



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio bioquímico y filogenético del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Francisco Romero Corpus

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Nina Pastor Colón
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)
Dra. Gloria Saab Rincón
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos.
Noviembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio dieciséis “Consortio de Fisiología del Espermatozoide” del departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la supervisión del Dr. Takuya Nishigaki Shimizu.

Para la realización de este proyecto se recibieron los siguientes apoyos:

- Beca CONACyT para programa de posgrado con número de CVU 350245.
- Donativo CONACyT CB-2012-177138.
- Donativo DGAPA-PAPIIT IN206116.
- Donativo UC-MEXUS-CONACyT Fornteras 71 y CN-16-56.

Este trabajo recibió la siguiente asesoría

Asesoría técnica en laboratorio:

M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara.
Lic. Jorge A. Blancas Naranjo.
M. en C. Paulina Torres Rodríguez.
Biol. José Luis de la Vega Beltrán.

Auxiliar de laboratorio:

Miguel A. Trujillo.

Apoyo administrativo:

Leonel Linares Labastida.
Cinthya Olvera.

Servicio de Cluster del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

M. C. Jerome Jean Verleyen.
<http://teopanzolco.ibt.unam.mx/>

Unidad de docencia y formación de recursos humanos del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

Ing. Jalil Saab.
Lic. J. Antonio Bolaños Guillen.
Gloria Villa Herrera.
Pedro Saucedo.

Servicios computacionales:

M. en T. I. Juan Manuel Hurtado.
MEM. David Santiago Castañeda Carreón.
Ing. Roberto Rodríguez.
Arturo Ocadiz.

Unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

Dr. Ruben Paul Gaytan Colín.
M. en C. Jorge Arturo Yáñez.
M. en C. Eugenio López Bustos.

Biblioteca:

B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth.
Lic. I. Omar Arriaga.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN.....	17
SUMMARY.....	18
INTRODUCCIÓN.....	19
Comunicación celular previo a la fecundación entre el ovulo y el espermatozoide.....	19
El espermatozoide.....	20
Hiperactivación del flagelo.....	21
Control molecular de la hiperactivación del batido flagelar.....	22
CatSper, un canal de Ca ²⁺ regulado por pH citoplasmático y adenosín monofosfato cíclico.....	23
CAPÍTULO I. Ensayo para estudiar la interacción molecular entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y un análogo de adenosín monofosfato cíclico, mediante mediciones de transferencia de energía entre dos fluoróforos.....	27
ANTECEDENTES.....	27
Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD).....	27
Estudio de la interacción ligando-receptor utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia.....	29
Transferencia de energía de resonancia <i>Föster</i> (FRET), Anisotropía y fluoróforos sensibles a la polaridad del ambiente.....	29
Transferencia de energía de resonancia <i>Föster</i>	29
Anisotropía.....	31
Fluoróforos sensibles a la polaridad del ambiente.....	32
Determinación de la actividad de un CNBD.....	32
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34

Reactivos.....	34
Equipo de espectrofluorimetría.....	34
Preparación y purificación de la proteína recombinante CNBD acoplada a la proteína fluorescente cian (CNBD-CFP).....	35
Mediciones de las cinéticas de unión.....	36
Determinación de la constante de disociación al equilibrio.....	36
Estimación de las afinidades aparentes mediante ensayos de competencia con análogos de nucleótidos cíclicos sin marca fluorescente.....	37
RESULTADOS.....	38
Descripción del diseño experimental.....	38
Ensayo de unión tipo FRET de proteína no purificada.....	40
Determinación de k_{on} y k_{off}	42
Determinación de la K_d al equilibrio.....	43
Curva de competencia con análogos de cNMP.....	44
Expresión heteróloga del C-terminal del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide de ratón.....	45
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	47
CAPÍTULO II: Análisis de genómica comparativa entre el canal de Ca^{2+} CatSper, el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide y la adenilato ciclasa soluble.....	48
ANTECEDENTES.....	48
Evolución de los canales CatSper.....	48
Evolución de la adenilato ciclasa soluble y dependencia funcional del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide y la adenilato ciclasa soluble.....	49
HIPÓTESIS.....	50
OBJETIVO GENERAL.....	50
OBJETIVOS PARTICULARES.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
Minería de base de datos y selección de especies.....	50

Sintenia e identificación de pseudogenes.....	51
Análisis filogenético del sNHE y la sAC.....	52
Análisis de motivos y dominios en las secuencias de la sAC.....	54
RESULTADOS.....	54
Relación evolutiva entre la sAC, el sNHE y CatSper en Metazoa.....	54
Distribución del NHA.....	64
DISCUSIÓN.....	65
Coevolución de CatSper, el sNHE y la sAC en Metazoa.....	65
El dominio sensible a voltaje del sNHE.....	66
La importancia de los grupos intermedios entre -Todo- y -Nada-, y el caso particular del Tinamú blanco y el Kiwi marrón.....	68
Regulación de CatSper en el grupo de los no-metazoarios.....	69
CONCLUSIONES.....	69
APORTACIONES Y PERSPECTIVAS.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación gráfica del proceso de fecundación. El evento de fecundación se divide en 1) activación de la movilidad, 2) quimiotaxis y/o reotaxis, 3) hiperactivación, 4) unión a la capa externa, 5) reacción acrosomal, 6) penetración, 7) fusión de ambas membranas, 8) reacción cortical y 9) fusión de los pronúcleos.....20

Figura 2: Diagrama general del espermatozoide de mamífero. El espermatozoide se compone por la cabeza, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La cabeza está compuesta por el acrosoma, el núcleo, la envoltura nuclear redundante y el flagelo se compone principalmente por el axonema y las mitocondrias.....21

Figura 3: Propiedades y función de la hiperactivación. A. Forma del flagelo y dirección del nado (flechas) durante la motilidad activada y motilidad hiperactivada en espermatozoides nadando en un medio experimental de baja viscosidad. B. Relevancia fisiológica de la hiperactivación del espermatozoide i) Nado progresivo en medio viscoelástico en el tracto reproductor femenino ii) liberación del espermatozoide del reservorio del istmo y avance hacia el sitio de fecundación y iii) penetración por las células del cúmulus y la zona pelúcida.22

Figura 4: Representación gráfica de CatSper de mamíferos. CatSper está constituido por 4 subunidades α (1-4) y 5 subunidades auxiliares (β , γ , δ , ϵ y ζ).....23

Figura 5: Representación gráfica del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). El sNHE está compuesto por un dominio catalítico, un dominio sensible a voltaje y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos.....24

Figura 6: Representación gráfica de la adenilato ciclasa soluble (sAC). A. La sAC es un proteína que produce cAMP a través de ATP, esta proteína está regulada por la unión alostérica de HCO_3^- . B. La sAC de humano está compuesta por dos dominios catalíticos (C1 y C2) y un dominio P-loop NTPasa (P-loop) (Leipe *et al.*, 2003).....25

Figura 7: Modelo de regulación del batido flagelar en mamíferos. El incremento de bicarbonato intracelular activa a la sAC produciendo cAMP, el incremento de cAMP activa al sNHE a través del CNBD, la actividad del sNHE incrementa el pHc regulando positivamente la actividad de CatSper y promueve la hiperactivación (modificado de (Navarro et al., 2008)).
26

Figura 8: Representación gráfica del dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). A. El CNBD se puede dividir en dos dominios por separados, el dominio α (verde) y el dominio β (púrpura). El dominio α , es la región de hélices α accesorias del CNBD que transduce la señal a la proteína asociada en respuesta a la unión de un cNMP. El dominio β está conformado por un núcleo de 8 β plegadas, el cual forma la cavidad donde se coordina la unión del cNMP (Rehmann *et al.*, 2007). B. Mecanismo de acción de los CNBDs en respuesta a la unión de un cNMP. El mecanismo por el cual el CNBD responde ante la unión de un cNMP se puede resumir en tres pasos, 1) El PBC coordina la unión del fosfato del cNMP, 2) se promueve un cambio conformacional en el dominio α , esto da inicio a la transducción de la señal del CNBD a la proteína asociada y 3) un cambio de conformación de la bisagra y de la tapa estabilizan la unión entre el CNBD y el cNMP.....28

Figura 9: La transferencia de energía de resonancia de *Föster*. A. El espectro de emisión del donador debe sobrelapar en parte con el espectro de excitación del aceptor. B. La distancia entre los fluoróforos debe ser menor a 10 nm. C. La interacción entre el complejo ligando-receptor reducirá la intensidad de fluorescencia del donador e incrementará la intensidad del aceptor, debido al fenómeno de transferencia de energía resonante. D. La E_{FRET} decae fuertemente conforme el donador y el aceptor se alejan.....30

Figura 10: Anisotropía. A. Cuando un fluoróforo se excita en solución por luz polarizada, la fluorescencia emitida se mantiene polarizada a cierto grado. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de anisotropía B. La anisotropía está relacionada con el tamaño aparente de una molécula fluorescente en una solución, es decir que el valor de anisotropía aumenta cuando la masa molecular se incrementa, como ocurre en el caso de las interacciones entre moléculas.....31

Figura 11: Pueden ocurrir dos fenómenos en el espectro del fluoróforo cuando pasa al estado relajado (R), debido a efectos de la polaridad del ambiente. A. Cambios en la intensidad de fluorescencia cuando el fluoróforo pasa al estado relajado. B. Cambios en la longitud de onda de emisión cuando el fluoróforo pasa al estado relajado. C. Durante la interacción ligando-receptor, entre un fluoróforo acoplado a un ligando (8-NBD-cAMP) y un receptor (EPAC1) la fluorescencia del NBD aumenta conforme se titula con mayor concentración de receptor (Kraemer *et al.*, 2001).....32

Figura 12: Espectros de emisión y excitación de EPAC_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP.....38

Figura 13: Empalme entre el espectro de emisión de CFP (EPAC_{CNBD}-CFP) y el espectro de excitación de Fluoresceína y (8-Fluo-cAMP).....39

Figura 14: Resumen gráfico sobre la estrategia experimental. A. 1) Cuando la quimera EPAC1_{CNBD}-CFP es excitada a 440nm en ausencia de 8-Fluo-cAMP, la intensidad de fluorescencia que observamos corresponde a CFP, 2) mientras que cuando está en presencia del análogo fluorescente de cAMP y hay unión entre éste y la proteína recombinante ocurre FRET y 3) para determinar que la unión es específica entre el CNBD y el análogo fluorescente de cAMP se compite con un exceso de un análogo no fluorescente de cAMP (8-CPT-cAMP). B. El complejo de unión entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP tiene una E_{FRET} mayor que 80% (flecha azul).....40

Figura 15: Ensayo de unión tipo FRET en presencia (línea negra) y en ausencia (línea roja) de exceso del competidor 8-CPT-cAMP A. Quimera no purificada de EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP. B. Quimera purificada de EPAC1_{R279E}-CFP y 8-Fluo-cAMP. C. Quimera CAP_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP.....41

Figura 16: Ensayo de unión mediante stopped-flow. A. Cinética de disociación ante la adición de 10 mM de 8-CPT-cAMP al complejo EPAC1_{CNBD}-CFP/8-Fluo-cAMP (100 nM) (puntos negros). B. Cinética de unión al mezclar 100 nM de EPAC1_{CNBD}-CFP y 100 nM 8-Fluo-cAMP (puntos negros). Los valores teóricos (línea roja) fueron determinados como se describe en

materiales y métodos. Los recuadros (línea azul) muestran la diferencia entre los resultados obtenidos experimentalmente y los valores teóricos del ajuste.....42

Figura 17: Determinación de la K_d a través de FRET y Anisotropía. A. Determinación de la constante K_d al equilibrio mediante FRET. Los ensayos de unión al equilibrio fueron realizados manteniendo una relación estequiométrica 1:2 de EPAC1_{CNBD}-CFP/8-Fluo-cAMP en diferentes concentraciones. La eficiencia de FRET fue graficada en función de la concentración total de EPAC1_{CNBD}-CFP (círculos). La fracción de EPAC1_{CNBD}-CFP unida a 8-Fluo-cAMP es indicada con la línea punteada a partir de 0 a 1. El valor de K_d fue determinado como se describe en materiales y métodos. El mejor ajuste está indicado con una línea negra. B. Determinación de la constante K_d al equilibrio mediante anisotropía. La eficiencia de FRET fue graficada en función de la concentración total de 8-Fluo-cAMP (círculos). El valor de anisotropía de 100 nM de 8-Fluo-cAMP en solución está indicado con la línea punteada. El valor de K_d fue determinado como se describe en materiales y métodos. El mejor ajuste está indicado con una línea negra.....43

Figura 18: Curvas de unión de distintos cNMPs como competidores. Las intensidades de fluorescencia de CFP fue determinado mediante un lector de placas a partir en presencia de 4 distintos competidores a distintas concentraciones como se describe en materiales y métodos. 8-CPT-cAMP (triángulos abiertos), cAMP (triángulos cerrados), 8-CPT-cGMP (círculos abiertos) y cGMP (círculos cerrados).....45

Figura 19: A. Distribución filogenética de CatSper en metazoarios (Cai & Clapham, 2008). B. Distribución filogenética de CatSper en no metazoarios (Cai & Clapham, 2012; Cai et al., 2014). Los recuadros grises con línea continua representan los grupos taxonómicos que conservan CatSper, mientras que los recuadros vacíos con línea punteada indican los grupos sin CatSper.....49

Figura 20: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los eucariontes. El árbol representa los grupos taxonómicos de los Metazoa (caja verde) y no-metazoarios (caja púrpura). Los grupos taxonómicos con cajas abiertas tienen variedad en la distribución dentro del grupo. Los

homólogos del sNHE y la sAC están representados con cajas llenas a la mitad, azul y rojo respectivamente. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.....56

Figura 21: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en las aves. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.....57

Figura 22: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los peces. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.....58

Figura 23: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los artrópodos. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.....58

Figura 24: Análisis filogenético y la composición de dominios del sNHE y sus homólogos. La historia evolutiva se infirió entre los ortólogos y homólogos del sNHE. El árbol está dibujado a escala, se muestra el árbol con la mayor probabilidad y la longitud de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. Los puntos rojos en las ramas indican que el valor de *bootstrapping* es mayor al 50%. Se usó una distribución discreta Gamma de dos categorías para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios (+G, parámetro = 1.73).59

Figura 25: Análisis filogenético y composición de dominios de la sAC y sus homólogos. La historia evolutiva se infirió entre los ortólogos y homólogos de la sAC. El árbol está dibujado a escala, se muestra el árbol con la mayor probabilidad y la longitud de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. Los puntos rojos en las ramas indican que el valor de *bootstrapping* es mayor al 50%. Se usó una distribución discreta Gamma de dos categorías para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios (+G, parámetro = 1.66). Las sAC de Metazoa forman un clado independiente (caja verde), sin embargo se observaron sAC fuera de los no-metazoarios. De acuerdo con los resultados obtenidos por el software SUPERFAMILY, nosotros observamos una diversificación del C-Terminal de las sAC. La

composición de dominios se describe a continuación, el dominio catalítico (caja roja), el dominio P-loop NTPasa (caja amarilla), el dominio de hidrolasa dependiente de metales (caja cian), el dominio compuesto de hidrolasa dependiente de metales (caja rosa), el dominio tipo TPR (caja verde oscuro), el dominio tipo HD-PDEase (caja blanca), el dominio tipo PH (caja café) y el dominio tipo HCP (caja azul). Además, se muestra el resultado de un análisis de búsqueda de motivos (MEME), se observan dos motivos específicos de Metazoa (caja verde claro y cian por debajo de los dominios catalíticos).....61

Figura 26: Sintenia del SLC9C y pseudogenes de SLC9C y ADCY10. A. El panel superior muestra el bloque sinténico del SLC9C entre lagartija, coelacanto, pejelagarto y tinamú blanco. El panel inferior muestra el alineamiento entre los fragmentos representativos de las proteínas del sNHE de lagartija, coelacanto, pejelagarto y la secuencia de amino ácidos predichos de los exones obtenidos del genoma del tinamú blanco (PE of Tinamu). B. El panel superior muestra el bloque sinténico del SLC9C entre dos mariposas (bf) y la mosca de la fruta. El panel inferior muestra el alineamiento de los fragmentos de proteínas entre las dos mariposas y la secuencia de aminoácidos predica del exon obtenido de la mosca de la fruta (PE of fly). C. alíneamiento representativos de la sAC de lagartija, pollo y tinamú blanco y las secuencias de aminoácidos deducidas de los exones predichos de pavo (PE of Turkey), pato (PE of Duck) y paloma (PE of Pigeon). Los cromosomas (Chr) no están representados a escala.....63

Figura 27: Nivel de conservación de la sintenia del NHA. El SLC9B se encuentra en vertebrados como pavo y gallo, especies que sólo conservan la sAC. De igual forma, el NHA se encuentra en rana, medaka y pez cebra (peces óseos), especies que carecen de CatSper, el sNHE y la sAC. Por otra parte, observamos que la lagartija no conserva el NHA, sin embargo tiene CatSper, el sNHE y sAC. Los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) están representados a un lado de las especies.....65

Figura 28: Alineamiento del VSD de los sNHE de metazoa. La mayoría de los sNHE que analizamos en este trabajo conservan los 4 segmentos TM (Souza *et al.*, 2014; Kang & Baker, 2016). Agregamos 2 VSDs funcionales del canal de potasio Kv1.2 y *Shaker* en el alíneamiento. La firma de la hélice S2 ([F/Y]XX[D/E]XXX[R/K]) (Souza *et al.*, 2014) se

conserva, excepto en el caso del sNHE de los ctenóforos en el cual observamos un VSD degradado desde el S2 al S4.....67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Reactivos utilizados.....	34
Tabla 2: Constantes cinéticas de la interacción molecular entre EPAC1 _{CNBD} -CFP y 8-Fluo-cAMP.....	43
Tabla 3: Base de datos utilizadas para determinar la presencia de CatSper, el sNHE y la sAC	50
Tabla 4: Homólogos del sNHE para realizar análisis filogenético de la figura 24.....	53
Tabla 5: Homólogos de la sAC para realizar análisis filogenético de la figura 25.....	53

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$[Ca^{2+}]_c$	Concentración de Ca^{2+} citoplasmática
[L]	Concentración de ligando libre
$[L]_T$	Concentración de ligando total
[R]	Concentración de receptor libre
$[R]_T$	Concentración de receptor total
[RL]	Concentración de complejo ligando-receptor
$^{\circ}C$	Grados centígrados
8-CPT-cAMP	8-(4-Clorofeniltio)adenosín-3',5' monofosfato cíclico
8-CPT-cGMP	8-(4-Clorofeniltio)guanosín-3',5' monofosfato cíclico
8-Fluo-cAMP	8-[[2-[(Fluoreceiniltioureido)amino]etil]tiol]adenosin-3',5' monofosfato cíclico
8-NBD-cAMP	8-(2-[7-Nitro-4-benzofurazanil]aminoetil)adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
C-terminal	Carboxilo terminal
Ca^{2+}	Ión calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CatSper	Canal de Ca^{2+} específico de espermatozoide
CFP	Proteína fluorescente cian
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
Cl^-	Ión cloro
cm	Centímetros
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
cNMP	Nucleótido cíclico
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E_{FRET}	Eficiencia de FRET
E_m	Potencial de membrana
EPAC1	Factor de intercambio de nucleótidos GDP-GTP 1
EPAC2	Factor de intercambio de nucleótidos GDP-GTP 2
FRET	Transferencia de energía de resonancia <i>Föster</i>
HCO_3^-	Ión bicarbonato
H_v	Canal de protones
IC_{50}	Concentración de inhibición 50
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopiranosido
ITC	Caliometría de titulación isotérmica
K_d	Constante de disociación
K_i	Constante de inhibición
k_{off}	Constante cinética de disociación
k_{on}	Constante cinética de unión
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
Na⁺	Ión sodio
NHA1	Antiportador Na ⁺ /H ⁺ 1
NHA2	Antiportador Na ⁺ /H ⁺ 2
NHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
Ni²⁺	Ión níquel
nm	Nanómetro
PBC	Casete de unión a fosfato
PF	Proteína fluorescente
pH_c	pH citoplasmático
s	Segundos
S1	Segmento transmembranal 1
S2	Segmento transmembranal 2
S3	Segmento transmembranal 3
S4	Segmento transmembranal 4
sAC	Adenilato ciclasa soluble
sNHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ específico de espermatozoide
TM	Transmembranal
VSD	Dominio sensible a voltaje
μM	Micromolar

RESUMEN

El batido flagelar del espermatozoide juega un papel fundamental para la fecundación en la mayoría de las especies de animales. Su regulación está controlada por parámetros fisiológicos como son la concentración de Ca^{2+} y el pH citoplasmático (pH_c), entre otros. Cuando el espermatozoide de mamífero llega al sitio donde ocurre la fecundación, el batido flagelar se caracteriza por ser vigoroso y de amplitud larga, llamado hiperactivación el cual es un evento fundamental para la fecundación. Durante la hiperactivación, participan una adenilato ciclasa soluble (sAC), un intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE) y un canal de Ca^{2+} específico de espermatozoide (CatSper). Cada una de estas proteínas están conectadas a través de una vía de señalización que regula el batido flagelar del espermatozoide de mamífero.

A diferencia a otros intercambiadores Na^+/H^+ somáticos, el intercambiador sNHE es una proteína constituida por tres dominios, un dominio catalítico, un dominio sensible a voltaje (VSD) y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). El objetivo de este proyecto fue determinar la participación de los nucleótidos cíclicos (cNMPs) en la actividad del sNHE. Debido a la dificultad para expresar la proteína funcional, decidimos realizar experimentos con proteínas recombinantes del CNBD aislado. Desafortunadamente, no obtuvimos una construcción estable en solución, aún con el dominio CNBD aislado. Sin embargo, como parte de las estrategias experimentales, desarrollamos un nuevo ensayo de unión entre el CNBD y la proteína fluorescente cian (CFP) y un análogo fluorescente de cAMP (8-Fluo-cAMP) a través de estimaciones de transferencia de energía resonante (FRET) entre los fluoróforos acoplados en cada molécula. Mediante esta estrategia se logró determinar las constantes de unión aparentes entre este par molecular y los análogos de nucleótidos cíclicos.

Además de abordar la función del sNHE mediante técnicas bioquímicas, decidimos realizar un análisis filogenético del sNHE en conjunto con la sAC y CatSper para obtener una visión de la putativa relación evolutiva de estas proteínas y su posible implicación en la función del sNHE. Interesantemente, nuestros resultados muestran un patrón general de coevolución entre las tres proteínas en metazoarios, apoyando la idea del acoplamiento funcional entre las proteínas. Por otra parte, en las especies fuera de los animales, nunca encontramos un ortólogo del sNHE, lo que sugiere que el mecanismo de regulación de CatSper es distinto a los que observamos en animales.

Finalmente, este trabajo tiene aportaciones importantes de la función del sNHE desde un punto de vista evolutivo. Además, aporta una nueva estrategia para el estudio de CNBDs poco o nulamente descritos y promueve el desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales de las que actualmente están descritas.

SUMMARY

The flagellar beating of the sperm plays a fundamental role for fertilization in the most animal species. It is controlled by physiological parameters such as Ca^{2+} concentration and cytoplasmic pH (pH_c). When the mammalian spermatozoa reach the place where fertilization occurs, the flagellar beating is vigorous with long amplitude, called hyperactivation which is a fundamental event for the fertilization. During hyperactivation, a soluble adenylate cyclase (sAC), a sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) and a sperm-specific Ca^{2+} channel (CatSper) participate in this process. Each of these proteins is connected through a signaling pathway that regulates the flagellar beat of mammalian sperm.

In contrast to the somatic NHEs, the sNHE exchanger is a protein constituted by three domains, a catalytic domain, a voltage sensitive domain (VSD) and a cyclic nucleotide binding domain (CNBD). Our particular interest, during the development of this project, was to determine the participation of cyclic nucleotides (cNMPs) in the activity of the sNHE. Due to the difficulty to express the functional entire protein, we decided to carry out experiments with a recombinant protein of the isolated CNBD. Unfortunately, we did not obtain a stable construction even with the isolated domain. Nevertheless, as part of the experimental strategies, we developed a new binding assay between the CNBD-CFP and a fluorescent analogue of cAMP (8-Fluo-cAMP) using the Förster resonant energy transfer (FRET).

