (1987). Enzyme Termini of a Phosphocreatine Shuttle. *The Journal of biological chemistry*, 262(33), 16011–16019.
- Travis, A., Merdiushev, T., Vargas, L. A., Jones, B. H., Purdon, M. A., Nipper, R. W., ... Kopf, G. S. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Developmental biology*, 240(2), 599–610.
- Treviño, C. L., Serrano, C. J., Beltran, C., Felix, R., & Darszon, A. (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS letters*, 509, 119–125.
- Trimmer, J. S., & Vacquier, V. D. (1986). Activation of sea urchin gametes. *Annual review of cell biology*, 2, 1–26.

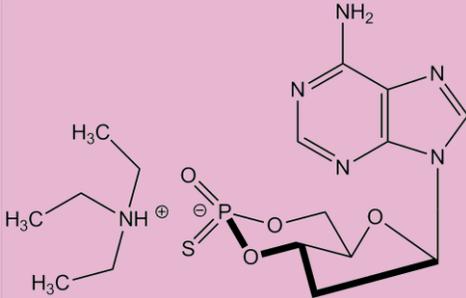
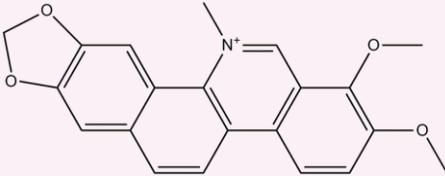
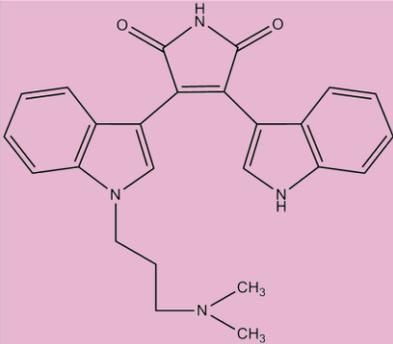
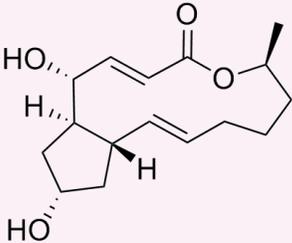
- Triphan, X., Menzel, V. A., Petrunkina, A. M., Cassará, M. C., Wemheuer, W., Hinsch, K. D., & Hinsch, E. (2008). Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Eur*, 455, 677–686.
- Uguz, C., Vredenburgh, W. L., & Parrish, J. J. (1994). Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biology of reproduction*, 51, 1031–1039.
- Van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular human reproduction*, 11(8), 583–590.
- Vigue, C., Vigue, L., & Huszar, G. (1992). Adenosine Triphosphate (ATP) concentrations and ATP/Adenosine Diphosphate Ratios in Human Sperm of Normospermic, Oligospermic, and Asthenospermic Specimens and in their Swim-up Fractions: Lack of Correlation between ATP parameters and sperm creatine kinas. *Journal of andrology*, 13(4), 305–311.
- Vijayaraghavan, S., Olson, G. E., NagDas, S., Winfrey, V. P., & Carr, D. W. (1997). Subcellular localization of the regulatory subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 57(6), 1517–1523.
- Wallimann, T., & Hemmer, W. (1994). Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 133-134, 193–220.
- Walsh, D., Perkins, J., & Krebs, E. (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 243(12), 7–10.
- Ward, G. E., Garbers, D. L., & Vacquier, V. D. (1985). Effects of extracellular egg factors on sperm guanylate cyclase. *Science*, 227(4688), 768–770.
- Ward, G. E., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (1986). Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *The Journal of cell biology*, 103, 95–101.
- Washburn, M. P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schieltz, D. M., & Yates, J. R. (2002). Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Analytical chemistry*, 74(7), 1650–1657.
- White, D., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *The Journal of experimental biology*, 210, 4053–4064.
- Wood, C. D., Darszon, A., & Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *The Journal of cell biology*, 161(1), 89–101.
- Wood, C. D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S. a, & Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *The Journal of cell biology*, 169(5), 725–731.

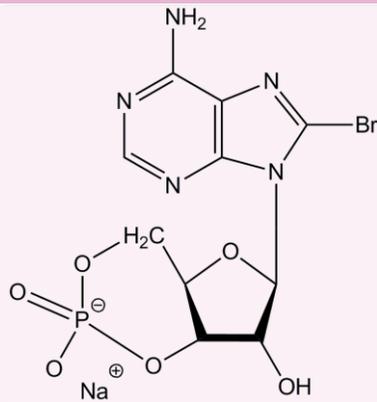
- Wood, C. D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S. a, Whitaker, M., & Darszon, A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental biology*, 306(2), 525–537.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote (Cambridge, England)*, 2(4), 371–372.
- Yates, J. R., Eng, J. K., McCormack, a L., & Schieltz, D. (1995). Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Analytical chemistry*, 67(8), 1426–1436.
- Yonemoto, W., Garrod, S. M., Bell, S. M., & Taylor, S. S. (1993). Identification of phosphorylation sites in the recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 268(25), 18626–18632.
- Yoshimura, A., Nakano, I., & Shingyoji, C. (2007). Inhibition by ATP and activation by ADP in the regulation of flagellar movement in sea urchin sperm. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64, 777–793.
- Yuan, H., Takeuchi, E., & Salant, D. J. (2002). Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 282, 585–591.
- Zheng, Y. Z., Berg, K. B., & Foster, L. J. (2009). Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins. *Journal of lipid research*, 50(5), 988–998.
- Zhu, L., & Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular reproduction and development*, 78, 920–929.
- Zimmermann, B. (1999). PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit Type I. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5370–5378.
- Zippin, J. H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M. S., Fischman, D. a, ... Buck, J. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *The FASEB Journal*, 17(1), 82–89.
- Zitranski, N., Borth, H., Ackermann, F., Meyer, D., Viewig, L., Breit, A., ... Boekhoff, I. (2010). The “acrosomal synapse”: Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa. *Communicative & integrative biology*, 3(6), 513–521.

10 ANEXOS

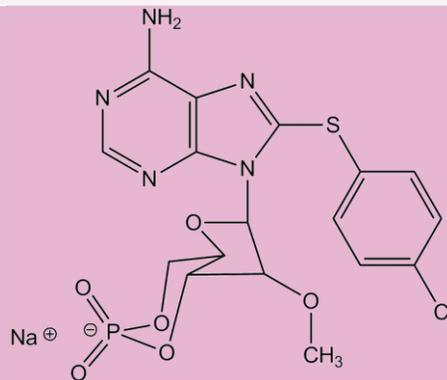
10.1 Estructuras químicas de los compuestos utilizados

Nombre	Estructura	Descripción
<p>INHIBIDORES</p> <p>2-Hidroxiestradiol (2OHE)</p>		<p>Catecolestrogeno que inhibe de manera efectiva la actividad de la adenilato ciclasa soluble. Con una IC_{50} = 5 μM.</p>
KH-7		<p>Inhibidor selectivo para la adenilato ciclasa soluble. Con una IC_{50} = 7 μM</p>
2'5'Dideoxiadenosina (2'5'DDA)		<p>Inhibidor específico para todas las isoformas de las adenilato ciclasas, es permeable a la membrana plasmática. Con una IC_{50} = 45 μM</p>
SQ22536		<p>Inhibidor de las adenilato ciclasas transmembranales, permeable a la membrana plasmática. Con una IC_{50} = 200 μM.</p>
H-89		<p>Inhibidor de la PKA permeable a la membrana plasmática. Con una IC_{50} = 0.14 μM. Sin embargo concentraciones mayores a 30 μM inhibe a otras cinasas como PKC.</p>

Rp-cAMPS		<p>Inhibidor de la PKA, permeable a la membrana plasmática y resistente a la hidrólisis por las fosfodiesterasas. Con una $K_i=11 \mu\text{M}$</p>
Quelerritrina		<p>Inhibidor potente de la PKC, permeable a la membrana plasmática y ejerce su efecto al unirse al dominio catalítico de la PKC. Con una $IC_{50}=0.66 \mu\text{M}$</p>
Bisindolilmaleimida I (BIM)		<p>Inhibidor altamente selectivo para la PKC. Actúa como un inhibidor competitivo para el sitio de unión del ATP en la PKC. Es específico para las isoformas α, βI, βII, γ, δ y ϵ. Con una $K_i=10 \text{ nM}$</p>
Brefeldina A (BFA)		<p>Inhibidor reversible del intercambio GDP-GTP que lleva a cabo el Epac. Con una $IC_{50}=36 \text{ nM}$</p>

ACTIVADORES**8Br-AMPC**

Análogo del AMPc permeable a la membrana plasmática y activador de la vía de señalización por la PKA. Su efecto es prolongado porque es resistente a la actividad de las fosfodiesterasas.

OMe-pCPT

También llamado 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. Es un análogo del AMPc permeable a la membrana plasmática que activa de una manera potente y específica a Epac. Con una $IC_{50}=50 \mu M$

10.2 Tablas de las dosis efectivas de los inhibidores y activadores

BLANCO	INHIBIDOR	DOSIS EFECTIVA	SISTEMA	REFERENCIAS
AC soluble	2-Hidroxiestradiol	20 μM	Cel. Epiteliales mamarias de humano	Hurh, 2004
		150 μM	Espermatozoides de erizo de mar	Beltrán, 2007
	KH-7	10 μM	Espermatozoides de ratón	Hess, 2005
50 μM		Espermatozoides de erizo de mar	Beltrán, 2007	
AC transmembranal	2'5'Dideoxiadeosina	50 μM	Espermatozoides de ratón	Babcock, 2006
		150 μM	Espermatozoides de erizo de mar	Beltrán, 2007
	SQ22536	0.1 mM	Espermatozoides de ratón	Babcock, 2006
3 mM		Espermatozoides de humano	Spehr, 2004	
PKA	H-89	30 μM	Espermatozoides de ratón	Babcock, 2006
		50 μM	Espermatozoides de toro	Carr, 1997
	Rp-cAMPS	200 μM	Espermatozoides de humano	Gagnon, 2006
1 mM		Espermatozoides de bovino	Suarez, 2006	
PKC	Quelerritina	1 μM	Espermatozoides de humano	Fraser, 1996
		5 μM	Espermatozoides de erizo de mar	White, 2007
	Bisindolilmaleimida	15 μM	Espermatozoides de humano	Liu, 2001

EPAC		50 μ M	Espermatozoides de jabalí	Harayama, 2006
	Brefeldina A	7.5 μ M	Espermátidas	Moreno, 2000

11 APÉNDICE

Artículos con los resultados de esta tesis:

1. Aceptado

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects
Volume 1830, Issue 11, Pages 5305–5315
doi: 10.1016/j.bbagen.2013.07.029.

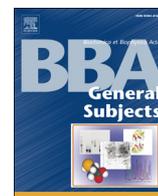
Certain Strongylocentrotus purpuratus sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation.

Loza-Huerta A, Vera-Estrella R, Darszon A, Beltrán C.

2. En preparación

Sperm motility is regulated by a crosstalk between protein kinase A and C in intact Strongylocentrotus purpuratus sea urchin sperm.

