

*Caracterització proteòmica de l'espermatozoide
humà. Proteïnes diferencials trobades en pacients
astenozoospèrmics.*

Per Juan Martínez Heredia



4.-Resultats.

4.- Resultats.

4.1.- Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll i obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.

4.1.1 Preparació d'espermatozoides mitjançant centrifugació en gradient de Percoll.

El primer pas comú per a tots els experiments es la realització d'un gradient de Percoll al 50%. Es realitza un gradient amb només un coixí de Percoll (al 50%) per que l'objectiu principal es estudiar la població total d'espermatozoides, i no només poblacions enriquides en un determinat tipus cel·lular. Aquests estudis, a més, ja es van realitzar al laboratori (Mengual, 2003), demostrant que només els espermatozoides passaven el coixí del 50%, deixant fora de l'estudi altres tipus cel·lulars.

Així, després del gradient de Percoll, s'obtenen espermatozoides altament purificats, útils per a realitzar estudis proteòmics. Un recompte dels espermatozoides presents al sediment ens dona una recuperació mitja de $86\% \pm 42\%$ (promig \pm desviació estàndard) respecte a la quantitat original carregada al gradient. A més, el recompte mitjançant microscòpia òptica de contrast de fase amb càmera Makler ens mostra una reducció molt important de la contaminació per altres tipus cel·lulars. El recompte en tres mostres escollides a l'atzar de la interfase entre plasma seminal i percoll ens indica que en aquesta, la cel·lularitat es de 3×10^6 i una desviació estàndard de 1.7, mentre que al sediment només es troben 0.06×10^6 milions de cèl·lules de mitja i 0.13 de desviació estàndard (en cinc mostres escollides a l'atzar).

A la Fig 4.1 es poden observar aquestes diferències, comparant la imatge abans del gradient (A) amb després del gradient (B).

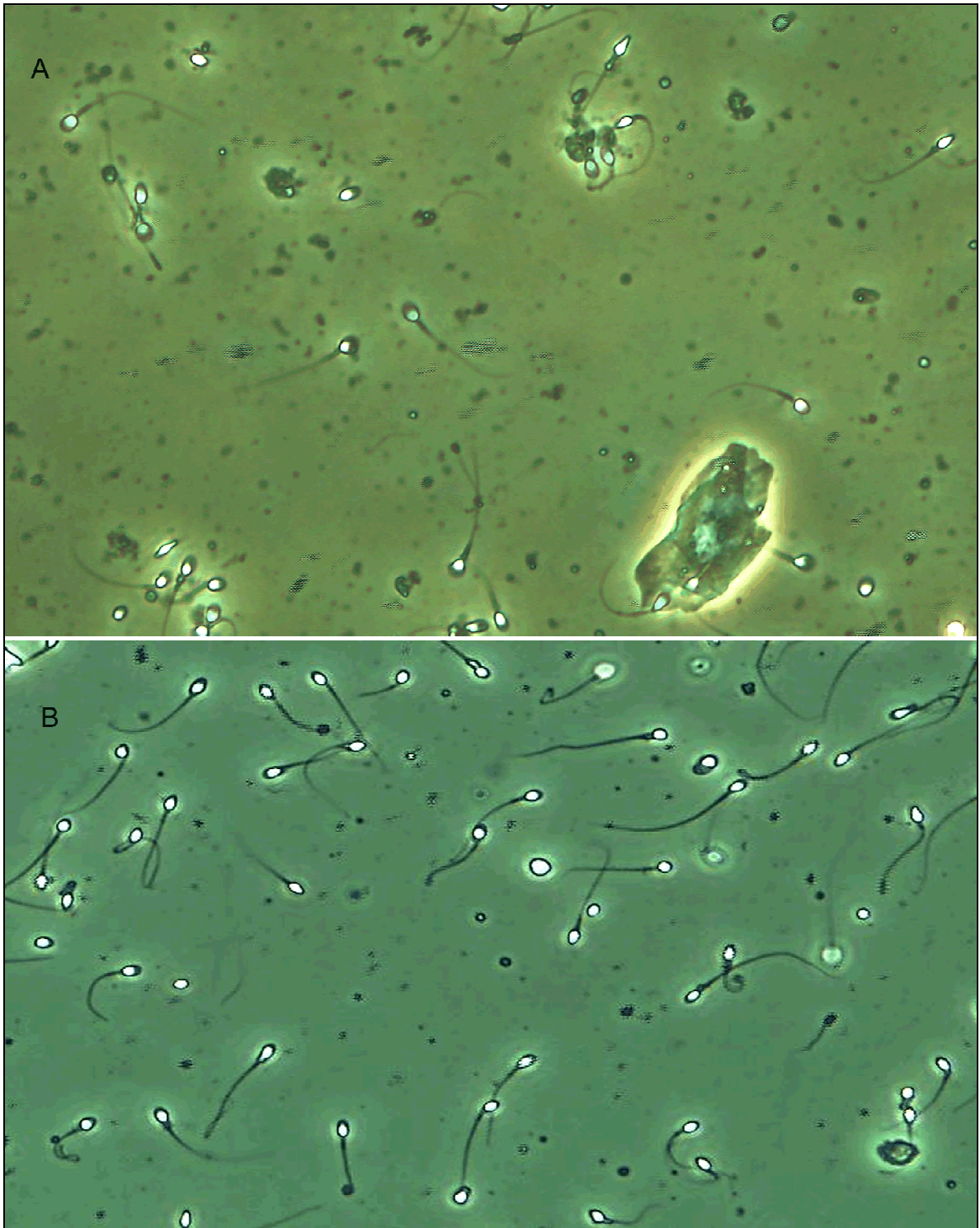


Fig 4.1 A: Imatge de microscòpia òptica (40x) d'una mostra de semen abans de realitzar un gradient de Percoll. S'observen cristalls i restes cel·lulars de fons. **B:** Imatge de microscòpia òptica (40x) de la mateixa mostra després de passar per un gradient de Percoll al 50%. S'observa una important reducció de les restes cel·lulars, i la eliminació total dels cristalls.

4.1.2.- Obtenció i purificació de caps per tal de procedir a l'extracció de les proteïnes nuclears i altres anàlisis.

Per tal de poder estudiar el proteoma nuclear, es van posar a punt dos tècniques diferents per a purificar caps. El primer protocol es basa en la sonicació de la mostra; el segon, en un afebliment químic de les estructures de membrana que uneixen el cap amb la cua.

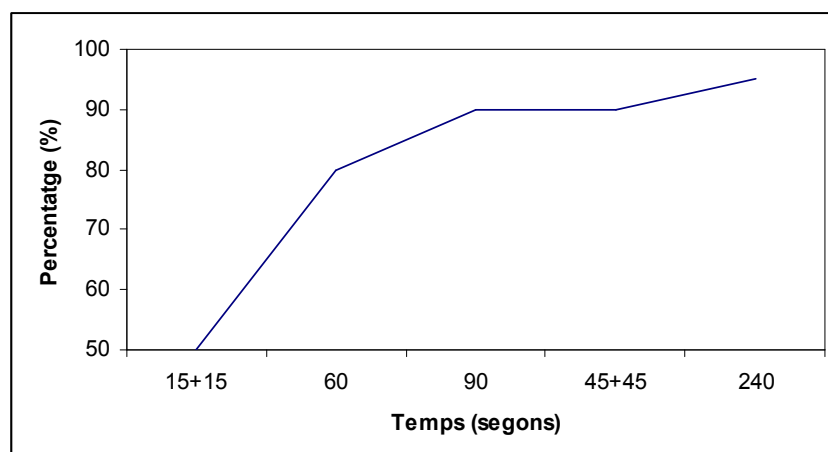
Mètode físic mitjançant sonicació.

El primer mètode es basa en la sonicació (Van Blerkom et al., 1995). Per tal d'aconseguir el màxim de caps purificats, es van provar diferents temps de sonicació. Els resultats es veuen a la taula 4.1.

| Temps de sonicació | Percentatge de caps separats |
|--------------------|------------------------------|
| 15 s +15 s | 50% |
| 60 s | 80% |
| 90 s | 90% |
| 45 s + 45 s | 90% |
| 240 s | 95% |

Taula 4.1. Taula on es mostra la resposta dels espermatozoides a la sonicació.

A la taula 4.1 i a la gràfica 4.1 s'observa com, a partir d'un determinat temps, el percentatge de caps separats de les seves cues no s'incrementa de manera significativa.



Gràfica 4.1 Relació entre temps de sonicació (en segons) i percentatge d'espermatozoides decapitats.

Així, tot i que si es sonica la mostra durant quatre minuts pràcticament no queden espermatozoides amb cua, també és veritat que les cues queden tan trencades que

difficulten la seva separació dels caps. Per a això es va optar per sonicar durant 90s, dividit en dos períodes de 45s cadascun separats per un temps d'incubació en gel de 15s.

Un cop finalitzada la sonicació, i després del gradient de sucrosa, s'obtenen espermatozoides amb un 90% de puresa. A la Fig 4.2 es poden veure imatges representatives tant de microscòpia electrònica com de contrast de fase.

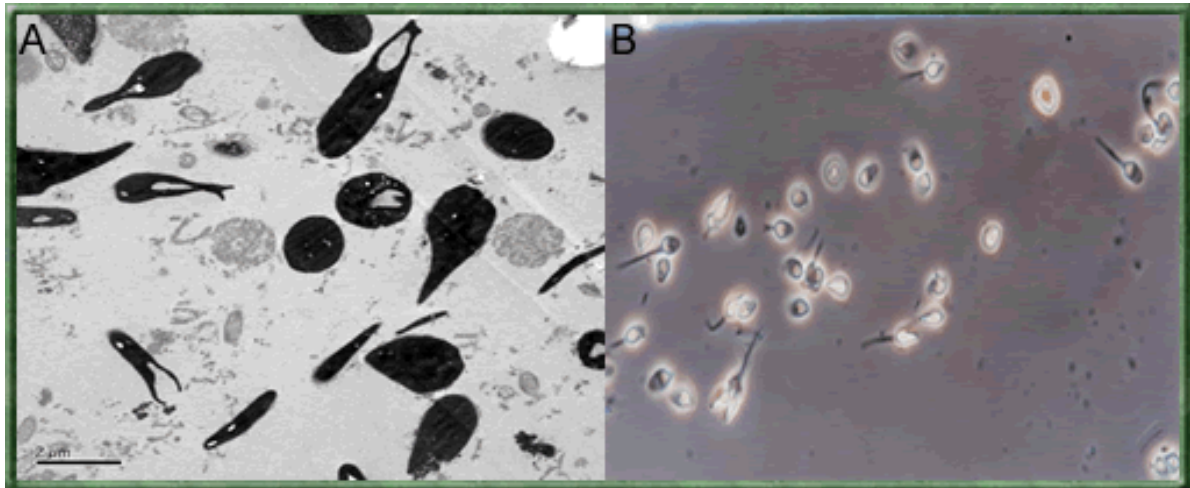


Fig 4.2. A: Imatge de microscòpia electrònica, on s'observen nuclis d'espermatozoide humà purificats. S'observen una majoria de caps aïllats, tot i que encara queden restes de cues. **B:** La mateixa mostra, en una imatge de CF a 40x. S'observen clarament que, tot i que la majoria són caps sense cua, encara queden alguns amb un tros de cua enganxats. *Imatges obtingudes a la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la UB.*

Mètode químic amb detergents.

Un mètode alternatiu desenvolupat consistia en l'afebliment químic de les estructures de membrana, per tal de separar la cua del cap (Jassim et al., 1992). Aquest mètode es basa en la incubació de les mostres amb detergents, i depèn tant del temps d'exposició com del tipus de mostra, com s'observa a la taula 4.2. En aquesta taula es mostra el temps que van trigar cinc mostres independents en tenir entre el 90 i el 100% de cues separades dels caps. Els experiments que eren resultat de la unió de diverses mostres s'obtenien barrejant prèviament les mostres, i tractant la mostra resultant com una única mostra, no com una barreja de quatre.

Els experiments es van realitzar amb una barreja de mostres normozoospèrmiques (Lab 683, Lab 707, Lab 711, Lab 712, Lab 727, Lab 1047), astenozoospèrmiques (Lab 1001, Lab 713, Lab 692) i oligoastenozoospèrmiques (Lab 698, Lab 722).

| Mostra | Temps necessari per a assolir el 100% de cues separades |
|---|---|
| Lab 683 | 2 hores |
| Lab 1001 | 10 minuts |
| Barreja de les mostres Lab 707, 711, 712, 713 | 40 minuts |
| Barreja de les mostres Lab 692, 698, 722, 727 | 5 minuts |
| Lab 1047 | 15 minuts |

Taula 4.2 Temps necessari en cinc experiments diferents per a tenir totes les cues separades.

Un cop finalitzada la disgregació amb detergent, i després del gradient de sucrosa, es recuperen espermatozoides amb un 90% de puresa al sediment. A la Fig 4.3 es poden veure imatges representatives tant de microscòpia electrònica com de contrast de fase.