In addition to the biochemical approach to role the function of sNHE, we decided to carry out a phylogenetic analysis of the sNHE in conjunction with the sAC and CatSper to obtain an evolutionary view of the sNHE function. Interestingly, our results show a general coevolution pattern among the three sperm-specific proteins in Metazoa, supporting the idea of a functional coupling among the proteins. On the other hand, in non-metazoan species, we never found an ortholog of sNHE, which indicates that the mechanism of regulation of CatSper is different from those observed in animals.

Finally, this work has an important contribution of the function of the sNHE from an evolutionary point of view. In addition, our work provides a new strategy for the study of CNBDs, which are little or nullly described.

INTRODUCCIÓN

La fecundación es uno de los procesos biológicos con mayor importancia para la preservación de las especies de reproducción sexual, en el cual se genera un individuo genéticamente único. Este proceso es un diálogo complejo y concertado que se establece entre el espermatozoide y el óvulo (gameto masculino y femenino, respectivamente). Entender el mecanismo del diálogo molecular durante todo el proceso de la fecundación es importante no solamente para la ciencia básica sino para atacar distintos retos sociales, como el control de la concepción humana a través de la reproducción asistida, desarrollo de nuevos anticonceptivos y el control de población en animales en el campo agrícola (Darszon *et al.*, 2011).

Comunicación celular previo a la fecundación entre el ovulo y el espermatozoide

La fecundación requiere de una comunicación celular entre ambos gametos, desde la deposición de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino hasta la fusión de los pronúcleos de ambas células sexuales. Como se muestra en la Figura 1, el evento de fecundación se divide en 1) activación de la movilidad, 2) quimiotaxis y/o reotaxis, 3) hiperactivación, 4) unión a la capa externa, 5) reacción acrosomal, 6) penetración, 7) fusión de ambas membranas, 8) reacción cortical y 9) fusión de los pronúcleos. Sin embargo estudios recientes muestran que los espermatozoides que se unen a la zona pelúcida (etapa 4) ya se encuentran reaccionados (Jin *et al.*, 2011), con este último análisis es necesario modificar esta convención dentro del área de reproducción.

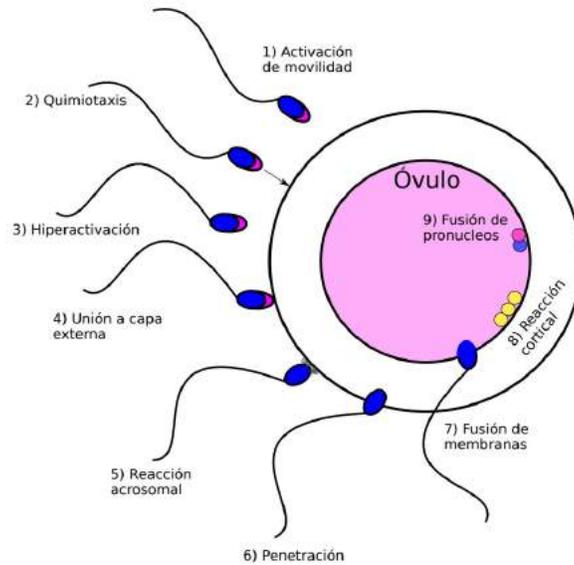


Figura 1: Representación gráfica del proceso de fecundación. El evento de fecundación se divide en 1) activación de la movilidad, 2) quimiotaxis y/o reotaxis, 3) hiperactivación, 4) unión a la capa externa, 5) reacción acrosomal, 6) penetración, 7) fusión de ambas membranas, 8) reacción cortical y 9) fusión de los pronúcleos.

El espermatozoide

El espermatozoide es la célula sexual masculina. Durante su diferenciación se observa una reducción en el volumen del citoplasma, se compacta el DNA (ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés) y se forma el flagelo. El objetivo primordial de esta célula es transferir al óvulo el material genético que dará lugar a un individuo genéticamente único.

El espermatozoide se constituye principalmente de cabeza y flagelo (Figura 2). En la cabeza se encuentra el núcleo, el acrosoma y la envoltura nuclear redundante. El acrosoma es una vesícula ácida derivada del aparato de Golgi que contiene enzimas hidrolíticas y otras proteínas necesarias para la fusión con el óvulo. La envoltura nuclear redundante, junto con el núcleo son un reservorio del ión calcio (Ca^{2+}). Por otra parte, el flagelo se divide en la pieza media, principal y terminal. El flagelo es la estructura que le confiere fuerza motriz a la célula a través de un complejo molecular denominado axonema (Lishko *et al.*, 2012).

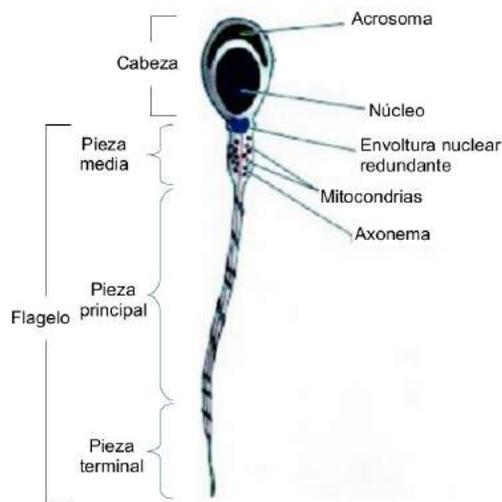


Figura 2: Diagrama general del espermatozoide de mamífero. El espermatozoide se compone por la cabeza, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La cabeza está compuesta por el acrosoma, el núcleo, la envoltura nuclear redundante y el flagelo se compone principalmente por el axonema y las mitocondrias.

Hiperactivación del flagelo

En mamíferos, los espermatozoides comienzan a moverse después de la eyaculación en el tracto reproductor femenino, en ese momento el flagelo de los espermatozoides muestran un batido simétrico y una amplitud corta (Figura 3A; Motilidad activada). A diferencia de los espermatozoides aislados de zonas cercanas al sitio de fecundación, donde el batido flagelar es asimétrico y tiene una amplitud larga (Figura 3A; Motilidad hiperactivada). En un medio experimental de baja viscosidad, los espermatozoides con motilidad activada muestran un nado progresivo en comparación con los espermatozoides hiperactivados que muestran un movimiento aleatorio (Suárez & Osman, 1987). En condiciones fisiológicas, la hiperactivación tiene al menos tres papeles fisiológicos (Carlson *et al.*, 2003; T Nishigaki *et al.*, 2014); i) en un medio viscoelástico el nado es progresivo, ii) permite la liberación del reservorio del istmo y iii) facilita la penetración de las células del cúmulus y de la zona pelúcida que se encuentran rodeando al ovocito (Figura 3B).

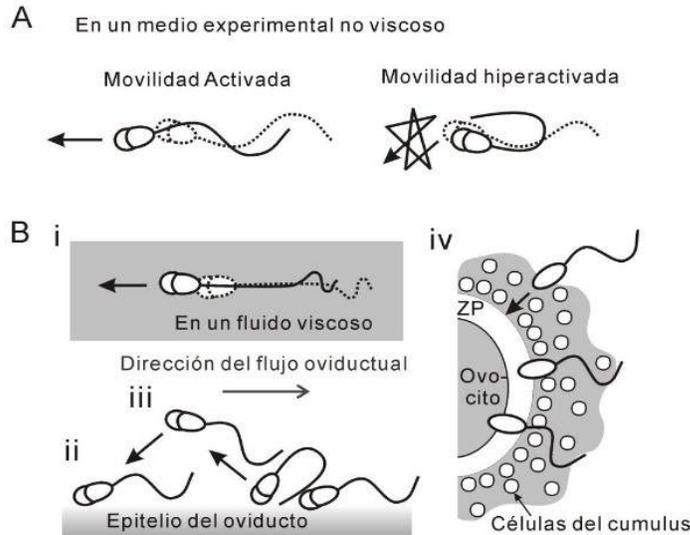


Figura 3: Propiedades y función de la hiperactivación. **A.** Forma del flagelo y dirección del nado (flechas) durante la motilidad activada y motilidad hiperactivada en espermatozoides nadando en un medio experimental de baja viscosidad. **B.** Relevancia fisiológica de la hiperactivación del espermatozoide i) Nado progresivo en medio viscoelástico en el tracto reproductor femenino ii) liberación del espermatozoide del reservorio del istmo y avance hacia el sitio de fecundación y iii) penetración por las células del cúmulus y la zona pelúcida.

Control molecular de la hiperactivación del batido flagelar

Para que ocurra la hiperactivación se requiere la participación de distintas proteínas que en conjunto resultan indispensables para esta función. El Ca^{2+} tiene una función crucial (Ho *et al.*, 2002) debido a que en ausencia de Ca^{2+} extracelular el proceso de hiperactivación no ocurre. El espermatozoide de mamífero expresa 2 tipos de canales de Ca^{2+} , los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Ca_v s) y una nueva familia específica de espermatozoide denominada CatSper (por sus siglas en inglés por **C**ation **c**hannel of **S**perm) (Ren *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2011). CatSper es el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide y se localiza en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo (Ren *et al.*, 2001; Kirichok *et al.*, 2006). Interesantemente, CatSper es indispensable para la fecundación, debido a que espermatozoides de ratones nulos para CatSper tienen afectaciones en la motilidad hiperactivada (Carlson *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2009). A diferencia de otros Ca_v s, CatSper está constituido por 4 subunidades α formadoras de poro (Lobley *et al.*, 2003) y 5 subunidades auxiliares β , γ , δ , ϵ y ζ (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011, 2017) (Figura 4).

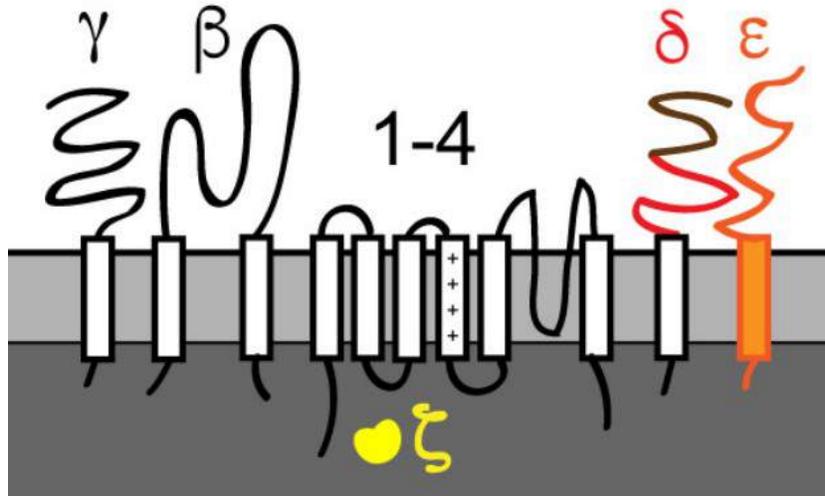


Figura 4: Representación gráfica de CatSper de mamíferos. CatSper está constituido por 4 subunidades α (1-4) y 5 subunidades auxiliares (β , γ , δ , ϵ y ζ).

CatSper, un canal de Ca^{2+} regulado por pH citoplasmático y adenosín monofosfato cíclico

CatSper es un canal altamente regulado por alcalinización intracelular (Kirichok *et al.*, 2006; Lishko *et al.*, 2011). Además del pH citoplasmático (pH_c), el adenosin monofosfato cíclico (cAMP) juega un papel fundamental durante la hiperactivación y por consecuencia en la regulación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) a través de la regulación de CatSper (Ren *et al.*, 2001; Kirichok *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008; Darszon *et al.*, 2011).

En el espermatozoide de mamífero están involucrados distintos elementos moleculares que regulan el pH_c , tales como las anhidrasas carbónicas CAI, CAII (Ali Akbar *et al.*, 1998), CAIV (Mezquita *et al.*, 1999), CAXII (Halmi *et al.*, 2004) y CAXIII (Lehtonen *et al.*, 2004), el canal de protones H_v (Lishko *et al.*, 2010), los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ SLC26A3 y SLC26A6 (Chávez *et al.*, 2012), el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBC (Demarco *et al.*, 2003) y los intercambiadores Na^+/H^+ NHA1 (Liu *et al.*, 2010), NHE1 (García & Meizel, 1999), NHE4 (Woo *et al.*, 2002) y el sNHE (Wang *et al.*, 2003). Interesantemente, el sNHE es uno de las proteínas de membrana con mayor implicación en la motilidad del espermatozoide, debido a que los ratones nulos en este intercambiador son infértiles a causa de aberraciones en la hiperactivación (Wang *et al.*, 2003).

El sNHE es producto de la familia génica *SLC9C* y cataliza el incremento del pH_c a través del gradiente de Na^+ (Lee *et al.*, 1983; Lee, 1984, 1985; Lee & Garbers, 1986). Esta proteína se localiza en la pieza principal del flagelo del espermatozoide de ratón (Wang

et al., 2003). En comparación con otros intercambiadores presentes en el espermatozoide o en células somáticas (Garcia & Meizel, 1999; Harris & Fliegel, 1999; Woo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010), a parte del dominio catalítico, el sNHE posee un dominio sensible a voltaje (VSD) y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) (Figura 5). El VSD está conformado por 4 segmentos transmembranales (TMs) con un alto grado de similitud con el VSD de los Ca_v s, lo que sugiere que el VSD del sNHE está regulado por el potencial de membrana (E_m) (Figura 5; TM 11-14). Asimismo, la presencia del CNBD citoplasmático sugiere que la actividad del sNHE se regula a través de la unión de nucleótidos cíclicos (cNMPs), tales como cAMP o guanosín monofosfato cíclico (cGMP). Sin embargo, en la actualidad no ha sido posible determinar la regulación del sNHE de mamíferos expresando la proteína entera en un sistema heterólogo.

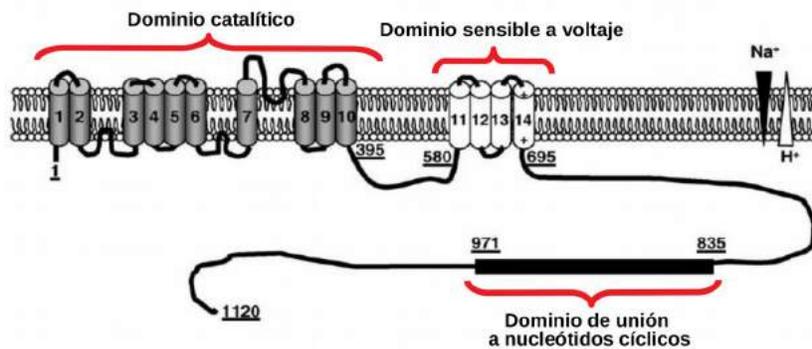


Figura 5: Representación gráfica del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). El sNHE está compuesto por un dominio catalítico, un dominio sensible a voltaje y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos.

En relación a la regulación del cAMP, el espermatozoide expresa una adenilato ciclasa soluble (sAC), producto del gen *ADCY10*. La sAC es una proteína que produce cAMP a partir de adenosín trifosfato (ATP) y se regula por la unión alostérica de HCO_3^- (Figura 6A) (Buck *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Esposito *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006). La sAC de mamíferos está compuesta por dos dominios catalíticos y un dominio P-loop NTPasa (Figura 6B) (Leipe *et al.*, 2004). La sAC es una proteína importante para la motilidad del espermatozoide de mamífero debido a que el ratón nulo presenta defectos en la motilidad basal (Esposito *et al.*, 2004).

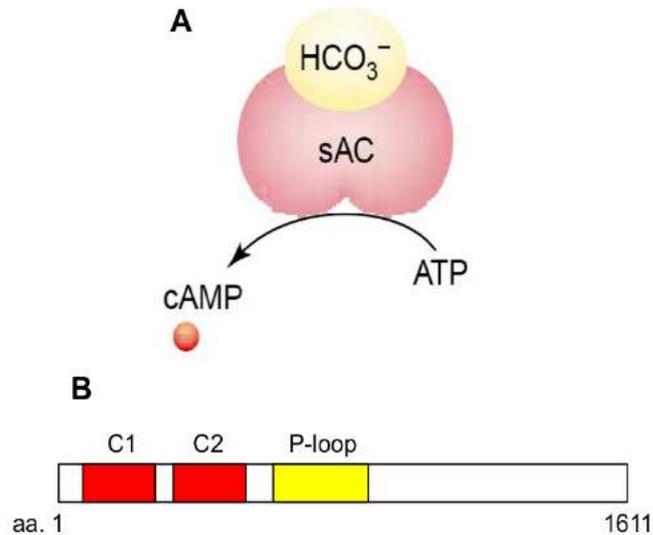


Figura 6: Representación gráfica de la adenilato ciclasa soluble (sAC). A. La sAC es un proteína que produce cAMP a través de ATP, esta proteína está regulada por la unión alostérica de HCO_3^- . B. La sAC de humano está compuesta por dos dominios catalíticos (C1 y C2) y un dominio P-loop NTPasa (P-loop) (Leipe *et al.*, 2003).

Es importante recordar que tanto CatSper, sNHE y la sAC son proteínas indispensables para la fertilidad por su participación en la hiperactivación del batido flagelar del espermatozoide de mamíferos. De hecho, Navarro y colaboradores proponen un modelo de regulación donde se involucra la participación de las tres proteínas durante la hiperactivación (Figura 7) (Navarro *et al.*, 2008). Actualmente, su propuesta se respalda por las siguientes evidencias experimentales; i) los cNMPs permeables a la membrana incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en espermatozoides de ratones silvestres, efecto ausente en espermatozoides de ratones nulos para CatSper (Kobori *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2001), ii) la inhibición de PKA carece de efecto sobre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por cNMPs, iii) la expresión de la sAC está comprometida a la presencia del sNHE, es decir en espermatozoides de ratones nulos para el sNHE la isoforma completa de la sAC es indetectable (Wang *et al.*, 2007). Muy recientemente, se reportó que el sNHE de erizo de mar se activa por la hiperpolarización del potencial de membrana (E_m) y por la unión de cAMP en el CNBD (Windler *et al.*, 2018).

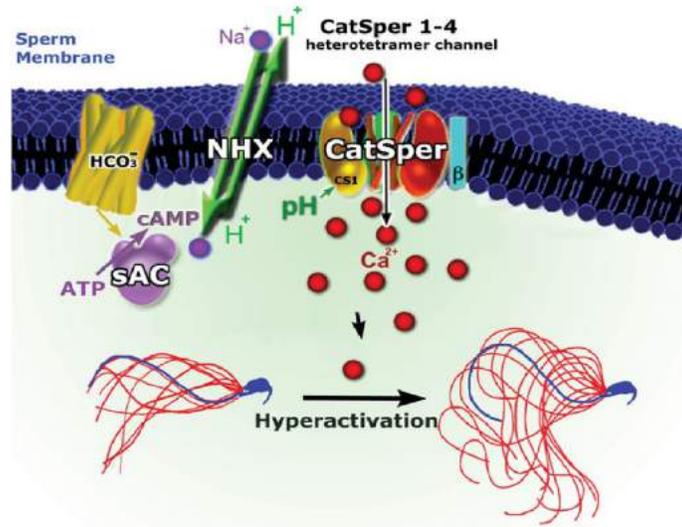


Figura 7: Modelo de regulación del batido flagelar en mamíferos. El incremento de bicarbonato intracelular activa a la sAC produciendo cAMP, el incremento de cAMP activa al sNHE a través del CNBD, la actividad del sNHE incrementa el pHc regulando positivamente la actividad de CatSper y promueve la hiperactivación (modificado de (Navarro et al., 2008)).

Debido a la relevancia de la función del sNHE en el mecanismo de regulación de la hiperactivación del espermatozoide de mamífero, decidimos abordar al intercambiador desde dos perspectivas, una bioquímica y una filogenética. La primera está enfocada a entender su regulación a través de los cNMPs y la segunda en comprender su comportamiento a través de la evolución de los eucariontes. A continuación describiremos ambas vertientes en capítulos por separado.

CAPÍTULO I. Ensayo para estudiar la interacción molecular entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y un análogo de adenosín monofosfato cíclico, mediante mediciones de transferencia de energía entre dos fluoróforos

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, el análisis de la secuencia del sNHE sugiere la presencia de un CNBD en su extremo carboxilo terminal (C-terminal) (Figura 5) (Wang *et al.*, 2003). Sin embargo, la sola presencia del CNBD en el sNHE no determina que los cNMPs estén regulando la actividad del sNHE debido a que existen varios reportes de proteínas con CNBD que no unen cNMP (Dremier *et al.*, 2003; Kannan *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009; Fechner *et al.*, 2015). Anteriormente mencionamos que la actividad del sNHE, por lo menos en erizo de mar, está regulada por la hiperpolarización del E_m y por la unión de cAMP en el CNBD (Windler *et al.*, 2018), sin embargo, se desconoce la actividad del CNBD del sNHE de mamíferos (Takuya Nishigaki *et al.*, 2014). Hasta la fecha es imposible expresar el sNHE de mamífero en un sistema heterólogo, lo cual es un paso limitante para estudiar la actividad del CNBD con la proteína completa del sNHE. Esta limitación técnica nos obliga a hacer el análisis de la modulación del CNBD de manera aislada.

Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD)

El CNBD es un sensor de nucleótidos cíclicos que puede modificar la actividad de la proteína que lo presenta, este interruptor molecular está conservado y presente tanto en proteínas de organismos eucariontes como en procariontes (Kannan *et al.*, 2007). Este dominio evolucionó para responder a cNMPs mediante un cambio conformacional (Berman *et al.*, 2005; Rehmann *et al.*, 2007). El CNBD regula la actividad de varios tipos de proteínas, tales como factores de transcripción, cinasas, canales iónicos y factores de intercambio de nucleótidos GDP-GTP en GTPasas pequeñas (EPAC1 y EPAC2) (Bos, 2006; Kannan *et al.*, 2007).

La estructura general de los CNBDs se puede dividir en un dominio α y un dominio β (Figura 8A) (Kannan *et al.*, 2007). El dominio α , es la región de hélices α accesorias del CNBD que transduce la señal a la proteína asociada en respuesta a la unión de un cNMP. El dominio β está conformado por un núcleo de 8 β plegadas, el cual forma la cavidad donde se coordina la unión del cNMP (Rehmann *et al.*, 2007). Es importante señalar que dentro del dominio β , particularmente entre la β_6 y la β_7 , se encuentra un asa denominada casete de unión a fosfatos (PBC, por sus siglas en inglés *Phosphate Binding Cassette*) que coordina la unión del fosfato del cNMP (Rehmann *et al.*, 2007). El mecanismo por el cual el CNBD responde ante la unión de un cNMP se puede resumir en tres pasos, 1) El PBC coordina la unión del fosfato del cNMP, 2) se promueve un cambio conformacional en el dominio α , esto da inicio a la transducción de la señal del CNBD a la proteína asociada y 3) un cambio de conformación de la bisagra y de la tapa estabilizan la unión entre el CNBD y el cNMP (Figura 8B, panel 1-3).

