



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio farmacológico del canal de K^+ Slo3 de humano para evaluar su contribución en la hiperpolarización asociada a la capacitación

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Oscar Sánchez Carranza

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Ignacio López González / Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Lourival D. Possani Postay / Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. León D. Islas Suárez / Facultad de Medicina-UNAM

MÉXICO, D. F. Agosto, 2015



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Leonor Pérez Martínez
Secretario	Dra. Liliana Pardo López
Vocal	Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Vocal	Dr. José de Jesús García Valdés
Vocal	Dra. Rita Restano

A mi familia....

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, porque su esfuerzo también se refleja en este escrito. A mi papá quien me apoyó incondicionalmente; sus consejos son el pilar de este trabajo. A mi mamá, quien con su fortaleza me guio hasta este lugar. A mis hermanos Ady y Josi con quienes comparto mi experiencia e inocencia, disfruto mucho jugar y reír con ellos mientras encontramos el sentido de la vida.

A Daniel, mi compañero del alma. Él me ha enseñado a pintar los días de múltiples colores, inclusive los días más grises.

Al Dr. Ignacio López González, por ser tan paciente conmigo. Su conocimiento y apoyo son elementos clave de este trabajo.

A la Dra. Claudia Treviño, con quien siempre pude contar. Sus consejos abarcan más allá de temas académicos. Muchas gracias, Dra.

A los Drs. Darszon, Takuya y Carmen, porque su orientación ha sido primordial en mi entrenamiento científico.

A Pau (Pau Torres), porque no importaban las horas experimentales cuando trabajaba a su lado. Disfruté su compañía fuera y dentro del laboratorio. Eres muy especial, amiga.

A mis amigos del laboratorio: Omar, Héctor, Fabio, Yolo, Francisco, Carmen, Julio, Edgar, Alberto y Selene. Su compañía hizo agradable mi estancia en este espacio de trabajo.

A mis amigos: David, May, Ale, Lau, Diego, Coral, Josué... por sus consejos y momentos de diversión necesarios para tiempos difíciles.

A los miembros de mi comité tutor, a los Drs. Lourival D. Possani y León Islas por ser piezas fundamentales en el seguimiento de este proyecto.

A los miembros del jurado, los Drs. Leonor Pérez, Liliana Pardo, Juan Carlos Gómora, Jesús García y Rita Restano por su tiempo, observaciones, ideas y comentarios que ayudaron a mejorar el escrito.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del “Consortio de la Fisiología del Espermatozoide” del Departamento de Biología del Desarrollo y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Cuernavaca, México), bajo la asesoría del Dr. Ignacio López González. Para la realización de la tesis de maestría, Oscar Sánchez Carranza recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de apoyo 368973. Además, contó con apoyo por parte de los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico / Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA / UNAM) (IN204914 para ILG, IN202212-3 para CT y IN225406 para AD); del CONACyT-México (128566 para AD); y de la fundación Alexander von Humboldt (para CT).

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS	1
2.	RESUMEN.....	3
3.	INTRODUCCIÓN	4
3.1.	Fecundación	4
3.2.	El espermatozoide	4
3.2.1.	La cabeza	4
3.2.2.	El flagelo	6
3.3.	Cambios en la movilidad y Capacitación	6
3.4.	Reacción acrosomal.....	8
3.5.	Generalidades de los canales de K ⁺	9
3.6.	Familia de los canales Slo	9
3.6.1.	Canal Slo1	10
3.6.2.	Canal Slo2	11
3.6.3.	Canal Slo3	12
4.	ANTECEDENTES	15
5.	JUSTIFICACIÓN	17
6.	HIPÓTESIS	17
7.	OBJETIVO GENERAL	17
7.1.	Objetivos Particulares.....	17
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
8.1.	Verificación de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52	18
8.2.	Electroforesis de ADN.....	19
8.3.	Secuenciación de ADN.....	19
8.4.	Subclonación de la subunidad hLRRC52.....	19
8.5.	Purificación de ADN a partir de gel de Agarosa	20
8.6.	Obtención de la clona que codifica para el canal hSlo3	21
8.7.	Verificación de las construcciones hSlo3-pcDNA 3.1 (+), hLRRC52-pIRES-YFP.....	21

8.8.	Cultivo celular	21
8.9.	Transfección de células CHO	22
8.10.	Electrofisiología.....	22
8.10.1.	Corrientes de canales endógenos de K ⁺ y canales hSlo3 expresados en células CHO.....	23
8.11.	<i>Swim up</i> de espermatozoides de humano	23
8.12.	Determinación del Em _{rep} de espermatozoides de humano por citometría de flujo	24
8.12.1.	Análisis de datos de citometría de flujo	24
9.	RESULTADOS.....	26
9.1.	Verificación de la identidad y la integridad de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52.	26
9.2.	Subclonación de la subunidad hLRRC52.....	28
9.3.	Electrofisiología: <i>Patch clamp</i>	29
9.3.1.	Expresión heteróloga del canal hSlo3.....	29
9.3.2.	El canal hSlo3 expresado en células CHO es sensible a Ba ²⁺	32
9.3.3.	El canal hSlo3 expresado heterológamente es insensible a Clofilium	32
9.3.4.	La Progesterona bloquea a la corriente del canal hSlo3	34
9.3.5.	Quinidina bloquea al canal hSlo3 independientemente del voltaje	36
9.3.6.	TEA ⁺ no bloquea al canal hSlo3.....	36
9.3.7.	Toxinas de la familia α KTX1 y Penitrem A inhiben parcialmente la corriente hSlo3 expresada en células CHO	38
9.3.7.1.	La corriente de K ⁺ en las células CHO transfectadas con el canal hSlo3 es parcialmente sensible a IbTX	39
9.3.7.2.	A diferencia de la IbTX, la CbTX inhibe parcialmente al canal hSlo3 independientemente del voltaje	39
9.3.7.3.	La SloTX tiene un efecto inhibitorio parcial en la corriente de K ⁺ registrada en células CHO transfectadas con hSlo3.....	39
9.3.7.4.	La micotoxina Penitrem A afecta la corriente hSlo3 expresada en células CHO	43
9.4.	El perfil farmacológico de la hiperpolarización asociada a la capacitación de espermatozoides de humano correlaciona con el perfil farmacológico de hSlo3.....	43
10.	DISCUSIÓN	47
10.1.	Diferencias y similitudes en el perfil farmacológico de los canales Slo3 de humano (hSlo3) y ratón (mSlo3)	48

10.2. El canal de K ⁺ hSlo3 y la hiperpolarización asociada a la capacitación en el espermatozoide de humano	51
11. CONCLUSIONES	54
12. PERSPECTIVAS.....	55
13. REFERENCIAS	57
14. APÉNDICE.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El espermatozoide	5
Figura 2. Canales de K ⁺ de la familia Slo.	12
Figura 3. Propiedades de los canales de la familia Slo.	14
Figura 4. Patrón de digestión de la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO	27
Figura 5. Alineamiento entre hLRRC52-GeneBank y hLRCC52-pCR4-TOPO	27
Figura 6. Inserción de los sitios NotI y EcoRI en el gen que codifica para la subunidad hLRRC52	28
Figura 7. Corroboración por patrón de digestión de las construcciones hSlo3-pcDNA3.1 (+) y.hLRRC52-pIRES-YFP	29
Figura 8. El canal hSlo3 se expresa exitosamente en las células CHO.	31
Figura 9. El canal hSlo3 se bloquea por Bario 1 mM con una ligera dependencia de voltaje.	33
Figura 10. El canal hSlo3 expresado heterológamente es insensible a Clofilium.	34
Figura 11. Progesterona inhibe a la corriente del canal hSlo3 de manera voltaje independiente	35
Figura 12. Quinidina es un bloqueador potente de la corriente hSlo3 expresada heterológamente, con una inhibición independiente de voltaje	37
Figura 13 El canal hSlo3 es insensible a TEA ⁺	38
Figura 14. IbTX inhibe la corriente del canal hSlo3 mayoritariamente a pulsos de voltaje negativos	40
Figura 15. La CbTX inhibe parcialmente al canal hSlo3 independientemente del voltaje aplicado	41
Figura 16. SloTX inhibe la corriente del canal hSlo3 independientemente a los pulsos de voltaje aplicados	42
Figura 17. Penitrem A inhibe parcialmente la corriente del canal hSlo3	44
Figura 18. La hiperpolarización asociada a la capacitación es inhibida por diferentes bloqueadores de K ⁺	45
Figura 19 Alineamiento entre los canales hSlo3, mSlo3 y hSlo1	50
Figura 20. El canal hSlo3 participa en la hiperpolarización asociada a la capacitación.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la clona hLRRC52	18
Tabla 2 Comparación entre el porcentaje del bloqueo de la corriente del canal hSlo3 expresado en células CHO y el porcentaje de inhibición de la hiperpolarización asociada a la capacitación de espermatozoides de humano.	52
Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la corriente hSlo3 expresada en células CHO a -50 mV	53

1. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Alofococianina
ATP	Adenosín trifosfato
BCECF	(2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(γ -6))-Carboxifluoresceína
Canal hSlo3	Canal Slo3 de humano
Canal mSlo3	Canal Slo3 de ratón
CbTX	Caribdotoxina
CHO	Células de ovario de hamster chino
DiSC ₃ (5)	3',3'-Ioduro de dipropiltiadicarbocianina
Em _{rep}	Potencial de membrana en reposo
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
FSC	Dispersiones directas
GB	Banco de genes (del inglés "GeneBank")
GFP	Proteína verde fluorescente
G Ω	Gigaohm
HAC	Hiperpolarización asociada a la capacitación
I.C ₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IbTX	Iberiotoxina
I _d	Densidad de corriente
I _{hSlo3}	Corriente iónica del canal hSlo3
Kb	Kilobase
kHz	Kilohertz
LED	Diodo emisor de luz

LRRC52	Proteína con repeticiones ricas en leucinas
M	Marcador
min	Minutos
MR	Medio de Registro
mV	Milivolt
MΩ	Megaohm
μg	Microgramo
μM	Micromolar
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pA	Picoamper
pb	Pares de bases
pF	Picofaradio
Pg	Progesterona
pH _i	pH intracelular
PI	Ioduro de propidio
pM	Picomolar
pS	Picosiemen
RCK	Dominio regulador de la conductancia
SloTX	Slotoxina
SSC	Dispersiones laterales
TEA ⁺	Tetraetilamonio
T _m	Temperatura media máxima
YFP	Proteína amarilla fluorescente
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular

2. RESUMEN

La fecundación es un proceso fundamental para las especies de reproducción sexual. Una vez que el espermatozoide es eyaculado en el tracto reproductor femenino, el gameto masculino todavía es incapaz de fecundar al ovocito. Para que el espermatozoide pueda adquirir la capacidad de fecundar exitosamente al ovocito, tiene que madurar en tres procesos fundamentales. Primero cambia su patrón de movilidad, pasando de una movilidad activada a una hiperactivada. Debe adquirir la capacitación, proceso que se caracteriza por el incremento de Ca^{2+} y pH intracelular, fosforilación de proteínas y una hiperpolarización de la membrana plasmática. Por último, el espermatozoide tiene que llevar a cabo la reacción acrosomal, proceso excitotónico que se caracteriza por la liberación de enzimas hidrolíticas y que permite los cambios necesarios en la membrana plasmática para poder fecundar al ovocito. En todos estos procesos la participación de los canales iónicos es fundamental. De manera interesante, el canal de K^+ Slo3 es esencial para la fecundación. Se ha demostrado que la ausencia de este canal en ratones (mSlo3) resulta en un fenotipo de infertilidad. Los espermatozoides de estos ratones tienen afectados los tres eventos fundamentales para fecundar al ovocito, es decir tienen problemas en la movilidad, no presentan la hiperpolarización asociada a la capacitación y como consecuencia no son capaces de llevar a cabo la reacción acrosomal. Por otro lado, el canal Slo3 también se expresa en el espermatozoide de humano (hSlo3) y, por su homología, se ha sugerido que tiene una función similar a su ortólogo en ratón. Hasta el momento, su perfil farmacológico no se ha establecido y su participación en la movilidad, capacitación y reacción acrosomal todavía no está demostrada. En este trabajo se expresó heterológicamente el canal hSlo3 en células CHO y, con la técnica de “patch-clamp”, se realizó un perfil farmacológico. Tal como se había demostrado anteriormente, el canal hSlo3 es sensible a progesterona. Además, al igual que el canal mSlo3, el canal hSlo3 se bloquea por Ba^{2+} y Quinidina, pero es insensible a Clofilium y TEA^+ . Por otro lado, el canal hSlo3 se bloquea parcialmente por toxinas de alacrán de la subfamilia αKTX como IbTX, CbTX y SloTX, y por la micotoxina Penitrem A. También se realizó un perfil farmacológico de la hiperpolarización asociada a la capacitación del espermatozoide de humano con citometría de flujo. La comparación de los perfiles farmacológicos indica una correlación positiva y una negativa. La correlación positiva sugiere fuertemente que el canal hSlo3 participa en la hiperpolarización asociada a la capacitación mientras que la correlación negativa sugiere la participación de otros canales de K^+ durante este proceso.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Fecundación

En las especies de reproducción sexual, la fecundación es el proceso de unión del espermatozoide (gameto masculino) y el ovocito (gameto femenino) para producir a un individuo genéticamente distinto [1]. La fecundación es un evento que incluye la maduración de los gametos masculino y femenino, la migración del espermatozoide hacia el oviducto y concluye con la interacción entre estas células [2]. Para lograr una fecundación exitosa, el gameto masculino debe adquirir la capacidad de responder a cambios bioquímicos y fisiológicos producidos por diversas moléculas que se va encontrando a lo largo de su viaje hacia el ovocito.

El espermatozoide, una vez eyaculado en el tracto reproductor femenino, es incapaz de fecundar al ovocito. El gameto masculino debe madurar dentro del aparato reproductor femenino. Se consideran por lo menos tres eventos que el espermatozoide debe cumplir para que pueda llevar a cabo la fecundación: cambios en la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal.

3.2. El espermatozoide

El gameto masculino fue descrito por primera vez por Anton van Leeuwenhoek ~1676-77, sin embargo fue hasta 1840's-1870's cuando se le reconoció como célula esencial para que ocurra la fecundación [3], [4]. El espermatozoide es una célula haploide terminal diferenciada [5], es decir, una vez maduro, ya no sintetiza nuevas proteínas. Se considera que su función es entregar el material genético para producir un organismo completamente distinto mediante la reproducción sexual [5], [6].

Estructuralmente, esta célula puede dividirse básicamente en dos compartimentos: la cabeza y el flagelo.

3.2.1. La cabeza

La cabeza del espermatozoide está constituida por el núcleo, el acrosoma y citoplasma. La forma de la cabeza difiere entre las especies, sin embargo conservan la misma función ([Figura 1](#)).

El núcleo contiene al material genético altamente condensado, estado de la cromatina que ocurre debido a la compactación del ADN por protaminas (proteínas especializadas en la compactación de ADN) [4], [7], [8]. La función del núcleo es contener el material genético que el espermatozoide proveerá

al ovocito para que ocurra la fecundación. Además, en la mayoría de los mamíferos, el cromosoma sexual se encuentra en el núcleo y es el que determina el sexo de la progenie [7].

El acrosoma es una vesícula citoplasmática derivada del complejo de Golgi [9]; está constituido por una membrana interna que yace a un lado de la membrana nuclear, y una externa la cual se encuentra subyacente a la membrana plasmática [10]. Este organelo contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialuronidasa, hidrolasas y esterases. Estas enzimas se liberan durante el proceso de la reacción acrosomal y son esenciales para que el espermatozoide pueda penetrar los componentes que rodean al ovocito [4], [5], [7].

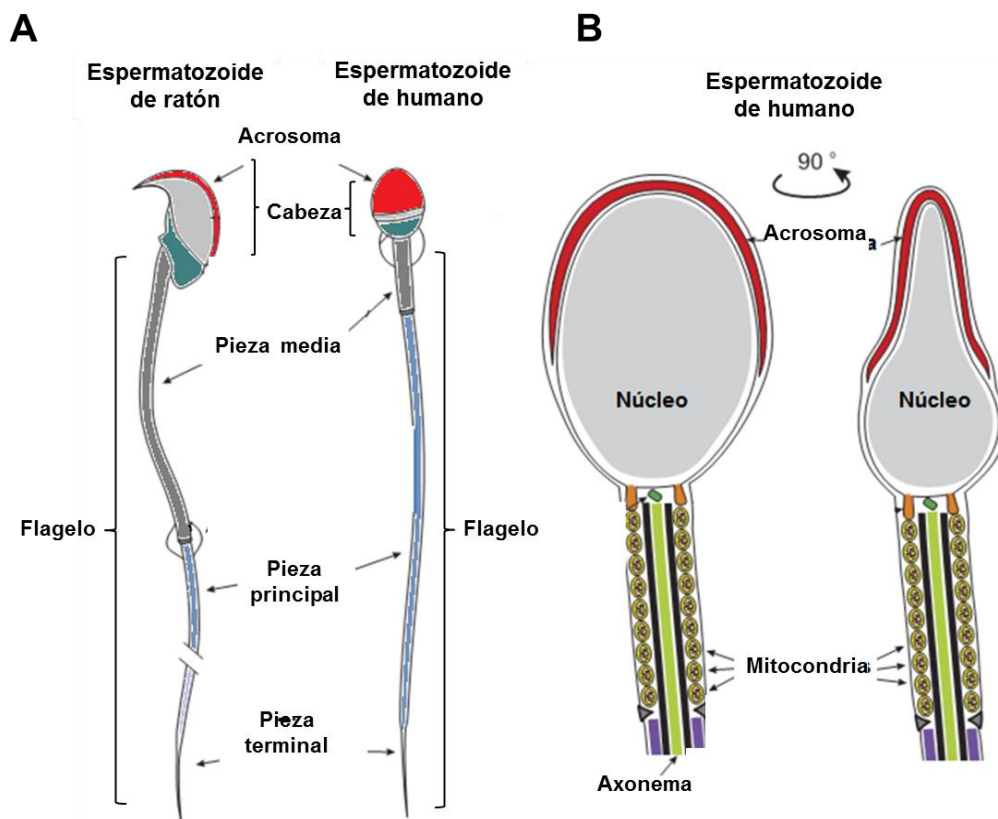


Figura 1. El espermatozoide

Esquemas de los principales componentes estructurales de los espermatozoides de humano y ratón. **A**, el espermatozoide está compartimentalizado principalmente en cabeza y flagelo. La cabeza incluye al núcleo y al acrosoma. El flagelo posee tres regiones definidas: la pieza media, pieza principal y pieza terminal. **B**, Ampliación de la cabeza y de la pieza media del espermatozoide humano esquematizado desde dos ángulos diferentes de un corte transversal. El núcleo ocupa la mayor parte del espacio de la cabeza y se encuentra rodeado por el acrosoma; hay muy poco citoplasma en estas células. Las mitocondrias se localizan rodeando al axonema, estructura que conforma a todo el flagelo [Modificado de 5].

Debido a que el espermatozoide es una célula terminal y altamente diferenciada, ya no contienen organelos que participan en la síntesis de biomoléculas como retículo endoplásmico o complejo de Golgi. Además, el citoplasma en el espermatozoide es muy poco y sólo está presente, junto con proteínas del citoesqueleto, en áreas pequeñas entre el núcleo y el acrosoma [4].

3.2.2. El flagelo

El flagelo es la parte motil y proveedora de energía del espermatozoide, es decir, es el motor que le permite llegar al sitio de fecundación. Estructuralmente el flagelo está segmentado en diferentes piezas: pieza media, principal y terminal (**Figura 1**). Cada una de estas divisiones tienen elementos celulares que las caracterizan, sin embargo las tres piezas están constituidas por el axonema. Éste está formado por nueve pares de fibras densas de microtúbulos que rodean a un par central, en una organización 9+2 [5], [7], [8], [11].

Debido a que el espermatozoide es una célula móvil, sus requerimientos energéticos son de gran importancia. Las mitocondrias son de los pocos organelos que el espermatozoide conserva durante su maduración. Con respecto a su distribución, se encuentran organizadas exclusivamente en la pieza media [5], [12] y es ahí donde las mitocondrias proveen de energía al espermatozoide para que cumpla con su objetivo final de fecundar al ovocito.

Como se mencionó anteriormente, una vez que el espermatozoide es eyaculado en el tracto reproductor femenino, éste es incapaz de fecundar. Cambios en la movilidad y el proceso de capacitación son factores indispensables que el espermatozoide debe cumplir dentro del tracto reproductor femenino para culminar en la fecundación.

3.3. Cambios en la movilidad y Capacitación

En 1970, Yanagimachi, observó y comparó el patrón de nado de espermatozoides del epidídimo de hámster dorado (células inmaduras o no capacitadas) contra espermatozoides incubados en un medio con componentes del tracto reproductor femenino de hámster hembras (células capacitadas). Entre sus observaciones, describió que los espermatozoides capacitados tenían un cambio en su patrón de nado que iba de un batido flagelar no vigoroso (condición no capacitante) a un batido flagelar amplio y vigoroso [13].

Años después se demostró que este cambio en la movilidad después de la capacitación también ocurre en otras especies de mamíferos incluidas *Homo sapiens* y *Mus musculus* [14], [15]. La principal

función del cambio en el batido flagelar es brindarle al espermatozoide la eficacia de tener un nado progresivo [3], [5] y a contraflujo [16] dentro del tracto reproductor femenino. Además, permite que atraviese las células del *cumulus* y la zona pelúcida que rodean al óvulo para entregar su material genético al ovocito [5].

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para determinar cuáles son las entidades moleculares y las cascadas de señalización involucradas en la movilidad y en la capacitación, ni su identidad ni su contribución espacio temporal han sido resuelta del todo.

El aumento del calcio intracelular (Ca^{2+}_i) en el espermatozoide es indispensable para que ocurra el cambio de la movilidad [5]. Se ha demostrado que este aumento, en parte, se produce gracias al influjo de este ión a través del canal CatSper (Canal catiónico del espermatozoide) [15], [17]. CatSper es un canal de Ca^{2+} activado por voltaje y pH intracelular (pH_i) que se expresa exclusivamente en el espermatozoide. Su ausencia o falla causa infertilidad principalmente porque los espermatozoides tienen problemas de nado y, por lo tanto, no son capaces de fecundar al ovocito [18]-[27].

La capacitación es un proceso que culmina en un aumento del pH_i y Ca^{2+}_i , fosforilación de proteínas y en la hiperpolarización del potencial de la membrana plasmática del espermatozoide. La hiperpolarización es el cambio en el potencial de membrana en reposo ($E_{m_{rep}}$) que pasa de ~ -40 mV en espermatozoides de ratón no capacitados a un potencial de membrana de ~ -65 mV en espermatozoides capacitados [28]-[31].

Al igual que en la movilidad, la participación de canales e intercambiadores iónicos durante la capacitación es fundamental. El canal de H^+ (en humano [32], [33]) y el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide o sNHE por sus siglas en inglés (en ratón [34], [35]) están involucrados en el aumento de pH_i durante este proceso.

Por otro lado, en ratón se ha observado que para ocurra la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la capacitación que, el canal de K^+ Slo3 participa activamente. La ausencia de este canal en el espermatozoide inhibe la hiperpolarización [31], [36]. Recientemente Mannowetz y colaboradores (2013) propusieron que en espermatozoide de humano, el canal de K^+ activado por Ca^{2+} Slo1 es la principal conductancia de K^+ [37]. Sin embargo como se discutirá más adelante, esta conclusión se contradice por otros estudios. Canales de Cl^- CFTR (regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística, por sus siglas en inglés) [38] y TMEM16 (proteína transmembranal con función desconocida 16 por sus siglas en inglés) [39]; y canales de Sodio Epiletiales (ENaC por sus siglas en inglés)

[40], presentes en el espermatozoide, también podrían contribuir a dicha hiperpolarización asociada a la capacitación. Recordemos que la hiperpolarización puede ocurrir por 1) un incremento en la permeabilidad de iones K^+ causada por la activación de canales de K^+ (p. ej.: activación de canales Slo3) y/o 2) una reducción a la permeabilidad de iones Na^+ (p. ej.: inactivación de canales ENac) [41]. A pesar de la importancia de la hiperpolarización asociada a la capacitación en numerosas especies de mamíferos, en el humano no se había demostrado. Como se verá más adelante, durante su tesis de maestría, la M. en C. Paulina Torres demostró que la hiperpolarización asociada a la capacitación ocurre en el espermatozoide de humano. Además, nuestros resultados indican que en humano se requiere la participación de, por lo menos, dos canales de K^+ (Slo1 y Slo3) para que ocurra la hiperpolarización asociada a la capacitación [42].

3.4. Reacción acrosomal

Una vez que el espermatozoide adquirió cambios en la movilidad y se capacitó durante su viaje por el tracto reproductor femenino, el último proceso que debe llevar a cabo antes de la fecundación es la reacción acrosomal.

La reacción acrosomal es el proceso excitotico donde el espermatozoide libera el contenido de su acrosoma. Durante la exocitosis, se reacomodan los elementos de la membrana plasmática y se exponen nuevos componentes al medio extracelular de tal forma que se potencializa la fusión del gameto masculino con el ovocito [5]. En este proceso ocurren múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide que resultan en la formación de vesículas híbridas que son liberadas [8] junto con las enzimas hidrolíticas del acrosoma [4], [5], [7].

Si bien, diversos estudios han indagado profundamente en la fisiología del espermatozoide para su entendimiento, todavía estamos lejos de comprender completamente cuál es el papel de algunas entidades moleculares que son de vital importancia en la fisiología del espermatozoide. Tal es el caso del canal de K^+ Slo3, que como se verá más adelante es fundamental para que el espermatozoide de ratón pueda fecundar al ovocito, sin embargo su participación en el espermatozoide de humano ha estado en debate durante los últimos años.

3.5. Generalidades de los canales de K⁺

En general, el $E_{m_{rep}}$ de una célula se rige por la actividad de los canales iónicos que se encuentran abiertos a potenciales de reposo. En la mayoría de las células, los canales de K⁺ son el principal elemento que determina dicho $E_{m_{rep}}$. Sin embargo, existen tipos celulares donde ocurre una contribución de otro tipo de canales al $E_{m_{rep}}$ como los canales de Ca²⁺ de bajo umbral de activación (LVA, por sus siglas en inglés) o los canales ENaC. En el caso del espermatozoide de ratón, antes de la capacitación, la célula se encuentra depolarizada con un $E_{m_{rep}}$ entre -35 y -45 mV y se hiperpolariza (-70 mV) durante la capacitación. El potencial alcanzado en la hiperpolarización se acerca al potencial de equilibrio de K⁺ (-90 mV) [29] sugiriendo que los canales de K⁺ son de gran importancia en la fisiología del espermatozoide.

Los canales de K⁺ se han estudiado desde los años 50's cuando Hodgking y Huxley demostraron que la membrana celular puede distinguir y controlar el flujo de Na⁺ y K⁺ [43]. En la actualidad se considera que los canales de K⁺ son el grupo más grande y diverso de estas proteínas transmembranales [44].

Los canales de K⁺ pueden ser clasificados por la forma en que éstos se modulan, algunos se activan al sentir el cambio de voltaje en la membrana plasmática, cambios en las concentraciones de Ca²⁺_i, pH_i, y otros más son regulados por proteínas G [45]. A pesar de las distintas formas de modulación, la mayoría de los canales de K⁺ que se conocen conservan una secuencia de aminoácidos en el asa del poro de selectividad, la secuencia firma de los canales de potasio: TTVGYGD (donde sólo las Glicinas son estrictamente conservadas) [43] (Figura 2). Esta secuencia tiene gran influencia en la selectividad de los canales ya que al realizar sustituciones de residuos de aminoácidos en la secuencia firma, la selectividad de los canales se ve alterada [46]. Como se verá más adelante, el canal Slo3 difiere en la secuencia firma de otros canales de K⁺ y su selectividad a este ión se ve reducida.

La estructura de los canales de K⁺ es diversa. En este trabajo sólo se describirá la estructura de los canales de K⁺ Slo.

3.6. Familia de los canales Slo

Los canales de la familia Slo son canales de K⁺ dependientes de voltaje. Se caracterizan por tener conductancias unitarias altas (~250 pS), es decir, la corriente que pasa por un solo canal es mayor en comparación con otros canales de K⁺. Otros nombres con lo que se puede denominar a los canales de

la familia Slo son: canales “grandes” de potasio (BK, por sus siglas en inglés) o canales maxi-K [45], [47], [48].

En la actualidad se sabe de cuatro genes que codifican para los canales de K^+ en la familia Slo: *Slo1*, *Slo2.1*, *Slo2.2* y *Slo3*. Estos genes codifican para las subunidades α ; un canal funcional está constituido por cuatro de estas subunidades (Figura 2). En nuestro conocimiento, la formación de un canal funcional de la familia Slo es homotetrámera. Hasta el momento sólo hay un reporte de formación de heterotetrámeros entre el canal Slo1 y Slo2 en un sistema heterólogo, donde las propiedades biofísicas de los canales formados difieren a las propiedades de los canales Slo1 y Slo2 expresados de manera independiente [49]. A pesar de que estos canales de K^+ de conductancia unitaria alta pertenecen a la misma familia, la forma en cómo se regulan, su distribución y su estructura varían.

3.6.1. Canal Slo1

Desde 1991, Atkinson, N. S. y colaboradores, clonaron por primera vez al canal de K^+ Slo1 activado por voltaje y Ca^{2+}_i [50]. La importancia de este canal radica en que juega un papel fundamental para regular la excitabilidad neuronal y muscular por señalización del Ca^{2+}_i . El canal Slo1, se expresa en diferentes tejidos y células incluyendo neuronas, músculos de los vasos sanguíneos, células cromafines, etc. Su función en neuronas se relaciona con la liberación de neurotransmisores y la contribución a la repolarización de las células después de un potencial de acción [45], [47], [48].

Los canales de K^+ Slo1 se activan por voltaje y en respuesta a un incremento de Ca^{2+}_i . Como se observa en la Figura 2A, los canales Slo1 están constituidos por cuatro subunidades α . Cada subunidad α se forma por siete segmentos transmembranales; el cuarto segmento (S4) contiene aminoácidos cargados positivamente responsables de la sensibilidad a los cambios del voltaje. Como se verá más adelante, a diferencia del canal Slo2, el canal Slo1 tiene un segmento transmembranal S0 y un extremo amino extracelular. Por otro lado, el extremo carboxilo del canal es intracelular y comprende dos terceras partes de la proteína. En este extremo se encuentran dos dominios reguladores de la conductancia de K^+ (RCK1 y RCK2 por sus siglas en inglés), dominios importantes para que el canal pueda activarse por un incremento Ca^{2+}_i [47], [48], [51], [52].

Al igual que los otros dos miembros de la familia Slo, el Slo1 tiene el asa del poro entre los segmentos S5 y S6, región donde se encuentra el filtro de selectividad de los canales de K^+ .

El canal Slo1 se caracteriza por tener una conductancia de ~250 pS y ser altamente selectivo a K⁺ (K⁺/Na⁺>50) [45],[53]. Acerca de su farmacología, es sensible a Caribdotoxina (CbTX), Iberiotoxina (IbTX), TEA⁺, Slotoxina y Penitrem A (Figura 3) [54], [55], [56], [57].

3.6.2. Canal Slo2

Hasta el momento se han identificado dos genes que codifican para los canales Slo2, denominados *slo2.1* y *slo2.2*. Los canales de K⁺ Slo2 se forman por cuatro subunidades α como el Slo1 y el Slo3 pero a diferencia de los otros miembros de la familia, los canales Slo2 se activan por Na⁺. Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de Cl⁻, el modo de acción de ambos iones se vuelve sinérgico. Una cosa interesante de los canales Slo2 es que, mientras que en mamíferos este sinergismo ocurre entre Na⁺ y Cl⁻, estudios en *Caenorhabditis elegans* sugieren que el sinergismo ocurre entre Ca²⁺ y Cl⁻ [45], [58], [59].

Otra diferencia interesante es que los canales Slo2 no tienen el segmento transmembranal 0 (S0) como los otros miembros de la familia. Conservan la estructura convencional de los canales de K⁺ activados por voltaje de seis segmentos (S1-S6) con un dominio amino y carboxilo terminal citosólicos. Los canales Slo2 tampoco presentan un S4 que contenga aminoácidos cargados positivamente, sin embargo son ligeramente sensibles a voltaje [45], [59] (Figura 2).

Con respecto a su distribución, los canales Slo2 en *C. elegans* se encuentran en neuronas y músculos [59], mientras que en mamíferos existen reportes de la expresión diferencial del Slo2.2 y Slo2.1; el primero se expresa en cerebro, riñón y testículo, mientras que el segundo además de los tejidos mencionados se expresa en corazón, músculo, pulmón e hígado [58].

A diferencia del canal Slo1 y Slo3, el canal Slo2 tiene una conductancia de ~140 pS, además es sensible a ATP intracelular, Ba²⁺ y Clofilium [45],[60].

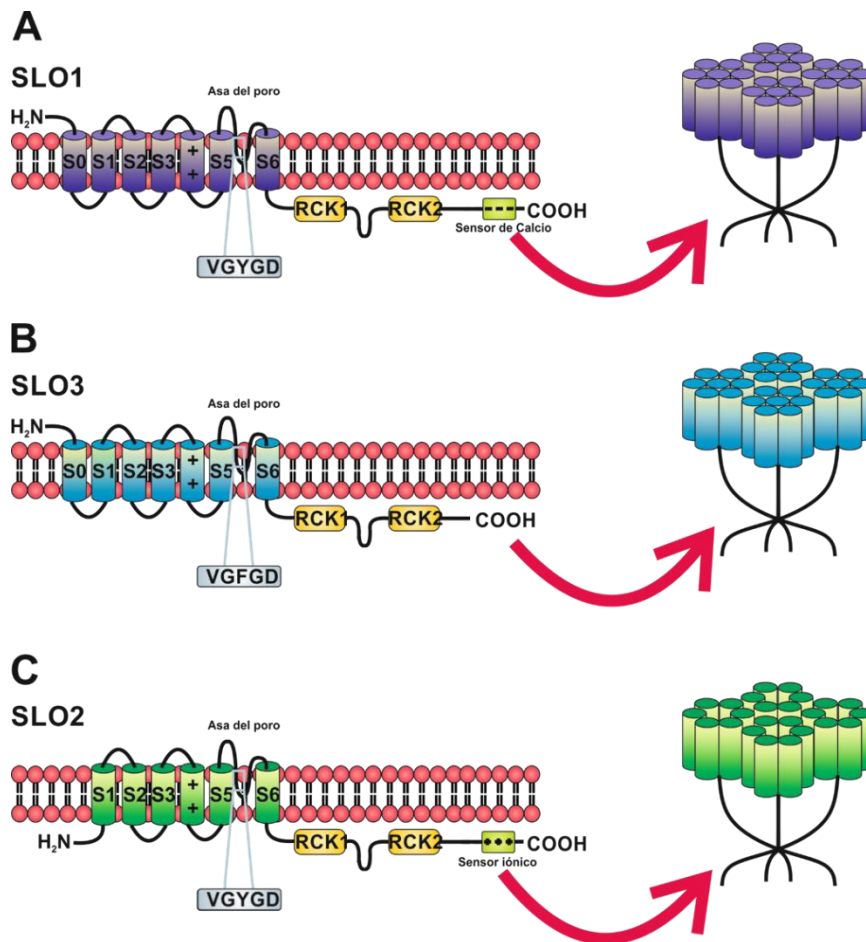


Figura 2. Canales de K^+ de la familia Slo.

Estructura de las subunidades α de los canales Slo. Las subunidades α de los canales Slo1 (A) y Slo3 (B) están constituidos por siete segmentos transmembranales (S0-S1), mientras que los canales Slo2 (C) se conforman por seis segmentos transmembranales (S1-S6). El canal Slo3 difiere de los canales Slo1 y Slo2 en el filtro de selectividad a potasio; los canales Slo3 presentan una Fenilalanina (F) que sustituye a la Tirosina (Y) presente en los otros canales Slo. Por tal motivo, los canales Slo3 son menos selectivos para K^+ sobre Na^+ en comparación de los canales Slo1 y Slo2. Los canales Slo se caracterizan por estar conformados por un gran segmento en el carboxilo terminal que contiene a los dominios citosólicos de regulación denominados RCK1 y RCK2 (dominios de regulación de K^+ 1 y 2, respectivamente), o al sensor de Ca^{2+} en el Slo1 (A). El dominio que monitorea al Ca^{2+} está modificado en el Slo3 (B) y el Slo2 (C). El Slo2 también se distingue porque contiene un amino terminal intracelular y la ausencia de cargas positivas en el S4. Nótese que cuatro subunidades α se unen para formar un tetrámero y constituir al canal funcional [45]

3.6.3. Canal Slo3

El canal Slo3 fue clonado y expresado por primera vez por Schreiber M. y colaboradores en 1998 [53]. Los canales de K^+ Slo3 al igual que los canales Slo1 y Slo2 están constituidos por cuatro subunidades α que forman un tetrámero. Cada subunidad α está conformada por siete segmentos transmembranales que van del S0 al S6 presentando un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citosólico. Con

respecto a su selectividad, el canal Slo3 es menos selectivo por K^+ ($K^+/Na^+ \sim 5-7$). Esta reducción, se sugiere, ocurre debido a que los canales Slo3, a diferencia de los canales Slo1 y Slo2, tienen una Fenilalanina (F) en el filtro de selectividad de los canales de K^+ en lugar de una Tirosina (Y) [53].