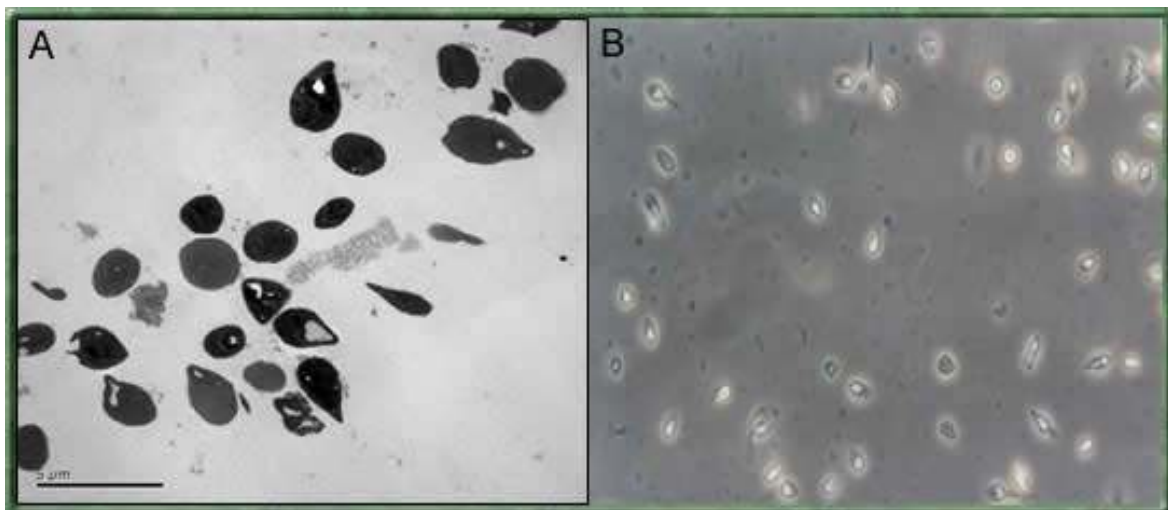


Fig 4.3 **A:** Imatge de microscòpia electrònica, on s'observen nuclis d'espermatozoide humà purificats. No obstant, encara es veuen restes d'altres materials. **B:** La mateixa mostra, en una imatge de CF a 40x. Es veuen restes de cues i espermatozoides amb trossos de cua encara enganxats. *Imatges obtingudes a la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la UB.*

Caracterització de proteïnes nuclears extretes de gels monodimensionals àcids.

Amb l'extracció àcida, es van poder extreure proteïnes unides al DNA, tals com protamines, histones i, possiblement, d'altres proteïnes. Per poder analitzar-les, es va fer servir una electroforesis monodimensional en gel àcid. Es van utilitzar gels de 17 cm d'ample, per tal de tenir una major resolució i poder separar millor les proteïnes. A més, es van picar algunes de les bandes per tal d'intentar identificar les proteïnes. Es van picar les bandes utilitzant puntes estèrils, tallades amb un bisturí estèril (tot nou, preparat en exclusiva per a aquest experiment) fins tenir el diàmetre adequat per a poder retallar la banda. El resultat es pot veure a la Fig 4.4 i a la Taula 4.3.

| Nom del punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) |
|--------------|---------------------------|----------------|-----------------|------------------------|
| 1 | Precursor protamina P2 | P04554 | 19.8 | 2/94 (2%) |
| 2 | Precursor protamina P2 | P04554 | 19.8 | 2/104 (1%) |
| 4 | Precursor semenogelina I | P04279 | 340 | 9/149 (6%) |
| 6 | Precursor protamina P2 | P04554 | 19.8 | 2/104 (1%) |
| 8 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 5.85e+003 | 8/100 (8%) |
| 9 | Precursor semenogelina I | P04279 | 8.85e+004 | 10/122 (8%) |
| 10 | Precursor semenogelina I | P04279 | 1.14e+009 | 21/117 (17%) |
| 11 | Precursor semenogelina I | P04279 | 7.56e+006 | 12/101 (11%) |
| 12 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 1.2e+005 | 10/113 (8%) |
| 14 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 8.28e+006 | 14/116 (12%) |
| 15 | Precursor semenogelina I | P04279 | 1.71e+010 | 17/114 (14%) |
| 16 | Precursor semenogelina I | P04279 | 1.19e+007 | 11/103 (10%) |
| 17 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 2.73e+009 | 17/95 (17%) |
| 18 | Precursor semenogelina I | P04279 | 1.14e+006 | 12/100 (12%) |
| 19 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 2.32e+007 | 18/106 (16%) |
| 20 | Precursor semenogelina I | P04279 | 2.51e+013 | 27/115 (23%) |
| 21 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 4.73e+010 | 32/115 (27%) |
| 22 | Precursor semenogelina II | Q02383 | 5.15e+013 | 31/107 (28%) |
| 23 | Precursor semenogelina I | P04279 | 6.41e+012 | 29/131 (22%) |

Taula 4.3 Proteïnes identificades en un gel monodimensional

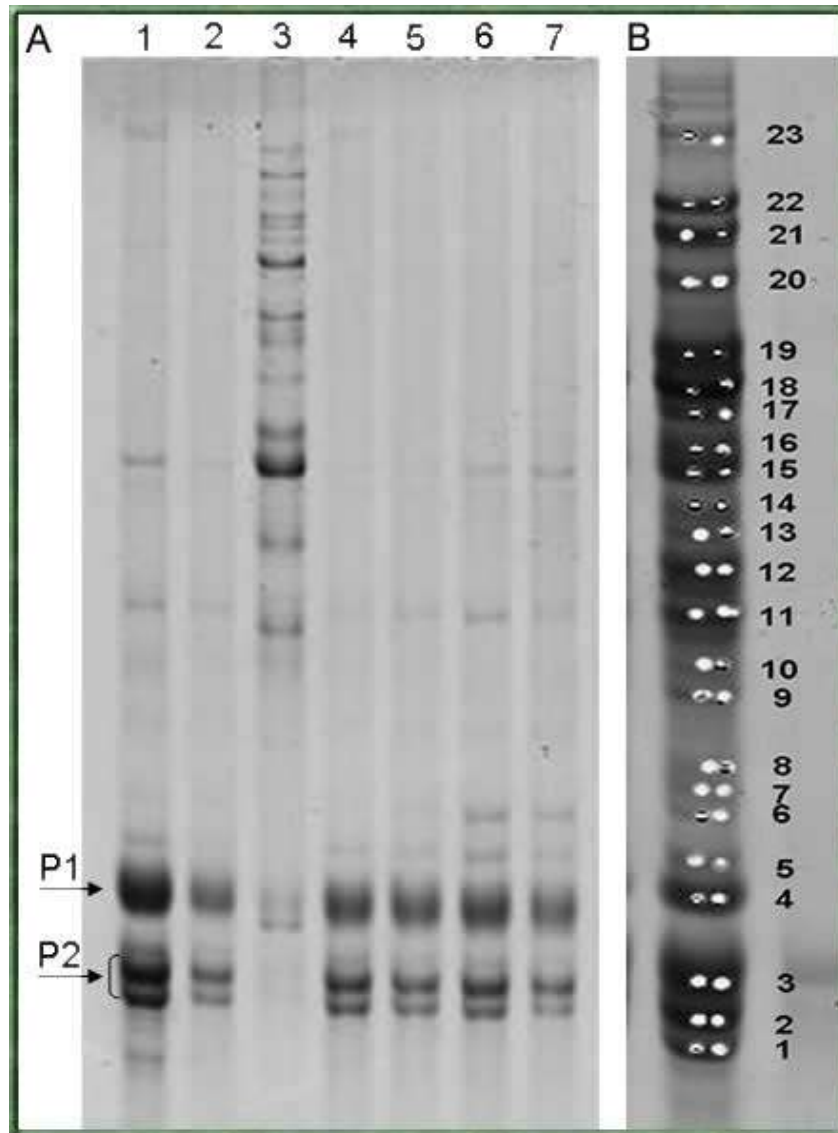


Fig 4.4. **A:** Gel monodimensional àcid. Els carrils 2,3,6 i 7 corresponen a mostres astenozoospermiques. Els carrils 1,4 i 5 corresponen a pacients normozoospermics. Marcades es troben les protamines P1 i la família P2. **B:** El carril B conté les referències per a la Taula 4.1

Bàsicament, es van identificar tres bandes corresponents al precursor de la protamina P2 i moltes bandes corresponents al precursor de formes diferents de semenogelina. La funció de tots dos tipus de proteïnes estan altament estudiades; la protamina P2 juga un paper molt important en la compactació del DNA, mentre que la semenogelina intervé en la formació de la matriu extracel·lular.

No obstant, la identificació de la semenogelina, una proteïna caracteritzada com a extracel·lular, en tantes de les bandes va fer pensar en la possibilitat de la redistribució proteica durant el procés de purificació nuclear. Per tant, es va decidir efectuar un canvi d'estratègia.

4.2.- Descripció del proteoma total de l'espermatozoide humà mitjançant 2D i identificació de les proteïnes utilitzant la tecnologia MALDI-TOF.

Amb la utilització de les tècniques d'extracció total, isoelectroenfoc, separació de les proteïnes amb gels 2D i anàlisi per MALDI-TOF de punts escindits dels gels s'han pogut identificar 98 proteïnes de l'espermatozoide humà. Aquestes 98 proteïnes corresponen aproximadament al 10% de les proteïnes que som capaços de resoldre en un gel (es resolten unes 1000 proteïnes aproximadament). A la Fig 4.5 es mostra un gel tipus dels obtinguts en la realització de l'experiment.

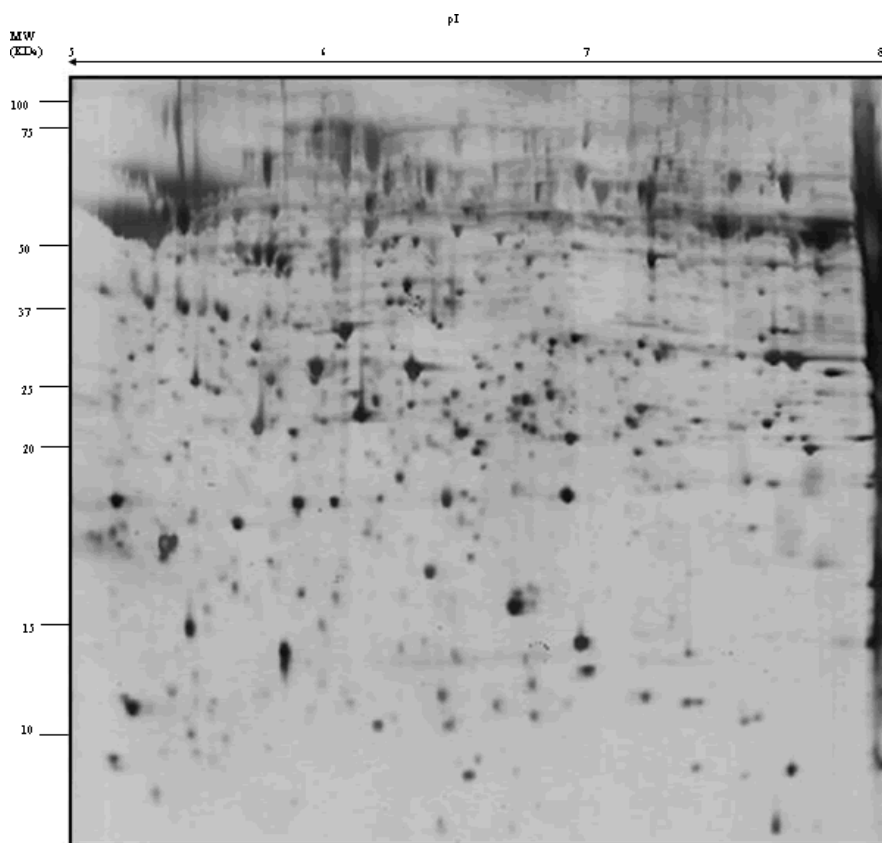


Figura 4.5 Mapa 2D d'un espermatzoide normozoospermic humà. La primera dimensió s'ha realitzat mitjançant IEF en tires de pH 5-8, la segona en un gel 12% SDS-PAGE, i les proteïnes s'han visualitzat per tinció de plata.

Per tal de poder identificar aquestes proteïnes es van retallar 145 punts, pertanyents a un rang de pes molecular des de 10 fins a 70 KDa, i un rang de punt isoelèctric de 5 a 8. El 96% d'aquestes proteïnes són constants en tots els gels estudiats. D'aquests 145 punts, 85 es van retallar només una vegada, i 30 es van retallar per duplicat, per tal de resoldre punts dubtosos.

