

CatSper, el canal de Ca^{2+} que regula el batido flagelar del espermatozoide en eucariontes

Takuya Nishigaki, Francisco Romero y Yoloxochitl Sánchez-Guevara
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Cuernavaca, Mor.; México
[takuya, fraroco, yosag] @ibt.unam.mx

Abstract— CatSper is a sperm-specific Ca^{2+} channel. In mammals, the elimination of any of the distinct pore-forming subunits results in male infertility. CatSper is a moderate voltage-dependent channel, activated by intracellular alkalization and extracellular ligands (in certain species). The activation of this channel exhibits a change in the swimming pattern from an activated to hyperactivated motility. In sea urchin, CatSper has been described as the modulator of the sperm chemotaxis toward the oocyte. Interestingly, this channel is present from the common ancestor of eukaryotes. Nevertheless, it is absent in some taxonomic groups where possibly another protein replaced its function during the evolution.

Keyword— *CatSper, Ca^{2+} , hyperactivated motility*

Resumen— El espermatozoide expresa específicamente un canal de Ca^{2+} (CatSper). En mamíferos, la eliminación de cualquiera de las subunidades formadoras de poro provoca infertilidad. CatSper es moderadamente dependiente de voltaje, se activa por alcalinización y por ligandos extracelulares (en algunas especies), la activación de este canal provoca que el espermatozoide cambie su patrón de batido flagelar de un modo activado a uno hiperactivado. En erizo de mar, se propone a CatSper como un modulador de la quimiotaxis del espermatozoide hacia el ovocito. Interesantemente, este canal está presente desde el ancestro común de los eucariontes. Sin embargo, está ausente en ciertos grupos taxonómicos donde posiblemente otra proteína sustituyó su función durante la evolución.

Palabras claves— *CatSper, Ca^{2+} , movilidad hiperactivada*

I. INTRODUCCIÓN

En la reproducción sexual, la fecundación es un proceso fundamental en el cual el gameto masculino (espermatozoide) y el femenino (ovocito) se fusionan y forman un nuevo individuo genéticamente distinto a los progenitores. En los espermatozoides que conservan el flagelo, el batido de esa estructura es indispensable para una fecundación exitosa. El batido del flagelo no es un movimiento constante durante la fecundación: se alteran tanto la frecuencia como la forma (la curvatura). Particularmente, el ion calcio (Ca^{2+}) es un elemento crucial para modificar la dinámica del flagelo. De hecho, la importancia del Ca^{2+} está bien establecida en dos procesos: 1) durante la hiperactivación de la movilidad en el espermatozoide de mamíferos y 2) en la quimiotaxis del espermatozoide en distintos grupos taxonómicos de eucariontes. Por lo tanto, los transportadores de Ca^{2+} son cruciales para regular estos dos eventos. En mamíferos, se sabe que existen dos moléculas indispensables para controlar el nivel de Ca^{2+} intracelular en el flagelo: CatSper (un canal catiónico específico del espermatozoide) y PMCA4 (una bomba de Ca^{2+} en la membrana plasmática). En esta revisión nos enfocaremos únicamente en la descripción de CatSper.

II. ESTRUCTURA DE CATSPER

CatSper es un canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide. Su estructura general es similar a la de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Ca_v). Sin embargo, en CatSper las cuatro subunidades formadoras del poro (CatSper1-4 o subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 4$) están codificadas en cuatro genes distintos (Fig.