Arlet Loza-Huerta, Alberto Darszon, Carmen Beltrán



Certain *Strongylocentrotus purpuratus* sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation



Arlet Loza-Huerta^a, Rosario Vera-Estrella^b, Alberto Darszon^a, Carmen Beltrán^{a,*}

^a Departamentos de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos CP 62210, Mexico

^b Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos CP 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2012
Received in revised form 24 June 2013
Accepted 27 July 2013
Available online 6 August 2013

Keywords:

Protein phosphorylation
Mitochondria
LD-DIM
Sea urchin sperm
Speract
Sperm motility

ABSTRACT

Background: Sea urchin sperm motility is regulated by Speract, a sperm-activating peptide (SAP) secreted from the outer egg coat. Upon binding to its receptor in the sperm flagellum, Speract induces a series of ionic and metabolic changes in *Strongylocentrotus purpuratus* spermatozoa that regulate their motility. Among these events, protein phosphorylation is one of the most relevant and evidence indicates that some proteins of the Speract signaling cascade localize in low density detergent-insoluble membranes (LD-DIM).

Methods: LD-DIM-derived proteins from immotile, motile or Speract-stimulated *S. purpuratus* sperm were resolved in 2-D gels and the PKA and PKC substrates detected with specific antibodies were identified by LC-MS/MS.

Results: Differential PKA and PKC substrate phosphorylation levels among the LD-DIM isolated from sperm in different motility conditions were found and identified by mass spectrometry as: ATP synthase, creatine kinase, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, succinyl-CoA ligase and the voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2), which are mitochondrial proteins, as well as, the cAMP-dependent protein kinase type II regulatory (PKA RII) subunit, Tubulin β chain and Actin Cy I changed their phosphorylation state.

Conclusions: Some mitochondrial proteins regulated by PKA or PKC may influence sea urchin sperm motility.

General significance: The fact that a high percentage (66%) of the PKA or PKC substrates identified in LD-DIM are mitochondrial proteins suggests that the phosphorylation of these proteins modulates sea urchin sperm motility via Speract stimulation by providing sufficient energy to sperm physiology. Those mitochondrial proteins are indeed PKA- or PKC-substrates in the sea urchin spermatozoa.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Spermatozoa are terminal cells whose only function is to fertilize the egg, which involves motility regulation and the acrosome reaction (AR). The AR is a crucial process where the acrosome membrane fuses with the sperm plasma membrane to expose a new membrane specialized to fuse with the egg. In sea urchin sperm, motility is regulated by sperm-activating peptides (SAP) present on the outer layer of the homologous egg. Binding of Speract (one of the SAPs from the *Strongylocentrotus purpuratus* egg) to its receptor elicits rapid physiological changes in sperm such as: a hyperpolarization followed by a depolarization of the sperm membrane potential (E_m), increases of intracellular

pH (pH_i), sodium ($[Na^+]_i$), calcium ($[Ca^{2+}]_i$), $[cGMP]_i$ and $[cAMP]_i$ levels among other events [1]. When sperm pH_i is alkalinized, the ATPase activity and the mitochondrial respiratory rates (50-fold) increase, and sperm motility is activated [2]. The tight linkage observed between respiration and motility could be due to a direct relationship between ATP synthesis by the single mitochondrion of the sperm and its hydrolysis; mainly by dynein ATPases in the sea urchin sperm flagella [1,3].

It is known that *S. purpuratus* spermatozoa respond to Speract by redirecting their swimming paths, but do not show chemotaxis towards Speract or egg jelly under laboratory conditions tested thus far [1], as is the case for *Lytechinus pictus* sperm [4]. Although spermatozoa from both species respond to Speract gradients with a sequence of turning episodes that correlate with transient flagella Ca^{2+} increases, only *L. pictus* spermatozoa accumulate at the gradient source, probably because of the selective suppression of Ca^{2+} fluctuations of *L. pictus* spermatozoa as they swim towards the source of the chemoattractant gradient [4]. All these together with the signaling cascade of events triggered by Speract may involve mitochondrial regulation.

Notably, Speract induces a cAMP increase that activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA), which in turn phosphorylates specific

Abbreviations: SAP, Sperm-Activating Peptide; LD-DIM, low density detergent-insoluble membranes; VDAC, voltage-dependent anion channel; CK, creatine kinase; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKC, protein kinase C; ASW, Artificial sea water; LC-MS/MS, tandem mass spectrometry

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 2001, Cuernavaca, Morelos CP 62210, Mexico. Tel.: +52 777 329 1611; fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: beltran@ibt.unam.mx (C. Beltrán).

sperm proteins [5]. cAMP-dependent and -independent changes in protein phosphorylation have been demonstrated to be crucial events during sperm motility activation [6,7] and the AR [8]. Most of the studies that correlate sperm motility with changes in protein phosphorylation have been conducted using in vitro demembrated sperms [9–11]. Although disrupting the integrity of the sperm plasma membrane allows direct contact with the axonemal proteins, it likely alters signaling mechanisms that involve the participation of protein kinases. There is only one report showing that PKC is implicated in intact living *L. pictus* sperm motility initiation and maintenance [12].

Protein phosphorylation plays an important role in cell signaling. A number of ion channels, receptors, cytoskeleton elements, nucleic acids, regulatory factors and diverse enzymes are protein kinase substrates [13]. Although protein kinases were initially found in the cytosol [14], now we know that they are also present in the mammalian mitochondria [15]. At present, more than 60 mitochondrial phosphoproteins have been found distributed along the mitochondria [16], suggesting that reversible protein phosphorylation is an important mechanism in the regulation of mitochondrial activity. The presence of a complete $\text{CO}_2\text{-HCO}_3\text{-sAC-cAMP-PKA}$ signaling cascade within the mitochondria supports the previous assumption [17]. Proteins located either in the matrix, the intermembrane space or at the outer and inner mitochondrial membrane are regulated by phosphorylation in different cell types [16,18,19]. Furthermore, it has also been shown that some mitochondrial phosphoproteins are important for the capacitation of mammalian sperm [20–22]. However, despite the importance of mitochondrion in the motility of sea urchin sperm, to date the regulation of the activity of mitochondrial proteins is unknown.

Sea urchin sperm have only one mitochondrion located at the bottom of the head [23], which is the only source of ATP production since these cells lack glycolytic pathway [24]. ATP is essential for flagella beating as it is the substrate for dyneines (ATPases), which are the molecular motors of the axoneme that are in turn regulated by protein phosphorylation [25,26]. For these reasons, the participation of mitochondrial proteins regulated by phosphorylation may be crucial for sperm motility.

Low density detergent-insoluble membranes (LD-DIM) are membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids that contain signaling molecules as receptors and ion channels [27,28]. Ion fluxes are essential for sperm physiology and several lines of evidence suggest that LD-DIM regulate channel function in different ways, either by direct protein–lipid interactions or by altering the physical properties of the lipid bilayer [27]. LD-DIM have been implicated in diverse physiological processes like: signal transduction [29,30], membrane trafficking [31], immune responses, cellular growth [32] and embryonic stem cell self-renewal [33], as well as in pathological events like neurodegenerative diseases [34]. LD-DIM have been described in mammalian [35–37], sea urchin [38], and *Ciona intestinalis* [39] sperm and in mammalian eggs [40]. In sperm, LD-DIM are involved in the AR and capacitation [41–44]. Sea urchin sperm LD-DIM contain receptors (Speract receptor and REJ-1; Receptor for egg jelly-1), enzymes (Adenylate cyclase, Guanylate cyclase and PKA) and $G_{s\alpha}$ -protein. It has been demonstrated that the Speract receptor, the GPI-anchored protein, and the $G_{s\alpha}$ -protein co-immunoprecipitate [45], suggesting that they interact in a macromolecular complex within a lipid microdomain possibly involved in sperm motility. Mitochondrial proteins have been identified to be associated to LD-DIM-microdomains by proteomic analysis in different cell types [46,47]. These proteins are considered contaminants that co-purify with microdomains [48].

Here, we isolated LD-DIM from sea urchin spermatozoa exposed to different ionic conditions that yield them immotile, motile or stimulated by Speract. We used antibodies against PKA or PKC substrates to detect LD-DIM proteins whose phosphorylation state changed in motile sperm. The phosphorylated proteins were identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Our results show that significant fractions (~66%) of the identified motility-associated PKA/PKC substrates in LD-

DIM are mitochondrial proteins. The fact that some sperm mitochondrial proteins modify their phosphorylation levels in response to motility changes suggests that the sea urchin sperm mitochondria participates in the regulation of motility in more complex manners.

2. Materials and methods

2.1. Gametes and materials

S. purpuratus sea urchins were purchased from Pamanes (Ensenada, Baja California, México) and maintained alive for several months in a 300 liter aquarium tank filled with artificial seawater (ASW). Sperm were obtained by intracoelomic injection of 1–2 ml of 0.5 M KCl, collected in a tube and kept on ice (dry sperm) until used. Artificial sea water (ASW) contained the following in mM: 486 NaCl, 10 CaCl_2 , 26 MgCl_2 , 10 KCl, 30 MgSO_4 , 10 HEPES, 2.5 NaHCO_3 and 0.1 EDTA-2Na (~1000 mOsm, pH 8). Sea water for immotile sperm was [49] ASW pH 6, containing 50 mM KCl and sea water with low calcium (1CaASW) was ASW pH 7.5 containing only 1 mM CaCl_2 . PhosphoSafe Extraction Reagent was from Novagen-MERK Biosciences, Complete EDTA-free (protease inhibitor cocktail) and Calpain inhibitors I and II were from ROCHE (Applied Sciences). Speract was synthesized in Dr. Possani's laboratory (Instituto de Biotecnología-UNAM, México). Primary antibodies raised in rabbit were Anti-Phospho-(Ser/Thr) PKA substrate (α -pPKAs) and Anti-Phospho-(Ser) PKC substrate (α -pPKCs) and were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The secondary peroxidase-labeled antibody (HRP) goat anti-rabbit IgG was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Molecular mass standards used in immunoblotting experiments were purchased from Fermentas International (Burlington, ON, Canada). The 0.45 μm pore size polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were obtained from Millipore (Billerica, MA). The enhancer chemiluminescence (ECL) detection kit was from PIERCE (Rockford, IL); Kodak Super MXB films were used. ReadyPrep 2-D Cleanup kit, the RC CD Protein Assay kit, Bio-Lyte pH 3–10 Ampholytes and immobilized pH gradient (IPG) strips pH 3–10 were from Bio-Rad (México). GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo Scientific, México) was used to stain the SDS denaturing polyacrylamide gels (SDS-PAGE). OptiPrep® Density Gradient Medium and all other chemicals were from Sigma (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) unless otherwise stated.

2.2. Isolation of low-density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fractions

Spines and coelomocytes were eliminated from dry sea urchin sperm (2 ml diluted 1:10 into 1CaASW) by centrifugation ($300 \times g$ 5 min 4 °C). The supernatant (spermatozoa) was divided into three equal portions and centrifuged at $3000 \times g$ 10 min 4 °C. The pellets (clean spermatozoa) were resuspended in ASW, ASW pH 6 containing 50 mM KCl (for immotile sperm) or ASW containing 10 nM Speract, and centrifuged at $60,000 \times g$ 10 min 4 °C. LD-DIMs were extracted and isolated [50] as described. Pellets of spermatozoa pre-exposed to different motility conditions were resuspended in 500 μl of TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA)/1% Triton X-100 containing protease and phosphatase inhibitor cocktails. The cells were incubated at 4 °C for 30 min and homogenized with 20 strokes into a glass Dounce homogenizer with a Teflon pestle (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). After separating the pellet by centrifugation ($1500 \times g$ /5 min at 4 °C), the supernatant (250 μl of total solubilized (TS)) was mixed with 500 μl of 60% OptiPrep (40% final concentration) over layered with 1.2 ml of 30% OptiPrep in TNE, 250 μl of 5% OptiPrep in TNE and finally 250 μl of TNE. The samples were centrifuged at $60,000 \times g$ for 2 h at 4 °C, and seven fractions of 360 μl were collected from the top to the bottom of the gradient (Fig. 1A).

