



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Escuela de Biología

Desarrollo y evaluación de análogos
fluorescentes del péptido quimioatrayente
del espermatozoide de erizo de mar, *Speract*

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

César Arcos Hernández

Tutor: Ma. del Carmen Beltrán Núñez



Junio, 2014

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

Investigación realizada gracias los Programas DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN204112-3 a Ma. del Carmen Beltrán Núñez e IN203513 a Takuya Nishigaki Shimizu) y CONACYT (CB2012-177138 a Takuya Nishigaki Shimizu).

Agradecimientos

A la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez y al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu por la ayuda brindada durante todo el proyecto.

A las personas que me ayudaron técnicamente:

Biología molecular: M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, M.C. Francisco Romero Corpus y Carmen Santana Calvo

Microscopia confocal: Q.F.B. Xochitl Alvarado Affantranger

HPLC: M.B. Timoteo Olamendi Portugal

Especialmente

A mi familia: Martha, Emigdio, Ana

Y a Yeni por todo su apoyo

Índice

1.	Abreviaturas	5
2.	Resumen	7
3.	Introducción	9
3.1	La fecundación	9
3.2	El erizo de mar.....	10
3.3	El espermatozoide de erizo de mar.....	11
3.4	Péptidos activadores del espermatozoide	12
3.5	Cambios fisiológicos provocados por el <i>Speract</i>	14
3.6	Análogos del <i>Speract</i>	16
3.7	Las proteínas fluorescentes.....	18
3.8	Diferentes usos de las proteínas fluorescentes	20
4.	Justificación	22
5.	Hipótesis	23
6.	Objetivo general	23
7.	Objetivos particulares	23
8.	Materiales y métodos	24
8.1	Reactivos	24
8.2	Material biológico	25
8.3	Técnicas.....	26
8.3.1	Preparación de <i>Ametrine-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i> en el vector pET	26
8.3.2	Expresión de <i>Ametrine-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i> y obtención de la fracción soluble.....	28
8.3.3	Purificación de <i>Ametrine-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i> en columna de Ni^{2+}	28
8.3.4	Determinación de la pureza de <i>Ametrine-Speract</i> , <i>CFP-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i> en un gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PA-SDS).....	29
8.3.5	Determinación del E_m , el pH_i y la $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de <i>S. purpuratus</i> en respuesta a <i>CFP-Speract</i>	30
8.3.6	Localización de <i>Venus-Speract</i> en espermatozoides de <i>L. pictus</i>	33
8.3.7	Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC) de <i>F-Speract</i>	34
8.3.8	Cálculo de la concentración del receptor a <i>Speract</i> en espermatozoides de <i>L. pictus</i>	

8.3.9	Determinación de la capacidad de unión de <i>Ametrine-Speract</i> a espermatozoides de <i>L. pictus</i>	36
8.3.10	Análisis estadístico	36
9.	Resultados	37
9.1	Desarrollo y purificación de <i>Ametrine-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i>	37
9.2	Pureza de <i>Ametrine-Speract</i> , <i>CFP-Speract</i> y <i>Venus-Speract</i>	39
9.3	Los cambios provocados en el Em, el pH _i y la [Ca ²⁺] _i por <i>CFP-Speract</i> , son similares a los causados por el <i>Speract</i>	40
9.4	<i>Venus-Speract</i> se une al flagelo del espermatozoide de <i>L. pictus</i>	44
9.5	Pureza de <i>F-Speract</i> , analizada por RP-HPLC	45
9.6	Determinación de la concentración del receptor a <i>Speract</i> en espermatozoides de <i>L. pictus</i>	46
9.7	La capacidad de unión de <i>Ametrine-Speract</i> al espermatozoide de <i>L. pictus</i> es menor que la del <i>Speract</i>	47
10.	Discusión	49
11.	Conclusiones	53
12.	Perspectivas	54
13.	Referencias	55
14.	Anexo: Secuencia y diseño de los oligonucleótidos utilizados.	59

1. Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
AMA	Agua de mar artificial
AMA1:10	Agua de mar artificial diluida 1:10 pH 6.8 + 20 mM MgSO ₄
AMA1Ca	Agua de mar artificial 1 mM Ca ²⁺ pH 7.0
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ca²⁺	Calcio
CFP	Proteína fluorescente cian
Cl⁻	Cloro
EC₅₀	Mitad de la concentración efectiva máxima
Em	Potencial de membrana
<i>F-Speract</i>	<i>Speract</i> fusionado a 5(6)-SFX (6-(fluorescein-5-(y-6)-carboxamido) ácido hexanoico, succinimidil ester)
GFP	Proteína fluorescente verde
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
IPTG	Isopropil- -D-1-tiogalactopiranosido
K⁺	Potasio
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodáton
LB	Medio de cultivo Luria Broth

Na⁺	Sodio
Pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH_i	pH intracelular
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
SAP	Péptido regulador de la movilidad del espermatozoide (del inglés: "Sperm Activating Peptide")
YFP	Proteína fluorescente amarilla

2. Resumen

En los seres vivos, en donde la fecundación es externa, la comunicación celular entre el espermatozoide y el óvulo es fundamental para el éxito de este importante evento. Los SAP's (péptidos reguladores de la movilidad del espermatozoide) son péptidos que sirven para establecer esta comunicación. En el erizo de mar, el *Speract* es uno de ellos y al unirse a su receptor en el flagelo del espermatozoide, causa una serie de cambios en la fisiología y en los patrones de movilidad de la célula. Las características de la respuesta al *Speract* se han estudiado mediante análogos fluorescentes y radiactivos, sin embargo, se requiere de nuevas herramientas que ayuden a profundizar en el entendimiento de su mecanismo de acción y de la interacción con su receptor.

En este trabajo, mediante técnicas de biología molecular, se fusionó el *Speract* a dos proteínas fluorescentes (*Ametrine* y *Venus*), siendo las proteínas resultantes purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. Posteriormente utilizando indicadores fluorescentes probamos la eficacia de *CFP-Speract* (otro análogo desarrollado previamente) para inducir los cambios característicos provocados por el *Speract* en el potencial de membrana (E_m), el pH (pH_i) y la concentración de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) intracelulares de espermatozoides en condiciones fisiológicas normales e hinchados (por cambios en la osmolaridad del medio, al estar suspendidos en agua de mar artificial (AMA) diluida 1:10 pH 6.8 + $MgSO_4$ 20 mM, en los cuales se ha visto que la hiperpolarización inducida por el *Speract* es más evidente) de la especie *S. purpuratus*. Después, detectamos la unión de *Venus-Speract* a espermatozoides de la especie *L. pictus* mediante microscopía confocal. Finalmente, haciendo ensayos de competencia con un análogo del *Speract* (*F-Speract*) fusionado al análogo de fluoresceína 5(6)-SFX (6-(fluorescein-5-(y-6)-carboxamido) ácido hexanóico, succinimidil ester), cuantificamos la afinidad de *Ametrine-Speract* por su receptor en el flagelo del espermatozoide de la misma especie. Nuestros resultados indican que *CFP-Speract* y *Speract* inducen cambios similares en el E_m , el pH_i y la $[Ca^{2+}]_i$ de los

espermatozoides y que en el caso del Em y el pH_i los cambios son significativamente mayores cuando las células fueron hinchadas. Observamos que *Venus-Speract* se une de manera específica al flagelo del espermatozoide y que la capacidad de unión de *Ametrine-Speract* es menor que la del *Speract*, debido probablemente al tamaño de la proteína fluorescente (28 kDa) en relación con el del *Speract* (10 aminoácidos). De nuestros resultados concluimos que los análogos fluorescentes desarrollados en este trabajo pueden ser de gran utilidad en el estudio de la vía de señalización que induce el *Speract* para regular la movilidad del espermatozoide y así fecundar al óvulo.

3. Introducción

3.1 La fecundación

El proceso de fecundación sucede cuando se establece la interacción entre el espermatozoide y el óvulo. Es el paso más importante en el desarrollo de cualquier ser vivo debido a que implica la subsistencia de la especie. Este proceso es diferente entre cada grupo de seres vivos y de manera general existen dos tipos de fecundación: interna y externa. La fecundación interna, que acontece principalmente en los mamíferos, implica que sucedan varios eventos en el espermatozoide al interior del tracto genital femenino como la capacitación y la reacción acrosomal (Darszon, Nishigaki, Beltran, & Treviño, 2011). La fecundación externa, a su vez se lleva a cabo en organismos acuáticos como los equinodermos, entre los que se encuentra el erizo de mar. Los espermatozoides de estos organismos llevan a cabo procesos similares (como la hiperactivación de la movilidad y la reacción acrosomal), pero se enfrentan con otras dificultades para realizar el proceso de fecundación (principalmente en relación a la probabilidad de encuentro de los gametos) que depende del movimiento del agua, de la cercanía de los individuos que los liberan, de la concentración y sincronización de los gametos liberados, etc. (Serrao, Pearson, Kautsky, & Brawley, 1996).

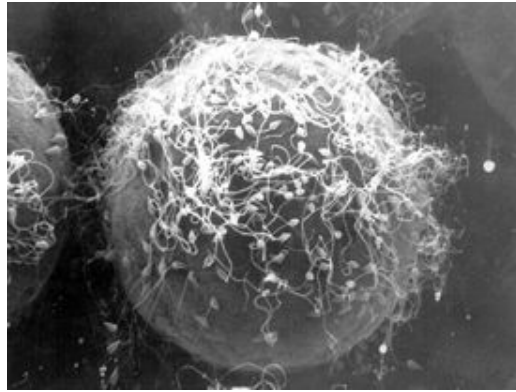


Figura 1. Fecundación en el erizo de mar.

Fotografía de microscopía electrónica de barrido, de un óvulo de erizo de mar rodeado de espermatozoides. Tomada de: <http://news.stanford.edu/news/2000/august9/sperm-89.html>.

3.2 El erizo de mar

Los erizos de mar pertenecen al orden Echinoidea y son organismos con una larga vida media (50-100 años) y un ciclo de reproducción anual cuya gametogénesis está controlada por la fotoperiodicidad (Sodergren et al., 2006). Estos organismos se han convertido a lo largo de los años en uno de los modelos biológicos más importantes en el área reproductiva. Así como otras especies que llevan a cabo fecundación externa, el erizo de mar produce una cantidad muy alta de gametos (aproximadamente 10^{10} espermatozoides y 10^6 óvulos) para contrarrestar el efecto negativo de su alta dilución y lograr con éxito el proceso de fecundación. Lo anterior representa una de las principales ventajas (junto con la facilidad para obtener los gametos) para la utilización de los óvulos y los espermatozoides en el estudio de la fecundación y el posterior desarrollo del embrión. Además, esta característica es de gran utilidad para la realización de experimentos que sirvan para el entendimiento de la fisiología del espermatozoide, de la manera en que éste es atraído para fecundar al óvulo, así como para realizar investigaciones

preliminares en aspectos fisiológicos y estructurales compartidos con otras especies.

3.3 El espermatozoide de erizo de mar

Los espermatozoides son células germinales, producto del proceso de espermatogénesis y en todas las especies tienen la función de llegar a donde se encuentra el óvulo y ser capaz de liberar su material genético en él para iniciar el proceso de la formación de un nuevo individuo. El espermatozoide de erizo de mar al igual que las demás especies se compone por la cabeza y el flagelo y tiene una estructura muy particular (resultado de su adaptación a la fecundación externa).

El flagelo, que tiene un diámetro de $0.25\ \mu\text{m}$ y $50\ \mu\text{m}$ de largo, es la parte que le confiere movilidad a la célula, siendo esto resultado de una estructura interna del citoesqueleto llamada axonema que es el aparato motor del flagelo. Esta estructura está altamente conservada y se compone de un par de microtúbulos centrales rodeados de otros 9 pares, que a su vez están asociados con diversas proteínas que regulan su función (Fig. 2) (Inaba, 2003).

La cabeza es esférica y elongada con aproximadamente 5 y $2\ \mu\text{m}$ de largo y ancho respectivamente. El acrosoma que tiene un diámetro aproximado de $0.5\ \mu\text{m}$, está situado en la parte apical de la cabeza y posee su propia membrana. En la base de la cabeza se encuentra su única mitocondria (de 1 a $2\ \mu\text{m}$ de diámetro), que tiene forma de anillo y rodea al centriolo, a partir del cual inicia el flagelo (Drozdov & Vinnikova, 2010).

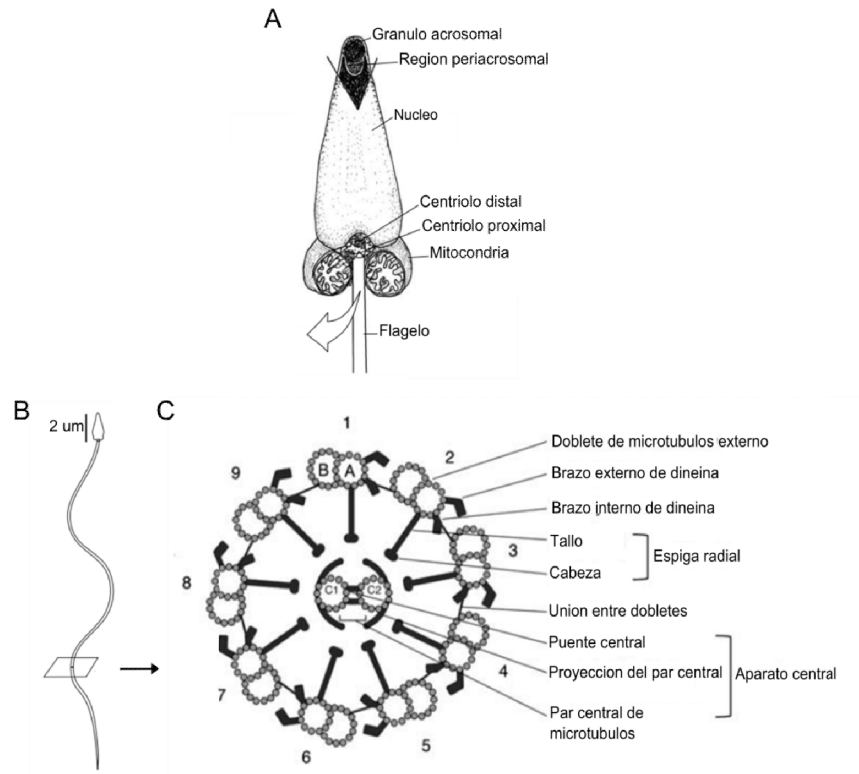


Figura 2. Estructura del espermatozoide de erizo de mar.