Otra particularidad del canal Slo3 es que sólo se expresa en la línea germinal masculina [42], [53] y su activación se da, principalmente, por aumento de pH_i (en ratón [31], [36], [53], [61]-[63]) y/o Ca^{2+}_i (en humano [59], [37], [63]), y por cambios en el voltaje (activado por depolarización) [23], [35], [43]-[49]. La ausencia de la expresión de esta proteína en ratón (Slo3 -/-) se manifiesta como un fenotipo de esterilidad masculina [31], [36].

Como en la mayoría de los canales iónicos, la subunidad α del canal Slo3 es la responsable de las propiedades biofísicas básicas de las corrientes iónicas generadas. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares modifica o ayuda al tráfico de los canales hacia la membrana plasmática, y regulan las propiedades biofísicas de las subunidades α . Esta interacción permite que los canales se puedan activar en condiciones fisiológicas y les brindan las características observadas en las células nativas. En el caso del canal Slo3, se ha demostrado que este canal se regula fuertemente por la subunidad accesoria LRRC52 (proteína con repeticiones ricas en leucina 52, por sus siglas en inglés), también conocida como $\gamma 2$ [50-54].

La subunidad LRRC52 modifica la apertura o activación por voltaje y pH del canal Slo3 de humano (hSlo3) y de ratón (mSlo3) expresados heterológamente. Los canales resultantes de su coexpresión tienen propiedades biofísicas semejantes a las observadas en la corriente de K^+ endógena del espermatozoide [62], [65], [66]. Además esta subunidad también tiene un alto nivel de expresión en tejido testicular, de manera casi tejido específica [66] en comparación con otras subunidades LRRCs (p. ej.: la subunidad LRRC26), sugiriendo que la expresión exclusiva del canal Slo3 en testículo pudiera estar influenciada por la expresión de la subunidad LRRC52.

Hasta el momento no existe un bloqueador o inhibidor específico del canal, sin embargo Clofilium [64], [68], Quinidina [64], TEA^+ [69] y Progesterona (en humano) [50] son algunos de los compuestos que se han utilizado para la caracterización electrofisiológica del canal Slo3 y la evaluación de su participación en la fisiología del espermatozoide (Figura 3).

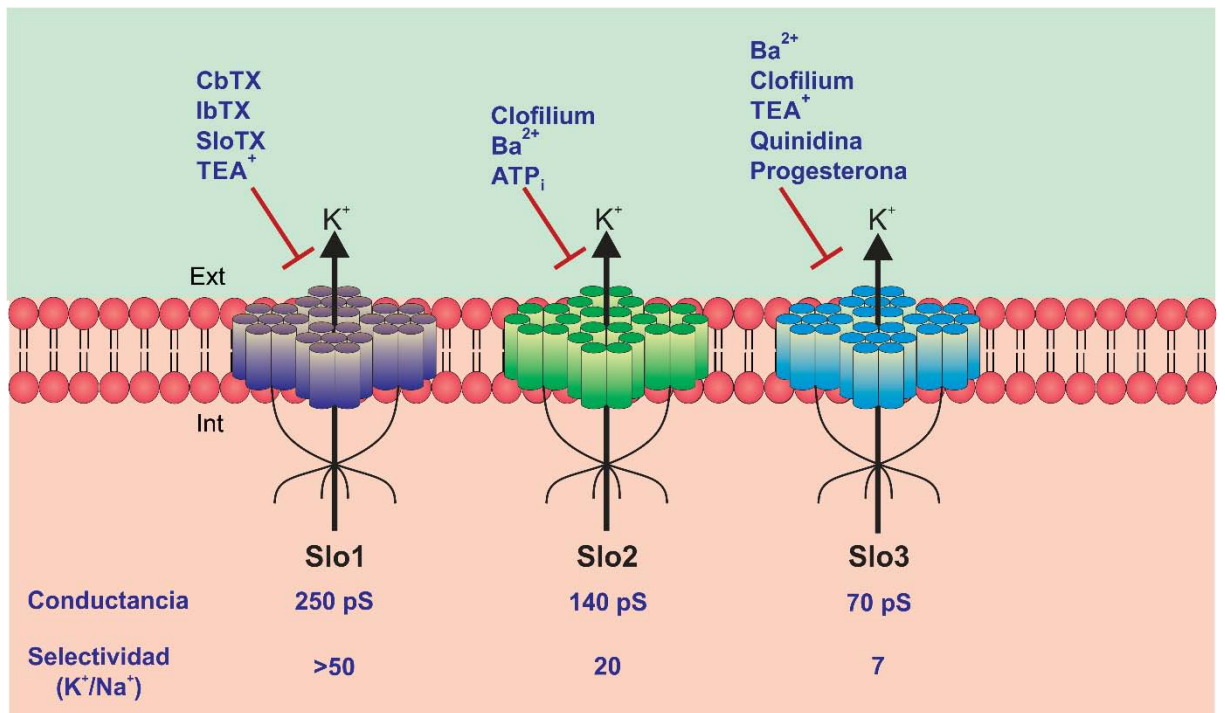


Figura 3. Propiedades de los canales de la familia Slo.

Los canales de la familia Slo difieren considerablemente en sus propiedades estructurales, biofísicas y farmacologías. El canal Slo1 presenta la conductancia (250 pS) y una selectividad por K⁺ más alta (K⁺/Na⁺>50) en comparación de los otros miembros de la familia, mientras que el canal Slo3 presenta la conductancia (70 pS) y selectividad por K⁺ más baja (K⁺/Na⁺~7). El canal Slo2 tiene una conductancia y selectividad por K⁺ (K⁺/Na⁺) intermedia. A pesar que los canales de la familia pueden ser bloqueados por los mismos inhibidores o toxinas, la sensibilidad de los canales a éstos es diferente.

4. ANTECEDENTES

La participación de los canales iónicos durante la capacitación es crucial para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito [3], entre ellos se encuentra el canal de K^+ Slo3 [31]. Los resultados sugieren que el canal Slo3 se expresa exclusivamente en los espermatozoides de mamífero [53]. El desarrollo de un ratón nulo para Slo3 demostró que los machos de esta especie son infértiles ya que sus espermatozoides presentan defectos en el nado progresivo y en su morfología. Además, son incapaces de llevar a cabo la reacción acrosomal y tampoco presentan la hiperpolarización del $E_{m_{rep}}$ asociada a la capacitación (cambio del potencial de membrana de ~ -40 mV a ~ -65 mV en espermatozoides de ratones silvestres) [31].

En nuestro laboratorio y en otros grupos, se ha demostrado que el canal Slo3 también se expresa en espermatozoides de humano [42], [53], [65]. Por otro lado, en su tesis de maestría, la M. en C. Paulina Torres demostró por citometría de flujo que los espermatozoides de humano presentan la hiperpolarización de la membrana plasmática después de ser incubados *in vitro* en medio capacitante (ver materiales y métodos). Estos resultados sugieren que la contribución fisiológica del canal hSlo3 pudiera ser similar a la de su ortólogo en ratón. Sin embargo, estudios recientes han generado una controversia con respecto a cuál es el canal de K^+ principal del espermatozoide de humano ya que las conclusiones de los autores son contradictorias.

Por un lado, Mannowetz y colaboradores (2013) reportan con estudios electrofisiológicos que la conductancia principal de K^+ en espermatozoides de humano eyaculados es a través del canal Slo1. Sus conclusiones se basan principalmente en que, en sus condiciones de registro, la corriente de K^+ se regula por Ca^{2+}_i y no por pH_i . Además, el perfil farmacológico reportado demuestra que las corrientes se inhiben por diferentes toxinas que actúan sobre el canal Slo1, pero no bloquean al canal mSlo3 [70]. A pesar de sus conclusiones, en este trabajo no se discutió acerca de la selectividad ni de la conductancia del canal de K^+ .

Por otro lado, Mansell y colaboradores (2014) demostraron que la corriente de potasio registrada en espermatozoides de humano es dependiente de pH_i y es bloqueada por compuestos que, anteriormente, se había demostrado, inhiben al canal Slo3 [64]. Ellos también reportan que la selectividad del canal por K^+ (K^+/Na^+) es de ~ 7 , característica intrínseca del canal Slo3 [45], [53].

Por último, Brenker y colaboradores (2014), registraron a la corriente de K^+ presente en el espermatozoide de humano eyaculado y además coexpresaron al canal hSlo3 con la subunidad hLRRC52

en células CHO. En este trabajo demostraron que ambas conductancias son sensibles tanto a pH_i como a Ca^{2+}_i . Además, la medición de la conductancia de canal unitario fue de ~ 70 pS en ambos sistemas [65]. Esta conductancia coincide con la reportada por Schreiber y colaboradores (1998) en ratón [53] para Slo3. Sus evidencias sugieren que el principal canal de K^+ en el espermatozoide de humano es el canal Slo3 y no el canal Slo1 tal como lo había reportado Mannowetz y colaboradores (2013).

A pesar de estas enormes contribuciones en el campo de la fecundación, en ninguno de estos estudios se indagó sobre el perfil farmacológico del canal hSlo3 expresado heterológamente. Solamente Brenker y colaboradores (2014) reportaron que la corriente hSlo3 se inhibe por Progesterona con una concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) de 17.5 ± 2 μM [65]. Tampoco se investigó sobre la participación de este canal en la fisiología del espermatozoide.

Debido a que no existe un perfil farmacológico establecido para el canal hSlo3, ni un inhibidor o bloqueador específico, el debate sobre cuál o cuáles son los canales responsables de la conductancia de K^+ en espermatozoide de humano seguirá abierto. El contar con un perfil farmacológico del canal hSlo3 constituiría una herramienta importante para determinar su función en la fisiología del espermatozoide de humano. Por otro lado, en nuestro laboratorio el establecimiento de la expresión del canal hSlo3 en las células CHO permitirá registrar corrientes del mismo. En un futuro se podría realizar un tamizaje farmacológico automatizado a gran escala con el fin de encontrar un inhibidor específico a partir del cual se desarrolle un anticonceptivo masculino.

5. JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha el estudio y la caracterización de las propiedades biofísicas del canal Slo3 se ha realizado, en su mayoría, en el canal de ratón (mSlo3). En nuestro laboratorio se ha observado que el canal Slo3 también se expresa en espermatozoides de humano y se propone que pudiera tener una función similar a la de su ortólogo en ratón. A pesar de su importancia en la fecundación, hasta el momento no existe un perfil farmacológico para el canal hSlo3, por lo que es importante evaluar si su farmacología es similar a la del canal mSlo3. El perfil farmacológico del canal hSlo3 ayudará a contar con herramientas para entender cuál es la participación de este canal en la fisiología del espermatozoide.

6. HIPÓTESIS

Al igual que otros canales iónicos del espermatozoide, el canal Slo3 de humano tiene una farmacología especie específica y participa en la hiperpolarización asociada a la capacitación del espermatozoide de humano.

7. OBJETIVO GENERAL

- Realizar un perfil farmacológico del canal de K⁺ hSlo3 expresado heterológamente en células CHO.

7.1. Objetivos Particulares

- Establecer la expresión del canal hSlo3 en células CHO y evaluar su perfil farmacológico.
- Determinar si el canal hSlo3 participa en la hiperpolarización asociada a la capacitación del espermatozoide de humano.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

8.1. Verificación de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52

La clona que codifica para la subunidad hLRRC52 se adquirió de *Open Biosystems* (número de acceso BC132383). Originalmente el inserto se clonó en el vector de amplificación pCR4-TOPO. Para confirmar la integridad de la construcción hLRRC52- pCR4-TOPO se realizó un patrón de digestión. Se seleccionaron las enzimas de restricción EcoRI y KpnI (*Thermo Scientific Inc.*) para generar cortes al ADN y obtener un patrón de bandas. Para cada una de las reacciones se digirieron 1 µg de ADN, se utilizó la solución tampón (Tango; *Thermo Scientific Inc*) y se añadieron 0.5 unidades de enzima EcoRI en la digestión sencilla, mientras que en la digestión doble se utilizó la misma cantidad de enzima EcoRI y dos unidades de KpnI. El volumen se ajustó con H₂O MiliQ al volumen final deseado. Las reacciones se incubaron por una hora a 37° C y se corrieron en un gel de agarosa 1% por electroforesis. El patrón de bandas observado se comparó con el esperado.

Para determinar la identidad molecular de la subunidad hLRRC52 se recurrió a la secuenciación de ADN. A partir de las secuencias reportadas en el banco de genes (*GeneBank*) para la subunidad hLRRC52, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos específicos que sirvieron como cebadores para la secuenciación de la clona (**Tabla 1**). Los oligos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis Química de Oligonucleótidos, del Instituto de Biotecnología, UNAM. El Oligo1 hLRRC52 se utilizó para secuenciar el extremo 5' de la clona, mientras que el Oligo2 hLRRC52 se utilizó para secuenciar el extremo 3'.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la clona hLRRC52

Se muestra el nombre, la longitud en pares de bases (p.b.) y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la clona que codifica para la subunidad LRRC52. Además se muestra la T_m en grados centígrados (°C).

OLIGOS LRRC52			
NOMBRE	LONGITUD (p.b.)	SECUENCIA (5' -> 3')	T _m (°C)
Oligo1 hLRRC52	18	ATG TCC CTT GCT TCA GGC	56
Oligo2 hLRRC52	20	CTA AAT AAG CTG AGG GAA CT	56

8.2. Electroforesis de ADN

Las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 1 %. La agarosa se disolvió en la solución tampón TAE (solución constituida por Tris (hidroximetil) aminometano, acetato y ácido etildiaminotetraacético), calentándola en horno de microondas por aproximadamente 40 segundos. Una vez polimerizada la agarosa del paso anterior, se corrieron las muestras de ADN en una cámara de electroforesis que contenía solución TAE. El voltaje aplicado en la electroforesis fue de +80 mV durante el tiempo deseado. Posteriormente el gel se tiñó con SYBR® Gold de Invitrogen disuelto en solución TAE o con Bromuro de Etidio (Invitrogen) en agitación constante. Las fotografías de los geles se tomaron con la incidencia de luz UV proveniente de un transiluminador T1201 SYGMATM y una cámara Kodak acoplada a un filtro de emisión (placa de acrílico naranja que funciona como filtro; la placa permite observar la emisión de Syber® Gold, Invitrogen, >500 nm).

8.3. Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN (500 ng/ μ L) de las construcciones de los genes hLRRC52 y hSlo3 se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. La mezcla ADN/Oligo se entregó en un volumen final de 16 μ L en agua grado biología molecular.

8.4. Subclonación de la subunidad hLRRC52.

El gen que codifica para la subunidad hLRRC52 se encontraba clonado en el vector de amplificación bacteriano pCR4-TOPO. Para poderla coexpresar con el canal hSlo3 en células CHO fue necesario subclonarla en el vector de expresión pIREs-YFP (vector que permite la expresión de proteínas exógenas en líneas celulares de eucariontes). Para la subclonación del gen que codifica para la subunidad hLRRC52, se insertaron por medio de PCR los sitios NotI y EcoRI en los extremos 5' y 3' que flanquean la secuencia de la clona, respectivamente.

Se utilizaron 200 μ M de dNTPs, una unidad de enzima Phusion® ADN polimerasa de alta fidelidad (*New England BioLabs*) y agua MiliQ hasta alcanzar el volumen final deseado. Esta reacción se realizó en la solución Phusion® (*New England BioLabs*).

Los componentes y concentraciones utilizados se muestran a continuación:

Componente	Concentración final
Templado: hLRRC52-pCR4-TOPO	60 ng
Oligo F: hLRRC52 NotI (5' TAC GGC GGC CGC ATG TCC CTT 3')	10 μ M
Oligo R: hLRRC52 EcoRI (5' GCC AAA GAA TTC AAA CTA AAT AAG CTG AGG GAA 3')	10 μ M

El programa y las condiciones de los ciclos fueron los siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Alineamiento	60	20	
Elongación	72	20	
Elongación final	72	600	1

La banda del tamaño esperado (950 pb) se purificó a partir de gel de agarosa.

Para la ligación del producto de PCR (inserto) con el vector pIRES-EYFP se utilizó una unidad de ligasa de ADN T4 (*Thermo Scientific*). El vector y el inserto (hLRRC52) se pusieron en concentraciones finales equivalentes (0.05 μ M). Se utilizó solución de ligasa de ADN T4 y se ajustó con H₂O MiliQ para alcanzar el volumen final de la reacción. Como control negativo se puso una reacción como la descrita anteriormente pero sin ADN de los insertos.

8.5. Purificación de ADN a partir de gel de Agarosa

En un tubo eppendorf se colocó el fragmento de gel de agarosa que contenía el ADN de interés. Se le agregó la solución QG (Qiagen) tres veces en volumen con respecto al peso en gramos del fragmento de gel de agarosa. Se metió el tubo en un baño maría a 60° C hasta que se disolvió el gel en la solución QG. Se le agregaron 10 μ L de Buffer P3 (Qiagen) y un volumen de isopropanol con respecto al peso en gramos del fragmento de gel de agarosa. Se resuspendió y se pasó a una columna para

purificación de ADN (Fermentas), con un volumen máximo de 800 μ L. Se centrifugó un minuto. Se agregaron 500 μ L de solución de lavado (*Wash Solution*, Fermentas) y se incubó por 2 min. Se centrifugó 1 min. Posteriormente se agregaron 50 μ L de agua MiliQ y se incubó por 2 min. Por último, para obtener el ADN de la columna se centrifugó durante 2.5 min. En todos los casos la centrifugación se realizó a 11,000 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga Eppendorf 5424.

8.6. Obtención de la clona que codifica para el canal hSlo3

La clona que codifica para el canal hSlo3 se obtuvo gracias a la donación del Dr. Benjamin Kaupp, investigador del Departamento de Sistemas Sensoriales Moleculares en el centro de Investigación y Estudios Avanzados Europeos de Bonn, Alemania. Esta clona está insertada en el vector de expresión eucariótico pcDNA 3.1 (+) y es la misma que se utilizó para los estudios reportados por Brenker y colaboradores (2014) [65].

8.7. Verificación de las construcciones hSlo3-pcDNA 3.1 (+), hLRRC52-pIRES-YFP

La verificación de la integridad de las construcciones se realizó por patrón de digestión. La construcción hSlo3-pcDNA 3.1 (+) se digirió durante una hora con las enzimas de restricción NotI y HindIII, mientras que la construcción hLRRC52-pIRES-YFP se incubó con las enzimas NotI y EcoRI. Se comprobó la digestión en un gel de agarosa 1 % por electroforesis.

8.8. Cultivo celular

Las células CHO se mantuvieron en cultivo utilizando medio Eagle modificado de Dulbecco avanzado (ADMEM por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen) suplementado con 1% de antibióticos y 10% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen). Las células crecieron sobre cajas Petri de plástico a 37° C y 5% de CO₂ en una incubadora *VWR Scientific* 2100.

Las células se sembraron cada 48 horas de acuerdo al siguiente protocolo: como primer paso, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con 3 mL de PBS (Gibco, Invitrogen), y se les retiró el PBS por medio de succión. Para despegar a las células del fondo de la caja cultivo se les adicionó 1 mL de tripsina (TryPLE™ Express, Gibco, *Life Technologies*), y se incubaron durante un minuto a 37° C o hasta comprobar que todas las células estaban en suspensión mediante observación con un microscopio óptico invertido (*Nikon Eclipse* TS 100). La reacción de la tripsina se bloqueó con el mismo volumen de medio completo (ADMEM suplementado con FBS). Finalmente en una caja de Petri nueva que contenía medio completo fresco, se agregaron 200 μ L de la suspensión celular del cultivo anterior.

8.9. Transfección de células CHO

La transfección se realizó en cultivos celulares con 24 h *post-pase* ($\sim 5 \times 10^5$ células).

En 100 μL de medio ADMEM sin suero se agregaron cuidadosamente 6 μL de ReactivoPlus (Gibco, *Life Technologies*). Después, por goteo, se agregó 1 μg del ADN de interés previamente resuspendido en 100 μL de medio ADMEM sin suero. Se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 15 min. Transcurrido el tiempo, se agregaron 7 μL de lipofectamina (Invitrogen) a la mezcla anterior y se incubó durante 15 min.

Las células a transfectar, se lavaron con 2 mL de medio sin suero. Se retiró esta disolución y se agregó el medio ADMEM que contenía al ADN, ReactivoPlus y lipofectamina hasta un volumen final de 1 mL. Las células se incubaron durante 5 h. Pasado este tiempo se retiró este medio y se sustituyó con 2 mL de medio ADMEM suplementado con FBS y antibiótico. Las células transfectadas se incubaron a 37° C durante 48 h.

Para seleccionar a las células CHO transfectadas con el canal hSlo3 y la subunidad hLRRC52, éstas se cotransfectaron con el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en una proporción 1:3 (GFP:hSlo3+hLRRC52). El uso de la proteína reportera YFP del vector pIRES-YFP se descartó debido a que no contamos ni con el equipo de excitación de la proteína ni con el filtro de adquisición de la fluorescencia adecuados.

8.10. Electrofisiología

Las células CHO, previamente disociadas y pegadas en vidrios cubreobjetos cortados en dimensiones de 2 X 2 mm, se colocaron en una cámara de registro. Con la técnica de *patch clamp* se realizaron registros electrofisiológicos de células CHO en la configuración célula completa (*whole cell*). Se utilizaron pipetas de vidrio de borosilicato, las cuales se estiraron con un pulidor de micropipetas laser P-200 (*Sutter Instruments Co*) hasta alcanzar una resistencia de entre 3-8 M Ω . Sólo se adquirieron corrientes iónicas cuando se alcanzaron sellos con resistencia ≥ 1 G Ω . Las corrientes iónicas se adquirieron con un amplificador Axopatch 200 B (*Molecular Devices*). La frecuencia de adquisición fue de 20 kHz y se filtraron a 5 kHz. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El potencial de mantenimiento fue de -100 mV. Las corrientes iónicas se analizaron con el *software* pCLAMP 10.3. El valor de corriente se tomó del promedio de los valores de los últimos 30 ms del registro

electrofisiológico, intervalo de tiempo en el que la corriente había alcanzado su máximo valor. Para el análisis estadístico, se realizaron pruebas de *t* de Student comparando la densidad de corriente (pA/pF) y la corriente hSlo3 normalizada ($I_{hSlo3} = I/I_{control}$). Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaPlot 10.0. Todos los datos están dados como promedios \pm error estándar. Los datos con un valor de $p < 0.05$ se consideraron como diferentes.

8.10.1. Corrientes de canales endógenos de K^+ y canales hSlo3 expresados en células CHO.

Los componentes de la solución de baño fueron los siguientes (en mM): 140 NaCl, 1.8 $CaCl_2$, 5.4 KCl, 1 $MgCl_2$ y 5 de ácido etanosulfónico N-2-hidroxyethylpiperazina-W-2 (HEPES). Los componentes de la solución de la pipeta fueron los siguientes (en mM): 130 K-Aspartato, 10 NaCl, 0.5 $CaCl_2$ y 10 de HEPES. La osmolaridad de las soluciones externa e interna se ajustó con glucosa a 310 y 290 mosmol/Kg, respectivamente. Para calcular la densidad de corriente se dividió la amplitud de corriente sostenida (pA) entre la capacitancia (pF). Las células CHO transfectadas con hSlo3 se seleccionaron gracias a la expresión de la proteína GFP como gen reportero excitando con un LED a 586 nm y filtrando a 510 nm. El efecto de los bloqueadores y/o toxinas en las corrientes iónicas se probó 3-5 min después de la adición del compuesto a la solución del baño en la cámara de registro.

8.11. *Swim up* de espermatozoides de humano

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación de donadores que cumplen con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las muestras se incubaron durante 30 min en una incubadora a 37° C y 5% de CO_2 para el proceso de licuefacción. 500 μ L de la muestra licuada se depositaron en tubos de ensayo y se incubaron por 1 h con 1 mL de medio Ham's F10 (suplementado con 2 mM de $CaCl_2$ y con 5 mg/mL de BSA para la obtención de espermatozoides capacitados). La muestra se colocó en tubos de ensayo inclinados a 45°. Posteriormente se colectaron 700 μ L de espermatozoides con medio Ham's y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles. La concentración de espermatozoides capacitado y no capacitados se ajustó con medio Ham's, utilizando una cámara Makler. Los espermatozoides se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se incubaron a 37° C y 5% de CO_2 durante toda la noche en presencia o ausencia de distintos bloqueadores y/o toxinas: Ba^{2+} , Clofilium, IbTX, CbTX, SloTX, TEA^+ , Progesterona, Quinidina y Penitrem A. Clofilium, IbTX, CbTX y SloTX se diluyeron en de HEPES 10 mM, mientras que Pg, Quinidina y Penitrem

A se diluyeron en DMSO. Los experimentos con DMSO se realizaron de tal forma que el disolvente quedara a una concentración $\leq 0.05\%$.

Ba²⁺, Clofilium, TEA⁺ y Progesterona fueron adquiridos de *Syigma Aldrich*. IbTX, CbTX, SloTX y Penitrem se adquirieron de *Alomone Labs*; Quinidina de *RBI*.

8.12. Determinación del Em_{rep} de espermatozoides de humano por citometría de flujo

Los cambios en el Em_{rep} y pHi se monitorearon utilizando los colorantes DiSC₃(5) y BCECF, respectivamente (*Molecular Probes-Invitorgen*, Inc.). Después de la incubación durante toda la noche, los espermatozoides en condiciones capacitantes o no capacitantes, se centrifugaron a 750 g durante 3 min. Se resuspendieron en medio de registro (MR; en mM: 120 NaCl, 15 NaHCO₃, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 lactato Na, 5 D-Glucosa y 1 de Piruvato Na; pH 7.4); y se cargaron con el indicador fluorescente BCECF (25 nM) durante 7 min a temperatura ambiente. Se lavaron con medio de registro y se resuspendieron en la condición experimental: 500 μ L de células suspendidas se colocaron en un tubo para uso en el citómetro. Los espermatozoides se cargaron con el indicador fluorescente DiSC₃(5) (10 nM) y Ioduro de Propidio (100 nM) (para determinar viabilidad; PI por sus siglas en inglés) 3 min antes de su prueba por el citómetro de flujo. Los datos se grabaron como eventos celulares individuales utilizando el citómetro de flujo FACSCanto IITM (Becton Dickinson). Se midieron las dispersiones directas *forward* (FSC) y laterales *side* (SSC) de la luz de 20 mil eventos por muestra. Los umbrales de FSC y SSC se utilizaron para excluir señales de residuos celulares. Las muestras sin teñir se utilizaron para compensar los umbrales apropiados y crear las ventanas adecuadas para seleccionar eventos celulares únicos. Las señales positivas para DiSC₃(5), BCECF y PI se obtuvieron utilizando filtros para alofocianina (APC), isotiocinato de fluoresceína (FITC) y para PI, respectivamente. Los siguientes controles se utilizaron para la compensación de parámetros: espermatozoides sin teñir, espermatozoides teñidos con DiSC₃(5), BCECF o espermatozoides muertos teñidos con PI (los espermatozoides se resuspendieron con 0.1% de tritón X-100 en MR y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente).

8.12.1. Análisis de datos de citometría de flujo

Los datos de citometría de flujo se analizaron automáticamente utilizando los programas FACS Diva y FlowJo. Para cada análisis, se excluyeron los residuos celulares y a las células muertas. Los datos se presentan como histogramas de porcentaje del conteo celular máximo (% Max; calculado como el conteo celular obtenido dividido por el valor máximo del conteo total) graficado vs fluorescencia.

El porcentaje de inhibición de la hiperpolarización se calculó como se describe a continuación: los datos de citometría de flujo nos permiten calcular directamente el número de células con una intensidad de fluorescencia determinada. Para considerar una célula hiperpolarizada, se estableció un umbral de fluorescencia o ventana, en la cual se incluyó el 95% del total de los eventos de la distribución log de las células no capacitadas. Las células con una intensidad de fluorescencia mayor a lo establecido en la ventana de células no capacitadas, se consideraron como células hiperpolarizadas. Después se compararon el número de células hiperpolarizadas en presencia de los inhibidores o toxinas probadas en este trabajo y se calculó el % de inhibición de acuerdo a la siguiente ecuación:

Porcentaje de inhibición

$$= \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n \left(100 - \left(\left(\frac{\text{Células hiperpolarizadas}_{\text{inhibidor}} / \text{Células totales}_{\text{inhibidor}}}{\text{Células hiperpolarizadas}_{\text{control}} / \text{Células totales}_{\text{control}}} \right) \times 100 \right) \right) i$$

Donde; Células hiperpolarizadas_{inhibidor} = número de células hiperpolarizadas en presencia de cualquier inhibidor o toxina de canales de K⁺ en condiciones de capacitación (células con intensidad de fluorescencia igual o mayor a lo establecido para la ventana de células no capacitadas anteriormente descrito); Células totales_{inhibidor} = número total de espermatozoides contados en la presencia de cualquier inhibidor o toxina de canales de K⁺ en condiciones de capacitación (espermatozoides hiperpolarizados + espermatozoides no hiperpolarizados); Células hiperpolarizadas_{control} = número de espermatozoides hiperpolarizados en la ausencia de bloqueador o toxina de canales de K⁺ en condiciones de capacitación (número de células con la intensidad de fluorescencia igual o mayor a lo establecido para la ventana de células no capacitadas anteriormente descrito); Células totales_{control} = número total de espermatozoides presentes en la muestra celular en la ausencia de bloqueador o toxina de canales de K⁺ en condiciones de capacitación (espermatozoides hiperpolarizados + espermatozoides no hiperpolarizados); n = al número de ensayos realizados por condición experimental.

El análisis estadístico se realizó en el programa SigmaPlot 10.0. Todos los datos están dados como promedios ± desviación estándar. Los datos con un valor de p<0.05 se consideraron como estadísticamente diferentes.

9. RESULTADOS

9.1. Verificación de la identidad y la integridad de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52.

Inicialmente, la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 se clonó en el vector de amplificación pCR4-TOPO, flanqueada por sitios de reconocimiento para EcoRI. Analizando las secuencias que corresponden para dicho vector y la secuencia que codifica para la subunidad hLRRC52 en *GeneBank* (acceso NM_001005214) se seleccionó un sitio de restricción que reconoce KpnI en la construcción y se realizaron reacciones de digestión sencillas y dobles para confirmar, por patrón de digestión, la identidad de la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO ([Figura 4](#)).

La digestión con EcoRI, dio dos fragmentos, uno que corresponde al tamaño del vector pCR4-TOPO (~4000 pb) y otro que corresponde al tamaño de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 (~1150 pb). Como se puede observar en la [Figura 4](#), la banda que corresponde a la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 tiene un tamaño de ~1150 pb. Este fragmento es ligeramente más grande al esperado (~950 pb) y se debe a que la subunidad en la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO está flanqueada por secuencias extra en los extremos 5' y 3'. La digestión doble con KpnI y EcoRI dio como resultado tres bandas, una que corresponde al tamaño del vector pCR4-TOPO (~4000 pb) y otras dos que corresponden a la digestión de la clona que codifica para la subunidad hLRCC55 en dos fragmentos, uno de ~550 y otro de ~500 pb.

La segunda estrategia utilizada para corroborar la integridad e identidad de la construcción fue secuenciar la clona con oligonucleótidos específicos. Nuestros resultados comprueban que la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 se encuentra íntegra y sin mutaciones ([Figura 5](#)).

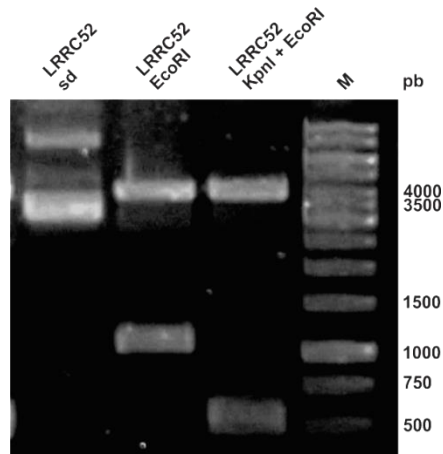


Figura 4. Patrón de digestión de la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO

En cada carril se muestran los fragmentos esperados para las digestiones sencillas o dobles de la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO, con las enzimas EcoRI y KpnI. De acuerdo a los tamaños esperados y observados se determinó que la construcción analizada corresponde a la construcción hLRRC52-pCR4-TOPO. *sd*, ADN sin digerir; *M*, marcador; y *pb*, pares de bases.

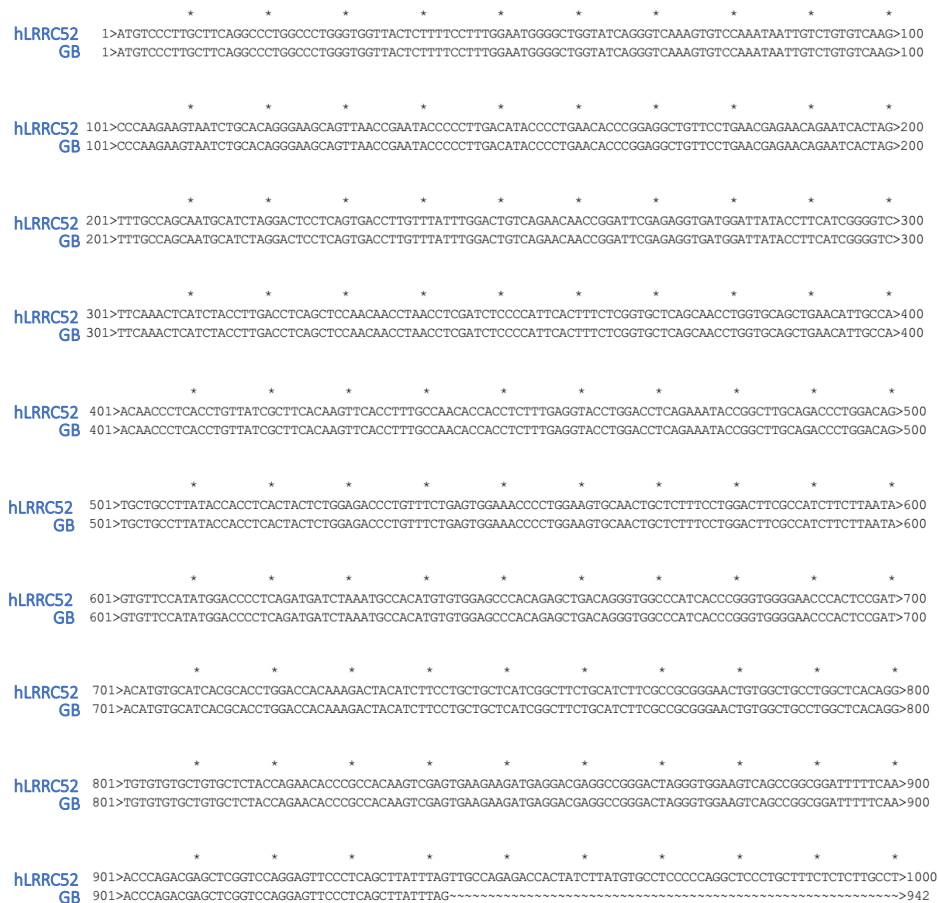


Figura 5. Alineamiento entre hLRRC52-GeneBank y hLRRC52-pCR4-TOPO

El alineamiento muestra 100% de identidad a nivel nucleótido. El alineamiento se realizó en APE y se comparan la secuencia de hLRRC52 reportada en GeneBank (GB) y la secuencia de nuestra clona (hLRRC52).

9.2. Subclonación de la subunidad hLRRC52

Uno de los objetivos de este trabajo fue coexpresar a la subunidad hLRRC52 con el canal hSlo3 en células CHO para aumentar su transporte hacia la membrana plasmática y poder registrar corrientes iónicas de buena amplitud. Como la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 se clonó en un vector de amplificación bacteriano (pCR4-TOPO), fue necesario subclonar al gen en un vector de expresión que nos permitiera coexpresarla con el canal hSlo3 en células CHO. Para abordar este objetivo, se introdujeron nuevos sitios de restricción que nos permitieron subclonarla en el vector de expresión pIRES-EYFP. En la **Figura 6** se observa el producto de una PCR con un tamaño ~950 pb. En esta reacción se utilizaron oligonucleótidos específicos que reconocen al gen que codifica para la subunidad hLRRC52. Estos oligonucleótidos contienen a los sitios de reconocimiento NotI y EcoRI, en los extremos 5' y 3' del gen respectivamente, y flanquean al gen que codifica para la subunidad hLRRC52. La inserción de estos sitios de reconocimiento no cambia el marco de lectura.

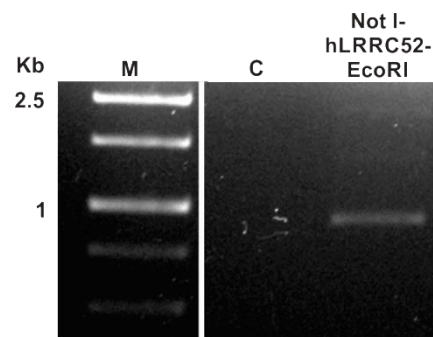


Figura 6. Inserción de los sitios NotI y EcoRI en el gen que codifica para la subunidad hLRRC52

Producto de PCR que muestra una banda correspondiente al tamaño del gen que codifica para la subunidad hLRRC52 con la inserción de los sitios NotI y EcoRI en sus extremos 5' y 3', respectivamente (NotI-hLRRC52-EcoRI). Los carriles corresponden al mismo gel, por comodidad visual se excluyeron carriles ajenos a este experimento. La fotografía muestra las bandas observadas en un gel de agarosa 1%. *M*, marcador; *C*, control, *Kb*, kilobases.