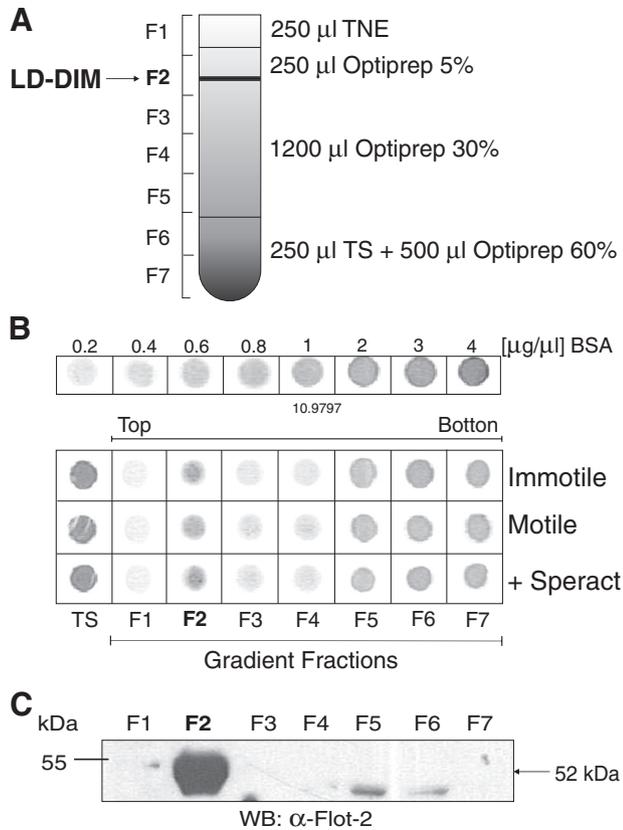


Fig. 1. Low density-detergent insoluble membranes (LD-DIM) from sperm. (A) OptiPrep gradient scheme showing the different OptiPrep concentrations in TNE buffer (see [Materials and methods](#) section), as well as, the LD-DIM localization after the gradient centrifugation. (B) Distribution of proteins (determined on filter paper stained with Coomassie brilliant blue R-250 as described – see [Materials and methods](#) section) in the OptiPrep gradient fractions (F1–F7) and total solubilized (TS) sperm proteins from immotile, motile and Speract-stimulated spermatozoa, extracted with 1% Triton X-100. Different BSA (Bovine Serum Albumin) concentrations from 0.2 to 4 μ g/ μ l were used as standards. (C) A representative Western blot experiment from three replicates shows that flotillin-2 (Flot-2) is mainly localized in the OptiPrep gradient F2 corresponding to LD-DIM as previously reported [50]. The arrow indicates the molecular weight of flotillin-2 (52 kDa).

2.3. Protein determination

Quantitative (RC CD Protein assay kit) [51] and qualitative (with Coomassie brilliant blue R250 on filter paper modified from) [52]. Briefly, for the qualitative determination, 1 μ l of proteins were loaded on filter paper (Whatman 3), which was left to dry and stained with 0.5% de Coomassie brilliant blue R250 in 50% methanol/5% acetic acid for 5 min. The filter paper was de-stained with 20% methanol/7.5% acetic acid for 30 min with gentle agitation. The protein determination was performed by comparing the intensity of the spots with a BSA standard curve (0.1–4 μ g/ μ l in the sample volume) run in parallel.

2.4. Two-dimensional gel electrophoresis

LD-DIM proteins (100 μ g) obtained from sea urchin sperm under different conditions (motile, immotile and Speract-stimulated) were desalted/cleaned with the ReadyPrep 2-D Cleanup kit (Bio-Rad, México) according to the manufacturer's instructions. The final protein pellets were resuspended in rehydration buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 2 \times Complete EDTA-free and 0.2% Bio-Lyte pH 3–10 Ampholytes). Ready Strip IPG strips (7 cm, linear pH 3–10; Bio-Rad, México) were layered gel side down onto samples placed in the Protean IEF tray (Bio-Rad, México). Strips were covered with 1 ml

of mineral oil, and were active-rehydrated for 16 h in a Protean IEF cell (Bio-Rad, México) at 50 V and 20 $^{\circ}$ C. After rehydration, isoelectric focusing in the IPG strips was carried out in a three-step ramping protocol for a total of 40 kV/h at 20 $^{\circ}$ C and a maximum current setting of 50 μ A per strip. The focused IPG strips were submerged for 15 min in equilibration buffer I (6 M Urea, 2% w/v SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 20% v/v glycerol) containing 1% w/v DTT on a shaker to reduce the proteins, followed by a 15 min incubation in equilibration buffer II containing 2.5% w/v iodoacetamide on a shaker to alkylate the proteins. The equilibrated IPG strips were loaded onto 7 cm \times 9 cm, 10% SDS-PAGE [53] for the molecular mass electrophoresis (2-D or second dimension). Strips were overlaid with 0.5% low melting agarose in SDS running buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 192 mM glycine, 0.1% SDS and 0.4% bromophenol blue) as a gel front indicator. SDS-PAGE was performed in a Tetra-Protean chamber (Bio-Rad, México) at 100 V for 2 h, where the three gels from each experiment were run at the same time. One of the gels was stained with colloidal Coomassie brilliant blue (GelCode Blue Safe Protein Stain) to visualize the protein spots and the other 2 gels were used for Western blots.

2.5. Western blotting

LD-DIM proteins resolved in 10% SDS-PAGE or 2-D mini gels under denaturing conditions (SDS-PAGE), were electrotransferred to Immobilon-P membranes (0.5 A/1 h in 190 mM glycine, 25 mM Tris base, pH 8.6) in a semi-dry transfer cell (Bio-Rad, México). After blocking with 5% BSA in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.6) containing 0.5% Tween-20 (TBS-T) at room temperature (2 h), the membranes were incubated with Phospho-(Ser/Thr) PKA substrate (α -pPKAs 1:500) or Phospho-(Ser) PKC substrate (α -pPKCs 1:500) antibodies overnight at 4 $^{\circ}$ C and washed 3 times with TBS-T and 3 more times (10 min) with TBS at room temperature. Immunodetected proteins were revealed with the ECL chemiluminescence kit from Pierce (Rockford, IL USA). The statistical analysis for the quantization of protein (2-D gels) and phosphorylation levels (WB) was performed with a *t*-test (unpaired comparison).

2.6. Protein identification by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Protein spots from the colloidal Coomassie brilliant-stained gels were excised from the gels and sent to the Proteomics Facility at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Canada. Protein spot cut fragments were washed and de-stained in 0.5 ml 50% methanol/5% acetic acid overnight at room temperature. Protein digestion was carried out according to the in-gel method with some modifications [54]. Excised gel spots were dehydrated in 100 μ l of acetonitrile (CH_3CN) for 5 min at room temperature, the supernatant was removed, and gel fragments were air-dried. Samples were rehydrated in 20 μ l of trypsin (25 ng/ μ l) until the solution was absorbed (10 min). Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3 , 50 mM) was added to completely cover the rehydrated gel and the samples incubated overnight at 37 $^{\circ}$ C. Thereafter, an additional 20 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 was added to the samples and incubated at room temperature for 10 min. The samples were then centrifuged and the extracts were transferred into empty 0.5 ml Eppendorf tubes. The gel spots were re-extracted with 20 μ l of extraction solution (5% formic acid in 50% CH_3CN) and incubated for 10 min at room temperature. The samples were then vortexed and centrifuged for 30 s. The supernatants were collected without disturbing the gel piece and combined with the previous extract. Protein digests were desalted by solid-phase extraction by means of a modified protocol for C18 Zip pipette tips from Millipore (Bedford, MA). For peptide binding and washing, the samples were aspirated 60 times, and peptides were eluted in 15 μ l of 1% formic acid in 50% CH_3CN . Peptide mixtures were analyzed by nano LC-MS/MS using a Finnigan MicroAS auto sampler and a Surveyor MS pump system coupled to an LTQ-Orbitrap (Thermo, San José, CA). Forty microliters of each mixture were loaded on a C18 pre-column (Symmetry300 C18 5 μ m, nano-Esi Trap Column, Waters,

Boston, MA) at 3 μ l/min for 15 min in 0.1% formic acid in 5% CH₃CN. Peptides were eluted using a 5–35% gradient of solvent B (0.1% formic acid in 100% CH₃CN) during 60 min at a flow rate of 300 nl/min with a BioBasic C18 PicoFrit column (PFC7515/BI/10, New Objective). Data-dependent acquisition mode was carried out with the Xcalibur software. A Fourier transformed (FT) full scan was acquired by means of the Orbitrap, from 300 to 1800 m/z with resolving power set at 30,000 (400 m/z). The 5 most intense peaks were sequentially isolated for the MS/MS experiments in the linear ion trap (LTQ) using collisionally-induced dissociation. Mass over charge ratio range was from 380 to 2000 for MS scanning with a target value of 1,000,000 charges and from \sim 1/3 of parent m/z ratio to 2000 for MS/MS scanning with a target value of 10,000 charges. The data-dependent scan events used a maximum ion fill time of 100 ms and 1 microscan. To prevent duplication of MS/MS data for the same peptide, dynamic exclusion was set to 2 and selected ions were placed on the exclusion list for 45 s. The MS/MS raw spectra data were converted to DTA files using Thermo Electron Bioworks 3.2 and analyzed by means of Turbo SEQUEST (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Nanospray and S-lens voltages were set to 0.9–1.8 kV and 50 V, respectively. Capillary temperature was set to 225 °C. MS/MS conditions were: normalized collision energy, 35 V; activation Q, 0.25; activation time, 10 ms.

2.7. Database searching

Tandem mass spectra were extracted by using the Mascot Daemon version 2.3.02 program. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version 2007.01.01.1). Mascot was set up to search the *S. Purpuratus*_20111201 database assuming the digestion enzyme trypsin. X! Tandem was set up to search a subset of the *S. Purpuratus*_20111201 database also assuming trypsin. Mascot and X! Tandem were searched with a fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 12 ppm. Oxidation of methionine and the iodoacetamide derivative of cysteine were specified in Mascot and X! Tandem as variable modifications.

2.8. Criteria for protein identification

Scaffold (Scaffold_4.0.5, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 50% probability by the Peptide Prophet algorithm [55] with Scaffold delta-mass correction. Mascot identifications required that ion scores be greater than the associated identity scores and 20, 15 and 15 for double, triple and quadruply charged peptides, respectively. X! Tandem identifications required at least $-\log$ (Expect) scores greater than 25. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% probability and contained at least 2 unique identified peptides.

3. Results

3.1. Isolation of low-density detergent-insoluble membranes (LD-DIM) from sea urchin sperm at different motility conditions

In this work, we used the LD-DIM from sea urchin sperm that were exposed to different motility conditions to identify proteins whose phosphorylation levels were associated with sperm motility regulation. Although several strategies had been used to isolate LD-DIM [35,45,56,50], in the present work, we used a combination of the methods described by Ohta et al. [45] and Yuan et al. [50]. LD-DIM were extracted by incubating sea urchin spermatozoa to the non-ionic detergent Triton X-100 at 4 °C and isolated by Optiprep gradient centrifugation. A schematic representation of the Optiprep gradient composition is shown in Fig. 1A. The LD-DIM were collected at the

inter-phase 5/30%, fraction 2 (F2, Fig. 1A). Analysis of the protein distribution in the Optiprep gradient revealed by the Coomassie brilliant blue R filter paper staining method shows that LD-DIM proteins from spermatozoa in the different motility conditions (immotile, motile and stimulated by Speract) were localized at F2 (Fig. 1B). The enrichment of LD-DIM in F2 was confirmed by immunodetection (Fig. 1C) and immunofluorescence (Fig. S1) with the antibody raised against Flotillin-2 (Flot-2), a LD-DIM marker protein separate from caveolae [57]. Besides, immunofluorescence experiments show that phosphorylated substrates for PKA (pPKAs) or PKC (pPKCs) are distributed along the sperm (Fig. S1). Fraction F7 contains the soluble fraction.