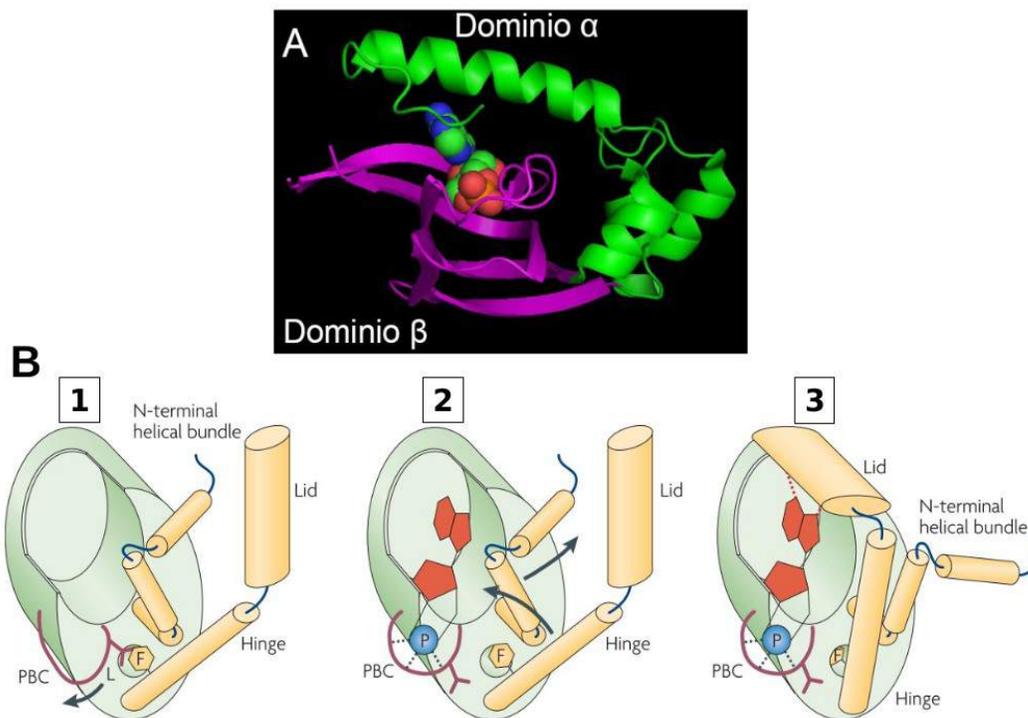


Figura 8: Representación gráfica del dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). **A.** El CNBD se puede dividir en dos dominios por separados, el dominio α (verde) y el dominio β (púrpura). El dominio α , es la región de hélices α accesorias del CNBD que transduce la señal a la proteína asociada en respuesta a la unión de un cNMP. El dominio β está conformado por un núcleo de 8 β plegadas, el cual forma la cavidad donde se coordina la unión del cNMP (Rehmann *et al.*, 2007). **B.** Mecanismo de acción de los CNBDs en respuesta a la unión de un cNMP. El mecanismo por el cual el CNBD responde ante la unión de un cNMP se puede resumir en tres pasos, 1) El PBC coordina la unión del fosfato del cNMP, 2) se promueve un cambio conformacional en el dominio α , esto da inicio a la transducción de la señal del CNBD a la proteína asociada y 3) un cambio de conformación de la bisagra y de la tapa estabilizan la unión entre el CNBD y el cNMP.

Estudio de la interacción ligando-receptor utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia

En la actualidad existen distintos métodos para determinar la formación de complejos ligando-receptor, por ejemplo, usando ligandos con marcas radioactivas (separación mecánica) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés *Isotherman Titulation Calorimetry*). Sin embargo, estas técnicas muestran desventajas experimentales como uso de isótopos radioactivos y la pureza de la proteína es un paso limitante. Estas desventajas pueden ser abordadas utilizando estrategias de espectroscopía de fluorescencia. A continuación daremos una breve introducción de distintas técnicas de espectroscopía de fluorescencia utilizadas para determinar la interacción ligando-receptor.

Transferencia de energía de resonancia Föster (FRET), Anisotropía y fluoróforos sensibles a la polaridad del ambiente

Transferencia de energía de resonancia Föster

La transferencia de energía de resonancia Föster (FRET, por sus siglas en inglés *Föster Resonance Energy Transfer*) es una técnica de espectroscopía de fluorescencia que utiliza el fenómeno cuántico de la transferencia de energía mediante resonancia entre un fluoróforo en un estado electrónico excitado y un fluoróforo en su estado basal, denominamos como Donador (D) y Aceptor (A), respectivamente (Figura 9) (Lakowicz, 2006; Nishigaki & Treviño, 2012). Existen 3 condiciones fundamentales para determinar la eficiencia de FRET entre dos fluoróforos; 1) el espectro de emisión del donador debe coincidir con el espectro de excitación del aceptor (Figura 9A), 2) la distancia entre los fluoróforos debe ser menor a 10 nm (Figura 9B) y 3) los fluoróforos deben estar orientados apropiadamente uno respecto al otro.

La eficiencia de FRET (E_{FRET}) está determinada por la ecuación (1), donde R_0 representa la distancia de Föster, la cual determina la distancia crítica a la que el 50% de la energía de excitación es transferida al aceptor (Lakowicz, 2006) y r es la distancia entre ambos fluoróforos. Es decir, la E_{FRET} decae fuertemente conforme el donador y el aceptor se alejan (Figura 9D, ecuación 1). La estrategia de FRET permite determinar la interacción entre un ligando y un receptor, si ambos están marcados con una molécula fluorescente que funcione como donador o aceptor, respectivamente. La interacción entre el complejo ligando-receptor reducirá la intensidad del donador e incrementará la intensidad del aceptor, debido al fenómeno de transferencia de energía resonante (Figura 9C).

$$E_{FRET}(r) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \dots (1)$$

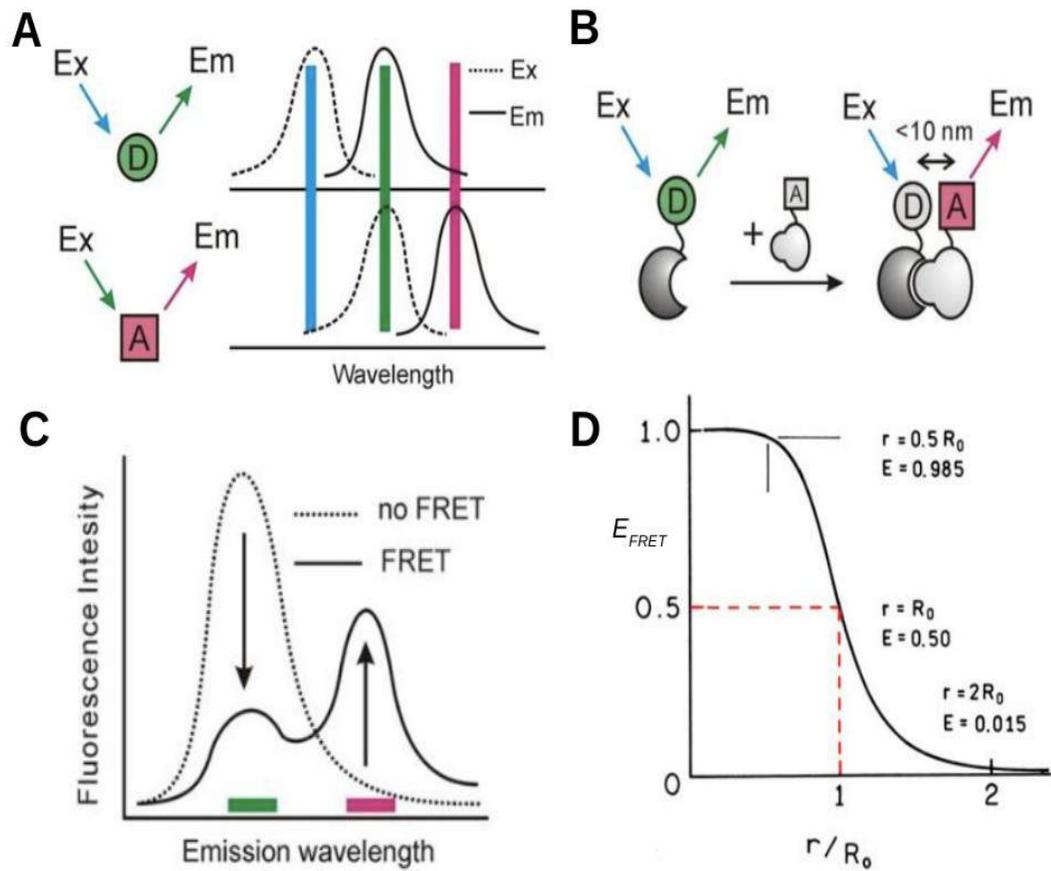


Figura 9: La transferencia de energía de resonancia de Föster. **A.** El espectro de emisión del donador debe sobrelapar en parte con el espectro de excitación del aceptor. **B.** La distancia entre los fluoróforos debe ser menor a 10 nm. **C.** La interacción entre el complejo ligando-receptor reducirá la intensidad de fluorescencia del donador e incrementará la intensidad del aceptor, debido al fenómeno de transferencia de energía resonante. **D.** La E_{FRET} decae fuertemente conforme el donador y el aceptor se alejan.

Anisotropía

Cuando un fluoróforo se excita en solución por luz polarizada, la fluorescencia emitida se mantiene polarizada a cierto grado (Figura 10A). El grado de polarización de la emisión se describe en términos de anisotropía (Nishigaki & Treviño, 2012).

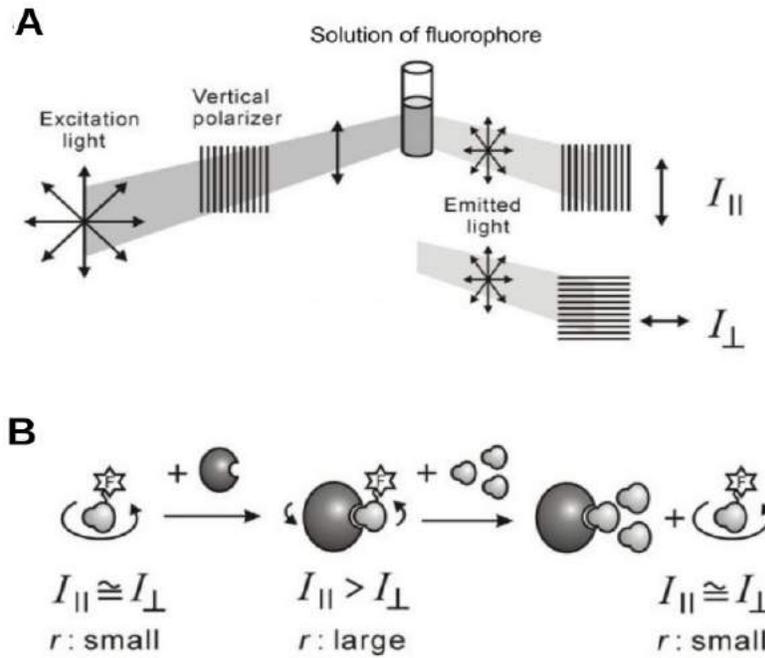


Figura 10: Anisotropía. **A**. Cuando un fluoróforo se excita en solución por luz polarizada, la fluorescencia emitida se mantiene polarizada a cierto grado. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de anisotropía **B**. La anisotropía está relacionada con el tamaño aparente de una molécula fluorescente en una solución, es decir que el valor de anisotropía aumenta cuando la masa molecular se incrementa, como ocurre en el caso de las interacciones entre moléculas.

El valor de anisotropía está determinada por la ecuación (2), donde I_{\parallel} y I_{\perp} corresponden a los componentes paralelo y perpendicular, respectivamente, de la intensidad de la fluorescencia respecto a la orientación de la luz de excitación polarizada.

$$\text{Anisotropía} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \dots (2)$$

La anisotropía está relacionada con el tamaño aparente de una molécula fluorescente en una solución, es decir que el valor de anisotropía aumenta cuando la molécula interacciona con otra molécula. Por lo anterior, esta estrategia se utiliza para

determinar la interacción entre dos moléculas (Figura 10B). La anisotropía es una herramienta poderosa, sin embargo, requiere equipo sofisticado y la sensibilidad está comprometida por el decremento de la intensidad de la emisión debido al uso de luz polarizada.

Fluoróforos sensibles a la polaridad del ambiente

Dentro de la variedad de moléculas fluorescentes, existen algunos que cambian sus propiedades espectroscópicas en función a cambios de su entorno, en particular al cambio de la polaridad del solvente. Los cambios en las propiedades fluorescentes se pueden generalizar en dos categorías: 1) cambio en la intensidad de fluorescencia (Figura 11A) y 2) corrimiento del espectro de emisión y/o excitación (Figura 11B).

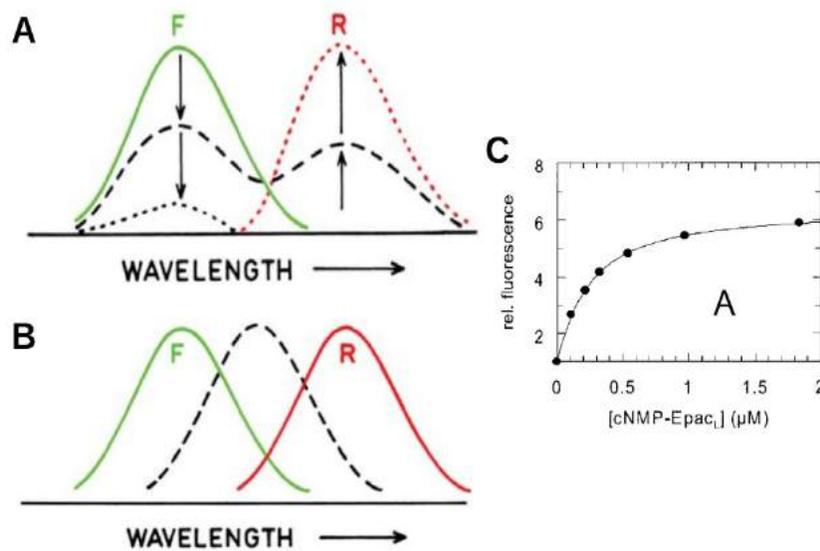


Figura 11: Pueden ocurrir dos fenómenos en el espectro del fluoróforo cuando pasa al estado relajado (R), debido a efectos de la polaridad del ambiente. **A.** Cambios en la intensidad de fluorescencia cuando el fluoróforo pasa al estado relajado. **B.** Cambios en la longitud de onda de emisión cuando el fluoróforo pasa al estado relajado. **C.** Durante la interacción ligando-receptor, entre un fluoróforo acoplado a un ligando (8-NBD-cAMP) y un receptor (EPAC1) la fluorescencia del NBD aumenta conforme se titula con mayor concentración de receptor (Kraemer *et al.*, 2001).

Determinación de la actividad de un CNBD

La actividad del CNBD puede determinarse indirectamente midiendo la actividad de la proteína efectora mediante la dependencia de cNMP, tal como se reporta para la actividad de la cinasa PKA (Taylor *et al.*, 1990). También, es posible estudiar la interacción molecular entre el cNMP y el CNBD aislado. Por ejemplo, el cAMP marcado radioactivamente puede utilizarse para determinar la unión específica a un CNBD mediante separación mecánica (filtración o centrifugación) entre ligandos libres y unidos (Saraswat *et al.*, 1988).

Por otro lado, se sabe que algunos análogos de cNMPs modificados químicamente en el carbono 8 del anillo de purina pueden funcionar como análogos funcionales para los CNBDs (Khwaja *et al.*, 1975). Por lo tanto, los cNMPs con marcas fluorescentes como el 8-Fluo-cAMP se emplean para determinar la interacción molecular por medio de anisotropía de fluorescencia (Moll *et al.*, 2008). Además, se han utilizado análogos fluorescentes sensibles a la polaridad del ambiente, tal es el caso del 8-NBD-cAMP (Kraemer *et al.*, 2001). Estos métodos son útiles, sin embargo, no satisfacen la sensibilidad así como la versatilidad de manera simultánea. Teniendo esto en cuenta, desarrollamos una estrategia simple para estudiar la interacción molecular basada en FRET, utilizando 8-Fluo-cAMP y el CNBD de la proteína EPAC1 (EPAC1_{CNDB}) etiquetado con una proteína fluorescente color cian (CFP). Nuestro método demostró ser más sensible y versátil que los reportados anteriormente.

HIPÓTESIS

El dominio de unión a nucleótidos cíclicos de EPAC1 fusionado a una proteína fluorescente y un análogo fluorescente de cAMP facilitaran determinar de forma versátil y sensible las propiedades cinéticas y al equilibrio de la unión entre estas dos moléculas, utilizando la técnica de espectroscopía de fluorescencia FRET.

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método sensible y versátil para determinar la interacción y especificidad entre un CNBD y cNMPs mediante FRET

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las cinéticas de unión del CNBD de EPAC1 a cNMPs mediante ensayos fluorescentes de tipo FRET.
- Comparar los valores de afinidad obtenidos por FRET y los logrados por anisotropía, para la interacción de cNMPs al CNBD de EPAC1.
- Definir si el CNBD del sNHE es un dominio de unión a cNMPs o si es un dominio con secuencia consenso sin afinidad a estos nucleótidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Tabla 1: Reactivos utilizados

Nombre de reactivo	Proveedor
Plásmido que codifica la proteína fluorescente cian (CFP, por sus siglas en inglés <i>Cyan fluorescent protein</i>) CFP-pRSETB	Dr. T. Nagai. Universidad de Osaka, Japón.
Plásmido que codifica el CNBD de EPAC1 de humano.	M. Lohse. Universidad de Wuerzburg, Alemania.
Análogos de cAMP (8-Fluo-cAMP, 8-CPT-cAMP, cAMP, 8-CPT-cGMP, cGMP)	Axxora y Biolog
Cepas de <i>Escherichia coli</i> JM109(DE3) o BL21(DE3)	National BioResource Project. National Institute of Genetics.
Enzima para restricción <i>NheI</i> y <i>BamHI</i>	Fermentas Inc.
Enzima para PCR Vent TM	New England Biolabs
Inhibidor de proteasas cOmplete TM	Roche
Cromatografía de afinidad Ni-NTA SuperFlow	Qiagen
Cromatografía de exclusión molecular Sephadex-G25	Pharmacia
Oligonucleótidos cnbdF: 5'-GGCTAGCGAATTCGAGGAGTTGGCC-3' cnbdR: 5'-GGGATCCCCTCTAGATTCCAGCCGCA-3'	Unidad de síntesis. Instituto de Biotecnología. UNAM

Equipo de espectrofluorimetría

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas mediante un espectrofluorómetro actualizado por Olis con una lámpara de arco Xenón como fuente de luz de excitación. Para obtener los espectros de emisión en algunos experimentos, utilizamos un LED “royal blue” como fuente de luz de excitación. Las muestras fueron iluminadas a través de una guía de luz líquida unida a un LED donde utilizamos un filtro *bandpass* de D440/20ex (Chroma).

En general, las intensidades de fluorescencia y los espectros de las muestras fueron determinadas a temperatura ambiente, utilizando cubetas de poliestireno desechables (Sigma-Aldrich). En el caso de muestras con concentración mayor a 3 μM , utilizamos cubetas de cuarzo para volúmenes de 45 μL (Starna Cells). La determinación de fluorescencia se realizó al menos por triplicado.

Preparación y purificación de la proteína recombinante CNBD acoplada a la proteína fluorescente cian (CNBD-CFP)

Para construir la quimera EPAC1_{CNBD}-CFP, clonamos el CNBD de EPAC1 de humano (E157-E316) mediante PCR utilizando como templado a EPAC1-camps (Nikolaev *et al.*, 2004) con los oligonucleótidos cnbdF y cnbdR (Tabla 1). El producto fue digerido con las enzimas NheI y BamHI e insertado en el plásmido CFP-pRSETB (EPAC1_{CNBD}-CFP-pRSETB). La construcción incluyó una cola de 6 histidinas en el amino terminal para su purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel (Ni^{2+}).

Posteriormente, la construcción EPAC1_{CNBD}-CFP-pRSETB fue transformada en la cepa JM109(DE3) o BL21(DE3). La proteína recombinante se expresó en cultivos de 200 mL de medio LB a 22 °C por 2 días, el LB fue suplementado con ampicilina y en ausencia de Isopropyl-b-D-thiogalactopiranosido (IPTG) (Heim *et al.*, 1994). La expresión de la quimera se confirmó por un color amarillo en el cultivo. Las células se recuperaron por centrifugación (2500 g por 20 min a 4 °C). Para eliminar los residuos de LB, la pastilla se lavó 3 veces con la solución A (10 mM de Trizol y 150 mM NaCl, pH 7.4) y finalmente se suspendió en 1 mL de solución A suplementada con el inhibidor de proteasas cOmplet™. La suspensión se sonicó en hielo (3 pulsos de 30 s con intervalos de 90 s incubando en hielo). Para recuperar la proteína soluble, el lisado se centrifugó a 28,000 g por 10 min a 4°C y se recuperó la fracción soluble. La fracción soluble contiene la proteína recombinante no purificada. Este extracto fue utilizado para realizar los experimentos con proteína no purificada.

Para purificar la proteína recombinante utilizamos cromatografía de afinidad por Ni^{2+} , se preparó una columna con un 1 mL de Ni-NTA SuperFlow. La columna se equilibró con 6 mL de la solución A. La unión inespecífica de proteínas endógenas se eluyó con 5 mL de la solución A suplementada con 50 mM de imidazol. La proteína recombinante se recuperó con la adición de la solución A adicionada con 250 mM de imidazol. La integridad de la quimera se confirmó mediante la tinción de Coomassie en un gel SDS/PAGE. El imidazol se eliminó mediante filtración de gel con Sephadex-G25 equilibrada con la solución A. La proteína se concentró utilizando un filtro Amicon Ultra 50 K.

Para determinar la concentración de la proteína purificada se determinó la absorbancia a 435 nm utilizando un NanoDrop™2000 (Solución A como blanco). El coeficiente de extinción molar de CFP es 32,500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Se determinó la concentración de la proteína pura por el ensayo de Bradford utilizando BSA para generar la curva estándar y se obtuvo una diferencia menor al 5 %.

En todos los experimentos se utilizó la solución A como medio.

Mediciones de las cinéticas de unión

Para determinar las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} entre EPAC1_{CNBD} y 8-Fluo-cAMP utilizamos un espectrofluorómetro de mezclado rápido (SFM-20, BioLogic) a 22 °C. Cada muestra fue excitada por un monocromador de luz a 440 nm a través de una fibra óptica y la intensidad de fluorescencia fue detectada a través de un filtro *long-pass* mayor a 515 nm, la cual corresponde principalmente a la fluorescencia del 8-Fluo-cAMP.

Para elucidar el valor de k_{off} , el complejo EPAC1_{CNBD} y 8-Fluo-cAMP (100 nM cada uno) se mezcló con un exceso de competidor (10 μM 8-CPT-cAMP). Para obtener el valor de k_{on} , 200 nM de EPAC1_{CNBD} y 200 nM 8-Fluo-cAMP se mezclaron en volúmenes iguales (100 nM de cada uno al final); ambas medidas se realizaron a un flujo de 2 mL·s⁻¹, se colectaron los datos cada 10 ms durante 80 y 15 s respectivamente. Las tres muestras se prepararon por separado y se utilizó el promedio de 16 trazos de cada muestra para el análisis de datos.

El valor de k_{off} fue determinado mediante el ajuste de la ecuación (3), donde $F(t)$ es la intensidad de fluorescencia del aceptor en función del tiempo.

$$F(t) = \alpha(e^{-k_{off}t}) + \beta \quad \dots (3)$$

Después de determinar la k_{off} , el valor de k_{on} fue derivado del ajuste de la ecuación (4).

$$F(t) = \alpha' \left(a \frac{(1 - e^{(a-b)k_{on}t})}{(1 - \frac{a}{b} e^{(a-b)k_{on}t})} \right) + \beta' \quad \dots (4)$$

$$\text{donde } a, b = [R] + [L] + \frac{k_{off}}{k_{on}} \pm \frac{\sqrt{([L] + [R] + \frac{k_{off}}{k_{on}})^2 - 4[R][L]}}{2} \quad \text{y } \alpha, \beta, \alpha', \beta' \text{ son}$$

constantes para el ajuste. Los ajustes se realizaron utilizando R (R-Core-Team, 2016).

Determinación de la constante de disociación al equilibrio

Para determinar la K_d al equilibrio, preparamos una condición inicial de 3.16 μM de EPAC1_{CNBD}-CFP y 6.32 μM de 8-Fluo-cAMP en presencia y ausencia de un exceso de competidor (1mM de 8-CPT-cAMP). Posteriormente realizamos diluciones secuenciales

hasta obtener 0.032 nM de EPAC1_{CNBD}-CFP utilizando 3.16 como factor de dilución. Una vez que obtuvimos los espectros, establecimos el cociente de la intensidad de fluorescencia del donador (F_{474}) y el punto isobéstico (F_{501}). Nuestro método está basado en la teoría de interacción ligando-receptor con depleción de ligando (ecuación 5).

$$[RL] = \frac{[L]_T + [R]_T + K_d - \sqrt{([L]_T + [R]_T + K_d)^2 - 4[L]_T[R]_T}}{2} \dots (5)$$

Simplificando la ecuación 3 a partir de las siguientes aseveraciones

considerando

$$[L]_T = 2[R]_T,$$

donde

$$[R]_T = x,$$

$$[L]_T = 2x$$

y la fracción del complejo $\frac{[RL]}{[R]_T} \propto \frac{F_{474}}{F_{501}}$

obtenemos la ecuación 6

$$-\frac{F_{474}}{F_{501}} = \alpha'' \left(\frac{3x + K_d - \sqrt{(3x + K_d)^2 - 8x^2}}{2x} \right) + \beta'' \dots (6)$$

α'' , β'' son constantes para el ajuste. Los ajustes se realizaron utilizando R (R-Core-Team, 2016).