Una vez purificado el segmento Not-hLRRC52-EcoRI, se ligó con el vector de expresión pIRES-YFP para la obtención de la construcción hLRRC52-pIRES-YFP.

Para corroborar la integridad de la construcción hLRRC52-pIRES-YFP y de la que codifica para el canal hSlo3 (hSlo3-pcDNA 3.1 (+)), se realizaron digestiones dobles. Como se puede observar en la **Figura 7**, los tamaños de las bandas observados coinciden con los esperados. Para la digestión doble con las enzimas NotI y EcoRI de la construcción hLRRC52-pIRES-YFP, se esperaban dos fragmentos: uno que corresponde al tamaño del vector (~5.4 Kb) y otro al tamaño del inserto (~950 pb). Por otro lado, para

la digestión doble con las enzimas NotI y HindIII de la construcción hSlo3-pcDNA 3.1 (+), se esperaba dos fragmentos: uno que corresponde al tamaño del vector (~5.4 Kb) y otro al del inserto (~3.5 Kb). La secuenciación de las clonas que codifican para el canal hSlo3 y hLRRC52 coinciden en un 100% con lo registrado en GeneBank (datos no mostrados).

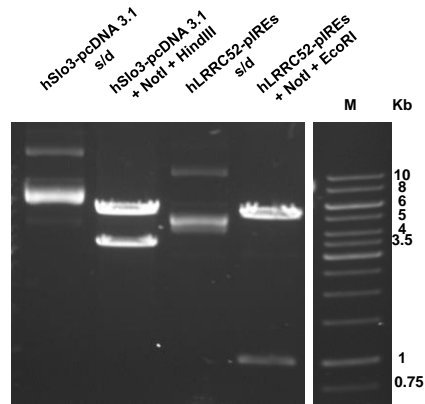


Figura 7. Corroboración por patrón de digestión de las construcciones hSlo3-pcDNA3.1 (+) y.hLRRC52-pIRES-YFP

En cada carril se muestran los fragmentos esperados de las construcciones hSlo3-pcDNA 3.1 (+) y hLRRC52-pIRES-YFP de acuerdo a digestiones dobles, con las enzimas indicadas en cada carril. De acuerdo a los tamaños esperados y observados (5.4, 3.5, 5.4 y 0.95 Kb para el vector pcDNA3.1 (+), inserto hSlo3, vector pIRES-YFP e inserto hLRRC52, respectivamente) se determinó que las construcciones analizadas por patrón de digestión corresponden a las construcciones hLRRC52-pIRES-YFP y hSlo3-pcDNA 3.1 (+). *s/d*, ADN sin digerir; *M*, marcador; y *Kb*, Kilobases.

Una vez obtenidas las construcciones hSlo3-pcDNA y hLRRC52-pIRES-YFP, se prosiguió a la estandarización de la transfección de las células CHO para la expresión del canal hSlo3.

9.3. Electrofisiología: *Patch clamp*

9.3.1. Expresión heteróloga del canal hSlo3

Reportes recientes demuestran que la subunidad hLRRC52 es importante para la expresión del canal Slo3 en sistemas heterólogos debido a que ésta podría estar regulando el transporte de la subunidad α del canal hacia la membrana plasmática y modular sus propiedades biofísicas acercándolas a lo que se registra en el espermatozoide [62], [65], [66], [71]. Por esta razón, en este trabajo se propuso la caracterización del efecto de los diferentes bloqueadores y/o toxinas sobre el canal hSlo3 coexpresado con la subunidad accesoria hLRRC52.

Anteriormente se había descrito que las células CHO expresaban una corriente de K⁺ con una conductancia de ~210 pS sensible a Caribdotoxina [72]. Como se puede observar en la [Figura 8](#), corroboramos que las células CHO sin transfectar (CHO control) expresan una corriente endógena de K⁺, la cual tiene una densidad de corriente (I_d) de 6.5 ± 2 (pA/pF) a un potencial de +110 mV.

A medida que se establecían las condiciones experimentales para la expresión heteróloga del canal hSlo3 en las células CHO, en colaboración con el Dr. Edgar Garza López, caracterizamos la farmacología de la corriente de K⁺ endógena de las células CHO (*Véase Apéndice*). Nuestras observaciones fueron que la corriente de K⁺ endógena consta, al menos, de dos diferentes entidades moleculares: el componente mayor es sensible a toxinas de la familia α KTx1 (CbTX, IbTX y SloTX), pero resistente a Clofilium, mientras que el componente menor es resistente a estas toxinas. Además, describimos que la corriente endógena se incrementaba al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ (concentración que se utilizó para el registro de las corrientes del canal hSlo3). Con estas observaciones, concluimos que la conductancia de K⁺ principal en las células CHO es generada por los canales K⁺ Slo1 [73].

Por otro lado, como control, transfectamos a las células CHO solamente con la subunidad hLRRC52 para determinar si esta subunidad pudiera incrementar de manera importante a la corriente de K⁺ endógena. Como se puede observar en la [Figura 8](#), la corriente endógena aumentó cuatro veces con respecto a las células sin transfectar, con una $I_d = 24.5 \pm 5$ (pA/pF) a un potencial de +110 mV. Además, se observaron cambios en la cinética de activación de la corriente. Las corrientes de K⁺ de las células transfectadas con la subunidad γ 2 presentaron una activación más lenta comparada con la corriente de K⁺ endógena de las células CHO ([Figura 8A](#)).

De manera interesante, cuando coexpresamos al canal hSlo3 con la subunidad hLRRC52, se observó que la densidad de la corriente registrada en las células CHO fue de 94 ± 10 (pA/pF), lo que representa un aumento de ~10 y ~4 veces con respecto a la corriente de K⁺ endógena y a la corriente de K⁺ registrada en células CHO transfectadas solo con la subunidad γ 2, respectivamente. Además, como se puede ver en la [Figura 8A](#), la cinética de la corriente es similar a la reportada por Brenker y colaboradores (2014) [65], por lo que concluimos que el canal hSlo3 se logró expresar de manera exitosa en las células CHO y se distingue perfectamente de las corrientes de K⁺ endógenas.

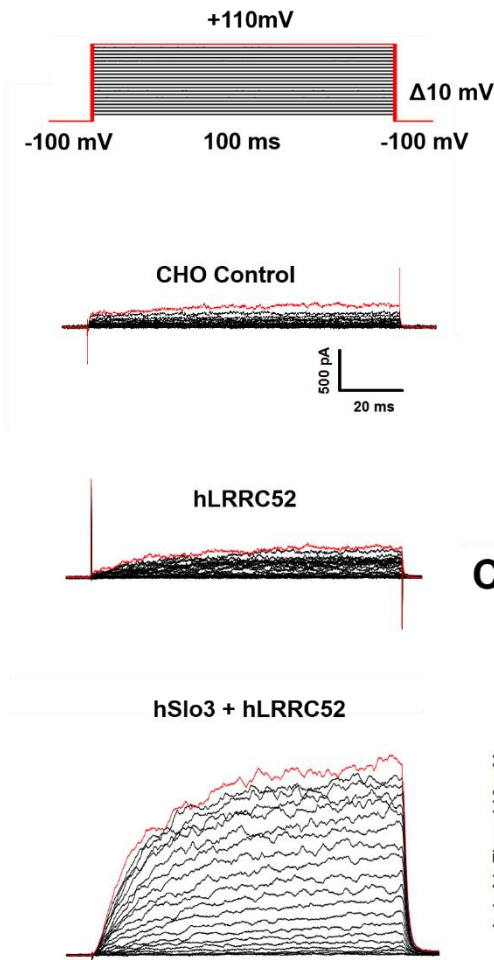
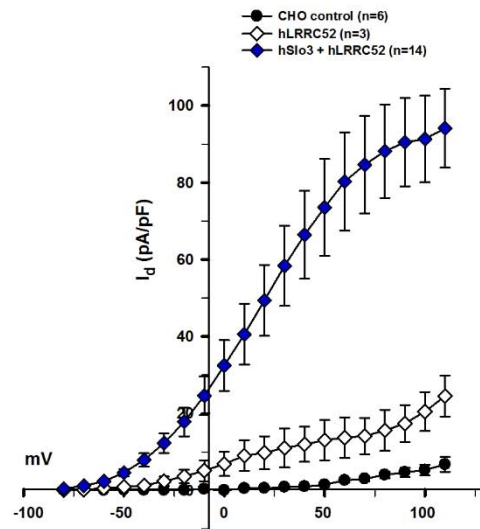
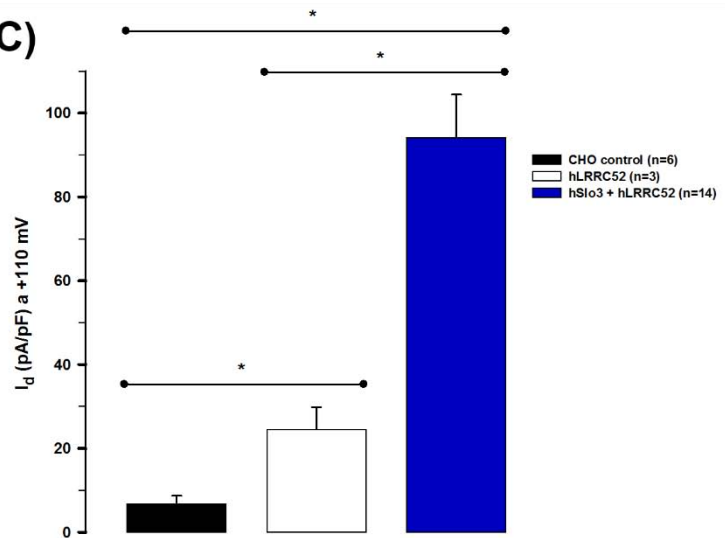
A)**B)****C)**

Figura 8. El canal hSlo3 se expresa exitosamente en las células CHO.

A) Representación gráfica del protocolo utilizado para registrar las corrientes de K^+ en las células CHO. Trazos representativos de las corrientes de K^+ endógenas de las células CHO (*panel superior*), transfectadas sólo con la subunidad hLRR52 (*panel medio*) o coexpresando al canal hSlo3 con la subunidad hLRR52 (*panel inferior*). **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A registradas en células sin transfectar (CHO Control, círculos negros), células transfectadas sólo con la subunidad hLRR52 (diamantes blancos) y células CHO cotransfectadas con las construcciones que codifican para el canal hSlo3 y hLRR52 (hSlo3 + hLRR52, diamantes azules). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar de la muestra. n : 3-14. * $p < 0.01$.

9.3.2. El canal hSlo3 expresado en células CHO es sensible a Ba²⁺

Uno de los bloqueadores de canales de K⁺ utilizados en este perfil farmacológico fue el ión divalente Ba²⁺. Debido a que tiene un radio iónico semejante al del ion K⁺, permite que este ión divalente pueda insertarse en el filtro de selectividad de estos canales y bloquear la conductancia de iones de K⁺ [74]. Anteriormente, Martínez-López y colaboradores (2009) demostraron por primera vez que Ba²⁺ bloquea al canal mSlo3 expresado heterológamente en ovocitos de *X. laevis* y a la corriente de K⁺ en los espermatozoides de ratón a una concentración de 1 mM [69]. Como se puede observar en la [Figura 9](#), el Ba²⁺ (1 mM), tiene un efecto de bloqueo cercano al 80% de la corriente hSlo3 expresada en células CHO. En la [Figura 9C](#), se observa que el bloqueo no es dependiente de voltaje.

9.3.3. El canal hSlo3 expresado heterológamente es insensible a Clofilium

Hasta el momento no existe un bloqueador específico para el canal Slo3. La caracterización farmacológica del canal Slo3 se ha realizado con bloqueadores generales de canales de K⁺ y algunas toxinas. Hasta el momento se considera que Clofilium es el bloqueador más específico para el canal mSlo3. Sin embargo, ni en los reportes de Leonetti y colaboradores (2012) ni de Brenker y colaboradores (2014) se estudió el efecto de este compuesto en las corrientes del canal hSlo3 expresado heterológamente [62], [65].

Como se puede observar en la [Figura 10](#), el canal hSlo3 es insensible a Clofilium a una concentración de 50 μM, concentración que se ha utilizado para inhibir a la corriente de K⁺ en espermatozoides de ratón [68]. Al comparar la I_{hSlo3} registrada a +110 mV en el trazo control contra el trazo en presencia de Clofilium ([Figura 10B](#)), observamos que no hay inhibición de la corriente (0.99 ± 0.01 y 1.25 ± 0.2 I/I_{ctrl}, respectivamente).

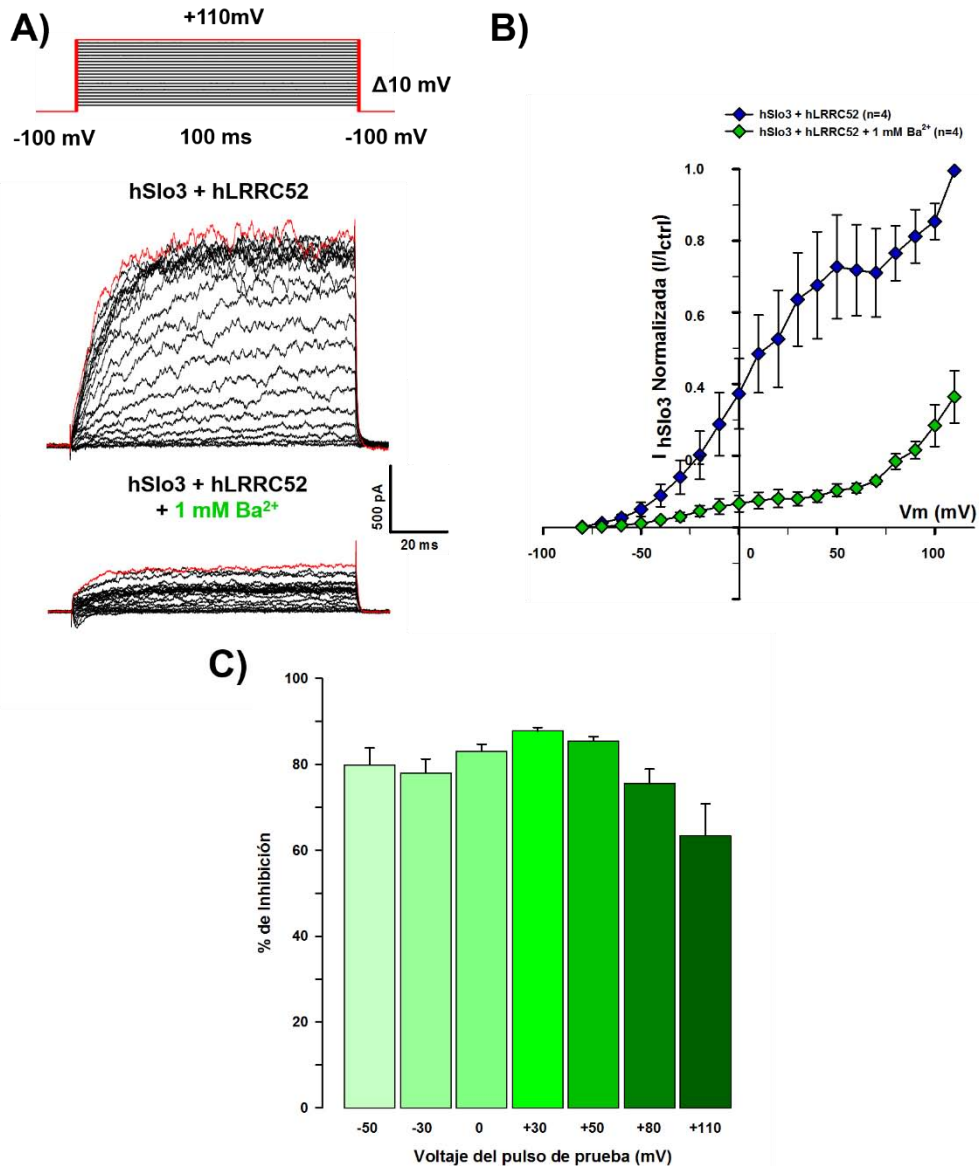


Figura 9. El canal hSlo3 se bloquea por Bario 1 mM con una ligera dependencia de voltaje.

A) Trazos representativos de la familia corriente codificada por el canal hSlo3 en ausencia y presencia de 1 mM de Ba²⁺. Los registros se realizaron con el protocolo que se muestra en la figura. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 en condiciones control (hSlo3 + hLRR52, diamantes azules) y en presencia de 1 mM de Ba²⁺ (diamantes verdes claro). **C)** La inhibición de la I_{hSlo3} por Ba²⁺ muestra una ligera dependencia de voltaje, con una disminución en el bloqueo de la corriente de K⁺ a valores más depolarizados. El porcentaje de inhibición fue de 80 ± 4, 78 ± 3, 83 ± 2, 88 ± 1, 85 ± 1, 75 ± 3 y 63 ± 7 % a potenciales de -50, -30, 0, +30, +50, +80 y +110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control ± el error estándar de la muestra.

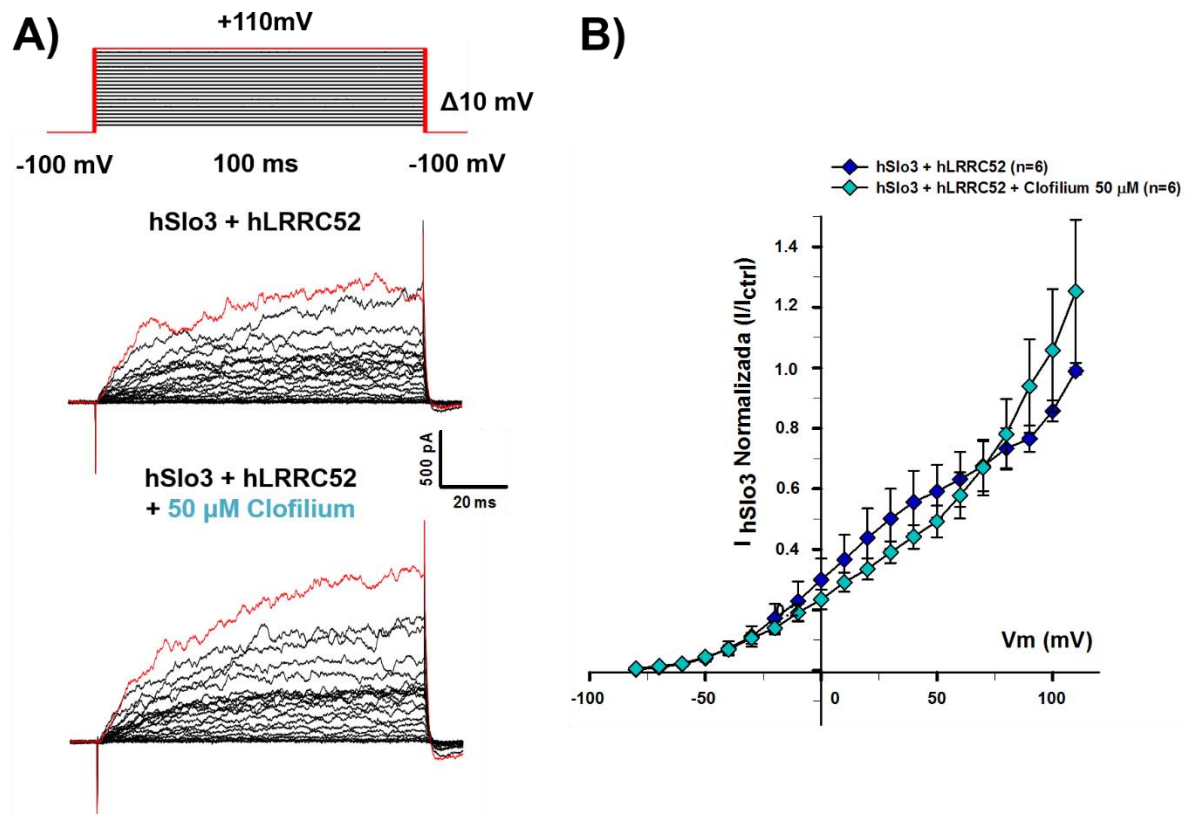


Figura 10. El canal hSlo3 expresado heterológamente es insensible a Clofilium.

A) Trazos representativos de la corriente originada por la expresión del canal hSlo3 en ausencia y presencia de 50 μM de Clofilium. El protocolo para la obtención de las corrientes de muestra *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en células transfectadas con el canal hSlo3 sin Clofilium (hSlo3 + hLRRC52, (diamantes azules) y en presencia de 50 μM de Clofilium (diamantes azul claro). Los símbolos representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra.

9.3.4. La Progesterona bloquea a la corriente del canal hSlo3

Debido a que el canal hSlo3 no se bloqueó por Clofilium, se recurrió a probar el efecto de la Pg en la corriente expresada heterológamente. Hasta el momento la progesterona es el único inhibidor que se ha reportado para el canal hSlo3 [65]. Brenker y colaboradores (2014) reportaron que la Pg inhibe la corriente del canal hSlo3 expresado heterológamente en células CHO con una IC_{50} de $17.5 \pm 2 \mu\text{M}$ [65]. Por esa razón, en el presente trabajo, utilizamos 30 μM de Pg como control positivo de inhibición. Como se puede observar en la **Figura 11** la hormona tiene un efecto de inhibición notorio en la corriente del canal hSlo3 expresado en células CHO. Al realizar un análisis del porcentaje de inhibición a distintos pulsos de prueba, lo que observamos fue que su efecto en la corriente no depende de voltaje (**Figura 11C**) ya que en todos los pulsos la inhibición de la corriente fue de $\sim 60\%$. Este porcentaje de inhibición coincide con lo reportado por Brenker y colaboradores (2014) [65].

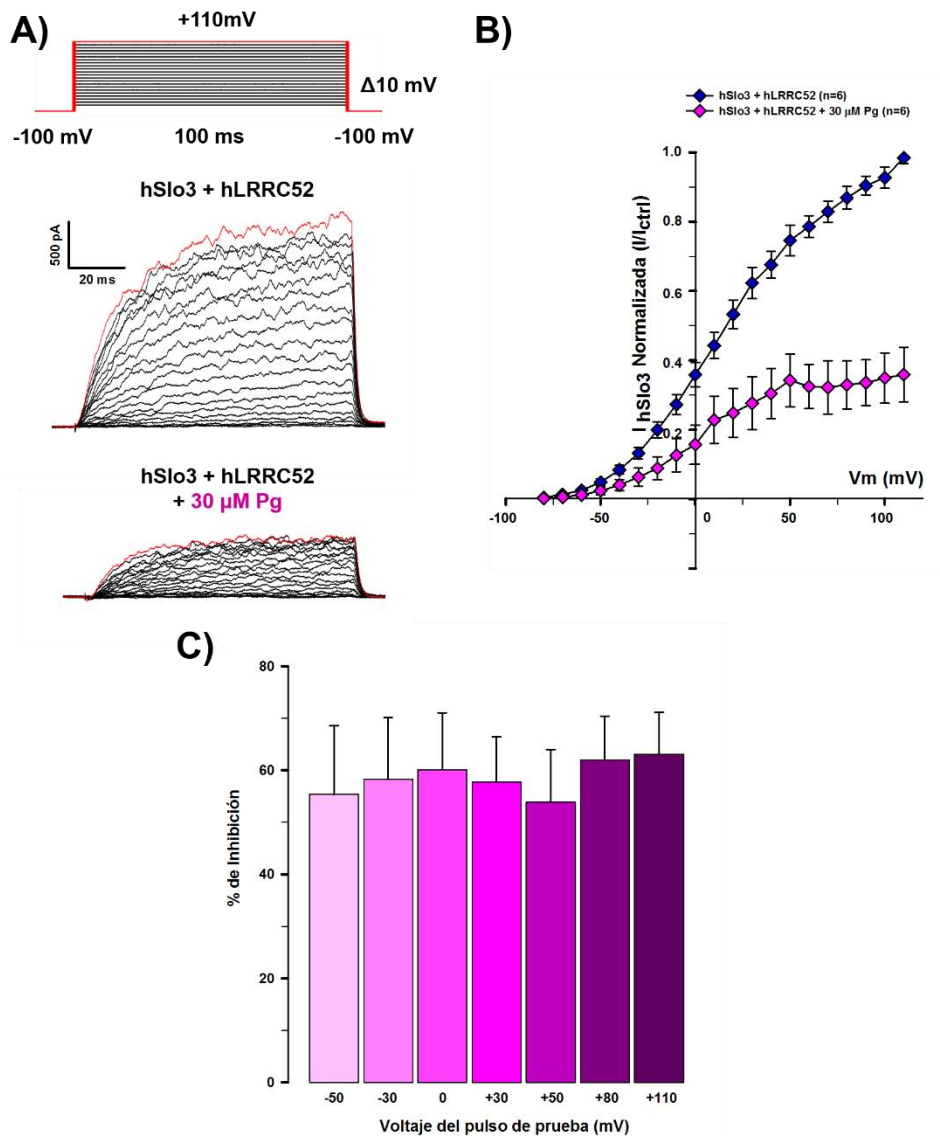


Figura 11. Progesterona inhibe a la corriente del canal hSlo3 de manera voltaje independiente

A) Trazos representativos de la corriente generada por el canal hSlo3 en ausencia y presencia de 30 μM de Progesterona. Las corrientes se obtuvieron al aplicar el protocolo de registro que se muestra *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A de las células transfectadas con el canal hSlo3 control (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y en presencia de 30 μM de Pg (diamantes rosa mexicano). **C)** La inhibición de la I_{hSlo3} por Pg es independiente de voltaje en un rango de voltaje de -50 a +100 mV. El porcentaje de inhibición fue de 55 ± 13, 58 ± 12, 60 ± 11, 58 ± 9, 54 ± 10, 62 ± 8 y 63 ± 8 % a potenciales de -50, -30, 0, +30, +50, +80 y +110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control ± el error estándar de la muestra.

9.3.5. Quinidina bloquea al canal hSlo3 independientemente del voltaje

Otro de los bloqueadores utilizados para la caracterización del canal mSlo3 es la Quinidina. Estudios anteriores demuestran que la ésta tiene un efecto en diferentes canales de K⁺ dependientes de voltaje [75]-[77]. Por antecedentes, se sabe que el canal mSlo3 expresado heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*, se inhibe por este bloqueador ~70% a una concentración de 100 μM [54]. Es por eso que en este trabajo utilizamos dicha concentración para determinar el efecto de este compuesto en la corriente de hSlo3 expresada en células CHO.

Como se puede observar en la [Figura 12](#), la Quinidina inhibe fuertemente la corriente del canal hSlo3 expresado heterológamente en células CHO. Anteriormente, se había demostrado que la Quinidina bloquea canales K⁺ de manera voltaje dependiente, con un bloqueo más débil a potenciales mayores a +100 mV [54], [75]. En la [Figura 12C](#) se muestra que el bloqueo canal hSlo3 por este compuesto se mantiene en ~90% en el rango de pulsos de voltaje de -80 - +110 mV.

9.3.6. TEA⁺ no bloquea al canal hSlo3

En 2009, Martínez-López y colaboradores demostraron que el canal mSlo3 expresado heterológamente en ovocitos de *X. laevis* es parcialmente sensible a TEA⁺ (60 mM), bloquea a la corriente de K⁺ ~35% [69]. Como se puede observar en la [Figura 13](#), a diferencia del canal mSlo3, el canal hSlo3 expresado en células CHO es insensible a TEA⁺ 60 mM.

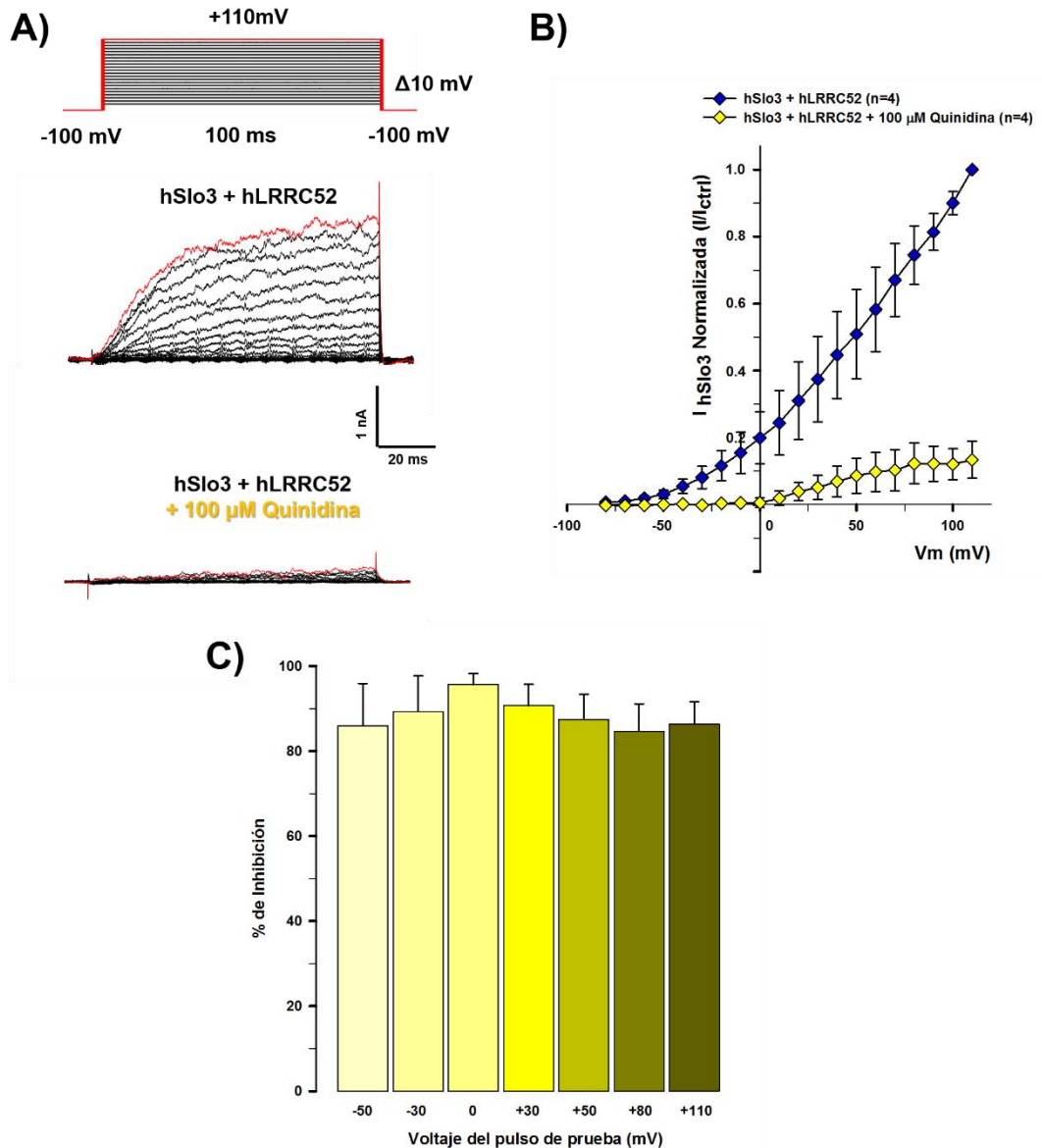


Figura 12. Quinidina es un bloqueador potente de la corriente hSlo3 expresada heterológamente, con una inhibición independiente de voltaje

A) Trazos representativos de la corriente emitida por el canal hSlo3 en ausencia y presencia de 100 μ M de Quinidina obtenidos con el protocolo que se muestra *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 control en ausencia (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y presencia de 100 μ M de Quinidina (diamantes amarillos). **C)** La inhibición de la I_{hSlo3} por Quinidina es independiente de voltaje en todo el rango probado. El porcentaje de inhibición fue de 86 ± 10 , 90 ± 8 , 95.5 ± 2.5 , 90.5 ± 5 , 87 ± 6 , 85 ± 6.5 y 86 ± 5 % a potenciales de -50, -30, 0, +30, +50, +80 y +110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra. $p < 0.05$.

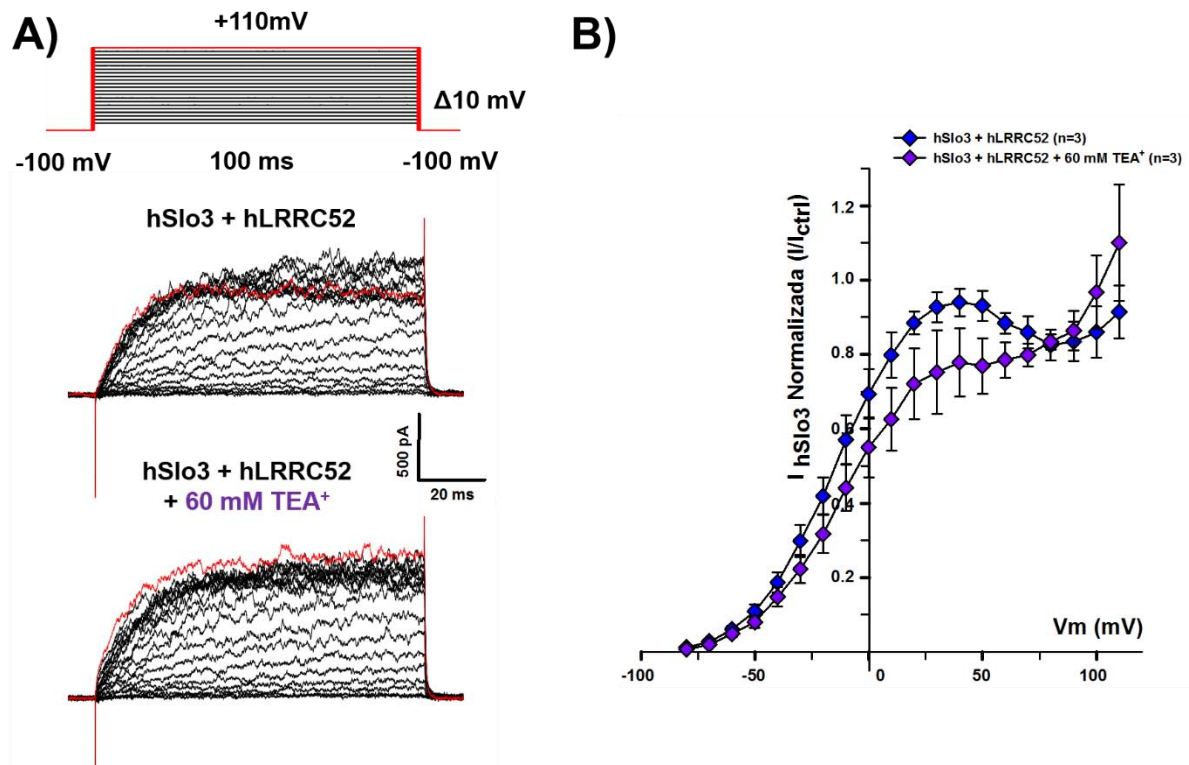


Figura 13 El canal hSlo3 es insensible a TEA⁺

A) Trazos representativos de las familias de corriente registradas en células CHO transfectadas con hSlo3 en ausencia y presencia de 60 mM de TEA⁺. El protocolo de registro se muestra *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en células transfectadas con el canal hSlo3 en ausencia (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y en presencia de 60 mM de TEA⁺ (diamantes morados). Los símbolos representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra.

9.3.7. Toxinas de la familia α KTX1 y Penitrem A inhiben parcialmente la corriente hSlo3 expresada en células CHO

Debido a la ausencia del perfil farmacológico para el canal hSlo3, consideramos interesante probar el efecto de toxinas que, hasta el momento, han demostrado ser más específicas para el canal Slo1 y que no tienen efecto en el canal mSlo3. Nuestro estudio farmacológico incluye a las toxinas de alacrán de la familia α KTX1: IbTX, CbTX y SloTX, y la toxina micótica Penitrem A. El estudio del efecto de estas toxinas en la corriente hSlo3 expresada en células CHO, ayudará a abordar la actual contradicción sobre cuál (o cuáles) es (o son) el (o los) canal(es) de K⁺ responsable(s) de la conductancia de K⁺ en espermatozoide de humano.

9.3.7.1. La corriente de K⁺ en las células CHO transfectadas con el canal hSlo3 es parcialmente sensible a IbTX

Diversos reportes sugieren que la Iberiotoxina es una toxina de alacrán específica para el canal Slo1 [54], [78] con una IC₅₀ de 250 pM [79]. Recientemente, Mannowetz y colaboradores (2013) reportaron que la conductancia de K⁺ del espermatozoide humano eyaculado se inhibe ~80% por IbTX a una concentración de 100 nM, y propusieron que esta corriente está codificada por canal hSlo1 [70]. De manera interesante, la adición de 100 nM de IbTX inhibió a la corriente hSlo3 expresada en células CHO entre un 43 ± 11% y un 22 ± 10 %, en un intervalo de voltaje entre -50 mV y +110 mV, respectivamente (Figura 14). Esta tendencia en el bloqueo de la corriente de hSlo3 por IbTX sugiere una inhibición dependiente de voltaje (Figura 14C).