3.2. LD-DIM from intact sea urchin sperm contains PKA and PKC substrates whose phosphorylation depends on motility state

To analyze whether sperm motility state induces phosphorylation changes of PKA- or PKC-substrates in the LD-DIM fractions, we performed an immunoblotting assay with anti-Phospho-(Ser/Thr) PKA-substrate (α -pPKAs) and anti-Phospho-(Ser)PKC-substrate (α -pPKCs) antibodies. These antibodies detect proteins containing a phospho-serine/threonine or serine residue with arginine or lysine at the 3 or 2 positions and they are useful tools in identifying substrates of these protein kinases. The advantage of these antibodies is that they do not cross-react with non-phosphorylated PKA or PKC substrate motifs. In order to do so, we compared the phosphorylation profile of immunoblots from both (Fig. 2A, B) the LD-DIM and the soluble fractions (F7; bottom of the tube gradient, Fig. 1A) isolated from immotile, motile or Speract-stimulated sea urchin sperm probed with α -pPKAs (Fig. 2A) or α -pPKCs (Fig. 2B) antibodies. The right side of each blot shows the gel stained with Coomassie brilliant blue as a loading control of protein in each condition.

Various increases or decreases in phosphorylation levels of PKA (Fig. 2A) or PKC substrates (Fig. 2B) were observed in LD-DIM and in the soluble fraction (F7) obtained from sperm exposed to different motility conditions. In the immunoblots of LD-DIM isolated from the immotile (I) spermatozoa probed with the α -pPKAs antibody, four protein bands with a molecular size of 120, 80, 50 and 40 kDa were detected (Fig. 2A-WB LD-DIM). When sperm were transferred to ASW to become motile (M), the phosphorylation level of the 120 kDa protein increased, that of the 80 kDa protein disappeared and those of the protein bands of 50 and 40 kDa decreased (Fig. 2A-WB LD-DIM). When motile spermatozoa were stimulated by Speract (S), their isolated LD-DIM showed an increase in the phosphorylation level of the 120 kDa band, a reappearance of the 80 kDa substrate, a decrease in the band of 50 kDa and no change in the phosphorylation level of the 40 kDa protein (Fig. 2A-WB LD-DIM). It is interesting that none of the three pPKAs detected in the soluble fraction (F7) changed their phosphorylation levels with the motility conditions (Fig. 2A-WB F7), suggesting that PKAs in LD-DIM could be involved in the regulation of the sperm motility. These same changes were observed in three independent experiments.

Similar experiments with the α -pPKCs antibody, revealed seven main pPKCs (280, 148, 110, 95, 75, 55 and 40 kDa) whose phosphorylation level changed in LD-DIM from spermatozoa under different motility conditions (Fig. 2B-WB LD-DIM). When immotile (I) spermatozoa were activated (M) the phosphorylation level of all the pPKCs decreased (Fig. 2B, WB-LD-DIM), and similar results were obtained when stimulating with Speract (S) (Fig. 2B, WB LD-DIM), when compared to the LD-DIM derived from motile spermatozoa. A general reduction of the abundance of the pPKCs was evident in the soluble fraction (F7) from both motile and Speract-stimulated compared to the immotile spermatozoa (Fig. 2B, WB F7). These results suggest that some pPKAs and pPKCs associated to LD-DIM are motility state dependent. Previous reports claim that protein phosphorylation is important for sperm motility [9,11,12,26].

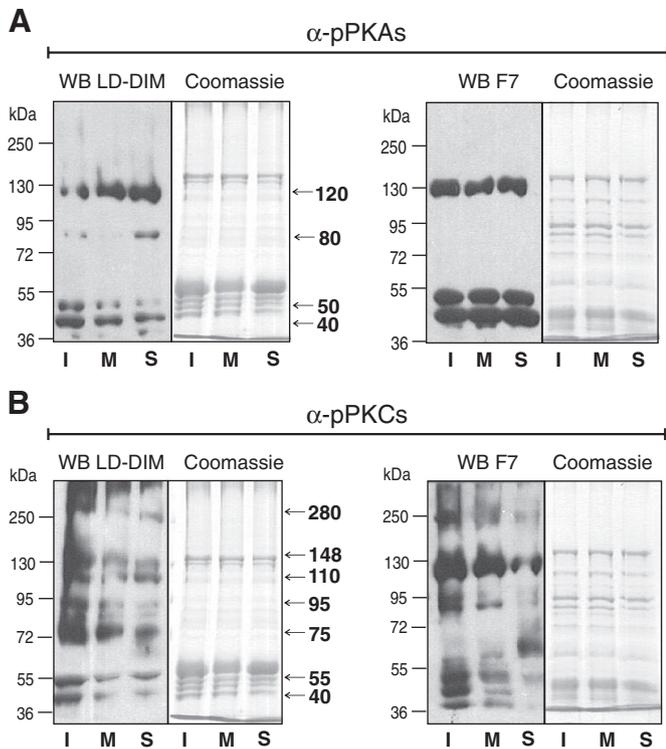


Fig. 2. Motility-associated phosphorylation changes of PKA and PKC substrates in LD-DIM from intact sperm. Western blot of (A) Phospho-(Ser/Thr) PKA substrates and (B) Phospho-(Ser) PKC substrates in isolated LD-DIM proteins (as described in [Materials and methods](#) section) from sperm in different motility conditions (I, immotile; M, motile and S, Speract-stimulated) and resolved in 10% SDS-PAGE. Arrows indicate the position of the motility-associated phosphorylated-PKA (120, 80, 50 and 40 kDa) or PKC (280, 148, 110, 95, 75, 55 and 40 kDa) substrates. F7 is the T-X100 soluble fraction from the Optiprep gradient. In (A) and (B) the blots (left side) are representative of three different isolated LD-DIM from different sea urchins. As a loading control on the right side of each blot the gels of the same condition stained with Coomassie brilliant blue is shown.

3.3. PKA and PKC substrates in LD-DIM from spermatozoa under different motility conditions separated in bi-dimensional gels (2-D gels)

In order to identify the proteins detected by antibodies either against pPKAs or pPKCs, we separated the LD-DIM proteins isolated from spermatozoa exposed to different motility conditions in 2-D gels. Each sample from the three independent experiments was run in triplicate. One

2-D gel was stained with colloidal Coomassie brilliant blue ([Fig. 3](#)) and the proteins of two more gels were transferred to PVDF membranes for Western blotting assays ([Figs. 4 and 5](#)). The electrophoretic pattern of the LD-DIM proteins from immotile ([Fig. 3A](#)); motile ([Fig. 3B](#)) or Speract-stimulated ([Fig. 3C](#)) spermatozoa was different, suggesting that changes in sperm motility correlate with re-localization of some proteins in LD-DIM. The Western blots of samples obtained under the described conditions and probed with the α -pPKAs antibody reveal different phosphorylation patterns between the LD-DIM proteins obtained from immotile ([Fig. 4A](#)), motile ([Fig. 4B](#)) and Speract-stimulated ([Fig. 4C](#)) spermatozoa. Three main spots detected with the antibody against substrates phosphorylated by PKA (pPKAs, ~75, 50 and <28 kDa) with different isoelectric points (pI) were observed in LD-DIM from immotile sperm ([Fig. 4A](#)), two (~50 kDa, with different pI) from motile sperm ([Fig. 4B](#)) and three pPKAs (two of ~50 kDa and one ~36 kDa) from spermatozoa stimulated by Speract ([Fig. 4C](#)). However, from all the detected pPKAs, spot 1 not only increased its phosphorylation level under different motility conditions but was also detected in the 2-D gels stained with Coomassie brilliant blue, a condition required to cut the spot for protein identification. This was corroborated by densitometry analysis of the phosphorylation levels ([Fig. 4D and E](#) gray bars) in the immunoblots ([Fig. 4A–C](#)) and of the corresponding spot abundance ([Fig. 4E](#) black bars) in the corresponding Coomassie brilliant blue-stained 2-D gel ([Fig. 3A–C](#)). The phosphorylation intensity average of spot 1 ([Fig. 4A–C](#)) increased with the activation of motility (2.5-fold) or in the sample stimulated by Speract (3-fold) ([Fig. 4E](#) gray bars). However, these changes were not significant.

The immunoblots from the LD-DIM proteins resolved in 2-D gels probed with the α -pPKCs antibody showed different PKC phosphorylation patterns from immotile ([Fig. 5A](#)), motile ([Fig. 5B](#)) and Speract-stimulated ([Fig. 5C](#)) spermatozoa. Although several PKC substrates were detected by the α -pPKCs antibody, we only focused on those whose phosphorylation levels varied with motility activation (spot 2, ~32 kDa; spot 3, ~55 kDa and spot 4, ~33 kDa) and were also detected in the 2-D gels stained with Coomassie brilliant blue. With the α -pPKCs antibody we detected that the phosphorylation level in spot 2 decreased 0.4-fold when immotile and motile sperm were compared, while a significant increase (0.8-fold) in phosphorylation was detected in this spot in samples from Speract-stimulated spermatozoa ([Fig. 5D](#)). The densitometry analysis of spot 3 ([Fig. 5E](#)) indicated no significant changes and 0.2-fold phosphorylation increase on PKC substrates in LD-DIM isolated from motile and Speract-stimulated sperm, respectively, compared with immotile sperm ([Fig. 5E](#)). Finally, in spot 4 ([Fig. 5F](#)) we observed that the PKC phosphorylation levels did not change or increase

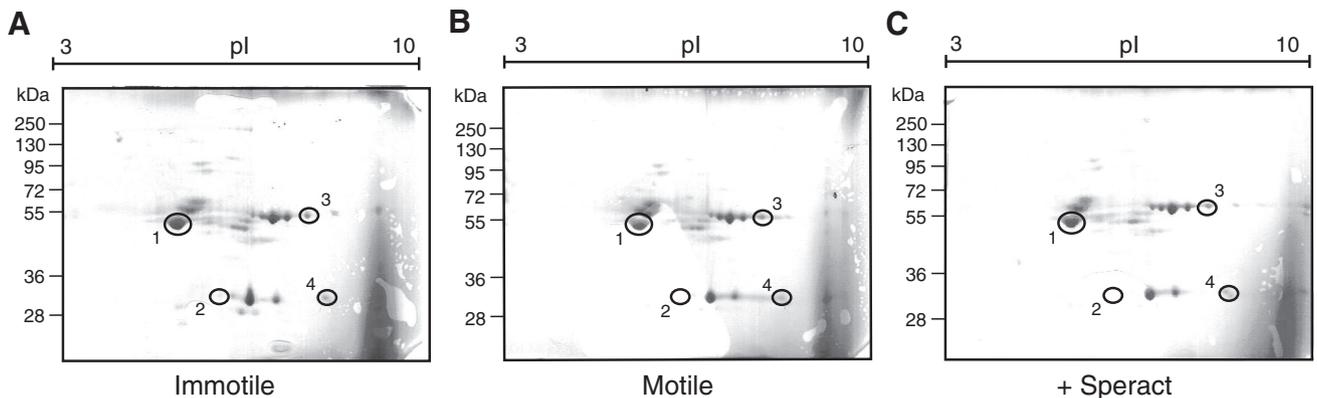


Fig. 3. LD-DIM proteins from immotile, motile and Speract-stimulated sperm resolved in two-dimensional gels (2-D gels). Electrophoretic pattern (Coomassie brilliant blue-stained gels) of LD-DIM proteins (100 μ g) isolated from spermatozoa exposed to immotile (A), motile (B) or Speract-stimulated (C) conditions resolved in 2-D gels. The proteins were separated based on their isoelectric point (pI; pH 3–10) in the first dimension and on 10% SDS-PAGE in the second dimension. The circles indicate the protein spots whose phosphorylation by either PKA (spot 1) or PKC (spots 2, 3 and 4) changed upon sperm motility activation. Gels are representative of five independent experiments with LD-DIM isolated from spermatozoa of different sea urchins.