1A) [1]–[4], mientras que en el canal Ca_v la subunidad α es el producto de un solo gen (cuatro subunidades repetidas en un polipéptido) (Fig. 1B) [5]. Se ha propuesto que el poro de CatSper está ensamblado necesariamente como un heterotetrámero formado por las subunidades α_1 – α_4 ; la mejor evidencia de lo anterior es que los ratones transgénicos que carecen de cualquier subunidad α , producen espermatozoides infértiles que no presentan la corriente característica de CatSper [6]. Cada subunidad α tiene seis segmentos transmembranales (STMs): los primeros cuatro STMs sirven como sensor de voltaje y los dos últimos forman el poro del canal (Fig. 1A). En el cuarto STM de las subunidades α_1 y α_2 , cada tres aminoácidos se encuentran cuatro o cinco aminoácidos con carga positiva (arginina o lisina) (Fig. 2A), característica del segmento-4 de otros canales dependientes de voltaje como los Ca_v s. Sin embargo, las subunidades α_3 y α_4 de CatSper, solamente tienen de dos a tres aminoácidos con carga positiva (Fig. 2A), lo cual podría explicar la moderada dependencia de voltaje de este canal. Se conoce que la actividad de CatSper es altamente dependiente del pH intracelular (se activa por alcalinización) [7], [8] aunque no se conoce con precisión el mecanismo molecular. Por otro lado, todas las subunidades α tienen un dominio típico de selectividad a Ca^{2+} (Na^+ en el caso de las bacterias), [T/S]-X-[D/E]-X-W [9] (Fig. 2B). Curiosamente, en todas las especies que mantienen CatSper en su genoma, el ácido aspártico (D) está conservado en el motivo de selectividad de las subunidades α (Fig. 2B), excepto para CatSper3 (α_3) de erizo de mar en el cual el D está sustituido por el ácido glutámico (E) [10]. CatSper cuenta además con tres subunidades auxiliares (β , γ y δ) [11]–[13] (Fig. 1A), las cuales tienen uno o dos STMs y un dominio extracelular largo. Hasta la fecha, se ha reportado que la subunidad δ es esencial para el ensamblaje del canal, ya que el ratón transgénico sin esta subunidad presenta el mismo fenotipo que los mutantes de las subunidades α [13].

A pesar de su gran importancia en la fecundación, es poco el avance en el estudio de las propiedades biofísicas de CatSper debido a que no se ha logrado expresar el canal recombinante en sistemas heterólogos. Como método alternativo, recientemente realizamos una exploración sobre la selectividad iónica de CatSper modificando el $Ca_v3.1$ de humano de tal forma que fuera muy parecido al poro del canal CatSper [14]. El resultado indica que el canal $Ca_v3.1$ con el poro de CatSper tiene una mayor permeabilidad iónica a cadmio (Cd^{2+}) y a manganeso (Mn^{2+}) comparada con la de $Ca_v3.1$ no modificado. Además, mediante adquisición de imágenes fluorescentes se muestra en espermatozoides un incremento de la permeabilidad de Cd^{2+} ante un estímulo de progesterona, un activador potente de CatSper del espermatozoide de humano. Aún estamos explorando la relevancia de la permeabilidad de Cd^{2+} a través de CatSper. Por otro lado, la permeabilidad a Mn^{2+} podría tener un efecto positivo sobre la movilidad del espermatozoide si consideramos que el Mn^{2+} es un activador potente de la adenilato ciclasa soluble del espermatozoide [15], [16].

III. MECANISMO FISIOLÓGICO DE CATSPER EN MAMÍFEROS

Desde el primer reporte de CatSper1 (α_1), se ha propuesto su participación en la movilidad hiperactivada (MHA) en los espermatozoides de mamíferos [3], [4]. La MHA produce un batido flagelar vigoroso que en un medio experimental no viscoso tiene una forma asimétrica, gran amplitud y frecuencia baja, características que provocan un movimiento menos progresivo comparado con la movilidad activada (Fig. 3A). Sin embargo, se sabe que el espermatozoide con MHA presenta movimientos progresivos en un medio viscoso, lo cual es relevante desde el punto de vista fisiológico. Actualmente, se cree que la MHA tiene las siguientes funciones: i) el movimiento progresivo en el fluido viscoelástico del oviducto, ii) la liberación del espermatozoide desde el reservorio del oviducto, iii) el movimiento direccional opuesto al flujo del oviducto (reotaxis) y iv) la penetración a través de la matriz extracelular del ovocito (el cúmulus y la zona pelúcida) (Fig. 3B) [17]. Los espermatozoides del ratón transgénico que carecen de CatSper pierden las funciones antes mencionadas [3], [18]–[20], lo cual confirma la participación de CatSper en la MHA del espermatozoide. La relevancia de CatSper para la MHA en espermatozoides de humano también ha sido demostrada [21]–[23]. La progesterona y

la prostaglandina activan a CatSper [8], [24]. Anteriormente, se propuso que algunas subunidades auxiliares podrían funcionar como receptores de esos activadores. Sin embargo, muy recientemente se demostró que es una hidrolasa de monoacilglicérols (específicamente del 2-araquidonoilglicérol, 2AG), llamada ABHD2, la que funciona como el receptor de la progesterona [25].