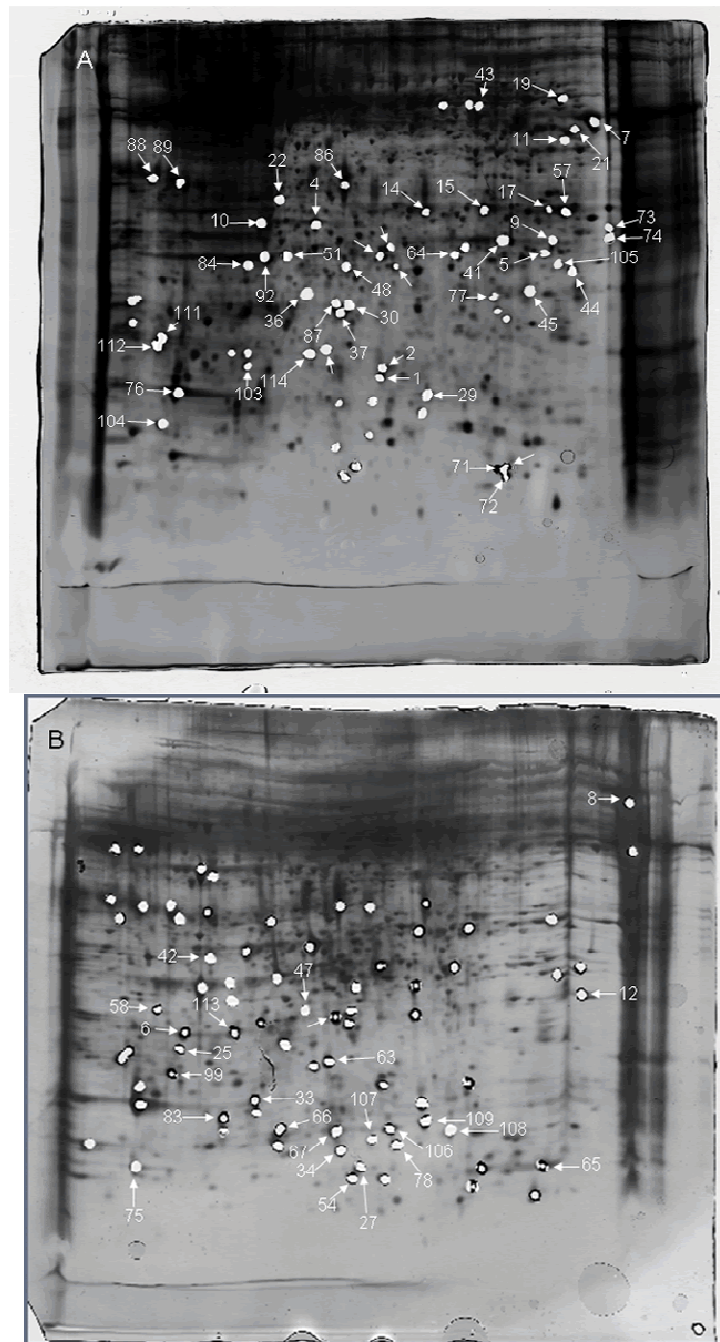


Fig 4.6 Imatge amb dos dels quatre gels picats per a la identificació positiva dels punts. El gel A es correspon amb la mostra Lab 1677; el gel B a la mostra Lab 1658. No tots els punts picats es van analitzar, ni tots els punts analitzats van donar resultats concloents; els números tenen la seva correspondència a la taula 4.4. *(Continua a la pàgina següent)*

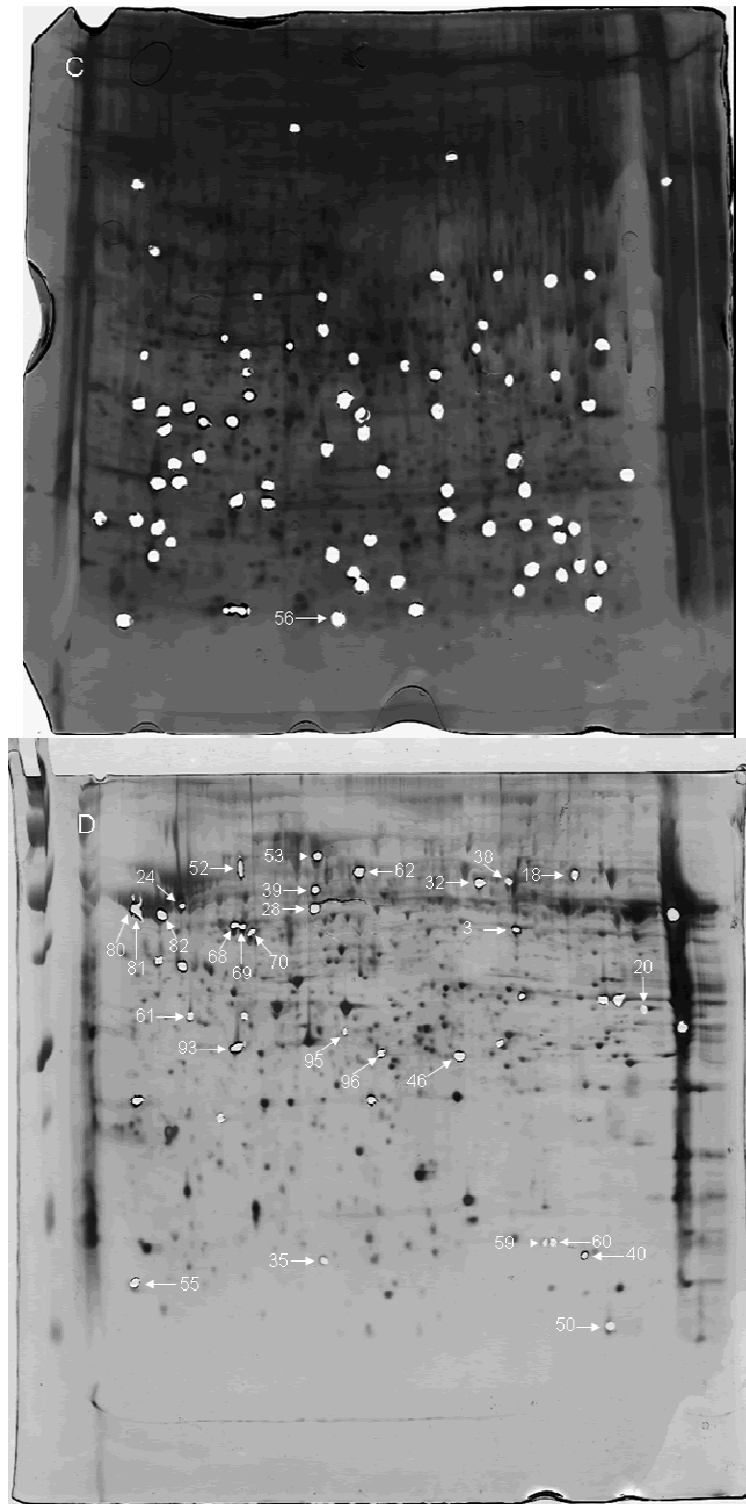


Fig 4.7 (Continuació de la Fig 4.6). Imatge amb dos dels quatre gels picats per a la identificació positiva dels punts. El gel C es correspon amb la mostra Lab 1620; el gel D a la mostra Lab 1759.

Després de retallar del gel les proteïnes a analitzar, es van portar a la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científico-Tècnics (SCT) ubicats a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Allà es van digerir les proteïnes presents als punts, i la seva

relació massa/càrrega va ser analitzada amb un sistema MALDI-TOF. Aquesta relació es presenta en forma d'espectre, on cada pic correspon a un pèptid. A les Figures 4.8 i 4.9 es mostren quatre exemples d'espectres obtinguts (Imatges analitzades amb el Data Explorer, v4.2, d'Applied Biosystems). Utilitzant aquests espectres, es va procedir a realitzar una cerca a les bases de dades de proteïnes tripsinitzades. Utilitzant software específic (motors de cerca MS-FIT i MASCOT), es va poder relacionar els pics amb proteïnes concretes, assolint així la seva identificació. En els exemples que es presenten, es van identificar les següents proteïnes:

A la figura 4.8 trobem la proteïna inhibidora beta de la dissociació de Rho GDP (ARHGDIB), amb una probabilitat d'encert (MOWSE score) de 9.23×10^3 . A més, 9 dels 130 pèptids trobats a la mostra es corresponien amb aquesta proteïna. Al mateix exemple A trobem també la subunitat Vib de la citocrom c oxidasa (COX6B). El MOWSE score per a aquesta proteïna és de 7.76×10^3 , i coincidien 5 dels 132 pèptids possibles.

En la figura 4.9 es mostra l'espectre corresponent a la glutatió S-transferasa Mu 3 (GSTM3). En aquest cas, el MOWSE score és de 3.14×10^8 , i 17 dels 63 pèptids possibles es trobaven a l'espectre. En el segon gràfic de la figura 4.9 troben la CTCL tumor antigen se57-1 (SE57-1) i la RAB 2, membre de la família d'oncogèns RAS (RAB2). En aquest cas, els pèptids trobats es corresponen a dos proteïnes diferents. La proteïna SE57-1 (marcada amb cercles verds) té un MOWSE score de 207 i 6 dels 29 pèptids presents corresponen a aquesta proteïna. La proteïna RAB2 (marcada amb cercles vermells) en té un MOWSE score de 71.7, i han coincidit 4 dels 29 punts trobats a la mostra. Tot i que els valors de MOWSE semblen baixos, la identificació ha estat possible per la bona qualitat de l'espectre (pics grans i sense soroll de fons).

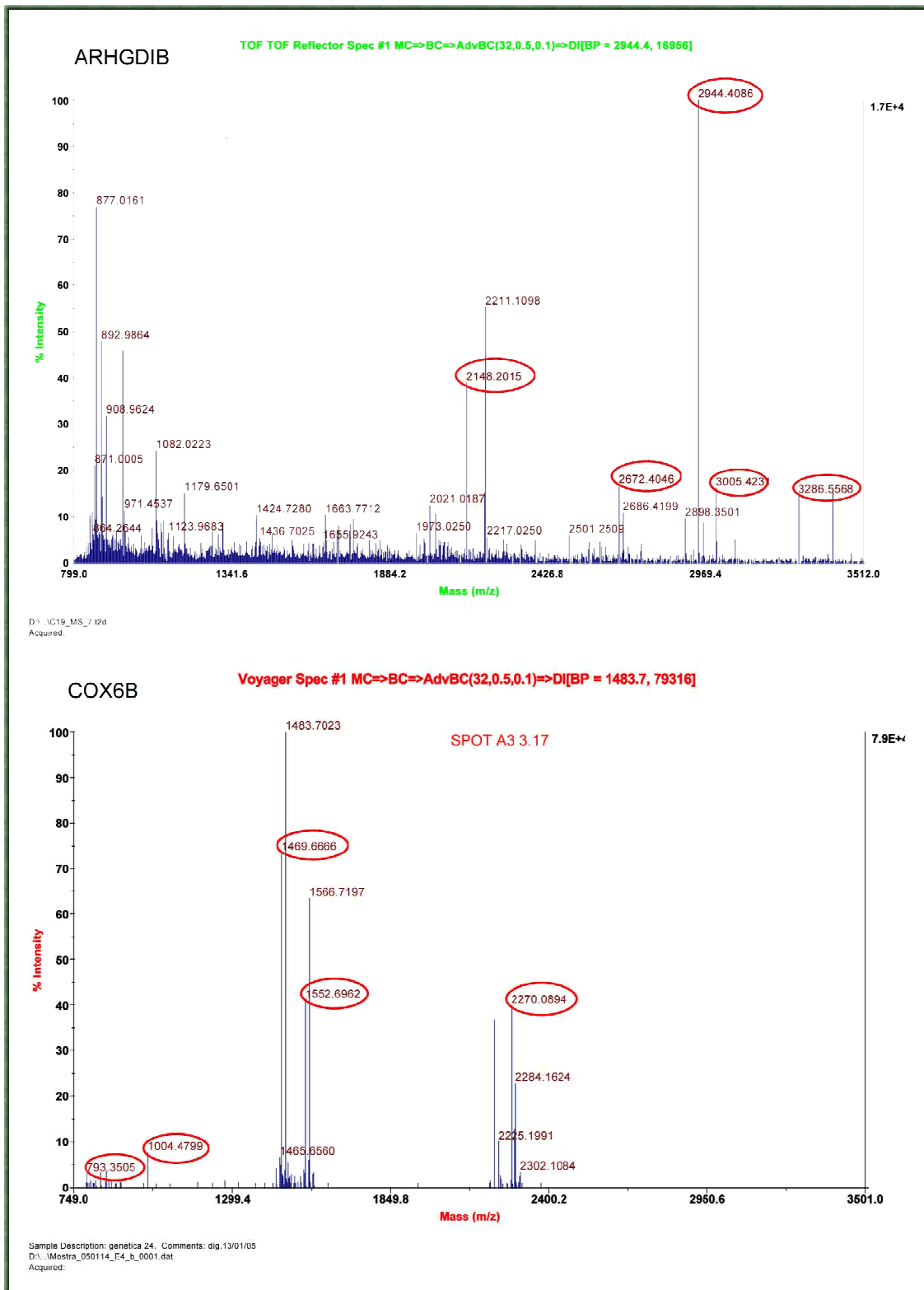


Fig 4.8 Alguns exemples dels espectres que van conduir a la identificació positiva de les proteïnes. El primer correspon a la proteïna ARGHDIB. El segon, a la COX6B.