(A) Componentes principales del espermatozoide de erizo de mar. **(B)** Dibujo de un espermatozoide en el que se muestra el tamaño aproximado de la cabeza. **(C)** Componentes principales del axonema. Modificada de Drozdov & Vinnikova, 2010, Inaba, 2003 y Darszon et al., 2011.

3.4 Péptidos activadores del espermatozoide

En el erizo de mar, donde la fecundación es externa, el contacto entre los gametos sucede en el ambiente que rodea a los individuos. Se ha observado que en estas condiciones, uno de los elementos que permiten el éxito de la interacción entre el espermatozoide y el óvulo, es el establecimiento de formas de comunicación por medio de moléculas producidas por este último, las cuales están ubicadas en la capa externa del óvulo. Estas moléculas son los llamados péptidos activadores del espermatozoide (SAP's).

En diferentes ordenes de erizos de mar, entre los que se encuentra el orden Echinoidea (Tabla 1) y en algunas especies de estrella de mar (Suzuki & Yoshino, 1992; Nishigaki, Chiba, Miki, & Hoshi, 1996), se han identificado una gran cantidad de SAP's. En los años ochenta se reportó la existencia de un decapeptido difusible denominado *Speract* o *SAP-1* (GFDLNGGGVG), que está presente en la capa externa de los óvulos y que al liberarse al ambiente se une específicamente a su receptor en el espermatozoide aumentando su tasa respiratoria (Hansbrough & Garbers, 1981). Desde que se conoce la existencia del *Speract* en la especie de *Strongylocentrotus purpuratus* y de *Lytechinus pyctus* (Garbers y Hardman, 1975), se ha avanzado en la descripción de la cascada de señalización y de los cambios fisiológicos que este péptido provoca (Darszon, Labarca, Nishigaki, & Espinosa, 1999; Neill & Vacquier, 2004; Darszon et al., 2011).

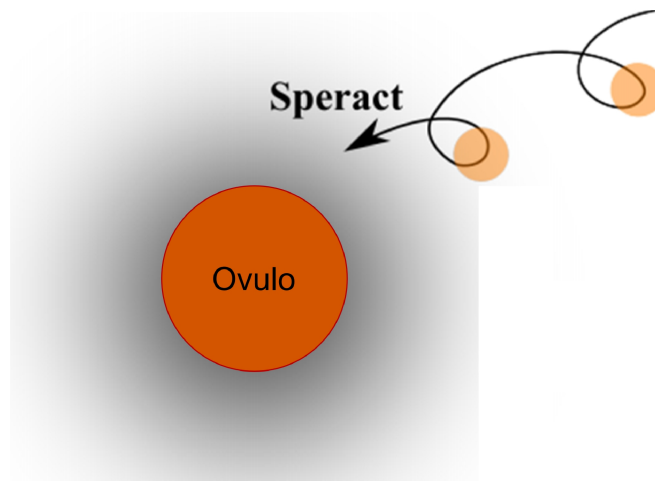


Figura 3. Respuesta del espermatozoide de erizo de mar a un gradiente de *Speract*.

Se muestra el gradiente descendente de *Speract* que inicia alrededor del óvulo y que en los espermatozoides de la especie *L. pictus* provoca una respuesta quimiotáctica en su patrón de nado, mediante la realización de giros. Modificada de Guerrero et al., 2013.

Tabla 1. Péptidos activadores del espermatozoide de algunas especies del orden Echinoidea.

Suborden	Familia	Especie	Secuencia del SAP
Temnopleurina	Toxopneustidae	<i>Lytechinus pictus</i>	GFDLTGGVQ FDLTGGGVQ
Echinia	Strongylocentrotidae	<i>Strongylocentrotus nudus</i>	GFDLNGGGVG
			GFSLSGGGVG
			GFALGGGGVG
			GFDLTGGGVG
		<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	GFDLNGGGVG
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	GFALGGGVG		
	GFSLTGGGVG		
	GFDLNGGGVG		
	GFDLTGGGVG GFDLNGGGVS SFALGGGVG GFSLTGGGVD		

Modificada de Suzuki, 1995

3.5 Cambios fisiológicos provocados por el *Speract*

Al unirse a su receptor, ubicado en el flagelo, el *Speract* es capaz de generar (incluso en concentraciones del rango picomolar) un aumento en la tasa de respiración (Suzuki & Garbers, 1984) y una serie de cambios fisiológicos (Fig. 4) que inician con la activación de la guanilato ciclasa causando un aumento en la concentración de GMPc, que provoca la apertura del canal de K⁺, tetraKCNG, causando una hiperpolarización de la célula que activa al intercambiador Na⁺/H⁺. La activación de este intercambiador induce un aumento del pH_i, que junto con el aumento de los niveles de AMPc causan un incremento tónico en la [Ca²⁺]_i el cual no ha sido caracterizado. Por otra parte, la salida de Na⁺ y la repolarización de la membrana provocan un aumento transitorio de la [Ca²⁺]_i. Este incremento transitorio se ha asociado a una respuesta motora primaria por parte del

dependiente de Ca^{2+} (CaCC), canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} (CaKC) **(B)** Eventos de señalización, causados por la unión del *Speract* al espermatozoide. La activación de la GC induce un aumento del pH_i y una salida de K^+ que provoca una hiperpolarización. El aumento del pH_i y del AMPc provoca un aumento tónico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (del cual no se sabe muy bien su función), mientras que la salida de Na^+ y la repolarización de la membrana causan un aumento transitorio que está relacionado con un evento de giro por parte del espermatozoide. La entrada de Cl^- y la salida de K^+ provocan una nueva hiperpolarización, teniendo de esta manera una retroalimentación positiva que permite nuevos eventos de giro. Modificada de: Espinal et al., 2011.

3.6 Análogos del *Speract*

Muchos de los trabajos enfocados a describir la respuesta fisiológica del espermatozoide de erizo de mar al *Speract* y la interacción de este péptido con su receptor se han realizado mediante la síntesis y el uso de análogos (Tabla 2). El uso de un análogo marcado radiactivamente (^{125}I -GGG[Y^2]-*Speract*) y la técnica de entrecruzamiento químico permitió la identificación y caracterización de su receptor, una proteína de 77 kDa (Dangott & Garbers, 1984). Posteriormente, la síntesis de un análogo marcado químicamente con el compuesto fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC-GGG[Y^2]-*Speract*), utilizando microscopia de fluorescencia, permitió entre otras cosas, saber que el *Speract* tiene su receptor en el flagelo del espermatozoide (Cardullo, Herrick, Peterson, & Dangott, 1994). El uso del análogo radiactivo mencionado anteriormente permitió la purificación e identificación de la secuencia y estructura de dicho receptor, la cual consiste en una región amino-terminal compuesta por 26 aminoácidos, un dominio extracelular grande, rico en cisteínas, con cuatro pliegues de 115 aminoácidos cada uno, un solo dominio transmembranal y una región citosólica de 12 aminoácidos (Dangott, Jordan, Bellet, & Garbers, 1989). Este receptor, se identificó también en membranas de espermatozoides (*L. pictus*) aisladas mediante cavitación por nitrógeno (Bentley & Garbers, 1986).

Los experimentos realizados con los análogos antes mencionados, tuvieron entre sus objetivos analizar su unión al receptor en comparación con la del *Speract*, gracias a que se puede cuantificar la marca radiactiva. Un ejemplo de este tipo de investigaciones son los experimentos realizados en espermatozoides de erizo de mar de la especie *Hemicentrotus pulcherrimus*. En este caso, los espermatozoides se incubaron con el análogo y diferentes cantidades de un competidor no marcado. El *Speract* no unido se eliminó por filtración y el que se unió, se cuantificó midiendo los niveles de radioactividad de cada muestra (Harumi, Hoshino, & Suzuki, 1992).

Posteriormente, la síntesis de otro análogo fluorescente llamado *F-Speract* (5(6)-*SFX-Speract*, (λ_{exc} 494/ λ_{emi} 524)), permitió medir la eficiencia de este análogo para unirse a su receptor debido a que se descubrió que posee la propiedad de reprimir la emisión de fluorescencia al unirse a su receptor. Esta característica se aprovechó posteriormente para desarrollar un método que permitió cuantificar la cantidad de receptores a *Speract* que hay en una suspensión de espermatozoides y por lo tanto la posibilidad de analizar cuantitativamente la unión del *Speract*. En el mismo trabajo, este método se usó para definir la constante de asociación ($2.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y de disociación del *Speract* con su receptor, la cual es lenta y bifásica con un componente menor del 5% ($3.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) y uno del 95% ($4.4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), que sugiere la existencia de dos conformaciones diferentes del receptor a *Speract*, además, se definió la importancia que para esta interacción tienen la presencia de algunos iones extracelulares (como el Na^+ y el K^+) (Nishigaki & Darszon, 2000). Este método permitió también, analizar la actividad del *Speract* enjaulado (inactivado por la inserción de un grupo 2-nitrobenzyl), que tiene una menor afinidad al receptor, y posteriormente se fotoactiva por luz UV, desarrollando así, un método para el enjaulamiento de péptidos activos biológicamente (Tatsu, Nishigaki, Darszon, & Yumoto, 2002).

Tabla 2. Análogos del *Speract*

Análogo	Especie	Aplicación
¹²⁵ I-GGG-[Y ²]- <i>Speract</i> ^{ab}	<i>S. purpuratus</i>	Identificación del receptor
	<i>S. purpuratus</i>	Estructura del receptor
	<i>A. punctulata</i>	
<i>FITC</i> -GGG[Y ²]- <i>Speract</i> ^c	<i>L. pictus</i>	Ubicación del receptor en el flagelo
<i>5(6)</i> - <i>SFX-Speract</i> ^d (<i>F-Speract</i>)	<i>L. pictus</i>	Cuantificación de la unión a su receptor

(^aDangott & Garbers, 1984; ^bDangott et al., 1989; ^cCardullo et al., 1994; ^dNishigaki & Darszon, 2000)

3.7 Las proteínas fluorescentes

Anteriormente, se mencionaron avances en relación al estudio de la interacción del *Speract* con su receptor, que se han obtenido mediante el desarrollo de análogos de este péptido marcados químicamente. Sin embargo, existe la posibilidad de estudiar dichos procesos mediante análogos obtenidos por la fusión genéticamente codificada de las proteínas fluorescentes a la molécula de interés.

La primera descripción de una proteína fluorescente fue en 1962 cuando el grupo de Shimomura descubrió la *GFP* (proteína fluorescente verde) en la medusa *Aequorea victoria* mientras se realizaban estudios acerca de su quimioluminiscencia. Las proteínas de la familia *GFP*, se componen de 220 a 240 aminoácidos y tienen un peso que oscila alrededor de los 28 kDa. En los siguientes años se descubrió que la fluorescencia de este tipo de proteínas depende de la maduración de un fluoróforo (molécula capaz de absorber luz de una determinada longitud de onda y de emitirla en una longitud mayor), el cual esta codificado en la secuencia de la proteína y requiere esencialmente de la interacción de tres aminoácidos (Ser65, Tyr66 y Gly67) y de que estos se encuentran al interior de una estructura en forma de barril compuesta por 11 hojas beta que rodean una alfa hélice central (Fig. 5A) (Tsien, 1998; Rizzo, Davidson, & Piston, 2009).

Mediante el uso principalmente de mutaciones dirigidas a aminoácidos que intervienen en la síntesis del fluoróforo, se han desarrollado una gran cantidad de proteínas fluorescentes que se diferencian en el color (como el amarillo (*YFP*), el cian (*CFP*), el azul (*BFP*) y el rojo (*Cherry*)) y en características relacionadas con su rendimiento, como la fotoestabilidad, el carácter monomérico, el brillo, el espectro de excitación/emisión, etc. (Kremers, Gilbert, Cranfill, Davidson, & Piston, 2011), permitiendo ampliar el número de usos que se les pueden dar en la investigación científica (Fig. 5B).