Estimación de las afinidades aparentes mediante ensayos de competencia con análogos de nucleótidos cíclicos sin marca fluorescente

Las curvas de competencia fueron realizadas en un lector de placas a partir de la mezcla entre 10 nM de EPAC1_{CNBD}-CFP y 20 nM 8-Fluo-cAMP utilizando cuatro análogos de cNMP (cAMP, cGMP, 8-CPT-cAMP y 8-CPT-cGMP) como competidores no fluorescentes. Las lecturas se hicieron en un lector de placa utilizando un *bandpass* de excitación de 440 nm y un *bandpass* de emisión de 485 nm. Determinamos los valores de K_d de cada competidor (K_i) a partir de la IC_{50} , la $[R]$ y $[L]$ como se describe en Nikolovska-Coleska y colaboradores (Nikolovska-Coleska *et al.*, 2004).

RESULTADOS

A continuación describiremos los resultados obtenidos durante el desarrollo del ensayo de unión tipo FRET.

Descripción del diseño experimental

Como mencionamos anteriormente, basamos nuestro diseño experimental en la estrategia de fluorescencia FRET, a continuación daremos una explicación sobre cómo funciona nuestro desarrollo. En la figura 12, podemos observar los espectros de emisión (líneas punteadas) y de excitación (líneas continuas) de EPAC1_{CNBD}-CFP (Donador) y de 8-Fluo-cAMP (Aceptor).

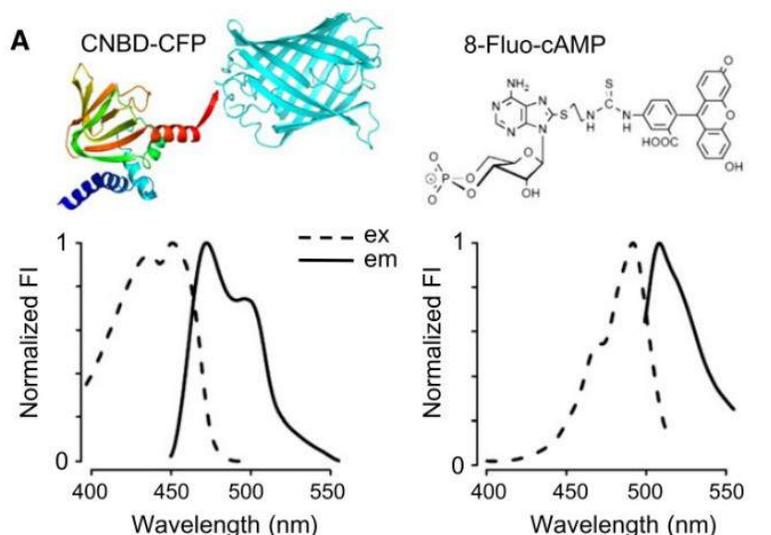


Figura 12: Espectros de emisión y excitación de EPAC_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP.

Como comentamos en los antecedentes de esta sección, en los ensayo de FRET es indispensable que el espectro de emisión del donador y el espectro de excitación del aceptor empalmen entre si para que pueda ocurrir el fenómeno de transferencia de energía resonante, esto ocurre entre los espectros de EPAC1_{CNBD}-CFP (línea punteada) y de 8-Fluo-cAMP (línea continua) (Figura 13).

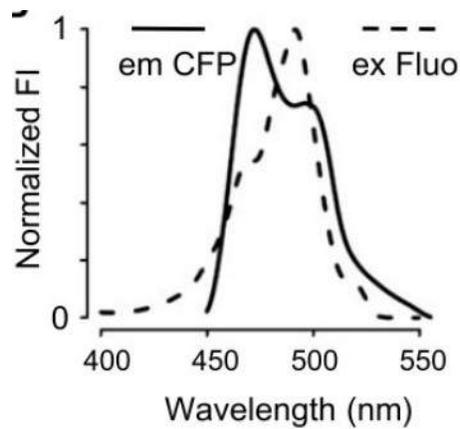


Figura 13: Empalme entre el espectro de emisión de CFP (EPAC_{CNBD}-CFP) y el espectro de excitación de Fluoresceína y (8-Fluo-cAMP).

Cuando la quimera EPAC1_{CNBD}-CFP es excitada a 440nm en ausencia de 8-Fluo-cAMP, la intensidad de fluorescencia que observamos corresponde a CFP (Figura 14A panel 1) mientras que cuando está en presencia del análogo fluorescente de cAMP y hay unión entre éste y la proteína recombinante ocurre FRET (Figura 14A panel 2), es decir ocurre una reducción en la intensidad de fluorescencia del donador (línea roja Figura 14B). Posteriormente, para determinar que la unión es específica entre el CNBD y el análogo fluorescente de cAMP se compite con un exceso de un análogo no fluorescente de cAMP (8-CPT-cAMP) (Rehmann *et al.*, 2003) (Figura 14A panel 3) y se recupera la intensidad del espectro de emisión del donador (línea negra Figura 14B). El complejo de unión entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP tiene una E_{FRET} mayor que 80% (flecha azul Figura 14B), lo que corroboró que nuestro par FRET es eficiente para determinar la unión entre la proteína recombinante y el análogo fluorescente de cAMP.

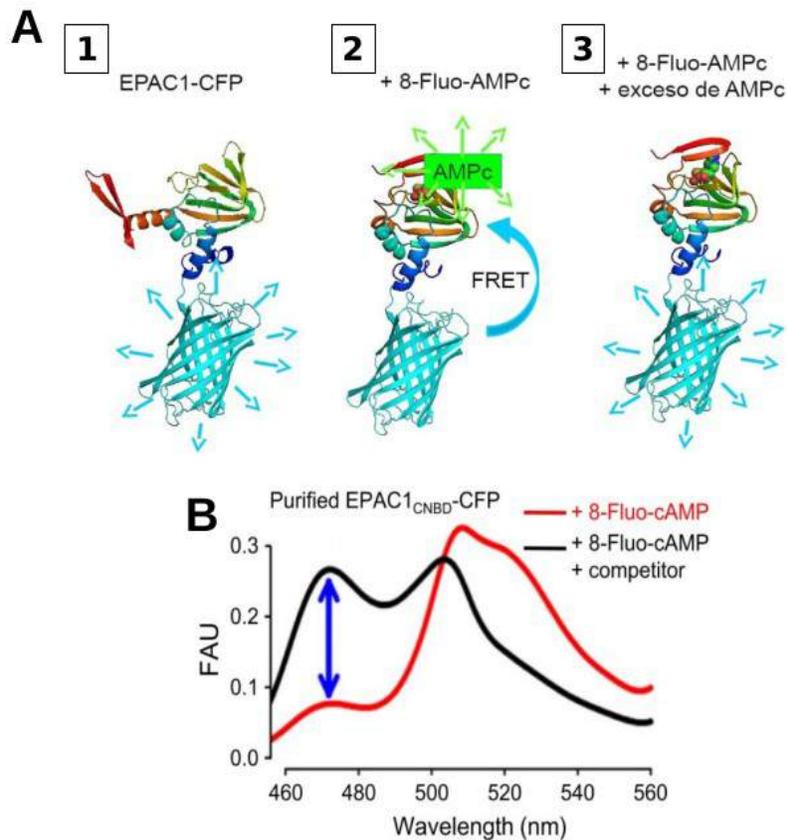


Figura 14: Resumen gráfico sobre la estrategia experimental. **A.** 1) Cuando la quimera EPAC1_{CNBD}-CFP es excitada a 440nm en ausencia de 8-Fluo-cAMP, la intensidad de fluorescencia que observamos corresponde a CFP, 2) mientras que cuando está en presencia del análogo fluorescente de cAMP y hay unión entre éste y la proteína recombinante ocurre FRET y 3) para determinar que la unión es específica entre el CNBD y el análogo fluorescente de cAMP se compite con un exceso de un análogo no fluorescente de cAMP (8-CPT-cAMP). **B.** El complejo de unión entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP tiene una E_{FRET} mayor que 80% (flecha azul).

Ensayo de unión tipo FRET de proteína no purificada

Una vez que corroboramos la E_{FRET} entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP, decidimos verificar la sensibilidad del par FRET utilizando proteína no purificada, es decir, utilizar la fracción soluble después del paso de sonicación. En la figura 15 se muestran los espectros de fluorescencia de EPAC1_{CNBD}-CFP y de 8-Fluo-cAMP, correspondientes para proteína no purificada (Figura 15A), en ausencia (línea roja) y en presencia de exceso de competidor 8-CPT-cAMP (línea negra). El nivel de FRET de la proteína no purificada es ligeramente menor en comparación con el nivel de FRET de la proteína purificada, probablemente por la degradación parcial de la proteína recombinante y/o la interferencia de

algunas proteínas endógenas de la bacteria. A pesar de la reducción en el nivel de FRET, la eficiencia observada con la proteína no purificada muestra la eficacia y versatilidad de nuestro ensayo. Para corroborar la especificidad de la interacción entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP por otro método, utilizamos una construcción con un CNBD que no une cAMP debido a una mutación en la arginina 279 por un ácido glutámico (Qiao *et al.*, 2002) (EPAC1_{R279E}-CFP). En la figura 15B observamos que no hay señal de FRET entre EPAC1_{R279E}-CFP y 8-Fluo-cAMP. Como un ejemplo adicional sobre la utilidad de nuestro desarrollo, probamos el CNBD del factor de transcripción CAP y observamos una señal específica de FRET en el rango μM (Figura 15C).

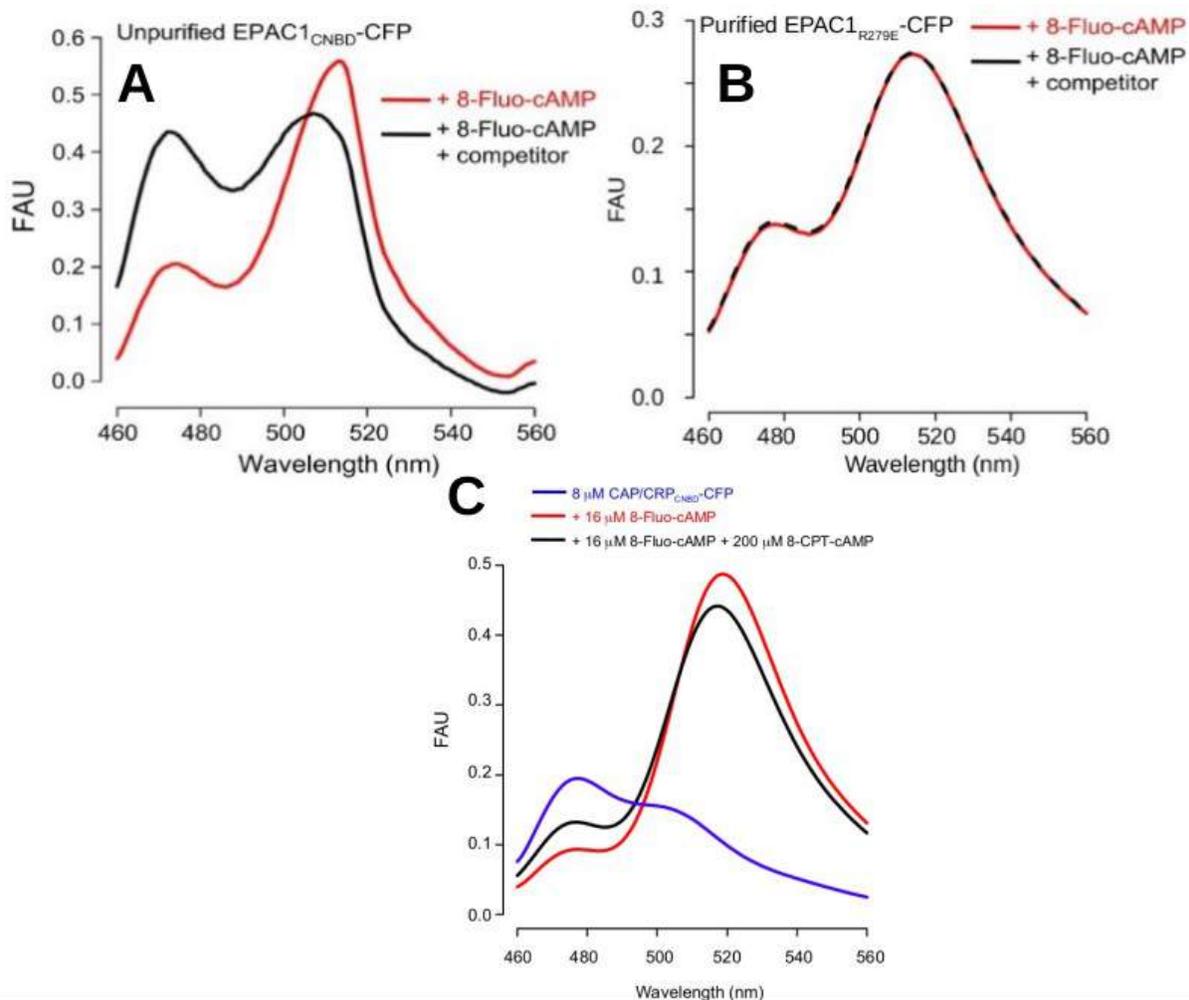


Figura 15: Ensayo de unión tipo FRET en presencia (línea negra) y en ausencia (línea roja) de exceso del competidor 8-CPT-cAMP **A.** Quimera no purificada de EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP. **B.** Quimera purificada de EPAC1_{R279E}-CFP y 8-Fluo-cAMP. **C.** Quimera CAP_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP.

Determinación de k_{on} y k_{off}

Es posible determinar las tasas de asociación y disociación de la interacción molecular entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP monitoreando la señal de FRET en tiempo real, por lo que determinamos las constantes k_{on} y k_{off} usando un espectofluorómetro de mezclado rápido (Figura 16). Para obtener la k_{off} , adicionamos 10 mM de 8-CPT-cAMP al complejo EPAC1_{CNBD}-CFP/8-Fluo-cAMP (100 nM cada uno).

En la figura 16A observamos un trazo representativo de la cinética de disociación (puntos negros) y ajustamos la ecuación (3) descrita en Materias y Métodos (trazo rojo). Para determinar la k_{on} mezclamos EPAC1_{CNBD}-CFP con 8-Fluo-cAMP (100 nM cada uno), en el panel B de la figura 16 observamos un trazo representativo de la cinética de asociación y ajustamos la ecuación (4) (trazo rojo). De igual forma realizamos ambos experimentos en presencia de 100 mM de imidazol para determinar el efecto de este compuesto en la interacción molecular (Tabla 2). Podemos concluir que no existe diferencia significativa en la constante de asociación (k_{on}) entre las dos condiciones, pero la tasa de disociación (k_{off}) con imidazol es significativamente más pequeña. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre los valores de la K_d dinámica (k_{off}/k_{on}) entre las dos condiciones (3.65 ± 0.07 nM y 364 ± 0.08 nM en ausencia y presencia de imidazol, respectivamente). Por lo anterior, consideramos que el imidazol residual (< 2 mM) no tiene efecto en la interacción entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP.

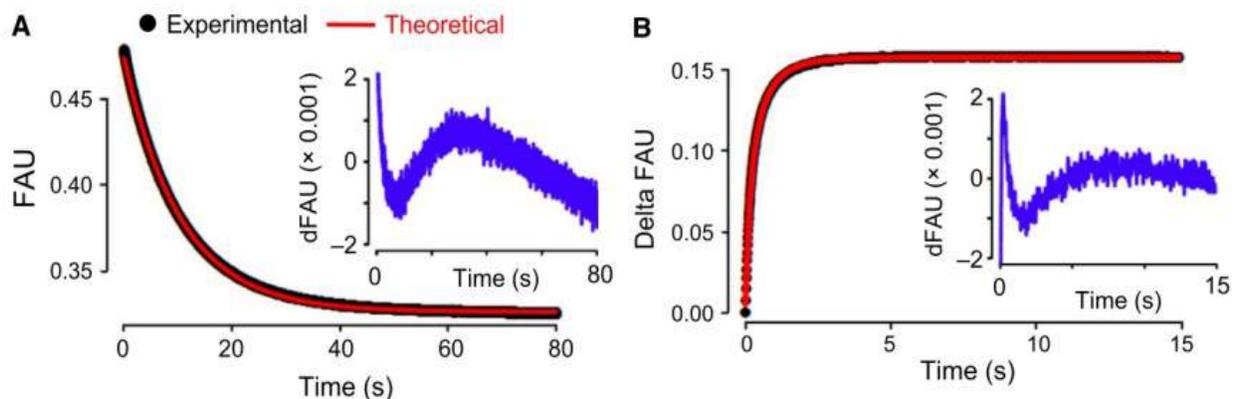


Figura 16: Ensayo de unión mediante stopped-flow. **A.** Cinética de disociación ante la adición de 10 mM de 8-CPT-cAMP al complejo EPAC1_{CNBD}-CFP/8-Fluo-cAMP (100 nM) (puntos negros). **B.** Cinética de unión al mezclar 100 nM de EPAC1_{CNBD}-CFP y 100 nM 8-Fluo-cAMP (puntos negros). Los valores teóricos (línea roja) fueron determinados como se describe en materiales y métodos. Los recuadros (línea azul) muestran la diferencia entre los resultados obtenidos experimentalmente y los valores teóricos del ajuste.

Tabla 2: Constantes cinéticas de la interacción molecular entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP

	Imidazol 0 mM	Imidazol 100 mM
Numero de mediciones	5	5
k_{on} ($\times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	2.62 ± 0.05	2.59 ± 0.05
k_{off} ($\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)	9.55 ± 0.02	$9.42 \pm 0.02^*$
K_d (k_{off}/k_{on}) (nM)	3.65 ± 0.07	3.64 ± 0.08

* $P < 0.05$ Prueba Wilcoxon de suma de rangos

Determinación de la K_d al equilibrio

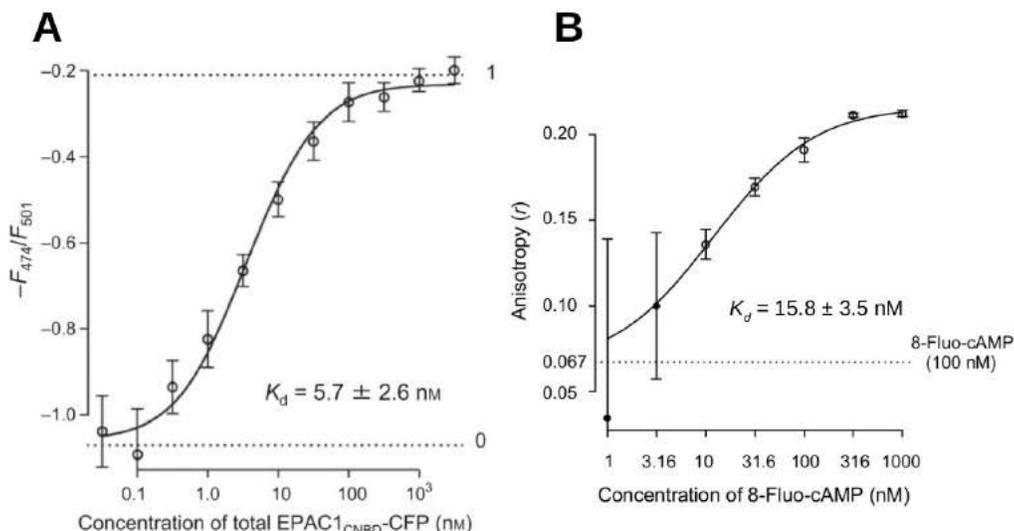


Figura 17: Determinación de la K_d a través de FRET y Anisotropía. **A.** Determinación de la constante K_d al equilibrio mediante FRET. Los ensayos de unión al equilibrio fueron realizados manteniendo una relación estequiométrica 1:2 de EPAC1_{CNBD}-CFP/8-Fluo-cAMP en diferentes concentraciones. La eficiencia de FRET fue graficada en función de la concentración total de EPAC1_{CNBD}-CFP (círculos). La fracción de EPAC1_{CNBD}-CFP unida a 8-Fluo-cAMP es indicada con la línea punteada a partir de 0 a 1. El valor de K_d fue determinado como se describe en materiales y métodos. El mejor ajuste está indicado con una línea negra. **B.** Determinación de la constante K_d al equilibrio mediante anisotropía. La eficiencia de FRET fue graficada en función de la concentración total de 8-Fluo-cAMP (círculos). El valor de anisotropía de 100 nM de 8-Fluo-cAMP en solución está indicado con la línea punteada. El valor de K_d fue determinado como se describe en materiales y métodos. El mejor ajuste está indicado con una línea negra.

Usualmente, la K_d se determina utilizando una concentración fija del receptor e incrementando la concentración de ligando hasta que el receptor esté saturado, posteriormente se estima la concentración de ligando unido y libre en cada ensayo al equilibrio. Posteriormente, se estima la concentración donde el 50% del receptor está unido al ligando (K_d). Para simplificar este laborioso proceso experimental, desarrollamos un protocolo sencillo para determinar la K_d entre EPAC1_{CNBD}-CFP y 8-Fluo-cAMP basado en un ensayo tipo FRET. Primero, preparamos una mezcla del donador y el aceptor con una

estequiometría 1:2 en ausencia y presencia del competidor. Posteriormente, realizamos diluciones secuenciales y determinamos la eficiencia de FRET en cada condición mediante el cociente del pico máximo de intensidad de CFP y el punto isobéptico (Figura 14B). La figura 17A muestra la eficiencia del FRET entre el complejo receptor-ligando en función de la concentración total de 8-Fluo-cAMP. El valor de K_d fue determinado mediante el ajuste de la ecuación 5 (línea negra). El valor obtenido (5.7 ± 2.6 nM) es comparable con el valor de la K_d dinámica (k_{on}/k_{off} : 3.65 ± 0.07 nM). Con la finalidad de validar el valor de la K_d determinada por FRET, realizamos un ensayo de unión por anisotropía de fluorescencia (Figura 17B) y obtuvimos un valor de K_d similar (15.8 nM \pm 3.5 nM) al valor determinado por el ensayo tipo FRET. Además, demostramos que el método de FRET es más sensible (más confiable en baja concentración de la muestra) que el de anisotropía. Por los resultados anteriores, podemos considerar a nuestro método como un nuevo protocolo para determinar la K_d .

Curva de competencia con análogos de cNMP

Para determinar la versatilidad de nuestro ensayo de unión, realizamos experimentos de competencia usando 10 nM de EPAC1_{CNBD}-CFP y 20 nM de 8-Fluo-cAMP y determinamos la K_d de varios análogos de cNMPs. Como esperábamos, cada análogo 8-CPT-cNMP tiene una actividad mayor que su respectivo cNMP sin marca (Rehmann *et al.*, 2003) (Figura 18), lo que indica que la adición del grupo alquil al carbono 8 de la base nitrogenada incrementa la afinidad al CNBD. También, determinamos los valores de la constante de inhibición K_i (representan los valores de K_d de los competidores) utilizando el método de Nikolovska-Coleska y considerando 5.7 nM como la K_d del 8-FluocAMP (Nikolovska-Coleska *et al.*, 2004). Obtuvimos para 8-CPT-cAMP $K_i = 250$ nM, para cAMP $K_i = 3.8$ μ M, para 8-CPT-cGMP $K_i = 22$ μ M y para $K_i =$ cGMP 140 μ M. Los valores de K_i para cAMP determinados en este estudio coinciden con el valores reportados previamente (de Rooij *et al.*, 2000; Kraemer *et al.*, 2001). Por otra parte, cuando el valor de K_d obtenido mediante anisotropía (15.8 nM) es utilizado para obtener el valor de K_i de cAMP (7.0 μ M) el resultado es mayor a los datos reportados. Este resultado da soporte a la relevancia de nuestro ensayo de unión tipo FRET.