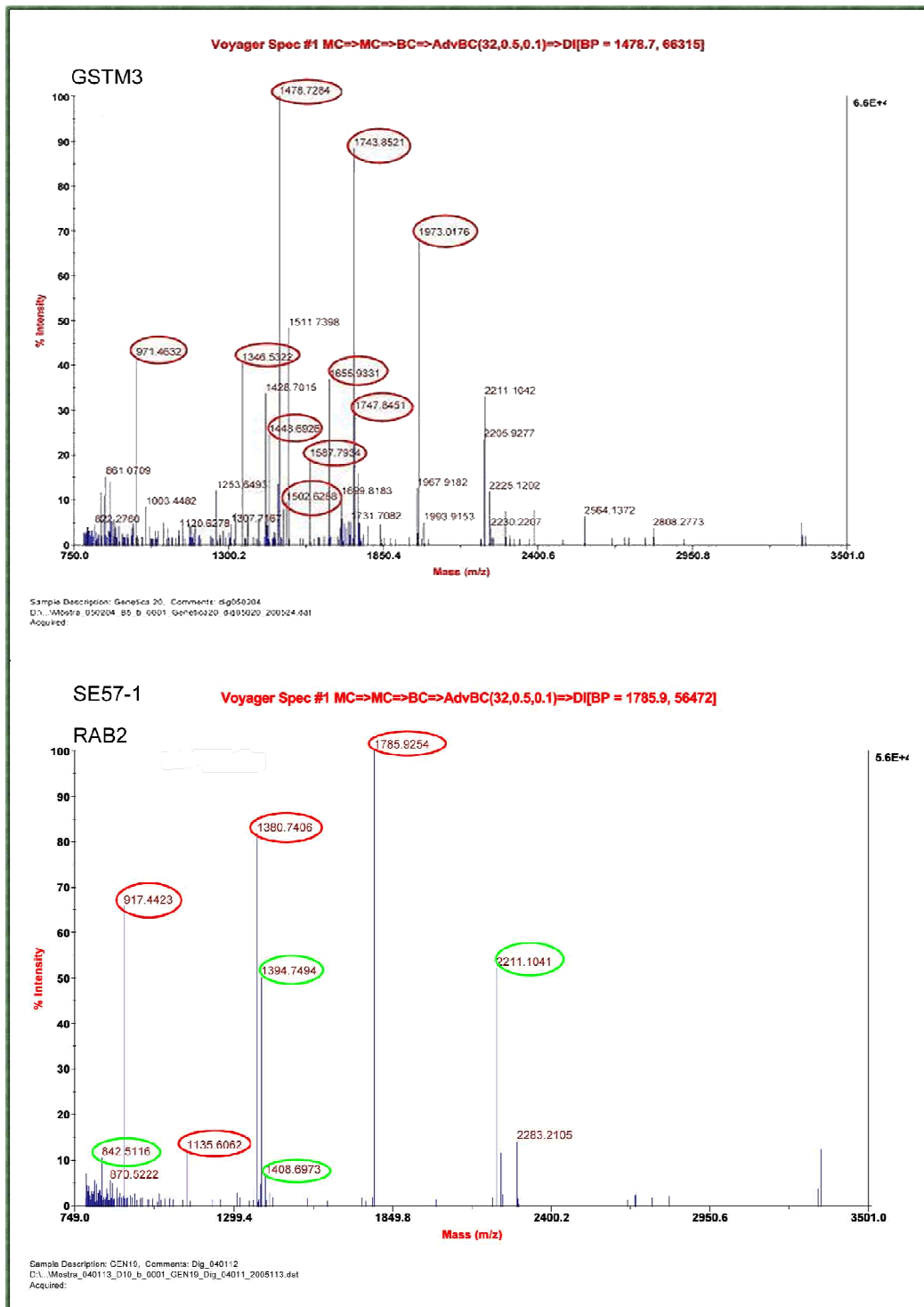


Fig 4.9 Més exemples dels espectres que van conduir a la identificació positiva de les proteïnes. Cada pic correspon a un pèptid en concret. La búsqueda a les bases de dades de la massa exacta d'aquests pèptids condueix a la identificació de les proteïnes. El primer espectre es correspon amb la proteïna GSTM3. El segon ens ha permès identificar dos proteïnes a la vegada, la SE57-1 i la RAB2 (marcades amb verd i vermell respectivament) gràcies a les intensitats i pics diferents presents.

Resultats

Utilitzant aquestes tècniques, s'han pogut identificar 98 proteïnes. La identificació de cada proteïna, així com el número que la relaciona amb el punt retallat, la seva funció i altra informació rellevant es detalla a la Taula 4.4, mentre que la seva localització al mapa es troba a la Fig 4.10. Formant part de l'execució de la present tesis aquests resultats s'han publicat a la revista *Proteomics* (Martínez-Heredia et al., 2006).

Taula 4.4 Proteïnes d'espermatozoide humà identificades per MS.

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|-------------------------------------|---------|---|----------------|-----------------|------------------------|--------------------|------------------|---------------|---|
| Metabolisme | | | | | | | | | |
| ACYP1 | 1 | Acylfosfatasa, isozima comuna a òrgans | P07311 | 5.75 | 3/6 (50%) | 27% (27/99 AA's) | 16.8/6.44 | 11/9.52 | Rol fisiològic sense determinar. Involucrada, possiblement, en el metabolisme del fosfat |
| ACYP2 | 2 | Acylfosfatasa, isozima de tipus muscular | P14621 | 5.75 | 3/6 (50%) | 27% (27/99 AA's) | 16.8/6.44 | 11/9.52 | Idèntic que el superior |
| GLUL | 3 | Glutamina sintetasa | P15104 | 3.16e+003 | 6/60 (10%) | 21% (79/373 AA's) | 44.8/6.97 | 42/6.43 | Pertany a la família de les glutamines sintetases; metabolisme dels aminoàcids |
| HIBADH | 4 | Precursor de 3-hidroxi-isobutirat deshidrogenasa | P31937 | 5.78e+003 | 8/18 (44%) | 28% (97/336 AA's) | 31.7/6.30 | 35/8.38 | Deshidrogenasa; involucrada en el metabolisme de la valina |
| HFLJ | 5 | Proteïna hipotètica FLJ11342 | XP_416633 | 1.49e+009 | 14/106 (13%) | 48% (147/306 AA's) | 28.5/7.63 | 34/8.80 | Hidrolasa predita, amb una funció probable de transport d'aa i el seu metabolisme |
| PRPSAP1 | 6 | Proteïna 1 associada a la fosforibosil pirofosfat sintetasa | Q14558 | 1.16e+003 | 8/140 (5%) | 17% (64/356 AA's) | 20.8/7.59 | 391/6.73 | Funció inhibidora de la síntesis de PRPP; forma part del metabolisme de nucleobases, nucleòsids, nucleòtids i àcids nucleics |
| Energia | | | | | | | | | |
| Glucòlisis i Gluconeogènesis | | | | | | | | | |
| ENO1 | 7 | Alfa enolasa | P06733 | 5.62e+008 | 13/29 (44%) | 36% (158/434 AA's) | 50.2/7.84 | 47/7.01 | Glicòlisis, control del creixement, tolerància a la hipòxia, resposta al·lèrgica, repressor de la transcripció |
| GAPDHS | 8 | Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, específica de testicle | O14556 | 2.05e+008 | 14/37 (37%) | 49% (202/408 AA's) | 50.3/7.78 | 44/8.39 | Pot jugar un paper en la regulació de l'intercanvi entre diferents vies per a la producció d'energia durant l'espermioogènesis i a l'espermatozoide |
| PGAM1 | 9 | Fosfoglicerat mutasa 1 | P18669 | 3.21e+006 | 9/238 (3%) | 51% (131/254 AA's) | 30.0/7.67 | 29/6.68 | Interconversió de 2,3-bisfosfoglicerat |
| TPI1 | 10 | Trioses fosfat isomerasa 1 | CAG46503 | 4.13e+006 | 11/30 (36%) | 51% (129/249 AA's) | 31.3/5.95 | 27/6.45 | Juga un important paper en algunes vies metabòliques (inclosa la glicòlisis) |
| Oxidació dels àcids grassos | | | | | | | | | |
| ACADM | 11 | Acil coenzim A deshidrogenasa, C-4 a C-12 cadena recta | P11310 | 4.27e+005 | 11/20 (55%) | 28% (119/421 AA's) | 48.5/7.74 | 47/8.61 | Involucrat en les fases primàries de la via mitocondrial de la beta-oxidació dels àcids grassos |
| CYB5R3 | 12 | Citocrom b5 reductasa b5R2 | P00387 | 5.14e+004 | 6/44 (13%) | 31% (87/276 AA's) | 28.7/7.77 | 31/8.49 | Desnaturalització i elongació dels àcids grassos, síntesis de colesterol metabolisme de drogues |

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|-----------------------------|---------|--|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| DECR1 | 12 | Precursor de 2-4 dienoil CoA reductasa I | Q16698 | 1.29e+006 | 9/44 (20%) | 32% (109/335 AA's) | 28.7/7.77 | 36/9.35 | Enzim auxiliar de la beta-oxidació que participa del metabolisme dels enoil-CoA no saturats |
| ECH1a | 14 | Precursor del Delta 3,5-delta 2,4-dienoil-CoA isomerasa | Q13011 | 9.01e+003 | 6/51 (11%) | 22% (73/328 AA's) | 33.2/6.69 | 36/6.61 | Isomerització de 3-trans, 5-cis-dienoil-CoA a 2-trans,4-trans-dienoil-CoA |
| ECH1b | 15 | Proteïna semblant a peroxisomal enoil-coenzim A hydratasa | NP_001389 | 4.03e+004 | 7/40 (17%) | 33% (109/328 AA's) | 33.2/7.26 | 36/6.61 | Té una funció en els passos auxiliars de la beta-oxidació dels àcids grassos |
| SCAD | 3 | Acil-CoA deshidrogenasa | P16219 | 1.19e+011 | 18/60 (30%) | 62% (257/412 AA's) | 44.8/6.97 | 44/8.13 | Primer pas de la beta-oxidació mitocondrial |
| <i>Glicòlisi anaeròbica</i> | | | | | | | | | |
| LDHC | 17 | L-lactat deshidrogenasa C | P07864 | 1.49e+005 | 11/123 (8%) | 41% (137/332 AA's) | 33.2/7.66 | 37/7.08 | Pas final, específica de testicle |
| <i>Cicle de Krebs</i> | | | | | | | | | |
| DLD | 18 | Precursor de dihidroliipoamida deshidrogenasa | P09622 | 3.73e+005 | 11/55 (20%) | 25% (130/509 AA's) | 61.7/7.71 | 54/7.59 | Component de les piruvat i alfa-cetoglutarat deshidrogenasa mitocondrial |
| | 19 | | | 5.98e+005 | 10/38 (26%) | 26% (137/509 AA's) | 63.7/7.22 | 54/7.59 | |
| ETFA | 20 | Flavoproteïna de transferència d'electrons, subunitat alfa | P13804 | 6.62e+008 | 11/78 (14%) | 46% (156/333 AA's) | 31.8/7.59 | 35/8.62 | Transfereix els electrons a la principal via mitocondrial de la cadena respiratòria, via ETF-ubiquinona oxidoreductasa |
| FH | 21 | Precursor de la fumarat hidratasa | P07954 | 1.60e+007 | 12/46 (26%) | 34% (176/510 AA's) | 49.4/7.78 | 55/8.85 | Component enzimàtic del cicle dels àcids tricarbòxics (TCA) |
| PDHB | 22 | Precursor del component de la subunitat beta de la piruvat deshidrogenasa E1 | P11177 | 2.06e+010 | 13/34 (38%) | 50% (180/359 AA's) | 33.8/6.07 | 39/6.21 | El complex de la piruvat deshidrogenasa catalitza la conversió de piruvat a acetil-CoA |
| <i>Respiració</i> | | | | | | | | | |
| ATP5A1 | 8 | ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complex F1 mitocondrial, isoforma 1 de la subunitat alfa | P25705 | 6.67e+003 | 5/37 (13%) | 15% (86/553 AA's) | 50.3/7.78 | 60/9.16 | ATP sintasa mitocondrial. Proteïna de la subunitat alfa del nucli catalític |
| ATP5B | 24 | Cadena beta de la ATP sintasa, precursor mitocondrial | P06576 | 2.46e+013 | 20/53 (37%) | 55% (291/529 AA's) | 54.5/5.43 | 56/5.26 | ATP sintasa mitocondrial. La cadena beta és la subunitat catalítica |
| ATP5H | 25 | Subunitat d del complex F0 de la ATP syntase H | O75947 | 4.08e+004 | 8/78 (10%) | 47% (76/161 AA's) | 19.9/5.58 | 18/5.21 | ATP sintasa mitocondrial. Aquest gen codifica la subunitat d del complex F0 |
| | 6 | | | 6.91e+003 | 6/140 (4%) | 46% (75/161 AA's) | 20.8/5.59 | 18/5.21 | |
| COX6B | 27 | Citocrom c oxidasa, subunitat Vib | Q7L1R4 | 7.76e+003 | 5/132 (3%) | 66% (57/86 AA's) | 12.2/6.51 | 10/6.54 | Transport d'electrons |
| UQCRC1 | 28 | Nucli de la ubiquinol citocrom c reductasa I | P31930 | 7.95e+011 | 21/59 (35%) | 53% (258/480 AA's) | 51.4/5.96 | 53/5.94 | Part de la cadena mitocondrial de transport d'electrons |