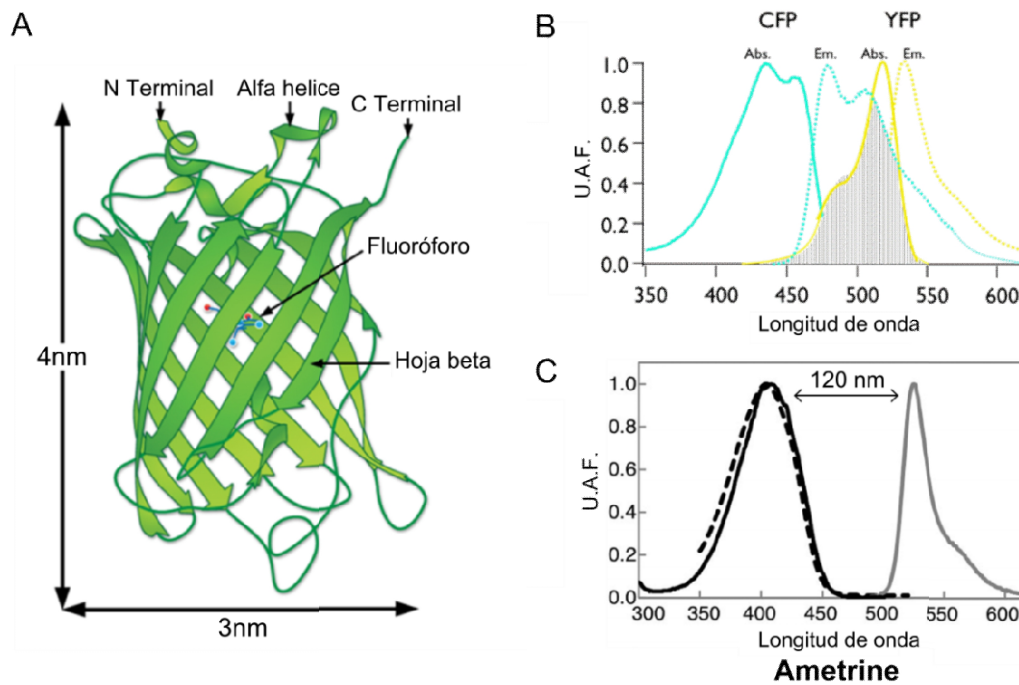


Figura 5. Estructura de las proteínas fluorescentes y sus espectros de excitación/emisión

(A) Estructura básica y dimensiones aproximadas de la proteína fluorescente *GFP*. Espectros de excitación/emisión de *CFP*, *YFP* (B) y *Ametrine* (C), proteínas fluorescentes obtenidas mediante mutagénesis de la secuencia de *GFP*. Modificada de: Rizzo et al., 2009, Chudakov, Matz, Lukyanov, & Lukyanov, 2010 y Ding, Ai, Hoi, & Campbell, 2011.

3.8 Diferentes usos de las proteínas fluorescentes

Desde hace varios años, las proteínas fluorescentes son de gran utilidad para el marcaje y seguimiento por técnicas de imagen, gracias a que en su secuencia genética poseen todo lo necesario para sintetizar su fluoróforo. Además, al fusionarse genéticamente a una molécula de interés se garantiza la expresión equivalente de cada componente lo cual evita el uso de procedimientos exógenos para el marcaje fluorescente (Kremers et al., 2011).

Las características antes mencionadas han permitido el uso de las proteínas fluorescentes para otros propósitos como la evaluación de interacciones entre proteínas. También son útiles en el desarrollo de biosensores basados en transferencia de energía de resonancia (FRET) entre un donador y un aceptor de fluorescencia que presentan superposición entre sus espectros de emisión y de excitación y se encuentran en una proximidad menor a 100 Å. Además, este tipo de proteínas han permitido la visualización de cambios dinámicos en la expresión genética de un organismo en desarrollo al colocar la proteína fluorescente bajo el control transcripcional del promotor del gen de interés. Lo anterior ha hecho que las publicaciones relacionadas con estas proteínas hayan aumentado en gran número desde los primeros años de la década de los noventa del siglo pasado (Chudakov et al., 2010).

El desarrollo de proteínas con características innovadoras permite su uso en las técnicas de imagen antes mencionadas. Actualmente existe una alta diversidad en la gama de proteínas fluorescentes obtenidas mediante mutagénesis de la *GFP*. Una de estas proteínas es *Venus* (λ_{exc} 515/ λ_{emi} 528), una variante de *YFP* (proteína fluorescente amarilla) que presenta la mutación F46L. Existen dos ventajas obtenidas a partir de esta mutación, la primera, corresponde a un aumento significativo en la velocidad de oxidación y por lo tanto en la maduración de la proteína a 37 °C. Además, *Venus* se caracteriza por presentar una considerable disminución en cuanto a la sensibilidad al Cl⁻ y al pH en comparación con otras variantes de *YFP*, lo que la hace conveniente como aceptor para la

realización de FRET (Nagai et al., 2002). Al igual que *YFP* y sus variantes, *CFP* (proteína fluorescente cian, (λ_{exc} 434/ λ_{emi} 477), es una de las proteínas fluorescentes más utilizadas y es resultado del reemplazamiento de la Tyr66 por triptófano. Tiene un pico de emisión a 480 nm y un hombro a 500 nm. Además es muy útil porque puede utilizarse con *YFP* en la realización de FRET, y cuenta con la mutación constitutiva N146I, que previene la formación de dímeros (Espagne et al., 2011) (Rizzo et al., 2009). En años recientes, el diseño de nuevas proteínas fluorescentes ha continuado y un ejemplo de ello es *Ametrine* (λ_{exc} 406/ λ_{emi} 526), una variante de la *GFP* con una gran separación entre los valores máximos de excitación y emisión (120 nm), lo cual le confiere una utilidad distinta a la de *YFP* y sus variantes. Esta característica permitió también la realización de dos pares de biosensores FRET en las mismas células HeLa, de manera simultánea (Ai & Hazelwood, 2008).

Las diferentes características de las variantes de *GFP* desarrolladas y, principalmente, el hecho de que tengan diferentes espectros de excitación/emisión pueden representar elementos que permitan desarrollar un nuevo método para el análisis de la interacción *Speract*-Receptor y para otros propósitos relacionados con el efecto fisiológico y la respuesta quimiotáctica que el *Speract* genera en el espermatozoide de erizo de mar.

4. Justificación

El estudio de la interacción del *Speract* con su receptor y de la respuesta del espermatozoide de erizo de mar al péptido requiere del desarrollo de nuevas herramientas que permitan conocer más acerca de los procesos fisiológicos relacionados con la interacción entre el óvulo y el espermatozoide que no han podido ser estudiados.

La idea de fusionar una proteína fluorescente al *Speract* está basada en la obtención de un análogo que por su expresión genética, sea más fácil y menos costoso de producir y que resulte en una expresión equitativa entre el marcador y la molécula de interés. Otras ventajas de este análogo en relación a otros es que no es radioactivo y que a diferencia de *F-Speract* no apaga su fluorescencia al unirse a su receptor.

El desarrollo de una herramienta para las técnicas de imagen y fluorescencia (FRET por ejemplo) permitirá idear nuevas estrategias de estudio que aumenten las posibilidades para el análisis de la interacción del *Speract* con su receptor.

Este análogo podría ayudar a identificar más acertadamente la distribución del receptor del *Speract* en el flagelo del espermatozoide utilizando microscopia de alta resolución o ensayos de FRET entre dos análogos fluorescentes.

Además, existen otras líneas de investigación que podrían explorarse relacionadas, por ejemplo, con la interacción del receptor con la guanilato ciclasa.

Finalmente, es muy importante el desarrollo de técnicas que faciliten el aprendizaje en distintas instituciones educativas, de eventos relacionados con la fecundación, como es el caso de la quimiotaxis.

5. Hipótesis

La unión de proteínas fluorescentes al *Speract* (*Ametrine*, *CFP* y *Venus*) no impedirá la unión del péptido a su receptor ni afectará los cambios fisiológicos que induce en el espermatozoide de erizo de mar.

6. Objetivo general

Desarrollar *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract*, y evaluar junto con *CFP-Speract* la unión a su receptor y su efecto en el espermatozoide de erizo de mar comparando con el *Speract*.

7. Objetivos particulares

1. Transferir los genes de las proteínas fluorescentes (*Ametrine* y *Venus*) al vector plasmídico pET y unirlos a la secuencia del *Speract*.
2. Expresar y purificar *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract*.
3. Determinar los cambios en el Em, el pH_i y en la [Ca²⁺]_i inducidos por *CFP-Speract* y compararlos con los generados por el *Speract*.
4. Observar la unión de *Venus-Speract* a su receptor por microscopia confocal.
5. Establecer la capacidad de unión de *Ametrine-Speract* a su receptor, en competencia con el análogo fluorescente 5(6)-SFX-*Speract* (*F-Speract*).

8. Materiales y métodos

8.1 Reactivos

Para digerir los plásmidos se utilizaron las enzimas de restricción: HindIII y XhoI de Thermo Scientific. Para los ensayos de PCR se utilizó la enzima Vent polimerasa de New England Biolabs. Para ligar los extremos romos de los fragmentos de ADN se utilizó la T4 ligasa de Thermo Scientific. Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit miniprep (cat: #K0503) de Thermo Scientific. Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó IPTG (Isopropil-D-1-tiogalactoripanosido) de Sigma. La mezcla de inhibidores de proteasas, Complete, fue de Roche. Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Luria Broth (1 litro): Triptona 10%, extracto de levadura 5% y NaCl 10%. En el caso de medio solido, se agregó agar para una concentración final de 1.5%.

La composición del agua de mar artificial (AMA) fue la siguiente en mM: NaCl 486, MgCl₂ 27, MgSO₄ 29, CaCl₂ 10, KCl 10, NaHCO₃ 2.5, EDTA 0.1 y Hepes 10, con un pH de 8.0 y 1000 mOsm.

Para hinchar a los espermatozoides se utilizó agua de mar artificial diluida diez veces, con una concentración final de MgSO₄ de 22.9 mM y pH de 6.8 (AMA1:10).

Además se utilizó agua de mar artificial con CaCl₂ 1mM, pH 7.0 y 1000 mOsm (AMA1Ca).

Para mantener la fluorescencia de las muestras fijadas se usó Citifluor de Electron Microscopy Sciences.

Para las determinaciones del pH_i, de la [Ca²⁺]_i y del Em se utilizó BCECF AM, Fluo-4 AM y Disc₃(5) respectivamente, todos de Invitrogen.

El *Speract* se sintetizó en el laboratorio del Dr. Possani y el *F-Speract* fue preparado en el laboratorio del Dr. Darszon, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

8.2 Material biológico

1. Cepas bacterianas

E. coli JM109 (DE3): Aislamiento de ADN plasmídico

E. coli BL21 (DE3): Expresión de proteínas recombinantes

2. Plásmidos para la clonación y expresión de proteínas recombinantes

Nombre	Vector	
	pET	pRSET
Tamaño	5.2 kb	2.9 kb
Resistencia a antibiótico	Kanamicina	Ampicilina

3. Erizos de mar

Los individuos de las especies *S. purpuratus* y *L. pictus*, se obtuvieron de Pamanes Inc. Ensenada, Baja California, México y Marinus, Inc. Long Beach, CA, USA respectivamente. En el laboratorio, los erizos fueron mantenidos en acuarios con AMA con un pH de 8, 1000 mOsm y una temperatura de 14 °C. Cada especie de las utilizadas tiene una temporalidad distinta, por lo que algunos de los experimentos fueron realizados de acuerdo a la disponibilidad de los individuos.

4. Espermatozoides de erizo de mar

Los espermatozoides (*L. pictus* o *S. purpuratus*) se obtuvieron inyectando 1-2 ml de KCl 0.5 M en la cavidad intracelómica de los erizos. Las células se colectaron con una pipeta Pasteur en tubos de 1.5 ml y se mantuvieron en hielo hasta su uso (máximo 12 hrs). Para los experimentos, los espermatozoides se diluyeron (1:10) en AMA1Ca.

8.3 Técnicas

8.3.1 Preparación de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* en el vector pET

Las secuencias codificantes de dos genes de proteínas fluorescentes (*Venus* y *Ametrine*), se obtuvieron a partir del vector de clonación pRSET y se unieron a la secuencia del *Speract* mediante PCR para finalmente ser clonadas en el vector pET.

El vector pET fue separado de *Nectarine* (proteína fluorescente roja), aprovechando los sitios únicos de restricción para HindIII y XhoI. Se separaron los fragmentos por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y el vector se purificó a partir del fragmento correspondiente utilizando un amortiguador para solubilizar la agarosa e isopropanol para precipitar el ADN.

Posteriormente, mediante la técnica de PCR, se amplificaron las secuencias de las proteínas fluorescentes *Ametrine* y *Venus* contenidas en el vector pRSET. Con el oligonucleótido Tak 88 se incorporó a la amplificación, la secuencia del *Speract* unido a las proteínas fluorescentes con un espaciador rico en glicina (GGGSGGGG), mientras que con el oligonucleótido Tak 22 se añadió una cola de polihistidina que serviría para la purificación posterior de la proteína recombinante (Ver anexo 1 y fig. 6). Los dos oligonucleótidos fueron diseñados por el Dr. Takuya Nishigaki.

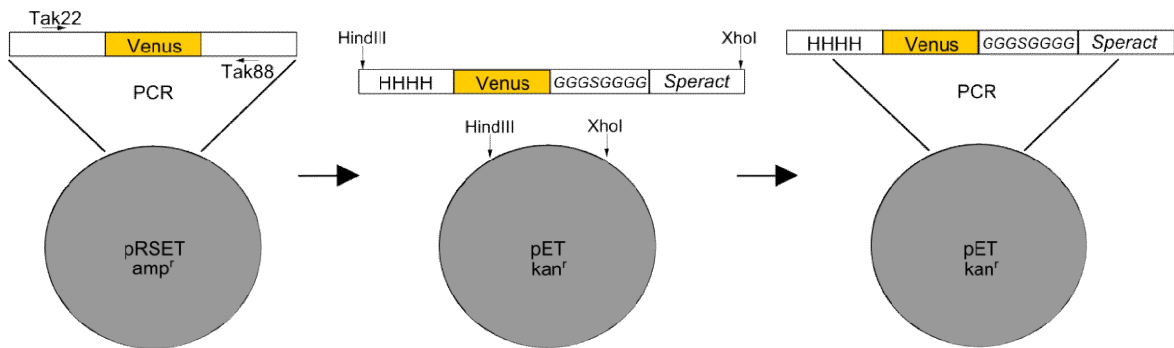


Figura 6. Amplificación de las proteínas fluorescentes mediante PCR.

Las proteínas fluorescentes *Venus* y *Ametrine* (en el esquema solo se muestra a *Venus*) contenidas en el vector pRSET (resistente a ampicilina) se amplificaron por PCR, utilizando los oligonucleótidos Tak22 y Tak88 (ver Anexo1), diseñados para incorporar una cola de polihistidina y la secuencia del *Speract* (unida mediante un espaciador rico en glicinas) respectivamente. Posteriormente, el producto se digirió con las enzimas HindIII y XhoI para ligarlo al vector pET (resistente a kanamicina).