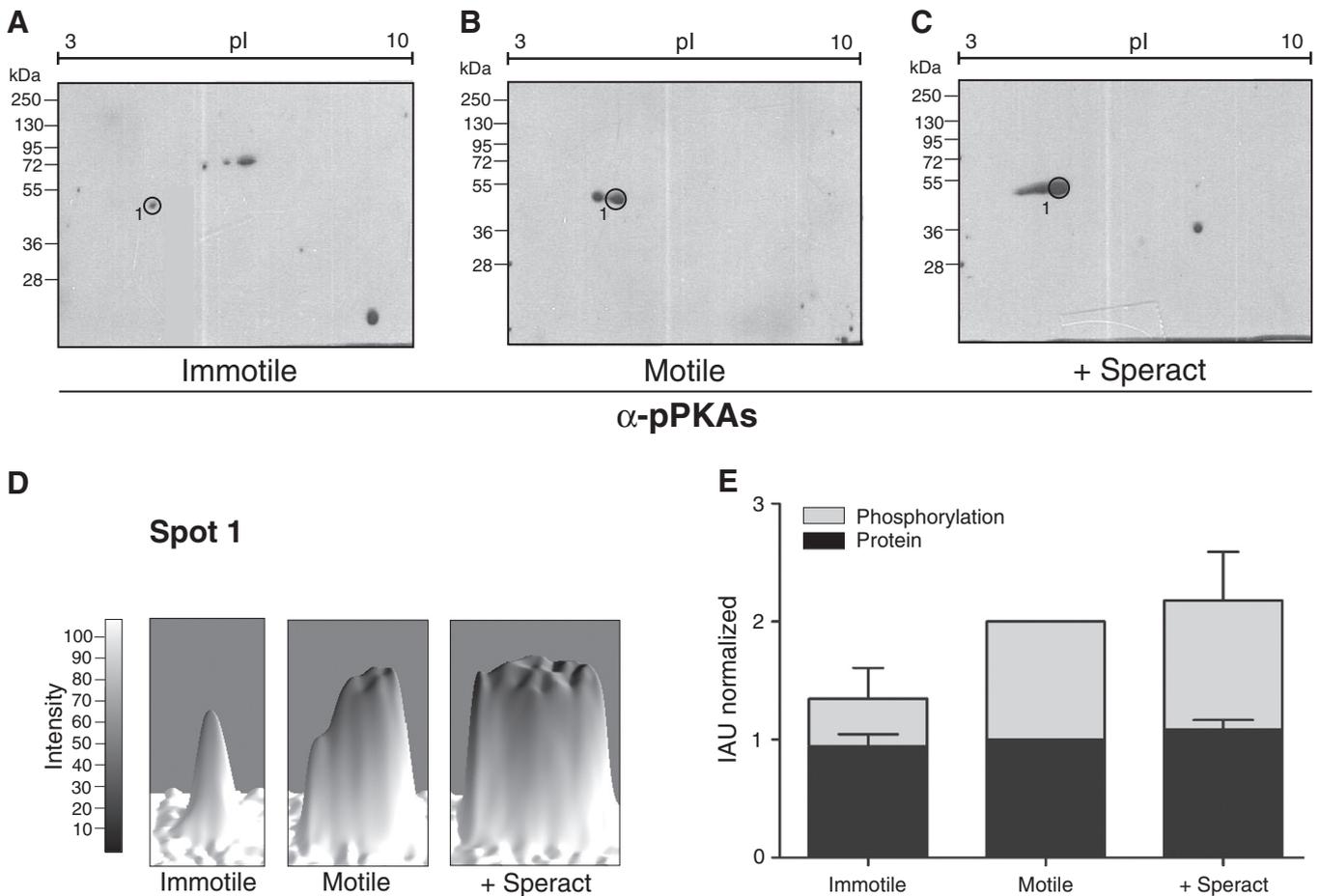


Fig. 4. PKA substrates' phosphorylation associated to sperm motility. Western blots representative of LD-DIM from immotile (A), motile (B) or Speract-stimulated (C) spermatozoa resolved in 2-D gels as described in Fig. 3, were probed with the α -pPKAs antibody. (A–C) Circle numbered 1 shows the Spot whose phosphorylation by PKA increased upon sperm motility. (D) Densitometry analysis of Spot 1 (A–C) phosphorylation intensity by using the ImageJ program (E) Intensity Arbitrary Units (IAU) of protein abundance on spot 1 (black bars) quantified by densitometry of three different Coomassie brilliant blue-stained gels (Fig. 3A–C), and the phosphorylation levels (gray bars) in the corresponding Western blot of a representative experiment is shown in A–C. Bars indicate the average \pm S.E.M normalized with respect to the motile condition. Spot 1 was cut from three different Coomassie brilliant blue-stained gels (Fig. 3A) with samples of LD-DIM isolated from spermatozoa of different sea urchins and sequenced by LC-MS/MS. Pictures are representative of three independent experiments with LD-DIM isolated from spermatozoa of different sea urchins.

significantly (2.3-fold) in LD-DIM isolated from motile and Speract-stimulated spermatozoa respectively, with respect to the immotile condition (Fig. 5F gray bars). These results suggest that the LD-DIM from sea urchin sperms contain proteins regulated by PKA and/or PKC that participate in the regulation of sperm motility.

3.4. Identification of the motility-associated PKA and PKC substrates from sea urchin sperm by LC-MS/MS

To identify the phosphorylated proteins recognized by the α -pPKA (spot 1; Fig. 4) and α -PKCs (spots 2, 3 and 4; Fig. 5) antibodies, the spots were cut from the corresponding Coomassie brilliant blue-stained 2-D gels (Fig. 3) and sequenced by LC-MS/MS at the Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Canada. A total of 21 different proteins were identified with a high level of confidence (Table S1) from the four spots sequenced. The proteins were categorized into five cellular compartments according to their Gene Ontology (GO) annotations: mitochondria (66%), axoneme (10%), cytoskeleton (10%), cytoplasm (10%) and plasma membrane (4%) (Fig. 6).

After sequence analyses of the LC-MS/MS-identified proteins with the NetPhos-K program, we found a total of nine phosphoproteins that were recognized by either the α -pPKAs (spot 1) or the α -pPKCs (spots 2, 3 and 4) antibodies (Table 1). Five PKA substrates were identified in spot 1; creatine kinase, succinyl-CoA ligase, PKA type II regulatory subunit, Tubulin β chain and Actin Cy I (Table 1). NADH

dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 and Tubulin β chain were identified as PKC substrates in spot 2; spot 3 contained only the mitochondrial ATP synthase α -subunit (Table 1). As expected, immunofluorescence experiments showed that the ATPase α - and β -subunits are restricted only to the sea urchin sperm mitochondria (Fig. S2). Finally we identified a voltage-dependent anion channel (VDAC2, spot 4) as a PKC substrate, located in the sea urchin sperm mitochondria and with a punctate pattern in the flagellum (Fig. S2). VDAC, originally found in the outer mitochondrial membrane [58], is also present in the plasma membrane [59], in caveolae-like domains [60], as well as in the outer dense fiber of the mammalian sperm flagellum [61]. Moreover, spots 3 and 4 contained 24 and 23 unique peptides from the protein ENSANGP00000009431 with high similarity to the LD-DIM marker Flotillin-2, which is not a PKCs (Table S1 [57]). The presence of this protein further corroborated that the Optiprep fraction 2 corresponds to the sea urchin sperm LD-DIM. It is important to consider that the level of phosphorylation detected by α -pPKAs or α -pPKCs in each spot is a balance of the phosphorylation/dephosphorylation of the different proteins present in the mentioned spots.

4. Discussion

LD-DIM are defined as small and heterogeneous microdomains that compartmentalize a plethora of cellular processes [30], even though the extraction protocol has been somewhat controversial [62,63]. To date,