9.3.7.2. A diferencia de la IbTX, la CbTX inhibe parcialmente al canal hSlo3 independientemente del voltaje

La CbTX es una toxina con alta afinidad para los canales Slo1 [54] con una constante de disociación de 3.5 nM [80]. Sin embargo se sabe que esta toxina también es capaz de inhibir a otros canales de K⁺ tipo *Shaker* a concentraciones en el orden nM [81], [82]. Como se puede observar en la Figura 15, la adición de 100 nM de CbTX en el medio extracelular induce una inhibición de ~35% de la corriente de hSlo3 expresado en células CHO. De manera consistente a estudios anteriores en otros canales de K⁺ dependientes de voltaje [54], [73], la CbTX no tiene un bloqueo dependiente de voltaje en este canal a pesar de la homología con la IbTX (Figura 15C).

9.3.7.3. La SloTX tiene un efecto inhibitorio parcial en la corriente de K⁺ registrada en células CHO transfectadas con hSlo3

Por antecedentes sabemos que la SloTX inhibe de manera específica al canal Slo1 en el orden nM; el canal Slo1 se inhibe ~90% a una concentración de 100 nM [56]. Al probar el efecto de esta toxina sobre la corriente de K⁺ registrada en células CHO transfectadas con hSlo3, lo que observamos fue un efecto inhibitorio parcial.

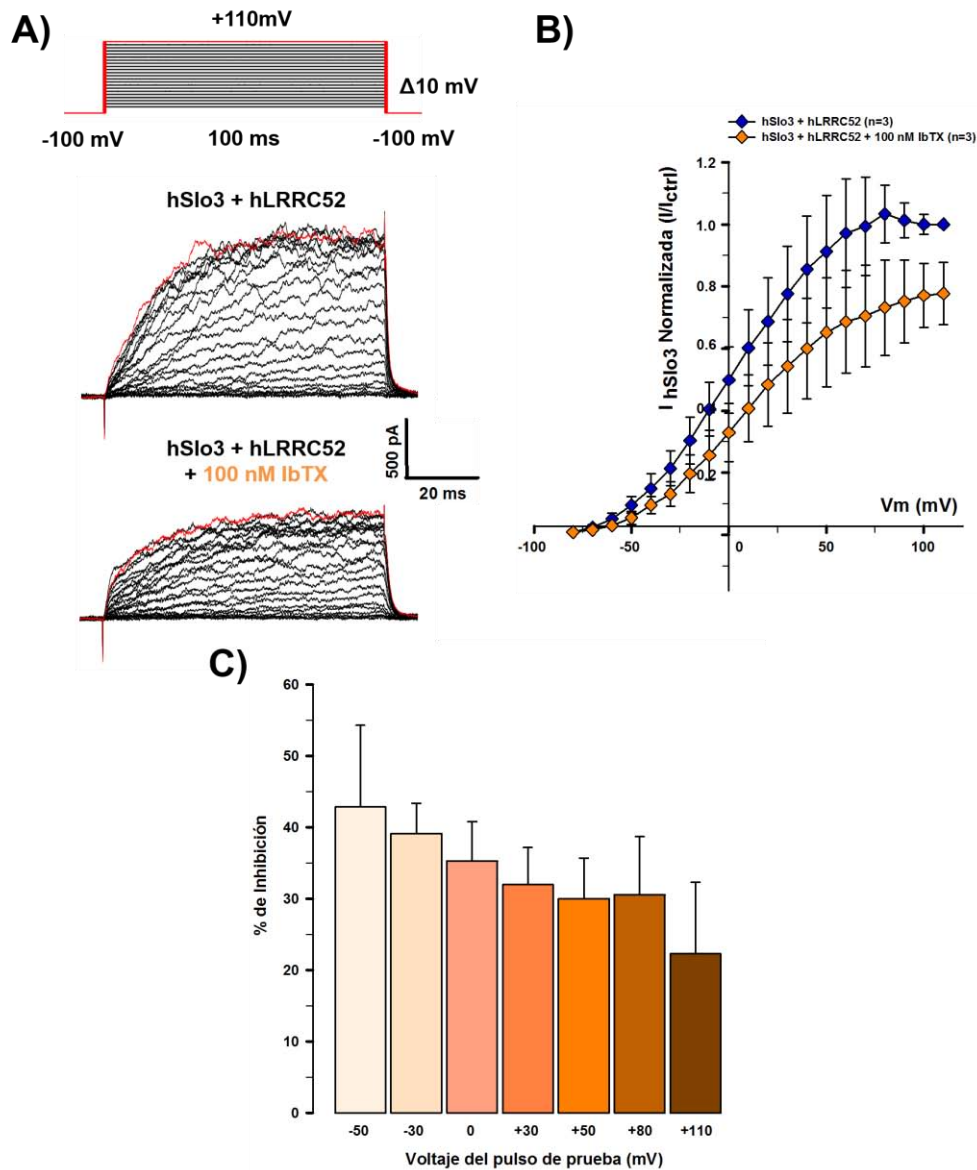


Figura 14. IbTX inhibe la corriente del canal hSlo3 mayoritariamente a pulsos de voltaje negativos

A) Trazos representativos de la corriente producida por el canal hSlo3 en ausencia y presencia de 100 nM de IbTX registrados con el protocolo mostrado *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 control en ausencia (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y presencia de 100 nM de IbTX (diamantes anaranjados). **C)** Dependencia de voltaje de la inhibición de la I_{hSlo3} por IbTX. El porcentaje de inhibición fue de 43 ± 11.5 , 39 ± 4 , 35 ± 5.5 , 32 ± 5 , 30 ± 5.5 , 30.5 ± 8 y 22 ± 10 % a potenciales de -50, -30, 0, +30, +50, +80 y +110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra.

Como se puede ver en la [Figura 16](#), después de 3 minutos de incubación, la SloTX tiene un efecto inhibitorio de ~30% en la corriente registrada. Nuestros resultados no muestran una dependencia de voltaje en esta inhibición, tal como se ha sugerido en otros estudios [56], [73].

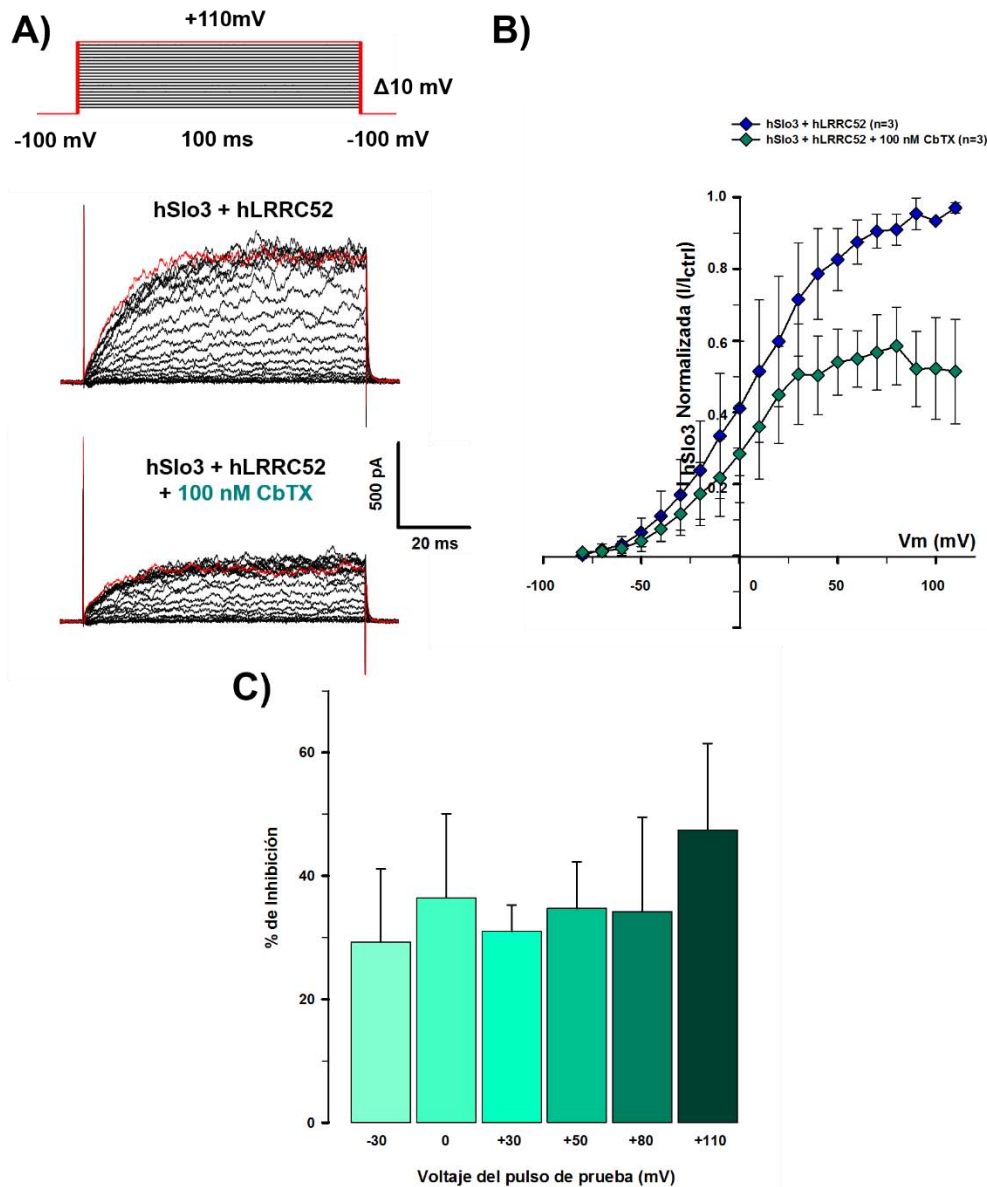


Figura 15. La CbTX inhibe parcialmente al canal hSlo3 independientemente del voltaje aplicado

A) Trazos representativos de la corriente generada por el canal hSlo3 en ausencia y presencia de 100 nM de CbTX. Los registros se realizaron a un potencial de mantenimiento de -100 mV y pulsos que van de -80 mV a +110 mV con incrementos de 10 mV. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 control en ausencia (hSlo3 + hLRR52, diamantes azules) y presencia de 100 nM de CbTX (diamantes azul turquesa). **C)** El porcentaje de inhibición de la I_{hSlo3} por CbTX es el mismo en todo el rango de voltaje. El porcentaje de inhibición fue de 30 ± 11 , 36 ± 13 , 31 ± 4 , 35 ± 7 , 34 ± 15 y 47 ± 14 % a potenciales de -30, 0, +30, +50, +80 y +110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra.

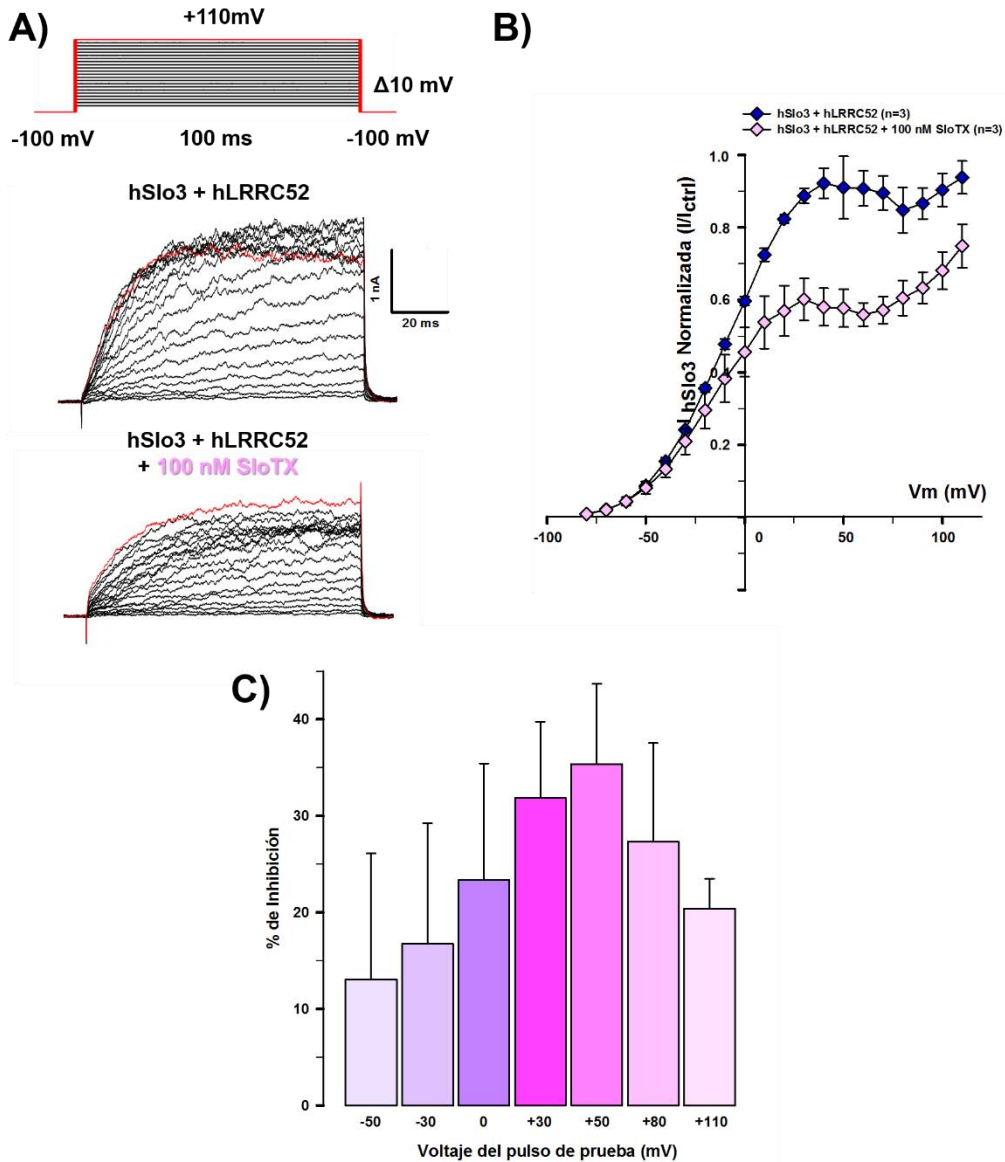


Figura 16. SloTX inhibe la corriente del canal hSlo3 independientemente a los pulsos de voltaje aplicados

A) Trazos representativos de la familia de corrientes registradas del canal hSlo3 en ausencia y presencia de 100 nM de SloTX. Los registros se realizaron a un potencial de mantenimiento de -100 mV y pulsos que van de -80 mV a +110 mV con incrementos de 10 mV. **B)** Curva I-V obtenida de la familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 control en ausencia (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y presencia de 100 nM de SloTX (diamantes rosa claro). **C)** Porcentaje de inhibición de la I_{hSlo3} por SloTX a diferentes voltajes. El porcentaje de inhibición fue de 13 ± 13 , 16 ± 12 , 23 ± 12 , 32 ± 8 , 35 ± 8 , 27 ± 10 y 20 ± 3 % a potenciales de -50, -30, 0, 30, 50, 80 y 110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra.

9.3.7.4. La micotoxina Penitrem A afecta la corriente hSlo3 expresada en células CHO

Penitrem A es una micotoxina producida por hongos del género *Penicillium*, *Aspergillus* y *Claviceps* y es considerada como uno de los inhibidores no peptídicos más específica para los canales de K^+ Slo1[83]. Debido a que este compuesto bloquea 100% al canal Slo1 a una concentración de 10 nM, desde entonces se ha utilizado esta toxina para la caracterización de este canal [45], [57], [83]. En nuestro estudio observamos que Penitrem A (100 nM) inhibe de manera voltaje independiente al ~50% de la corriente hSlo3 expresada heterológamente en células CHO (Figura 17). De los bloqueadores de canales Slo1 probados en la corriente hSlo3, Penitrem A y CbTX tienen el mayor efecto de bloqueo a +110 mV (Figuras 15 y 17).

9.4. El perfil farmacológico de la hiperpolarización asociada a la capacitación de espermatozoides de humano correlaciona con el perfil farmacológico de hSlo3

Durante su tesis de Maestría, la M. en C. Paulina Torres-Rodríguez demostró, por citometría de flujo, que una subpoblación de espermatozoides de humano se hiperpolarizan después de la capacitación [42]. Nuestra hipótesis fue que al igual que en ratón, la hiperpolarización asociada a la capacitación (HAC) ocurre gracias a la participación del canal hSlo3. Por esta razón, en colaboración con ella, realizamos el perfil farmacológico de la HAC en el espermatozoide de humano. En la Figura 18, se muestra que una subpoblación de espermatozoides de humano capacitados presenta un aumento en la fluorescencia del indicador de potencial de membrana DiSC₃(5). Este cambio en la fluorescencia se interpreta como la hiperpolarización de la membrana plasmática ($68 \pm 17.5\%$ de células hiperpolarizadas).

La hiperpolarización de la membrana plasmática es resultado del cambio en la permeabilidad electrogénica de iones que corren al $E_{m_{rep}}$ hacia el potencial de equilibrio de K^+ (E_K ; cerca de -90 mV) [29]. Si las concentraciones de K^+ intra y extracelulares se igualan o asemejan, el corrimiento hacia el E_K no ocurre debido a que la permeabilidad de este ión por los canales de K^+ disminuye. Para caracterizar si la hiperpolarización del espermatozoide de humano se debía a la participación de canales de K^+ , se incubaron a los espermatozoides en presencia de una concentración extracelular alta de K^+ (60 mM).

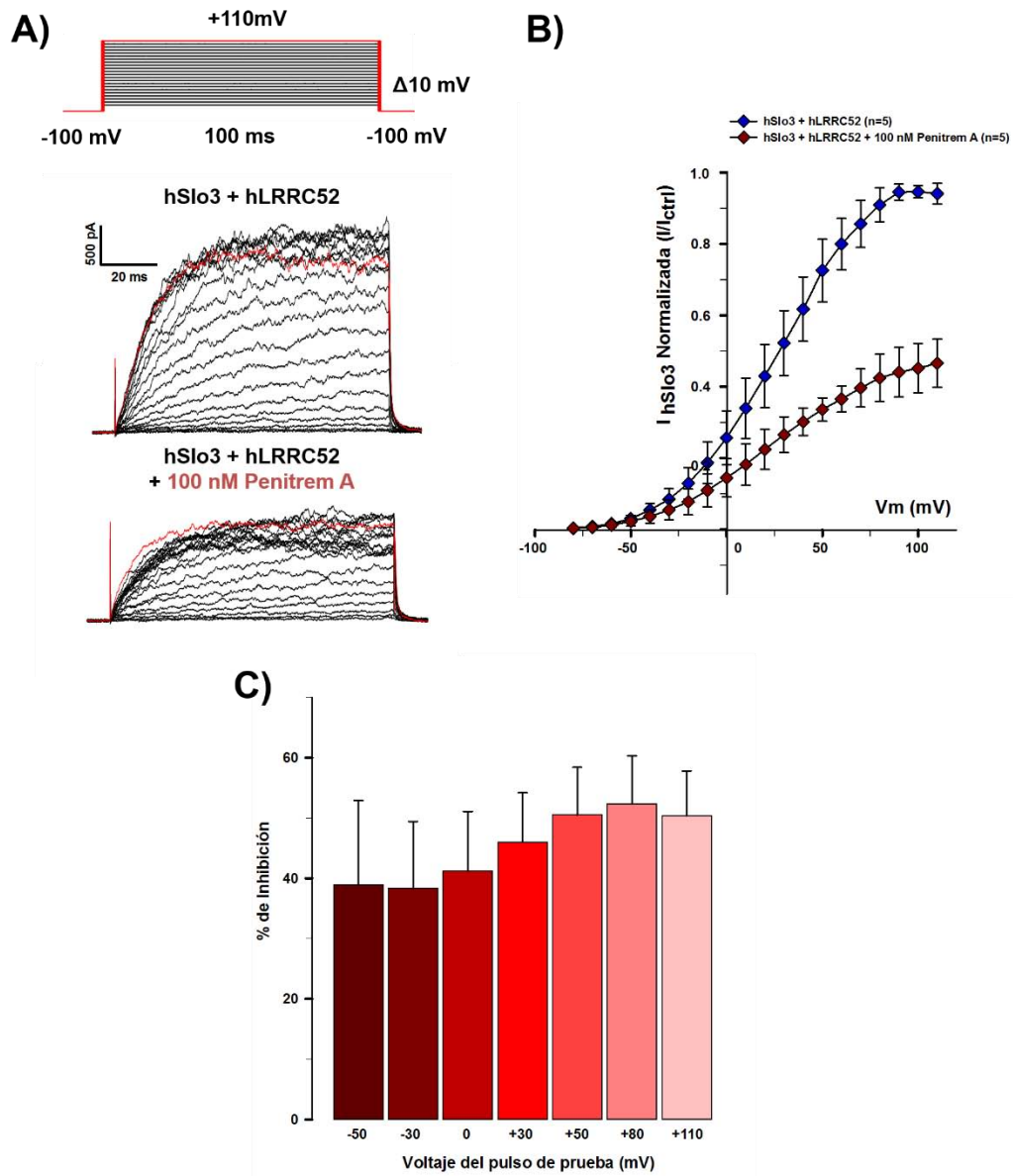


Figura 17. Penitrem A inhibe parcialmente la corriente del canal hSlo3

A) Trazos representativos de las familias de corriente hSlo3 registrada en células CHO transfectadas con este canal en ausencia y presencia de 100 nM de Penitrem A. El protocolo de registro se observa *arriba*. **B)** Curva I-V obtenida de las familia de corrientes mostradas en el panel A en las células transfectadas con el canal hSlo3 control en ausencia (hSlo3 + hLRRC52, diamantes azules) y presencia de 100 nM de Penitrem A (diamantes rojos carmín). **C)** Porcentaje de inhibición de la I_{hSlo3} por Penitrem A a diferentes voltajes. El porcentaje de inhibición fue de 39 ± 14 , 38 ± 11 , 41 ± 10 , 46 ± 8 , 50.5 ± 8 , 52 ± 8 y 50 ± 7 % a potenciales de -50, -30, 0, 30, 50, 80 y 110 mV, respectivamente. En todos los casos, los símbolos y las barras representan el promedio normalizado con respecto al valor máximo de las corrientes control \pm el error estándar de la muestra. $p < 0.05$.

Como se puede observar en la **Figura 18**, la HAC se inhibe en presencia de una alta concentración de K^+ externo ($88 \pm 11\%$), lo que sugiere que este proceso depende en la permeabilidad de iones K^+ e implica la participación de canales de K^+ .

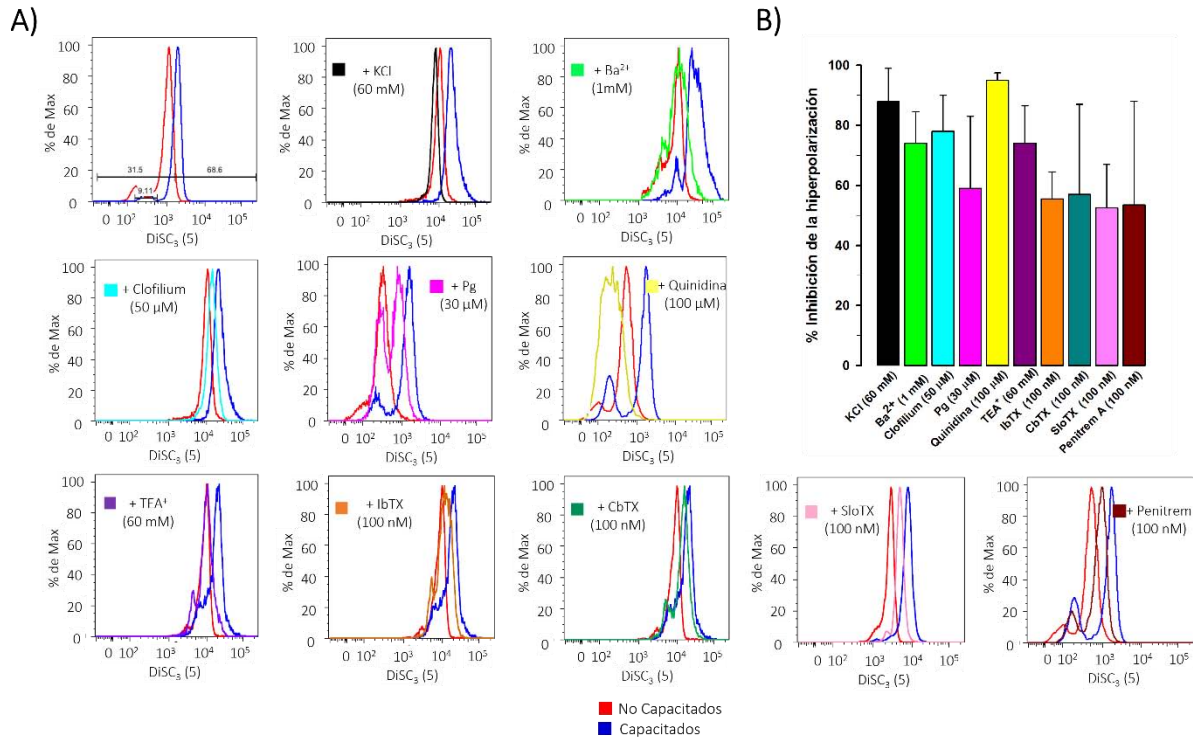


Figura 18. La hiperpolarización asociada a la capacitación es inhibida por diferentes bloqueadores de K^+

A) Histogramas representativos del número de células normalizado (% de Max) vs la fluorescencia de DiSC₃(5) de espermatozoides no capacitados (rojo) y capacitados (azul) en la condición control donde se observa que una subpoblación de células capacitadas (68%) se hiperpolarizan. La hiperpolarización asociada a la capacitación fue sensible a diferentes bloqueadores y toxinas: KCl 60 mM (negro), Ba²⁺ 1 mM (verde claro), Clofilium, 50 μM (azul agua), Progesterona 30 μM (rosa mexicano), Quinidina 100 μM (amarillo), TEA⁺ 60 mM (morado), IbTX 100 nM (anaranjado), CbTX 100 nM (azul turquesa), SloTX 100 nM (rosa claro) y Penitrem A 100 nM (rojo carmín). Un corrimiento de la fluorescencia a la derecha en presencia del inhibidor indica la inhibición de la hiperpolarización. Los porcentajes de inhibición se presentan en **B**. Las barras representan el promedio ± desviación estándar. n≥3.

Una vez observada esta reducción en el porcentaje de espermatozoides hiperpolarizados, se incubó a las células en presencia de los inhibidores, bloqueadores y toxinas probadas en la corriente de K^+ del canal Slo3 expresado en células CHO para determinar su contribución en este parámetro importante de la capacitación. La HAC, al igual que la corriente hSlo3 expresada heterológicamente, se inhibió por Ba²⁺ (1 mM), Pg (30 μM) y Quinidina (100 μM) (74 ± 10.5 , 59 ± 24 y $95 \pm 2.5\%$, respectivamente). A diferencia de la corriente hSlo3, resistente a Clofilium (50 μM) y a TEA⁺ (60 mM),

estos bloqueadores sí inhibieron a la HAC del espermatozoide de humano (78 ± 12 y 74 ± 12.5 % de inhibición, respectivamente). Por otra parte, las toxinas de la familia α KTX, IbTX, CbTX y SloTX y la micotoxina Penitrem A inhibieron la hiperpolarización un 55 ± 9 , 57 ± 30 , 52 ± 14.5 , y $53.5 \pm 34.5\%$, respectivamente (**Figura 18**). Como control negativo de inhibición de la HAC, se probó la Tetrodotoxina (TTX), toxina que tiene como blanco a canales de Na^{2+} . De acuerdo a lo esperado, la TTX no tuvo ningún efecto en el potencial de membrana de los espermatozoides de humano (Véase *apéndice*; López-González *et al.* 2014), descartando algún efecto de adición y la participación de canales de Na^{2+} . Los resultados del perfil farmacológico de la HAC en espermatozoide de humano, correlacionan fuertemente con lo observado en el perfil farmacológico del canal hSlo3 expresado en células CHO (**Tabla 2**). La correlación sugiere que este canal participa activamente durante este proceso. Sin embargo la inhibición de la hiperpolarización por Clofilium ($50 \mu\text{M}$) y TEA^+ (60mM), sugiere la participación de otros canales, ya que el canal hSlo3, expresado heterológamente, es insensible a estos compuestos.

10. DISCUSIÓN

La caracterización de las propiedades biofísicas del canal de K^+ hSlo3 es fundamental para comprender el papel del mismo en la fisiología del espermatozoide de humano. El estudiarlo en un sistema heterólogo tiene ventajas sobre hacerlo en la célula nativa ya que el espermatozoide es una célula con muy poco citoplasma y, además, presenta una membrana plasmática muy rígida que interactúa estrechamente con estructuras intracelulares. Estas características impiden la obtención de Gigasellos, un prerequisite para poder registrar canales por *patch clamp* en cualquier modelo celular [84]. El contar con un sistema de expresión heteróloga para este tipo de canal iónico facilita la caracterización de las propiedades biofísicas intrínsecas al complejo funcional formado por la subunidad α , formadora del poro del canal hSlo3, y la subunidad auxiliar LRRC52 o $\gamma 2$. De igual forma, permite realizar estudios farmacológicos más fácilmente.

Sin bien la obtención de Gigasellos en las células CHO con la técnica de *patch-clamp* facilita el estudio de canales expresados heterológamente, estudios anteriores demostraron que las células CHO tienen un canal de K^+ de manera endógena [72]. Por este antecedente, fue necesario caracterizar a las corrientes de K^+ registradas en células sin transfectar y determinar si podíamos distinguirlas de las registradas al coexpresar al canal hSlo3 con la subunidad hLRRC52. Como se muestra en la [Figura 8](#), las corrientes endógenas obtenidas con nuestras condiciones de registro son ~10 veces más pequeñas en comparación con las registradas al expresar al canal hSlo3. Además, la farmacología y dependencia $[Ca^{2+}]_i$ de las corrientes endógenas sugieren que éstas están codificadas por el canal Slo1 (datos no mostrados. *Ver apéndice*). Estos resultados indican que logramos expresar exitosamente al canal hSlo3 en células CHO y podemos distinguir a las corrientes de K^+ heterólogas de las endógenas.

Hasta el momento, no existía un perfil farmacológico para el canal hSlo3 para poder evaluar la posible participación de este canal en la fisiología del espermatozoide. El único inhibidor reportado hasta el momento para el canal hSlo3 era la Progesterona [65]. Por esta razón, se realizó la caracterización farmacológica del canal hSlo3 basada en lo anteriormente reportado para su ortólogo en ratón, el canal mSlo3 [54], [68], [69] y se comparó con lo observado en el canal hSlo3 expresado en células CHO.

10.1. Diferencias y similitudes en el perfil farmacológico de los canales Slo3 de humano (hSlo3) y ratón (mSlo3)

Entre las similitudes del perfil farmacológico del canal mSlo3 y hSlo3 se encuentran que ambos canales se bloquean por Ba^{2+} (1 mM) y Quinidina (100 μ M). Anteriormente Martínez-López y colaboradores (2009) reportaron que el canal mSlo3 expresado en ovocitos de *X. laevis* y la corriente de K^+ registrada en los espermatozoides de ratón epididimales se bloquean por Ba^{2+} (1 mM) ~80% [69]. Al igual que en el reporte mencionado, nosotros demostramos que el canal hSlo3 expresado heterológicamente en células CHO se bloquea por Ba^{2+} (1 mM) en ~65%, consistente con la idea de que Ba^{2+} es un bloqueador de canales de K^+ por excelencia [74]. Con respecto a Quinidina (100 μ M), este inhibidor redujo $\geq 80\%$ a la corriente de hSlo3 expresada heterológicamente, consistente con el efecto descrito de este compuesto sobre el canal mSlo3 [40, 55]. Hasta este punto, el canal hSlo3 y mSlo3 comparten una alta sensibilidad a Ba^{2+} (1 mM) y Quinidina (100 μ M).

Hasta el momento el único inhibidor que se había probado directamente en el canal hSlo3 era la progesterona. Brenker y colaboradores (2014) demostraron que la corriente del canal hSlo3, expresada heterológicamente en células CHO, se inhibe fuertemente por 30 μ M de Pg [65]. Como se puede observar en la [Figura 11](#), utilizamos a la progesterona como un control positivo y obtuvimos resultados similares a los reportados previamente: la corriente hSlo3 fue muy sensible en presencia de Pg (30 μ M), observándose una reducción del ~60% de la amplitud de la corriente de K^+ .

Por otro lado, la primera diferencia farmacológica importante entre los canales hSlo3 y mSlo3 se observó al usar Clofilium. Por antecedentes Navarro y colaboradores (2007) demostraron que Clofilium (50 μ M) inhibe a la corriente de K^+ de espermatozoides de ratón 92% de manera irreversible, posiblemente codificada por mSlo3 [68]. Sin embargo, en la bibliografía consultada al momento de realizar este estudio, no hay un reporte donde se utilice este bloqueador en la corriente mSlo3 expresada heterológicamente. De manera interesante, como se puede observar en la [Figura 10](#), el canal hSlo3 expresado heterológicamente es insensible a este inhibidor a la concentración arriba mencionada. Debido a que no se sabe con precisión el sitio de unión de Clofilium al canal mSlo3, estudios posteriores donde se realicen quimeras entre mSlo3 y hSlo3 podrían ayudar a comprender cuál es el dominio o sitio de unión entre Clofilium el canal de ratón.

Otra de las diferencias entre la farmacología de los canales Slo3, es que el canal hSlo3 expresado en células CHO es insensible a TEA^+ . Estudios anteriores demuestran que el TEA^+ es un bloqueador de

canales de K^+ , incluyendo al canal mSlo3 [54], [69], [85], [86], [87]. Nuestros datos indican que el canal hSlo3 no se bloquea por TEA^+ 60 mM, concentración que bloquea al canal mSlo3 en un ~35% [77]. Una posible explicación a esta diferencia farmacológica, es que el canal hSlo3 tiene una treonina (T) en lugar de una metionina (M) en la posición 274 (T274), cerca del filtro de selectividad del canal, en comparación con los canales mSlo3 y hSlo1 (Figura 19). Por antecedentes sabemos que en el canal de K^+ Kcv la sustitución de la Leucina 70, tres aminoácidos después del filtro de selectividad del canal, por Alanina o Tirosina disminuyó mil veces el bloqueo de este canal por TEA^+ [88], [86], [90]. Esto indica que los residuos de aminoácidos cercanos al filtro de selectividad en los canales de K^+ tienen gran importancia en la sensibilidad a este compuesto. De esta forma, y a manera de especulación, es posible que la presencia de la T274 en la cercanía al filtro de selectividad del canal hSlo3 sea la responsable de la resistencia de este canal al bloqueo por TEA^+ . Para confirmar esta hipótesis se podrían hacer estudios con mutaciones puntuales en este aminoácido (T274) del canal hSlo3 y evaluar si este canal adquiere una mayor sensibilidad a TEA^+ .

Con respecto a las toxinas de la familia $\alpha KTX1$ y a la micotoxina Penitrem A, este estudio demuestra por primera vez que estas toxinas, que anteriormente se habían propuesto como específicas para el canal Slo1 y sin efecto sobre el canal mSlo3 [56], [83], [89], [90], inhiben parcialmente a la corriente hSlo3 expresada en células CHO, apoyando la idea propuesta que sugiere que los canales ortólogos presentan características propias de cada especie (farmacología, función en la reproducción, etc.) [89] [90], [91].

Un ejemplo de este caso es el canal de Ca^{2+} CatSper que en ratón es insensible a Pg [89], mientras que en humano este canal se activa por esta hormona [91]. No sería sorprendente que en el caso del canal Slo3, al ser una proteína fundamental para que ocurra la fecundación [23, 44], ocurra un fenómeno similar y presente una farmacología diferente entre las especies.