Los productos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción HindIII y XhoI y posteriormente se ligaron al vector pET (haciendo de esta manera, un cambio de resistencia a antibiótico) purificado previamente; esto es posible ya que los dos fragmentos tienen extremos complementarios. Después, células quimiocompetentes JM109 (DE3) tratadas con CaCl₂, se transformaron con las construcciones preparadas; una vez que crecieron las colonias, se seleccionó una por el brillo característico de *Venus* o *Ametrine* para hacer un cultivo de una noche y extraer el ADN plasmídico. Para confirmar la presencia de la construcción deseada se realizó una digestión con las enzimas HindIII y XhoI. El ADN resultante se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar que el patrón de digestión no correspondiera al de la construcción de donde se obtuvo el vector.

8.3.2 Expresión de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* y obtención de la fracción soluble

El ADN con las construcciones de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract*, se utilizó para transformar células quimiocompetentes BL21 (DE3) (tratadas con CaCl_2). Una de las colonias positivas se creció en un matraz de 250 ml, con 50 ml de LB kanamicina por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, 2 ml del cultivo se transfirieron a 200 ml de LB kanamicina (contenidos en un matraz de 1000 ml) y se continuó la incubación a 37 °C por aproximadamente 2 horas hasta una DO_{600} de 0.8. Finalmente, al cultivo se le agregó 300 μM de IPTG (el cual induce la expresión de la proteína recombinante al remover el represor del promotor transcripcional T7 del operón *lac*), y se incubó a 30 °C por 24 horas. Al final, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm en el rotor 16A4-44 de Eppendorf por 20 min. a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 8 ml de Sol. A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y pH 7.4). La suspensión se centrifugó a 1000 $\times g$ por 15 min. a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 8 ml de Sol. A con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete 1X). La suspensión se separó en alícuotas de 1 ml para sonicar con 2 pulsos de 40 segundos a una amplitud del 50% en un sonicador de punta Ultrasonic Processor GE50T. Después de la sonicación, las células se centrifugaron a 11750 $\times g$ por 15 min. a 4 °C y el sobrenadante se mantuvo en hielo y protegido de la luz, hasta su uso.

8.3.3 Purificación de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* en columna de Ni^{2+}

Para purificar *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* se aprovechó la afinidad que tiene el Ni^{2+} por su cola de polihistidina. Después, las proteínas se eluyeron mediante un gradiente ascendente de imidazol.

Se montó una columna con 1 ml de resina de Ni^{2+} en 5 ml de Sol. B (Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM y pH 7.4). La Sol. B se dejó salir y la columna se equilibró con 3 ml de la misma solución conteniendo 20 mM de imidazol. Posteriormente se

agregó la fracción soluble que contiene la proteína a purificar (8 ml). La fluorescencia de las proteínas permitió observar su unión a la resina. A continuación, la columna se lavó con 5 ml de Sol. C (Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 50 mM y pH 7.4) (para eliminar de la resina las uniones inespecíficas), los cuales se recuperaron en 10 tubos de 500 μ l. Posteriormente, se eluyeron las dos proteínas recombinantes (proceso visible también debido a la fluorescencia de las proteínas), agregando 3 ml de Sol. D (Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 200 mM y pH 7.4) y colectando alícuotas de 0.5 ml, las cuales se almacenaron a 4 °C. Se determinó la absorbancia (Abs) de cada alícuota en un espectrofotómetro para volúmenes pequeños (nanodrop), a la longitud de onda de excitación correspondiente de cada proteína fluorescente. Tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar (ϵ) de cada proteína y la distancia (l) que recorre la luz en el equipo (1 mm), se calculó la concentración de las soluciones, utilizando la ley de Lambert-Beer y la siguiente fórmula: $\text{Concentración} = \text{Abs} / (\epsilon \cdot l)$.

8.3.4 Determinación de la pureza de *Ametrine-Speract*, *CFP-Speract* y *Venus-Speract* en un gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PA-SDS)

La pureza de *Ametrine-Speract*, *CFP-Speract* (purificada antes de iniciar el proyecto) y *Venus-Speract* aisladas en la columna de níquel, se analizó por medio de electroforesis en un gel de PA-SDS al 15% de acuerdo a un reporte previo (Laemmli, 1970). Este tipo de geles permiten la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular gracias a la presencia del detergente aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS).

Se utilizaron dos carriles por cada proteína, agregando 1.5 y 3 μ g respectivamente. Al final de la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.5%, metanol 50% y ácido acético 5%) por una hora con agitación suave y se destiñó con la misma solución sin colorante.

8.3.5 Determinación del Em, el pH_i y la [Ca²⁺]_i en espermatozoides de *S. purpuratus* en respuesta a *CFP-Speract*

Como ya se mencionó, la unión del *Speract* a su receptor en el espermatozoide de erizo de mar, induce cambios en el Em, la [Ca²⁺]_i y el pH_i.

El potencial de membrana en reposo de una célula puede modificarse cuando la diferencia de potencial eléctrico a los dos lados de la membrana se hace más negativa o positiva. Para medir estos cambios se pueden utilizar las cianinas como la Disc₃(5), que al ser adicionada a un grupo de células se particiona en la membrana a partir de cambios en el potencial, modificando el espectro de emisión del colorante a valores más positivos si este entra a la célula (hiperpolarización) o más negativos si sale de ella (despolarización) (Hoffman & Laris, 1974).

Para determinar el pH_i de una célula, el colorante más utilizado desde hace ya algún tiempo es el BCECF AM, el cual es un indicador fluorescente permeable a la membrana de la célula con un valor de pKa de aproximadamente 7. Este indicador contiene un grupo acetoximetil éster que permite la entrada a la célula donde los grupos derivados del éster son hidrolizados por esterasas citosólicas para evitar la salida del colorante (Weiner & Hamm, 1989).

Finalmente, los cambios en la [Ca²⁺]_i son de los más relevantes en la respuesta del espermatozoide al *Speract*. Para medir este parámetro se utilizó el indicador fluorescente permeable a la célula, Fluo-4 AM, el cual es un análogo de Fluo-3 AM (un quelante de Ca²⁺ acoplado a un fluoróforo) que presenta una mayor excitación a 488 nm (Gee et al., 2000).

Para la determinación de los parámetros descritos anteriormente, los espermatozoides de la especie *S. purpuratus* (especie utilizada debido a la disponibilidad temporal) se diluyeron 10 veces en AMA1Ca conteniendo Fluo-4 AM 20 μM (para la [Ca²⁺]_i) o BCECF AM 8 μM (para el pH_i) en presencia de ácido plurónico 0.2% y se incubaron por 2 horas y media a 14 °C en la oscuridad. Los espermatozoides cargados con los indicadores fluorescentes se diluyeron a 2 ml

con AMA1Ca y se centrifugaron a 200 xg por 1 min. para la eliminación de celomocitos y espinas, después a 1000 xg por 7 min para eliminar el sobrenadante con el colorante residual. Los espermatozoides en el precipitado se resuspendieron en el volumen original de AMA1Ca. De la suspensión preparada anteriormente, se tomaron 10 μ l y se agregaron a una celda que contenía 0.8 ml de AMA o AMA1:10, la cual se mantuvo con agitación suave a 14°C. En el caso del potencial de membrana, los espermatozoides (10 μ l de los diluidos 1:10 en AMA1Ca) que no fueron cargados se agregaron directamente a 0.8 ml de AMA o AMA1:10 conteniendo 1 μ M del indicador fluorescente de potencial Disc₃(5) (González-Martínez, Guerrero, Morales, de De La Torre, & Darszon, 1992).

Las determinaciones de los parámetros mencionados anteriormente se hicieron en espermatozoides en condiciones fisiológicas y en espermatozoides hinchados, basándonos en reportes previos donde se menciona que la hiperpolarización inducida por el *Speract* es más grande en ésta condición (Babcock, Bosma, Battaglia, & Darszon, 1992; Reynaud, De de La Torre, Zapata, Liévano, & Darszon, 1993; Galindo, Beltrán, Cragoe, & Darszon, 2000). La fluorescencia se monitoreó en el espectrofluorómetro mencionado previamente, de acuerdo a los valores de excitación/emisión de cada indicador: Disc₃(5): 640/670 nm, Fluo-4 AM: 495/515 nm y BCECF AM: 500/550 nm.

En los tres casos, se realizó una adición de *Speract* o *CFP-Speract* 10 nM y el cambio en la fluorescencia se registró durante 1 min. En el caso de la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$, después del minuto de registro, se hizo una adición de Triton X-100 0.05% para permeabilizar las células y obtener el máximo de fluorescencia emitida por el marcador Fluo-4 AM. Durante la determinación del potencial de membrana, se añadió en primer lugar 1 μ M de Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP), después se adicionó el *Speract* y posteriormente se agregó 2 μ M del ionóforo valinomicina para igualar las concentraciones de K^+ , entre el interior y el exterior de la célula. Posteriormente se hicieron adiciones secuenciales de KCl (equivalentes a 2.5 mM, 5 mM, 10 mM y 10 mM) para calibrar los cambios en la fluorescencia de acuerdo con el potencial de equilibrio del K^+

utilizando la ecuación de Nernst ($E_m = RT/zF \cdot \ln [K^+]_e/[K^+]_i$; asumiendo una concentración intracelular de K^+ de 180 mM) y haciendo una regresión lineal de estos datos con los valores de fluorescencia (Fig. 7) (Babcock et al., 1992). En el caso del pH_i , las determinaciones fueron cualitativas solamente, por lo que no se realizó una calibración al final del trazo. En todas las determinaciones del E_m , del pH_i y de la $[Ca^{2+}]_i$, hicimos dos tipos de controles, uno agregando solo el solvente en el que se encuentra el *Speract* (Tris-HCl pH 8), y otro agregando 40 mM de KCl antes de la adición de *Speract* para bloquear las respuestas inducidas por el péptido, evitando la formación de un gradiente de K^+ hacia el exterior.

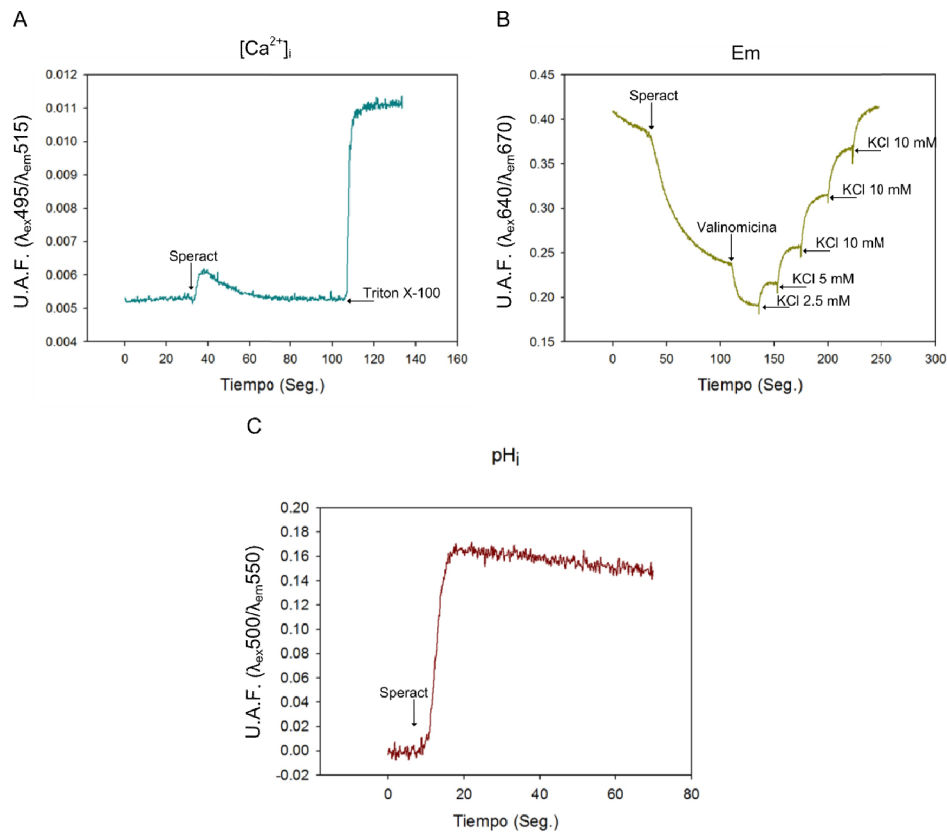


Figura 7. Registro de los cambios en la fluorescencia asociados a la $[Ca^{2+}]_i$, el E_m y el pH_i .

La figura muestra cómo se hicieron las determinaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ (A) del E_m (B) y del pH_i (C) en el espectrofluorómetro. En el caso de la $[Ca^{2+}]_i$, después de registrar la respuesta al *Speract* durante 1 minuto, se agregó Triton X-100 0.05% para permeabilizar

a la célula y obtener el máximo de fluorescencia de Fluo-4 AM. Para el Em, después de registrar la respuesta al *Speract*, se agregó valinomicina para igualar la cantidad de K⁺ entre el interior y el exterior de la célula. Cuando la respuesta a la valinomicina se estabilizó, se hicieron adiciones secuenciales de distintas concentraciones de KCl (equivalentes a 2.5, 5 y 10 mM). Finalmente, en el caso del pH_i, las determinaciones fueron solamente cualitativas por lo que solamente se hizo la adición del *Speract* y el registro de la fluorescencia durante 1 minuto.