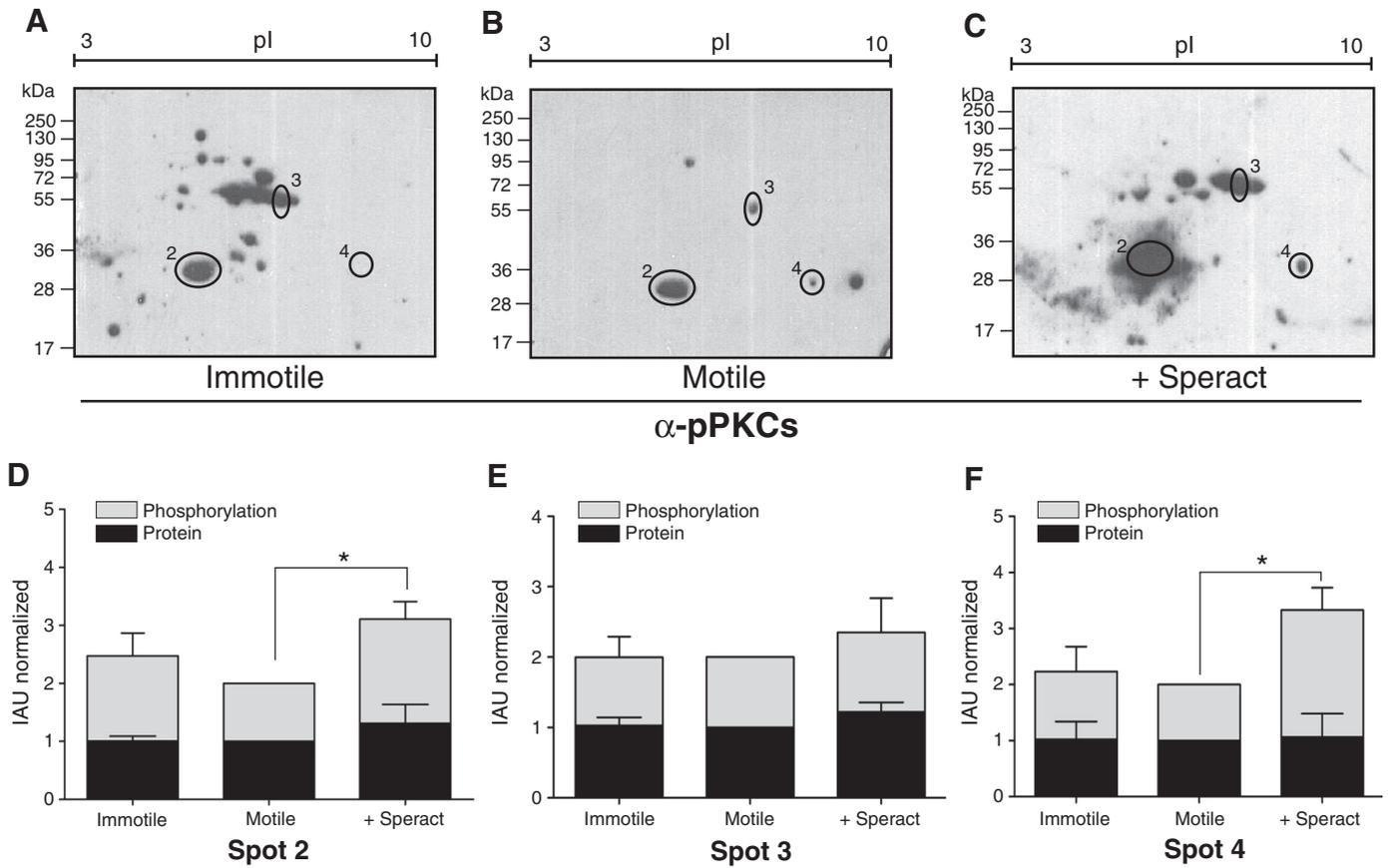


Fig. 5. PKC substrates' phosphorylation associated to sperm motility. Western blots representative of LD-DIM from immotile (A), motile (B) or Speract- stimulated (C) spermatozoa resolved in 2-D gels and probed with the α -pPKCs antibody. Circles 2, 3 and 4 show the spots whose phosphorylation levels increased with sperm motility as indicated by densitometry analysis (D, spot 2; E, spot 3 and F, spot 4). (D–F) Intensity Arbitrary Units (IAU) of protein (black bars) and phosphorylation (gray bars) levels of the corresponding spot were quantified by the ImageJ program, as described in Fig. 4. Bars show the average \pm S.E.M normalized with respect to the motile condition. spots 2, 3 and 4 were cut from the corresponding Coomassie brilliant blue-stained gels (as in Fig. 3A) and sequenced by LC–MS/MS. Blots are representative of four independent experiments with LD-DIM isolated from spermatozoa of different sea urchins. * $P \leq 0.05$.

evidence arguing for the existence of such microdomains has come from biophysical studies, the different strategies used for the isolation of the LD-DIM that involve detergent or not [35,64,56], the examination of the effects of cholesterol depletion, as well as, from the distribution of putative microdomain components in living cells [65,66].

It is known that LD-DIM act as platforms for the selective recruitment of key membrane proteins that participate in various cellular adhesion and signaling events in different type of cells [67]. In mammalian sperm, LD-DIM have been implicated in the acrosomal reaction (AR) [41] and capacitation [42,86,37]. In the ascidian *C. intestinalis*, LD-DIM

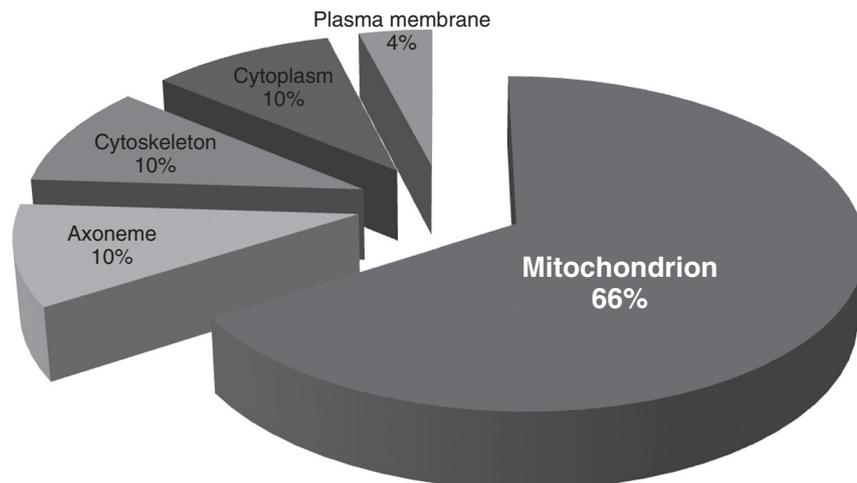


Fig. 6. Subcellular localization of the PKA and PKC phosphorylated proteins identified in isolated LD-DIM from sea urchin spermatozoa. Phosphorylated proteins in LD-DIM were from mitochondria (66%), axoneme (10%), cytoskeleton (10%), cytoplasm (10%) and the plasma membrane (4%).

Table 1
Proteins in LD-DIM from sea urchin spermatozoa detected with α -pPKAs or α -pPKCs that change their phosphorylation level with the sperm motility identified by LC-MS/MS.

Protein name	No. acc	TPN	UPN	Phosphorylation
<i>Spot 1 Phospho-(Ser/Thr) PKA substrate</i>				
*Creatine kinase	gi 72154204	22	12	0.75 S-188 by PKA
*Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] β subunit	gi 72015065	20	8	0.69 S-42 by PKA
*cAMP-dependent protein kinase (PKA) type II regulatory subunit	gi 47551027	14	6	0.84 S-81 by PKA
*Tubulin β chain	gi 72065171	11	5	0.72 S-322 by PKA
*Actin Cy I, cytoplasmic	gi 72167348	4	3	0.8 S-339 by PKA
<i>Spot 2 Phospho-(Ser) PKC substrate</i>				
*NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	gi 72007636	100	15	0.83 T-22 by PKC
*Tubulin β chain	gi 72065171	37	15	0.81 T-374 by PKC
<i>Spot 3 Phospho-(Ser) PKC substrate</i>				
*ATP synthase α subunit	gi 47551121	1360	64	0.79 T-253 by PKC
<i>Spot 4 Phospho-(Ser) PKC substrate</i>				
*Voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)	gi 72005582	34	12	0.91 T-107 by PKC

No. acc, accession number in NCBI; TPN, total peptide number of three experiments; UPN, exclusive unique peptide number of three experiments.

Phosphorylation, phosphorylation analysis with the NetPhos-K program indicating the score (being 1 the maximum) and amino acid phosphorylated by PKA or PKC.

participate in the Ca^{2+} signaling cascade of the sperm motility activation and chemotaxis [39]. However in sea urchin sperm, the function of LD-DIM had never been linked to sperm motility.

LD-DIM obtained from *S. purpuratus* sea urchin spermatozoa contained several proteins (Speract receptor, REJ-1, the 63 kDa GPI anchored protein, G_{sox} , AC, GC and PKA, all identified only by Western blot) that are important for sperm physiology. The results of co-immunoprecipitation experiments led the authors to suggest that the LD-DIM fraction might be a membrane microdomain where Speract interacts with its receptor, as well as, for the signal transduction pathways involved in sperm respiration, motility and the AR [45]. In addition, as some proteins from the Speract signaling cascade have potential phosphorylation sites [1] (i.e. GC [69], Tetra-KCNG channel [70], hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gate channel (SpHCN) [71], voltage-activated Ca^{2+} channels (Ca_v s) [72], sAC [73] and the phosphodiesterase (PDE) 5 [74]), and can be associated to lipid microdomains [68], we became interested in determining if sea urchin sperm LD-DIM contain PKA and/or PKC substrates whose phosphorylation changes with the state of sperm motility or after Speract binding to its receptor. In this work we showed that the PKA and PKC substrate phosphorylation patterns of LD-DIM proteins from sea urchin sperm exposed to different motility conditions change (Fig. 2). Similar results have been reported in mammalian [21,75] and sea urchin sperm [6,9,10]. However, these previous results were obtained using total solubilized sperm or sperm membranes, and antibodies to detect phosphorylation in general (for example pTyr, pThr or pS).

We used 2-D gels to resolve LD-DIM isolated proteins (Fig. 3) and observed that upon motility activation the electrophoretic pattern of LD-DIM proteins was modified, supporting the involvement of these microdomains in sperm motility [39]. Protein kinases, in coordination with protein phosphatases, play crucial roles in the regulation of signaling pathways [13], and these proteins have been found in sea urchin spermatozoa [5,7,76]. Moreover, sequence analysis of the *S. purpuratus* genome revealed the presence of 91 phosphatases and their potential functions in sea urchin [77], as well as, the presence of 353 protein kinases that include PKA and PKC [78]. Initial reports on protein phosphorylation/dephosphorylation were performed using demembrated spermatozoa [9–11], not a good condition to study the regulated activity of kinase/phosphatase as the integrity of the plasma membrane is important for cell signaling. It is important to point out that White et al. [12] found opposite results when comparing intact sperm from sea urchin with demembrated spermatozoa treated with detergent. For this reason, we used intact *S. purpuratus* sperm exposed to different motility conditions.

The phosphorylation pattern of the LD-DIM proteins separated in 2-D gels probed with α -PKAs (Fig. 4) showed that at least one of the spots (No. 1) increased its phosphorylation level with sperm

motility activation and Speract stimulation, in agreement with previous reports [9,10]. It is not surprising that sea urchin sperm LD-DIM contain phosphorylated proteins, since these microdomains recruit different signaling molecules such as AC (later identified as sAC [73]), PKA and the G_{sox} proteins, among others [45]. Moreover, both PKA [8] and cAMP-dependent protein phosphorylation [9] are important for sea urchin sperm motility [10]. To our knowledge, this is the first report on the identification of PKAs associated to LD-DIM from sea urchin spermatozoa.

As in Fig. 4 for PKAs, we observed motility-associated phosphorylation changes in three spots (2–4) of the LD-DIM separated in 2-D gels detected with α -pPKCs (Fig. 5). These results are in agreement with those obtained previously in *L. pictus* sperm where PKC-mediated phosphorylation is associated with the maintenance of sea urchin sperm motility [12].

It is interesting that 66% of the PKA/PKC substrates identified by LC-MS/MS in the LD-DIM isolated from spermatozoa in different motility conditions were mitochondrial proteins. This is the first report describing mitochondrial proteins as PKA- or PKC-substrates associated to LD-DIM from sea urchin spermatozoa. The main motility-associated phosphoprotein identified in LD-DIM from sea urchin sperm was the ATP synthase α subunit (Table 1; Spot 3; Fig. S2) located in the mitochondria. It is known that the ATPase α , β and δ subunits are regulated by phosphorylation in different cell types [79–81]. Moreover, the ATP synthase complex has been localized in the plasma membrane (reviewed in [82]) and in detergent-resistant lipid rafts by diverse tools in different cell types [46,83]. The other four mitochondrial PKC substrates whose phosphorylation level changed with sperm motility activation (Table 1) were: creatine kinase, succinyl-CoA ligase (Table 1; spot 1), NADH dehydrogenase (Table 1; spot 2) and VDAC2 (Table 1; spot 4).

Creatine kinase (CK) participates in sperm energy metabolism catalyzing the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphorylcreatine to ADP in order to generate ATP (reviewed in [84]) that supports flagellar dynein activity and sperm motility [85]. In humans there is an inverse correlation between sperm CK activity and number of spermatozoa [86]. CK is a key enzyme in sperm energy transport; however the relationship between [ATP] and fertility in human spermatozoa has not been established [87]. In the sea urchin spermatozoa, two CK isozymes were purified and characterized; one from the flagellum (T-CK) and another from the head, primarily located in the mitochondrion (Mi-CK) [88]. Though we identified Mi-CK associated to LD-DIM in sea urchin spermatozoa, there is no evidence for the presence of this enzyme in LD-DIM in other cell types. These results suggest that Mi-CK may participate in sea urchin sperm motility through PKC mediated phosphorylation. NADH dehydrogenase and succinyl-CoA ligase are enzymes that participate in sites I

and II of the mitochondrial electron transport chain, respectively, which are important to human sperm motility [89]. Isolated lipid rafts from rat liver or diverse mouse organs contain different subunits of the mitochondrial complexes I and II [46,83]. In addition, several complex I subunits undergo reversible phosphorylation (Reviewed in [90]). The role of these proteins at the LD-DIM of sea urchin sperm and other species requires further investigation.