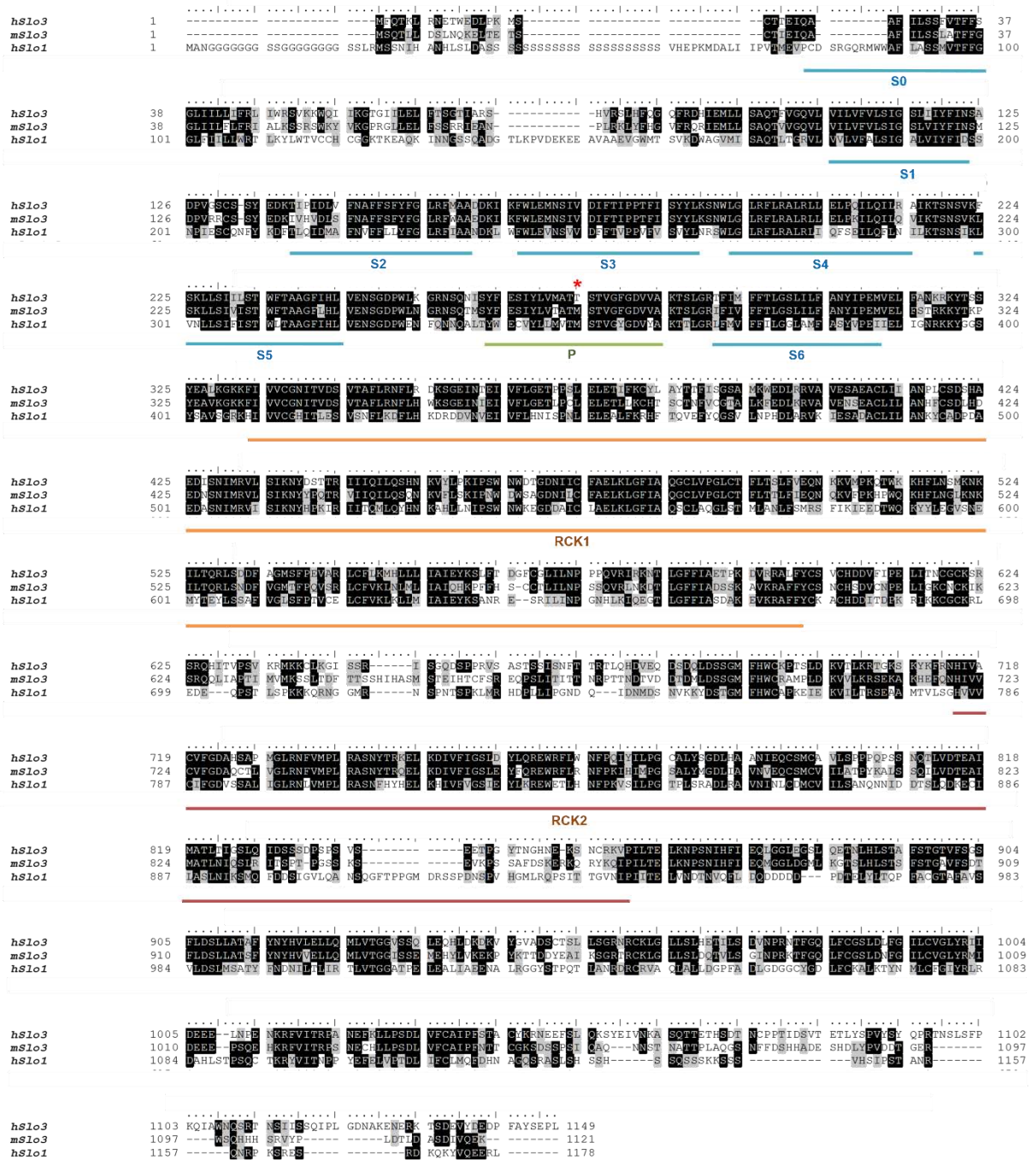


Figura 19 Alineamiento entre los canales hSlo3, mSlo3 y hSlo1
 En la figura se pueden observar los aminoácidos idénticos entre los canales (sombreados en negro), los residuos de aminoácidos que tienen las mismas propiedades pero que son diferentes (sombreados en gris) y los distintos (letras negras sin sombreado). Además se resaltan las secuencias que forman parte de los segmentos transmembranales (S0-S6) y el poro del canal (P). También se muestran los dominios reguladores de la conductancia de K⁺ (RCK1 y RCK2 por sus siglas en inglés). El asterisco en rojo sobresalta a la Treonina 274 (T274), aminoácido que podría tener un papel importante en la insensibilidad por TEA⁺ del canal hSlo3.

10.2. El canal de K⁺ hSlo3 y la hiperpolarización asociada a la capacitación en el espermatozoide de humano

Estudios recientes han desatado una controversia sobre cuál es la principal entidad molecular responsable de la conductancia de K⁺ en el espermatozoide de humano [42], [64], [65], [70], [89]. En nuestro laboratorio demostramos que el canal hSlo3 está presente en el espermatozoide de humano y se propuso que su participación en la fisiología del espermatozoide es parecida a la de su ortólogo en ratón: contribuir en la hiperpolarización asociada a la capacitación [31]. Debido a que la HAC es necesaria y fundamental para que ocurra la reacción acrosomal [30], fue importante realizar un perfil farmacológico de la hiperpolarización en el espermatozoide de humano para poder determinar las entidades moleculares que participan durante este proceso.

La farmacología de la HAC tiene una alta correlación al perfil farmacológico de la corriente del canal hSlo3 expresada heterológamente, sugiriendo que el canal hSlo3 participa fuertemente durante este proceso. Sin embargo, la inhibición de la hiperpolarización asociada a la capacitación por Clofilium (50 μM) y TEA⁺ (60 mM), compuestos que no inhibieron a la corriente hSlo3, sugiere la participación de otros canales de K⁺ en este proceso, como el canal Slo1 [70], el cual también podría ser inhibido por la toxinas de la familia αKTX1 como IbTX o SloTX probadas en este trabajo (Figura 20). Esta hipótesis también explicaría el por qué, en la inhibición de la hiperpolarización se observa un porcentaje de bloqueo mayor que al porcentaje observado en la corriente hSlo3 expresada heterológamente (Tabla 2). Además, es importante tener en cuenta que en los ensayos de la HAC, tanto Clofilium como TEA⁺ se incubaron durante toda la noche, mientras que en los registros electrofisiológicos se aplicaron de forma directa y se incubó con estos bloqueadores por tres minutos. La diferencia en el tiempo de incubación de los bloqueadores puede ser otra posible explicación a lo observado. Por esta razón, se requieren estudios posteriores para terminar de caracterizar cuáles son los otros posibles canales que participan en este proceso.

Por último, es importante resaltar que los compuestos probados en la I_{hSlo3} expresada en células CHO tienen el mismo efecto en un intervalo de voltaje fisiológico para el espermatozoide de humano el cual, se ha reportado, va de ~-61 a ~-58 mV [92] (Tabla 3).

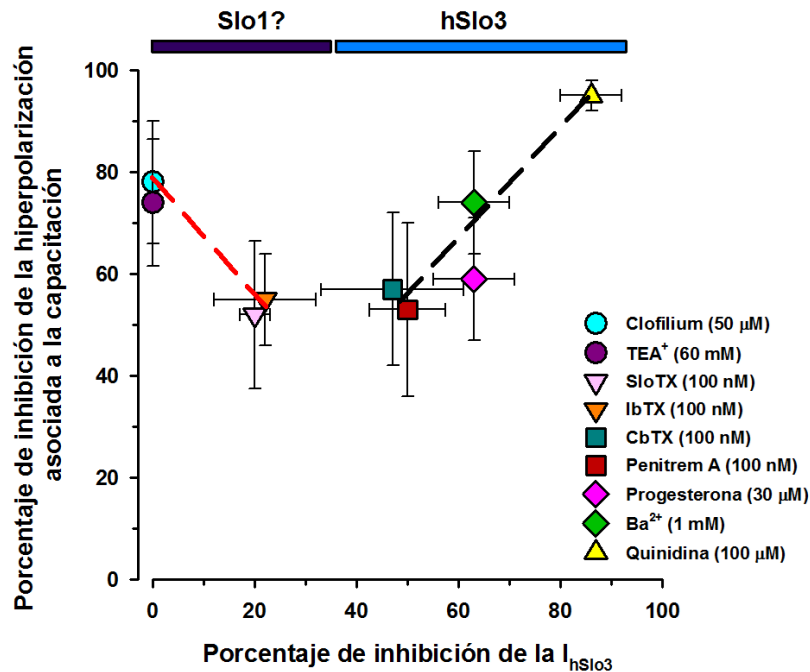


Figura 20. El canal hSlo3 participa en la hiperpolarización asociada a la capacitación.

Correlación entre el porcentaje de inhibición de la hiperpolarización asociada a la capacitación y el porcentaje de la inhibición de la I_{hSlo3} expresada en células CHO a +110 mV. La gráfica se ajusta a dos correlaciones: una correlación negativa con un índice de correlación (r) de -0.98 la cual indica que en presencia de Clofilium, TEA^+ , SloTX o IbTX en la inhibición de la hiperpolarización participarían otros canales de K^+ distintos al canal hSlo3, posiblemente hSlo1; y una correlación positiva ($r=0.95$) donde se observa claramente que en el caso de los bloqueadores CbTX, Penitrem A, Progesterona, Ba^{2+} y Quinidina, existe una correlación positiva que sugiere la participación del canal hSlo3 durante este proceso. Los símbolos representan los promedios \pm el error estándar de los porcentajes de inhibición. Los índices de correlación se obtuvieron con el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 2 Comparación entre el porcentaje del bloqueo de la corriente del canal hSlo3 expresado en células CHO y el porcentaje de inhibición de la hiperpolarización asociada a la capacitación de espermatozoides de humano.

	% de bloqueo de la corriente hSlo3 a +110 mV	% de inhibición de la hiperpolarización
Ba^{2+} 1 mM	63 ± 7	74 ± 10.5
Clofilium 50 μ M	0	78 ± 12
Pg 30 μ M	63.5 ± 8	59 ± 24
Quinidina 100 μ M	86.5 ± 5.5	95 ± 2.5
TEA^+ 60 mM	0	74 ± 12.5
IbTX 100 nM	22 ± 10	55 ± 9
CbTX 100 nM	47.5 ± 14	57 ± 30
SloTX 100 nM	20.5 ± 3	52 ± 14.5
Penitrem A 100 nM	50.5 ± 7.5	53.5 ± 34.5

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la corriente hSlo3 expresada en células CHO a -50 mV

	% de bloqueo de la corriente hSlo3 a -50 mV
Ba ²⁺ 1 mM	80 ± 4
Clofilium 50 μM	0
Pg 30 μM	55 ± 13
Quinidina 100 μM	86 ± 10
TEA ⁺ 60 mM	0
IbTX 100 nM	43 ± 11.5
CbTX 100 nM	56 ± 30
SloTX 100 nM	13 ± 13
Penitrem A 100 nM	39 ± 14

11. CONCLUSIONES

- Se corroboró la identidad e integridad de la clona que codifica para la subunidad hLRRC52 por patrones de digestión y secuenciación
- Se subclonó al gen que codifica para la subunidad hLRRC52 en el vector de expresión pIRES-YFP.
- Se logró coexpresar heterológamente al canal hSlo3 junto con la subunidad hLRRC52 ($\gamma 2$) en las células CHO
- Se demostró que el canal hSlo3 expresado heterológamente se bloquea por Ba^{2+} (1 mM), Quinidina (100 μM) y Progesterona (30 μM); fue parcialmente sensible a IbTX, CbTX, SloTX y Penitrem A (100 nM); pero insensible a Clofilium (50 μM) y TEA^+ (60 mM).
- La hiperpolarización asociada a la capacitación se inhibe por una alta concentración de K^+ (60 mM), demostrando la importancia de la participación de canales de K^+ durante este proceso.
- El perfil farmacológico del canal hSlo3 expresado en células CHO correlaciona con el perfil farmacológico de la hiperpolarización asociada a la capacitación, sugiriendo que el canal hSlo3 participa en este proceso. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otros canales de K^+ en este marcador de la capacitación.
- El canal Slo3 presenta propiedades especie específicas como lo sugiere la diferencia en el perfil farmacológico de los canales hSlo3 y mSlo3.

12. PERSPECTIVAS

- Establecer la expresión constitutiva del canal hSlo3 en las células CHO
- Realizar un tamizaje farmacológico a gran escala del canal hSlo3 expresado heterológamente para encontrar bloqueadores específicos para este canal.
- Realizar quimeras entre el canal mSlo3 y hSlo3 para indagar acerca del sitio de unión entre Clofilium y el canal mSlo3.
- Realizar una mutación puntual en la T274 del canal hSlo3 para determinar su participación en la insensibilidad a TEA⁺.
- Debido a que la HAC es suficiente y necesaria para desencadenar la reacción acrosomal en ratón, es importante evaluar ésta en los espermatozoides de humano después de incubarlos con los bloqueadores y toxinas probados en este estudio.

En este trabajo se contó con el apoyo técnico de:

La M. en C. Paulina Torres Rodríguez y el Biól. José Luis de la Vega Beltrán, técnicos académicos del “Consortio de la Fisiología del Espermatozoide”; al M. en C. Jorge Arturo Yáñez y al Dr. Paul Gaytán, de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas; y a Omar Arriaga, técnico académico de la Unidad de Biblioteca.

13. REFERENCIAS

- [1] F. J. McPherson and P. J. Chenoweth, "Mammalian sexual dimorphism.," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 131, no. 3–4, pp. 109–22, Apr. 2012.
- [2] M. Okabe, "The cell biology of mammalian fertilization.," *Development*, vol. 140, no. 22, pp. 4471–9, Nov. 2013.
- [3] R. Yanagimachi, "Fertilization Studies and Assisted Fertilization in Mammals: Their Development and Future," vol. 58, no. 1, 2012.
- [4] S. Pesch and M. Bergmann, "Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation.," *Micron*, vol. 37, no. 7, pp. 597–612, Jan. 2006.
- [5] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Treviño, "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa.," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 4, pp. 1305–55, Oct. 2011.
- [6] M. S. Rahman, W.-S. Kwon, and M.-G. Pang, "Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 841615, Jan. 2014.
- [7] E. M. Eddy, "The Spermatozoon," in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edit., 2006, pp. 3–54.
- [8] M. G. Buffone, T. W. Ijiri, W. Cao, T. Merdiushev, H. K. Aghajanian, and G. L. Gerton, "Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility.," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 79, no. 1, pp. 4–18, Jan. 2012.
- [9] D. W. Burgos, Mario H; Fawcett, "Studies on the fine structure of the mammalian testis," *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 1, pp. 287 – 300, 1955.
- [10] H. M. Florman and T. Ducibella, "Fertilization in Mammals," in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed., J. D. Neill, Ed. Elsevier, 2006, pp. 55 – 112.
- [11] J. P. Fouquet and M. L. Kann, "The cytoskeleton of mammalian spermatozoa.," *Biol. Cell*, vol. 81, no. 2, pp. 89–93, Jan. 1994.
- [12] P. Piomboni, R. Focarelli, a Stendardi, a Ferramosca, and V. Zara, "The role of mitochondria in energy production for human sperm motility.," *Int. J. Androl.*, vol. 35, no. 2, pp. 109–24, Apr. 2012.
- [13] R. Yanagimachi, "The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation," *J. Reprod. Fert.*, vol. 23, pp. 193–196, 1970.
- [14] S. S. & X. D. Suarez, "Hyperactivation Enhances Mouse Sperm for Penetrating Viscoelastic Media," *Biol. Reprod.*, vol. 691, pp. 686–691, 1992.

- [15] S. S. Suarez, "Control of hyperactivation in sperm.," *Hum. Reprod. Update*, vol. 14, no. 6, pp. 647–57, 2008.
- [16] K. Miki and D. E. Clapham, "Rheotaxis guides mammalian sperm.," *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 443–52, Mar. 2013.
- [17] H. Chang and S. S. Suarez, "Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice.," *Biol. Reprod.*, vol. 85, no. 2, pp. 296–305, Aug. 2011.
- [18] J. F. Smith, O. Syritsyna, M. Fellous, C. Serres, N. Mannowetz, Y. Kirichok, and P. V Lishko, "Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 17, pp. 6823–8, Apr. 2013.
- [19] M. R. Avenarius, M. S. Hildebrand, Y. Zhang, N. C. Meyer, L. L. H. Smith, K. Kahrizi, H. Najmabadi, and R. J. H. Smith, "Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 84, no. 4, pp. 505–10, Apr. 2009.
- [20] K. Ho, C. a Wolff, and S. S. Suarez, "CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir.," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 21, no. 2, pp. 345–50, Jan. 2009.
- [21] A. E. Carlson, L. a Burnett, D. del Camino, T. a Quill, B. Hille, J. a Chong, M. M. Moran, and D. F. Babcock, "Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation.," *PLoS One*, vol. 4, no. 8, p. e6844, Jan. 2009.
- [22] H. Wang, J. Liu, K.-H. Cho, and D. Ren, "A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein.," *Biol. Reprod.*, vol. 81, no. 3, pp. 539–44, Sep. 2009.
- [23] J. Jin, N. Jin, H. Zheng, S. Ro, D. Tafolla, K. M. Sanders, and W. Yan, "Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse.," *Biol. Reprod.*, vol. 77, no. 1, pp. 37–44, Jul. 2007.
- [24] J. Liu, J. Xia, K.-H. Cho, D. E. Clapham, and D. Ren, "CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 26, pp. 18945–52, Jun. 2007.
- [25] H. Qi, M. M. Moran, B. Navarro, J. a Chong, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, Y. Kirichok, I. S. Ramsey, T. a Quill, and D. E. Clapham, "All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 4, pp. 1219–23, Jan. 2007.
- [26] T. a Quill, D. Ren, D. E. Clapham, and D. L. Garbers, "A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 22, pp. 12527–31, Oct. 2001.
- [27] Y. Kirichok, B. Navarro, and D. E. Clapham, "Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel.," *Nature*, vol. 439, no. 7077, pp. 737–40, Feb. 2006.

- [28] J. L. Bailey, "Factors regulating sperm capacitation.," *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 56, no. 5, pp. 334–48, Oct. 2010.
- [29] P. E. Visconti, D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltrán, J. J. Acevedo, and A. Darszon, "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation.," *Asian J. Androl.*, vol. 13, no. 3, pp. 395–405, May 2011.
- [30] J. L. De La Vega-Beltran, C. Sánchez-Cárdenas, D. Krapf, E. O. Hernandez-González, E. Wertheimer, C. L. Treviño, P. E. Visconti, and A. Darszon, "Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 53, pp. 44384–93, Dec. 2012.
- [31] C. M. Santi, P. Martínez-López, J. L. de la Vega-Beltrán, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, and L. Salkoff, "The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility.," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 5, pp. 1041–6, Mar. 2010.
- [32] P. V Lishko, I. L. Botchkina, A. Fedorenko, and Y. Kirichok, "Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel," pp. 327–337, 2010.
- [33] P. V Lishko and Y. Kirichok, "The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation.," *J. Physiol.*, vol. 588, no. Pt 23, pp. 4667–72, Dec. 2010.
- [34] D. Wang, J. Hu, I. A. Bobulescu, T. a Quill, P. McLeroy, O. W. Moe, and D. L. Garbers, "A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 22, pp. 9325–30, May 2007.
- [35] D. Wang, S. M. King, T. a Quill, L. K. Doolittle, and D. L. Garbers, "A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 12, pp. 1117–22, Dec. 2003.
- [36] X.-H. Zeng, C. Yang, S. T. Kim, C. J. Lingle, and X.-M. Xia, "Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 14, pp. 5879–84, Apr. 2011.
- [37] D. E. Clapham, "Sperm BerserKers," *Elife*, vol. 2, p. e01009, Jan. 2013.
- [38] D. Figueiras Fierro, J. J. Acevedo, P. Martínez, J. Escoffier, F. V. Sepúlveda, E. Balderas, G. Orta, P. Visconti, and A. Darszon, "Electrophysiological Evidence for the Presence of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Mouse Sperm," *J Cell Physiol*, vol. 228, no. 3, pp. 590–601, 2013.
- [39] G. Orta, G. Ferreira, O. José, C. L. Treviño, C. Beltrán, and A. Darszon, "Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction.," *J. Physiol.*, vol. 590, no. Pt 11, pp. 2659–75, 2012.
- [40] E. O. Hernández-González, J. Sosnik, J. Edwards, J. J. Acevedo, I. Mendoza-Lujambio, I. López-González, I. Demarco, E. Wertheimer, A. Darszon, and P. E. Visconti, "Sodium and epithelial

sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 9, pp. 5623–5633, 2006.

- [41] C. M. Santi, G. Orta, L. Salkoff, P. E. Visconti, a. Darszon, and C. L. Treviño, *K+ and Cl- Channels and Transporters in Sperm Function*, vol. 102. 2013.
- [42] I. López-González, P. Torres-Rodríguez, O. Sánchez-Carranza, A. Solís-López, C. M. Santi, A. Darszon, and C. L. and Treviño, "Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 20, no. 7, pp. 619–629, 2014.
- [43] J. G. McCoy and C. M. Nimigean, "Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 2, pp. 272–85, Feb. 2012.
- [44] D. L. Minor, "Potassium channels: life in the post-structural world.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, no. 4, pp. 408–14, Aug. 2001.
- [45] L. Salkoff, A. Butler, G. Ferreira, C. Santi, and A. Wei, "High-conductance potassium channels of the SLO family.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 12, pp. 921–31, Dec. 2006.
- [46] L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon, "Mutations in the K+ channel signature sequence.," *Biophys. J.*, vol. 66, no. 4, pp. 1061–7, Apr. 1994.
- [47] U. S. Lee and J. Cui, "BK channel activation: structural and functional insights.," *Trends Neurosci.*, vol. 33, no. 9, pp. 415–23, Sep. 2010.
- [48] P. Orio, P. Rojas, G. Ferreira, and R. Latorre, "New Disguises for an Old Channel : MaxiK Channel - -Subunits," pp. 156–161, 2012.
- [49] W. J. Joiner, M. D. Tang, L. Y. Wang, S. I. Dworetzky, C. G. Boissard, L. Gan, V. K. Gribkoff, and L. K. Kaczmarek, "Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits.," *Nat. Neurosci.*, vol. 1, no. 6, pp. 462–469, 1998.
- [50] N. S. Atkinson, G. A. Robertson, and B. Ganetzky, "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus.," *Science*, vol. 253, pp. 551–555, 1991.
- [51] X.-M. Xia, X. Zhang, and C. J. Lingle, "Ligand-dependent activation of Slo family channels is defined by interchangeable cytosolic domains.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 24, pp. 5585–91, Jun. 2004.
- [52] T. M. Weiger, A. Hermann, and I. B. Levitan, "Modulation of calcium-activated potassium channels.," *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.*, vol. 188, no. 2, pp. 79–87, Mar. 2002.
- [53] M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan, J. Gaut, M. Saito, and L. Salkoff, "Slo3, a novel pH-sensitive K+ channel from mammalian spermatocytes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 6, pp. 3509–16, Feb. 1998.

- [54] Q.-Y. Tang, Z. Zhang, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine.," *Channels (Austin)*, vol. 4, no. 1, pp. 22–41, 2010.
- [55] J. Garcia-Valdes, F. Z. Zamudio, L. Toro, and L. D. Possan, "Slotoxin, alpha KTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between alpha and alpha+beta (beta1 or beta4) complexes," *FEBS Lett.*, vol. 505, pp. 369–373, 2001.
- [56] J. Garcia-Valdes, F. Z. Zamudio, L. Toro, and L. D. Possan, "Slotoxin, aKTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between a and a+B (B1 or B4) complexes," *FEBS Lett.*, vol. 505, no. 3, pp. 369–373, 2001.
- [57] C. Welz, N. Krüger, M. Schniederjans, S. M. Miltsch, J. Krücken, M. Guest, L. Holden-Dye, A. Harder, and G. von Samson-Himmelstjerna, "SLO-1-channels of parasitic nematodes reconstitute locomotor behaviour and emodepside sensitivity in *Caenorhabditis elegans* slo-1 loss of function mutants," *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 4, 2011.
- [58] A. Yuan, C. M. Santi, A. Wei, Z. W. Wang, K. Pollak, M. Nonet, L. Kaczmarek, C. M. Crowder, and L. Salkoff, "The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family.," *Neuron*, vol. 37, no. 5, pp. 765–73, Mar. 2003.
- [59] a Yuan, M. Dourado, a Butler, N. Walton, a Wei, and L. Salkoff, "SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence.," *Nat. Neurosci.*, vol. 3, no. 8, pp. 771–9, Aug. 2000.
- [60] M. de Los Angeles Tejada, K. Stolpe, A.-K. Meinild, and D. a Klaerke, "Clofilium inhibits Slick and Slack potassium channels.," *Biologics*, vol. 6, pp. 465–70, Jan. 2012.
- [61] X. Zhang, X. Zeng, and C. J. Lingle, "Slo3 K⁺ channels: voltage and pH dependence of macroscopic currents.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 128, no. 3, pp. 317–36, Sep. 2006.
- [62] M. D. Leonetti, P. Yuan, Y. Hsiung, and R. Mackinnon, "Functional and structural analysis of the human SLO3 pH- and voltage-gated K⁺ channel.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 47, pp. 19274–9, 2012.
- [63] X. Zhang, X. Zeng, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "pH-regulated Slo3 K⁺ channels: properties of unitary currents.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 128, no. 3, pp. 301–15, Sep. 2006.
- [64] S. a Mansell, S. J. Publicover, C. L. R. Barratt, and S. M. Wilson, "Patch clamp studies of human sperm under physiological ionic conditions reveal three functionally and pharmacologically distinct cation channels.," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 20, no. 5, pp. 392–408, May 2014.
- [65] C. Brenker, Y. Zhou, A. Müller, F. A. Echeverry, C. Trötschel, A. Poetsch, X. Xia, W. Bönigk, C. J. Lingle, U. B. Kaupp, and T. Strünker, "The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3," *Elife*, pp. 1–19, 2014.
- [66] C. Yang, X.-H. Zeng, Y. Zhou, X.-M. Xia, and C. J. Lingle, "LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 48, pp. 19419–24, Nov. 2011.

- [67] J. Zhang and J. Yan, "Regulation of BK channels by auxiliary γ subunits.," *Front. Physiol.*, vol. 5, no. October, p. 401, Jan. 2014.
- [68] B. Navarro, Y. Kirichok, and D. E. Clapham, "KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 18, pp. 7688–92, May 2007.
- [69] P. Martínez-López, C. M. Santi, C. L. Treviño, A. Y. Ocampo-Gutiérrez, J. J. Acevedo, A. Alisio, L. B. Salkoff, and A. Darszon, "Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 381, no. 2, pp. 204–9, Apr. 2009.
- [70] N. Mannowetz, N. M. Naidoo, S.-A. S. Choo, J. F. Smith, and P. V Lishko, "Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa.," *Elife*, vol. 2, p. e01009, Jan. 2013.
- [71] J. Yan and R. W. Aldrich, "BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 20, pp. 7917–22, May 2012.
- [72] B. Skryma, R. Prevarskaya N, Vacher, P & Dufy, "Voltage-dependent ionic conductances in Chinese hamster ovary cells.," *Am. Physiol. Soc.*, pp. C544–C553, 1994.
- [73] E. Garza-López, O. Sánchez-Carranza, T. Nishigaki, and I. López-González, "Pharmacological Identification of Endogenous Slo1 Channel-B1 Subunit Complexes in CHO Cells Using Three aKTX1 Subfamily Toxins," *Int. J. Pharm. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 11–24, 2015.
- [74] Y. Jiang and R. MacKinnon, "The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 269–72, Mar. 2000.
- [75] D. J. Snyders, K. M. Knoth, S. L. Roberds, and M. M. Tamkun, "Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel," *Mol. Pharmacol.*, vol. 41, no. 2, pp. 322–330, 1992.
- [76] N. Iwatsuki and O. H. Petersen, "Inhibition of Ca²⁺-activated K⁺ channels in pig pancreatic acinar cells by Ba²⁺, Ca²⁺, quinine and quinidine.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 819, no. 2, pp. 249–257, 1985.
- [77] B. Yang, V. K. Gribkoff, J. Pan, V. Damagnez, S. I. Dworetzky, C. G. Boissard, A. Bhattacharjee, Y. Yan, F. J. Sigworth, and L. K. Kaczmarek, "Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels," *Neuropharmacology*, vol. 51, no. 4, pp. 896–906, 2006.
- [78] S. Candia, M. L. Garcia, and R. Latorre, "Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel.," *Biophys. J.*, vol. 63, no. 2, pp. 583–590, 1992.
- [79] A. Galvez, G. Gimenez-Gallego, J. P. Reuben, L. Roy-Contancin, P. Feigenbaum, G. J. Kaczorowski, and M. L. Garcia, "Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 19, pp. 11083–11090, 1990.

- [80] C. Smith, M. Phillips, and C. Miller, "Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 31, pp. 14607–14613, 1986.
- [81] S. a N. Goldstein, D. J. Pheasant, and C. Miller, "The charybdotoxin receptor of a Shaker K^{+} channel: Peptide and channel residues mediating molecular recognition," *Neuron*, vol. 12, no. 6, pp. 1377–1388, 1994.
- [82] S. a Goldstein and C. Miller, "Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K^{+} channel.," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 4, pp. 1613–1619, 1993.
- [83] H. G. Knaus, O. B. McManus, S. H. Lee, W. a Schmalhofer, M. Garcia-Calvo, L. M. Helms, M. Sanchez, K. Giangiacomo, J. P. Reuben, and a B. Smith, "Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels.," *Biochemistry*, vol. 33, no. 19, pp. 5819–5828, 1994.
- [84] P. Lishko, D. E. Clapham, B. Navarro, and Y. Kirichok, *Sperm patch-clamp.*, 1st ed., vol. 525. Elsevier Inc., 2013.
- [85] M. J. Lenaeus, M. Vamvouka, P. J. Focia, and A. Gross, "Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 454–459, 2005.
- [86] Q. Tan, B. Ritzo, K. Tian, and L.-Q. Gu, "Tuning the tetraethylammonium sensitivity of potassium channel Kcv by subunit combination," *J. Gen. Physiol.*, vol. 139, no. 4, pp. 295–304, 2012.
- [87] J. Thompson and T. Begegnisich, "External TEA block of shaker K^{+} channels is coupled to the movement of K^{+} ions within the selectivity filter.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 122, no. 2, pp. 239–246, 2003.
- [88] R. C. Rodríguez de la Vega, E. Merino, B. Becerril, and L. D. Possani, "Novel interactions between K^{+} channels and scorpion toxins.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 24, no. 5, pp. 222–7, May 2003.
- [89] M. R. Miller, S. a. Mansell, S. Meyers, and P. V. Lishko, "Flagellar Ion Channels of Sperm: Similarities and Differences between Species," *Cell Calcium*, Oct. 2014.
- [90] W. Alasmari, S. Costello, J. Correia, S. K. Oxenham, J. Morris, L. Fernandes, J. Ramalho-Santos, J. Kirkman-brown, F. Michelangeli, S. Publicover, and C. L. R. Barratt, " Ca^{2+} signals generated by CatSper and Ca^{2+} stores regulate different behaviors in human sperm.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 9, pp. 6248–58, Mar. 2013.
- [91] P. V Lishko, I. L. Botchkina, and Y. Kirichok, "Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm.," *Nature*, vol. 471, no. 7338, pp. 387–91, Mar. 2011.
- [92] C. Patrat, C. Serres, and P. Jouannet, "Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa.," *Biol. Reprod.*, vol. 66, no. 6, pp. 1775–1780, 2002.

14. APÉNDICE

Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation

I. López-González^{1,†}, P. Torres-Rodríguez^{1,†}, O. Sánchez-Carranza¹,
A. Solís-López¹, C.M. Santi², A. Darszon¹, and C.L. Treviño^{1,*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México ²Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University School of Medicine, 660 S Euclid Ave, St. Louis, MO 63110, USA

*Correspondence address. Tel: +52-777-3-29-16-11; Fax: +52-777-3-17-23-88; E-mail: ctrevino@ibt.unam.mx

Submitted on October 30, 2013; resubmitted on February 19, 2014; accepted on April 9, 2014

ABSTRACT: Sperm capacitation is a complex and indispensable physiological process that spermatozoa must undergo in order to acquire fertilization capability. Spermatozoa from several mammalian species, including mice, exhibit a capacitation-associated plasma membrane hyperpolarization, which is necessary for the acrosome reaction to occur. Despite its importance, this hyperpolarization event has not been adequately examined in human sperm. In this report we used flow cytometry to show that a subpopulation of human sperm indeed undergo a plasma membrane hyperpolarization upon *in vitro* capacitation. This hyperpolarization correlated with two other well-characterized capacitation parameters, namely an increase in intracellular pH and Ca^{2+} concentration, measured also by flow cytometry. We found that sperm membrane hyperpolarization was completely abolished in the presence of a high external K^+ concentration (60 mM), indicating the participation of K^+ channels. In order to identify, which of the potential K^+ channels were involved in this hyperpolarization, we used different K^+ channel inhibitors including charybdotoxin, slotoxin and iberiotoxin (which target Slo1) and clofilium (a more specific blocker for Slo3). All these K^+ channel antagonists inhibited membrane hyperpolarization to a similar extent, suggesting that both members of the Slo family may potentially participate. Two very recent papers recorded K^+ currents in human sperm electrophysiologically, with some contradictory results. In the present work, we show through immunoblotting that Slo3 channels are present in the human sperm membrane. In addition, we found that human Slo3 channels expressed in CHO cells were sensitive to clofilium (50 μM). Considered altogether, our data indicate that Slo1 and Slo3 could share the preponderant role in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm in contrast to what has been previously reported for mouse sperm, where Slo3 channels are the main contributors to the hyperpolarization event.

Key words: flow cytometry / human sperm / hyperpolarization / Slo K^+ channels

Introduction

After cell differentiation in the testis, spermatozoa continue to mature as they pass through the epididymis. In the female tract they undergo capacitation—a complex process, involving a series of physiological modifications, that prepares sperm to undergo the acrosome reaction (AR) when they encounter the egg (Jin *et al.*, 2011). The AR is a single exocytotic event that sperm need to undergo to penetrate the outer layers of the egg and to fuse with it.

Capacitation involves remodeling of the plasma membrane (which includes cholesterol removal), as well as extensive protein tyrosine-phosphorylation and increases in intracellular pH (pH_i) and Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Aitken *et al.*, 1986; Parrish *et al.*, 1988; Thomas and Meizel, 1988; Baldi *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1996; Flesch and Gadella, 2000; Lishko *et al.*, 2010). In mouse and bovine sperm, only a subpopulation of spermatozoa (20–40%) becomes capacitated (Zeng *et al.*, 1995),

and the mechanisms involved in such selective capacitation and in eliciting the aforementioned cellular changes are far from clear. Notably, only capacitated sperm can undergo the AR and fertilize the egg.

In some species, including mouse, cow and horse, capacitation is also accompanied by a membrane potential (E_m) hyperpolarization (Zeng *et al.*, 1995; Arnoult *et al.*, 1999; Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Demarco *et al.*, 2003; McPartlin *et al.*, 2011; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012). The exact role of this hyperpolarization is not completely clear, but it has been explored especially in mouse sperm. In this species the resting membrane potential ($E_{m,r}$) of non-capacitated sperm lies between -35 and -45 mV and after capacitation this value reaches -65 mV (Espinosa and Darszon 1995; Zeng *et al.*, 1995; Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Demarco *et al.*, 2003; Hernández-González *et al.*, 2006; Santi *et al.*, 2010; McPartlin *et al.*, 2011; De La Vega-Beltran *et al.*, 2012). The function of this hyperpolarization was believed to be the removal of the inactivation from T-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (Ca_v3),

[†] These authors contributed equally to this work.

which could then be activated during the AR by physiological agonists (e.g. zona pellucida; ZP) (Zeng et al., 1995; Arnoult et al., 1996, 1999; Liévano et al., 1996). However, recent electrophysiological evidence (Lishko et al., 2012) has questioned the presence of these Ca^{2+} channels in mature sperm. The patch clamp technique applied directly to mature mouse and/or human spermatozoa could only detect channels for four ions: Ca^{2+} channels [Catsper (mouse: Ren et al., 2001; and humans: Strunker et al., 2011; Lishko et al., 2011) and TRPM8 (mouse: Martínez-López et al., 2011)]; K^{+} channels [Slo3 (mouse: Martínez-López et al., 2009; Zeng et al., 2011; Mansell et al., 2014); Slo1 (humans: Mannowetz et al., 2013; Mansell et al., 2014)]; H^{+} channels (human Hv: Lishko et al., 2010) and Cl^{-} channels [cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (mouse: Figueiras-Fierro et al., 2013; and TMEM16A (humans: Orta et al., 2012)]. Catsper, H^{+} channels and a putative specific $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger (Lee, 1984, 1985; Wang et al., 2003) that are also present in sperm, can be affected by a change in E_m , highlighting the importance of the hyperpolarization event. In addition, our group has recently shown that a membrane hyperpolarization is necessary to prepare mouse sperm for the AR (De La Vega-Beltran et al., 2012).

Previously, several groups demonstrated that the ZP-induced AR is impaired in mouse sperm if capacitation takes place in a medium with high extracellular K^{+} concentration ($[\text{K}^{+}]_o$), a condition that prevents membrane hyperpolarization (Zeng et al., 1995; Arnoult et al., 1999; De La Vega-Beltran et al., 2012). The molecules and mechanisms involved in membrane hyperpolarization are beginning to be understood at least for mouse sperm. Sperm cells from Slo3 null mice are unable to hyperpolarize during capacitation and display several defects including impaired motility, a bent 'hairpin' shape and failure to undergo the AR (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). Altogether, these defects render Slo3 null male mice sterile. Chávez et al. (2013) recently showed that Slo3 is the principal channel responsible for mouse hyperpolarization during capacitation and that its K^{+} permeability increases three times during this process, while Na^{+} and Cl^{-} permeabilities remain practically the same. Despite the different roles that membrane hyperpolarization may play during capacitation, this E_m change has not been demonstrated in human sperm. There are few reports regarding this subject. Linares-Hernandez et al. (1998) reported that the E_m of non-capacitated human sperm is around -40 mV, whereas Patrat et al. (2002) reported that capacitated sperm exhibit an E_m of about -58 mV. An exploratory study using cell sorting and an E_m sensitive dye reported that capacitated human sperm undergo a hyperpolarization (Brewis et al., 2000). However, none of these studies quantitatively determined the E_m changes human sperm undergo during capacitation or examined their nature pharmacologically.