8.3.6 Localización de *Venus-Speract* en espermatozoides de *L. pictus*

Para investigar la zona del espermatozoide en que se une *Venus-Speract*, utilizamos microscopia de fluorescencia. Después de obtener los espermatozoides de la especie *L. pictus* (especie utilizada por disponibilidad temporal) por inyección intracelómica, se realizó una dilución 1:10 de estos en AMA1Ca. Estos espermatozoides se diluyeron 100 veces en AMA con 0.1% de BSA. Las dos diluciones se separaron en 4 tubos conteniendo alguno o ninguno de los siguientes tratamientos: *Venus-Speract* 10 nM, *Speract* 10 nM y *Venus-Speract* 10 nM junto con *Speract* 500 nM como competidor (para evitar la unión del análogo fluorescente). Los tubos se centrifugaron a 1000 xg por 7 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante para así eliminar la proteína no unida a los espermatozoides.

Posteriormente utilizando laminillas (de 3 pozos para virología) se colocaron 25 µl de cada suspensión de espermatozoides en diferentes pozos y se incubaron en un cuarto frío a 4 °C durante una hora. Los espermatozoides se fijaron mediante un proceso que implica la muerte de las células manteniendo sus características estructurales. Para esto, se agregaron 25 µl de paraformaldehído 4% en AMA pH 8 durante 10 minutos e inmediatamente después se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con un amortiguador de fosfatos (PBS; en mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 10, KH₂PO₄ 1.8 mM) 1X. Finalmente, se agregaron 5 µl de citifluor (el cual evita la pérdida de la fluorescencia) y se colocó un cubreobjetos en cada

laminilla (0.13-0.17 mm de grosor), los cuales se sellaron en los bordes con esmalte.

La fluorescencia de los espermatozoides marcados con *Venus-Speract* se observó en un microscopio confocal Zeiss LSM510, utilizando un objetivo 100X. La excitación de *Venus-Speract* se hizo a 514 nm y la emisión de la fluorescencia se registró a 528 nm. Las imágenes de los espermatozoides en las diferentes condiciones se obtuvieron mediante el programa LSM 5 Image Examiner.

8.3.7 Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC) de *F-Speract*

La RP-HPLC, consiste en la separación de moléculas en base a su hidrofobicidad. La separación depende de la unión hidrofóbica de los solutos de la fase móvil a los ligandos unidos a la fase estacionaria (Rajan et al., 2004).

Debido a que el *F-Speract* utilizado estuvo almacenado durante catorce años a -20 °C, se decidió analizarlo mediante RP-HPLC (de forma solamente cualitativa), para comprobar que este compuesto no se hubiera degradado. Para la realización de esta técnica, se utilizó una columna Vydac C8 con una velocidad de flujo de 1 ml/min, ácido trifluoroacético 0.1%, acetonitrilo 40% en la fase móvil y la muestra: *F-Speract* 10 nM.

8.3.8 Cálculo de la concentración del receptor a *Speract* en espermatozoides de *L. pictus*

Antes de hacer los experimentos de unión, calculamos la concentración del receptor a *Speract* en una suspensión de espermatozoides de *L. pictus* (debido a que presentan una mayor densidad del receptor a *Speract* (6.3×10^4 /células; (Nishigaki & Darszon, 2000)). Para esto, se monitoreó la fluorescencia de *F-*

Speract, tomando en cuenta que según lo reportado, el 88% de este análogo pierde reversiblemente su fluorescencia al unirse a su receptor (Nishigaki & Darszon, 2000).

La fluorescencia de *F-Speract* 10 nM se registró en 800 μ l de AMA conteniendo BSA 0.1% (para evitar la unión inespecífica de *Ametrine-Speract*). Durante el registro se agregaron 5 μ l de espermatozoides de *L. pictus* diluidos 1:10 en AMA1Ca (Fig. 8).

La fluorescencia correspondiente al cambio después de agregar los espermatozoides se calculó haciendo la corrección de acuerdo al porcentaje de *F-Speract* que pierde su fluorescencia utilizando la siguiente fórmula: $F = F_i - (F_i - F_f) / 0.88$, donde F es el cambio en la fluorescencia, F_i es la fluorescencia de 10 nM de *F-Speract* y F_f , la fluorescencia después de agregar espermatozoides. Finalmente se determinó la concentración de receptor a *Speract* que corresponde al valor de fluorescencia calculado.

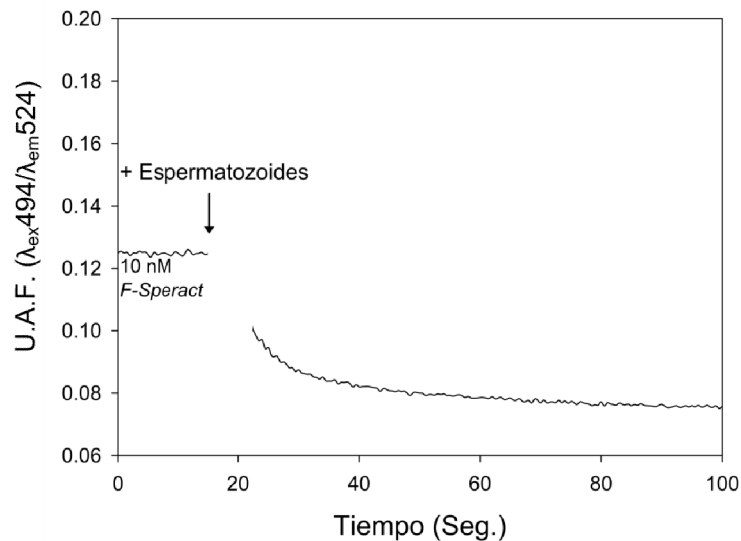


Figura 8. Cálculo de la concentración del receptor a *Speract*, en espermatozoides de *L. pictus*

Para realizar adecuadamente los experimentos de unión, se calculó previamente la concentración del receptor a *Speract* en las suspensiones de espermatozoides utilizadas como está reportado (Nishigaki & Darszon, 2000). Primero se registró la fluorescencia de

10 nM de *F-Speract* en 800 μ l de AMA. Posteriormente se agregaron 5 μ l de espermatozoides (de una dilución 1:10 en AMA1Ca) y se observó el cambio en la fluorescencia correspondiente al 88% del *F-Speract* que se unió al receptor, permitiéndonos cuantificar la concentración del receptor. El espacio en blanco del trazo corresponde al momento en el que se abrió la cámara para agregar los espermatozoides.

8.3.9 Determinación de la capacidad de unión de *Ametrine-Speract* a espermatozoides de *L. pictus*

Cuando ya sabíamos cuál era la concentración del receptor en la dilución de espermatozoides se realizaron los experimentos para cuantificar la capacidad de unión de *Ametrine-Speract*. Para esto, se prepararon alícuotas que contuvieran 10 nM del receptor y 10 nM de *F-Speract*. A cada alícuota se les agregó *Speract* o *Ametrine-Speract* en diferentes concentraciones (nM): 1000, 316, 100, 31.6, 10, 3.16 y 1 (este tipo de dilución secuencial se utilizó para minimizar el error por el pipeteo) para observar la capacidad de cada concentración de evitar la unión de *F-Speract* y por lo tanto disminuir su apagado.

En una celda de 160 μ l se agregó la misma cantidad de las soluciones preparadas anteriormente y se registró la fluorescencia de *F-Speract* en un espectrofluorómetro SLM-Aminco utilizando los siguientes valores de excitación y emisión: 494/524 nm.

8.3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa R versión 3.0.1 y se utilizaron las pruebas de T-Student no pareada y el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía.

9. Resultados

9.1 Desarrollo y purificación de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract*

Para unir la secuencia del *Speract* a las proteínas fluorescentes, se realizaron ensayos de PCR. Los productos de estos ensayos correspondientes a la amplificación de *Venus* y *Ametrine*, se observaron en un gel de agarosa, en los dos casos se observó una banda de aproximadamente 800 pb (Fig. 9) correspondiente al tamaño esperado (806 pb). La digestión con las enzimas HindIII y XhoI del vector pET (que se observó en un gel de agarosa similar), resultó en dos bandas, una de 5 kb (vector) y otra de 500 pb (*Nectarine*) respectivamente (Fig. 10). La purificación de la banda del gel de agarosa correspondiente al vector, resultó en un ADN con una concentración de 20 ng/μl. Los productos de PCR de *Venus-Speract* y *Ametrine-Speract* que también se digirieron con las enzimas HindIII y XhoI no se observaron en un gel de agarosa por que la cantidad de nucleótidos que se removió en los extremos era muy poca para notar la diferencia. De la transformación de *E. coli* JM109 (DE3) con las construcciones de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* ligadas al vector pET, las colonias positivas, se seleccionaron por el brillo característico de cada proteína fluorescente. El patrón de digestión de las dos construcciones con las enzimas HindIII y XhoI, observado en un gel de agarosa permitió notar una diferencia de aproximadamente 50 pb en relación con el vector pET que contiene a la proteína *Nectarine* (741 pb) (Fig. 10).

La purificación de las proteínas recombinantes fue más sencilla por el hecho de que se trata de proteínas fluorescentes, lo cual permite seguirlas a lo largo de todo el proceso de expresión y purificación.

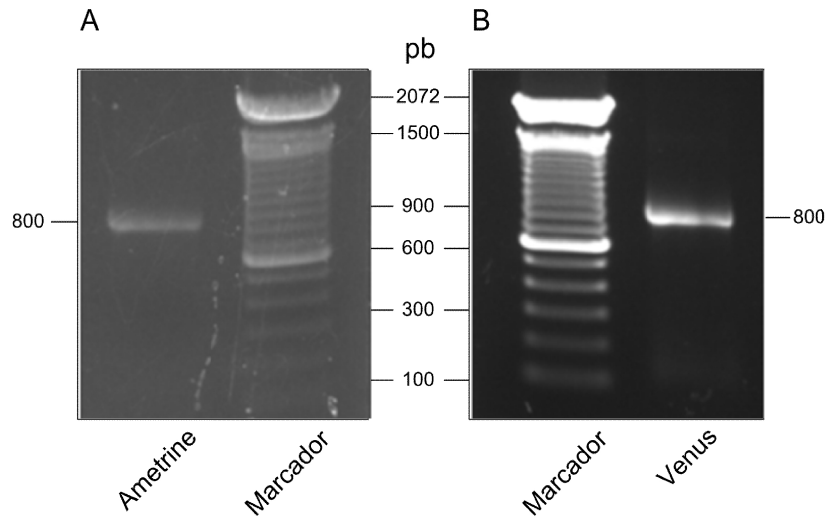


Figura 9. Los productos de PCR de *Ametrine* y *Venus* tienen el tamaño esperado.

Los productos de PCR con las proteínas fluorescentes *Ametrine* (A) y *Venus* (B) se separaron en un gel de agarosa al 1% para posteriormente unirlos a la secuencia del *Speract*. En cada gel se observa el marcador de pares de bases y las bandas de los productos de PCR del tamaño esperado (806 pb).

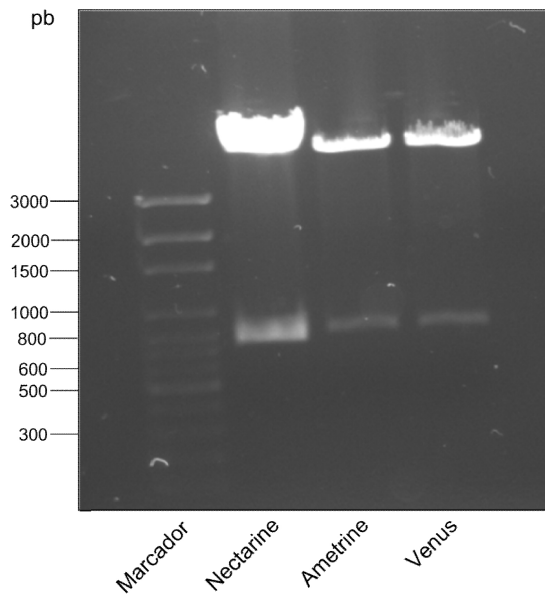


Figura 10. Las construcciones de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* tienen el tamaño esperado.

El ADN purificado de las colonias seleccionadas por color, se digirió con las enzimas *HindIII* y *XhoI* para comprobar que contuvieran las construcciones deseadas. El primer

carril contiene el marcador de pares de bases, el segundo muestra el fragmento de 741 pb que contiene la enzima *Nectarine* (de donde se obtuvo el vector pET). Los siguientes dos carriles corresponden a las construcciones de *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* respectivamente, revelando en los dos casos un fragmento del tamaño deseado (791 pb). Las bandas superiores en el caso de *Nectarine*, *Ametrine* y *Venus* corresponden al ADN que no fue digerido.

9.2 Pureza de *Ametrine-Speract*, *CFP-Speract* y *Venus-Speract*

Para comprobar la pureza de las tres proteínas recombinantes utilizadas en los diferentes experimentos las separamos en un gel de PA-SDS al 15%. La tinción con azul de Coomassie nos muestra principalmente las bandas correspondientes al peso molecular de las tres proteínas recombinantes (aproximadamente 28 kDa) y en el caso particular de *Ametrine-Speract* una pequeña banda de aproximadamente 20 kDa (que representa alrededor del 4% de la proteína total) que podría ser una proteína contaminante o degradación parcial de *Ametrine-Speract* (Fig.11).

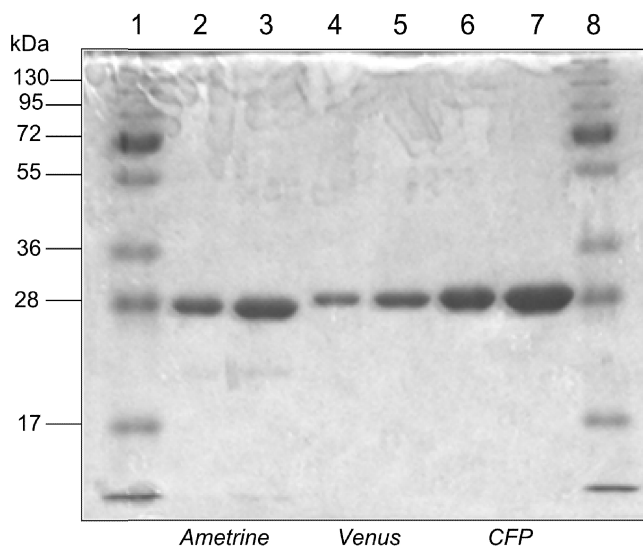


Figura 11. La pureza de *Ametrine-Speract*, *CFP-Speract* y *Venus-Speract* es alta

El gel de PA-SDS al 15% teñido con azul de Coomassie R-250 nos permitió observar la pureza de *FP-Speract*. Los carriles 1 y 8 contienen el marcador molecular. Los carriles 2,

4 y 6 contienen 1.5 μg de las proteínas indicadas, mientras que los carriles 3, 5 y 7 contienen 3 μg de la misma proteína.