Resultats

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'encès | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|---|---------|---|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| <i>Altres vies</i> | | | | | | | | | |
| ASRGL1 | 29 | Proteïna semblant a l'asparaginasa 1 | Q7L266 | 4.77e+003 | 9/59 (15%) | 34% (106/308 AA's) | 16.0/6.92 | 32/5.84 | Catabolisme de glicoproteïnes |
| | 30 | | | 1.27e+003 | 4/20 (20%) | 13% (32/239 AA's) | 22.4/6.26 | 32/5.84 | |
| NIT1 | 15 | Homòleg de la nitrilasa 1 | Q86X76 | 1.07e+005 | 8/40 (20%) | 36% (119/327 AA's) | 33.2/7.26 | 36/7.91 | Proteïna amb domini hidrolasa |
| OXCT1 | 32 | Precursor de la transferasa succinil CoA 3 cetoàcid coenzim A | P55809 | 9.55e+006 | 11/98 (11%) | 32% (171/520 AA's) | 61.3/6.78 | 56/7.13 | Enzim clau per al catabolisme dels cossos cetònics (catabolitzza el primer pas) i transfereix el CoA de succinat a acetoacetat |
| Transcripció, síntesis proteica i bescanvi proteic | | | | | | | | | |
| <i>Transcripció</i> | | | | | | | | | |
| H2A | 33 | Histona H2A | Q93077 | 243 | 3/55 (5%) | 11% (35/293 AA's) | 16.3/5.86 | 14/10.86 | Forma part del nucleosoma |
| H4A | 34 | Histona H4 | P62805 | 1.02e+003 | 6/43 (13%) | 43% (45/103 AA's) | 12.8/6.20 | 11/11.36 | Forma part del nucleosoma |
| MYCBP | 35 | Proteïna 1 d'unió a C-myc | Q99417 | 1.38e+003 | 3/65 (4%) | 46% (48/103 AA's) | 13.0/6.06 | 12/5.71 | Pot controlar l'activitat transcripcional de c-Myc |
| PARK7 | 36 | Subunitat reguladora de l'unió a RNA de l'oncogen DJ1 | Q99497 | 2.36e+005 | 7/104 (6%) | 38% (73/189 AA's) | 20.7/6.01 | 20/6.33 | Actua com un regulador positiu de la transcripció dependent del receptor d'androgen i pot funcionar com una chaperona sensible al redox i com a sensor per a estres oxidatiu |
| | 37 | | | 2.69e+008 | 11/175 (6%) | 60% (115/189 AA's) | 21.0/6.44 | 20/6.33 | |
| RUVBL1 | 38 | Proteïna 1 semblant a RuvB | Q9Y265 | 1.03e+010 | 18/86 (20%) | 50% (230/456 AA's) | 55.8/7.18 | 50/6.02 | Activitats ATPasa i DNA helicasa i component de la NuA4 histona acetiltransferasa |
| RUVBL2 | 39 | Proteïna 2 semblant a RuvB | Q9Y230 | 4.13e+009 | 18/58 (31%) | 44% (205/463 AA's) | 57.3/5.96 | 51/5.49 | El mateix que a dalt; forma un complexe multimèric amb RUVBL1 |
| <i>Bescanvi proteic</i> | | | | | | | | | |
| ACRBP | 40 | Proteïna d'unió a acrosina | Q8NEB7 | 1.24e+006 | 9/41 (21%) | | 11.5/ 7.46 | 18/5.21 | Involucrada en l'empaquetament i condensació de l'acrosina zimogen |
| ACRBPpre | 41 | Precursor de la proteïna d'unió a acrosina | Q8NEB7 | 6.54e+003 | 6/89 (6%) | 16% (87/543 AA's) | 29.8/7.36 | 61/5.09 | El mateix que ACRBP |
| | 42 | | | 1.05e+005 | 8/39 (20%) | 19% (107/543 AA's) | 30.5/5.68 | 61/5.09 | |
| LAP | 43 | Citosol aminopeptidasa | P28838 | 1.59e+013 | 27/119 (22%) | 57% (283/488 AA's) | 53.9/7.21 | 53/6.29 | Bescanvi de proteïnes intracel·lulars |
| PSMA2 | 44 | Subunitat alfa del proteasoma tipus 2 | P25787 | 2.71e+007 | 9/46 (19%) | 51% (120/234 AA's) | 26.7/7.76 | 26/6.91 | Subunitat del proteasoma amb un potencial efecte regulatori |
| PSMB2 | 45 | Subunitat beta del proteasoma tipus 2 | P49721 | 7.53e+003 | 8/125 (6%) | 33% (67/201 AA's) | 22.3/7.54 | 23/6.52 | Subunitat del proteasoma |
| PSMB3 | 46 | Subunitat beta del proteasoma tipus 3 | P49720 | 1.01e+004 | 9/15 (60%) | 47% (98/205 AA's) | 25.4/6.68 | 23/6.14 | El mateix que a dalt |

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|-----------------------------------|---------|--|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| PSMB4 | 47 | Subunitat beta del proteasoma tipus 4 | P28070 | 3.78e+010 | 12/40 (30%) | 39% (103/264 AA's) | 22.6/6.25 | 29/5.72 | El mateix que a dalt |
| PSMB7 | 48 | Subunitat beta del proteasoma tipus 7 | Q99436 | 4.47e+003 | 6/92 (6%) | 23% (65/277 AA's) | 25.4/6.45 | 30/7.58 | El mateix que a dalt |
| UAP1 | 48 | Antigen 2 associat a l'espermatozoide | Q16222 | 224 | 4/92 (4%) | 9% (51/522 AA's) | 25.5/6.29 | 59/5.92 | Converteix UDP i GlcNAc-1-P en UDP-GlcNAc, i UDP i GalNAc-1-P en UDP-GalNAc |
| UBA52 | 50 | Proteïna L40 ribosomal 60S | P62987 | 1.49e+003 | 6/63 (9%) | 46% (59/128 AA's) | 10.0/7.41 | 15/9.87 | Proteïna de fusió consistent en ubiquitina a l'N terminal i la proteïna ribosomal L40 |
| <i>Empaquetament de proteïnes</i> | | | | | | | | | |
| APCS | 51 | Precursor del component P del sèrum amiloide | P02743 | 249 | 4/33 (12%) | 21% (48/223 AA's) | 26.8/6.11 | 25/6.10 | Pot interactuar amb el DNA i les histones i pot recollir material nuclear alliberat per cèl·lules circulants danyades |
| HSPD1 | 52 | Proteïna P1 de la matriu mitocondrial | P10809 | 2.36e+011 | 18/35 (51%) | 46% (266/573 AA's) | 65.5/5.68 | 61/5.70 | Importació de proteïnes a la mitocondria, assemblatge i empaquetament de les proteïnes importades |
| HSPA8 | 53 | Proteïna 8 relacionada amb el shock per calor de 70KDa, isoforma 1 | P11142 | 1.29e+003 | 7/26 (26%) | 12% (78/646 AA's) | 71.5/5.97 | 70/5.38 | Pertany a la família HSP70 que s'uneix a polipèptids acabats de fer per tal de facilitar el correcte assemblatge, a més de funcionar com una ATPasa en el desassemblatge de les vesícules cobertes de clatrina |
| <i>Transport de proteïnes</i> | | | | | | | | | |
| DBI | 54 | Inhibidor de la unió de diazepam | P07108 | 7.77e+003 | 4/80 (5%) | 42% (44/104 AA's) | 11.6/6.31 | 12/5.41 | Desplaça al lligand unit al lloc de reconeixement de beta-carbolina / benzodiazepina i es troba involucrat en el transport molecular |
| NUTF2 | 55 | Factor de transport nuclear 2 | P61970 | 164 | 3/61 (4%) | 29% (38/127 AA's) | 13.7/5.30 | 14/5.10 | Facilita transport fins al nucli a les proteïnes i interacciona amb la nucleoporina p62 i Ran |
| RAB2 | 56 | RAB 2, membre de la família d'oncògens RAS | P61019 | 71.7 | 4/29 (13%) | 21% (46/212 AA's) | 10.3/6.35 | 23/6.08 | Necessari per al transport de proteïnes des de el reticle endoplàsmic al complex de Golgi |
| hVDAC2 | 57 | Canal selectiu d'anions dependent de voltatge 2 | P45880 | 7.47e+005 | 9/31 (29%) | 46% (138/294 AA's) | 33.4/7.73 | 39/6.32 | Forma un canal entre la mitocondria i el citoplasma |
| Transducció de senyal | | | | | | | | | |
| ARHGDIB | 58 | Inhibidor beta de la dissociació de Rho GDP | P52566 | 9.23e+003 | 9/130 (6%) | 65% (132/201 AA's) | 24.0/5.57 | 23/5.1 | Regula el canvi GDP/GTP de les proteïnes Rho |
| HINT1 | 59 | Proteïna 1 d'unió a histidina triad nucleòtid | P49773 | 1.15e+005 | 5/86 (5%) | 51% (65/126 AA's) | 13.8/7.13 | 14/6.43 | Hidrolitza el substrat de l'adenosina 5'-monofosforamidat i forma part de la via de transducció de senyal |
| | 60 | | | 8.05e+003 | 4/168 (2%) | 51% (65/126 AA's) | 13.8/7.16 | 14/6.43 | |
| IMPA1 | 61 | Inositol-1(o 4)-monofosfatasa | P29218 | 2.88e+004 | 8/17 (47%) | 37% (103/277 AA's) | 29.8/5.46 | 30/5.16 | Enzim clau de la via de senyalització de fosfatidil inositol |

Resultats

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'encès | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|--|---------|--|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|---|
| PDIA3 | 62 | Proteïna regulada per glucosa de 58 kDa | P30101 | 2.52e+010 | 17/31 (54%) | 38% (195/505 AA's) | 62.8/6.18 | 57/5.99 | Catalitza el reajustament dels ponts -S-S- en les proteïnes. Forma part de la via de transducció de senyal |
| PRKG1 | 63 | Proteïna kinasa dependent de cGMP tipus 1 | P14619 | 1.65e+003 | 8/122 (6%) | 13% (94/686 AA's) | 18.8/6.33 | 78/5.28 | Kinasa, involucrada en algunes vies transcripcionals |
| SLC9A8 | 64 | Intercanviador de sodi/hidrogen 8 | Q9Y2E8 | 1.06e+003 | 4/72 (5%) | 9% (57/577 AA's) | 26.8/6.90 | 65/6.07 | Involucrat en la regulació de pH; té a més un paper en la transducció de senyal |
| S100A8 | 65 | Proteïna d'unió a calci S100 A8 | P05109 | 2.31e+002 | 4/9 (44%) | 26% (25/93 AA's) | 12.0/7.72 | 11/6.51 | Pot funcionar en la inhibició de la caseïna kinasa, com una citokina i interactuar amb els components dels filaments intermedis |
| S100A9 | 66 | Proteïna d'unió a calci S100 A9 | P06702 | 2.65e+006 | 8/28 (28%) | 72% (83/114 AA's) | 14.5/6.04 | 13/5.71 | El mateix que a dalt |
| | 67 | | P06702 | 6.44e+003 | 5/151 (3%) | 48% (55/114 AA's) | 13.8/6.07 | 13/5.71 | |
| Citoesquelet, flagel i moviment cel·lular | | | | | | | | | |
| ACTB | 68 | Actina del citoesquelet | P60709 | 1.55e+007 | 11/34 (32%) | 36% (137/375 AA's) | 47.4/5.65 | 42/5.29 | Involucrades en motilitat cel·lular, estructura i integritat |
| | 69 | | | 6.57e+007 | 13/26 (50%) | 46% (176/375 AA's) | 47.6/5.68 | 42/5.29 | |
| ARPM2 | 70 | Proteïna relacionada amb actina M2 | Q8TDY3 | 2.19e+007 | 12/30 (40%) | 37% (141/377 AA's) | 44.7/5.70 | 42/5.28 | Pertany a la família de les actines amb síntesis en espermatides tardies i localització en el calix |
| DNCL2B | 71 | Polipèptid de dineïna citoplasmàtica lleugera 2B | Q8TF09 | 6.05e+003 | 5/144 (3%) | 61% (59/96 AA's) | 11.9/7.36 | 11/6.91 | Pot estar involucrat en l'assemblatge i funció motora de la dineïna, amb un paper en la divisió cel·lular i el transport intracel·lular |
| | 72 | | | 7.13e+003 | 5/49 (10%) | 61% (59/96 AA's) | 11.9/7.36 | 11/6.91 | |
| ODF1 | 73 | Fibra exterior densa de la cua de l'espermatozoide 1 | Q14990 | 2.26e+004 | 10/39 (25%) | 35% (88/250 AA's) | 29.9/7.98 | 28/8.47 | Component de les fibres exteriors denses de l'espermatozoide |
| | 74 | | | 2.67e+003 | 6/44 (13%) | 28% (71/250 AA's) | 28.7/7.77 | 28/8.47 | |
| PIP | 75 | Proteïna induïda per prolactina | P12273 | 5.98e+003 | 5/86 (5%) | 50% (73/146 AA's) | 12.7/5.51 | 17/8.26 | Involucrat en algun tipus d'unió a actina, però no es té clar encara |
| PIPpre | 76 | Precursor de la proteïna induïda per prolactina | P12273 | 4.40e+005 | 7/32 (21%) | 56% (82/146 AA's) | 16.3/5.51 | 17/8.26 | El mateix que a dalt |
| SEMG1 | 77 | Precursor de la semenogelina I | P04279 | 3.82e+004 | 9/82 (10%) | 25% (116/462 AA's) | 21.8/7.32 | 52/9.30 | Proteïna predominant al semen, involucrada en la formació de la matriu |
| SGCB | 78 | Sarcoglican beta | Q16585 | 1.34e+002 | 3/17 (17%) | 9% (30/318 AA's) | 13.5/6.78 | 35/8.86 | Forma una unió entre la F-actina del citoesquelet i la matriu extracel·lular |
| TEKT2 | 39 | Tektina 2 | Q9UIF3 | 1.55e+007 | 10/58 (17%) | 41% (178/430 AA's) | 57.3/5.96 | 50/5.39 | Família de proteïnes que són co-assemblades amb tubulines per formar el citoesquelet. |