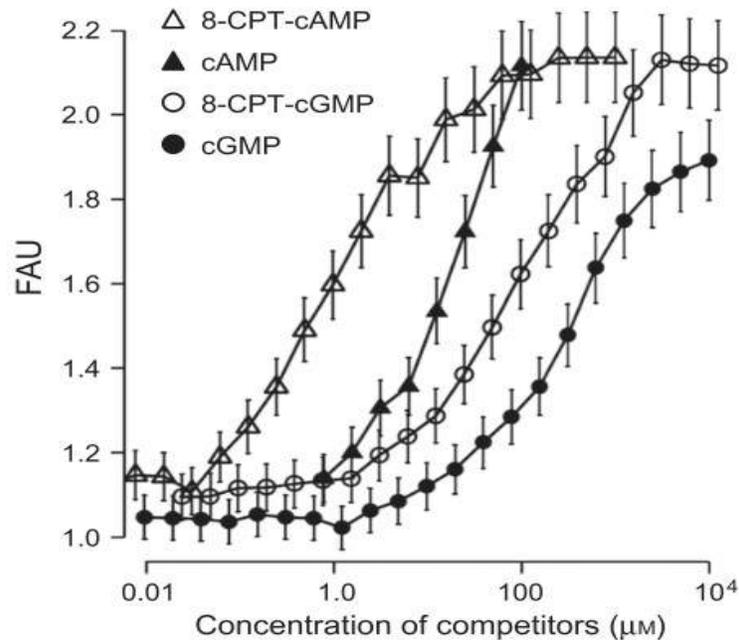


Figura 18: Curvas de unión de distintos cNMPs como competidores. Las intensidades de fluorescencia de CFP fue determinado mediante un lector de placas a partir en presencia de 4 distintos competidores a distintas concentraciones como se describe en materiales y métodos. 8-CPT-cAMP (triángulos abiertos), cAMP (triángulos cerrados), 8-CPT-cGMP (círculos abiertos) y cGMP (círculos cerrados).

Expresión heteróloga del C-terminal del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide de ratón

Para determinar la funcionalidad del CNBD del sNHE de ratón, preparamos 10 quimeras del CNBD del sNHE con variaciones en la extensión del N- y C-terminal. Las quimeras fueron preparadas mediante la fusión la proteína CFP en el C-terminal del péptido. Cada una de las construcciones se sobre expresó en el sistema procarionte JM109(DE3) y BL21(DE3). Sin embargo, a diferencia de la construcción EPAC1_{CNBD}-CFP que se produce y recupera sin problema en estas células, la proteína del CNBD del sNHE en ningún caso pudimos obtenerla soluble. Con base en lo anterior, evaluamos la expresión de las construcciones en el sistema eucarionte HEK293. La expresión de todas las construcciones se observaron de manera uniforme en el citoplasma, lo cual sugiere que varias chaperonas ayudan en la estabilidad y la solubilidad de las quimeras en el citoplasma de las células eucariontes.

DISCUSIÓN

En este trabajo, desarrollamos un ensayo de único y simple basado en FRET, que permite estudiar la interacción molecular entre un CNBD recombinante y un análogo fluorescente de cNMP. En nuestros métodos, el CNBD lo fusionamos con una proteína fluorescente (PF). Es importante resaltar que el uso de las PFs tiene ventajas experimentales: a) Incrementan la solubilidad de la proteína recombinante, b) permiten visualizar la proteína recombinante durante la expresión, extracción y purificación y c) facilita determinar la concentración de la proteína utilizando la absorbancia de la PF. Considerando estas características, nuestro ensayo de unión tipo FRET es un método amigable para estudiar la interacción molecular entre el CNBD y el cNMP.

Actualmente, existen dos métodos populares de espectroscopía de fluorescencia para estudiar la interacción entre el CNBD y cNMP: 1) anisotropía y 2) fluorescencia sensible a la polaridad del ambiente. En general, la anisotropía es un método confiable en experimentos de unión entre una molécula pequeña y una molécula grande, tal es el caso de la interacción ligando:receptor. Sin embargo, el método de anisotropía es menos versátil que FRET ya que requiere un equipo especial para realizar los experimentos (Lakowicz, 2006). Además, la sensibilidad de la anisotropía se ve disminuida por consecuencia en la reducción de la señal de fluorescencia por su paso a través de los polarizadores. De acuerdo a esta teoría, nuestro resultado claramente mostró que el ensayo de unión tipo FRET es más sensible que el de anisotropía. Por otra parte, es posible determinar la K_d de un CNBD utilizando el análogo fluorescente 8-NBD-cAMP con base en la sensibilidad del NBD a la polaridad del ambiente (Cukkemane *et al.*, 2007). Sin embargo, el NBD no es brillante como es el caso de CFP. De hecho, determinamos que la intensidad de fluorescencia del 8-NBD-cAMP en solución acuosa es 900 veces más tenue que la de CFP. Aunado a esto, se requiere una concentración mínima de 60 a 100 nM de 8-NBD-cAMP (Kraemer *et al.*, 2001) en comparación con nuestra propuesta (10-20 nM de 8-Fluo-cAMP) para realizar un ensayo de unión en un lector de placas de fluorescencia convencional. En este sentido, el ensayo de unión tipo FRET es más versátil y sensible que los ensayos descritos anteriormente. Nuestra propuesta permite estudiar eficientemente proteínas que unen cNMP no caracterizados. Inclusive, un análisis bioinformático reveló que hay CNBDs predichos aún no caracterizados, tanto en procariontes como en eucariontes (Kannan *et al.*, 2007), incluyendo por supuesto el CNBD del sNHE del espermatozoide.

Debido a que no es posible expresar heterológamente la proteína completa del sNHE de ratón, decidimos realizar un ensayo de unión solamente utilizando el CNBD predicho del sNHE. Sin embargo, nuestro intento de expresar el CNBD predicho del sNHE en bacterias no fue exitoso debido a problemas de solubilidad. A pesar de la situación, parece factible realizar un ensayo de unión tipo FRET del CNBD del sNHE en el citoplasma en células eucariontes vivas debido a que existen varias chaperonas que ayudarían con la

solubilidad. La clave de este proyecto sería utilizar un análogo fluorescente de cAMP y permeable a la membrana plasmática.

CONCLUSIONES

- En este trabajo aprovechamos las ventajas técnicas del uso de proteínas fluorescentes en un ensayo de unión ligando-receptor: Solubilidad, Nivel de Expresión, Purificación y Cuantificación.
- Desarrollamos un ensayo de unión único y simple basado en FRET. Este ensayo permite estudiar la interacción molecular entre un CNBD recombinante y un análogo fluorescente de cNMP.
- Comparamos dos herramientas de espectroscopía de fluorescencia, FRET y Anisotropía en la obtención de las constantes de unión entre el CNBD de EPAC1 y análogos de nucleótidos cíclicos. Determinamos que el ensayo tipo FRET tiene mayor sensibilidad y es más versátil que el ensayo de anisotropía.
- Este ensayo nos permitirá estudiar eficientemente CNBDs no caracterizados.

CAPÍTULO II: Análisis de genómica comparativa entre el canal de Ca²⁺ CatSper, el intercambiador Na⁺/H⁺ específico del espermatozoide y la adenilato ciclasa soluble

En esta sección desarrollamos la segunda vertiente con la que abordamos el estudio del sNHE. Como mencionamos anteriormente, Navarro y colaboradores proponen un modelo de regulación de la hiperactivación del batido flagelar en mamíferos (Figura 7) (Navarro *et al.*, 2008). El modelo propone la participación de la sAC y el sNHE como posibles reguladores de CatSper por lo cual decidimos determinar la relación evolutiva de estas tres proteínas.

ANTECEDENTES

La raíz evolutiva de los eucariontes está definida entre dos súper grupos, Unikonta (células eucariontes con un cilio) y Bikonta (células eucariontes con dos cilios) (Stechmann, 2002). El grupo Unikonta incluye a los animales (Metazoa), a los hongos (fungi) y a *Thecamona trahens* (el único ancestro conocido de los Opisthokonta). Por otra parte, Bikonta contiene a las plantas, a las diatomeas y a las algas (Stechmann, 2002; Richards & Cavalier-Smith, 2005; Derelle & Lang, 2012). Para estudiar las diferencias o semejanzas entre los genomas de las especies con alta diversidad genética, la genómica comparativa se convierte en una herramienta indispensable (Koonin *et al.*, 2000). De hecho, un primer acercamiento demostró que de 2,100 ortólogos de genes ancestrales, de un grupo de 21 genomas de bacterias, arqueas y eucariontes, sólo el 5% están presentes en el conjunto de 21 genomas; la mayoría de estas proteínas son componentes de la maquinaria de transcripción y traducción (Koonin *et al.*, 2000; Tatusov *et al.*, 2000). En esta notable plasticidad genómica, resalta la pérdida de genes en linajes específicos a través de distintas fuerzas evolutivas. Por una parte, la transferencia horizontal de genes es plausible como una explicación de la distribución filogenética en mosaico, aunque puede ser difícil probar en casos específicos como para proteínas compuestas por varias subunidades (Aravind *et al.*, 1998). Por otro lado la pseudogenización, un proceso de pérdida de la función del gen debido al proceso de relajación evolutiva (selección neutra) (Podlaha & Zhang, 2010).

Evolución de los canales CatSper

A pesar de la relevancia de la función de CatSper en mamíferos, los genes que codifican el canal no están conservados en varios vertebrados como aves, anfibios y algunos peces óseos incluyendo el pez cebra y en invertebrados como peces sin mandíbula, artrópodos, nematodos, moluscos, placozoa y esponjas (Figura 19A) (Cai & Clapham, 2008). En estas especies, los genes que codifican las subunidades α y β de CatSper se pseudogenizaron durante la evolución (Cai and Clapham, 2008). Asimismo, se observó un patrón heterogéneo en la presencia de CatSper en los ancestros de los animales y en las

especies de Bikonta (Figura 19B) (Cai & Clapham, 2012; Cai *et al.*, 2014). Considerando que el canal funcional de CatSper requiere el ensamblaje de distintas proteínas, no es factible asumir que un evento de transferencia horizontal generó una distribución heterogénea del canal en los eucariontes. Por lo anterior se sugiere que CatSper emergió en una etapa temprana de la evolución de los eucariontes.

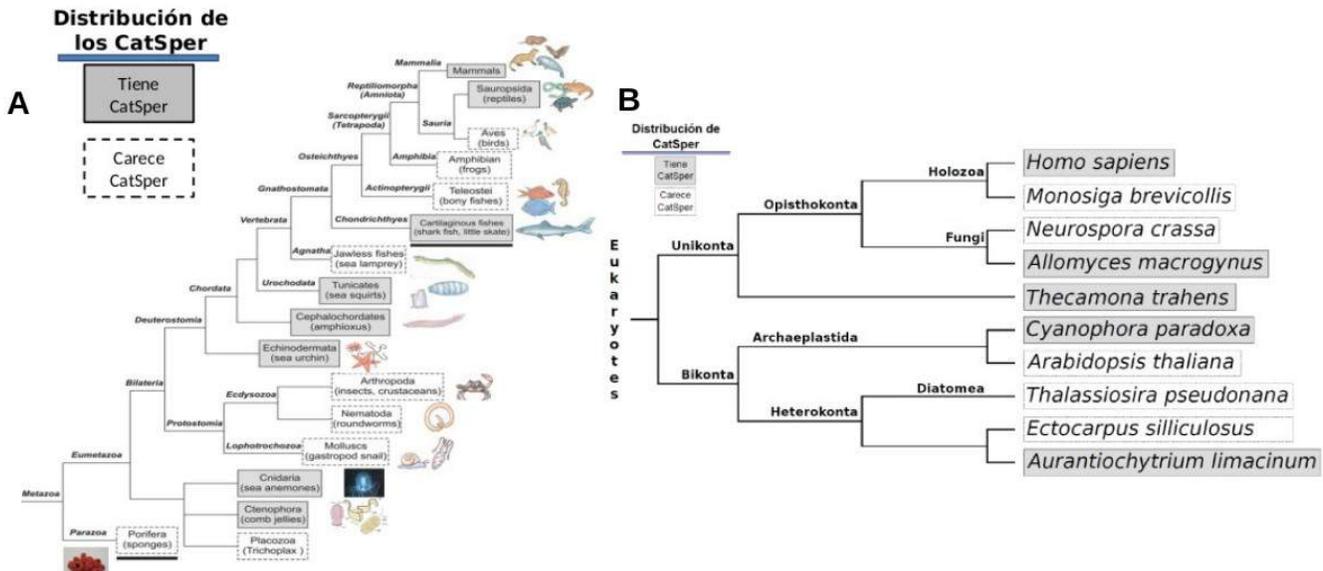


Figura 19: **A.** Distribución filogenética de CatSper en metazoarios (Cai & Clapham, 2008). **B.** Distribución filogenética de CatSper en no metazoarios (Cai & Clapham, 2012; Cai *et al.*, 2014). Los recuadros grises con línea continua representan los grupos taxonómicos que conservan CatSper, mientras que los recuadros vacíos con línea punteada indican los grupos sin CatSper

Evolución de la adenilato ciclasa soluble y dependencia funcional del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide y la adenilato ciclasa soluble

De manera interesante, en el año 2002 Roelofs y colaboradores reportaron que los ortólogos de la sAC de humano están presentes en mamíferos, sin embargo están ausentes en especies como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y plantas (Roelofs *et al.*, 2002). Este patrón corresponde a la distribución filogenética de CatSper (Cai & Clapham, 2008; Cai *et al.*, 2014). Además, Wang y colaboradores reportaron que el sNHE interacciona físicamente con la isoforma completa de la sAC (sAC_f) y demostraron que esta interacción estabiliza a ambas proteínas (Wang *et al.*, 2007). De hecho, en espermatozoides del ratón nulo para el sNHE, la isoforma sAC_f desaparece de los espermatozoides maduros y la actividad de la sAC disminuye significativamente (Wang *et al.*, 2007). Todos estos reportes previos sugieren la existencia de un acoplamiento funcional entre CatSper, el sNHE y la sAC. Con base en lo anterior, decidimos analizar de manera sistemática la distribución de los

genes que codifican para las tres proteínas en el linaje completo de los eucariontes utilizando las bases de datos de DNA disponibles de genomas secuenciados.

HIPÓTESIS

La distribución filogenética de la sAC y el sNHE tendrá una correlación positiva con la distribución de CatSper.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la distribución filogenética y origen del acoplamiento funcional que se ha descrito para la sAC y el sNHE con CatSper.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la distribución filogenética de la sAC y el sNHE en los eucariontes y en que grupos filogenéticos coexisten.
- Determinar la relación evolutiva de la sAC y el sNHE con CatSper y en que grupos filogenéticos coexisten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Minería de base de datos y selección de especies

Para determinar la presencia de CatSper, el sNHE y la sAC en la filogenia de los eucariontes, realizamos una búsqueda tipo TblastN y BlastP (Altschul *et al.*, 1990; S. Altschul *et al.*, 1997) sobre las bases de datos disponibles (Tabla 3) utilizando las secuencias de los ortólogos de las tres proteínas de humano (*Homo sapiens*), del erizo púrpura de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) y de la anémona de mar (*Exaiptasia pallida*).

Tabla 3: Base de datos utilizadas para determinar la presencia de CatSper, el sNHE y la sAC

Base de datos	Sitio	Referencia
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	(S. F. Altschul <i>et al.</i> , 1997)
STRING 10	http://string-db.org/	(Franceschini <i>et al.</i> , 2013)
AGRIPEST BASE	http://agripestbase.org/	
InsectBase	http://www.insect-genome.com/	(Yin <i>et al.</i> , 2015)
e!Ensembl	http://www.ensembl.org/	(Kersey <i>et al.</i> , 2015)
e!EnsemblMetazoa	http://Metazoa.ensembl.org/	(Kersey <i>et al.</i> , 2015)
e!EnsemblFungi	http://fungi.ensembl.org/	(Kersey <i>et al.</i> , 2015)
e!EnsemblProtist	http://protists.ensembl.org/	(Kersey <i>et al.</i> , 2015)
Broad Institute / Origins of	http://www.broadinstitute.org/	

Multicellularity		
SkateBase	http://skatebase.org/	(Wang <i>et al.</i> , 2012; Wyffels <i>et al.</i> , 2014)
Genome Portal	http://genome.jgi.doe.gov/	(Nordberg <i>et al.</i> , 2014)
Phytozome	https://phytozome.jgi.doe.gov/	(Nordberg <i>et al.</i> , 2014)
Metazome	https://metazome.jgi.doe.gov	(Nordberg <i>et al.</i> , 2014)
SilkDB	http://silkworm.genomics.org.cn/	(Xia <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2005)
FlyBase	http://flybase.org/	(Attrill <i>et al.</i> , 2016)

Posteriormente, definimos qué especies conservan CatSper, sNHE y la sAC. Para este propósito decidimos aplicar los siguientes criterios: para CatSper, consideramos como caso positivo a las especies que conservan al menos 4 subunidades α formadoras de poro, considerando lo reportado para ratón (Qi *et al.*, 2007). Es importante mencionar que algunas especies conservan copias insuficientes (de 1 a 3) de subunidades α de CatSper, por lo que consideramos a estas especies como carentes de CatSper. En el caso del sNHE, las especies que conservan al menos uno de los ortólogos de *SLC9C* (la familia que codifica para el sNHE) son consideradas como especies que tienen el sNHE. Actualmente, algunos mamíferos poseen dos genes de esta familia, el *SLC9C1* (Wang *et al.*, 2003) y el *SLC9C2* (Liu *et al.*, 2010) y ambos genes son expresados preferentemente en el testículo (Donowitz *et al.*, 2013). En ratón, el gen *SLC9C2* se encuentra pseudogenizado (Símbolo MGI: Gm6185 (Blake *et al.*, 2017) y sólo el gen *SLC9C1* permanece como una proteína funcional. Por esta razón, el estudio del sNHE avanzó significativamente en ratón. Como una característica particular del sNHE, la proteína posee un dominio catalítico seguido por un VSD y un CNBD en el C-terminal. Cabe mencionar que existen algunos intercambiadores Na^+/H^+ (NHEs) con un CNBD en el C-terminal sin tener el VSD (tal es el caso de la proteína SOS1 de *Arabidopsis thaliana* (C.-I. Wu *et al.*, 1996). Para el caso de la sAC, las proteínas que poseen 2 dominios catalíticos, un dominio P-loop NTPasa (Leipe *et al.*, 2004) y carecen de segmentos transmembranales fueron considerados como ortólogos de la sAC. La eficiencia de nuestro método la probamos comparando la distribución de las subunidades α de CatSper con los resultados reportados previamente por Cai y colaboradores (Cai & Clapham, 2008, 2012; Cai *et al.*, 2014).

Sintenia e identificación de pseudogenes

Para evaluar las diferencias y semejanzas entre genomas de dos especies es común evaluar el nivel de sintenia de uno o más genes contiguos entre dos bloques sinténicos (Ghiurcuta & Moret, 2014). Para evaluar la conservación del bloque sinténico correspondiente a los genes *SLC9C* y *SLC9B* (un gen que codifica para un NHE específico de espermatozoide denominado NHA) utilizamos el navegador Genomicus (<http://genomicus.biologie.ens.fr>) (Louis *et al.*, 2015), el cual permite visualizar los ortólogos de distintas especies en presencia de los genes adyacentes. Además, utilizamos la base de

datos y navegador de e!Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (Yates *et al.*, 2016) para identificar los genes que flanquean a *SLC9C* y *SLC9B*.

Para encontrar el *SLC9C* degenerado en el tinamú blanco (*Tinamus guttatus*) y en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), obtuvimos el fragmento de la secuencia genómica flanqueada por los ortólogos de *GAL* y *PPP6R3* en el genoma del tinamú y el RNA no codificante (Dmel/asRNA:CR45143-RA) localizado río abajo del gen *FUS* del genoma de la mosca. Interesantemente, durante la minería de los genomas de pavo (*Meleagris gallopavo*), pato (*Anas platyrhynchos*) y paloma (*Columba livia*) encontramos secuencias con arreglos de exones con identidad para la sAC, por esta razón decidimos obtener las secuencias y analizarlas. Posteriormente, las secuencias fueron procesadas mediante el software *Small Exon Finder* (<http://gander.wustl.edu/~wilson/smallexonfinder/index.html>) (Shaffer *et al.*, 2014). Cada secuencia de aminoácidos deducida fue alineada con los ortólogos más cercanos. Todos los alineamientos fueron realizados con *ClustalW* con los parámetros por defecto (Thompson *et al.*, 1994) y las visualizaciones fueron preparadas con el paquete “msa” en Rstudio (Bodenhofer *et al.*, 2015).

Análisis filogenético del sNHE y la sAC

Para determinar la historia filogenética de la sAC y el sNHE, seleccionamos al menos una proteína representativa para cada grupo taxonómico de la filogenia de los eucariontes. Utilizamos 26 secuencias anotadas para el sNHE (Tabla 4) y 33 secuencias de proteínas para la sAC (Tabla 5). En el caso del análisis filogenético de la sAC, incluimos el homólogo de sAC de *Dyctyostelium* el cual codifica una guanilato ciclasa soluble (sGC-Amoeba) (Roelofs *et al.*, 2001). Ambos análisis evolutivos fueron realizados con MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), con el cual determinamos el mejor modelo de sustitución que se ajusta a cada conjunto de secuencias. La historia evolutiva fue inferida mediante el método de “Maximum likelihood” basado en el modelo de Whelan y Goldman (Whelan & Goldman, 2001) y el modelo Le_Gascuel_2008 (Le & Gascuel, 2008) para el set de secuencias de la sAC y el sNHE respectivamente. Los árboles iniciales fueron obtenidos por búsqueda heurística aplicando el método de *Neighbor-Joining* a la matriz de distancias por pares estimada usando el modelo JTT. Todas las posiciones con menos del 80% de cobertura fueron eliminadas.

Tabla 4: Homólogos del sNHE para realizar análisis filogenético de la figura 24

Especie	Nombre común	Identificador
<i>Homo sapiens</i>	Human C1	NM_183061.2
<i>Mus musculus</i>	Mouse	NM_198106.4
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat C1	NM_001008762.2
<i>Homo sapiens</i>	Human C2	NM_178527.3
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat C2	XM_017604643.1
<i>Anole carolinensis</i>	Lizard	XM_016993479.1
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Spotted gar	XM_015338064.1
<i>Callorhinchus milii</i>	Elephant shark	XM_007887836.1
<i>Latimeria chalumnae</i>	Coelacanth	XM_014494506.1
<i>Branchiostoma floridae</i>	Amphioxus	XM_002597519.1
<i>Ciona intestinalis</i>	Ciona	XM_002119928.2
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Purple sea urchin	NM_001098457.1
<i>Lottia gigantea</i>	Owl limpet C1	XM_009055560.1
<i>Lottia gigantea</i>	Owl limpet C2	XM_009053155.1
<i>Crassostrea gigas</i>	Pacific oyster	XM_020066843.1
<i>Lingula anatina</i>	Lingulata	XM_013565254.1
<i>Danaus plexippus</i>	Monarch butterfly	DPOGS203525
<i>Heliconius melpomene</i>	Postman butterfly	HMEL013207
<i>Exaiptasia pallida</i>	Glass anemone	XM_021043824.1
<i>Amphimedon queenslandica</i>	Sponge	XM_003384983.2
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Sea walnut	ML174765a
<i>Salpingoeca rosetta</i>	Apunsozoa	XM_004995518.1
<i>Ectocarpus silliculosus</i>	Brown algae	Esi0050_054
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOS1-Arabidopsis	NM_126259.4
<i>Auratiochytrium limacinum</i>	Labyrinthulomycete	gw1.19.482.1
<i>Thecamona trahens</i>	Choanoflagellate	XM_013897693.1

Tabla 5: Homólogos de la sAC para realizar análisis filogenético de la figura 25

Especie	Nombre común	Identificador
<i>Homo sapiens</i>	Human	XM_011509760.3
<i>Mus musculus</i>	Mouse	NM_173029.3
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat C1	NM_021684.1
<i>Anole lizard</i>	Lizard	XM_008119652.2
<i>Callorhinchus milii</i>	Elephant shark	XM_007890197.1
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Spotted gar	XM_015359032.1
<i>Latimeria chalumnae</i>	Coelacanth	XM_014493498.1
<i>Trichoplax adhaerens</i>	Placozoa	XM_002117821.1
<i>Amphimedon queenslandica</i>	Sponge	XM_019993565.1
<i>Exaiptasia pallida</i>	Glass anemone	KY853034.1
<i>Ciona intestinalis</i>	Ciona	XM_002121860.4
<i>Branchiostoma floridae</i>	Amphioxus	XM_002610098.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Purple sea urchin	NM_001025209.1

<i>Lingula anatina</i>	Lingulata	XM_024076007.1
<i>Crassostrea gigas</i>	Pacific oyster	XM_011451881.2
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Sea walnut	ML29314a
<i>Heliconius melpomene</i>	Postman butterfly	HMEL015715
<i>Danaus plexippus</i>	Monarch butterfly	DPOGS208170
<i>Bombyx mori</i>	Silkworm	XM_021351392.1
<i>Anopheles gambiae</i>	Mosquito	AGAP008683
<i>Ectocarpus silliculosus</i>	Brown algae1	CBJ26102.1
<i>Ectocarpus silliculosus</i>	Brown algae2	CBJ29407.1
<i>Auratiochytrium limacinum</i>	Labyrinthulomycete1	Aurli1 36553
<i>Auratiochytrium limacinum</i>	Labyrinthulomycete2	Aurli1 3394
<i>Auratiochytrium limacinum</i>	Labyrinthulomycete3	Aurli1 29869
<i>Auratiochytrium limacinum</i>	Labyrinthulomycete4	Aurli1 11945
<i>Allomyces macrogynus</i>	Fungi1	AMAG_15879
<i>Allomyces macrogynus</i>	Fungi2	AMAG_14269
<i>Salpingoeca rosetta</i>	Apunsozoa	XM_004990475.1
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Diatom	XM_002289477.1
<i>Dictyostelium discoideum</i>	sGC_Amoeba	XM_638127.1
<i>Thecamona trahens</i>	Choanoflagellate1	XM_013900106.1
<i>Thecamona trahens</i>	Choanoflagellate2	XM_013898968.1

Análisis de motivos y dominios en las secuencias de la sAC

Con la finalidad de determinar la variabilidad de dominios en las secuencias homologas de la sAC (Tabla 4), realizamos un análisis utilizando SUPERFAMILY (Gough *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2015). De la misma forma, realizamos un análisis con el algoritmo MEME para determinar los motivos específicos de metazoarios. La búsqueda se delimitó a un máximo de 20 motivos con una ocurrencia de cero o una vez por secuencia y un tamaño de 60 a 200 aminoácidos (Bailey *et al.*, n.d.). Ambos análisis fueron depurados manualmente.