IV. FUNCIÓN DE CATSPER EN EL ERIZO DE MAR

Se sabe que en varios invertebrados marinos, el espermatozoide se mueve hacia al óvulo de la misma especie para que ocurra la fecundación eficientemente a pesar de la dilución de los gametos en el océano [26]. Este fenómeno de movilidad dirigida, conocida como quimiotaxis (Fig. 4), ha llamado la atención a científicos durante varias décadas. A pesar de que los quimioatrayentes tienen distinta identidad molecular dependiendo del grupo taxonómico, existe un patrón similar del movimiento del espermatozoide durante este proceso. Los espermatozoides nadan formando una vuelta pronunciada (vuelta quimiotáctica) al alejarse de la fuente del quimioatrayente, orientando el nado hacia el gradiente efectivo del estímulo (Fig. 4). En los últimos quince años, hubo avances significativos en el estudio del mecanismo molecular de este evento, principalmente usando al erizo de mar como modelo. Para conocer detalladamente los mecanismos moleculares de la quimiotaxis, es conveniente revisar referencias importantes sobre el tema [27]–[29]. Desde hace tiempo, se sabe que el Ca^{2+} juega un papel fundamental en el proceso de quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar. Mediante la obtención de imágenes fluorescentes de Ca^{2+} , demostramos que existe un incremento robusto en la concentración de Ca^{2+} intracelular, principalmente en el flagelo, al momento en que ocurre la vuelta quimiotáctica en el espermatozoide del erizo de mar (indicado por círculos grises en la trayectoria del espermatozoide en la Fig. 4) [30]–[32]. Un reporte reciente propuso que CatSper del erizo de mar es la entidad molecular que participa en el incremento de Ca^{2+} necesario para la quimiotaxis del espermatozoide [10]. Sobre la señalización producida por el quimioatrayente, demostramos que ante un estímulo, en experimentos con células individuales o en población, existe un incremento de pH intracelular a través del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) que siempre precede a un incremento de Ca^{2+} [33]–[35]. Este incremento en el pH es de vital importancia debido a que, como se mencionó anteriormente, la actividad de CatSper es altamente dependiente del pH intracelular. De manera interesante, el sNHE de ratón es una proteína esencial en la regulación del batido flagelar y se ha propuesto que regula a CatSper en mamíferos [9], [36].

V. DISTRIBUCIÓN FILOGENÉTICA DE CATSPER

Desde el descubrimiento de CatSper, se sabía que los espermatozoides de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) no tienen este canal a pesar de que el gameto masculino de esta especie tiene un flagelo móvil. Lo anterior indicaba que CatSper no era el único canal de Ca^{2+} utilizado de manera ubicua en todas las especies eucariontes. En 2008, Cai y Clapham reportaron la distribución heterogénea de las especies que conservan CatSper en metazoarios [37]. En el caso de los vertebrados, tanto los mamíferos como los reptiles y los peces cartilagosos, conservan a CatSper. Sin embargo, las aves, los anfibios y algunos peces óseos no contienen a CatSper. De manera similar, la distribución de CatSper es heterogénea en los invertebrados: tunicados (ascidias), equinodermos (erizos de mar), cnidarios (anémonas de mar) conservan CatSper pero no así los nemátodos, los artrópodos (insectos) y los moluscos. El análisis de sintenia de algunas subunidades de CatSper en el gallo (*Gallus gallus domesticus*) y en el pez cebra (*Danio rerio*) permitió encontrar pseudogenes de CatSper, lo cual indica que especies que no tienen CatSper, lo tenían anteriormente y lo perdieron en algún punto de su evolución [37]. Recientemente, el análisis de genética comparativa se amplió y se encontró a CatSper en todas las ramas taxonómicas de eucariontes incluyendo algas y plantas (Fig. 5). Esta amplia distribución de CatSper en eucariontes sugiere que este canal apareció en una etapa inicial del proceso