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'encès | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|--|---------|---|----------------|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------|---------------|---|
| TUBB | 80 | Subunitat beta tubulina | Q13509 | 1.18e+011 | 21/45 (46%) | 64% (289/445 AA's) | 53.8/5.22 | 50/4.79 | La tubulina és el principal constituent dels microtúbuls |
| | 81 | | | 2.64e+008 | 15/26 (57%) | 53% (238/445 AA's) | 52.9/5.25 | 50/4.79 | |
| | 82 | | | 1.19e+010 | 18/24 (75%) | 64% (288/445 AA's) | 52.1/5.34 | 50/4.79 | |
| Cicle cel·lular, apoptosi i estres oxidatiu | | | | | | | | | |
| <i>Cicle cel·lular</i> | | | | | | | | | |
| CDK5 | 83 | Kinasa depenent de ciclina 5 | Q00535 | 37.3 | 3/13 (23%) | 15% (44/292 AA's) | 15.4/5.83 | 33/7.57 | Probablement involucrada en el control del cicle cel·lular |
| HSPA2 | 84 | Proteïna 2 relacionada amb el shock per calor de 70KDa | P54652 | 8.2e+004 | 9/67 (13%) | 21% (139/639 AA's) | 27.1/5.86 | 70/5.56 | Involucrada en el desenvolupament de les espermatides i la meiosis masculina |
| | 53 | | | 5.26e+009 | 18/26 (69%) | 36% (233/639 AA's) | 71.5/5.97 | 70/5.56 | |
| PPP1CC | 86 | Serina/treonina fosfatasa 1, subunitat catalítica, isoforma gamma | P36873 | 3.13e+004 | 9/54 (16%) | 34% (113/323 AA's) | 38.2/6.23 | 37/6.12 | Essencial per a la divisió cel·lular, i participa en la regulació del metabolisme del glicogen, contracció muscular i síntesis proteica. Involucrat en la regulació de la conductància iònica i la plasticitat de llarga durada sinàptica |
| <i>Apoptosis</i> | | | | | | | | | |
| CASP2 | 87 | Caspasa 2, isoforma 3 | P42575 | 678 | 5/124 (4%) | 54% (59/108 AA's) | 22.4/6.26 | 12/7.88 | Membre de les proteases (caspases) cisteïna-àcid aspàrtic involucrades en l'apoptosis |
| CLU | 88 | Precursor de clusterina | P10909 | 922 | 7/55 (12%) | 14% (91/644 AA's) | 35.8/5.36 | 52/5.89 | La seva funció no està clara. Sembla tenir relació amb l'apoptosis, entre d'altres possibles funcions |
| | 89 | | | 922 | 7/55 (12%) | 16% (75/449 AA's) | 35.4/5.50 | 52/5.89 | |
| | 86 | | | 6.79e+003 | 6/51 (11%) | 14% (67/449 AA's) | 38.2/6.23 | 52/5.89 | |
| DNAJB13 | 45 | Proteïna relacionada amb l'apoptosis de d'espermatòcits testiculars | P59910 | 2.61e+003 | 5/125 (4%) | 23% (74/316 AA's) | 21.2/7.54 | 36/7.68 | Pot estar involucrada en inhibir l'apoptosis de l'espermatogènesi testicular |
| <i>Protecció contra dany oxidatiu i toxines</i> | | | | | | | | | |
| GSTM3 | 92 | Glutatió S-transferasa Mu 3 | P21266 | 3.14e+008 | 17/63 (26%) | 57% (130/225 AA's) | 26.8/5.97 | 26/5.37 | Pertany a la classe <i>mu</i> d'enzimes involucrades en la detoxificació de carcinògens, drogues, toxines i productes de l'estrès oxidatiu |
| | 93 | | | 3.01e+006 | 12/21 (57%) | 50% (113/225 AA's) | 26.3/5.64 | 26/5.37 | |
| MPST | 14 | 3-mercapto-piruvat sulfurtransferasa | P25325 | 5.14e+005 | 8/51 (15%) | 42% (125/297 AA's) | 33.2/6.69 | 33/6.13 | Transfereix un ió sulfur a la cianida o altres tiols i pot estar involucrada en la resposta a toxines |
| PRDX4 | 95 | Tioredoxina peroxidasa | Q13162 | 2.31e+007 | 11/66 (16%) | 53% (144/271 AA's) | 27.7/6.12 | 30/5.86 | Involucrada en la regulació redox de la cèl·lula |

Resultats

| Nom del punt | | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|---|-----|---|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| PRDX6 | 96 | Peroxiredoxina 6 | P30041 | 6.41e+005 | 12/43 (27%) | 63% (142/224 AA's) | 27.4/7.10 | 25/6.00 | Involucrada en la regulació redox de la cèl·lula i la regulació del bescanvi fosfolipídic; també en la protecció contra el dany oxidatiu |
| | 64 | | | 3.65e+004 | 9/91 (9%) | 45% (103/224 AA's) | 27.1/6.47 | 25/6.00 | |
| Interacció espermatozoide-ou i reconeixement cel·lular | | | | | | | | | |
| HLAA | 89 | Precursor de l'antigen HLA classe I A-31, cadena alfa | P16189 | 2.32e+003 | 6/89 (6%) | 21% (80/365 AA's) | 37.5/5.43 | 41/6.02 | Involucrat en la presentació d'antígens foranis al sistema immune |
| ACRV1i | 99 | Proteïna 1 de la vesícula acrosomal, isoforma i | P26436 | 1.03e+003 | 5/60 (6%) | 37% (56/150 AA's) | 18.5/5.62 | 16/6.79 | Pot estar involucrada en la unió de l'espermatozoide a la zona pel·lúcida, o en la penetració |
| ACRV1j | 99 | Proteïna 1 de la vesícula acrosomal, isoforma j | P26436 | 1.23e+003 | 5/60 (8%) | 46% (56/121 AA's) | 18.5/5.62 | 13/8.58 | El mateix de dalt |
| CRISP2 | 96 | Proteïna 2 secretora rica en cisteïnes | P16562 | 6.17e+004 | 5/91 (5%) | 29% (71/243 AA's) | 27.1/6.47 | 27/6.09 | Proteïna intra-acrosomal en espermatozoides frescos; important per a la interacció espermatozoide-oòcit |
| ROPN1 | 25 | Roporina, proteïna d'unió a AKAP | Q9HAT0 | 1.42e+006 | 9/79 (11%) | 54% (116/212 AA's) | 19.9/5.58 | 24/5.52 | Activitat porina; involucrada en la fusió de l'espermatozoide a la membrana plasmàtica de l'ou, la reacció de l'acrosoma i altres vies |
| SPACA1 | 103 | Proteïna associada a l'acrosoma de l'espermatozoide 1 | Q9HBV2 | 1.17e+003 | 5/110 (4%) | 18% (55/294 AA's) | 17.5/5.66 | 32/4.57 | Involucrada en la interacció espermatozoide-ou |
| SPACA3 | 104 | Proteïna associada a l'acrosoma de l'espermatozoide 3 | Q8IXA5 | 1.81e+003 | 417 (23%) | 24% (52/215 AA's) | 14.4/5.45 | 23/8.26 | Involucrada en la interacció espermatozoide-ou |
| Funció desconeguda | | | | | | | | | |
| C21orf33 | 105 | Precursor de l'homòleg mitocondrial de ES1 | P30042 | 5.52e+004 | 5/120 (4%) | 41% (111/268 AA's) | 27.2/7.70 | 28/8.50 | Desconeguda |
| HSPC142 | 106 | Proteïna HSPC142 | CAG38557 | 2.12e+003 | 7/108 (6%) | 23% (85/367 AA's) | 14.8/6.72 | Desconeguda | Desconeguda |
| LOC 465613 | 107 | Similar a dJ54B20.3 | XP_521044 | 5.55e+002 | 4/104 (3%) | 30% (49/159 AA's) | 14.0/6.60 | 18/5.94 | Desconeguda |
| | 108 | | | 3.8e+003 | 5/84 (5%) | 33% (53/159 AA's) | 13.6/6.42 | 18/5.94 | |
| TAGLN2 | 109 | Transgelina-2 | P37802 | 1.82e+003 | 7/76 (9%) | 37% (74/199 AA's) | 15.0/6.92 | 22/8.41 | Un dels marcadors primerencs de la diferenciació del múscul llis, de funció desconeguda |
| SE57-1 | 56 | CTCL tumor antigen se57-1 | NP_079490 | 207 | 6/29 (20%) | 16% (56/335 AA's) | 10.3/6.35 | 39/8.78 | Desconeguda |
| SPANXA1 | 111 | Proteïna de l'espermatozoide associada al nucli i al cromosoma X (SPANX) A1 | Q9NS26 | 81.7 | 3/21 (14%) | 32% (52/162 AA's) | 18.8/5.41 | 18/4.97 | Desconeguda |
| SPANXA2 | 112 | SPANX A2 | Q5JWI0 | 133 | 4/47 (8%) | 53% (52/97 AA's) | 18.8/5.41 | 11/5.04 | Desconeguda |

| Nom del punt | Nº punt | Nom de la proteïna | Nombre d'encès | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|--------------|---------|--------------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------------------|------------------|---------------|-------------|
| SPANXB2 | 113 | SPANX B2 | NP_663697 | 1.42e+003 | 5/71 (7%) | 50% (52/103 AA's) | 20.8/5.88 | 12/5.92 | Desconeguda |
| | 114 | | | 1.42e+003 | 4/30 (13%) | 42% (44/103 AA's) | 18.5/6.27 | 12/5.92 | |
| SPANXC | 115 | SPANX C. | Q9NY87 | 133 | 3/21 (14%) | 24% (24/97 AA's) | 18.8/5.45 | 11/5.07 | Desconeguda |
| SPANXD | 114 | SPANX D | Q9BXN6 | 133 | 3/30 (10%) | 24% (24/97 AA's) | 19.0/6.19 | 11/5.87 | Desconeguda |
| SPANXE | 114 | SPANX E | Q8TAD1 | 134 | 3/30 (10%) | 24% (24/97 AA's) | 19.0/6.19 | 11/5.22 | Desconeguda |

4.3.- Determinació de les proteïnes presents en menor o major abundància en mostres de semen de pacients mitjançant l'anàlisi de mostres independents i tinció argèntica.

Una vegada identificades tota una sèrie de proteïnes (98 proteïnes en gels bidimensionals) en mostres de semen de controls, es va procedir al seu anàlisi estadístic mitjançant un test U de Mann-Whitney. En concret, es va realitzar la comparació entre pacients astenozoospermics i donants de semen i la comparació entre pacients normozoospermics i donants de semen de fertilitat provada.

4.3.1.- Astenozoospermics en comparació amb donants de semen.

El primer anàlisi es va realitzar tenint en compte només els pacients astenozoospermics i els donants de semen normozoospermics. Així, els resultats obtinguts es podran explicar des de la perspectiva pacients i no pacients, i obtenir dades que permetin explicar millor l'astenozoospermia.