RESULTADOS

Relación evolutiva entre la sAC, el sNHE y CatSper en Metazoa

La distribución de CatSper, el sNHE y la sAC en los grupos taxonómicos que comprenden a los eucariontes está resumida en la figura 20. A partir de que encontramos una distribución heterogénea dentro de tres grupos taxonómicos (aves, peces óseos y artrópodos), entonces los indicamos con una clasificación ambigua (cajas abiertas, Figura 20). Los detalles de la distribución de genes se muestra en figuras separadas: aves (Figura 21), peces óseos (Figura 22) y artrópodos (Figura 23).

Reportes previos han sugerido que CatSper está distribuido de manera heterogénea dentro de toda la filogenia de los eucariontes (Cai & Clapham, 2008, 2012; Cai *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestro análisis indica que el sNHE está conservado sólo dentro de los animales (Metazoa, Figura 20).

El análisis filogenético del sNHE cuenta la historia evolutiva de este transportador. Como esperábamos, los ortólogos del sNHE pertenecientes a los Metazoa se agruparon en un clado (caja verde) separado de los homólogos del sNHE, estas especies fuera de los Metazoa (no-metazoarios) se agruparon a un clado distante (caja púrpura) (Figura 24). La composición general de los dominios de los ortólogos y homólogos del sNHE se explican a continuación, el dominio catalítico del intercambiador Na^+/H^+ (caja roja), el VSD (caja azul) y el CNBD (caja amarilla). Por ejemplo, la proteína SOS1, un NHE de *Arabidopsis thaliana* (Wu *et al.*, 1996a) posee un CNBD pero carece de un VSD (Figura 24), por lo que consideramos a éste como un homólogo del sNHE. Estos resultados sugieren que el sNHE pudo emerger en un proceso temprano de la especiación de los Metazoa. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de la existencia de organismos pertenecientes al grupo de los no-metazoarios que conserven un ortólogo del sNHE cuyo genoma aún no esté secuenciado.

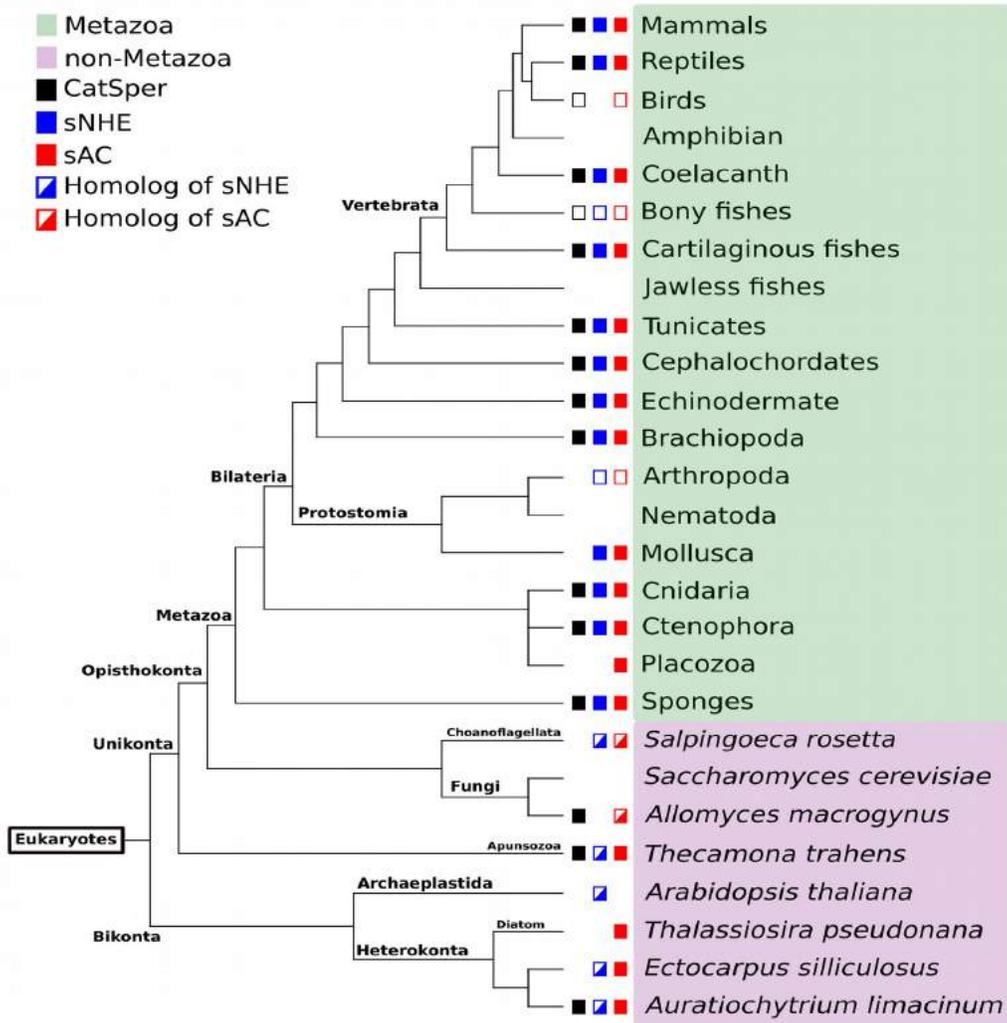


Figura 20: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los eucariontes. El árbol representa los grupos taxonómicos de los Metazoa (caja verde) y no-metazoarios (caja púrpura). Los grupos taxonómicos con cajas abiertas tienen variedad en la distribución dentro del grupo. Los homólogos del sNHE y la sAC están representados con cajas llenas a la mitad, azul y rojo respectivamente. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.

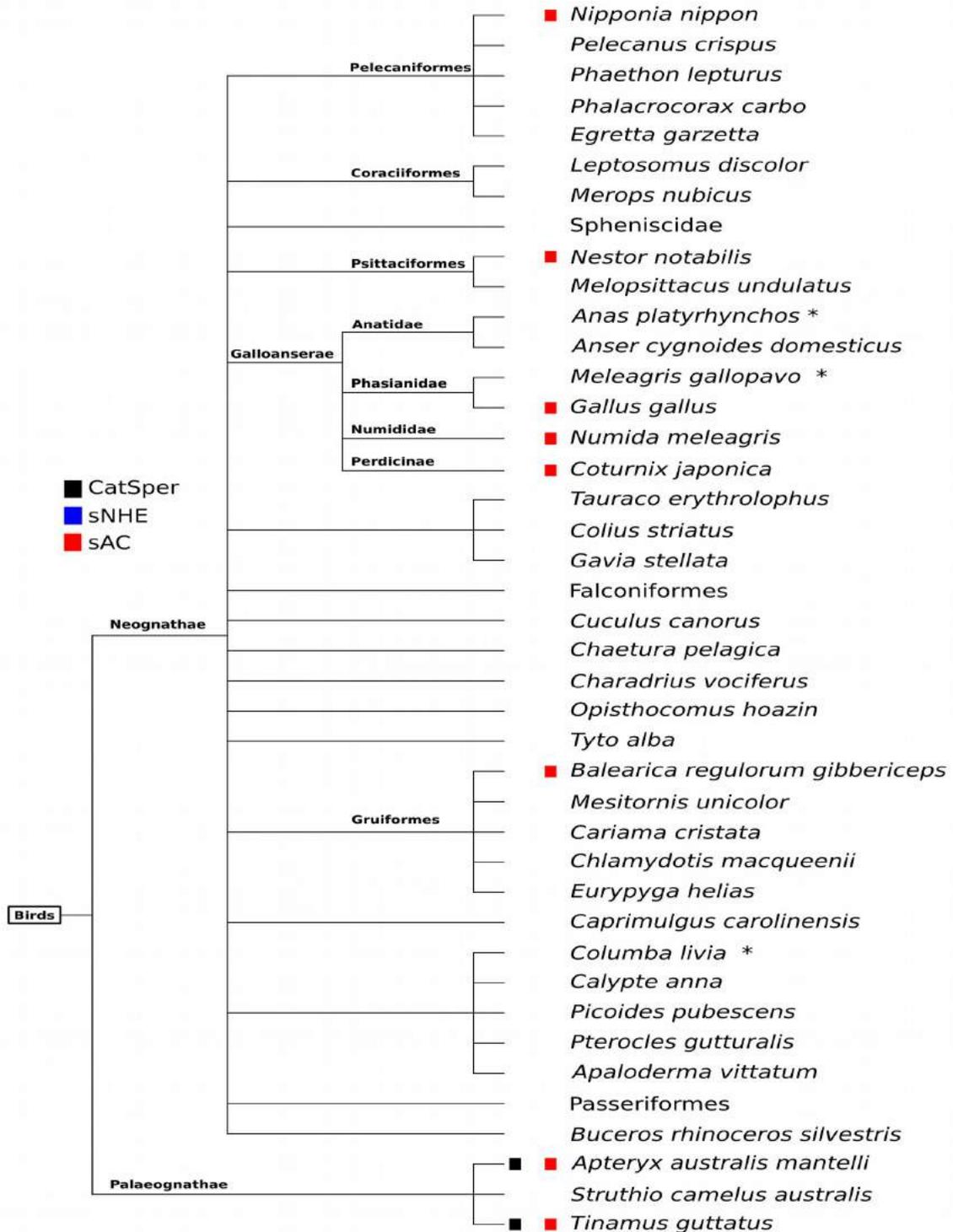


Figura 21: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en las aves. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.

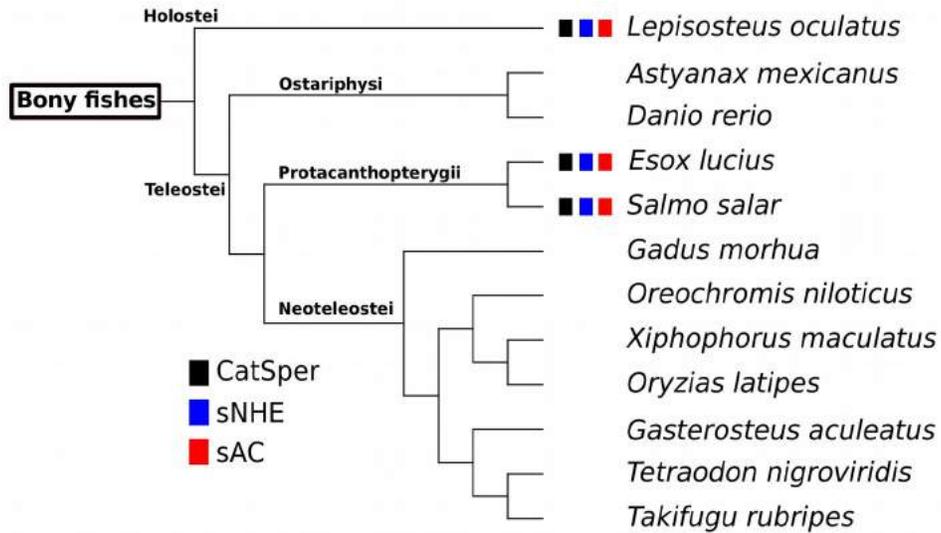


Figura 22: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los peces. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.

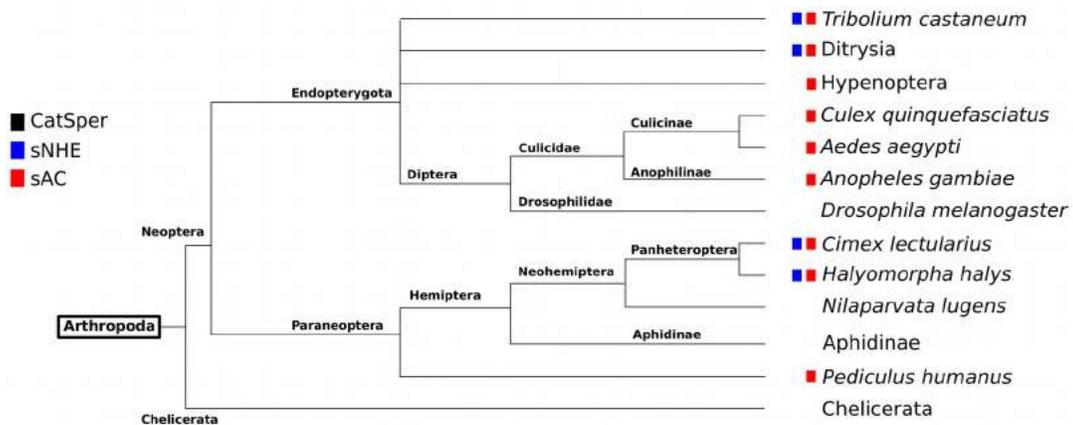


Figura 23: Distribución filogenética de los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) en los artrópodos. El tamaño de las ramas no es proporcional a su tasa evolutiva.

SNHE

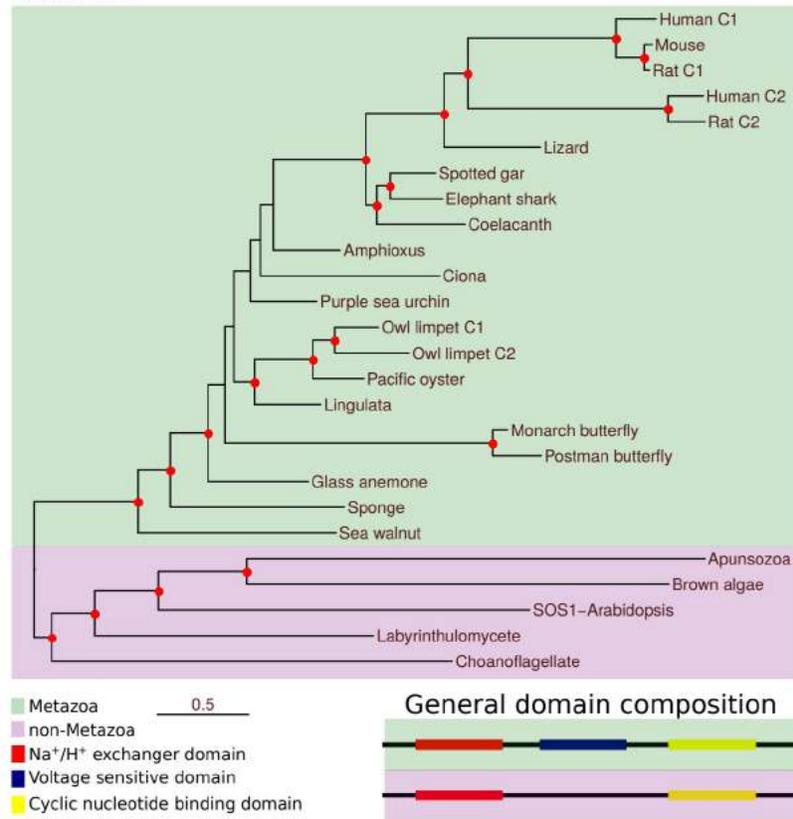


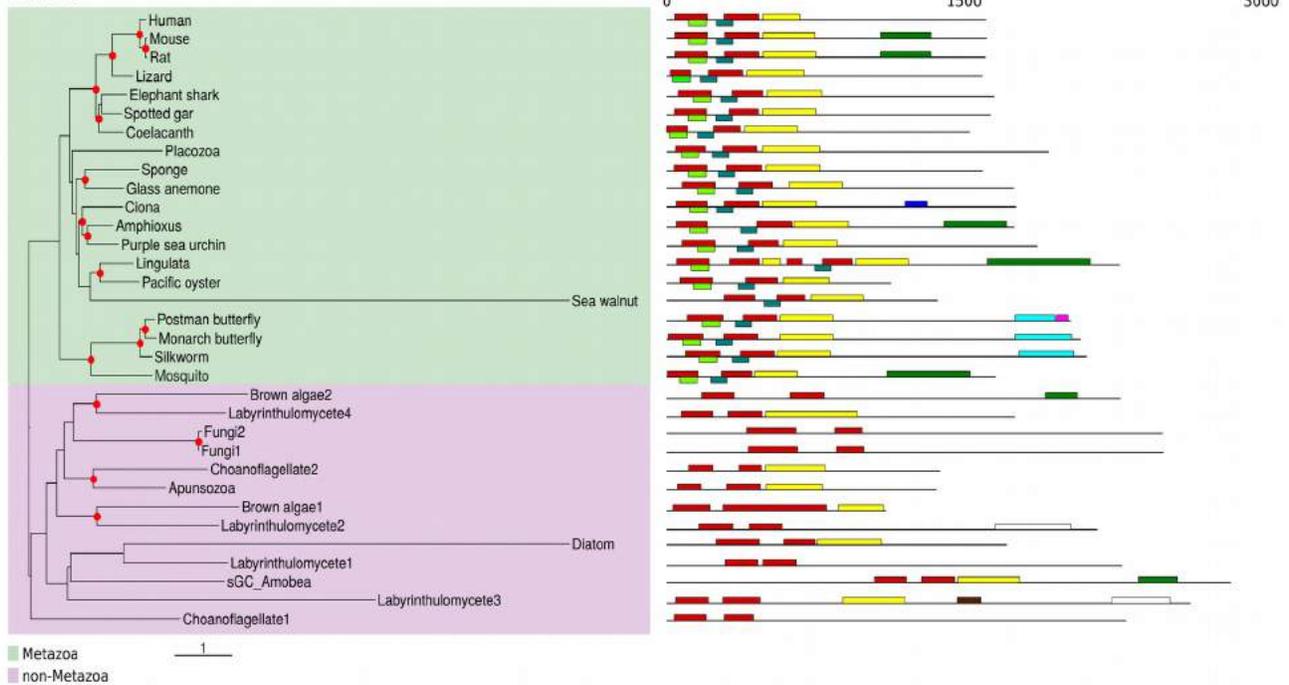
Figura 24: Análisis filogenético y la composición de dominios del sNHE y sus homólogos. La historia evolutiva se infirió entre los ortólogos y homólogos del sNHE. El árbol está dibujado a escala, se muestra el árbol con la mayor probabilidad y la longitud de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. Los puntos rojos en las ramas indican que el valor de *bootstrapping* es mayor al 50%. Se usó una distribución discreta Gamma de dos categorías para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios (+G, parámetro = 1.73).

Por otra parte, previamente se ha reportado que la proteína sAC puede ser encontrada en especies pertenecientes al grupo de los no-metazoarios (Figura 25) (Roelofs *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004; Leipe *et al.*, 2004; Blackstone, 2014). La historia evolutiva de los ortólogos de la sAC muestra una distribución amplia dentro de los Eucariontes, es decir, se encuentra en los Metazoa y en los no-metazoarios. De acuerdo con los resultados obtenidos por el software SUPERFAMILY (Oates *et al.*, 2015), observamos una diversificación del C-Terminal de las sAC, además de dos motivos específicos de Metazoa obtenidos mediante la suite MEME (Bailey *et al.*, 2009). La composición de los dominios que encontramos es: el dominio catalítico (caja roja), el dominio P-loop NTPasa (caja amarilla), el dominio de hidrolasa dependiente de metales (caja cian), el dominio compuesto de hidrolasa dependiente de metales (caja rosa), el dominio tipo TPR (caja verde

oscuro), el dominio tipo HD-PDEasa (caja blanca), el dominio tipo PH (caja café) y el dominio tipo HCP (caja azul). Además, se muestra el resultado de un análisis de búsqueda de motivos (MEME) en el que encontramos dos motivos específicos de Metazoa (caja verde claro y cian por debajo de los dominios catalíticos) (Figura 25).

La distribución heterogénea en el análisis filogenético sugiere que alguna sAC perdió el dominio *P-loop* NTPasa durante el proceso de evolución ya que esta configuración de dominios (dos dominios catalíticos y un dominio *P-loop* NTPasa) se encuentra en sAC de bacterias (Roelofs *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Es importante mencionar que la mayoría de las especies de bacterias conservan una sAC con sólo un dominio catalítico, mientras que algunas especies poseen dos dominios catalíticos (Chen *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2004).

sAC



- Nucleotide cyclase
- TPR-like
- P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
- HD-domain/PDEase-like
- Metallo-dependent hydrolase
- PH domain-like
- Composite domain of metallo-dependent hydrolase
- HCP-like



Figura 25: Análisis filogenético y composición de dominios de la sAC y sus homólogos. La historia evolutiva se infirió entre los ortólogos y homólogos de la sAC. El árbol está dibujado a escala, se muestra el árbol con la mayor probabilidad y la longitud de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. Los puntos rojos en las ramas indican que el valor de *bootstrapping* es mayor al 50%. Se usó una distribución discreta Gamma de dos categorías para modelar las diferencias de velocidad evolutivas entre los sitios (+G, parámetro = 1.66). Las sAC de Metazoa forman un clado independiente (caja verde), sin embargo se observaron sAC fuera de los no-metazoarios. De acuerdo con los resultados obtenidos por el software SUPERFAMILY, nosotros observamos una diversificación del C-Terminal de las sAC. La composición de dominios se describe a continuación, el dominio catalítico (caja roja), el dominio P-loop NTPasa (caja amarilla), el dominio de hidrolasa dependiente de metales (caja cian), el dominio compuesto de hidrolasa dependiente de metales (caja rosa), el dominio tipo TPR (caja verde oscuro), el dominio tipo HD-PDEase (caja blanca), el dominio tipo PH (caja café) y el dominio tipo HCP (caja azul). Además, se muestra el resultado de un análisis de búsqueda de motivos (MEME), se observan dos motivos específicos de Metazoa (caja verde claro y cian por debajo de los dominios catalíticos).