9.3 Los cambios provocados en el Em, el pH_i y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por *CFP-Speract*, son similares a los causados por el *Speract*

Como mencionamos en la introducción, la cascada de señalización del *Speract*, involucra cambios en el Em, el pH_i y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los espermatozoides. Debido a lo anterior, para investigar sobre la especificidad de *CFP-Speract*, comparamos los cambios inducidos en los espermatozoides por dicho análogo fluorescente con los provocados por el *Speract* no marcado. En este trabajo decidimos utilizar además de los espermatozoides en condiciones fisiológicas, células hinchadas, las cuales muestran una respuesta mucho más grande que sirvió para comparar los efectos del *CFP-Speract* con los inducidos por el *Speract*. *CFP-Speract* fue desarrollado para las determinaciones del Em, del pH_i y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, debido a que a diferencia de los otros análogos utilizados, su espectro de excitación y emisión ($\lambda_{\text{exc}}433/\lambda_{\text{emi}}476$) no interfiere con el espectro correspondiente de los indicadores utilizados para medir los parámetros mencionados. Nuestros resultados muestran que 10 nM de *CFP-Speract* induce cambios estadísticamente similares en el Em y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 12 y 14), a los provocados por el *Speract* tanto en espermatozoides hinchados, como en los que no lo estuvieron.

Los cambios en el Em en respuesta al *Speract*, se caracterizan por una hiperpolarización inicial, seguida de una repolarización de la membrana. En nuestros resultados no fue posible ver la repolarización de la membrana después de registrar la respuesta al *Speract* en las células hinchadas, a diferencia de las células en condiciones fisiológicas. Es importante mencionar que de acuerdo a lo esperado, las células hinchadas mostraron una respuesta significativamente más grande en el caso del Em así como en el pH_i .

La determinación cualitativa del pH_i muestra una ligera diferencia entre las respuestas de los espermatozoides a *Speract* y a *CFP-Speract*, siendo menor la de este último (Fig 13).

Como se esperaba, el control administrando el solvente en el que se encontraban el *Speract* y el *CFP-Speract*, no provocó ningún cambio importante en las determinaciones del Em, del pH_i ni de la $[Ca^{2+}]_i$. Además, la presencia de KCl 40 mM bloqueó la respuesta inducida por *Speract* o *CFP-Speract* de los tres parámetros medidos, en los dos tipos de células utilizadas (Figs. 12, 13 y 14).

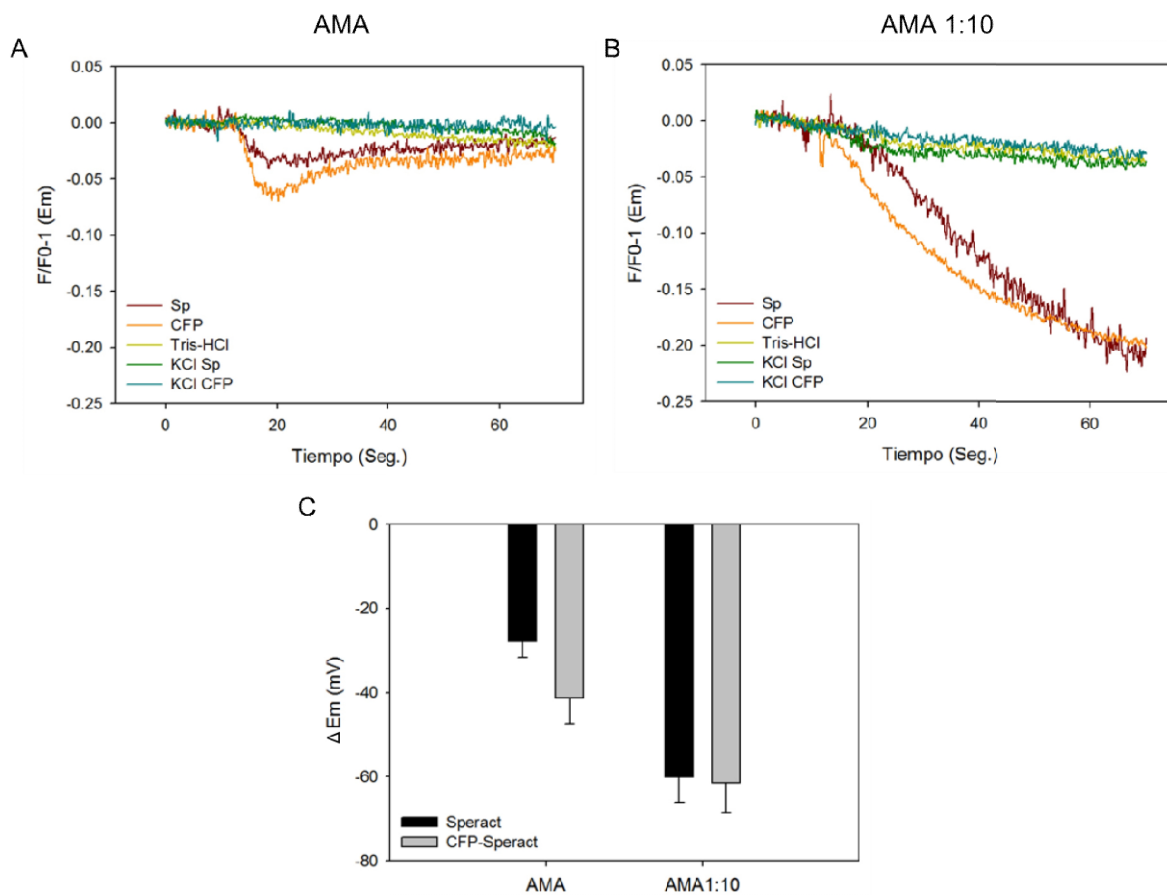


Figura 12. *CFP-Speract* y *Speract* causan cambios similares en el E_m de espermatozoides y los cambios son mayores en células hinchadas.

Trazos representativos de los cambios en el E_m inducidos por la adición de *Speract*, *CFP-Speract* (pre-tratados o no con KCl 40 mM) o Tris-HCl pH 8 en espermatozoides en AMA

(A) o en AMA 1:10 (B; células hinchadas) de la especie *S. purpuratus*. **(C)** Resumen de datos de los aumentos del Em en los dos tipos de células ($p > 0.05$ en los dos casos). Los valores en mV se calcularon mediante la ecuación de Nernst considerando los valores de fluorescencia obtenidos en la calibración de cada trazo. Los cambios son significativamente mayores en espermatozoides hinchados tanto para el *Speract* como para *CFP-Speract* ($p < 0.05$). $n=3$.

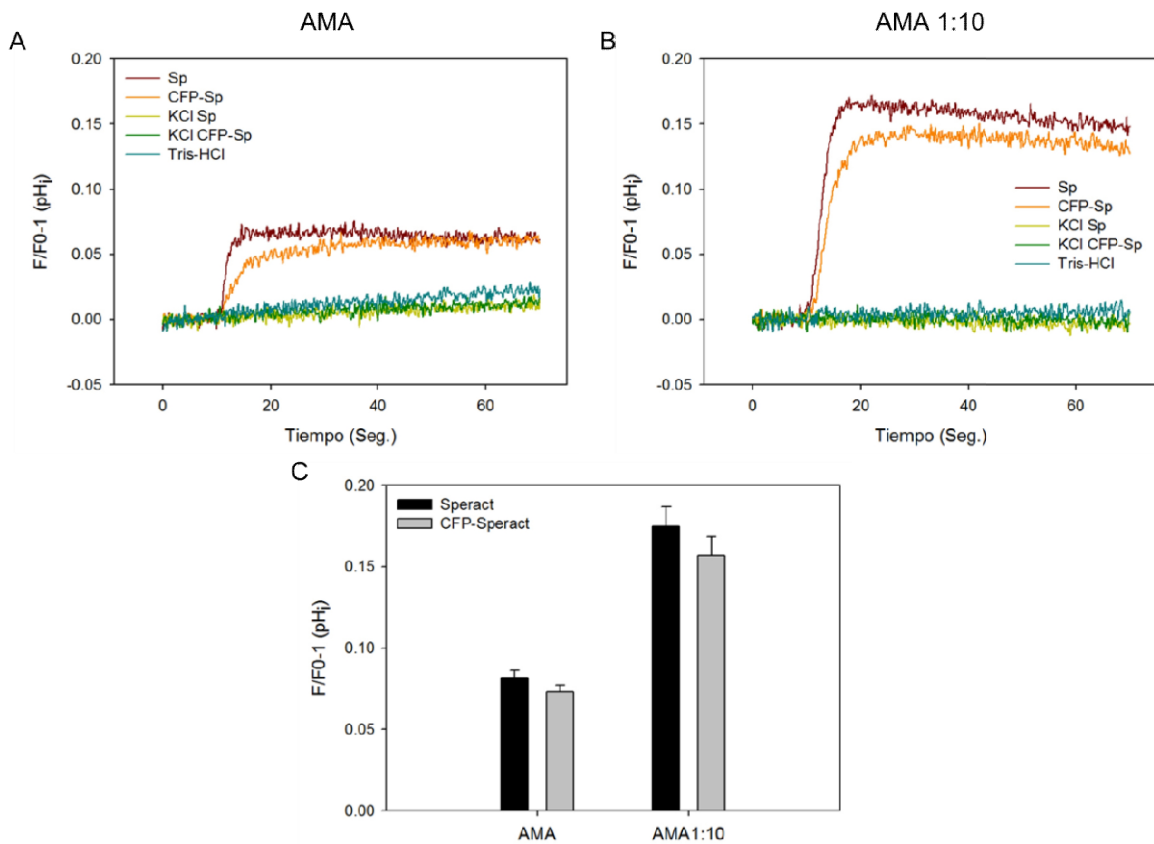


Figura 13. *CFP-Speract* causa cambios ligeramente menores que el *Speract* en el pH_i de espermatozoides y los cambios son mayores en células hinchadas.

Trazos representativos de los aumentos del pH_i inducidos por la adición de *Speract*, *CFP-Speract* (pre-tratados o no con KCl 40 mM) o Tris-HCl pH 8 en espermatozoides en AMA (A) o AMA 1:10 (B; células hinchadas) de la especie *S. purpuratus*. **(C)** Resumen de datos de los aumentos del pH_i en los dos tipos de células. Los cambios son significativamente

mayores en espermatozoides hinchados tanto para el *Speract* como para *CFP-Speract* ($p < 0.05$). $n = 3$.

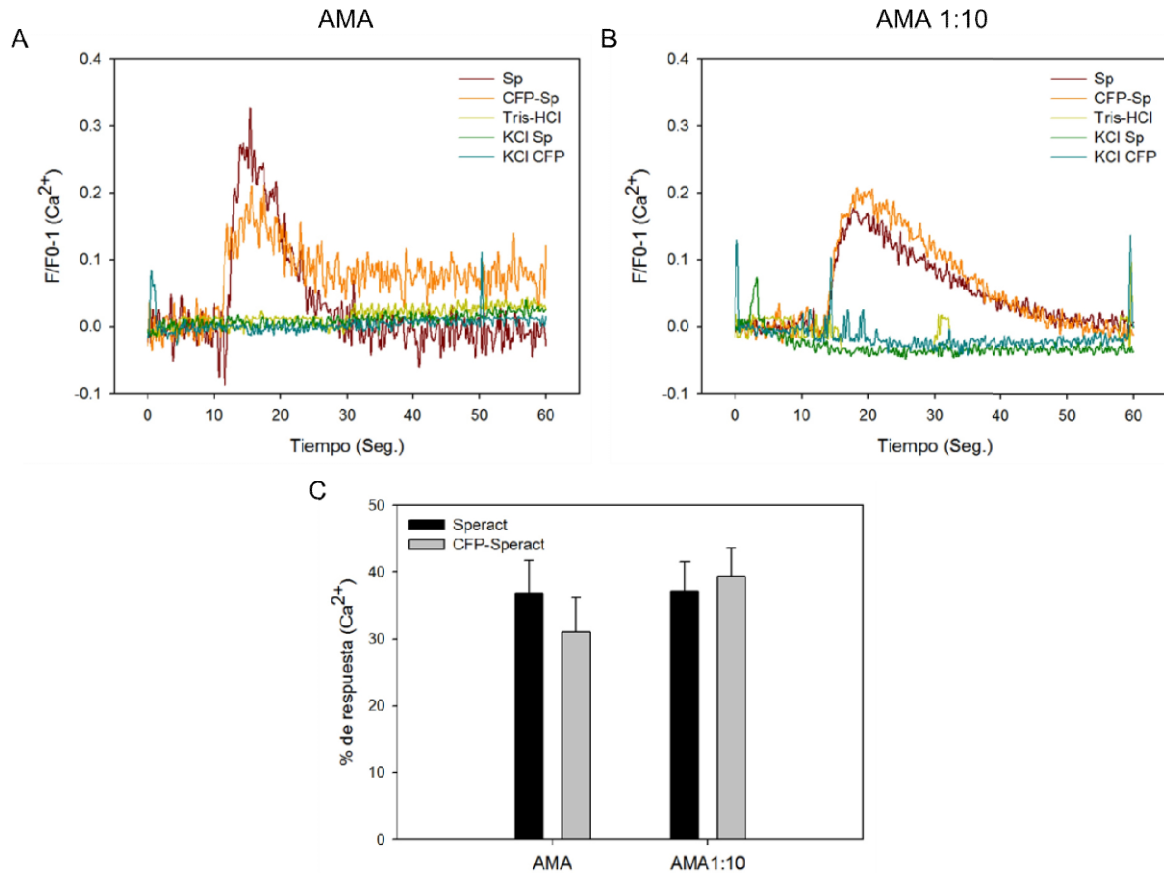


Figura 14. *CFP-Speract* y *Speract* causan cambios similares en la $[Ca^{2+}]_i$ de espermatozoides en condiciones fisiológicas e hinchados.