In the present work, we determined through flow cytometry experiments that: (i) there is a subpopulation of human sperm that undergoes membrane hyperpolarization during capacitation, (ii) such E_m change is completely blocked by high $[\text{K}^{+}]_o$ and (iii) the hyperpolarization is partially sensitive to diverse K^{+} channels blockers, suggesting that two or more K^{+} channels, including Slo3, are involved in it. Furthermore, we observed that the heterologous expression of human Slo3 (hSlo3) channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells hyperpolarizes their E_m . The pharmacological profile of the expressed hSlo3 channels was consistent with the inhibition caused by Slo3 inhibitors of the capacitation-associated hyperpolarization in human sperm, but other K^{+} channels, namely Slo1 may also participate in the process.

Materials and Methods

Reagents

3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine iodide (DiSC₃(5)), propidium iodide (PI), Fluor-3 acetoxymethyl (AM) ester (Fluo-3 AM) and 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF) were purchased from Molecular Probes-Invitrogen, Inc. (Eugene, OR, USA). Charybdotoxin, iberiotoxin, slotoxin and tetrodotoxin were acquired from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). LipofectAMINE, bovine fetal serum (BSA), Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium and pcDNA3.1(-) vector, were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Restriction enzymes were purchased from Fermentas (now Thermo Scientific). T4 DNA ligase was acquired from Thermo Scientific (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). All other reagents were purchased through Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Human sperm swim-up

Human sperm were obtained as previously described (Mata-Martínez et al., 2013). Briefly, ejaculated samples (obtained by masturbation) fulfilling the parameters established by the World Health Organization laboratory manual were used for the experiments. Semen samples were placed in an incubator at 37°C under 5% CO₂ for 30 min for liquefaction. Five hundred microliter portions of each liquefied semen sample was placed in glass test tubes and incubated for 1 h with 1 mL Ham's F-10 medium carefully layered on top of the sample to avoid mixing of the phases (Ham's F-10 medium was supplemented with 2 mM CaCl₂ and for capacitated sperm samples only with 5 mg/mL BSA). Seven hundred microliters (now containing motile spermatozoa) was then collected from the upper part of each tube and pooled into a single clean glass tube. The sample concentration was determined using a Makler Counting Chamber and adjusted to the required concentration using supplemented Ham's F-10 medium. When required, sperm samples were incubated at 37°C under 5% CO₂ for 5–13 h to promote capacitation, non-capacitated sperm were incubated for the same amount of time but in a media lacking BSA.

Human sperm analysis by flow cytometry

Sperm plasma membrane potential, pH_i and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes were monitored using DiSC₃(5), BCECF and Fluo3-AM, respectively. After overnight incubation under either non-capacitating or capacitating conditions, samples were centrifuged at 750 g for 5 min. Sperm were resuspended in Human Sperm Medium (HSM; 120 mM NaCl, 15 mM NaHCO₃, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Na lactate, 5 mM D-glucose, 1 mM Na pyruvate; pH 7.4) and their concentration adjusted to 4×10^6 cells/mL. The sperm were loaded with the fluorescent indicators by incubating them with 50 nM DiSC₃(5), 0.5 μM BCECF or 1 μM Fluo3-AM during 30 min at 37°C under 5% CO₂. For each experimental condition to be tested, 500 μL of cell suspension was placed in a cytometer tube, PI was added 5 min before collecting data. Data were recorded as individual cellular events using an FACSCanto II™ cytometer (Becton Dickinson). Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) fluorescence data were collected from 20 000 events per sample. Appropriate cytometer settings were selected for DiSC₃(5), BCECF, Fluo3-AM and PI. Threshold levels for FSC and SSC were set to exclude signals from cellular debris (Fig. 1A and B). Thus, particles of cellular debris with background fluorescence signals outside these threshold values were not included in the counts of sperm calculated by the flow cytometer and the number of sperm available for study was less than the total number of events (20 000). The photo multiplier tube voltages used to record the fluorescence signals were as follows: FSC (480–500), SSC (520–550), Fluo3-AM/BCECF (500–580), PI (500–560) and DiSC₃(5) (600–700). Unstained control samples were used to verify

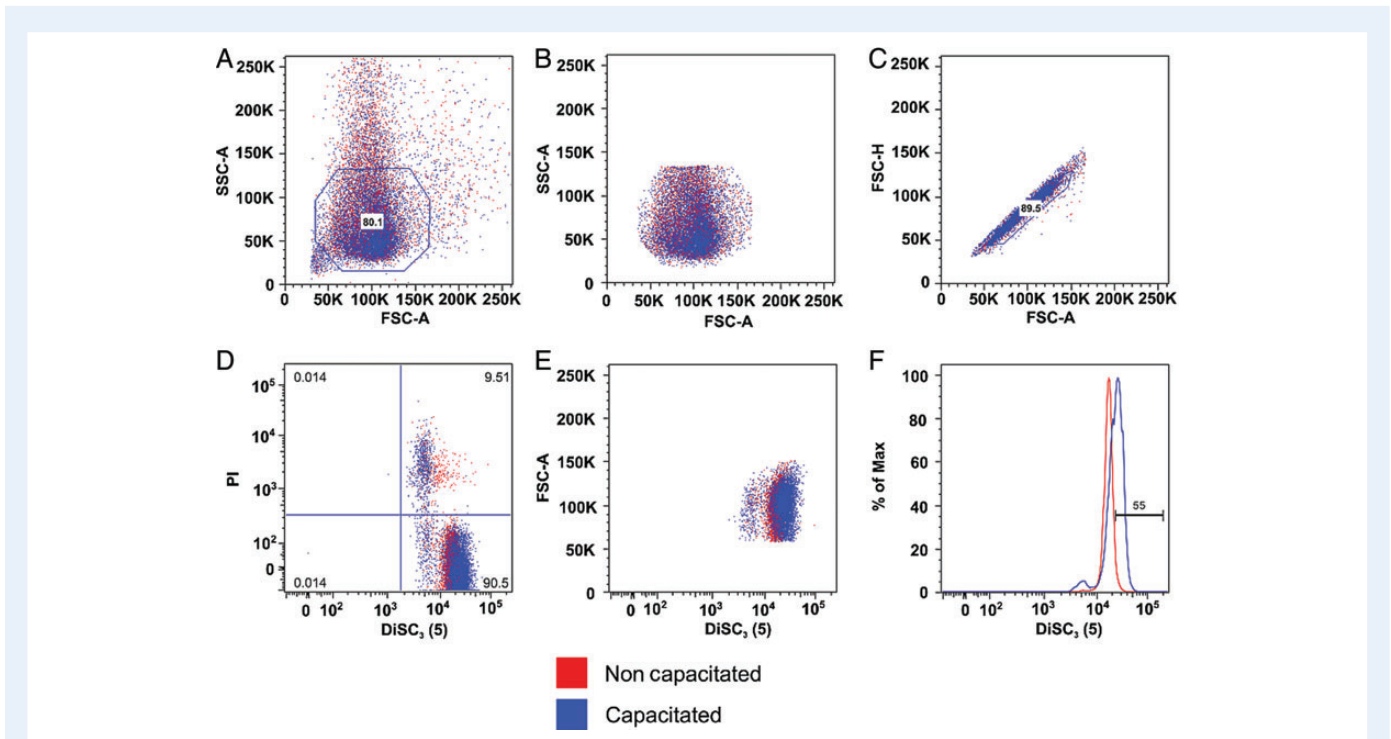


Figure 1 Human sperm hyperpolarize during capacitation. Analysis of a representative flow cytometry experiment to determine changes in the resting potential (E_m) in non-capacitated (red) and capacitated (blue) sperm. **(A)** Dot plot of side (SSC-A) versus forward (FSC-A) scatter for each sample. **(B)** Region of interest according to the gate indicated in (A) to eliminate cellular debris. **(C)** The forward scatter area (FSC-A) versus forward scatter height (FSC-H) profile was used to exclude cell aggregates and large cells from the analysis. **(D)** Two-dimensional fluorescence plot for DiSC₃(5) and PI. Four quadrants are indicated: top left (dead cells), upper right (DiSC₃(5) positive dead cells), lower left (DiSC₃(5) negative living cells) and lower right (DiSC₃(5) positive living cells), the percentage of cells that fell in each quadrant is indicated by the black number. **(E)** Dot plot for FSC-A scatter versus DiSC₃(5) fluorescence (only DiSC₃(5) positive living cells were included). **(F)** Same information as in (E) plotted as a histogram of percentage of the maximum (% Max) versus DiSC₃(5) fluorescence, obtained by normalizing to the peak height at the mode of the distribution—so the maximum Y-axis value in the absolute-count histogram becomes 100% of total. (D and E) An increase in fluorescence for the population (blue), revealing a hyperpolarization. These results are representative of one experiment out of 16.

that threshold settings were appropriate and to create the corresponding gates needed to discriminate debris from cells. Positive cells for DiSC₃(5), BCECF, Fluo3-AM and PI (to determine viability) were collected using allophycocyanine, fluorescein isothiocyanate FITC (for BCECF and Fluo3-AM) and PI filters, respectively. The following controls were used to set up compensation parameters: unstained sperm, sperm stained with DiSC₃(5), BCECF, Fluo3-AM or PI-stained dead sperm (sperm suspended in 0.1% Triton X-100 in HSM and incubated 10 min at room temperature). Non-capacitated and capacitated sperm samples (3×10^6 cells/mL, for each condition) were run and recorded. Data were analyzed using FACS Diva and FlowJo software (Tree Star 9.3.3). Cell debris, doublets and aggregates were excluded from analysis based on a dual parameter dot plot, in which pulse signal (signal high; FSC-H; y-axis) versus signal area (FSC-A; x-axis) was displayed. To test the effect of different compounds (see Table 1 for details), cells were incubated overnight at 37°C and under 5% CO₂ with each respective compound, which was also present during data acquisition. When a mixture of compounds was used, they were also tested individually in the same batch of sperm. All compounds stock solutions were prepared in 10 mM HEPES.

Subcloning of human and mouse Slo3 channels

Full-length hSlo3 cDNA (catalog number MH51010-7295475) was bought from Open Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA),

cloned in pOX vector and then subcloned into pcDNA3.1 (–) vector with standard ligation techniques using *Nhe* I and *Hind* III sites. A *Hind* III site was inserted into the hSlo3 cDNA sequence using oligonucleotide primers 5′ GGG AAG CTT GAG TCT AGA ACT AGT ATA GTG GCT 3′ and 5′ CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG 3′ synthesized by IBT/UNAM (Cuernavaca, Mexico). PCR was performed using high-fidelity Phusion[®] DNA polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) starting with a denaturation step at 98°C for 30 s, followed by 30 cycles under the following conditions: 98°C for 10 s, 45°C for 20 s and 72°C for 70 s. The final elongation step was performed at 72°C for 10 min. The presence of a single product (~3500 bp) was confirmed in a 1% agarose gel and it was purified using a rapid gel extraction protocol by column (Fermentas). The amplified fragment was digested with appropriate restriction enzymes and ligated into the pcDNA3.1(–) vector using standard protocols. Recombinant clones were subsequently sequenced on both strands to confirm the identity of the construct. Mouse Slo3 channel cDNA (Santi *et al.*, 2009) was used as a positive control and was directly subcloned into pcDNA3.1(–) vector digesting the clone with the *Nhe* I and *Xho* I restriction sites.

Cell culture

CHO cells were maintained in culture using Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 1% antibiotics and 10% BSA (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK). Cells were grown in

Table I K⁺ and Na⁺ channel blockers.

Compound	Concentration	Target	References
Ba ²⁺	1 mM	K ⁺ channels	Von Beckerath et al. (1996); Leung et al. (2000); Martínez-López et al. (2009)
Clofilium	50 μM	Slo3 channels	Navarro et al. (2007); Zeng et al. (2011)
TEA ⁺	10 mM	Slo1 + Slo3 (partial) channels	Tang et al. (2010)
TEA ⁺	60 mM	Slo1 + Slo3 channels	Martínez-López et al. (2009); Tang et al. (2010)
IbTX	100 nM	Slo1 channels	Tang et al. (2010)
CbTX	100 nM	Slo1 channels	Tang et al. (2010)
SloTX	100 nM	Slo1 channels	Reviewed in Garcia-valdes et al. (2001)
TTX	60 nM	Na ⁺ channels	Reviewed in Narahashi (2008)

plastic Petri dishes incubated in a humidity-controlled incubator at 37°C under 5% CO₂ (VWR Scientific 2100).

Transient expression of hSlo3 channels in CHO cells

Fifty percent of confluent CHO cells were transfected with 1 μg of the hSlo3 construct mixed with Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected CHO cells were maintained in advanced DMEM medium and were used in the studies described >48 h post-transfection. Control experiments include cells transfected with empty pcDNA3.1(-) vector.

Design and synthesis of anti-hSlo3 antibodies

Two chicken anti-Slo3 channel antibodies (U1493 and U1504) were commissioned from New England Peptides using the antigen peptide Ac-CELNPNNSIHFIIE-amide, corresponding to either amino acid residues 864–875 of human (NCBI Gene ID: 157855) or 869–880 of mouse (NCBI Gene ID: 16532) Slo3 channels.

SDS-PAGE and western blot analysis

Human sperm after swim-up separation (~30 × 10⁶ cells/lane) were washed once (600g/5 min in phosphate buffered saline) at room temperature, resuspended and incubated in solubilization buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA; 1% v/v sodium deoxycholate, 1% v/v NP-40 and protease inhibitors complete (Roche, Mannheim, Germany) for 30 min at 4°C. Samples were then centrifuged at 16 000g for 20 min, the supernatants were collected and 20 μg of total protein was mixed with loading buffer (500 mM Tris, 8 mM EDTA; 1 μg bromophenol blue/mL, 10% v/v SDS, 50% v/v glycerol and 5% v/v 2-mercaptoethanol). Samples were incubated at 70°C for 20 min, and then subjected to 7.5% SDS-PAGE. Proteins were electro-transferred (0.5 A/60 min, with a buffer solution, 190 mM glycine, 25 mM Tris, pH 8.6) to Immobilon P (Millipore) membranes (pre-treated according to the manufacturer's instructions) in a semi-dry transfer cell (Bio-Rad). After blocking with 5% w/v fat-free milk, blots were incubated with anti-Slo3 (U1493) (1:5000), pre-immune serum (1:5000) or a mixture of anti-Slo3 and antigenic peptide (1:1 weight ratio) (New England Peptide LLC, Gardner, MA, USA) and then with the goat anti-chicken secondary antibody (1:1000) conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, San Francisco, CA, USA) and developed with the chemoluminescent ECL kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Immunodetection of hSlo3 channels in CHO cells

CHO cells transiently expressing hSlo3 channels were used to determine the specificity of the primary antibodies U1493 and U1504 (New England peptides). Aliquots of CHO cells were fixed with 4% v/v paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% v/v Triton X-100 and incubated overnight at 4°C with primary antibody (only results with U1493 are shown) at 1:1000 dilution. Lastly, samples were incubated for 1 h with goat anti-chicken Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 594-conjugated antibodies (diluted 1:100, Molecular Probes-Invitrogen). Images were acquired in a confocal microscope Zeiss LSM510 META and analyzed using Zeiss LSM5 Image examiner software 4.2 (Carl Zeiss). Supplementary immunodetection images were acquired in a confocal microscope FLUOVIEW FV1000 (Olympus) and analyzed using ImageJ 1.48q software.

Membrane resting potential (Em_r) determinations in CHO cells

After transfection, 1 × 10⁶ cells were resuspended in modified Whittens buffer (100 mM N-methyl-D-glucamine, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5.5 mM sucrose, 20 mM HEPES; pH 7.4) stained with 1 μM Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC₂(3)) (Sigma-Aldrich) using a published procedure (Wolff et al., 2003) and incubated for 5–7 min at room temperature in 1 mL of modified Whittens buffer and increasing concentrations of KCl (6–66 mM). The basal fluorescence was recorded for 7 min using an Ocean Optics USB4000 spectrofluorometer operated by Spectra Suite (Ocean Optics, Inc., USA) with magnetic stirrer control (SIM Aminco), and coupled to a Cyan light-emitting diode (LED, Luxeon Star LXHL-LB3C, from LUMILEDS) and a 475–525 nm band-pass filter (Chroma Technology Corp.) for DiSBAC₂(3) excitation (ANASPEC). The LED was controlled by a custom-built power supply (700 mA). Emission light was obtained by setting the emission wavelength (λ_{Em}) from 550 up to 600 nm on the spectrofluorometer's monochromator. Calibration was performed by adding 1 μL of gramicidin D (1 mM stock solution in DMSO; Sigma-Aldrich) and sequential additions of known concentrations of KCl to obtain final concentrations of 6.7, 10.7, 18.7, 30.7, 46.7 and 66.7 mM, corresponding to plasma Em_r (theoretical) of -80, -64, -49, -36, -25 and -3 mV, respectively. The fluorescence signal was further recorded for 2 min after each K⁺ addition, and the end values were used to calculate the membrane potential. These values were obtained using the Nernst equation, assuming an [K⁺]_i of 120 mM, according to Chávez et al. (2013). The final cell membrane potential was obtained by linearly interpolating the theoretical Em_r values versus arbitrary units of fluorescence from each trace. For pharmacological assays, the Em_r of Slo3-transfected

CHO cells was measured in the presence of different K^+ channel inhibitors ($n = 6$).

Statistical analysis of data

Cytometry data were analyzed automatically using FACS Diva and FlowJo software. After gating to exclude debris and dead cells $\sim 12\,000$ – $15\,000$ cells were left for analysis (the average number of cells per condition/experiment is shown in Supplementary data, Tables SI and SII). We present the cytometry data as histograms of percentage of the maximum (% Max) versus fluorescence, obtained by normalizing to the peak height at the mode of the distribution—so the maximum y-axis value in the absolute-count histogram becomes 100% of total. The histograms, mean (arithmetic mean), standard deviation (SD) and geometric mean (GM) were automatically calculated by FlowJo Software. The average mean and the average GM per experimental condition and their corresponding SD were calculated according to supplementary equations and presented in Supplementary data, Tables SI and SII. All these parameters were compared with their corresponding control and analyzed using a *t*-test.

The percentage of inhibition was calculated as follows: cytometry data allows us to determine directly the number of cells with a given fluorescence. To consider that a cell was hyperpolarized we established a fluorescence intensity threshold, or gate, which was defined as the fluorescence intensity value reached at the point where the log distribution of non-capacitated cells (considered as non-hyperpolarized) included up to 95% of the total number of events counted in this condition (95th centile). A cell with a fluorescence intensity value equal to or higher than the fluorescence intensity gate was considered as hyperpolarized. We then compared the number of cells that were hyperpolarized in the presence of an inhibitor (in the same sperm batch) and calculated the % of inhibition according to the equation presented in Supplementary data, Tables SIII and SIV. These tables show the average number of hyperpolarized cells, the average of total cells counted, the average of percentage of inhibition, the SD and the standard error of the mean (SEM) of the percentage of inhibition.

Statistical analysis was performed using the R 2.11.1 program (The R foundation for statistical computing, 2010). Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for multiple comparisons were used to compare either the percentages of inhibition of the capacitation-induced hyperpolarization or the values of E_m , of control or hSlo3-transfected CHO cells in the absence or presence of different K^+ channel blockers. Data were expressed as the mean \pm SEM. A $P < 0.05$ was considered significant. All the experiments were repeated at least three times

Results

A subpopulation of human sperm hyperpolarizes under capacitating conditions

We set out to determine whether it would be possible to identify a subpopulation of hyperpolarized human sperm using flow cytometry—a technique that provides information for a large population of cells, but with single-cell resolution. As a proof of concept we first demonstrated that we were able to detect pH_i , $[Ca^{2+}]_i$ and E_m changes, by artificially increasing these parameters using NH_4Cl (20 mM), ionomycin (20 μM) or valinomycin (1 μM), respectively. These results are shown in Supplementary data, Fig. S1. Then we detected the increase of pH_i and $[Ca^{2+}]_i$, known to occur during capacitation using this technique (Supplementary data, Fig. S2). We were indeed able to detect the expected shift to the right in fluorescence values, indicating that both parameters increased in a subpopulation of human sperm upon incubation under capacitating conditions. Next, we proceeded to explore

whether it was possible to identify a hyperpolarized subpopulation of cells in capacitated versus non-capacitated sperm samples using the Em-sensitive dye DiSC₃(5). Figure 1 shows a representative flow cytometry experiment. A plot of cell complexity (SSC-A) versus cell size (FSC-A) is shown in A (Fig. 1A). The population was gated to eliminate cell debris and aggregates (Fig. 1B); the selection of individual cells was confirmed using the plot of FSC-H versus FSC-A that should give a straight line (Fig. 1C). In order to analyze selectively only the Em of living cells, we always co-stained sperm with PI (5 min prior to acquiring the data); normally we obtained a cellular viability $>90\%$. In non-capacitating conditions, we observed that the fluorescence intensities in the sperm population showed a log-normal distribution with a range of relative fluorescence intensity from 5 000 up to 40 000. In capacitating conditions, a subpopulation of live capacitated cells exhibited a higher DiSC₃(5) fluorescence indicating hyperpolarization of the plasma membrane potential (Fig. 1D–F). In this case the range of relative fluorescence intensity was from 3 000 up to 60 000. The mean and the GM for both non-capacitated and capacitated conditions are shown in Supplementary data, Table SI, the difference between them was statistically significant ($P = 0.001$). However, we found a large heterogeneity in the percentage of hyperpolarized sperm among samples from different individuals. Despite this large heterogeneity, in 16 out of 18 experiments a subpopulation of hyperpolarized cells in spermatozoa exposed to capacitating conditions was observed. Figure 2 shows three representative examples of a small (Fig. 2A), a medium (Fig. 2B) or a large hyperpolarized subpopulation during capacitation (Fig. 2C). Correlation analysis of high $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i sperm subgroups versus the percentage of cells in hyperpolarized subpopulations indicated a strong correlation between high $[Ca^{2+}]_i$ and hyperpolarization variables in capacitated sperm ($\rho = 0.96$), whereas a non-linear Spearman's correlation was observed for high pH_i and hyperpolarized variables ($\rho = 0.95$) (Supplementary data, Fig. S3).

Slo3 channels are expressed in human sperm

Membrane proteins from human sperm were separated by SDS-PAGE and probed with an antibody against Slo3. A band of the predicted molecular mass of 130 kiloDaltons (kDa) was observed as well as band with lower molecular weight (probably due to protein degradation). Both bands were not detected when the sample was incubated with the pre-immune serum or with the mixture of the antibody and the antigenic peptide (Fig. 3).

Human sperm hyperpolarization depends on a K^+ permeability increase sensitive to Slo I and Slo3 K^+ channels inhibitors

To characterize the role of K^+ flux and the channel(s) involved in human sperm hyperpolarization, we incubated the cells in the presence of high K^+ (60 mM) and in the presence of several K^+ channel antagonists. Figure 4 shows representative results indicating that high $[K^+]_o$ completely inhibited the hyperpolarization observed in sperm samples in all cases ($96.6 \pm 1.7\%$; $n = 11$), strongly suggesting that this process depends on a K^+ permeability. This hyperpolarization was partially sensitive to Ba^{2+} (1 mM), TEA^+ (60 mM) and clofilium (50 μM) with 74.1 ± 10.5 , 78.0 ± 12 and $74.2 \pm 12.5\%$ of blockade, respectively. In order to explore the possible participation of other K^+ channels, capacitated sperm were incubated with TEA^+ (10 mM), charybdotoxin

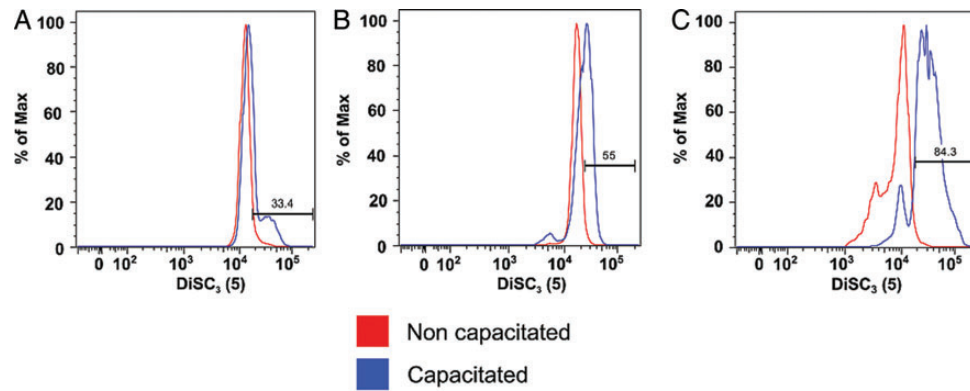


Figure 2 The membrane hyperpolarization associated with capacitation exhibits a high variability among donors. Histograms of percentage of the maximum (% Max) versus DiSC₃(5) fluorescence for non-capacitated (red) and capacitated (blue) sperm. Three representative experiments from different donors, illustrating a low (**A**; 33.4%), medium (**B**; 55%) and high (**C**; 84.3%) percentage of hyperpolarized sperm subpopulation in capacitating conditions.

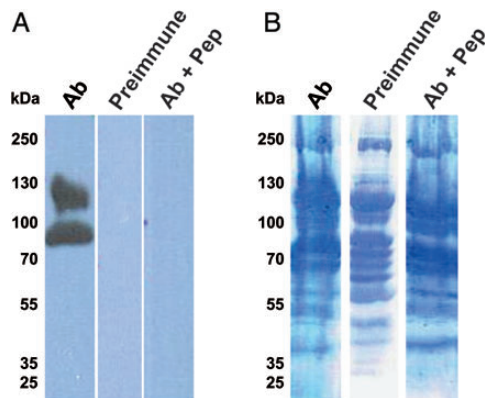


Figure 3 The presence of Slo3 in human sperm is confirmed by immunoblotting. Immunoblotting experiments using protein extracts from human sperm cells. (**A**) The left lane (Ab) shows the signal with the anti-Slo3 antibody (UI493), the middle lane corresponds to samples incubated with the serum before the immunization (Preimmune) and the right lane shows the signal of the anti-Slo3 antibody preincubated with the antigenic peptide (Ab + Pep). (**B**) The Immobilon P membrane was stained with amido black to show that similar amounts of protein were transferred to the membrane in each lane. The molecular weight markers in kiloDaltons (kDa) are shown to the left of each panel. The results presented are representative of at least three independent experiments from three different semen donors.

(CbTX, 100 nM), slo toxin (SloTX, 100 nM) or iberiotoxin (IbTX, 100 nM). Hyperpolarization was inhibited by 60.4 ± 10.4 , 69.5 ± 8.9 , 52.6 ± 14.7 and $55.5 \pm 9.2\%$ with TEA⁺, CbTX, SloTX and IbTX, respectively. At 10 mM, TEA⁺ acts as a general K⁺ channel inhibitor but only partially inhibits Slo3 channel currents; CbTX, SloTX and IbTX are more specific for Slo1, suggesting that at least two different K⁺ channels (probably Slo1) participate in the capacitation-associated hyperpolarization in human sperm. Consistently, sperm hyperpolarization was insensitive to TTX (60 nM), a voltage-dependent Na⁺ channel blocker, with a negligible percentage of blockade. Intriguing results

were obtained when combining the blockers used above. The presence of clofilium with either IbTX, SloTX or TEA (10 mM) decreased the % of inhibition of the hyperpolarization compared with each inhibitor alone. In contrast, combining CbTX with either clofilium or IbTX produced the same inhibition as CbTX alone. The general inhibition exerted by the blockers was consistent among experiments, although we did observe some variation in the extent of blockage between samples. All comparisons were made within the same batches of sperm. The summary of the percentage of inhibition is presented in Figs 4B and 5B and flow cytometry statistical data are presented in Supplementary data, Tables SI–SIV.

Heterologous expression and pharmacological profile of hSlo3 channels in CHO cells

As an alternative strategy to characterize hSlo3 channels, we expressed them in CHO cells in order to evaluate their pharmacological profile (only mSlo3 profile has been reported) and attempt to correlate it with the inhibitory profile of the capacitation-induced hyperpolarization observed in our flow cytometry studies. First, we verified the expression of the channel in CHO cells using an anti-Slo3 antibody. Control non-transfected CHO cells showed no signal in the presence of anti-Slo3 antibody, ruling out any endogenous epitopes for this antibody (Fig. 6A, control primary Ab). In contrast, Slo3 channels were clearly detected in the plasma membrane of hSlo3- and mSlo3-transfected cells (Fig. 6A, hSlo3 or mSlo3 primary Ab). However, most of the Slo3 signal was intracellular, probably due to its retention in an unidentified trafficking pathway organelle (Supplementary data, Fig. S4), precluding the electrophysiological recording of Slo3 macroscopic ion currents likely due to the absence of Slo3 ancillary subunits (Yang et al., 2011). On the other hand, hSlo3-transfected cells showed no signal with pre-immune sample (Fig. 6A, hSlo3 pre-immune), suggesting that the previously observed antibody signal was specific.

Although the expression of the hSlo3 channel in the plasma membrane of CHO cells was small, we proceeded with its pharmacological characterization. Using DiSBAC₂(3) as a fluorescent indicator of Em_r, we found that in our experimental conditions (0 Na⁺) the Em_r of native CHO cells was slightly depolarized (-30 ± 4 mV) (Fig. 6B and C).

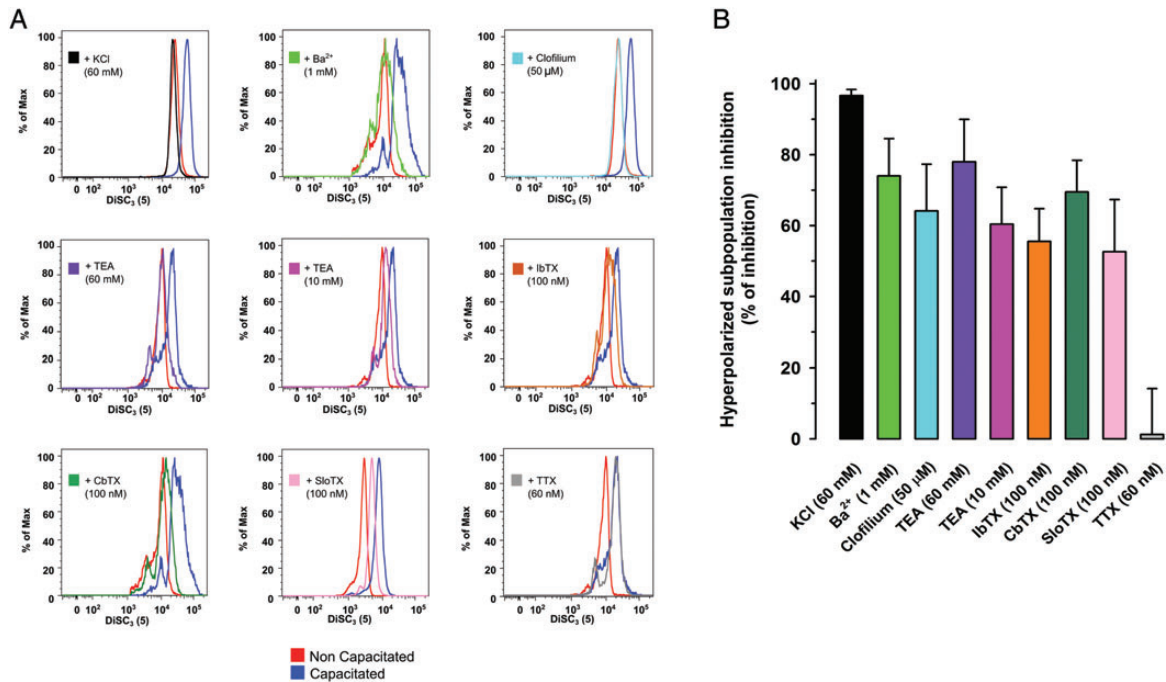


Figure 4 The capacitation-associated hyperpolarization of human sperm is inhibited by different K⁺ channel blockers. **(A)** Histograms of percentage of the maximum (% Max) versus DiSC₃(5) fluorescence for non-capacitated (red) and capacitated (blue) sperm incubated with different blockers: KCl 60 mM (black), Ba²⁺ 1 mM (light green), clofilium 50 μM (aqua blue), TEA 60 mM (purple), TEA 10 mM (pink), IbTX 100 nM (orange), CbTX 100 nM (green), SloTX 100 nM (light pink) and TTX 60 nM (gray), an Na⁺ Channel inhibitor, a negative control. The shift to left in the fluorescence traces in the presence of inhibitor indicates that the hyperpolarization was inhibited, the percentage of inhibition is presented in **(B)**. The bars represent the mean ± SD of *n* = 5–16. In all cases, *P* < 0.01.

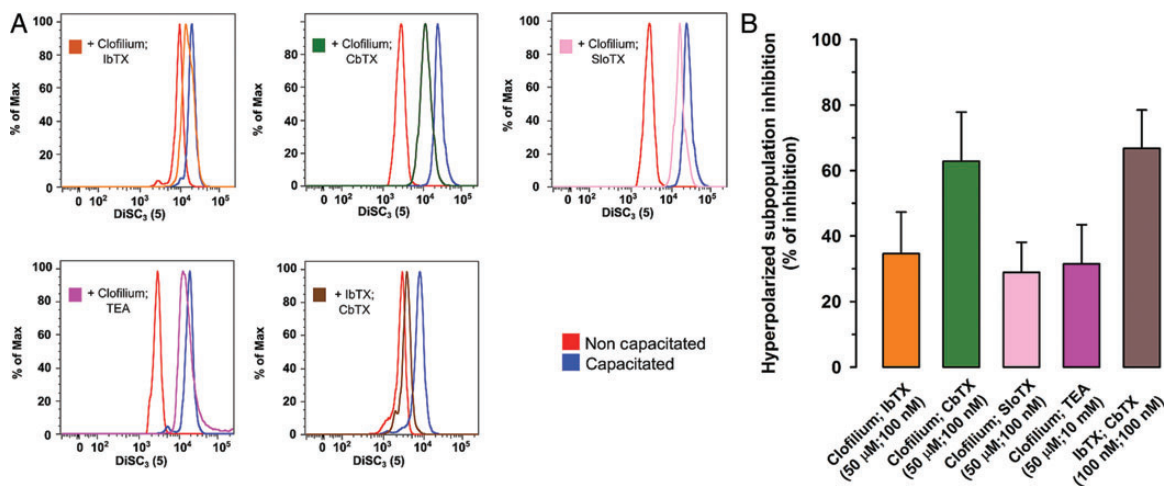


Figure 5 Combining two K⁺ channel blockers did not produce an additive inhibition of the capacitation-induced membrane hyperpolarization. **(A)** Histograms of percentage of the maximum (% Max) versus DiSC₃(5) fluorescence for non-capacitated (red) and capacitated (blue) sperm incubated with different combinations of K⁺ channel blockers: clofilium 50 μM + IbTX 100 nM (orange), clofilium 50 μM + CbTX 100 nM (green), clofilium 50 μM + SloTX 100 nM (light pink), clofilium 50 μM + TEA 10 nM (pink) and IbTX 100 nM + CbTX 100 nM (brown). The shift to left in the fluorescence traces in the presence of inhibitor indicates that the hyperpolarization was inhibited, the percentage of inhibition is presented in **(B)**. Bars represent the mean ± SD of *n* = 5–6. In all cases, *P* < 0.01.