Previamente, Cai y colaboradores identificaron los pseudogenes de CatSper3 y CatSper β en gallo comparando los bloques sinténicos correspondientes entre humano y gallo (Cai & Clapham, 2008). Estos resultados sugieren que las especies que carecen de CatSper lo perdieron durante la evolución y se encuentran bajo un proceso de pseudogenización. De la misma manera, nosotros encontramos el pseudogene del sNHE en el genoma de una ave primitiva (*Tinamus guttatus*) utilizando los bloques sinténicos entre esta ave, coelacanto, pejelagarto y lagartija (Figura 26A). Además corroboramos la presencia de un pseudogene para el sNHE en la mosca de la fruta utilizando la conservación de la sintenia con dos mariposas (Figura 26B). Estos resultados sugieren que todas las especies de Metazoos que carecen de un sNHE en el presente, solían poseer esta proteína, como en el caso de CatSper. Por otra parte, fue imposible determinar la conservación de la sintenia de sAC entre diferentes especies de distintos grupos taxonómicos en vertebrados debido a que encontramos varios sitios de translocación de la sAC (*ADCY10*) en genomas de distintas especies (datos no mostrados). Por lo anterior, nos resultó complicado determinar una región blanco para analizar la presencia de pseudogenes para la sAC. Sin embargo, a partir de resultados obtenidos de TBlastN encontramos posibles pseudogenes para la sAC en tres aves que no la conservan (Figura 26C). Esta evidencia soporta que las aves que carecen de sAC solían poseer esta proteína.

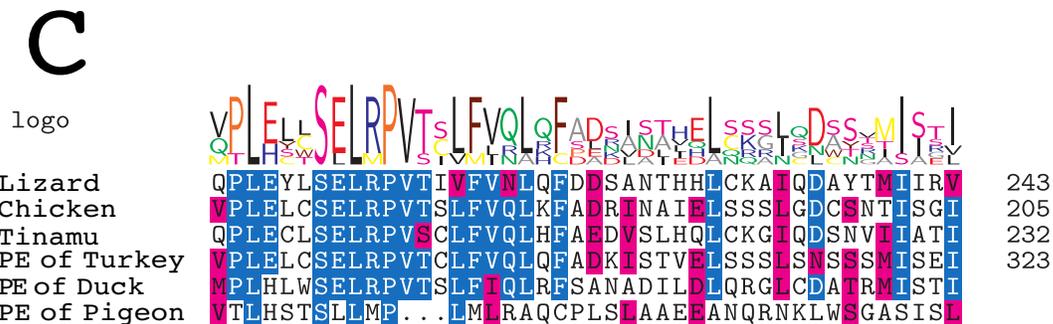
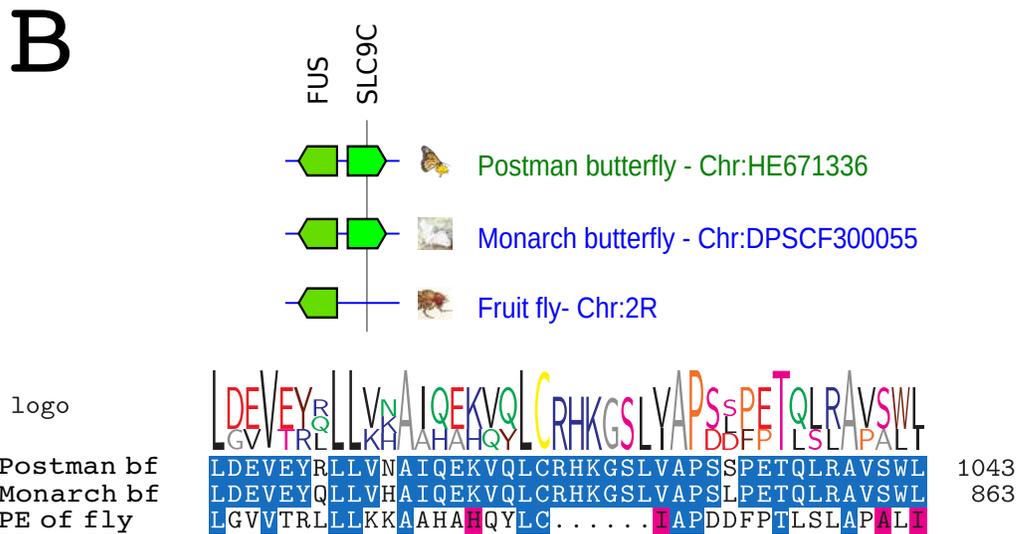
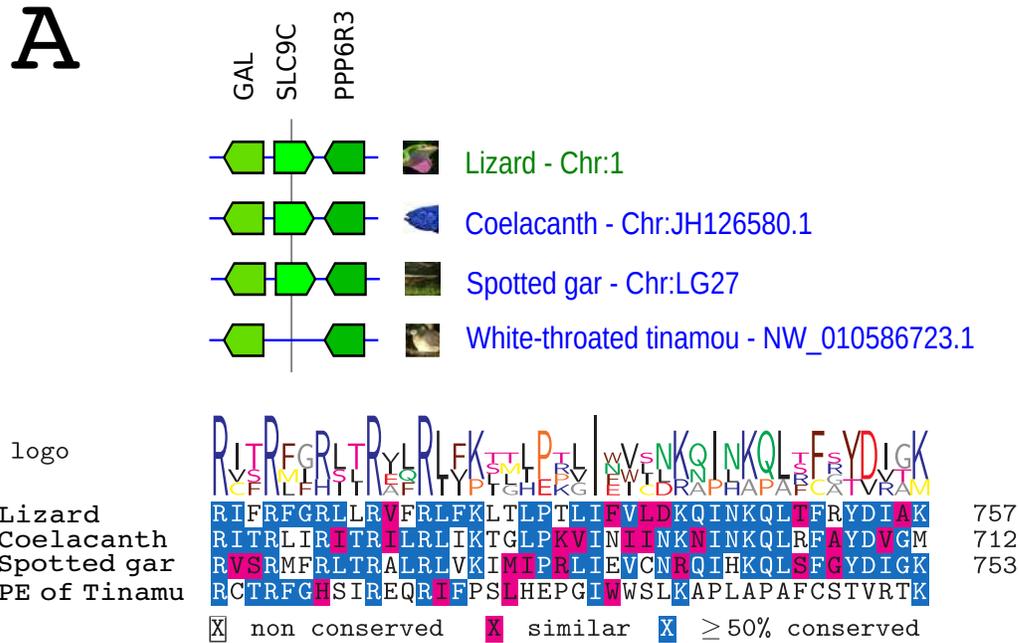


Figura 26: Sintenia del SLC9C y pseudogenes de SLC9C y ADCY10. **A.** El panel superior muestra el bloque sinténico del SLC9C entre lagartija, coelacanto, pejelagarto y tinamú blanco. El panel inferior muestra el alineamiento entre los fragmentos representativos de las proteínas del sNHE de lagartija, coelacanto, pejelagarto y la secuencia de amino ácidos predichos de los exones obtenidos del genoma del tinamú blanco (PE of Tinamu). **B.** El panel superior muestra el bloque sinténico del SLC9C entre dos mariposas (bf) y la mosca de la fruta. El panel inferior muestra el alineamiento de los fragmentos de proteínas entre las dos mariposas y la secuencia de aminoácidos predica del exon obtenido de la mosca de la fruta (PE of fly). **C.** alineamiento representativos de la sAC de lagartija, pollo y tinamú blanco y las secuencias de aminoácidos deducidas de los exones predichos de pavo (PE of Turkey), pato (PE of Duck) y paloma (PE of Pigeon). Los cromosomas (Chr) no están representados a escala.

En Metazoa, la distribución del sNHE y la sAC está altamente correlacionada con la distribución de CatSper (Figura 20). Actualmente, algunos grupos taxonómicos son clasificados dentro de -Todo- o -Nada-. Al inicio de nuestro análisis, observamos que las especies que poseen CatSper siempre conservan el sNHE y la sAC como es el caso de mamíferos, reptiles, coelacanto, peces cartilagosos, tunicados, cefalocordados, equinodermos, braquiópodos, cnidarios y ctenóforos (Figura 20). Además, encontramos tres especies de peces óseos que conservan CatSper (Yanagimachi et al., 2017) también poseen el sNHE y la sAC, por lo que consideramos que esta regla podría aplicar para todos los Metazoa. Sin embargo, encontramos excepciones en dos aves primitivas (*Apteryx australis* y *Tinamus guttatus*) que conservan CatSper y sAC pero no conservan el sNHE, indicando que la regla no es absoluta. De igual manera, encontramos varios grupos taxonómicos que conservan el sNHE y la sAC pero carecen de CatSper: moluscos y artrópodos (Figura 20). Además, algunas especies sólo conservan la sAC como es el caso de algunas aves, artrópodos y placozoa. Con base en lo anterior podemos definir que existen patrones intermedios fuera de los grupos de -Todo- y -Nada- descritos previamente. Sin embargo, la distribución general de CatSper, del sNHE y la sAC en Metazoa sugiere un proceso de coevolución entre las tres proteínas.

Distribución del NHA

Recientemente, los intercambiadores NHA1 (*SLC9B1*) y el NHA2 (*SLC9B2*) se reportaron como NHEs específicos del espermatozoide de ratón (Fuster & Alexander, 2014; Chen *et al.*, 2016). De igual forma, estos intercambiadores están enriquecidos en testículo de humano (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164037-SLC9B1/tissue>). La importancia de los NHAs la demostraron Chen y colaboradores en el 2016: el ratón nulo para NHA1 muestra una reducción parcial en la fertilidad masculina, mientras que el ratón nulo para ambos intercambiadores (NHA1 y NHA2) es completamente infértil (Chen *et al.*, 2016).

Debido a que los intercambiadores NHAs comparten algunas propiedades con el sNHE, como la localización en la pieza principal del flagelo y el fenotipo de los ratones nulos -defectos en la motilidad y disminución de la expresión de sAC- decidimos investigar la distribución filogenética de los NHAs en vertebrados. Una búsqueda simple en *Genomicus* v91.01 reveló que en humano, el NHA1 y NHA2 están localizados uno seguido del otro en el cromosoma 4 (Figura 27), lo cual sugiere que ocurrió un evento de duplicación génica. Además, demostramos que el SLC9B se encuentra en vertebrados como pavo y gallo, especies que sólo conservan la sAC. De igual forma, el NHA se encuentra en rana, medaka y pez cebra (peces óseos), especies que carecen de CatSper, el sNHE y la sAC. Por otra parte, observamos que la lagartija no conserva el NHA, sin embargo tiene CatSper, el sNHE y sAC.

Estos resultados implican que los NHAs no tienen relación con la distribución evolutiva de CatSper, el sNHE y la sAC, lo que sugiere que la distribución que describimos

no es sólo una consecuencia de proteínas específicas de espermatozoide en mamíferos o de proteínas involucradas en la regulación de la hiperactivación del batido flagelar.

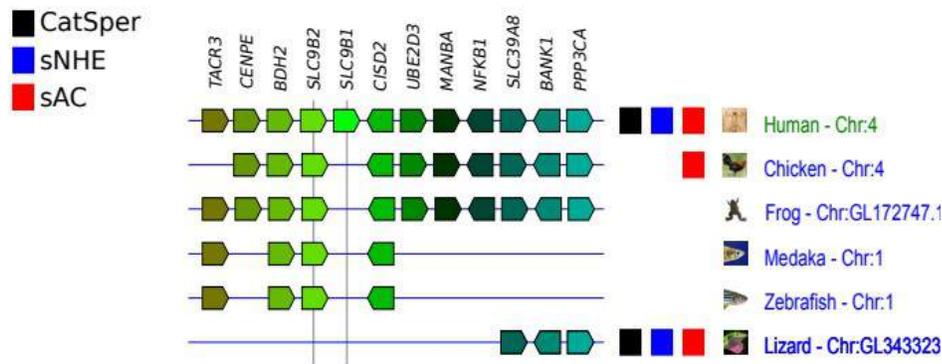


Figura 27: Nivel de conservación de la sintenia del NHA. El SLC9B se encuentra en vertebrados como pavo y gallo, especies que sólo conservan la sAC. De igual forma, el NHA se encuentra en rana, medaka y pez cebra (peces óseos), especies que carecen de CatSper, el sNHE y la sAC. Por otra parte, observamos que la lagartija no conserva el NHA, sin embargo tiene CatSper, el sNHE y sAC. Los genes que codifican CatSper (cuadro negro), el sNHE (cuadro azul) y sAC (cuadro rojo) están representados a un lado de las especies.

DISCUSIÓN

Coevolución de CatSper, el sNHE y la sAC en Metazoa

En este estudio, realizamos un análisis de genómica comparativa con los genes que codifican para CatSper, el sNHE y la sAC y encontramos una distribución restringida para cada proteína. En Metazoa, la distribución de CatSper, el sNHE y la sAC muestran un patrón aparente de coevolución entre las tres proteínas, lo que sugiere que el sNHE y la sAC son reguladores cruciales de CatSper en animales. Es importante mencionar que se reportó una distribución similar para el complejo de Ca^{2+} mitocondrial compuesto por MCU/MCUB, MICU1/MICU2 y EMRE (Bick *et al.*, 2012; Sancak *et al.*, 2013). Como un ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* carece de MCU y como consecuencia no están presentes MICU ni EMRE en el genoma de la levadura (Sancak *et al.*, 2013).

Recientemente en mamíferos y erizo de mar, se demostró que CatSper es regulado positivamente por la alcalinización del pH_i (Kirichok *et al.*, 2006; Lishko *et al.*, 2011; Seifert *et al.*, 2015). Por lo anterior, el sNHE debe ser un regulador crucial en la activación de CatSper en Metazoa. A partir de que el Na^+ extracelular es un factor esencial para la actividad del sNHE, la función de este intercambiador debe estar reducida para especies que realizan la fecundación en agua dulce (agua con baja concentración de Na^+). Esto explicaría

la razón por la cual los anfibios y la mayoría de los peces óseos que viven en agua dulce no conservan el sNHE. Por otra parte, el sNHE posee un CNBD y la sAC probablemente funciona como un regulador funcional del sNHE, lo cual sugiere que el sNHE y la sAC podrían trabajar en conjunto como reguladores importantes de CatSper.

Recientemente, se demostró en espermatozoides que un tratamiento transiente con un ionóforo de Ca^{2+} rescata la capacidad de fertilización *in vitro* (IVF) no solo en los espermatozoides de ratones nulos para CatSper sino también en espermatozoides de ratones nulos para la sAC (Navarrete *et al.*, 2016). Estos resultados sustentan la hipótesis de que la sAC funciona como un regulador crucial de CatSper. De hecho, el estudio inicial de CatSper reportó que este canal está involucrado en una entrada de Ca^{2+} inducido por cAMP en espermatozoides de ratón (Ren *et al.*, 2001). Nuestros resultados también apoyan la relevancia del cAMP en la activación de CatSper.

El dominio sensible a voltaje del sNHE

Una propiedad estructural del sNHE es que posee tres dominios predichos, el dominio catalítico, el VSD y el CNBD. Se analizaron los segmentos TM (S1-S4) del sNHE para al menos una especie representativa de cada grupo taxonómico (Figura 20). La mayoría de los sNHE que analizamos en este trabajo conservan los 4 segmentos TM (Souza *et al.*, 2014; Kang & Baker, 2016). Agregamos 2 VSDs funcionales del canal de potasio Kv1.2 y *Shaker* en el alineamiento. La firma de la hélice S2 ([F/Y]XX[D/E]XXX[R/K]) (Souza *et al.*, 2014) se conserva, excepto en el caso del sNHE de los ctenóforos en el cual observamos un VSD degradado desde el S2 al S4 (Figura 28), lo que sugiere que la sensibilidad de este sNHE está suprimida.

En las especies pertenecientes al grupo de los no-metazoarios, no encontramos ningún ejemplo de intercambiador con un VSD predicho. A su vez, encontramos algunos NHEs con un CNBD predicho, tal es el caso de la proteína SOS1 de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, el SOS1 está expresado mayoritariamente en células somáticas comparado con la expresión en la línea germinal (Schmid *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2002). Además este intercambiador no está involucrado en la reproducción sexual de *Arabidopsis*.

Recientemente, se confirmó la actividad tanto del VSD como del CNBD presentes en el sNHE de espermatozoides de erizo de mar (Windler *et al.*, 2018). En espermatozoides de ratón, también se demostró que la hiperpolarización del E_m induce un aumento en el pH_c de manera dependiente de Na^+ (Chávez *et al.*, 2014). Por lo tanto, el sNHE podría ser regulado por el E_m . En el erizo de mar, se sabe que el canal tetraKCNG/CNGK es responsable de la hiperpolarización del E_m al inicio de la quimiotaxis (Strünker *et al.*, 2006; Galindo *et al.*, 2007; Bönigk *et al.*, 2009) lo que lleva al incremento del pH_c mediado por el sNHE (Nishigaki *et al.*, 2001, 2004; González-Cota *et al.*, 2015) y la repolarización a través del canal HCN (Gauss *et al.*, 1998). Posteriormente, la concentración de Ca^{2+} citoplasmático aumenta a través de CatSper y se regula la forma del batido flagelar

(Strünker *et al.*, 2015; Espinal-Enríquez *et al.*, 2017). La quimiotaxis de los espermatozoides se observó en distintos grupos taxonómicos de invertebrados marinos como tunicados, equinodermos, moluscos y cnidaria (Miller, 1985) y la mayoría de ellos conservan el tetraKCNG/CNGK (Fechner *et al.*, 2015). Curiosamente, estos grupos taxonómicos también conservan CatSper, el sNHE y la sAC (Figura 20). Por lo anterior, resulta muy importante explorar si la cascada de señalización de la quimiotaxis en espermatozoides de erizo de mar se conserva en otros invertebrados marinos. Por otro lado, en muchos vertebrados, el canal Slo3 parece haber sustituido la función del tetraKCNG/CNGK (Vicens *et al.*, 2017). Es decir, la hiperpolarización del E_m a través del Slo3 es crítica para la activación de CatSper: en ratón el Slo3 junto con el sNHE y la sAC parecen ser importantes para el control de CatSper.

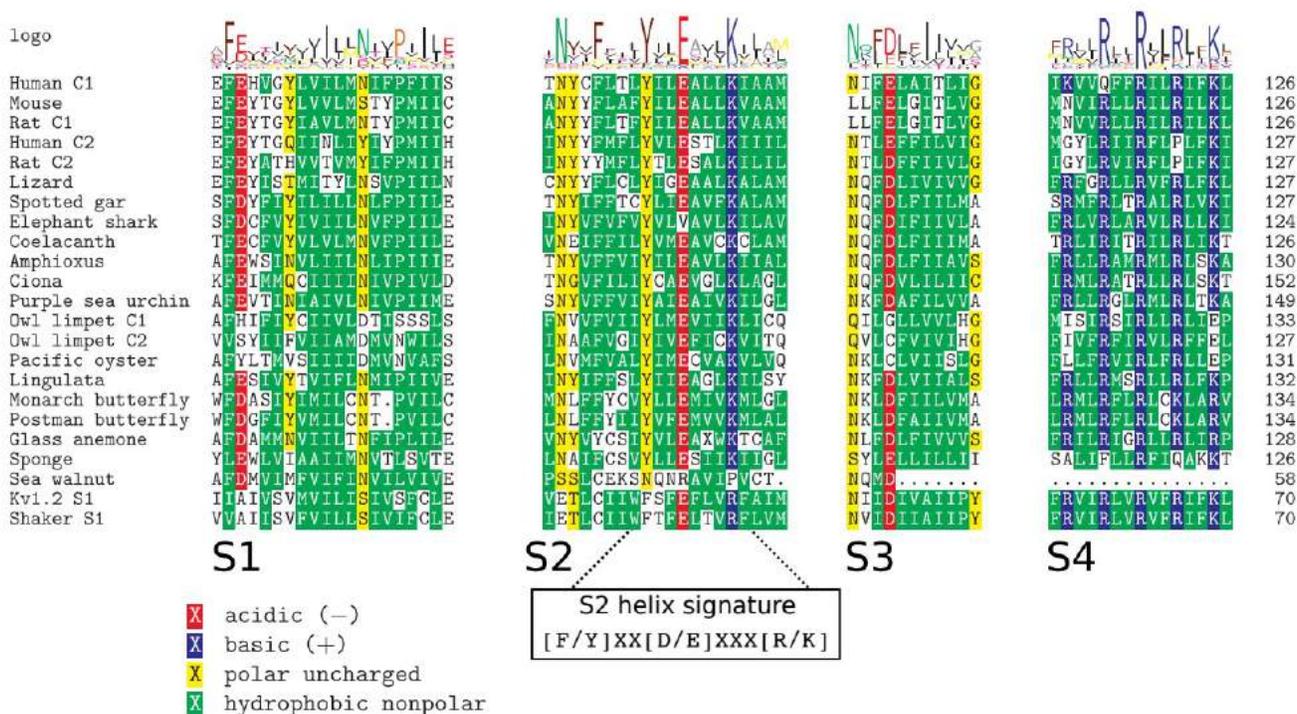


Figura 28: Alineamiento del VSD de los sNHE de metazoa. La mayoría de los sNHE que analizamos en este trabajo conservan los 4 segmentos TM (Souza *et al.*, 2014; Kang & Baker, 2016). Agregamos 2 VSDs funcionales del canal de potasio Kv1.2 y *Shaker* en el alineamiento. La firma de la hélice S2 ([F/Y]XX[D/E]XXX[R/K]) (Souza *et al.*, 2014) se conserva, excepto en el caso del sNHE de los ctenóforos en el cual observamos un VSD degradado desde el S2 al S4.

La importancia de los grupos intermedios entre -Todo- y -Nada-, y el caso particular del Tinamú blanco y el Kiwi marrón

En Metazoa encontramos dos patrones principales -Todo- y -Nada-, pero existen 3 excepciones que a continuación discutimos. Dentro de la distribución heterogénea en animales encontramos especies que carecen de CatSper pero que conservan el sNHE y la sAC (Int1) o especies que simplemente preservan la sAC (Int2). Además, encontramos dos especies de aves primitivas que conservan CatSper y la sAC pero no el sNHE (Int3).

El grupo Int1 incluye algunos artrópodos (Figura 23) y moluscos (Figura 20). En el caso de dípteros, identificamos los transcritos para el sNHE y la sAC en transcriptoma de testículos de gusano de seda (*Bombyx mori*) (<http://silkworm.genomics.org.cn/silkdb>, microarray sw10076, sw11099, sw13918). Curiosamente, la mariposa cartera (*Heliconius melpomene*) conserva 2 subunidades α formadoras de poro en CatSper en lugar de 4. Según nuestra definición, estas especies se clasifican como carentes de CatSper. Además, no sabemos el porqué algunas subunidades permanecen intactas en estas especies. Sería interesante determinar si CatSper está formado por homotetrámeros o tetrámeros de dímeros de las subunidades α formadoras de poro en CatSper. Una situación similar sucede en la avestruz (*Struthio camelus*) la cual sólo conserva 3 subunidades α de poro en CatSper. En el grupo Int1, sNHE y sAC se conservan incluso después de la pérdida de CatSper. Por lo tanto, sería posible que los canales de Ca^{2+} que sustituyen a CatSper puedan ser regulados por el pH_c y/o cAMP, pero se requieren estudios adicionales para abordar esta cuestión.

Por otro lado, el grupo Int2 que conserva sólo sAC, que incluye algunas aves (Figura 21), algunos artrópodos (Figura 23) y *Trichoplax adhaerens* (Figura 20; indicado como Placozoa). Aunque CatSper y sNHE no tienen ninguna función reportada en células somáticas, se ha propuesto que sAC desempeña un papel como sensor del cociente entre el CO_2 y el HCO_3^- ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) (Zippin *et al.*, 2001, 2003; Tresguerres *et al.*, 2010). Por lo tanto, se sugiere que la sAC juega dos papeles posibles en el grupo Int2: 1) la sAC modula la actividad del canal de Ca^{2+} que sustituye a CatSper y/o 2) funciona como un sensor de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ en células somáticas.

Finalmente, el grupo Int3 engloba las especies que conservan a CatSper y a la sAC, pero no al sNHE. Esta clasificación incluye sólo dos especies de aves primitivas, el Tinamú blanco y el Kiwi marrón (*Apteryx australis mantelli*) (Figura 21). Teniendo en cuenta que en Metazoa, la mayoría de las especies que conservan CatSper también preservan al sNHE, existen dos opciones: 1) CatSper no regula su actividad por la alcalinización del pH_c , o de lo contrario 2) algún transportador de protones debería haber sustituido la función del sNHE. En cualquiera de los casos, es bastante interesante estudiar la regulación de CatSper en el grupo Int3.