Trazos representativos de los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la adición de *Speract*, *CFP-Speract* (pre-tratados o no con KCl 40 mM) o Tris-HCl pH 8 en espermatozoides en AMA (A) o AMA 1:10 (B; células hinchadas) de la especie *S. purpuratus*. **(C)** Resumen de datos de los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en los dos tipos de células ($p > 0.05$ en los dos casos). Los datos se normalizaron considerando el máximo de fluorescencia obtenido al final del trazo, permeabilizando a las células con Triton X-100 0.05%. $n = 3$.

9.4 *Venus-Speract* se une al flagelo del espermatozoide de *L. pictus*

Con la idea de investigar la distribución de *Venus-Speract* en el espermatozoide y determinar la especificidad de la unión a dicha célula pusimos en contacto a este análogo fluorescente con espermatozoides de la especie *L. pictus* en AMA pH 8.0 conteniendo 0.1% de BSA y en presencia o ausencia de *Speract* (500 nM). La figura 15 muestra imágenes obtenidas por microscopia confocal de la unión de *Venus-Speract* a espermatozoides de *L. pictus*. Podemos observar que *Venus-Speract* se une principalmente al flagelo del espermatozoide y que dicha unión es específica dado que en presencia de 500 nM de *Speract* para competir por el receptor, desaparece prácticamente la fluorescencia asociada al flagelo. La misma figura muestra que los espermatozoides control no mostraron autofluorescencia.

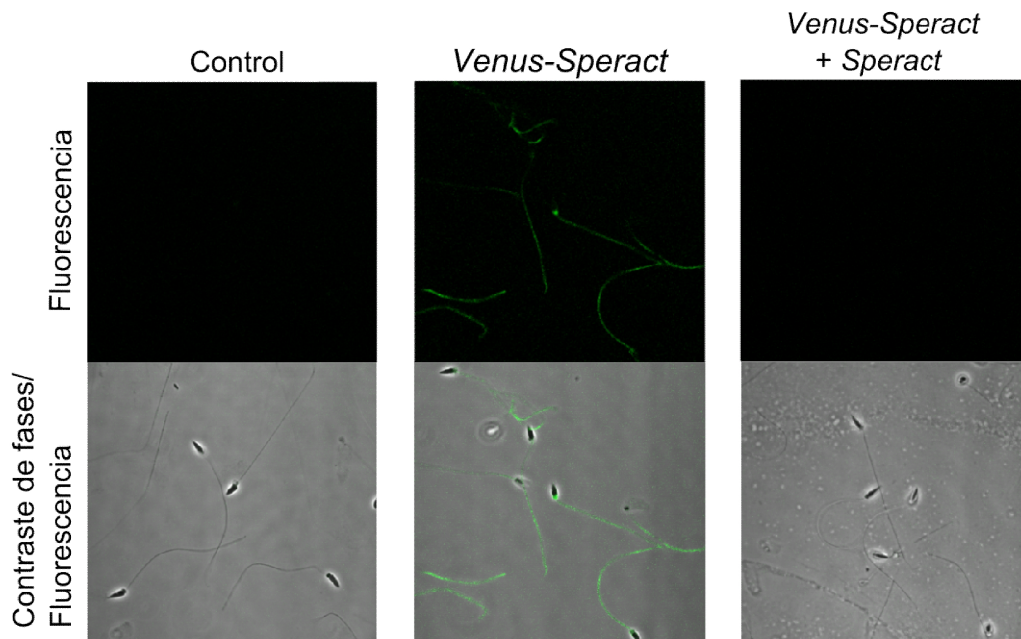


Figura 15. *Venus-Speract* se une específicamente al flagelo de espermatozoides de la especie *L. pictus*.

La figura muestra la fluorescencia (paneles superiores) y la sobreposición de la fluorescencia con el contraste de fases (paneles inferiores). Espermatozoides control

(paneles de la izquierda), tratados con *Venus-Speract* (paneles centrales) donde se puede ver claramente como este se une específicamente al flagelo del espermatozoide. Los paneles de la izquierda muestran que 500 nM de *Speract* compite con *Venus-Speract* por el receptor ubicado en el flagelo de los espermatozoides ya que no se observa fluorescencia en ellos, demostrando que la unión del análogo es específica.

9.5 Pureza de *F-Speract*, analizada por RP-HPLC

Para estar seguros de los resultados obtenidos en los experimentos de unión, analizamos las soluciones de *F-Speract* para asegurar que tenía una pureza alta a pesar del largo tiempo que llevaba almacenado. La figura 16 muestra el cromatograma del RP-HPLC cualitativo. A los 15.02 minutos se observa un pico que corresponde al *Speract* no unido al 5(6)-SFX, mientras que a los 27.61 minutos se localiza el pico correspondiente a *F-Speract*. Nuestros resultados muestran (Fig. 16), como se esperaba, que la mayor parte de la solución analizada corresponde a *F-Speract*, siendo mínima la parte correspondiente al *Speract* que no está unido a 5(6)-SFX. Los tiempos de retención de cada componente se conocían debido a que esta solución ya había sido analizada mediante la misma técnica (RP-HPLC) previamente (por el Dr. Takuya Nishigaki, datos no publicados).

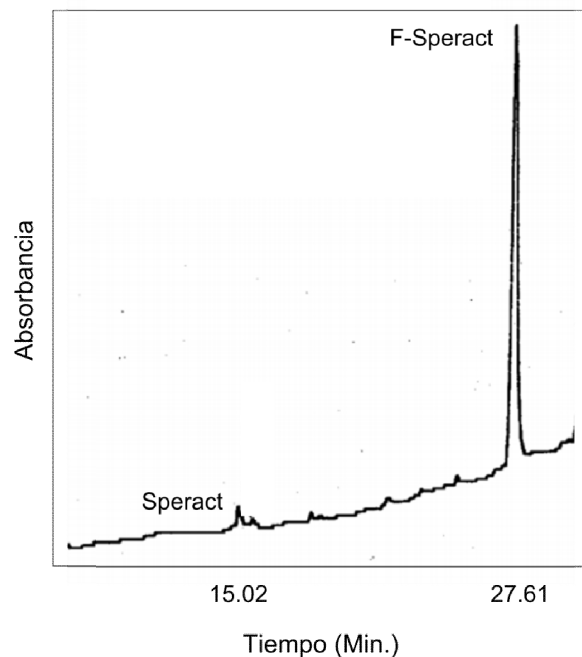


Figura 16. La pureza de *F-Speract* es alta

Cromatograma de RP-HPLC del *F-Speract* usado en los experimentos de unión de *Ametrine-Speract*. A los 15.02 minutos, se observa un pico correspondiente al *Speract* no unido al 5(6)-SFX, y a los 27.61 minutos el pico correspondiente al *F-Speract*.

9.6 Determinación de la concentración del receptor a *Speract* en espermatozoides de *L. pictus*

Antes de cada experimento, fue posible calcular la concentración aproximada del receptor, al cuantificar el apagamiento de *F-Speract* al unirse a los espermatozoides. Dependiendo de cada erizo, la concentración del receptor del *Speract* estuvo entre 800 y 1100 nM (en espermatozoides diluidos diez veces en AMA1Ca).

9.7 La capacidad de unión de *Ametrine-Speract* al espermatozoide de *L. pictus* es menor que la del *Speract*

Después de haber observado que *Venus-Speract* se une de manera específica al flagelo del espermatozoide, decidimos comparar el grado de afinidad de *Ametrine-Speract* con el del *Speract*, utilizando estos como moléculas competidoras de la unión de *F-Speract* (midiendo el apagamiento de este último al unirse a su receptor), obteniendo un mejor análisis cuantitativo de la interacción del análogo fluorescente con su receptor. En este caso utilizamos *Ametrine-Speract* porque su espectro de excitación (λ_{exc} 406) no interfiere con el del *F-Speract* (λ_{exc} 494), como es el caso de *Venus-Speract* (λ_{exc} 515) e inclusive de *CFP-Speract* (λ_{exc} 436).

Nuestros resultados muestran (Fig.17A) que cuando expusimos los espermatozoides a una concentración de 10 nM de *F-Speract* y diferentes concentraciones (haciendo diluciones seriadas, disminuyendo 3.16 veces la concentración de cada una; en nM: 1, 3.16, 10, 31.6, 100 y 316) de *Speract* o de *Ametrine-Speract*, solo hubo diferencia significativa al utilizar 10 y 31.6 nM de competidor. La EC_{50} (la mitad de la concentración efectiva máxima) del *Speract* fue de 8 nM mientras que la de *Ametrine-Speract* fue de 28 nM.

También, mediante una prueba de ANOVA, se compararon de manera independiente las diferencias entre cada concentración de competidor (Fig.17B). En el caso del *Speract*, los resultados muestran diferencias significativas entre 1 y 10 nM de concentración, mientras que para *Ametrine-Speract*, la diferencia estadísticamente significativa con la concentración más baja, se observa a partir de 100 nM, la cual es una concentración saturante.

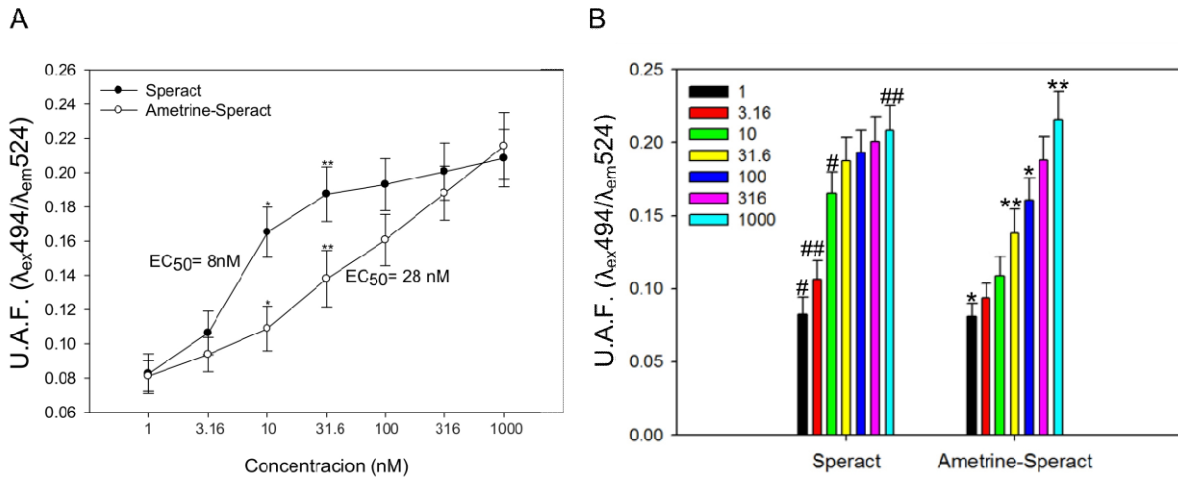


Figura 17. Ametrine-Speract compite con F-Speract de manera menos eficiente que el Speract.

(A) Curva de competencia en la que se compara la intensidad de fluorescencia de F-Speract 10 nM a 524 nm para los dos competidores utilizados. Se puede observar que a concentraciones de 10 y 31.6 nM Ametrine-Speract es un competidor estadísticamente menos eficiente que el Speract. Las EC_{50} de Speract y Ametrine-Speract fueron de 8 y 28 nM respectivamente. *,** p 0.05. **(B)** Intensidad de fluorescencia de F-Speract a 524 nm en presencia de distintas concentraciones (nM) de Speract o Ametrine-Speract. #, ##, *,** p 0.05. n=3.

10. Discusión

El objetivo de este proyecto fue desarrollar un análogo fluorescente del *Speract* que ofreciera nuevas posibilidades para la utilización de herramientas de imagen para el estudio del decapeptido y su receptor. Logramos construir y purificar *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract* y analizar su efecto en el espermatozoide de erizo de mar junto con *CFP-Speract*. Una de las ventajas que estos análogos tienen en relación a otros es con respecto a su síntesis. El hecho de codificarlas genéticamente nos permitió purificar las proteínas recombinantes de manera más eficiente, evitando los costos (que por ejemplo implicó la realización de *F-Speract*, al agregar un análogo de la fluoresceína) y riesgos (en los casos en que se agregan marcas radiactivas) que puede representar el marcaje exógeno del *Speract*. Las ventajas del *Speract* unido a proteínas fluorescentes, son claras cuando se compara a este análogo con $^{125}\text{I-GGG-[Y}^2\text{]-Speract}$, debido a que este requería primero de un proceso inicial para agregar la marca fluorescente y uno posterior para agregar la marca radiactiva, lo cual puede hacer el procedimiento menos eficiente. Otra ventaja de estos análogos, es que en comparación con *F-Speract*, su fluorescencia no se apaga al unirse a su receptor (debido probablemente a la interacción intermolecular del análogo), lo que lo hace una herramienta adecuada para la realización de técnicas de imagen.