VDAC2, a porin initially found in the outer mitochondrial membrane [58] was identified with the α -PKCs antibody in the LD-DIM derived from sea urchin sperm whose motility was either activated by dilution (1:10 into ASW) or stimulated by Speract (Table 1, spot 4). This channel is involved in metabolite and energy exchange between the cytosol and mitochondria, in the formation of the permeability transition pore and in apoptosis [91]. It is known that VDAC interacts with proteins from the cytoskeleton [92], possibly contributing to the flagella cytoskeleton integrity. Different isoforms of VDAC are located in several cell types (e.g. neurons, human multiple myeloma KM3 cells, human T lymphoid-like CEM cells; reviewed in [59,60]). They are also found in Sertoli and Leydig cells, spermatocytes, spermatids, in the outer dense fiber of bovine sperm flagellum [93] and in the head of bovine sperm [94]. Furthermore, it is known that the 1–3 isoforms of VDAC located in the human sperm flagella are essential for both normal structure and motility [61], that mice lacking VDAC3 are infertile due to sperm motility alterations [95] and that VDAC2 undergoes tyrosine phosphorylation during human sperm capacitation [20]. These data, and the fact that VDAC2 was detected by LC–MS/MS also in sea urchin sperm LD-DIM derived from isolated sea urchin flagellum (Loza-Huerta unpublished data) as well as the immunolocalization of this protein at the sperm (Fig. S2), support the participation of VDAC2 in sea urchin sperm motility.

Several proteomic analyses have identified a large number of mitochondrial proteins when isolating LD-DIM. These findings have suggested that either mitochondria contain LD-DIM or that they interact with the plasma membrane [96]. However, more recent work claims that mitochondria do not contain lipid rafts, and that lipid rafts do not contain mitochondrial proteins but that mitochondrial proteins are co-purifying contaminants of microdomain preparations [48]. More experiments are needed to clarify this issue. It could also be that in spermatozoa from sea urchin, the proximity between plasma and mitochondrial membranes as well as the strategy used to isolate the LD-DIM from these cells, lead to the co-purification of some mitochondrial proteins with the LD-DIM. However, this does not contradict the fact that the identified mitochondrial proteins are regulated by phosphorylation in order to influence sperm motility.

The PKA type II regulatory subunit (RII) we identified as a PKA substrate in LD-DIM from sea urchin sperm (Table 1, spot 1) located in the axonemal region of bovine sperm flagella [97] and in lipid rafts from adipocytes [98], is regulated by phosphorylation [99,100]. In vitro studies in cultured human cells showed that RII auto-phosphorylation alters its affinity for AKAPs (PKA-anchoring proteins) and for the PKA catalytic subunit [101]. Finally, we also identified the cytoskeletal Actin Cy I [102] and the Tubulin β chain [103] as PKA substrates in LD-DIM that changed their phosphorylation level with the sperm motility. All these findings indicate that protein phosphorylation by PKA is involved in sea urchin sperm motility regulation.

The single mitochondrion of sea urchin sperm has been implicated in motility and the AR by both the regulation of the intracellular Ca^{2+} concentration and the production of ATP [104,105]. This together with our results, suggests that the phosphorylation of some mitochondrial proteins via PKA and/or PKC modulates sea urchin sperm motility.

5. Conclusions

Our findings suggest that changes in the phosphorylation state of mitochondrial proteins that co-purify with the low density detergent-insoluble membranes (LD-DIM) participate in sea urchin sperm motility

regulation. This work opens new avenues for the study of the motility signaling pathway. Many questions remain to be answered regarding the relationship between sperm motility, the phosphorylation/dephosphorylation events in the mitochondria and the association of some mitochondrial proteins with LD-DIM.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.029>.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT (49113 to AD and CB) and DGAPA-UNAM (IN217409 and IN204112 to CB and IN109210 & IN202312 to AD). A. Loza-Huerta is a PhD student of the Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM program supported by CONACYT and DGAPA-UNAM.

References

- [1] A. Darszon, A. Guerrero, B.E. Galindo, T. Nishigaki, C.D. Wood, Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (2008) 595–606.
- [2] R. Christen, R.W. Schackmann, B.M. Shapiro, Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14881–14890.
- [3] R. Christen, R. Schackmann, B.M. Shapiro, Metabolism of sea urchin sperm, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5392–5399.
- [4] A. Guerrero, T. Nishigaki, J. Carneiro, T. Yoshino, C.D. Wood, A. Darszon, Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing, *Dev. Biol.* 344 (2010) 52–65.
- [5] C.H. Swarup, D.L. Garbers, Phosphoproteins phosphatase activity of sea urchin spermatozoa, *Biol. Reprod.* 960 (1982) 953–960.
- [6] A. Nakajima, M. Morita, A. Takemura, S. Kamimura, M. Okuno, Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axonemal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm, *J. Exp. Biol.* 208 (2005) 4411–4418.
- [7] J.S. Tash, M. Krinks, J. Patel, R.L. Means, C.B. Klee, A.R. Means, Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 1625–1633.
- [8] Y.H. Su, S.H. Chen, H. Zhou, V.D. Vacquier, Tandem mass spectrometry identifies proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase when sea urchin sperm undergo the acrosome reaction, *Dev. Biol.* 285 (2005) 116–125.
- [9] G.E. Bracho, J.J. Fritch, J.S. Tash, Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242 (1998) 231–237.
- [10] H. Murofushi, K. Ishiguro, D. Takahashi, J. Ikeda, H. Sakai, Regulation of sperm flagellar movement by protein phosphorylation and dephosphorylation, *Cell Motil. Cytoskeleton* 6 (1986) 83–88.
- [11] J. Tash, Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium, *Biol. Reprod.* 26 (1982) 745–763.
- [12] D. White, E. de Lamirande, C. Gagnon, Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa, *J. Exp. Biol.* 210 (2007) 4053–4064.
- [13] J. Graves, E. Krebs, Protein phosphorylation and signal transduction, *Pharmacol. Ther.* 82 (1999) 111–121.
- [14] S.K. Hanrs, T. Hunter, The eukaryotic protein kinase superfamily: (catalytic) domain structure and classification, *FASEB J.* 9 (1995) 576–596.
- [15] M. Thomson, Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 213–219.
- [16] D.J. Pagliarini, J.E. Dixon, Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 26–34.
- [17] R. Acin-Perez, E. Salazar, M. Kamenetsky, J. Buck, L.R. Levin, G. Manfredi, Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation, *Cell Metab.* 9 (2009) 265–276.
- [18] N. Deng, J. Zhang, C. Zong, Y. Wang, H. Lu, P. Yang, W. Wang, G.W. Young, Y. Wang, P. Korge, C. Lotz, P. Doran, D.A. Liem, R. Apweiler, J.N. Weiss, H. Duan, P. Ping, Phosphoproteome analysis reveals regulatory sites in major pathways of cardiac mitochondria, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011) 117–130.
- [19] R.K. Hopper, S. Carroll, A.M. Aponte, D.T. Johnson, S. French, R.-F. Shen, F.A. Witzmann, R.A. Harris, R.S. Balaban, Mitochondria matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium, *Biochemistry* 45 (2007) 2524–2536.
- [20] S. Ficarro, O. Chertihin, V.A. Westbrook, F. White, F. Jayes, P. Kalab, J.A. Marto, J. Shabanowitz, J.C. Herr, D.F. Hunt, P.E. Visconti, Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11579–11589.
- [21] E. Arcelay, A.M. Salicioni, E. Wertheimer, P.E. Visconti, Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (2008) 463–472.
- [22] K. Mitra, S. Shivaji, Novel tyrosine-phosphorylated post-pyruvate metabolic enzyme, dihydrolipoamide dehydrogenase, involved in capacitation of hamster spermatozoa, *Biol. Reprod.* 70 (2004) 887–899.
- [23] F. Longo, E. Anderson, Sperm differentiation in the sea urchin *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*, *J. Ultrastruct. Res.* 27 (1969) 486–509.