Es van incloure a l'anàlisi 101 proteïnes prèviament identificades, utilitzant dades conjuntes del laboratori (Martínez-Heredia et al., 2006; de Mateo et al., 2007). L'anàlisi d'aquestes 101 proteïnes es va realitzar amb el software PDQuest (Bio-Rad). Gràcies a aquest software, es va obtenir un valor numèric per a cada punt (corresponent al nivell d'expressió d'aquella proteïna dins d'un pacient concret). La comparació dels nivells d'expressió de proteïnes entre els pacients astenozoospermics i el grup control va resultar en la detecció de disset proteïnes amb expressió diferencial (Taula 4.5 i Fig 4.11).

De les disset, set proteïnes es van detectar en menor abundància a astenozoospermics comparats amb les mostres controls (Taula 4.5). Aquestes proteïnes són la β -actina (ACTB), l'anexina A5 (ANXA5), la subunitat 6B del citocrom c oxidasa (COX6B), l'histona H2A (H2A), la proteïna induïble per prolactina (PIP) i el seu precursor (PIPpre), i la proteïna d'unió a calci S100A9 (dos punts).

| Nom del punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés de la proteïna | Expressió en les mostres de pacients | Expressió mitja de la proteïna | | P (Mann-Whitney) | Funció |
|------------------------|---|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------|------------------|---|
| | | | | Control | Asteno | | |
| ACTB | Actina citoesquelètica | P60709 | ↓ | 23074 | 14063 | < 0,01 | Motilitat cel·lular, estructura i integritat |
| ANXA5 | Anexina A5 | P08758 | ↓ | 9318 | 6456 | < 0,05 | Fusió de membrana i exocitosi. Via de senyalització cel·lular |
| COX6B | Citocrom c oxidasa, subunitat 6B | Q7L1R4 | ↓ | 2681 | 1703 | < 0,05 | Transport d'electrons |
| H2A | Histona H2A | Q93077 | ↓ | 13842 | 5751 | < 0,05 | Forma part del nucleosoma |
| PIP | Proteïna induïda per prolactina | P12273 | ↓ | 27352 | 8894 | < 0,001 | Involucrada en algun tipus de funció d'unió a actina, però no es té clar encara |
| PIPpre | Precursor de la proteïna induïda per prolactina | P12273 | ↓ | 87770 | 53574 | < 0,05 | Precursor de PIP (mirar a dalt) |
| S100A9 (spots 1 and 2) | Proteïna d'unió a calci S100 A9 | P06702 | ↓ ↓ | 3947 4582 | 2051 1077 | < 0,05 < 0,05 | Regula la migració de fagòcits gràcies a la modulació de la polimerització de tubulina |
| CLUpre | Precursor de clusterina | P10909 | ↑ | 11743 | 23843 | < 0,05 | No es té clara. Associada amb la mort cel·lular programada (apoptosis) i la fertilitat |
| DLDpre | Precursor de la dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD) | P09622 | ↑ | 7555 | 13679 | < 0,01 | DLD és un component de les piruvat i alfa-cetoglutarat deshidrogenases mitocondrials |
| FHpre | Precursor de la fumarat hidratasa | P07954 | ↑ | 8599 | 14971 | < 0,05 | Component enzimàtic del cicle dels àcids tricarbòxics (TCA) |
| HSPA2 | Proteïna 2 relacionada amb el shock per calor de 70KDa | P54652 | ↑ | 2909 | 7114 | < 0,001 | Involucrada en el desenvolupament d'espermàtides i en la meiosi masculina |
| IMPA1 | Inositol-1(o 4)-monofosfatasa | P29218 | ↑ | 3196 | 6756 | < 0,01 | Enzim clau de la via de senyalització del fosfatidil inositol |
| MPST/ECH1pre | 3-mercapto-piruvat sulfurtransferasa / Precursor de delta 3,5-delta 2,4-dienoil-CoA isomerasa | P25325 /Q13011 | ↑ | 2076 | 8581 | < 0,001 | MPST es troba involucrat en la resposta a toxines / ECH1 es troba involucrat en la beta-oxidació dels àcids grassos |
| PSMB3 | Subunitat beta 3 del proteosoma | P49720 | ↑ | 10399 | 14714 | < 0,05 | Subunitat del proteosoma amb un potencial efecte regulador |
| SEMG1pre | Precursor de la semenogelina I | P04279 | ↑ | 3079 | 5220 | < 0,05 | Proteïna predominant en el semen involucrada en la formació de la matriu |
| TEX12 | Proteïna de la seqüència expressada a testicles 12 | Q9BXU0 | ↑ | 6968 | 13370 | < 0,001 | Sembla ser part del complex sinaptonèmic |

Taula 4.5 Proteïnes detectades en menor o major abundància en els espermatozoides de pacients astenozoospermics i donants de semen.

Vuit de les proteïnes es van detectar amb uns nivells d'expressió augmentats a les mostres astenozoospermiques comparats amb els donants (Taula 4.5). Aquestes proteïnes són el precursor de clusterina (CLUpre), el precursor de la dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLDpre), el precursor de la fumarat hidratasa (FHpre), la proteïna “heat shock” HSPA2 (HSPA2), l'inositol-1 monofosfatasa (IMPA1), la subunitat b3 del proteasoma (PSMB3), el precursor de la semenogelina 1 (SEMG1pre), i la seqüència expressada a testicles 12 (TEX12). Finalment, un punt individual corresponent a dos proteïnes diferents (3-mercapto-piruvat sulfurtransferasa / precursor de la isomerasa dienoyl-CoA, MPST / ECH1pre) es va detectar també com augmentat a les mostres astenozoospermiques respecte als controls de donants de semen (Taula 4.5).

La distribució d'aquestes disset proteïnes, així com de la resta de proteïnes analitzades es mostra a la Fig 4.11.

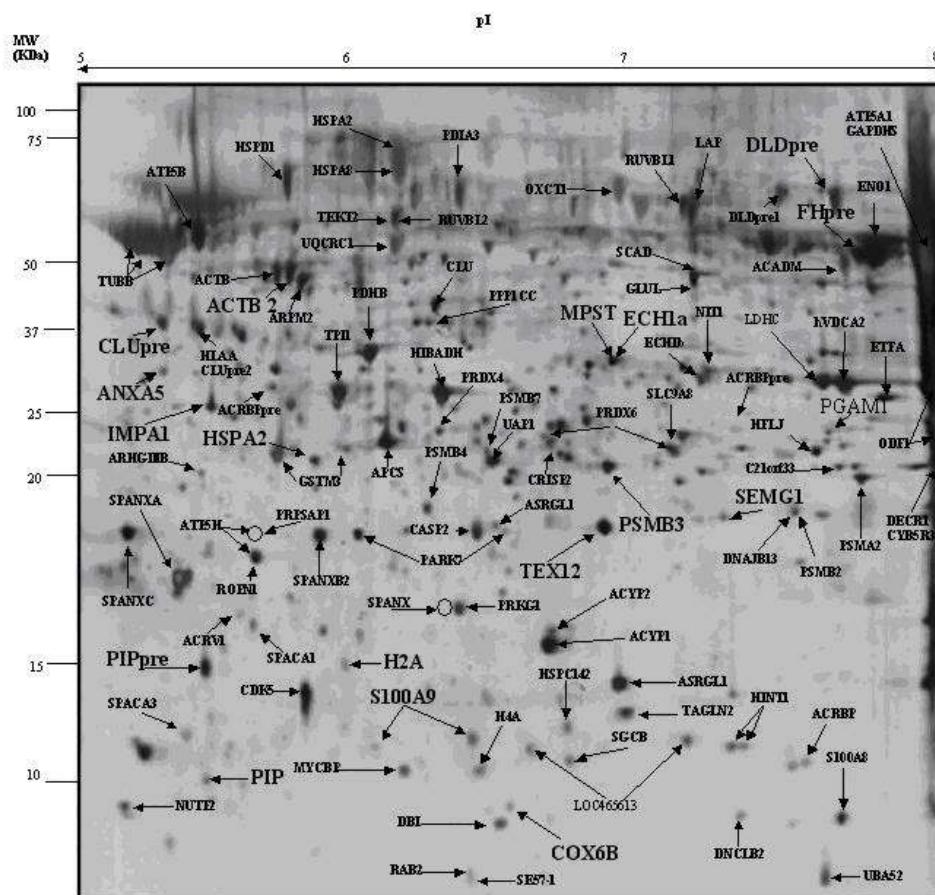


Fig 4.11 Mapa proteic on es mostren, en un tamany superior i en negreta, les proteïnes amb una expressió diferencial entre pacients astenozoospermics i donants de semen.

Totes aquestes proteïnes, amb l'excepció de la semenogelina i la clusterina, és la primera vegada que es descriuen com a presents en menor o major abundància en les

mostres astenozoospèrmiques. La semenogelina ha estat recentment descrita com a augmentada en mostres astenozoospèrmiques, en concordança amb les nostres dades (Zhao et al., 2007). Els nostres resultats proteòmics i immunocitoquímics (Fig 4.12) ens indiquen, també, que el precursor de la clusterina es troba augmentat en mostres astenozoospèrmiques. Això ja s'havia descrit a la bibliografia utilitzant mètodes convencionals (O'Bryan et al., 1990; Ibrahim et al., 2000).

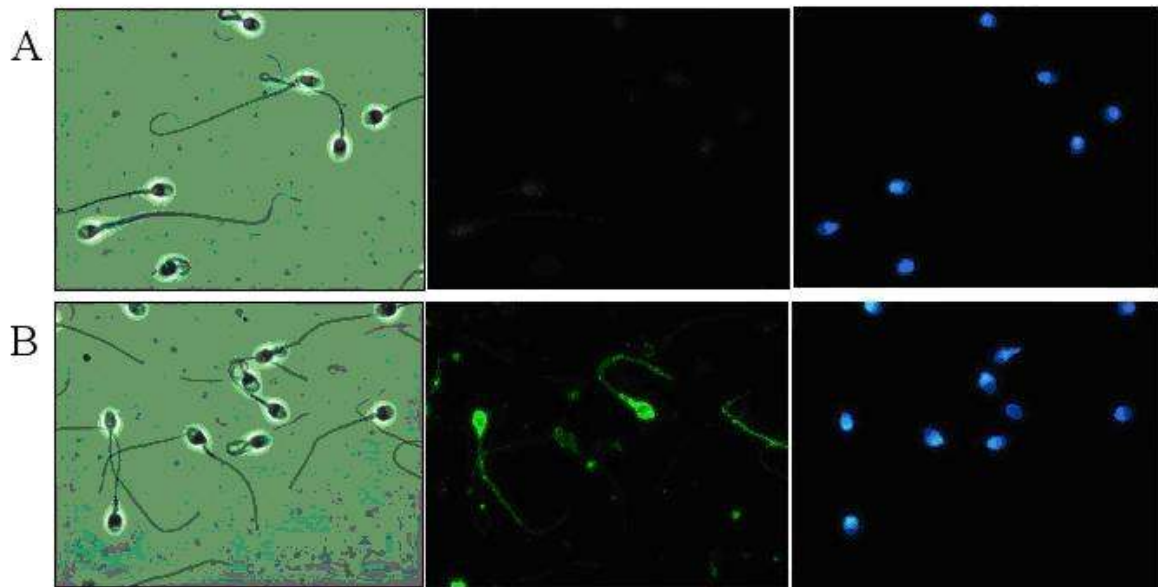


Fig 4.12 Alguns exemples de CPS (*Clusterin Positive Spermatozoa*). A la esquerra, imatges de contrast de fase; a la dreta, imatges de fluorescència amb DAPI; al mig, imatges de fluorescència amb l'anticòs anticclusterina. **A:** 100x d'augment, mostrant un control normozoospermic. **B:** 100x d'augment, mostrant un pacient astenozoospermic. Al control, gairebé no es té senyal per a la clusterina, mentre que a la mostra astenozoospermica es veuen clarament dos espermatozoides positius per a la clusterina. *Imatges realitzades per Sara de Mateo.*

4.3.2.- Normozoospèrmics en comparació amb donants de semen de fertilitat provada.

El següent anàlisi realitzat va ser la comparació del patró proteic de pacients normozoospèrmics (és a dir, amb tots els paràmetres seminals normals però amb una incapacitat per a generar descendència) i donants de semen de fertilitat provada (amb, com a mínim, un embaràs amb èxit cadascú). L'objectiu, en aquest cas, era obtenir informació sobre les proteïnes relacionades amb la fertilitat. Es va comparar sis pacients normozoospèrmics amb una infertilitat d'etiologia desconeguda i cinc donants de fertilitat provada. La prova estadística realitzada va ser, novament, una prova U de Mann-Whitney.