de evolución de eucariontes y que varias especies perdieron a CatSper en algún momento [37]–[39]. Un análisis de la secuencia de aminoácidos del poro de CatSper sugiere que es más antiguo que los canales Ca_v s [40]; esta idea se refuerza si consideramos que el poro de CatSper tiene similitud con el canal de Na^+ dependiente de voltaje presente en bacterias (NaChBac) (Fig. 1C, Fig. 2B) [38].

VI. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA SOBRE LA FUNCIÓN DE CATSPER EN EUKARIOTES

A pesar de que CatSper es un canal esencial en la fecundación de mamíferos, no está altamente conservado en todas las especies, aún si éstas pertenecen a grupos taxonómicos relativamente cercanos, como aves y anfibios. Considerando esta diferencia, el humano y erizo de mar comparten un mecanismo de regulación de Ca^{2+} intracelular más semejante que el que existe entre humanos y aves. De manera contundente, las especies que producen espermatozoides sin flagelos móviles como los nemátodos, las levaduras y las plantas con flores no conservan CatSper muy probablemente por un proceso de adaptación funcional. La amplia distribución de CatSper sugiere que los gametos masculinos de un ancestro común de los eucariontes actuales tenían flagelo(s) móvil(es) y que CatSper era una proteína esencial para su principal función.

Por otro lado, existen especies que producen gametos masculinos con un flagelo móvil pero no conservan CatSper como los insectos y los moluscos. En caso de *D. melanogaster*, se sabe que un canal de Ca^{2+} , TRPP2/PKD2, es esencial para la regulación del batido flagelar [41] y es posible que sustituyera a CatSper en esta especie. Sería interesante investigar qué tipo de canal sustituyó a CatSper en otras especies que lo perdieron a pesar de que conservan espermatozoides con flagelo(s) móvil(es).

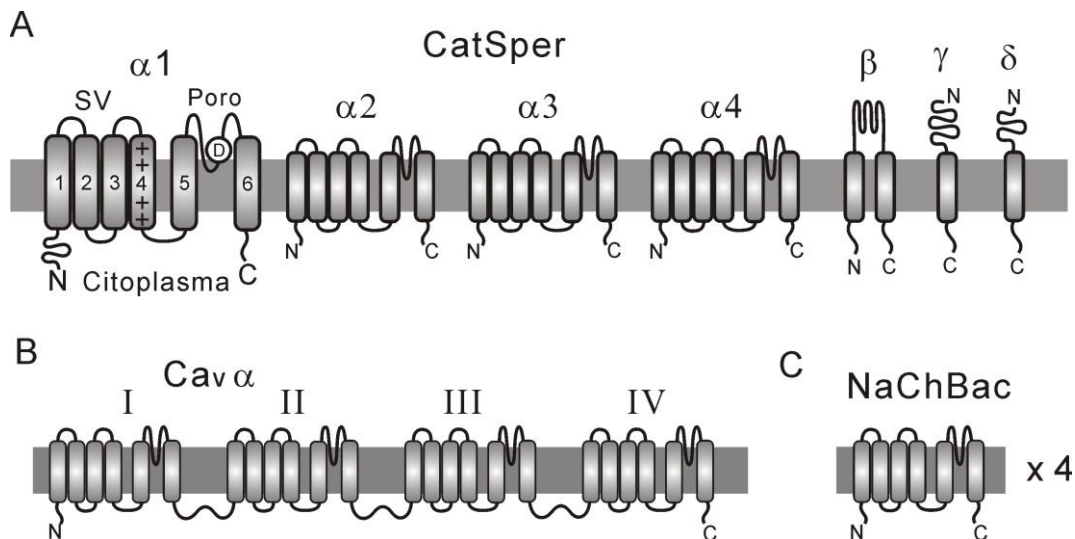


Figura 1. Representación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CatSper y Ca_v) de humano y de Na^+ en bacteria.