- [24] M. Mita, M. Nakamura, Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: an approach based on echinoid phylogeny, *Zool. Sci.* 15 (1998) 1–10.
- [25] K. Inaba, Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling, *Zool. Sci.* 20 (2003) 1043–1056.
- [26] A. Yoshimura, I. Nakano, C. Shingyoji, Inhibition by ATP and activation by ADP in the regulation of flagellar movement in sea urchin sperm, *Cell Motil. Cytoskeleton* 64 (2007) 777–793.
- [27] C. Dart, Lipid microdomains and the regulation of ion channel function, *J. Physiol.* 588 (2010) 3169–3178.
- [28] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 269–295.
- [29] M.A. Alonso, J. Millán, The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3957–3965.
- [30] K.G.N. Suzuki, Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 753–761.
- [31] A. Pristerá, K. Okuse, Building excitable membranes: lipid rafts and multiple controls on trafficking of electrogenic molecules, *Neuroscientist* 18 (2012) 70–81.
- [32] B. Bang, R. Gniatecki, B. Gajkowska, Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 14 (2005) 266–272.
- [33] M.Y. Lee, J.M. Ryu, S.H. Lee, J.H. Park, H.J. Han, Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2082–2089.
- [34] V. Michel, M. Bakovic, Lipid rafts in health and disease, *Biol. Cell* 99 (2007) 129–140.
- [35] A. Asano, V. Selvaraj, D.E. Buttke, J.L. Nelson, K.M. Green, J.E. Evans, A.J. Travis, Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts, *J. Cell. Physiol.* 218 (2009) 537–548.
- [36] N. Kawano, K. Yoshida, K. Miyado, M. Yoshida, Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis, *J. Lipids* 2011 (2011) 1–10.
- [37] C.D. Thaler, M. Thomas, J.R. Ramalie, Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation, *Mol. Reprod. Dev.* 73 (2006) 1541–1549.
- [38] K. Ohta, C. Sato, T. Matsuda, M. Toriyama, W.J. Lennarz, K. Kitajima, Isolation and characterization of low density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fraction from sea urchin sperm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (1999) 616–623.
- [39] L. Zhu, K. Inaba, Lipid rafts function in Ca^{2+} signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Mol. Reprod. Dev.* 78 (2011) 920–929.
- [40] M. Comiskey, C.M. Warner, Spatio-temporal localization of membrane lipid rafts in mouse oocytes and cleaving preimplantation embryos, *Dev. Biol.* 303 (2007) 727–739.
- [41] P.V. Miranda, A. Allaire, J. Sosnik, P.E. Visconti, Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 897–904.
- [42] B. Nixon, L.A. Mitchell, A.L. Anderson, E.A. McLaughlin, M.K. O'Bryan, R.J. Aitken, Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 2651–2665.
- [43] A. Travis, T. Merdiushev, L.A. Vargas, B.H. Jones, M.A. Purdon, R.W. Nipper, J. Galatioto, S.B. Moss, G.R. Hunnicutt, G.S. Kopf, Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa, *Dev. Biol.* 240 (2001) 599–610.
- [44] C.L. Treviño, C.J. Serrano, C. Beltrán, R. Felix, A. Darszon, Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm, *FEBS Lett.* 509 (2001) 119–125.
- [45] K. Ohta, C. Sato, T. Matsuda, M. Toriyama, V.D. Vacquier, W.J. Lennarz, K. Kitajima, Co-localization of receptor and transducer proteins in the glycosphingolipid-enriched, low density, detergent-insoluble membrane fraction of sea urchin sperm, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 205–214.
- [46] T.J. Bae, M.S. Kim, J.W. Kim, B.W. Kim, H.J. Choo, J.W. Lee, K.B. Kim, C.S. Lee, J.H. Kim, S.Y. Chang, C.Y. Kang, S.W. Lee, Y.G. Ko, Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface, *Proteomics* 4 (2004) 3536–3548.
- [47] L. Bini, S. Pacini, S. Liberatori, S. Valensin, M. Pellegrini, R. Raggiaschi, V. Pallini, C.T. Baldari, Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering, *Biochem. J.* 369 (2003) 301–309.
- [48] Y.Z. Zheng, K.B. Berg, L.J. Foster, Mitochondria do not contain lipid rafts, and lipid rafts do not contain mitochondrial proteins, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 988–998.
- [49] G.E. Bracho, J.J. Fritch, J.S. Tash, A method for preparation, storage, and activation of large populations of immotile sea urchin sperm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 59–62.
- [50] H. Yuan, E. Takeuchi, D.J. Salant, Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282 (2002) 585–591.
- [51] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (1951) 265–275.
- [52] L.S. Minamide, J.R. Bamburg, A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents, *Anal. Biochem.* 190 (1990) 66–70.
- [53] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [54] S.L. Hanna, N.E. Sherman, M.T. Kinter, J.B. Goldberg, Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Microbiology* 146 (2000) 2495–2508.
- [55] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5383–5392.
- [56] K. Song, S. Li, T. Okamoto, L.A. Quilliam, M. Sargiacomo, M.P. Lisanti, Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9690–9697.
- [57] G.P. Otto, B.J. Nichols, The roles of flotillin microdomains—endocytosis and beyond, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 3933–3940.
- [58] C.A. Mannella, M. Colombini, Evidence that the crystalline arrays in the outer membrane of *Neurospora* mitochondria are composed of the voltage-dependent channel protein, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 774 (1984) 206–214.
- [59] V. De Pinto, A. Messina, D.J.R. Lane, A. Lawen, Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1793–1799.
- [60] J.L. Herrera, M. Diaz, J.R. Hernández-Fernaudo, E. Salido, R. Alonso, C. Fernández, A. Morales, R. Marin, Voltage-dependent anion channel as a resident protein of lipid rafts: post-translational regulation by estrogens and involvement in neuronal preservation against Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 116 (2011) 820–827.
- [61] B. Liu, W. Zhang, Z. Wang, Voltage-dependent anion channel in mammalian spermatozoa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 (2010) 633–636.
- [62] K. Jacobson, O.G. Mouritsen, R.G. Anderson, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 7–14.
- [63] L.J. Pike, Lipid rafts: bringing order to chaos, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 655–667.
- [64] E.J. Smart, Y.S. Ying, C. Mineo, R.G. Anderson, A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 10104–10108.
- [65] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115 (2003) 377–388.
- [66] S. Schuck, M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. Simons, Resistance of cell membranes to different detergents, *PNAS* 100 (2003) 5795–5800.
- [67] P. Lajoie, J.G. Goetz, J.W. Dennis, I.R. Nabi, Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 381–385.
- [68] S.B. Sleight, P.V. Miranda, N.W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scrabble, J.C. Herr, P.E. Visconti, Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 721–729.
- [69] G.E. Ward, G.W. Moy, V.D. Vacquier, Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 95–101.
- [70] B.E. Galindo, J.L. de la Vega-Beltrán, P. Labarca, V.D. Vacquier, A. Darszon, Sp-tetraKNGC: a novel cyclic nucleotide gated K^{+} channel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 668–675.
- [71] B.E. Galindo, A.T. Neill, V.D. Vacquier, A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 96–101.
- [72] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 521–555.
- [73] M. Nomura, C. Beltrán, A. Darszon, V.D. Vacquier, A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa, *Gene* 352 (2005) 231–238.
- [74] Y. Su, V.D. Vacquier, Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 114–121.
- [75] L. González-Fernández, C. Ortega-Ferrusola, B. Macías-García, G.M. Salido, F.J. Peña, J.A. Tapia, Identification of protein tyrosine phosphatases and dual-specificity phosphatases in mammalian spermatozoa and their role in sperm motility and protein tyrosine phosphorylation, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 1239–1252.
- [76] M. Lee, R. Iverson, Protein kinase in sea urchin gametes and embryos, *Exp. Cell Res.* 75 (1972) 300–304.
- [77] C.A. Byrum, K.D. Walton, A.J. Robertson, S. Carbonneau, R.T. Thomason, J.A. Coffman, D.R. McClay, Protein tyrosine and serine-threonine phosphatases in the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: identification and potential functions, *Dev. Biol.* 300 (2011) 194–218.
- [78] C. Bradham, K.R. Foltz, W.S. Beane, M.I. Arnone, F. Rizzo, J.A. Coffman, A. Mushegian, M. Goel, J. Morales, A.M. Genevieve, F. Lapraz, A.J. Robertson, H. Kelkar, M. Loza-Coll, I.K. Townley, M. Raisch, M.M. Roux, T. Lepage, C. Gache, D.R. McClay, et al., The sea urchin kinase: a first look, *Dev. Biol.* 300 (2006) 180–193.
- [79] K. Højlund, K. Wrzesinski, P.M. Larsen, S.J. Fey, P. Roepstorff, A. Handberg, F. Dela, J. Vinten, J.G. McCormack, C. Reynet, H. Beck-Nielsen, Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10436–10442.
- [80] A. Struglics, K.M. Fredlund, I.M. Møller, J.F. Allen, Two subunits of the F0F1-ATPase are phosphorylated in the inner mitochondrial membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 664–668.
- [81] I.Y. Subota, S. Arziev, G. Nevinsky, Y.M. Konstantinov, Effect of redox conditions on the synthesis and phosphorylation of β -subunit of mitochondrial F_0F_1 -ATPase of maize (*Zea mays*), *Biochem. Biophys. Mol. Biol.* 438 (2011) 144–146.
- [82] P. Cortés-Hernández, L. Domínguez-Ramírez, A. Estrada-Bernal, D.G. Montes-Sánchez, A. Zentella-Dehesa, M.T. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, J.J. García, The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 844–849.
- [83] K.B. Kim, J.W. Lee, C.S. Lee, B.W. Kim, H.J. Choo, S.Y. Jung, S.G. Chi, Y.S. Yoon, Y.G. Ko, Oxidation-reduction respiratory chains and ATP synthase complex are localized in detergent-resistant lipid rafts, *Proteomics* 6 (2006) 2444–2453.
- [84] T. Wallimann, W. Hemmer, Creatine kinase in non-muscle tissues and cells, *Mol. Cell. Biochem.* 133–134 (1994) 193–220.
- [85] F. Dorsten, M. Wyss, T. Wallimann, K. Nicolay, Activation of sea-urchin sperm motility is accompanied by an increase in the creatine kinase exchange flux, *Biochem. J.* 325 (1997) 411–416.
- [86] G. Huszar, L. Vigue, M. Corrales, Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic, and oligospermic men, *Biol. Reprod.* 38 (1988) 1061–1066.
- [87] C. Vigue, L. Vigue, G. Huszar, Adenosine triphosphate (ATP) concentrations and ATP/adenosine diphosphate ratios in human sperm of normospermic, oligospermic, and asthenospermic specimens and in their swim-up fractions: lack of correlation between ATP parameters and sperm creatine kinases, *J. Androl.* 13 (1992) 305–311.

- [88] R.M. Tombes, B.M. Shapiro, Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 16011–16019.
- [89] E. Ruiz-Pesini, C. Diez, A.C. Lapeña, A. Pérez-Martos, J. Montoya, E. Alvarez, J. Arenas, M.J. López-Pérez, Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities, *Clin. Chem.* 44 (1998) 1616–1620.
- [90] R.J.R.J. Janssen, L.G. Nijtmans, L.P. Van den Heuvel, J.A.M. Smeitink, Mitochondrial complex I: structure, function and pathology, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 499–515.
- [91] J. Kerner, K. Lee, B. Tandler, C.L. Hoppel, VDAC proteomics: post-translation modifications, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1520–1525.
- [92] R. Guzun, M. Gonzalez-Granillo, M. Karu-Varikmaa, A. Grichine, Y. Usson, T. Kaambre, K. Guerrero-Roesch, A. Kuznetsov, U. Schlattner, V. Saks, Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within mitochondrial interactosome, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1545–1554.
- [93] K.D. Hinsch, V. De Pinto, V.A. Aires, X. Schneider, A. Messina, E. Hinsch, Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15281–15288.
- [94] X. Triphan, V.A. Menzel, A.M. Petrunkina, M.C. Cassará, W. Wemheuer, K.D. Hinsch, E. Hinsch, Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa, *Eur. J. Physiol.* 455 (2008) 677–686.
- [95] M.J. Sampson, W.K. Decker, A.L. Beaudet, W. Ruitenbeek, D. Armstrong, M.J. Hicks, W.J. Craigen, Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39206–39212.
- [96] K.A. McMahon, M. Zhu, S.W. Kwon, P. Liu, Y. Zhao, R.G.W. Andersom, Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria, *Proteomics* 6 (2006) 143–152.
- [97] S. Vijayaraghavan, G.E. Olson, S. NagDas, V.P. Winfrey, D.W. Carr, Subcellular localization of the regulatory subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatozoa, *Biol. Reprod.* 57 (1997) 1517–1523.
- [98] F. Ahmad, R. Lindh, Y. Tang, I. Ruishalme, A. Ost, B. Sahachartsiri, P. Strålfors, E. Degerman, V.C. Manganiello, Differential regulation of adipocyte PDE3B in distinct membrane compartments by insulin and the beta3-adrenergic receptor agonist CL316243: effects of caveolin-1 knockdown on formation/maintenance of macromolecular signalling complexes, *Biochem. J.* 424 (2009) 399–410.
- [99] J.V. Olsen, M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, M. Mann, Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis, *Sci. Signal.* 3 (2010) 1–16.
- [100] K.T.G. Rigbolt, T.A. Prokhorova, V. Akimov, J. Henningsen, P.T. Johansen, I. Kratchmarova, M. Kassem, M. Mann, J.V. Olsen, B. Blagoev, System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation, *Sci. Signal.* 4 (2011) 1–18.
- [101] S. Manni, J.H. Mauban, C.W. Ward, M. Bond, Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 24145–24154.
- [102] R.L. Morris, M.P. Hoffman, R.A. Obar, S.S. McCafferty, I.R. Gibbons, A.D. Leone, J. Cool, E.L. Allgood, A.M. Musante, K.M. Judkins, B.J. Rossetti, A.P. Rawson, D.R. Burgess, Analysis of cytoskeletal and motility proteins in the sea urchin genome assembly, *Dev. Biol.* 300 (2006) 219–237.
- [103] R.F. Luduena, D.O. Woodward, Isolation and partial characterization of alpha and beta-tubulin from outer doublets of sea-urchin sperm and microtubules of chick-embryo brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 3594–3598.
- [104] R.W. Schackmanns, P.B. Chock, Alteration of Intracellular $[Ca^{2+}]$ in Sea Urchin Sperm by the Egg Peptide Speract, *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1986) 8719–8728.
- [105] F. Ardón, E. Rodríguez-Miranda, C. Beltrán, A. Hernández-Cruz, A. Darszon, Mitochondrial inhibitors activate influx of external Ca^{2+} in sea urchin sperm, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (2009) 15–24.