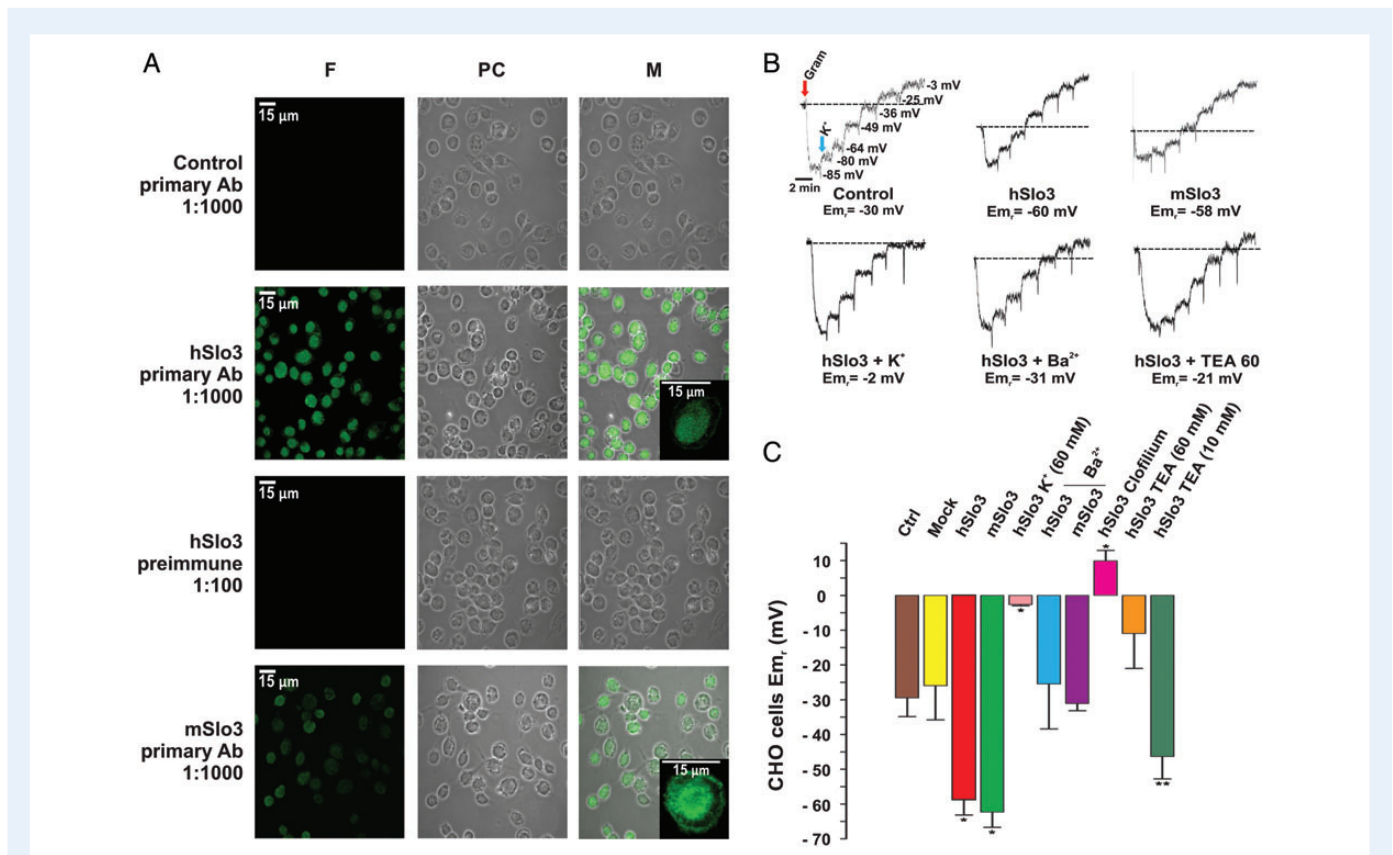


Figure 6 Expression of hSlo3 in CHO cells shifts the E_{m_r} to more hyperpolarized values. **(A)** Immunodetection of hSlo3 expressed in CHO cells. Control CHO cells showed no endogenous epitope for the anti-hSlo3 antibody (first row images); however, hSlo3 (second row) or mSlo3 (fourth row) transfected CHO cells presented a strong signal in the presence of anti-hSlo3 antibody, which is not observed if transfected cells were incubated with the pre-immune sample (third row). Inserts show the confocal slides of Slo3-transfected CHO cells demonstrating the membrane expression of Slo3 channels and the retained channels within intracellular organelles. In all cases F, PC and M columns correspond to fluorescence, phase contrast and merge images, respectively. **(B)** Representative plots of fluorescence traces at different experimental conditions. Gramicidin ($1 \mu\text{M}$) and K^+ calibration additions are indicated by red and blue arrows, respectively. The theoretical membrane potential values for each K^+ addition are shown in the control trace, the same calibration protocol was applied in all experiments. The E_{m_r} value estimated according to the calibration appears below each trace. **(C)** The average E_{m_r} of either hSlo3 (hSlo3 bar) or mSlo3 (mSlo3 bar) transfected CHO cells is hyperpolarized with respect to control non-transfected cells (Ctrl or mock bars). This hyperpolarization reverts when cells are exposed to a high external K^+ concentration (60 mM) (hSlo3 K^+). Ba^{2+} (1 mM; hSlo3 Ba^{2+} bar), clofilium (60 nM; hSlo3 clofilium bar) and TEA^+ (60 mM; hSlo3 TEA bar) strongly inhibited the hSlo3 induced E_{m_r} hyperpolarization, whereas TEA^+ (10 mM; hSlo3 TEA bar) produced a partial inhibition. The bars represent the mean \pm SEM of $n = 6$ experiments. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P \leq 0.05$ compared with ctrl condition.

Mock-transfected cells, using an empty vector, also showed a depolarized E_{m_r} (-26 ± 9 mV) close to that of native CHO cells, ruling out a non-specific effect on membrane potential solely due to vector transfection. In contrast, CHO cells transfected with hSlo3 or mSlo3 channels exhibited a hyperpolarized E_{m_r} , of -59 ± 4 and -62 ± 4 mV, respectively, strongly suggesting the functional expression of Slo3 channels. The hyperpolarized E_{m_r} in transfected CHO cells was very sensitive to high $[\text{K}^+]_o$ (60 mM), Ba^{2+} (1 mM), TEA^+ (60 mM) and clofilium (50 μM) with E_{m_r} of -3 ± 0.3 , -25 ± 12 , -11 ± 5 and 9 ± 3 mV, respectively, whereas the hyperpolarized E_{m_r} in CHO cells was partially inhibited by 10 mM TEA^+ (-46 ± 6 mV) (Fig. 6C), consistent with the pharmacological profile reported for mSlo3 (Martínez-López et al., 2009; Tang et al., 2010).

Altogether our data suggest the participation of hSlo3 and Slo1 K^+ channels in the hyperpolarization observed in capacitated human

sperm, but due to the differential sensitive and non-strict specificity of the blockers used, the participation of other K^+ channels cannot be ruled out.

Discussion

Various findings suggest that hyperpolarization is essential for sperm to acquire the ability to undergo a physiological AR. These observations lead to the proposal that an E_{m_r} hyperpolarization is necessary and sufficient for the AR to take place (De La Vega-Beltran et al., 2012). Despite the importance of this event in fertilization of several species, human sperm membrane hyperpolarization during capacitation has not been established. Several studies have measured human sperm membrane potential but have not compared in detail non-capacitated versus capacitated cells. For example, Linares-Hernandez et al. (1998) reported that

membrane potential of non-capacitated human spermatozoa (no incubation after sperm separation from semen) lays around -40 ± 16 mV and *Patrat et al.* (2002) reported a value of -58 ± 2 mV after capacitation. Considering only the values from these papers one can infer that a hyperpolarization took place during capacitation; however, their experimental conditions such as time of incubation and composition of solutions were quite different and the values cannot be compared directly. In all cases the $E_{m,r}$ for non-capacitated sperm was measured immediately after the separation of sperm, instead of what is normally done at least for mouse sperm, where sperm cells are incubated for the same amount of time in media that either support or do not support capacitation (absence of BSA). Interestingly, there is a study by *Calzada and Tellez* (1997) aimed to compare the $E_{m,r}$ of sperm cells from fertile versus non-fertile individuals in solutions with different ionic compositions. They found that regardless of the ionic composition of the media, sperm from fertile men always display a more hyperpolarized $E_{m,r}$ (-75 to -35 mV) compared with sperm from infertile men (-35 to -10 mV), suggesting that $E_{m,r}$ plays an important role in sperm fertility.

Prior to the present report, there is only one flow cytometry study, in which *Brewis et al.* (2000) reported that capacitation in human sperm is associated with a hyperpolarization. However, this study did not determine the percentage of hyperpolarized cells observed after sperm capacitation neither the statistical significance of the results nor the identity of the molecular entities involved in the hyperpolarization. In our study we confirmed that using flow cytometry, it is possible to clearly distinguish a subpopulation of hyperpolarized human sperm after capacitation. We explored a significant number of donors (19 individuals) and observed that in average $57 \pm 23\%$ of the sperm population shifted to a more hyperpolarized $E_{m,r}$ under capacitating conditions. However, the percentage of hyperpolarized cells among different donors is highly variable (see Fig. 2). This large variability may explain why the hyperpolarization associated with capacitation has not been detected in human sperm using conventional fluorometry, in which only average values are obtained that may mask the difference among subpopulations. The presence of hyperpolarized sperm subpopulations has also been recorded in mouse sperm. *Arnoult et al.* (1999) measured $E_{m,r}$ in individual mouse spermatozoa using di8-ANEPPS, a fast voltage sensitive dye and documented that capacitated mouse sperm consisted of at least two groups: one hyperpolarized (~ -80 mV) possibly representing capacitated spermatozoa and another of non-capacitated cells with a resting $E_{m,r} \sim -43$ mV.

Previous work from several laboratories including ours have proposed the involvement of epithelial Na^+ channels, CFTR, K^+ channels and other Cl^- transporters during mouse sperm membrane hyperpolarization. In spite of this, *Chávez et al.* (2013) recently reported that although mouse sperm $E_{m,r}$ before capacitation is governed by K^+ , Cl^- and Na^+ permeabilities, the hyperpolarization observed during this process is mainly due to the pH_i activation of Slo3 channels. It is becoming apparent that there are differences of quantity and biophysical characteristics of the ion channels present in diverse mammalian sperm species possibly tailoring their function to female genital tract characteristics. At the beginning of this study, the presence of Slo1 or Slo3 had not been documented in human sperm, although the latter has now been heterologously expressed and electrophysiologically recorded in oocytes by *Leonetti et al.* (2012). Very recently *Mansell et al.* (2014) reported the presence of at least three distinct cation channels in human sperm, two of which may conduct K^+ (possibly Slo1 and Slo3). We detected by western

blot analysis the presence of Slo3 channels in human sperm and tested different K^+ channel blockers to explore if Slo3 and/or Slo1 K^+ channels would have a preponderant role in the hyperpolarization of human sperm. We found that human sperm $E_{m,r}$ hyperpolarization was completely inhibited by high $[\text{K}^+]_o$ (60 mM) strongly suggesting the participation of K^+ fluxes in this process. This hyperpolarization displayed a differential sensitivity to various K^+ channel blockers; Ba^{2+} (1 mM), TEA⁺ (60 mM) and clofilium (50 μM) strongly inhibited indicating the participation of Slo3 K^+ channels. Previous reports indicate that Ba^{2+} at this concentration acts as a general K^+ channel inhibitor, whereas the last two compounds are more specific Slo3 K^+ channel blockers (reviewed in *Navarro et al.*, 2007; *Tang et al.*, 2010). TEA⁺ (10 mM), charybdotoxin (CbTX, 100 nM), slo toxin (SloTX, 100 nM) and iberiotoxin (IbTX, 100 nM) inhibited to a similar extent the hyperpolarization, suggesting the contribution of Slo1 channels.

The hyperpolarization was insensitive to tetrodotoxin (TTX, 60 nM) ruling out the participation of voltage-dependent Na^+ channels. The development of Slo K^+ channel inhibitors of greater specificity can help provide more precise information about the contribution of Slo3 and/or Slo1 K^+ channels in human sperm membrane hyperpolarization.

Altogether our results suggest the presence of different K^+ channels within the human sperm membrane, which could contribute to determine $E_{m,r}$ and/or participate in the hyperpolarization observed during capacitation. Interestingly, in mouse sperm the capacitation-induced hyperpolarization mainly depends on Slo3 channels. Our pharmacological results suggest that in human sperm different K^+ channels may be necessary to achieve the hyperpolarization of the membrane potential during capacitation. This is consistent with the recent report by *Mansell et al.* (2014), which suggests that the channel repertoire of human sperm is more complex as previously envisioned. For example, *Mannowetz et al.* (2013) reported that the main K^+ channel that can be recorded electrophysiologically in human sperm is Slo1, which is located at the flagella. In this work they show that the K^+ current recorded in non-capacitated human sperm is regulated by Ca^{2+} but not by pH_i . The current is almost completely inhibited ($\sim 80\%$ of inhibition) by two different Slo1 channel inhibitors, namely CbTX (1 μM) and IbTX (100 nM); whereas paxilline (100 nM), a third Slo1 inhibitor, blocked only 60% of the sperm K^+ current. In the present report, CbTX (100 nM), SloTX (100 nM) and IbTX (100 nM) partially inhibited the capacitation-associated hyperpolarization (between 55 and 70%), consistent with the presence of Slo1 K^+ channels in human sperm. However, incubation of capacitated human sperm with clofilium (50 μM), a more specific Slo3 blocker also inhibited the capacitation-associated hyperpolarization by $\sim 65\%$, suggesting that Slo3 channels are also relevant in this maturational process. Indeed, Slo3 channels are expressed in human sperm as determined by western blot analysis using swim-up isolated sperm to avoid contamination from other cell types (Fig. 3). Although we tried to confirm these results by doing immunocytochemistry, our antibodies did not yield reliable signals. Recently, human sperm Slo3 channels were heterologously expressed in *Xenopus* oocytes (*Leonetti et al.*, 2012) where they were found to be activated by intracellular alkalinization. Unfortunately, the authors did not perform a pharmacological profile. Expressing hSlo3 channels in CHO cells we indirectly demonstrated their sensitivity to clofilium (50 μM), as it was shown for Slo3 currents in mouse sperm (*Zeng et al.*, 2011). In contrast, a previous report showed that Slo1 channels are insensitive to clofilium (100 μM) (*Fernández-Fernández et al.*, 2002). Consistently

with previous reports in the same ionic conditions, we found that Em_o of CHO cells was depolarized, probably due to low endogenous K⁺ channel expression in these cells and the potential opening of endogenous swelling-activated Cl⁻ currents (Gabriel et al., 1992; Skryma et al., 1994; Li et al., 2000; Punke et al., 2003; Gamper et al., 2005).

The pharmacological profile observed for the capacitation-associated hyperpolarization in human sperm could be explained by at least by two hypotheses: (i) Slo1 and Slo3 homotetramers participate in the signaling cascade involved in the capacitation-induced hyperpolarization explaining why it is inhibited to the same extent by Slo1 or Slo3 channel antagonists or (ii) Slo1 and Slo3 channels form heterotetramers resulting in a functional channel with a distinct pharmacological profile. Our results combining blockers did not cause an additive inhibition, instead in most cases it caused a smaller effect than the individual blockers, except for the CbTx/lbTx and clofilium/CbTx combinations. These results were very reproducible ($n = 5$), although difficult to understand. It is possible that if the human sperm K⁺ channels are formed by heterotetramers of different Slo subunits, the interaction of both toxins/blockers may be sterically hindered in such a way that neither of them may exert their full action. In the other cases, if the blockers target the same channel, the resultant inhibition is the same as when just one of the blockers is present. Though, we favor the hypothesis of the presence of Slo heterotetramers in human sperm, both proposals deserve further investigation.

Supplementary data

Supplementary data are available at <http://molehr.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

The authors thank Andrés Saralegui, José Luis De la Vega, Xóchitl Alvarado, Yoloxóchitl Sánchez, Shirley Ainsworth, Elizabeth Mata, Erika Melchy, Graciela Cabeza and Marcela Ramírez for technical assistance. We thank Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez, and Arturo Ocádiz for computer services.

Authors' roles

I.L.G., P.T.R., O.S.C. and A.S.L. contributed substantially to the acquisition and analysis of data; drafting the article and final approval of the version to be published. I.L.G., A.D., C.M.S. and C.L.T. substantially contributed to the study design, revising critically the article for important intellectual content and final approval of the version to be published. C.L.T. managed the project.

Funding

This work was supported by National Institute of Health (NIH) Grants R01 HD038082-07A1 and R01HD069631-04 (to Pablo Visconti subcontract to A.D. and to C.S., respectively), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico) (99333 to C.T., 84362 to I.L.G. and 128566 to A.D. and C.T.; Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/UNAM) (IN225406 to A.D., IN217210: IN204914 to I.L.G. and IN202212-3 to C.T.); The Alexander von Humboldt Foundation (to C.T.).

Conflict of interest

None declared.

References

- Aitken RJ, Irvine S, Kelly RW. 3', 5'-monophosphate in the mechanisms by which prostaglandins influence human sperm function. *J Reprod Fertil* 1986;**77**:451–462.
- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:13004–13009.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:6757–6762.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krauzs C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Cell Biol* 1991;**12**:323–330.
- Brewis IA, Morton IE, Mohammad SN, Browes CE, Moore HD. Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J Androl* 2000;**21**:238–249.
- Calzada L, Tellez J. Defective function of membrane potential (psi) on sperm of infertile men. *Arch Androl* 1997;**38**:151–155.
- Chávez JC, de la Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, Santi CM. Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One* 2013;**8**:e60578.
- De La Vega-Beltrán JL, Sánchez-Cárdenas C, Krapf D, Hernández-González EO, Wertheimer E, Treviño CL, Darszon A. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem* 2012;**287**:44384–44393.
- Demarco I, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW, Visconti PE. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2003;**278**:7001–7009.
- Espinosa F, Darszon A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. *FEBS Lett* 1995;**372**:119–125.
- Fernández-Fernández JM, Nobles M, Currid A, Vázquez E, Valverde M. Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J of Physiol Cell Physiol* 2002;**283**:C1705–C1714.
- Figueiras-Fierro D, Acevedo JJ, Martínez-López P, Escoffier J, Sepúlveda FV, Balderas E, Darszon A. Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm. *J Cell Physiol* 2013;**228**:590–601.
- Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1469**:197–235.
- Gabriel SE, Price EM, Boucher RC, Stutts MJ. Small linear chloride channels are endogenous to nonepithelial cells small linear chloride channels are endogenous to nonepithelial. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992;**263**:708–713.
- Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Tox Met* 2005;**51**:177–185.
- García-valdes J, Zamudio FZ, Toro L, Possani LD. Slotoxin, KKTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between K and K + L (L1 or L4) complexes. *FEBS Lett* 2001;**505**:369–373.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Visconti PE. Sodium and epithelial sodium

- channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 2006;**281**:5623–5633.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:4892–4896.
- Lee HC. A membrane potential-sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. *J Biol Chem* 1984;**259**:15315–15319.
- Lee HC. The voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe. *J Biol Chem* 1985;**260**:10794–10799.
- Leonetti MD, Yuan P, Hsiung Y, Mackinnon R. Functional and structural analysis of the human SLO3 pH- and voltage-gated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;**109**:19274–19279.
- Leung YM, Kwan CY, Daniel EE. Block of inwardly rectifying K⁺ currents by extracellular Mg²⁺ and Ba²⁺ in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;**78**:751–756.
- Li X, Shimada K, Showalter L, Weinman S. Biophysical properties of CIC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J Biol Chem* 2000;**275**:35994–8.
- Liévano A, Santi CM, Serrano CJ, Treviño CL, Bellvé R, Hernández-Cruz A, Darszon A. T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 1996;**388**:150–154.
- Linares-Hernandez L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gomez JJ, Gonzalez-Martinez MT. Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1998;**1372**:1–12.
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 2010;**140**:327–337.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 2011;**471**:387–391.
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 2012;**74**:453–475.
- Mannowitz N, Naidoo NM, Choo S-AS, Smith JF, Lishko PV. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *eLife* 2013;**2**:e01009.
- Mansell S, Publicover S, Barratt C, Wilson S. Patch clamp studies of human sperm under physiological ionic conditions reveal three functionally and pharmacologically distinct cation channels. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**:392–408.
- Martínez-López P, Santi CM, Treviño CL, Ocampo-Gutiérrez AY, Acevedo JJ, Alisio A, Darszon A. Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**381**:204–209.
- Martínez-López P, Treviño CL, de la Vega-Beltrán JL, De Blas G, Monroy E, Beltrán C, Darszon A. TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J Cell Physiol* 2011;**226**:1620–1631.
- Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie A, Sánchez-Guevara Y, Treviño CL. Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp* 2013;**75**:e50344.
- McPartlin LA, Visconti PE, Bedford-Guauz SJ. Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biol Reprod* 2011;**85**:179–188.
- Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Develop Biol* 2001;**234**:261–274.
- Narahashi T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008;**84**:147–154.
- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:7688–7692.
- Orta G, Ferreira G, José O, Treviño CL, Beltrán C, Darszon A. Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol* 2012;**590**:2659–2675.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer M, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;**38**:1171–1180.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biol Reprod* 2002;**66**:1775–1780.
- Punke M, Licher T, Pongs O, Friederich P. Inhibition of human TREK-1 channels by bupivacaine. *Anesth Analg* 2003;**13**:1665–1673.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001;**413**:603–609.
- Santi CM, Butler A, Kuhn J, Wei A, Salkoff L. Bovine and mouse SLO3 K⁺ channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J Biol Chem* 2009;**284**:21589–21598.
- Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 2010;**584**:1041–1046.
- Skryma R, Prevarskaya N, Vacher P, Dufy B. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *FEBS Lett* 1994;**349**:289–294.
- Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011;**471**:382–386.
- Tang Q-Y, Zhang Z, Xia X-M, Lingle CJ. Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels* 2010;**4**:22–41.
- Thomas P, Meizel S. An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res* 1988;**20**:397–411.
- Von Beckerath N, Dittrich M, Klieber HG, Daut J. Inwardly rectifying K⁺ channels in freshly dissociated coronary endothelial cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1996;**491**:357–365.
- Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 2003;**5**:1117–1122.
- Wolff C, Fuks B, Chatelain P. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. *J Biomol Screen* 2003;**8**:533–543.
- Yang C, Zeng X-H, Zhou Y, Xia X-M, Lingle CJ. LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:19419–19424.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyper-polarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 1995;**171**:554–563.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-), and HCO3(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 1996;**173**:510–520.
- Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia XM. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:5879–5884.



International Journal of Pharmacy & Therapeutics

Journal homepage: www.ijptjournal.com

IJPT

PHARMACOLOGICAL IDENTIFICATION OF ENDOGENOUS SLO1 CHANNEL- β 1 SUBUNIT COMPLEXES IN CHO CELLS USING THREE α KTX1 SUBFAMILY TOXINS

Edgar Garza-López¹, Oscar Sánchez-Carranza¹, Takuya Nishigaki¹,
Ignacio López-González^{1*}

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62210, México.

ABSTRACT

Although CHO cells are an excellent cellular model for studying the biophysical properties of heterologously expressed voltage-gated K⁺ channels, this cell line has small, but significant, endogenous K⁺ conductances. Here, we show that CHO cells express at least two different endogenous K⁺ currents: the major component was inhibited by the α KTx1 subfamily toxins Charybdotoxin (CbTX), Iberitoxin, and Slotoxin but it was resistant to Clofilium; whereas the minor component was resistant to α KTx1 toxins. Consistently with the pharmacological profile, the current density of the main K⁺ current component was increased in presence of a high internal Ca²⁺ concentration (0.5 mM), suggesting this component is encoded by Slo1 K⁺ channels. The α KTx1 toxins did not affect the activation of the toxin-sensitive K⁺ current, but CbTX slowed the deactivation kinetics. In addition, the sequence of the α KTx1 toxins inhibitory potency suggests that native Slo1 channels are modulated, at least, by endogenous β 1 ancillary subunit. The presence of native β subunits could influence the biophysical properties of heterologously expressed K⁺ channels in this cell line.

Key Words:- Slo1 K⁺ channels; CHO cells; Charybdotoxin; Iberitoxin; Slotoxin; Clofilium.

INTRODUCTION

CHO cell line has constituted an excellent cellular model for studying the biophysical properties and pharmacology of heterologously expressed ion channels. In particular this cell line has been proposed as a good model for the electrophysiological characterization of voltage-gated K⁺ channels due to its low expression level of endogenous K⁺ channels (Di Veroli *et al.*, 2013; Gamper *et al.*, 2005). Interestingly there are few reports regarding the biophysical properties and pharmacology of those CHO cells endogenous K⁺ currents and no information

exists about electrophysiological or pharmacological evidence of their regulatory β subunits. Regarding ionic currents, previous studies have suggested CHO cells express at least four different types of macroscopic ion currents: a Ca²⁺-sensitive K⁺ current; Na⁺ and Ca²⁺ voltage-gated inward currents (Skryma *et al.*, 1994a); and a swelling-activated chloride current (Li *et al.*, 2000). Only the voltage-gated Ca²⁺ current was studied in more detail and it was identified as an L-type Ca²⁺ current based on its pharmacological profile (Skryma *et al.*, 1994b).

Slo1 channels (a.k.a. MaxiK, BK, or KCa1.1) are ubiquitously expressed voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels of large conductance (>200 pS) (Anderson *et al.*, 1988; Banerjee *et al.*, 2013; MacKinnon and Miller, 1988; Orio *et al.*, 2002). Despite being coded by a single gene

Corresponding Author

Ignacio López-González

Email:- iglogo@ibt.unam.mx

(*kcnma1*), Slo1 channels present a great diversity in their biophysical properties when expressed in different tissues. Channels with different kinetics and Ca^{2+} sensitivity are originated by alternative splicing; however, the most important element producing the differences between splice variants is β -subunit. Slo1 regulatory β -subunits present two transmembrane segments connected by a 120-residue extracellular loop, with cytoplasmic NH_2 - and COOH -terminals.

At present, four β -subunits ($\beta 1$ - $\beta 4$) have been cloned in mammals (Orío *et al.*, 2002). In general, β -subunit increases the stability of the open states and the apparent Ca^{2+} /voltage sensitivity of the α -subunit, also modifies Slo1 channel kinetics and alters its pharmacological properties (Dworetzky *et al.*, 1996; Meera *et al.*, 2000; Orío *et al.*, 2002).

α KTX toxins have proven to be powerful tools for testing the pharmacological, physiological, biophysical and even structural characteristics of K^+ channels. The α KTx1 Charybdotoxin subfamily (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003) are pore-blocking toxins that bind to the extracellular surface of the Slo1 channels with a 1:1 channel:toxin stoichiometry (Anderson *et al.*, 1988; Banerjee *et al.*, 2013). Charybdotoxin (CbTX), Iberiotoxin (IbTX) and Slo toxin (SloTX) are three representative members of the α KTx1 subfamily, their structure contain a triple-stranded β -sheet or a double-stranded β -sheet complemented with a third pseudo-strand at the N-terminal (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003).

Despite this structural homology, the inhibition specificity is characteristic for each toxin; whereas CbTX inhibits Slo1, $\text{K}_v1.2$ and $\text{K}_v1.3$ K^+ channels (Grissmer *et al.*, 1994), IbTX and SloTX are more specific for Slo1 (García-valdes *et al.*, 2001; Meera *et al.*, 2000). As previously mentioned, β subunits can modify the toxin sensitivity of K^+ channels. Considering the differential pharmacological profile related to the presence of a specific β subunit, toxins have been proposed as a pharmacological tools for discriminating specific K^+ channel- β subunit complexes in native tissues (García-valdes *et al.*, 2001; Meera *et al.*, 2000).

Here, we show that CHO cells express at least two different endogenous K^+ currents with distinct pharmacological sensitivity. Consistently with a previous report, the major component of the endogenous CHO cell K^+ current was inhibited by CbTX, IbTX, and SloTX but resistant to clofilium; suggesting this component is encoded by Slo1- $\beta 1$ K^+ channels. The minor component of K^+ currents was insensitive to previous mentioned Slo1 inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Charybdotoxin (CbTX), Iberiotoxin (IbTX), and Slo toxin (SloTX) were acquired from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). CbTX, IbTX, and SloTX were dissolved in a solution 10 mM HEPES, pH 7; divided into aliquots, and stored frozen until use. Clofilium tosylate (4-Chloro-N,N-diethyl-N-heptylbenzene butanamium tosylate) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO), dissolved in water to make a stock and stored at 4°C . Toxins dilution to the final concentration in the external medium was carried out daily.

Cell culture

CHO cells were maintained in culture using Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 1% antibiotics and 10% bovine fetal serum (Gibco, Life Technologies). Cells were grown in plastic Petri dishes incubated in a humidity-controlled incubator at 37°C and 5% CO_2 (VWR Scientific 2100) up to 80% of confluence.

Electrophysiology

Disaggregated CHO cells were placed on the stage of an inverted microscope (Diaphot 300, Nikon) following 3–4 days in culture, and membrane currents were recorded with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, USA) and filtered at 5 kHz (four-pole Bessel filter). Ion currents were digitized respectively using a Digidata 1440A interface (Molecular Devices, USA) and analyzed with the pCLAMP 10.3 and SigmaPlot software suites. Linear capacitive currents were minimized analogically using the capacitive transient cancellation feature of the amplifier. All experiments were carried out at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) and the holding potential (HP) was -100 mV. The recording extracellular solution contained (in mM): 160 KMeSO_4 , 1 CaCl_2 , 5 EGTA, 3 MgCl_2 , and 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-W-2-ethanesulfonic acid (HEPES). Intracellular solution contained (in mM): 160 KMeSO_4 , 5 EGTA, 3 MgCl_2 , and 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-W-2-ethanesulfonic acid (HEPES). The osmolarity of the external and internal solutions was adjusted to 290 or 265 mosmol/kg with sucrose, respectively. In both cases pH was adjusted to 7.3 with KOH. In pharmacological experiments, toxins were added to the bathing solution as indicated in the text. Patch pipettes were made from borosilicate glass and were pulled with a laser micropipette puller P-2000 (Sutter Instruments Co, USA). The typical micropipette electrical resistance was 3–8 M Ω when filled with internal solutions.

Voltage gated K⁺ Currents Recordings

Macroscopic K⁺ currents were acquired in response to 600 ms test pulses of variable amplitude at a sampling frequency of 20 kHz (50 μs). Current to voltage relationships (I–V curves) were obtained by plotting the peak amplitude of ion currents as a function of their respective membrane potential during the test pulse. For the deactivation analysis, data were obtained by fitting a curve to the tail-currents following settling of 95% of the membrane capacitance transient. In all cases, tail-currents were very well fit by a single exponential equation to determine their fast component.

Statistical analysis of data

Statistical analysis was performed using the R 2.11.1 program (The R foundation for statistical computing, 2010). Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for multiple comparisons were used to compare either the percentages of inhibition of the K⁺ current amplitude of CHO cells, in the absence or presence of different K⁺ channel blockers. Data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). A $p < 0.05$ was considered significant. All the experiments were repeated at least three times.

Results

In the present report all electrophysiological recordings were performed on acute disaggregated CHO cells under the whole-cell configuration. Cells had an average capacitance of 32 ± 10 pF ($n=17$) and input resistances in the range of 3 to 8 GΩ. In our experimental conditions (isotonic K⁺ concentration), CHO cells displayed a family of non-inactivating outward currents when we applied the indicated voltage clamp protocol (Figure 1A, control). The mean current density of endogenous K⁺ currents was $\sim 5 \pm 2$ pA/pF (Figure 1B; $n=13$).

Outward Rectifier K⁺ Currents in CHO Cells are sensitive to Charybdotoxin, Iberitoxin and SloTxin but Clofilium insensitive

It has been previously reported that Charybdotoxin (CbTX; 30 nM) inhibits around 90% of the voltage-activated K⁺ conductance present in CHO-K1 cells (Skryma *et al.*, 1994a) suggesting this K⁺ current is encoded by Slo1 K⁺ channels. In the present report we assayed two additional Slo1-specific toxins (Iberitoxin and SloTxin) to discard other potential CbTX blocking targets like K_v1.2 or K_v1.3 K⁺ channels ($K_d=14$ and 2.6 nM, respectively; reported by (Grissmer *et al.*, 1994)). Both K_v1 channels could be present in this cell line according to the CHO-K1 GenBank genome assembly

data (Kcna2 and Kcna3 genes, respectively. GenBank Assembly ID GCA_000223135.1; supplementary table 1). We confirmed that incubating CHO cells in presence of a saturating CbTX concentration (120 nM) inhibited the endogenous K⁺ current by around 80% (Figure 1A, right upper panel; and 1B). This CbTX-sensitive K⁺ current was modulated by the Ca²⁺ concentration of the internal solution. Figure 1C shows that the K⁺ current density of CHO cells increased by 5-fold in presence of Ca²⁺ (0.5 mM) respect to a nominal Ca²⁺ concentration, consistent with the Ca²⁺-dependent open probability of microscopic currents previously reported for this CHO cell K⁺ current (Skryma *et al.*, 1994a). Subtracting the CbTX-resistant component to the whole K⁺ endogenous current of CHO cells revealed the CbTX-sensitive K⁺ current of this cell line (Figure 2A, upper panel and open triangle in I-V curve). Addition of increasing concentrations of CbTX (0.1-200 nM) reduced the K⁺ current amplitude of the CbTX-sensitive component in a dose-dependent manner (Figure 2B). The dose-response curve of CbTX inhibition showed an $IC_{50}=31.0 \pm 8.8$ nM (Figure 2B, opened triangles). Similar results were obtained when Iberitoxin (IbTX) or SloTxin (SloTX) were assayed on the endogenous CHO cells K⁺ current. Addition of IbTX (120 nM) or SloTX (40 nM) reduces 80 or 60 % of the K⁺ current amplitude, respectively (Figure 1A, lower panels; and closed squares and opened diamonds in 1B, respectively). Consistently, the IbTX- or SloTX-sensitive K⁺ current component showed an I-V relationship statistically similar to the previously shown for the CbTX-sensitive component (Figure 2A right panel). The dose-response curve of IbTX inhibition reported an $IC_{50}=54.0 \pm 6.0$ nM (Figure 2B, closed squares). On the other hand, SloTX has been reported as a highly specific toxin against Slo1 channels (Garcia-valdes *et al.*, 2001). Addition of SloTX inhibited the CHO cells K⁺ current with an $IC_{50}=29.0 \pm 0.2$ nM (Figure 2C), showing the highest affinity for this current component. In all cases, the αKTx1 toxins inhibition was voltage-independent in the voltage range from +40 up to +130 mV (Figure 3A). The presence of αKTx1 toxins did not affect the voltage dependency of activation of the K⁺ current (Figure 3B), consistent with the previous description of these toxins as pore blockers rather than gating modifiers (Anderson *et al.*, 1988; Banerjee *et al.*, 2013). An interesting effect was observed regarding the K⁺ current deactivation, only CbTX slowed the deactivation process of the K⁺ current, in particular in a voltage range from +70 up to +130 mV (Figure 3C). Neither IbTX nor SloTX affected the K⁺ current deactivation kinetics.

To discard the potential contribution of Slo3 channel, another Slo K⁺ channel family member present in

the CHO cells genome (Supplementary table 1), to CHO cell macroscopic K^+ currents, we assayed Clofilium (100 μ M) which is a more specific Slo3 inhibitor (Navarro *et al.*, 2007) and does not inhibit Slo1 channels (Fernández-Fernández *et al.*, 2002). Exposing CHO cells to Clofilium did not affect their macroscopic K^+ currents (Figure 3),

indicating that nevertheless the mRNA of Slo3 K^+ channels is present in CHO cell line (supplementary table 1), Slo3 channels are not expressed in these cells or their contribution to the major component of the macroscopic K^+ current is negligible.

Figure 1. The major component of endogenous K^+ currents from CHO cells is modulated by internal Ca^{2+} concentration and it is sensitive to Charybdotoxin (CbTX), Iberiotoxin (IbTX) and Slo toxin (SloTX). A) Representative whole-cell endogenous K^+ currents of CHO cells in response to 600 ms test pulses of 10 mV steps from a holding potential of -100 mV in a voltage range from -80 up to +130 mV in absence (control) or presence of CbTX (120 nM), IbTX (120 nM) or SloTX (80 nM). Insert: peptide sequence comparisons of CbTX, IbTX and SloTX. Cystein residues appear in red. Conserved lysine that putative competes with K^+ appears in green. **B)** Representative current-voltage relationships obtained from the results shown in panel A. CbTX and IbTX (120 nM) inhibited the K^+ current to the same extent, SloTX (80 nM) was a more potent inhibitor. **C)** A high internal Ca^{2+} concentration (0.5 mM; open bar) increased the K^+ current density of the toxin-sensitive component, at +100 mV test pulse, respect to nominal Ca^{2+} (closed bar). Insert: representative traces of evoked current at +100 mV in nominal (lower trace) or high internal Ca^{2+} concentration (0.5 mM; upper trace). Right panel: Ca^{2+} -induced increment in the I-V curve of the CHO cells toxin-sensitive K^+ current (0.5 mM; open circles) compare to nominal Ca^{2+} (closed circles). In all cases symbols or bars represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$

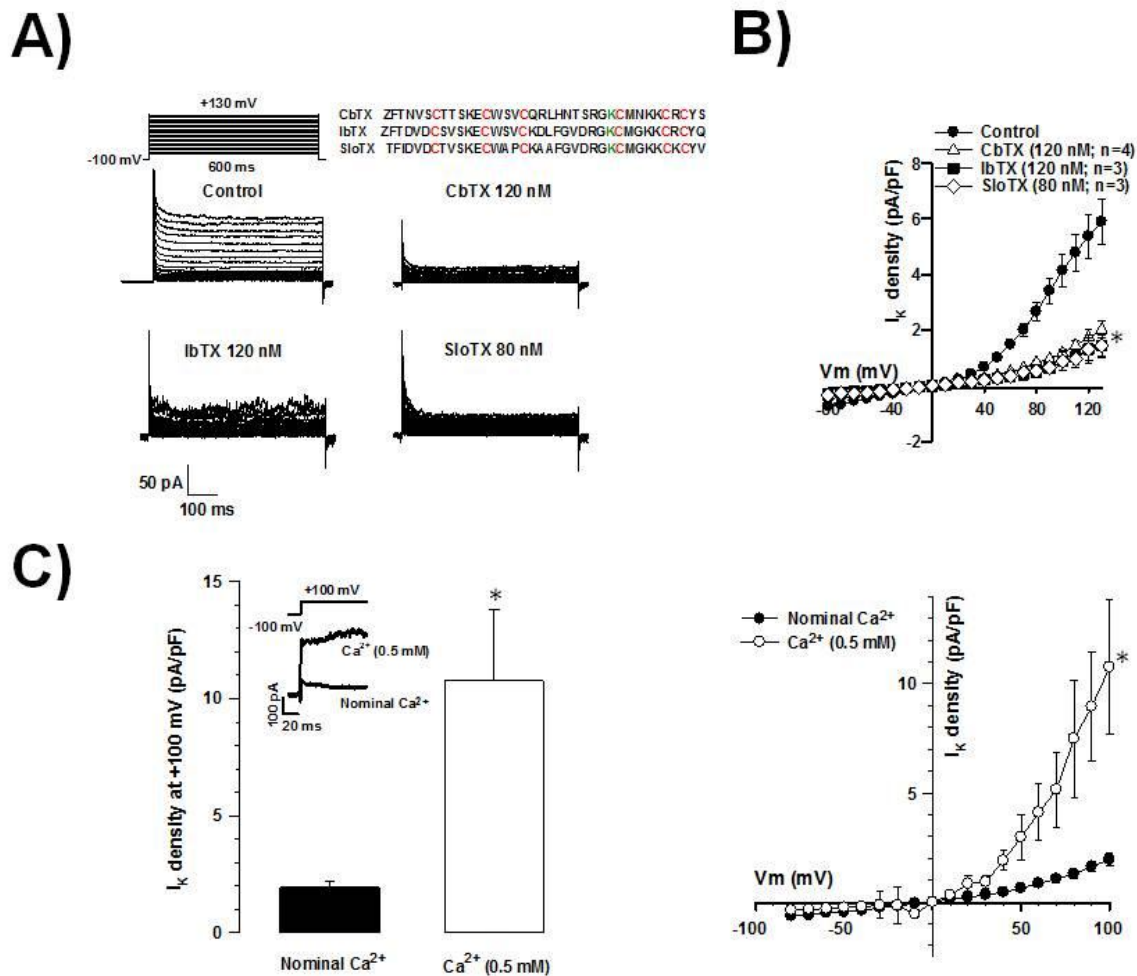


Figure 2. Toxin-sensitive component of the endogenous K⁺ currents showed a pharmacological profile similar to Slo1 channels. A) Representative current families obtained after subtracting experimental recordings treated with CbTX (120 nM), IbTX (120 nM) or SloTX (40 nM) from control recordings. Right panel: corresponding I-V relationships of current families shown in left panel. B) Dose-response curves for CbTX or IbTX inhibition. Following exposure to the indicated concentration of CbTX or IbTX, K⁺ current amplitude evoked with a +130 mV test pulse was normalized to the control at the same voltage. Smooth curves were generated with the Hill equation according to the parameters obtained from the K⁺ currents in each experimental condition (n=3-11). The IC₅₀ for CbTX and IbTX was 31.0 ± 8.8 and 54.0 ± 6.0 nM, respectively. C) CHO cell K⁺ currents were more sensitive to SloTX. Percentage of the K⁺ current inhibition in presence of SloTX (20-80 nM) (n=3-5). In all cases symbols or bars represent mean ± S.E.M.