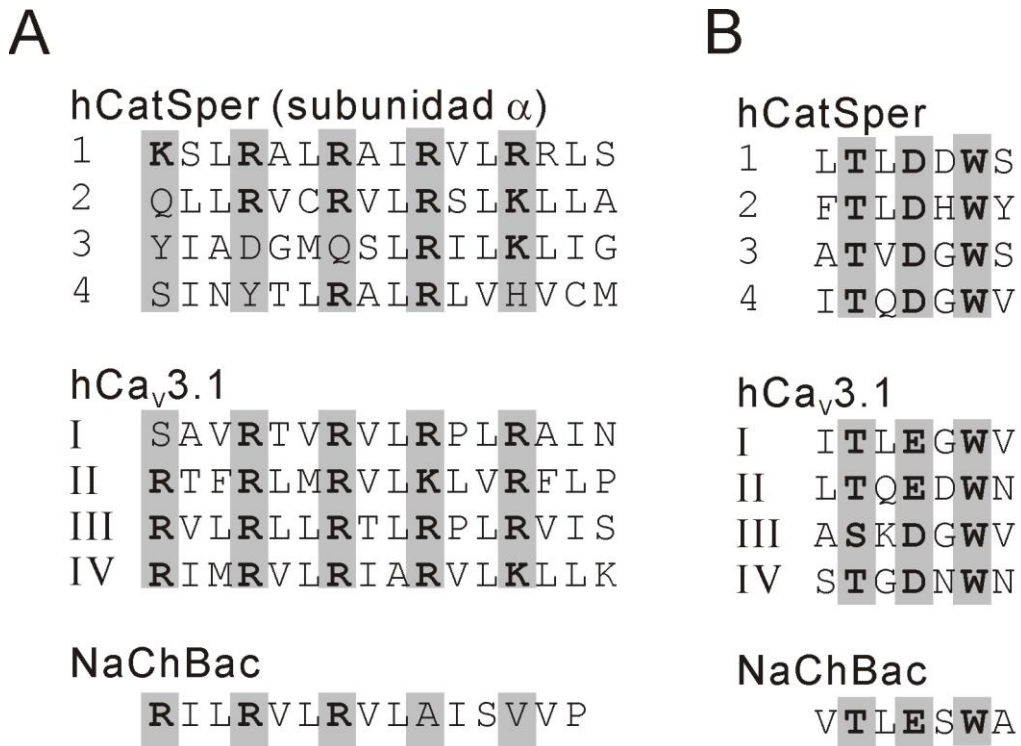


Figura 2. Alineamiento de las secuencias parciales de CatSper y Ca_v3.1 de humano y NaChBac de bacterias.