En cuanto a la eficiencia de purificación, la tinción con azul de Coomassie de los tres análogos en un gel de PA-SDS permitió ver que el grado de pureza de estas proteínas era adecuado para la experimentación. Esta forma de comprobar la pureza del análogo es más sencilla en relación a la del *F-Speract*, que requería en primer lugar la eliminación del marcaje sobrante y luego la purificación por HPLC. Además, el cambio en la resistencia a antibiótico, el patrón de digestión del ADN (Fig. 11) y sobre todo la presencia de brillo de las proteínas fluorescentes durante el desarrollo de la proteína recombinante en bacterias permitió una fácil selección de las colonias positivas y una mayor seguridad de que la purificación de la proteína estaba realizándose correctamente; creemos que todos estos aspectos

son una importante mejora en relación al proceso de purificación de los análogos del *Speract* desarrollados en el pasado (Tabla 2).

Con la expresión y purificación de diferentes proteínas fluorescentes, aumentamos el rango de longitudes de onda que pudimos utilizar para cumplir con los distintos objetivos del proyecto. Así, las características fluorométricas de *Ametrine* nos permitieron cumplir con el cuarto objetivo, que fue establecer la eficiencia de unión de *Ametrine-Speract*, debido a que dicho análogo a diferencia de los otros, no interfiere con el espectro de absorción de *F-Speract*. Por la misma razón, *CFP-Speract* nos permitió cumplir con el quinto objetivo, que fue determinar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, el Em y el pH_i inducidos por este análogo fluorescente. Además, debido a la disponibilidad de los rayos láser con los que cuenta el microscopio confocal utilizado para excitar a los fluoróforos de la muestra, *Venus-Speract* funcionó como una herramienta útil para observar la unión de este análogo al flagelo del espermatozoide. A partir de esto, podemos concluir que así como en el presente proyecto se usaron las tres proteínas fluorescentes mencionadas, en el futuro, de ser necesario el *Speract* se podría fusionar a alguna otra proteína dependiendo de lo que se requiera investigar y de las herramientas con las que se cuente. Teniendo para este propósito un método completamente estandarizado.

Los resultados de los experimentos de competencia, muestran que *Ametrine-Speract* tiene una menor capacidad para unirse a su receptor comparando con el *Speract* no marcado. Esto debe de tomarse en cuenta para la realización de experimentos que requieran cuantificar dicha interacción. Las concentraciones a las que *Ametrine-Speract* mostró tener una capacidad significativamente menor que el *Speract* para desplazar a *F-Speract*, fueron de 10 y 31.6 nM (con valores de EC_{50} de 8 nM y 28 nM para *Speract* y *Ametrine-Speract* respectivamente) (Fig. 17). Una posible explicación de esta diferencia, es que el tamaño tan alto de las proteínas fluorescentes (28 kDa) en relación al del *Speract* (de tan solo 10 aminoácidos), está afectando la posibilidad de que se unan más deca péptidos a su receptor. Una posible solución a este problema es el desarrollo de un

espaciador más grande entre la proteína fluorescente y el *Speract*, aunque también el cálculo del coeficiente de difusión del *Speract* unido a las proteínas fluorescentes podría clarificar este punto. También hay que tomar en cuenta que en el gel de PA-SDS, al menos en el caso de *Ametrine-Speract*, observamos además de la banda de 28 kDa, una banda de 20 kDa que podría ser un producto de degradación del análogo fluorescente y que corresponde al 4% de toda la proteína (Fig. 11), por lo que la diferencia en la capacidad de unión de *Ametrine-Speract* en relación al *Speract* podría ser ligeramente menor en realidad al haber utilizado una concentración menor de la deseada. A pesar de que el no tener una afinidad similar a la del *Speract* (como el *F-Speract*), puede limitar su uso, creemos que este análogo sigue ofreciendo nuevas ventajas para la realización de muchas técnicas de fluorescencia e imagen debido a las características únicas de las proteínas fluorescentes.

A pesar de que a una concentración de 10 nM, *Ametrine-Speract* no se une tan bien al receptor como el *Speract*, se demostró que esa concentración es capaz de generar cambios estadísticamente similares a los generados por el *Speract* no marcado, en la $[Ca^{2+}]_i$ y en el Em en el espermatozoide (Figs. 12 y 14). Este resultado está dentro de lo esperado si consideramos que el *Speract* induce cambios en el espermatozoide desde concentraciones en el rango picomolar por lo que 10 nM es una concentración alta tanto para *Speract* como para *CFP-Speract*. Debido a esto, es importante repetir estos experimentos utilizando concentraciones más bajas del *Speract* y del análogo fluorescente para hacer una mejor comparación de los dos quimioatrayentes.

Como se esperaba, el uso de las células hinchadas nos permitió observar mayores cambios en el Em y el pH_i inducidos por *Speract* y *CFP-Speract* en los espermatozoides hinchados de *S. purpuratus* (Figs. 12 y 13), sin embargo no observamos diferencia al hacer las determinaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ con las mismas células comparando con los espermatozoides en condiciones fisiológicas (Fig. 14). Este procedimiento había sido realizado previamente para el caso del Em, cuya respuesta al *Speract* se ve magnificada debido a que se modifica el gradiente de

Na^+ evitando su entrada y permitiendo una mayor salida de K^+ potenciando de esta manera la hiperpolarización, impidiendo ver la típica repolarización posterior. Además, la hiperpolarización de la membrana influye directamente en la apertura del intercambiador Na^+/H^+ , lo que podría explicar el notable aumento en el grado de alcalinización provocada por el *Speract* en nuestros experimentos con espermatozoides hinchados. Es importante hacer notar que no hubo diferencias significativas entre las respuestas inducidas por *Speract* y *CFP-Speract* tanto en espermatozoides en condiciones fisiológicas como en hinchados. Lo anterior indica que en experimentos futuros no es necesario hinchar a las células para hacer determinaciones de estos parámetros utilizando *CFP-Speract*. Aun cuando obtuvimos resultados estadísticamente similares en los tres parámetros fisiológicos determinados, es necesario hacer más experimentos para comprobar si la diferencia observada en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en el pH_i aunada a la menor capacidad del análogo para unirse a su receptor, podría influir en la respuesta quimiotáctica del espermatozoide.

Nuestros resultados indican que *Venus-Speract*, *Ametrine-Speract* y *CFP-Speract*, son herramientas muy útiles que en un futuro permitirán profundizar en el estudio (mediante distintas técnicas de fluorescencia e imagen) de la interacción del *Speract* y su receptor en el flagelo del espermatozoide para avanzar en el entendimiento de cómo este péptido regula la movilidad de dicha célula para fecundar al óvulo.

11. Conclusiones

1. Se realizaron las construcciones de *Venus-Speract* y *Ametrine-Speract* en el vector de clonación pET.
2. Los cambios inducidos por *CFP-Speract* y *Speract* en el Em, el pH_i y la [Ca²⁺]_i de los espermatozoides fueron similares.
3. Los cambios en el Em y el pH_i inducidos por *CFP-Speract*, fueron considerablemente mayores en células hinchadas (AMA 1:10).
4. *Venus-Speract* y *Ametrine-Speract* se unen de manera específica al espermatozoide. En el caso de *Venus-Speract* se observó que la unión es en el flagelo.
5. La capacidad de unión de *Ametrine-Speract* (EC₅₀= 8 nM) a su receptor es 3.5 veces menor que la del *Speract* (EC₅₀= 28 nM).

12. Perspectivas

- Hacer curvas de concentración con *Speract* y *CFP-Speract* en las respuestas fisiológicas que provocan en el espermatozoide de erizo de mar (E_m , pH_i , $[Ca^{2+}]_i$).
- Realizar experimentos de FRET (utilizando *Venus-Speract* y *CFP-Speract*), y microscopia de super-resolución (utilizando *Ametrine-Speract* o *Venus-Speract*) para conocer la distribución del receptor a *Speract* en el espermatozoide de erizo de mar.
- Hacer de esta construcción una herramienta educativa.
- Calcular las constantes de asociación y disociación de los análogos fluorescentes.
- Hacer un nuevo derivado fluorescente de *Speract*, utilizando un enlazador más largo y probar si tiene mayor afinidad que *Ametrine-Speract* y *Venus-Speract*.

13. Referencias

- Ai, H., & Hazelwood, K. (2008). Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature*, 5(5), 401–403.
- Babcock, D., Bosma, M., Battaglia, D., & Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 6001–5.
- Bentley, J., & Garbers, D. (1986). Retention of the Speract Receptor by Isolated Plasma Membranes of Sea Urchin Spermatozoa. *Biology of reproduction*, 421, 413–421.
- Cardullo, R., Herrick, S., Peterson, M., & Dangott, L. (1994). Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Developmental biology*, 162, 600–607.
- Chudakov, D. M., Matz, M. V, Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological reviews*, 90, 1103–1163.
- Dangott, L., & Garbers, D. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *The Journal of biological chemistry*, 259(22), 13712–6.
- Dangott, L., Jordan, J., Bellet, R., & Garbers, D. (1989). Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2128–32.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., & Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiological reviews*, 79(2), 481–510.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4), 1305–55.
- Ding, Y., Ai, H., Hoi, H., & Campbell, R. (2011). Forster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical chemistry*, 83(24), 9687–9693.
- Drozdov, A., & Vinnikova, V. (2010). Morphology of gametes in sea urchins from Peter The Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Developmental Biology*, 41(1), 37–45.

- Espagne, A., Erard, M., Madiona, K., Derrien, V., Jonasson, G., Lévy, B., Pasquier, H., et al. (2011). Cyan fluorescent protein carries a constitutive mutation that prevents its dimerization. *Biochemistry*, *50*(4), 437–9.
- Espinal, J., Aldana, M., Guerrero, A., Wood, C., Darszon, A., & Martínez-Mekler, G. (2011). Discrete dynamics model for the speract-activated Ca²⁺ signaling network relevant to sperm motility. *PloS one*, *6*(8), e22619.
- Galindo, B. E., Beltrán, C., Cragoe, E. J., & Darszon, A. (2000). Participation of a K⁺ channel modulated directly by cGMP in the Speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Developmental biology*, *221*(2), 285–94.
- Gee, K., Brown, K., Chen, W., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell calcium*, *27*(2), 97–106.
- González-Martínez, M., Guerrero, A., Morales, E., de De La Torre, L., & Darszon, A. (1992). A depolarization can trigger Ca²⁺ uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in *L. pictus* sea urchin sperm. *Developmental biology*, *150*(1), 193–202.
- Guerrero, A., Espinal, J., Wood, C. D., Rendón, J. M., Carneiro, J., Martínez-Mekler, G., & Darszon, A. (2013). Niflumic acid disrupts marine spermatozoan chemotaxis without impairing the spatiotemporal detection of chemoattractant gradients. *Journal of cell science*, *126*(Pt 6), 1477–87.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Yoshiro, T., Wood, C. D., & Darszon, A. (2010). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental biology*, *344*(1), 52–65. Elsevier Inc.
- Hansbrough, J., & Garbers, L. (1981). Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *The journal of biological chemistry*, *256*(3), 1447–1452.
- Harumi, T., Hoshino, K., & Suzuki, N. (1992). Effects of Sperm-Activating Peptide I on *Hemicentrotus pulcherrimus* Spermatozoa in High Potassium Sea Water. *Development growth & differentiation*, *34*(2), 163–172.
- Hoffman, J., & Laris, P. (1974). Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *The Journal of physiology*, 519–552.
- Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological science*, *20*(9), 1043–1056.

- Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., et al. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature cell biology*, 5, 109–117.
- Kremers, G., Gilbert, S., Cranfill, P., Davidson, M., & Piston, D. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2676–2676.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Nagai, T., Iyata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, 20(1), 87–90.
- Neill, A., & Vacquier, V. (2004). Ligands and receptors mediating signal transduction in sea urchin spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(2), 141–9.
- Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W., & Hoshi, M. (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote*, 4(3), 237–245.
- Nishigaki, T., & Darszon, a. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. *Developmental biology*, 223(1), 17–26.
- Rajan, A., Mullen, J., Bhatnagar, N., Dubey, A., Niemz, A., Chakravarti, B., & Chakravarti, D. (2004). Micro-parallel liquid chromatography for analysis of peptides and proteins. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9(5), 312–317.
- Reynaud, E., De de La Torre, L., Zapata, O., Liévano, a, & Darszon, a. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS letters*, 329(1-2), 210–4.
- Rizzo, M., Davidson, M., & Piston, D. (2009). Fluorescent protein tracking and detection: fluorescent protein structure and color variants. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(12).
- Serrao, E., Pearson, G., Kautsky, L., & Brawley, S. (1996). Successful external fertilization in turbulent environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5286–90.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. a, Angerer, R. C., Angerer, L. M., et al. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), 941–52.

- Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoological science*, (12), 13–27.
- Suzuki, N., & Garbers, D. (1984). Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biology of reproduction*, 30(5), 1167–74.
- Suzuki, N., & Yoshino, K. (1992). The relationship between aminoacid sequences of sperm-activating peptides and the taxonomy of echinoids. *Comparative biochemistry and physiology*, 102(4), 679–690.
- Tatsu, Y., Nishigaki, T., Darszon, A., & Yumoto, N. (2002). A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide. *FEBS letters*, 525(1-3), 20–4.
- Tsien, R. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, (67), 509–544.
- Weiner, I., & Hamm, L. (1989). Use of fluorescent dye BCECF to measure intracellular pH in cortical collecting tubule. *The American journal of physiology*, 256(5 Pt 2), F957–64.

14. Anexo: Secuencia y diseño de los oligonucleótidos utilizados.

a) Tak22

3' ccaagctt¹atgcatcatcaccaccac²gtgagcaagggcgaggagctgttc 5'

1. Sitio de restricción HindIII

2. Cola de polihistidina

b) Tak88

3' ctcggcatggacgagctgtacaagggtggtgtagcggcgggtggcggcttfgatctgaacgggtggcgggtgtgg
gc¹taactcgag²ggg 5'

1. *Speract*

2. Sitio de restricción XhoI

Condiciones del PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (Segundos)	Repeticiones
96	180	1
96	30	35
63	50	
72	60	
72	600	1