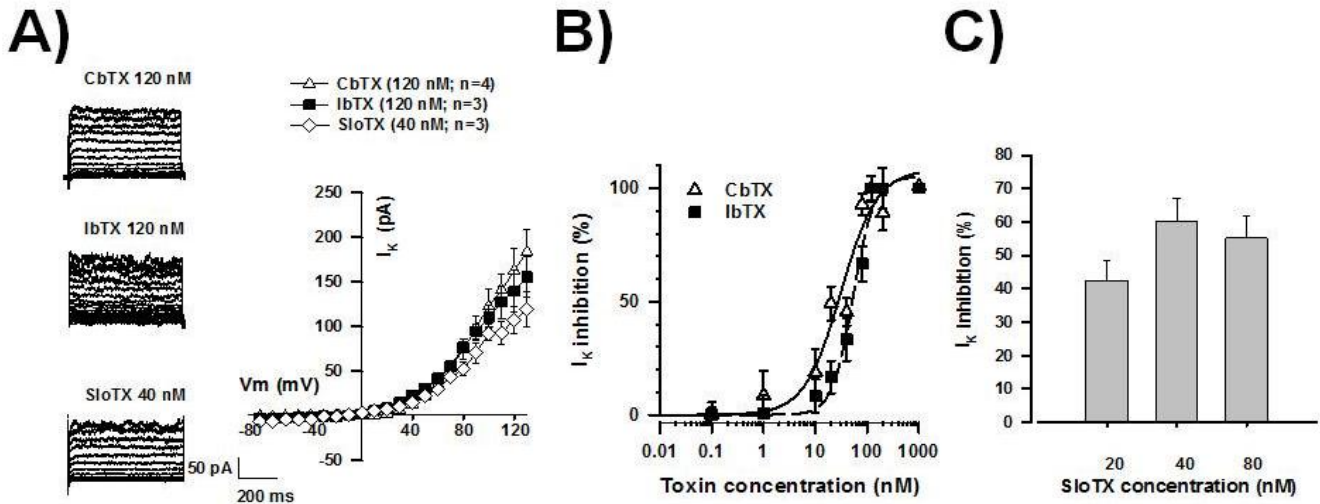


Figure 3. Differential effect of Charybdotoxin subfamily toxins on inhibition, activation and deactivation of the major component of CHO cell K⁺ currents. A) K⁺ current inhibition by α KTx1 toxins was voltage-independent in a depolarized voltage range from +60 up to +130 mV (n=3). B) Addition of α KTx1 toxins does not affect the activation curve of the major component of K⁺ currents. Symbols represent mean ± S.E.M. (n=3-10). C) CbTX (120 nM) was the only α KTx1 subfamily toxin that slowed the deactivation kinetics of endogenous K⁺ currents (n=5). In all cases symbols or bars represent mean ± S.E.M. **p*<0.05

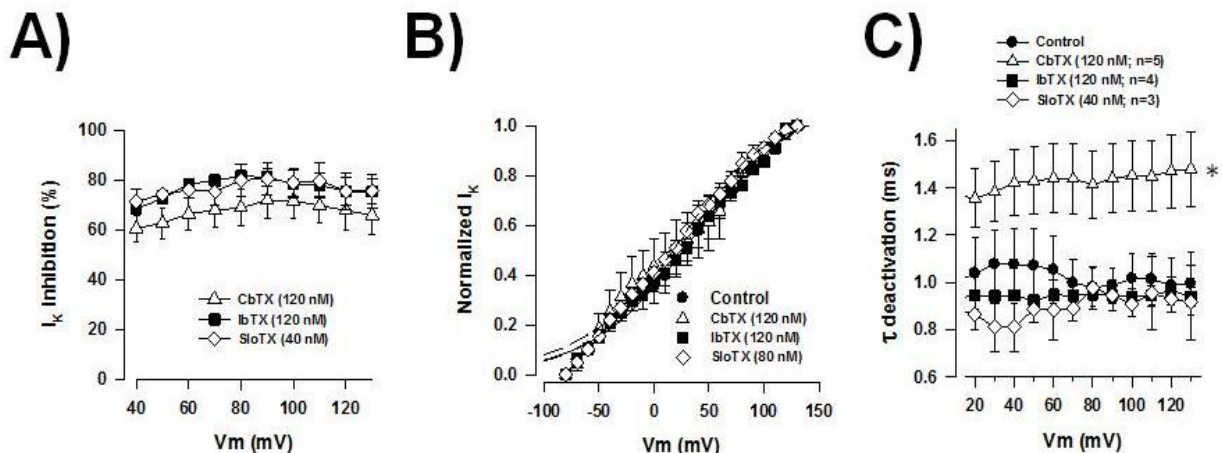
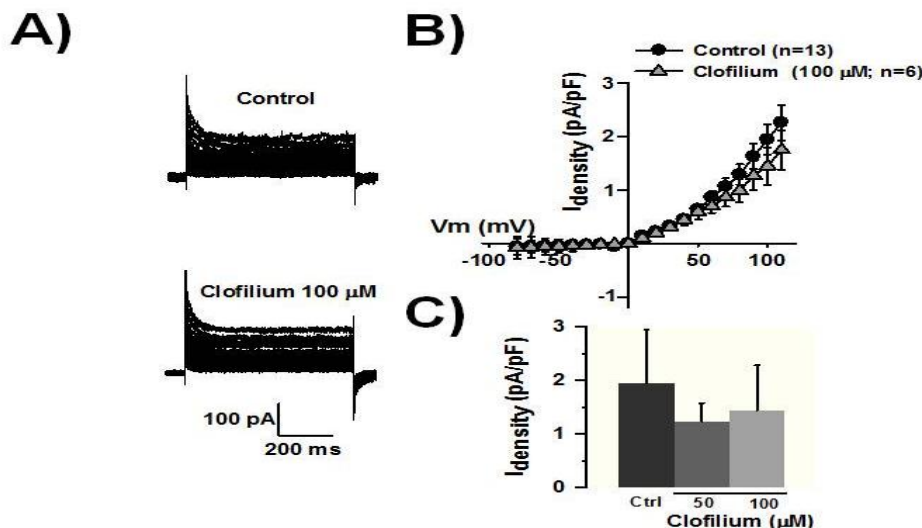


Figure 4. The major component of endogenous K⁺ currents from CHO cells is insensitive to Clofilium, a more specific Slo3 channels inhibitor. **A)** Representative whole-cell K⁺ currents before (upper traces) and after (lower traces) Clofilium addition in external solution (100 μM). **B)** Current-voltage relationships (I-V) in absence (closed circles) or presence (gray triangle) of previously mentioned Clofilium concentration (100 μM). **C)** Two different Clofilium concentrations were assayed on K⁺ current at +100 mV test pulse. K⁺ current density was not affected by the addition of Clofilium (50-100 μM). In all cases symbols or bars represent mean ± S.E.M. (n= 6-13).



DISCUSSION AND CONCLUSION

The pharmacological profile and the Ca²⁺-dependent increasing in the current density of the major component of the CHO cell K⁺ endogenous currents suggest that this αKTx1 toxin-sensitive K⁺ current could be originated by the expression of Slo1 channels. Recent genomic and proteomic data of this cell line support our hypothesis (Baycin-Hizal *et al.*, 2012; Brinkrolf *et al.*, 2013; Hammond *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2013). The mRNAs for the three Slo channel family members (namely Slo1 (kcnma1), Slo2 (kcnt1 and kcnt2) and Slo3 (kcnu1) channels); and for four different β subunits (β1 (kcmb1), β2 (kcmb2), β3 (kcmb3) and β4 (kcmb4)) are present in CHO cells (from CHO genome, supplementary table 1). Furthermore, proteomic data indicate the protein expression of at least one β1 subunit (KCNAB1) and three different β2 subunit (KCNAB2) isoforms which may interact with K⁺ channels in this cell line (Baycin-Hizal *et al.*, 2012).

Different pharmacological studies have emphasized the β subunit relevance in the large-conductance Ca²⁺- and voltage-activated K⁺ channel sensitivity to toxins (Garcia-valdes *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2012) or intracellular second messengers (Hoshi *et al.*, 2013). In the present report, the CbTX IC₅₀ was 31.0 ± 8.8 nM. Interestingly, the IbTX dose-response curve showed

this toxin exhibited the highest IC₅₀ value (54.0 ± 6.0 nM). Previous reports have shown that the Slo1 inhibition by IbTX could be modified depending on which β ancillary subunit is regulating the α1 subunit. For example, Slo1-β1, -β3 or -β4 coexpression reduces the α1 sensitivity to IbTX even at a high toxin concentration (60, 20 or 80% of current inhibition at 100 nM, respectively) (Dworetzky *et al.*, 1996; Meera *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2012); however the presence of β1 has no effect on the Slo1 inhibition by CbTX (Dworetzky *et al.*, 1996). CbTX (100 nM) completely inhibits Slo1 channels even when they are coexpressed with β1 subunits (100% of current inhibition); however β4 subunit coexpression renders Slo1 channels resistant to the same CbTX concentration (only 20% of current inhibition) (Meera *et al.*, 2000). Considering this information we suggest that in CHO cells Slo1 α subunits could be regulated, at least, by β1 subunits and therefore to be more resistant to IbTX but almost completely inhibited by CbTX (66 and 90% of current inhibition at 100 nM, respectively; Figure 2B). As previously mentioned, the CHO cell line expresses β1, β2, β3 and β4 subunit mRNAs (supplementary table 1 taken from www.chogenome.org); and the CHO proteomic data indicate the presence of, at least, the β1 subunit and three different β2 subunit isoforms in these cells (supplementary table 2 modified from (Baycin-Hizal *et al.*, 2012).

Table 1. K⁺ channels α and β subunits mRNAs present in CHO cells (from Chinese Hamster Genome Database).

Gene name	Access number (GeneBank)	Specification	Synonyms (GeneBank)
Hcn1	100753109	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium channel 1, transcript variant X1	Human: BCNG1; HAC-2; BCNG-1 Mouse: HAC2; Bcng1; C630013B14Rik
Hcn2	100751563	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium channel 2, transcript variant X1	Human: BCNG2; HAC-1; BCNG-2 Mouse: BCNG2, HAC1, trls
Hcn3	100772247	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium channel 3, transcript variant X1	Human: None Mouse: BCNG-4, Bcng4, Hac3, Hcn4
Hcn4	100758754	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium channel 4, transcript variant X1	Human: SSS2 Mouse: Bcng3, Hcn3
Kcmf1	100753827	Potassium channel modulatory factor 1, transcript variant X4	Human: DEBT91, FIGC, PCMF, ZZZ1 Mouse: 1700094M07Rik, Debt91, Pmcf
Kcnab1	100755538	Potassium Voltage-Gated channel, Shaker-related subfamily, Beta member 1, transcript variant X1	Human: AKR6A3, KCNA1B, KV-BETA-1, Kvb1.3, hKvBeta3, hKvb3 Mouse: Akr8a8, Kvbeta1.1, mKv(beta)1
Kcnab2	100765085	Potassium Voltage-Gated channel, Shaker-related subfamily, Beta member 2, transcript variant X1	Human: RP1-233K16.1, AKR6A5, HKvbeta2, HKvbeta2.1, HKvbeta2.2, KCNA2B, KV-BETA-2 Mouse: RP23-421E12.12-005, F5, l2rf5, Kcnb3, kv-beta-2
Kcnab3	100755337	Potassium Voltage-Gated channel, Shaker-related subfamily, Beta member 3, transcript variant X1	Human: AKR6A9, KCNA3.1B, KCNA3B, KV-BETA-3 Mouse: RP23-26L6.3, C330022D06Rik, Kcnab4, mKv(beta)4
Kcnb1	100759046	Potassium Voltage Gated channel, Shab-related subfamily, member 1	Human: DRK1, KV2.1, h-DRK1 Mouse: RP23-19L12.6, Kcr1-1, Kv2.1, Shab
Kcnb2	100764283	Potassium Voltage Gated channel, Shab-related subfamily, member 2	Human: KV2.2 Mouse: 9630047L19Rik, BB130875, Kv2.2
Kcng1	100758175	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily G, member 1	Human: RP5-955M13.1, K13, KCNG, KV6.1, kH2 Mouse: RP23-391M18.5, AW536275, OTTMUSG000000160
Kcng4	100773553	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily G, member 4	Human: KV6.3, KV6.4 Mouse: 4921535I01Rik, AW049024, KV6.3, KV6.4
Kcnh1	100764830	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily H 8eag-related 9, member 1	Human: EAG, EAG1, Kv10.1, h-eag Mouse: EAG1, Kv10.1, M-eag
Kcnh7	100764883	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily H 8eag-related 9, member 7	Human: ERG3, HERG3, Kv11.3 Mouse: RP23-34J8.1, 9330137I11Rik, Kv11.3, erg3
Kcnh8	100773504	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily H 8eag-related 9, member 8	Human: ELK, ELK1, Kv12.1, elk3 Mouse: C130090D05Rik, ELK, ELK1, ELK3, Kv12.1
Kcnj1	100766584	Potassium Inwardly-Rectifying channel, subfamily J, member 1	Human: KIR1.1, ROMK, ROMK1 Mouse: Kir1.1, ROMK, Romk2
Kcnj5	100766874	Potassium Inwardly-Rectifying channel, subfamily J,	Human: CIR, GIRK4, KATP1, KIR3.4, LQT13

		member 5	Mouse: GIRK4, Kir3.4
Kcnj10	100764542	Potassium Inwardly-Rectifying channel, subfamily J, member 10	Human: BIRK-10, KCNJ13-PEN, KIR1.2, KIR4.1, SESAME Mouse: BIR10, BIRK-1, Kir1.2, Kir4.1
Kcnj13	100774709	Potassium Inwardly-Rectifying channel, subfamily J, member 13	Human: KIR1.4, KIR7.1, LCA16, SVD Mouse: None
Kcnk1	100762483	Potassium channel, subfamily K, member 1	Human: RP4-550F15.1, DPK, HOHO, K2P1, K2p1.1, KCNO1, TWIK-1, TWIK1 Mouse: AI788889, TWIK-1
Kcnk2	100751502	Potassium channel, subfamily K, member 2, transcript variant X1	Human: K2p2.1, TPKC1, TREK, TREK-1, TREK1, hTREK-1c, hTREK-1e Mouse: A430027H14Rik, AI848635, TREK-1
Kcnk3	100771641	Potassium channel, subfamily K, member 3	Human: K2p3.1, OAT1, PPH4, TASK, TASK-1, TBAK1 Mouse: TASK, Task-1, cTBAK-1
Kcnk4	100760723	Potassium channel, subfamily K, member 4	Human: K2p4.1, TRAAK, TRAAK1 Mouse: MLZ-622, TRAAK, TRAAKt, Tex40
Kcnk5	100760223	Potassium channel, subfamily K, member 5	Human: K2p5.1, TASK-2, TASK2 Mouse: TASK-2
Kcnk6	100764262	Potassium channel, subfamily K, member 6, transcript variant X1	Human: K2p6.1, KCNK8, TOSS, TWIK-2, TWIK2 Mouse: D7Erd764e, Toss, Twik2
Kcnk7	100763826	Potassium channel, subfamily K, member 7	Human: K2p7.1, TWIK3 Mouse: 2310014G03Rik, Kcnk6, Kcnk8, Knot, Mlk3
Kcnk9	100756282	Potassium channel, subfamily K, member 9, transcript variant X1	Human: K2p9.1, KT3.2, TASK-3, TASK3 Mouse: Task3
Kcnk10	100750735	Potassium channel, subfamily K, member 10	Human: K2p10.1, PPP1R97, TREK-2, TREK2 Mouse: 1700024D23Rik, 3010005K24Rik, Trek2
Kcnk12	100770804	Potassium channel, subfamily K, member 12	Human: K2p12.1, THIK-2, THIK2 Mouse: mntk1
Kcnk13	100769761	Potassium channel, subfamily K, member 13	Human: K2p13.1, THIK-1, THIK1 Mouse: BB085247, F730021E22Rik, Gm1570, Gm1685
Kcnk15	100756837	Potassium channel, subfamily K, member 15, transcript variant X1	Human: K2p15.1, KCNK11, KCNK14, KT3.3, TASK-5, TASK5, dJ781B1.1 Mouse: RP23-161B3.2, KCNK11, KCNK14, KT3.3, TASK5
Kcnk16	100760808	Potassium channel, subfamily K, member 16	Human: K2p7.1, TWIK3 Mouse: 2310014G03Rik, Kcnk6, Kcnk8, Knot, Mlk3
Kcnk17	100770528	Potassium channel, subfamily K, member 17, transcript variant X1	Human: UNQ5816/PRO19634, K2p17.1, TALK-2, TALK2, TASK-4, TASK4 Mouse: None
Kcnk18	100774565	Potassium channel, subfamily K, member 18	Human: K2p18.1, MGR13, TRESK, TRESK-2, TRESK2, TRIK Mouse: Gm781, Tresk, Tresk-2, Trik

**Kcnma1	100764731	Potassium Large Conductance Calcium-Activated channel, subfamily M, alpha member 1	Human: RP11-443A13.1, BKTM, KCa1.1, MaxiK, SAKCA, SLO, SLO-ALPHA, SLO1, bA205K10.1 Mouse: RP24-486D21.1, 5730414M22Rik, BKCa, MaxiK, Slo, Slo1, mSlo, mSlo1
*Kcnmb1	100765448	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	CaKB; Calcium-activated potassium channel, beta1 subunit.
*Kcnmb2	100761612	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 2	CaKB; Calcium-activated potassium channel, beta2 subunit.
*Kcnmb3	100758210	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3, transcript variant X1, transcript variant X2, transcript variant X3	CaKB; Calcium-activated potassium channel, beta3 subunit.
*Kcnmb4	100754855	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4, transcript variant X1	CaKB; Calcium-activated potassium channel, beta4 subunit.
Kcnq1	100761481	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily Q, member 1	Human: ATFB1, ATFB3, JLNS1, KCNA8, KCNA9, KVLQT1, Kv1.9, Kv7.1, LQT, LQT1, RWS, SQT2, WRS Mouse: AW559127, KVLQT1, Kcna9
Kcnq5	100773342	Potassium Voltage-Gated channel, subfamily Q, member 5	Human: RP11-257K9.5, Kv7.5 Mouse: 7730402H11, 9230107O05Rik, AA589396, D1Mgi1
Kcnrg	100753429	Potassium channel regulator	Human: RP11-34F20.6, DLTET Mouse: C1ld4, E030012H22Rik, Gm745
Kcnt1	100758898	Potassium channel, subfamily T, member 1, transcript variant X1	Human: RP11-100C15.1, EIEE14, ENFL5, KCa4.1, SLACK, bA100C15.2 Mouse: RP23-123F7.3, C030030G16Rik, Slack, mKIAA1422, slo2
Kcnt2	100768557	Potassium channel, subfamily T, member 2, transcript variant X1	Human: RP11-58O13.1, KCa4.2, SLICK, SLO2.1 Mouse: E330038N15Rik, Slick
Kcnu1	100752893	Potassium channel, subfamily U, member 1	Human: KCNMC1, KCa5, KCa5.1, Kcnma3, Slo3 Mouse: Kcnma3, Slo3, mSlo3
Kcnv2	100757476	Potassium channel, subfamily V, member 2	Human: KV11.1, Kv8.2, RCD3B Mouse: KV11.1
Kctd1	100770054	Potassium channel tetramerization domain containing 1, transcript variant X1	Human: hCG_38480, C18orf5, SENS Mouse: 4933402K10Rik, AI661543, AW553000
Kctd2	100757654	potassium channel tetramerization domain containing 2, transcript variant X1	Human: None Mouse: RP23-392H19.1, 2310012I15Rik
Kctd3	100760825	Potassium channel tetramerization domain containing 3, transcript variant X1	Human: RP11-5F19.1, NY-REN-45 Mouse: 4930438A20Rik, 9330185B06, E330032J19Rik, NY-REN-45
Kctd4	100768043	Potassium channel tetramerization domain containing 4	Human: bA321C24.3 Mouse: 2210017A09Rik, AU017169

Kctd5	100772768	Potassium channel tetramerization domain containing 5, transcript variant X1	Human: None Mouse: 2610030N08Rik, mKIAA0176
Kctd6	100765751	Potassium channel tetramerization domain containing 6, transcript variant X1	Human: KCASH3 Mouse: 5430433B02Rik, AU044285
Kctd7	100757850	Potassium channel tetramerization domain containing 7, transcript variant X7	Human: CLN14, EPM3 Mouse: 4932409E18, 9430010P06Rik
Kctd8	100754636	Potassium channel tetramerization domain containing 8, transcript variant X1	Human: None Mouse: A730087N02Rik
Kctd9	100753176	Potassium channel tetramerization domain containing 9, transcript variant X1	Human: BTBD27 Mouse: None
Kctd10	100752520	Potassium channel Tetramerization domain containing 10, transcript variant X1	Human: BTBD28; ULRO61; MSTP028; hBACURD3 Mouse: C87062; AW536343; mBACURD3
Kctd11	100760546	Potassium channel tetramerization domain containing 11	Human: C17orf36, KCASH1, REN, REN/KCTD11 Mouse: RP23-119B10.1, AF465352, Ren
Kctd12	100753862	Potassium channel tetramerization domain containing 12, transcript variant X2	Human: C13orf2, PFET1, PFETIN Mouse: AU046135, AW538430, Pfet1, Pfetin
Kctd13	100753748	Potassium channel tetramerization domain containing 13, transcript variant X1	Human: FKSG86, BACURD1, PDIP1, POLDIP1, hBACURD1 Mouse: 1500003N18Rik, AV259508, PDIP1alpha, P dip1, Poldip1
Kctd14	100768863	Potassium channel tetramerization domain containing 14, transcript variant X1	Human: None Mouse: AI449310, D7ErtD760e
Kctd15	100765553	Potassium channel tetramerization domain containing 15, transcript variant X1	Human: None Mouse: RP23-324J22.2, BC031749
Kctd16	100755887	Potassium channel tetramerization domain containing 16	Human: None Mouse: 4930434H12Rik, Gm1267
Kctd17	100763063	Potassium channel tetramerization domain containing 17, transcript variant X2	Human: RP5-1170K4.4 Mouse: 2900008M13Rik, AA414907, AW742389, N28155
Kctd18	100751064	Potassium channel tetramerization domain containing 18, transcript variant X1	Human: 6530404F10Rik Mouse: 4932411A20Rik, 6530404F10Rik
Kctd19	100761191	Potassium channel tetramerization domain containing 19	Human: None Mouse: 4932411A20Rik, 6530404F10Rik
Kctd20	100752436	Potassium channel tetramerization domain containing 20, transcript variant X1	Human: RP1-108K11.2, C6orf69, dJ108K11.3 Mouse: RP24-318I24.4, 2410004N11Rik, AI451943, AW541186, D17ErtD562e
Kctd21	100765855	Potassium channel tetramerization domain containing 21, transcript variant X1	Human: KCASH2 Mouse: EG622320

Note: parcial mRNAs present in CHO cells reported by CHO genome database are not included. *mRNAs corresponding to different Slo1 β ancillary subunits. **mRNA of Slo1 α subunit.

Table 2. Proteomic data of CHO cells show the expression of K⁺ channel β 1 and β 2 subunits (from Chinese Hamster Genome Database).

Protein name	Protein Access ID	Identified Peptide Sequences	Number of Identified Sequences	Number of Identified Spectra	FDR	Coverage	Cluster ID	Group ID	SwissProt Annotation/Homology with Highest Percentage	GO Annotation	KEGG Annotation
Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2-like isoform 2	gi 354501157 ref XP_003512659.1	ELQAI AER	24	131	0.01013	58	763	4984	KCAB2_RAT: Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Kcnab2 PE=1 SV=1	GO:0016491Oxidoreductase activity; Molecular Function	KCNAB2; Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily, beta member 2 K04883 Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily A, beta member 2
Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2-like isoform 3	gi 354501159 ref XP_003512660.1	QTGSP GMIYR	22	129	0	63	763	4985	KCAB2_RAT: Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Kcnab2 PE=1 SV=1	GO:0016491Oxidoreductase activity; Molecular Function	KCNAB2; Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily, beta member 2 K04883 Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily A, beta member 2
Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2-like isoform 1	gi 354501155 ref XP_003512658.1	ELQAI AER	24	131	0.01013	63	763	4984	KCAB2_RAT: Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Kcnab2 PE=1 SV=1	GO:0016491Oxidoreductase activity; Molecular Function	KCNAB2; Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily, beta member 2 K04883 Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily A, beta member 2
Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-1-like	gi 354472456 ref XP_003498455.1	TVAIIA R; PDSNT PMEEI VR; EYHLF QREK	8	20	0	16	763	1203	KCAB2_RAT: Voltage-Gated Potassium Channel subunit beta-2 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Kcnab2 PE=1 SV=1	GO:0016491Oxidoreductase activity; Molecular Function	KCNAB2; Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily, beta member 2 K04883 Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-related subfamily A, beta member 2

Reported in Baycin-Hizal et al., 2012; [20].

The presence of $\beta 1$ subunit in this cell line would be consistent with a stronger K^+ current inhibition by CbTX ($IC_{50} = 31.0 \pm 8.8$ nM) than by IbTX ($IC_{50} = 54.0 \pm 6.0$ nM). Furthermore, in our experimental conditions the toxin-sensitive K^+ current showed no inactivation during the 600 ms test pulses. This biophysical property of a sustained K^+ current in CHO cells discards the potential Slo1- $\beta 2$ or $-\beta 3a,b,c$ isoforms interaction because it is well documented that $\beta 2$ or $\beta 3a,b,c$ subunits induces the inactivation of Slo1 K^+ currents during 200 ms test pulses (Hoshi *et al.*, 2013; Uebele *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2012). This inactivation of the Slo1 K^+ current is caused by the inactivating particle only present in the NH_2 -terminal domain of $\beta 2$ and $\beta 3$ subunits, which can occlude the conduction pathway of both Slo1 and *Shaker* K^+ channels (Orío *et al.*, 2002). Our results are consistent with the aforementioned observations but certainly this hypothesis deserves further investigation.

On the other hand, it has been shown that $\beta 4$ subunit confers complete protection against SloTX to the Slo1 α subunit (0% of current inhibition, (García-valdes *et al.*, 2001)). The highest sensitivity of the endogenous K^+ current to SloTX (60% inhibition at 40 nM, Figure 2C) could be explained as a consequence of the $\beta 4$ absence in the CHO cell line (supplementary table 1), and strongly support a potential modulation of the endogenous Slo1 channels by the native $\beta 1$ subunit, considering that SloTX has been proposed as a pharmacological tool for discriminating α Slo1- $\beta 1$ or $-\beta 4$ complexes in different tissues (García-valdes *et al.*, 2001).

Regarding CbTX, this toxin shows a considerable diversity of effects on the biophysical properties of different K^+ channels (Sprunger *et al.*, 1996). Whereas a CbTX voltage-dependent inhibition was described for single Ca^{2+} -activated K^+ channel from rat muscle in planar lipid bilayers (Anderson *et al.*, 1988; MacKinnon and Miller, 1988); the CbTX inhibition was voltage-independent on CbTX-sensitive K^+ currents from rat alveolar epithelial cells (Jacobs and Decoursey, 1990) or on heterologous expressed $K_v1.2$ K^+ channels (Sprunger *et al.*, 1996). According to our results, all $\alpha KTx1$ subfamily toxins showed a voltage-independent inhibition (Figure 3A) in the assayed voltage range (from +40 up to +130 mV), suggesting that $\alpha KTx1$ toxins bind to partial or totally activated Slo1 channels at the same extent. As previously mentioned, none of the $\alpha KTx1$ toxins affected the activation curve (Figure 3B), consistent with the previous description of these toxins as pore blockers rather than gating modifiers. Interestingly CbTX increased the deactivation constant of CHO cells K^+ currents (Figure 3C). Previous reports indicate that the CbTX-induced variations in the deactivation kinetics of K^+ channels may

reflect changes in one or more open to closed transition rate constants in addition to blocking the pore (Sprunger *et al.*, 1996). Our results suggest that after repolarization, CbTX reduces the channel returning to the closed state increasing precisely the deactivation constant but IbTX or SloTX do not.

There is a residual component which should be characterized in the future. Skryma and collaborators (1994) (Skryma *et al.*, 1994a) reported that CbTX 30 nM almost completely inhibited the macroscopic K^+ current in CHO cells. These data differ from our observations. Unfortunately we were unable to compare our results with those of the previous report because the CbTX effect on the macroscopic K^+ currents was not shown; and only one CbTX concentration was assayed (Skryma *et al.*, 1994a).

As previously mentioned, CHO cells are an excellent expression system to characterize the pharmacology of heterologous K^+ channels. However, the influence of CHO cell endogenous K^+ current on pharmacological assays could be important in cases where the expression level of heterologous K^+ channels is low to clearly distinguish the expressed heterologous target, as reported for Slo3 K^+ channels expressed in this cell line (Brenker *et al.*, 2014; López-González *et al.*, 2014).

In conclusion, the pharmacological profile presented by the main component of the endogenous K^+ current in this cell line is consistent with the reported pharmacology for Slo1 K^+ channels, which could be associated to, at least, $\beta 1$ ancillary subunit.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Jose Luis De la Vega, Yoloxóchitl Sánchez, Shirley Ainsworth, and Elizabeth Mata for technical assistance. We thank Juan Manuel Hurtado, Roberto Rodríguez, and Arturo Ocádiz for computer services. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico) (177138 to TN, and 84362 to ILG); Dirección General de Asuntos del Personal Académico/ Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/ UNAM) (IN203513 to TN and IN204914 to ILG). Additionally EGL and OSC were recipients of a (DGAPA/UNAM) postdoctoral fellowship and a CONACyT graduate fellowship, respectively.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors' contribution to the study

EGL, OSC, and ILG contributed substantially to the acquisition and analysis of data; drafting the article

and final approval of the version to be published. ILG and TN substantially contributed to the study design, critically

reviewing the article for intellectual content and final approval of the version to be published.

REFERENCES

- Anderson CS, Mackinnon R, Smith C. Charybdotoxin Block of Single Ca²⁺-activated K⁺ channels Effects of Channel Gating, Voltage, and Ionic Strength. *J Gen Physiol*, 91, 1988, 317–333.
- Banerjee A, Lee A, Campbell E, Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. *Elife*, 2, 2013, e00594.
- Baycin-Hizal D, Tabb DL, Chaerkady R, Chen L, Lewis NE, Nagarajan H, Sarkaria V, Kumar A, Wolozny D, Colao J, Jacobson E, Tian Y, O’Meally RN, Krag SS, Cole RN, Palsson BO, Zhang H, Betenbaugh M. Proteomic analysis of Chinese hamster ovary cells. *J Proteome Res*, 11, 2012, 5265–76.
- Brenker C, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Poetsch A, Xia, X, Bönigk, W, Lingle CJ, Kaupp UB, Strücker T. The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife*, e01438, 2014, 1–19.
- Brinkrolf K, Rupp O, Laux H, Kollin F, Ernst W, Linke B, Kofler R, Romand S, Hesse F, Budach WE, Galosy S, Müller D, Noll T, Wienberg J, Jostock T, Leonard M, Grillari J, Tauch A, Goesmann A, Helk B, Mott JE, Pühler A, Borth N. Chinese hamster genome sequenced from sorted chromosomes. *Nat Biotechnol*, 31, 2013, 694–5.
- Chinese Hamster Genome Database. URL:www.chogenome.org. Last update: May 8, 2014. Last access: October 24, 2014.
- Di Veroli GY, Davies MR, Zhang H, Abi-Gerges N, Boyett MR. High-throughput screening of drug-binding dynamics to HERG improves early drug safety assessment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, 2013, H104–17.
- Dworetzky SI, Boissard CG, Lum-Ragan JT, McKay MC, Post-Munson DJ, Trojnacki JT, Chang CP, Gribkoff VK. Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci*, 16, 1996, 4543–50.
- Fernández-Fernández JM, Nobles M, Currid A, Vázquez E, Valverde MA. Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, 2002, C1705–14.
- Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51, 2005, 177–85.
- García-valdes J, Zamudio FZ, Toro L, Possani LD. Slotoxin, alpha KTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between alpha and alpha + beta (beta1 or beta4) complexes. *FEBS Lett*, 505, 2001, 369–373.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, George Chandy K. Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated Expressed in Mammalian Cell Lines. *Mol Pharmacol*, 45, 1994, 1227–1234.
- Hammond S, Swanberg JC, Kaplarevic M, Lee KH. Genomic sequencing and analysis of a Chinese hamster ovary cell line using Illumina sequencing technology. *BMC Genomics*, 12, 2011, 67.
- Hoshi T, Tian Y, Xu R, Heinemann SH, Hou S. Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 110, 2013, 4822–7.
- Jacobs A, Decoursey E. Mechanisms of Potassium Channel Block in Rat Alveolar. *J Pharmacol Exp Ther*, 255, 1990, 459–472.
- Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O’Brien E, Bordbar A, Roth AM, Rosenbloom J, Bian C, Xie M, Chen W, Li N, Baycin-Hizal D, Latif H, Forster J, Betenbaugh MJ, Famili I, Xu X, Wang J, Palsson BO. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol*, 31, 2013, 759–65.
- Li X, Shimada K, Showalter L a Weinman S a. Biophysical properties of ClC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J Biol Chem*, 275, 2000, 35994–8.
- López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López a Santi CM, Darszon a Treviño CL. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*, 20, 2014, 619–29.
- MacKinnon R, Miller C. Mechanism of Charybdotoxin Block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol*, 91, 1988, 335–349.
- Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 97, 2000, 5562–7.

- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 104, 2007, 7688–7692.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R. New Disguises for an Old Channel : MaxiK Channel-Subunits. *Physiology*, 17, 2002,156–161.
- Rodríguez de la Vega RC, Merino E, Becerril B, Possani LD. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 2003, 222–7.
- Skryma R, Prevarskaya N, Vacher P, Dufy B. Voltage-dependent ionic conductances in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 267, 1994a, C544–C553.
- Skryma R, Prevarskaya N, Vacher P, Dufy B. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *FEBS Lett*, 349, 1994b, 289–94.
- Sprunger LK, Stewig NJ, Grady SMO. Effects of charybdotoxin on K⁺ channel (Kv 1.2) deactivation and inactivation kinetics. *Eur J Pharmacol*, 314, 1996, 357–364.
- Uebele VN, Lagrutta a Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R. Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 275, 2000, 23211–8.
- Wu RS, Liu G, Zakharov SI, Chudasama N, Motoike H, Karlin A, Marx SO. Positions of β 2 and β 3 subunits in the large-conductance calcium- and voltage-activated BK potassium channel. *J Gen Physiol*, 141, 2012, 105–17.