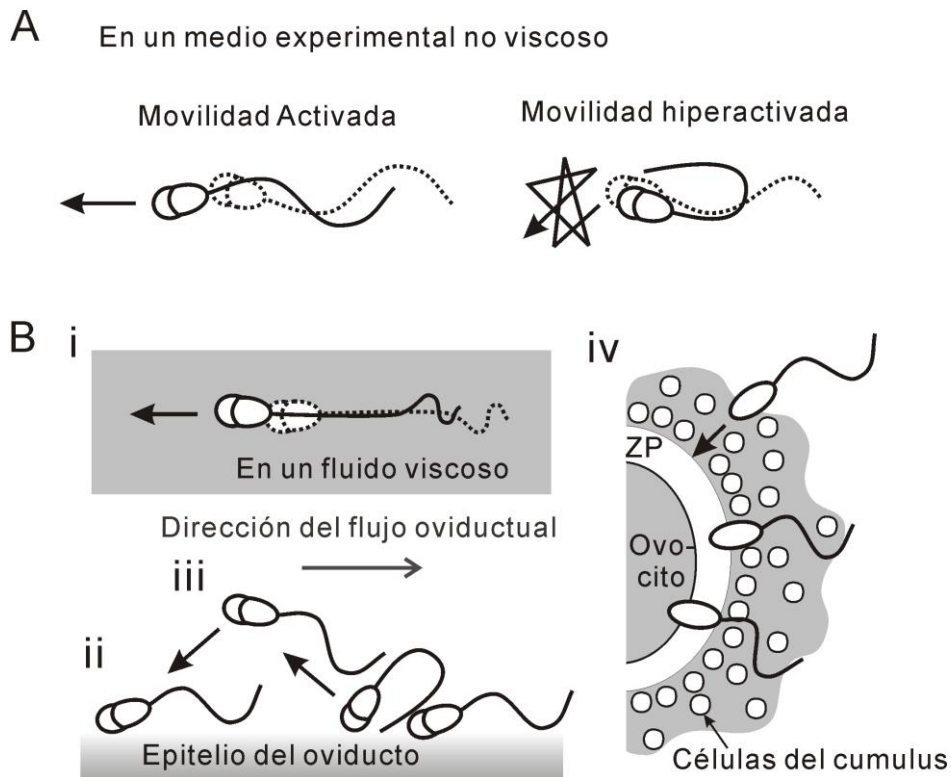


Figura 3. Propiedades y funciones de la hiperactivación del batido flagelar en mamíferos.

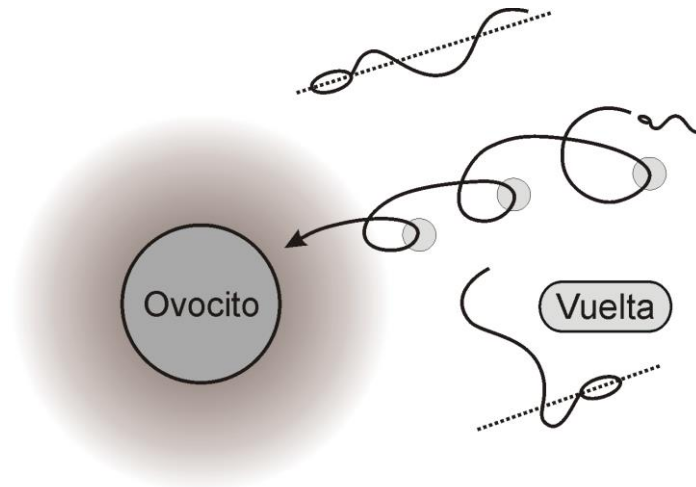


Figura 4. Modelo de quimiotaxis en espermatozoides de invertebrados marinos.

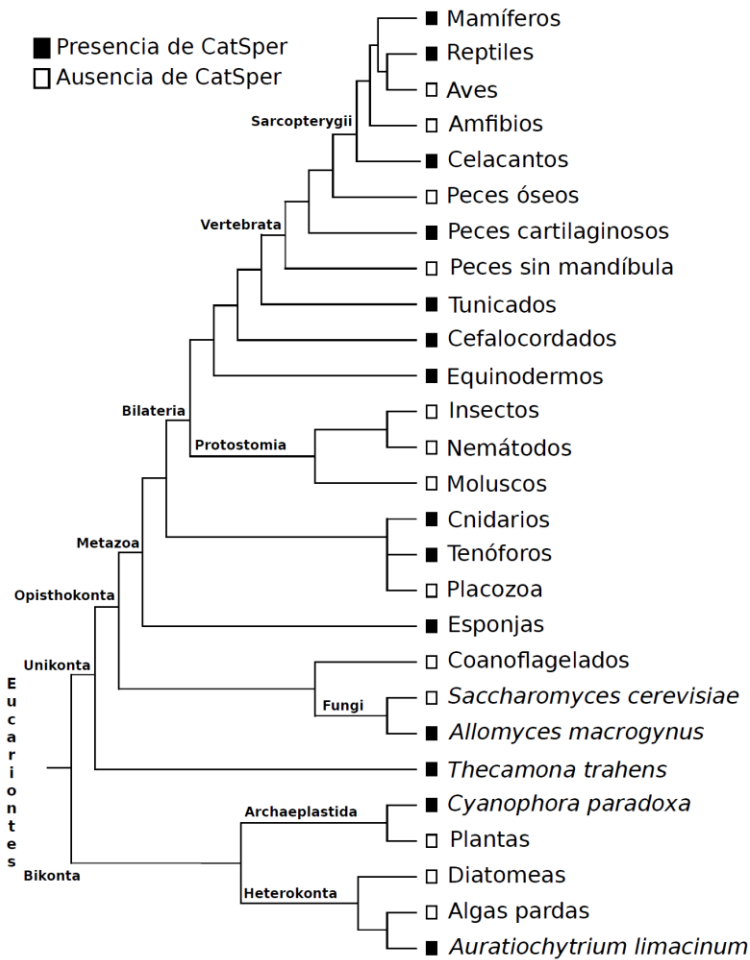


Figura 5. Distribución filogenética de CatSper en eucariontes.