Regulación de CatSper en el grupo de los no-metazoarios

Ante la propuesta de que CatSper emergió en un estado temprano de la evolución de los eucariontes (Cai *et al.*, 2014), desconocemos alguna evidencia acerca de la regulación de esta proteína en las especies de los no-metazoarios. Nuestros resultados sugieren que CatSper, al menos en Metazoa, podría ser regulado positivamente por la alcalinización del pH_c a través de la actividad del sNHE. Sin embargo, se desconoce si la regulación de CatSper mediante el pH_c se conserva en los no-metazoarios.

Por ejemplo, se sabe que los gametos masculinos de *Allomyces macrogynus* muestran quimiotaxis a un quimioatrayente derivado de los gametos femeninos denominado Sirenina (Pommerville, 1978; Syeda *et al.*, 2016), además, conocemos que estos hongos poseen múltiples genes para CatSper1 (5 copias), CatSper4 (2 copias) y una copia para CatSper2 y CatSper3 (Cai & Clapham, 2012). Por lo anterior podemos especular que CatSper está involucrado en la quimiotaxis del gameto masculino en esta especie. Sin embargo, el mecanismo de señalización de la sirenina debe ser diferente de lo establecido en erizo de mar considerando que el hongo vive en agua dulce y, además, que no conserva el sNHE.

CONCLUSIONES

- En este estudio, realizamos un análisis de genómica comparativa para los genes que codifican para CatSper, el sNHE y la sAC y encontramos una distribución restringida para cada proteína en los grupos de organismos analizados.
- En Metazoa, la distribución de CatSper, el sNHE y la sAC muestran un patrón aparente de coevolución entre las tres proteínas, lo que refuerza que el sNHE y la sAC son reguladores cruciales de CatSper en animales.
- Determinamos que el gen del sNHE está pseudogenizado en el Tinamú blanco (*Tinamus guttatus*) y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).
- En las especies donde está presente el sNHE, está presente la sAC (artrópodos y los moluscos). Esto sugiere que la sAC es la proteína esencial para el sNHE como un posible estabilizador del plegamiento del sNHE.
- Existen especies donde está presente solo el gen de la sAC, como es el caso particular de algunas especies aves y artrópodos. Para estas especies, proponemos que se expresa una isoforma truncada de la sAC por *splicing* alternativo que pudiese funcionar de manera independiente del sNHE.

APORTACIONES Y PERSPECTIVAS

Durante la hiperactivación -un evento fundamental para la fecundación del espermatozoide de mamífero- participan una adenilato ciclasa soluble (sAC), un intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE) y un canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (CatSper), proteínas conectadas a través de una vía de señalización que regula el batido del flagelo del espermatozoide de mamífero (Figura 7).

En particular, el sNHE es una proteína constituida por un dominio catalítico, un dominio sensible a voltaje (VSD) y un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). Nuestro interés particular durante el desarrollo de este proyecto fue determinar la participación de los nucleótidos cíclicos (cNMPs) en la actividad del sNHE. Debido a las dificultades técnicas para lograr lo anterior, decidimos realizar experimentos con el CNBD aislado en lugar de la proteína completa del sNHE. Desafortunadamente, no obtuvimos una construcción estable y en solución. Sin embargo, como parte de las estrategias experimentales, desarrollamos un nuevo ensayo de unión entre el CNBD-CFP y un análogo fluorescente de cAMP (8-Fluo-cAMP) a través de la transferencia de energía resonante (FRET). Esta aproximación tiene diversas ventajas sobre las estrategias de anisotropía y cambios de fluorescencia por diferencias en la polaridad del ambiente, previamente descritas.

Además de abordar la función del sNHE mediante técnicas de bioquímica, decidimos realizar un análisis filogenético del sNHE en conjunto con la sAC y CatSper para obtener una visión evolutiva de la función del sNHE. De manera interesante, nuestros resultados muestran un patrón general de coevolución entre estas tres proteínas en metazoarios (Figura 20), apoyando la idea del acoplamiento funcional entre las proteínas. Por otra parte, en las especies fuera de los animales, nunca encontramos un ortólogo del sNHE, lo que indica que el mecanismo de regulación de CatSper es distinto a los que observamos en animales.

Finalmente, este trabajo tiene aportaciones importantes sobre la función del sNHE desde un punto de vista evolutivo. Además, aporta una nueva estrategia para el estudio de CNBDs poco o nulamente descritos y promueve el desarrollo de nuevas aproximaciones, diferentes a las que actualmente están descritas. Sin embargo, quedan preguntas sin responder. A continuación listo algunas de mi interés:

- Determinar la actividad del CNBD del sNHE de mamíferos mediante el ensayo de unión *in vivo*.
- Determinar la dependencia del pH_c de CatSper en especies que no tienen el sNHE.
- En especies que carecen de CatSper, averiguar los sustitutos de este canal (otro tipo de canal de Ca^{2+}) mediante análisis del transcriptoma, del proteoma y de la tasa evolutiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali Akbar, S., Nicolaides, K.H. & Brown, P.R. 1998. Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Human Development* **51**: 205–11.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Dj, L. 1997. Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, a a, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–402.
- Aravind, L., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Walker, D.R. & Koonin, E. V. 1998. Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends in Genetics : TIG* **14**: 442–4.
- Attrill, H., Falls, K., Goodman, J.L., Millburn, G.H., Antonazzo, G., Rey, A.J., Marygold, S.J. & FlyBase Consortium, the F. 2016. FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **44**: D786-92.
- Bailey, T., Boden, M., Buske, F., ... M.F.-N. acids & 2009, undefined. n.d. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Academic.Oup.Com*.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. & Noble, W.S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* **37**: W202-8.
- Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A. & Taylor, S.S. 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 45–50.
- Bick, a. G., Calvo, S.E. & Mootha, V.K. 2012. Evolutionary Diversity of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Science* **336**: 886–886.
- Blackstone, N.W. 2014. sAC as a model for understanding the impact of endosymbiosis on cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1842**: 2548–54.

- Blake, J.A., Eppig, J.T., Kadin, J.A., Richardson, J.E., Smith, C.L., Bult, C.J. & the Mouse Genome Database Group. 2017. Mouse Genome Database (MGD)-2017: community knowledge resource for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Research* **45**: D723–D729.
- Bodenhofer, U., Bonatesta, E., Horejš-Kainrath, C. & Hochreiter, S. 2015. msa: an R package for multiple sequence alignment. *Bioinformatics (Oxford, England)* **31**: 3997–9.
- Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., Kaupp, U.B., Kaupp, B. & Kaupp, U.B. 2009. An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis. *Science Signaling* **2**: ra68.
- Bos, J.L. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences* **31**: 680–6.
- Brelidze, T.I., Carlson, A.E. & Zagotta, W.N. 2009. Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 27989–97.
- 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**: 79–84.
- Cai, X. & Clapham, D.E. 2008. Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSperbeta. *PloS One* **3**: e3569.
- Cai, X. & Clapham, D.E. 2012. Ancestral Ca²⁺ signaling machinery in early animal and fungal evolution. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 91–100.
- Cai, X., Wang, X. & Clapham, D.E. 2014. Early Evolution of the Eukaryotic Ca²⁺ Signaling Machinery: Conservation of the CatSper Channel Complex. *Molecular Biology and Evolution* **31**: 2735–40.
- Carlson, A.E., Westenbroek, R.E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D.E., Hille, B., Garbers, D.L. & Babcock, D.F. 2003. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14864–8.
- Chávez, J.C., Ferreira, J.J., Butler, A., De La Vega Beltrán, J.L., Treviño, C.L., Darszon, A., Salkoff, L. & Santi, C.M. 2014. SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *The Journal of Biological Chemistry* **289**: 32266–75.
- Chávez, J.C., Hernández-González, E.O., Wertheimer, E., Visconti, P.E., Darszon, A. & Treviño, C.L. 2012. Participation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers SLC26A3 and SLC26A6,

the Cl⁻ channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **86**: 1–14.

Chen, S.-R., Chen, M., Deng, S.-L., Hao, X.-X., Wang, X.-X. & Liu, Y.-X. 2016. Sodium–hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death and Disease* **7**: e2152.

Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. & Buck, J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (New York, N.Y.)* **289**: 625–8.

Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D.E. 2011. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nature Communications* **2**: 153.

Chung, J.J., Miki, K., Kim, D., Shim, S.H., Shi, H.F., Hwang, J.Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X. & Clapham, D.E. 2017. Catsper γ regulates the structural continuity of sperm ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *ELife* **6**: 1–25.

Cukkemane, A., Grüter, B., Novak, K., Gensch, T., Bönigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U.B. & Seifert, R. 2007. Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K⁺ channel. *EMBO Reports* **8**: 749–755.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C.L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews* **91**: 1305–55.

de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2000. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 20829–36.

Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J.L., Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A. & Visconti, P.E. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 7001–9.

Derelle, R. & Lang, B.F. 2012. Rooting the Eukaryotic Tree with Mitochondrial and Bacterial Proteins. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1277–1289.

Donowitz, M., Ming Tse, C. & Fuster, D. 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Molecular Aspects of Medicine* **34**: 236–51.

Dremier, S., Kopperud, R., Doskeland, S.O., Dumont, J.E. & Maenhaut, C. 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Letters* **546**: 103–107.

- Espinal-Enrriquez, J., Priego-Espinosa, D.A., Darszon, A., Beltrán, C. & Martínez-Mekler, G. 2017. Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Scientific Reports* **7**: 4236.
- Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. a M., Robben, T.J. a a, Strik, A.M., Kuil, C., Philipsen, R.L. a, van Duin, M., Conti, M., Gossen, J. a & Jaiswal, B.S. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2993–8.
- Fechner, S., Alvarez, L., Bönigk, W., Müller, A., Berger, T.K., Pascal, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Stölting, G., Siegfried, K.R., Kremmer, E., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 2015. A K⁺-selective CNG channel orchestrates Ca²⁺ signalling in zebrafish sperm. *ELife* **4**: 1–25.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., von Mering, C. & Jensen, L.J. 2013. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research* **41**: D808-15.
- Fuster, D.G. & Alexander, R.T. 2014. Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **466**: 61–76.
- Galindo, B.E., de la Vega-Beltrán, J.L., Labarca, P., Vacquier, V.D., Darszon, A., Galindo, B.E., Vacquier, V.D., Darszon, A., 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**: 668–75.
- Garcia, M. a & Meizel, S. 1999. Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Molecular Reproduction and Development* **52**: 189–95.
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**: 583–7.
- Ghiurcuta, C.G. & Moret, B.M.E. 2014. Evaluating synteny for improved comparative studies. *Bioinformatics* **30**: 9–18.
- González-Cota, A.L., Silva, P.Â., Carneiro, J. & Darszon, A. 2015. Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of Ca²⁺ influx in sea urchin spermatozoa. *FEBS Letters* **589**: 2146–54.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R. & Chothia, C. 2001. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology* **313**: 903–19.

- Halmi, P., Lehtonen, J., Waheed, A., Sly, W.S. & Parkkila, S. 2004. Expression of hypoxia-inducible, membrane-bound carbonic anhydrase isozyme XII in mouse tissues. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **277**: 171–7.
- Harris, C. & Fliegel, L. 1999. Amiloride and the Na(+)/H(+) exchanger protein: mechanism and significance of inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger (review). *International Journal of Molecular Medicine* **3**: 315–321.
- Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12501–4.
- Ho, H.-C., Granish, K.A. & Suarez, S.S. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental Biology* **250**: 208–17.
- Ho, K., Wolff, C.A. & Suarez, S.S. 2009. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility, and Development* **21**: 345–50.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K. & Hirohashi, N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. , doi: 10.1073/pnas.1018202108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018202108.
- Kang, B.E. & Baker, B.J. 2016. Pado, a fluorescent protein with proton channel activity can optically monitor membrane potential, intracellular pH, and map gap junctions. *Scientific Reports* **6**: 10–14.
- Kannan, N., Wu, J., Anand, G.S., Yooseph, S., Neuwald, A.F., Venter, J.C. & Taylor, S.S. 2007. Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome Biology* **8**: R264.
- Kersey, P.J., Allen, J.E., Armean, I., Boddu, S., Bolt, B.J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Falin, L.J., Grabmueller, C., Humphrey, J., Kerhornou, A., Khobova, J., Aranganathan, N.K., Langridge, N., Lowy, E., McDowall, M.D., Maheswari, U., *et al.* 2015. Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Research* **44**: D574-80.
- Khwaja, T.A., Boswell, K.H., Robins, R.K. & Miller, J.P. 1975. 8-Substituted derivatives of adenosine 3',5'-cyclic phosphate require an unsubstituted 2'-hydroxyl group in the ribo configuration for biological activity. *Biochemistry* **14**: 4238–44.

- Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D.E. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* **439**: 737–740.
- Kobayashi, M., Buck, J. & Levin, L.R. 2004. Conservation of functional domain structure in bicarbonate-regulated “soluble” adenylyl cyclases in bacteria and eukaryotes. *Development Genes and Evolution* **214**: 503–9.
- Kobori, H., Miyazaki, S. & Kuwabara, Y. 2000. Characterization of intracellular Ca(2+) increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* **63**: 113–20.
- Koonin, E. V, Aravind, L. & Kondrashov, A.S. 2000. The Impact of Comparative Genomics on Our Understanding of Evolution. *Cell* **101**: 573–576.
- Kraemer, a, Rehmann, H.R., Cool, R.H., Theiss, C., de Rooij, J., Bos, J.L. & Wittinghofer, a. 2001. Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *Journal of Molecular Biology* **306**: 1167–77.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870–4.
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. Springer.
- Le, S.Q. & Gascuel, O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1307–20.
- Lee, H.C. 1984. A membrane potential-sensitive Na⁺-H⁺ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* **259**: 15315–9.
- Lee, H.C. 1985. The voltage-sensitive Na⁺-H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *The Journal of Biological Chemistry* **260**: 10794–9.
- Lee, H.C. & Garbers, D.L. 1986. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *The Journal of Biological Chemistry* **261**: 16026–16032.
- Lee, H.C., Johnson, C., Epel, D., Hall, M. & Station, H.M. 1983. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology* **45**: 31–45.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.-K., Saarnio, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S. & Parkkila, S. 2004. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 2719–27.

- Leipe, D.D., Koonin, E. V & Aravind, L. 2004. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **343**: 1–28.
- Lishko, P. V, Botchkina, I.L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* **140**: 327–37.
- Lishko, P. V, Botchkina, I.L. & Kirichok, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**: 387–91.
- Lishko, P. V, Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.J. & Clapham, D.E. 2012. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology* **74**: 453–75.
- Liu, J., Xia, J., Cho, K.-H., Clapham, D.E. & Ren, D. 2007. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 18945–52.
- Liu, T., Huang, J.-C.C., Zuo, W.-L.L., Lu, C.-L.L., Chen, M., Zhang, X.-S. Sen, Li, Y.-C.C., Cai, H., Zhou, W.-L.L., Hu, Z.-Y.Y., Gao, F. & Liu, Y.-X.X. 2010. A novel testis-specific Na⁺/H⁺ exchanger is involved in sperm motility and fertility. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* **2**: 566–81.
- Lobley, A., Pierron, V., Reynolds, L., Allen, L. & Michalovich, D. 2003. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* **1**: 53.
- Louis, A., Nguyen, N.T.T., Muffato, M. & Roest Crolius, H. 2015. Genomicus update 2015: KaryoView and MatrixView provide a genome-wide perspective to multispecies comparative genomics. *Nucleic Acids Research* **43**: D682–D689.
- Mezquita, P., Mezquita, C. & Mezquita, J. 1999. Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis. *Molecular Human Reproduction* **5**: 199–205.
- Miller, R.L. 1985. Sperm Chemo-Orientation in the Metazoa. In: *Biology of Fertilization* Elsevier, pp. 275–337.
- Moll, D., Prinz, A., Brendel, C.M., Berrera, M., Guske, K., Zaccolo, M., Genieser, H.-G. & Herberg, F.W. 2008. Biochemical characterization and cellular imaging of a novel, membrane permeable fluorescent cAMP analog. *BMC Biochemistry* **9**: 18.
- Navarrete, F.A., Alvau, A., Lee, H.C., Levin, L.R., Buck, J., Leon, P.M.-D., Santi, C.M., Krapf, D., Mager, J., Fissore, R.A., Salicioni, A.M., Darszon, A. & Visconti, P.E. 2016. Transient

exposure to calcium ionophore enables in vitro fertilization in sterile mouse models. *Scientific Reports* **6**: 33589.

- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. & Clapham, D.E. 2008. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *The International Journal of Developmental Biology* **52**: 607–13.
- Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M.J. 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 37215–8.
- Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Roller, P.P., Krajewski, K., Saito, N.G., Stuckey, J.A. & Wang, S. 2004. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Analytical Biochemistry* **332**: 261–73.
- Nishigaki, T., González-Cota, A.L. & Orta, G. 2014. CatSper in Male Infertility. In: *Pathologies of Calcium Channels* (N. Weiss & A. Koschak, eds). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 713–728.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L. & Darszon, A. 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**: 1149–1158.
- Nishigaki, T. & Treviño, C.L. 2012. 6 . Study of protein-protein interactions by fluorescence spectroscopy. **661**.
- Nishigaki, T., Wood, C.D., Tatsu, Y., Yumoto, N., Furuta, T., Elias, D., Shiba, K., Baba, S.A. & Darszon, A. 2004. A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca(2+) before its increase. *Developmental Biology* **272**: 376–88.
- Nishigaki, T., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. & Darszon, A. 2001. Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**: 531–5.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V. & Dubchak, I. 2014. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research* **42**: 26–31.
- Oates, M.E., Stahlhacke, J., Vavoulis, D. V, Smithers, B., Rackham, O.J.L., Sardar, A.J., Zaucha, J., Thurlby, N., Fang, H. & Gough, J. 2015. The SUPERFAMILY 1.75 database in 2014: a doubling of data. *Nucleic Acids Research* **43**: D227-33.
- Podlaha, O. & Zhang, J. 2010. Pseudogenes and Their Evolution. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* 1–8.

- Pommerville, J. 1978. Analysis of gamete and zygote motility in *Allomyces*. *Experimental Cell Research* **113**: 161–72.
- Qi, H., Moran, M.M., Navarro, B., Chong, J.A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I.S., Quill, T.A. & Clapham, D.E. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 1219–23.
- Qiao, J., Mei, F.C., Popov, V.L., Vergara, L.A. & Cheng, X. 2002. Cell Cycle-dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26581–26586.
- R-Core-Team. 2016. R: A language and Environment for Statistical Computing.
- Rehmann, H., Schwede, F., Doøskeland, S.O., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2003. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 38548–38556.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2007. Capturing cyclic nucleotides in action: Snapshots from crystallographic studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 63–73.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L. & Clapham, D.E. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**: 603–609.
- Richards, T.A. & Cavalier-Smith, T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**: 1113–1118.
- Roelofs, J., Meima, M., Schaap, P. & Van Haastert, P.J. 2001. The Dictyostelium homologue of mammalian soluble adenylyl cyclase encodes a guanylyl cyclase. *The EMBO Journal* **20**: 4341–8.
- Roelofs, J., Van Haastert, P.J.M. & Haastert, P.J.M. Van. 2002. Deducing the origin of soluble adenylyl cyclase, a gene lost in multiple lineages. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2239–46.
- Sancak, Y., Markhard, A.L., Kitami, T., Kovács-bogdán, E., Kamer, K.J., Udeshi, N.D., Carr, S.A., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., Li, A.A., Calvo, S.E., Goldberger, O., Mootha, V.K. & B-f, M.C. 2013. EMRE Is an Essential Component. *Science* **147**: 1379–1382.
- Saraswat, L.D., Ringheim, G.E., Bubis, J. & Taylor, S.S. 1988. Deletion mutants as probes for localizing regions of subunit interaction in cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 18241–6.

- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Poetsch, A., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N.D., Kremmer, E., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U.B. & Strünker, T. 2015. The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm. *The EMBO Journal* **34**: 379–92.
- Souza, C.S., Amaral, C. & Treptow, W. 2014. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 17510–17515.
- Stechmann, A. 2002. Rooting the Eukaryote Tree by Using a Derived Gene Fusion. *Science* **297**: 89–91.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N.D., Weyand, I., Seifert, R., Kaupp, U.B., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Poetsch, A., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N.D., Kremmer, E., Jikeli, J., *et al.* 2015. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **34**: 382–6.
- Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J.E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E. & Kaupp, U.B. 2006. A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nature Cell Biology* **8**: 1149–54.
- Suárez, S.S. & Osman, R.A. 1987. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* **36**: 1191–1198.
- Syeda, S.S., Carlson, E.J., Miller, M.R., Francis, R., Clapham, D.E., Lishko, P. V, Hawkinson, J.E., Hook, D. & Georg, G.I. 2016. The Fungal Sexual Pheromone Sirenin Activates the Human CatSper Channel Complex. *ACS Chemical Biology* **11**: 452–9.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A. & Koonin, E. V. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research* **28**: 33–6.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. & Yonemoto, W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **59**: 971–1005.
- Tresguerres, M., Parks, S.K., Salazar, E., Levin, L.R., Goss, G.G. & Buck, J. 2010. Bicarbonate-sensing soluble adenylyl cyclase is an essential sensor for acid/base homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 442–7.
- Vicens, A., Andrade-López, K., Cortez, D., Gutiérrez, R.M. & Treviño, C.L. 2017. Premammalian origin of the sperm-specific Slo3 channel. *FEBS Open Bio* **7**: 382–390.
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I.A., Quill, T.A., McLeroy, P., Moe, O.W. & Garbers, D.L. 2007. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo

- bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 9325–30.
- Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K. & Garbers, D.L. 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology* **5**: 1117–22.
- Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H. & Ren, D. 2009. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biology of Reproduction* **81**: 539–44.
- Wang, J., Xia, Q., He, X., Dai, M., Ruan, J., Chen, J., Yu, G., Yuan, H., Hu, Y., Li, R., Feng, T., Ye, C., Lu, C., Wang, J., Li, S., Wong, G.K.S., Yang, H., Wang, J., *et al.* 2005. SilkDB: A knowledgebase for silkworm biology and genomics. *Nucleic Acids Research* **33**: 399–402.
- Wang, Q., Arighi, C.N., King, B.L., Polson, S.W., Vincent, J., Chen, C., Huang, H., Kingham, B.F., Page, S.T., Rendino, M.F., Thomas, W.K., Udway, D.W. & Wu, C.H. 2012. Community annotation and bioinformatics workforce development in concert-Little Skate Genome Annotation Workshops and Jamborees. *Database* **2012**: 1–11.
- Whelan, S. & Goldman, N. 2001. A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 691–699.
- Windler, F., Bönigk, W., Körschen, H.G., Grahn, E., Strünker, T., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 2018. The solute carrier SLC9C1 is a Na⁺/H⁺-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature Communications* **9**: 2809.
- Woo, A.L., James, P.F. & Lingrel, J.B. 2002. Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular Reproduction and Development* **62**: 348–56.
- Wu, C.-I., Johnson, N. a. & Palopoli, M.F. 1996. Haldane's rule and its legacy: Why are there so many sterile males? *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 281–284.
- Wu, S.J., Ding, L. & Zhu, J.K. 1996. SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *The Plant Cell* **8**: 617–627.
- Wyffels, J., King, B.L., Vincent, J., Chen, C., Wu, C.H. & Polson, S.W. 2014. SkateBase, an elasmobranch genome project and collection of molecular resources for chondrichthyan fishes. *F1000Research* **3**: 191.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T., Chai, C., Pan, G., Xu, J., Liu, C., Lin, Y., Qian, J., Hou, Y., Wu, Z., Li, G., *et al.* 2004. A draft sequence

for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science (New York, N.Y.)* **306**: 1937–1940.

Xie, F., Garcia, M.A., Carlson, A.E., Schuh, S.M., Babcock, D.F., Jaiswal, B.S., Gossen, J. a, Esposito, G., van Duin, M. & Conti, M. 2006. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology* **296**: 353–62.

Yates, A., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C.G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S.E., Janacek, S.H., Johnson, N., Juettemann, T., Keenan, S., *et al.* 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Research* **44**: D710–D716.

Yin, C., Shen, G., Guo, D., Wang, S., Ma, X., Xiao, H., Liu, J., Zhang, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, K., Huang, S. & Li, F. 2015. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Research* **44**: D801-807.

Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., Levin, L.R. & Buck, J. 2003. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**: 82–4.

Zippin, J.H., Levin, L.R. & Buck, J. 2001. CO₂/HCO₃⁻-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* **12**: 366–370.