REFERENCIAS

- [1] J. M. Arias, J. Murbartián, and E. Perez-Reyes, "Cloning of a novel one-repeat calcium channel-like gene.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 303, no. 1, pp. 31–6, Mar. 2003.
- [2] A. Lobley, V. Pierron, L. Reynolds, L. Allen, and D. Michalovich, "Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis.," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 1, p. 53, Aug. 2003.
- [3] D. Ren, B. Navarro, G. Perez, A. C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J. L. Tilly, and D. E. Clapham, "A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility.," *Nature*, vol. 413, no. 6856, pp. 603–609, Nov. 2001.
- [4] 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.
- [5] M. Strong, K. G. Chandy, and G. A. Gutman, "Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability.," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 10, no. 1, pp. 221–42, Jan. 1993.
- [6] 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.
- [7] 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. 737–740, 2006.
- [8] P. V Lishko, I. L. Botchkina, and Y. Kirichok, "Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm.," *Nature*, vol. 471, no. 7338, pp. 387–91, Mar. 2011.
- [9] B. Navarro, Y. Kirichok, J.-J. Chung, and D. E. Clapham, "Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 52, no. 5–6, pp. 607–13, Jan. 2008.
- [10] R. Seifert, M. Flick, W. Bönigk, L. Alvarez, C. Trötschel, A. Poetsch, A. Müller, N. Goodwin, P. Pelzer, N. D. Kashikar, E. Kremmer, J. Jikeli, B. Timmermann, H. Kuhl, D. Fridman, F. Windler, U. B. Kaupp, and T. Strücker, "The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm.," *EMBO J.*, vol. 34, no. 3, pp. 379–92, Feb. 2015.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] J.-J. Chung, B. Navarro, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, and D. E. Clapham, "A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 153, 2011.
- [14] E. Garza-López, J. C. Chávez, C. Santana-Calvo, I. López-González, and T. Nishigaki, "Cd²⁺ sensitivity and permeability of a low voltage-activated Ca²⁺ channel with CatSper-like selectivity filter," *Cell Calcium*, Mar. 2016.
- [15] T. Braun, "The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity.," *J. Cyclic Nucleotide Res.*, vol. 1, no. 6, pp. 271–81, 1975.
- [16] T. Braun, H. Frank, R. Dods, and S. Seppenwol, "Mn²⁺-sensitive, soluble adenylate cyclase in rat testis. Differentiation from other testicular nucleotide cyclases.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 481, no. 1, pp. 227–35, Mar. 1977.
- [17] 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.
- [18] T. A. Quill, S. A. Sugden, K. L. Rossi, L. K. Doolittle, R. E. Hammer, and D. L. Garbers, "Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 25, pp. 14869–74, Dec. 2003.

- [19] K. Miki and D. E. Clapham, "Rheotaxis guides mammalian sperm.," *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 443–52, Mar. 2013.
- [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] N. Avidan, H. Tamary, O. Dgany, D. Cattani, A. Pariente, M. Thulliez, N. Borot, L. Moati, A. Barthelme, L. Shalmon, T. Krasnov, E. Ben-Asher, T. Olender, M. Khen, I. Yaniv, R. Zaizov, H. Shalev, J. Delaunay, M. Fellous, D. Lancet, and J. S. Beckmann, "CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene.," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 11, no. 7, pp. 497–502, Jul. 2003.
- [22] 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.
- [23] H. L. Williams, S. Mansell, W. Alasmari, S. G. Brown, S. M. Wilson, K. A. Sutton, M. R. Miller, P. V. Lishko, C. L. R. Barratt, S. J. Publicover, and S. Martins da Silva, "Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa.," *Hum. Reprod.*, vol. 30, no. 12, pp. 2737–46, Dec. 2015.
- [24] M. R. Servin-Vences, Y. Tatsu, H. Ando, A. Guerrero, N. Yumoto, A. Darszon, and T. Nishigaki, "A caged progesterone analog alters intracellular Ca^{2+} and flagellar bending in human sperm.," *Reproduction*, vol. 144, no. 1, pp. 101–9, Jul. 2012.
- [25] M. R. Miller, N. Mannowetz, A. T. Iavarone, R. Safavi, E. O. Gracheva, J. F. Smith, R. Z. Hill, D. M. Bautista, Y. Kirichok, and P. V. Lishko, "Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone.," *Science*, Mar. 2016.
- [26] R. L. MILLER, "Sperm Chemo-Orientation in the Metazoa," in *Biology of Fertilization*, Elsevier, 1985, pp. 275–337.
- [27] U. B. Kaupp, N. D. Kashikar, and I. Weyand, "Mechanisms of sperm chemotaxis.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 70, pp. 93–117, Jan. 2008.
- [28] T. Strücker, L. Alvarez, and U. Kaupp, "At the physical limit — chemosensation in sperm," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 34, pp. 110–116, 2015.
- [29] A. Darszon, A. Guerrero, B. E. Galindo, T. Nishigaki, and C. D. Wood, "Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 52, no. 5–6, pp. 595–606, Jan. 2008.
- [30] C. D. Wood, T. Nishigaki, T. Furuta, S. A. Baba, and A. Darszon, "Real-time analysis of the role of Ca^{2+} in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm.," *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 5, pp. 725–31, Jun. 2005.
- [31] M. Böhmer, Q. Van, I. Weyand, V. Hagen, M. Beyermann, M. Matsumoto, M. Hoshi, E. Hildebrand, and U. B. Kaupp, " Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 15, pp. 2741–52, Aug. 2005.
- [32] A. Guerrero, T. Nishigaki, J. Carneiro, Yoshiro Tatsu, C. D. Wood, and A. Darszon, "Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing.," *Dev. Biol.*, vol. 344, no. 1, pp. 52–65, Aug. 2010.
- [33] A. L. González-Cota, P. Â. Silva, J. Carneiro, and A. Darszon, "Single cell imaging reveals that the motility regulator speract induces a flagellar alkalization that precedes and is independent of Ca^{2+} influx in sea urchin spermatozoa.," *FEBS Lett.*, vol. 589, no. 16, pp. 2146–54, Jul. 2015.
- [34] T. Nishigaki, F. Z. Zamudio, L. D. Possani, and A. Darszon, "Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 284, no. 2, pp. 531–5, Jun. 2001.
- [35] T. Nishigaki, C. D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Elias, K. Shiba, S. A. Baba, and A. Darszon, "A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase.," *Dev. Biol.*, vol. 272, no. 2, pp. 376–88, Aug. 2004.

- [36] 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.
- [37] X. Cai and D. E. Clapham, “Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSper and CatSperbeta.,” *PLoS One*, vol. 3, no. 10, p. e3569, Jan. 2008.
- [38] X. Cai, X. Wang, and D. E. Clapham, “Early Evolution of the Eukaryotic Ca²⁺ Signaling Machinery: Conservation of the CatSper Channel Complex.,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 31, no. 10, pp. 2735–40, Oct. 2014.
- [39] X. Cai and D. E. Clapham, “Ancestral Ca²⁺ signaling machinery in early animal and fungal evolution.,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, no. 1, pp. 91–100, Jan. 2012.
- [40] B. J. Liebeskind, D. M. Hillis, and H. H. Zakon, “Independent acquisition of sodium selectivity in bacterial and animal sodium channels.,” *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 21, pp. R948–9, Nov. 2013.
- [41] M. Köttgen, A. Hofherr, W. Li, K. Chu, S. Cook, C. Montell, and T. Watnick, “Drosophila sperm swim backwards in the female reproductive tract and are activated via TRPP2 ion channels.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e20031, 2011.