Utilitzant aquesta prova, s'han trobat dos proteïnes amb una abundància relativa alterada comparant aquests dos grups ($p < 0.01$) (Taula 4.6). Aquestes dos proteïnes són la proteïna regulada per glucosa de 58 kDa (PDIA3) i la proteïna de la seqüència expressada a testicles 12 (TEX12). Totes dues es troben sobreexpressades a pacients versus controls.

| Nom del punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés de la proteïna | Expressió en les mostres de pacients | Expressió mitja de la proteïna | | P (Mann-Whitney) | Funció |
|--------------|--|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------|------------------|--|
| | | | | Control | Normo | | |
| PDIA3 | Proteïna regulada per glucosa de 58 kDa | P30101 | ↑ | 15638 | 24583 | $p > 0.01$ | Catalitza el reajustament dels ponts -S-S- en les proteïnes. Forma part de la via de transducció de senyal |
| TEX12 | Proteïna de la seqüència expressada a testicles 12 | Q9BXU0 | ↑ | 6792 | 17942 | $p > 0.01$ | Sembla ser part del complex sinaptonèmic |

Taula 4.6 Proteïnes amb una expressió diferencial entre astenozoospèrmics i donants.

A la Fig 4.13 es pot veure la localització espacial d'aquestes dos proteïnes, a més de la resta de proteïnes estudiades dintre d'aquest anàlisi.

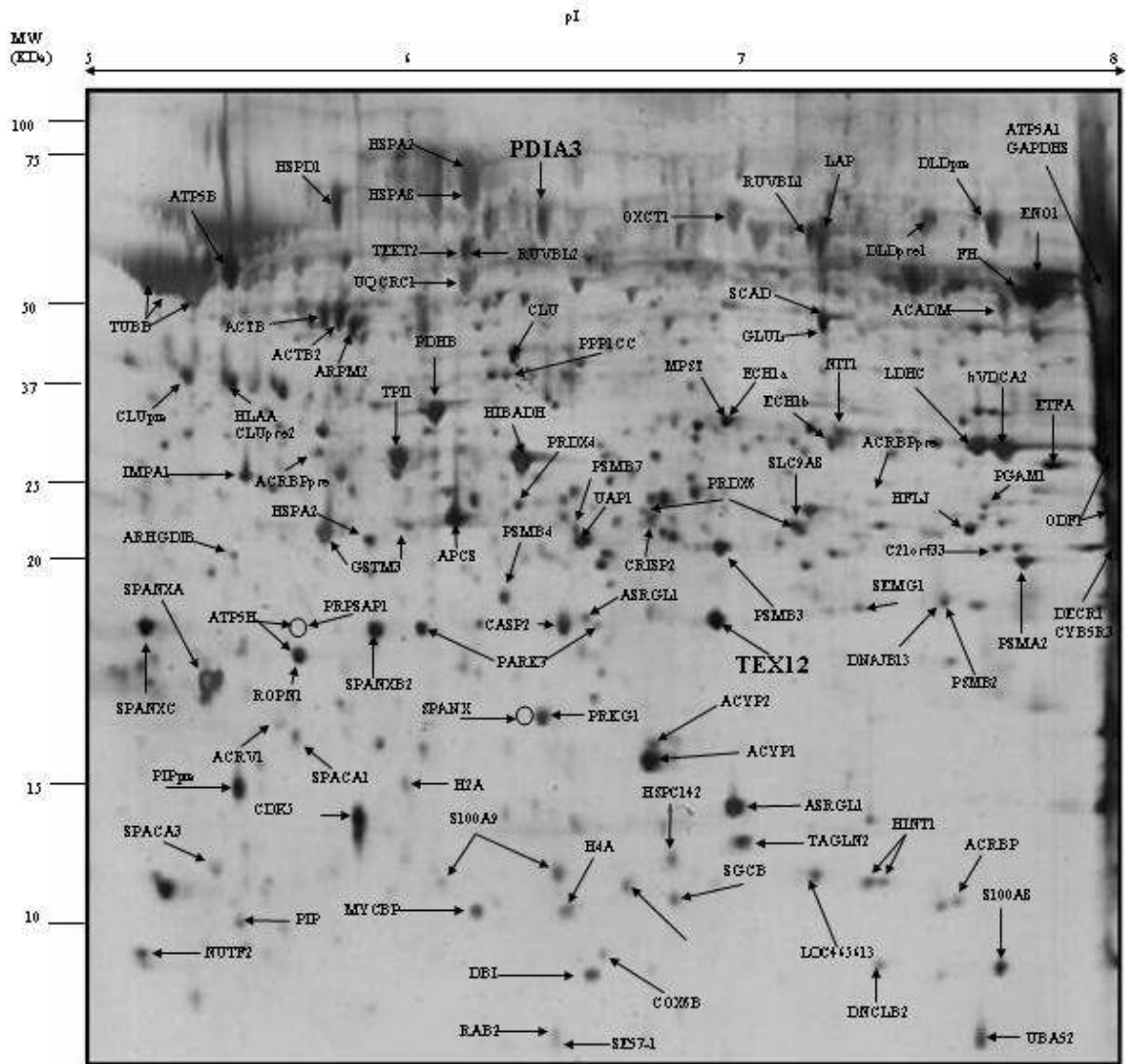


Fig 4.13 Mapa proteic on es mostren, en un tamany superior i en negreta, les proteïnes amb una expressió diferencial entre pacients normozoospermics i donants de semen.

4.4.- Estudi de la capacitat predictiva del patró d'expressió de les proteïnes quantitativament diferents mitjançant l'agrupació en "clusters".

Una vegada es tenia la comparació feta, es va voler realitzar una agrupació no supervisada de les dades (*clustering*), per tal de veure si les proteïnes trobades com augmentades o disminuïdes entre grups de mostres ens els agrupaven bé. Es van utilitzar els valors d'expressió obtinguts del PDQuest. El resultat del "cluster" per a la comparació "astenos-controls" es pot veure a la Fig 4.14, i ens mostra als donants de semen (controls) agrupats tots en la mateixa branca de l'arbre, separats dels pacients astenozoospèrmics. A més, la distribució de les mostres en dos branques no és a l'atzar ($p < 0.0000001$; χ^2). És interessant, a més, el fet que en la branca dels pacients astenozoospèrmics es poden observar diferents subgrups d'agrupació (sub-"clusters" 2a, 2b, 2c i 2d). Aquests sub-"clusters" potser ens estan indicant diferents causes d'astenozoospèrmia, al igual que "clusters" d'expressió de DNA han permet diferenciar entre diferents subgrups de càncer.

Per a l'anàlisi de pacients normozoospèrmics en comparació amb donant de semen fèrtils no s'ha fet una agrupació en arbre, ja que només dos proteïnes han sortit com a significatives en fer l'estudi estadístic. Així, un arbre d'aquest tipus no ens permetria extreure informació addicional.

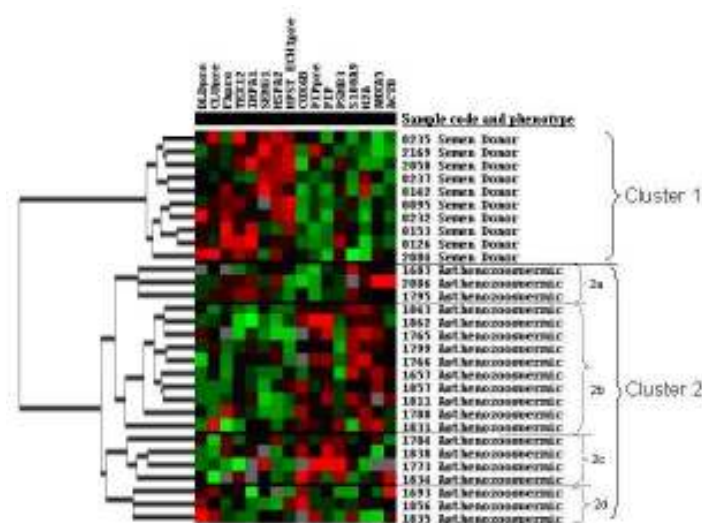


Fig 4.14 "Clustering" utilitzant les dades d'expressió de les proteïnes amb expressió diferencial. El color verd indica valors superiors al valor normal., el vermell, inferiors. El negre indica que no hi ha canvis, i el gris que no es tenen dades per a aquell valor en particular.

4.5.- Posada en marxa del sistema d'anàlisi DIGE en espermatozoides humans.

A més de posar en marxa la tinció argèntica, s'ha treballat també en la posta a punt del sistema d'electroforesi DIGE, utilitzant mostres de pacients astenozoospèrmics i normozoospèrmics. Els resultats de la prova pilot, on s'ha treballat només amb dos mostres, es pot veure a la Fig 4.15. Totes dues mostres eren representatives de la població, i s'han marcat segons s'ha descrit prèviament. La mostra normozoospèrmica s'ha marcat amb Cy3 (verd) i la mostra astenozoospèrmica s'ha marcat amb Cy5 (vermell). Una barreja de totes dues a parts iguals s'ha marcat amb Cy2 (blau) i s'ha utilitzat com a control intern. Els resultats s'observen a la Fig 4.15.

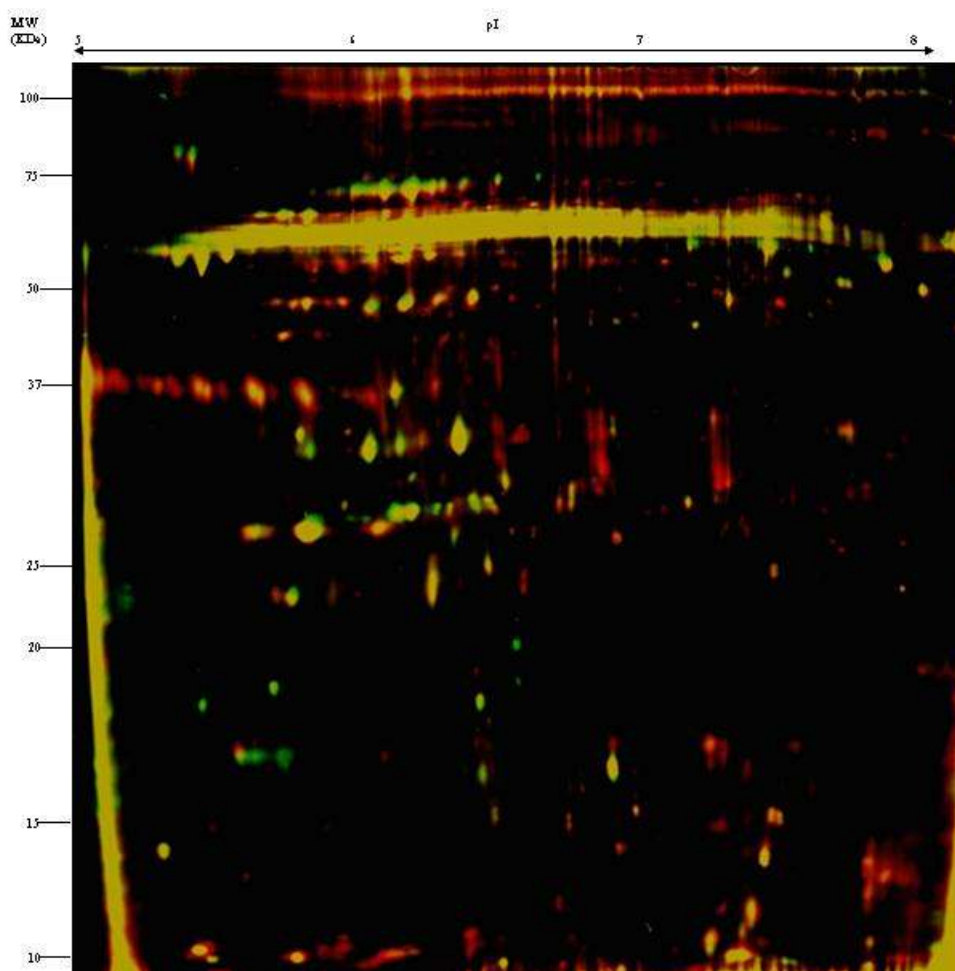


Fig 4.15 Imatge DIGE on s'observen, en vermell, les proteïnes sobreexpressades a astenozoospèrmics i en verd, les proteïnes sobreexpressades a normozoospèrmics.

Encoratjats pels resultats d'aquesta prova pilot, es va realitzar un gel DIGE per tal de comparar un pacient astenozoospèrmic amb un donant de semen. La mostra astenozoospèrmica tenia les següents característiques: contatge: 81.6 M/ml; motilitat +++ 9.4, motilitat ++ 23.6, motilitat + 2.8. La mostra del donant de semen (de fertilitat provada, amb 6 embarassos demostrats) tenia un contatge de 83.4 M/ml, una motilitat +++ de 43.7 i una motilitat conjunta de ++ i + de 51.3. La mostra del donant s'ha marcat amb Cy5 (vermell) i la mostra astenozoospèrmica s'ha marcat amb Cy3 (verd). Una barreja de totes dues a parts iguals s'ha marcat amb Cy2 (blau) i s'ha utilitzat com a control intern. El resultat es pot veure a la Fig 4.16. Com era d'esperar, el patró és fàcilment comparable amb el patró obtingut amb mostres tenyides amb plata (Fig 4.10).

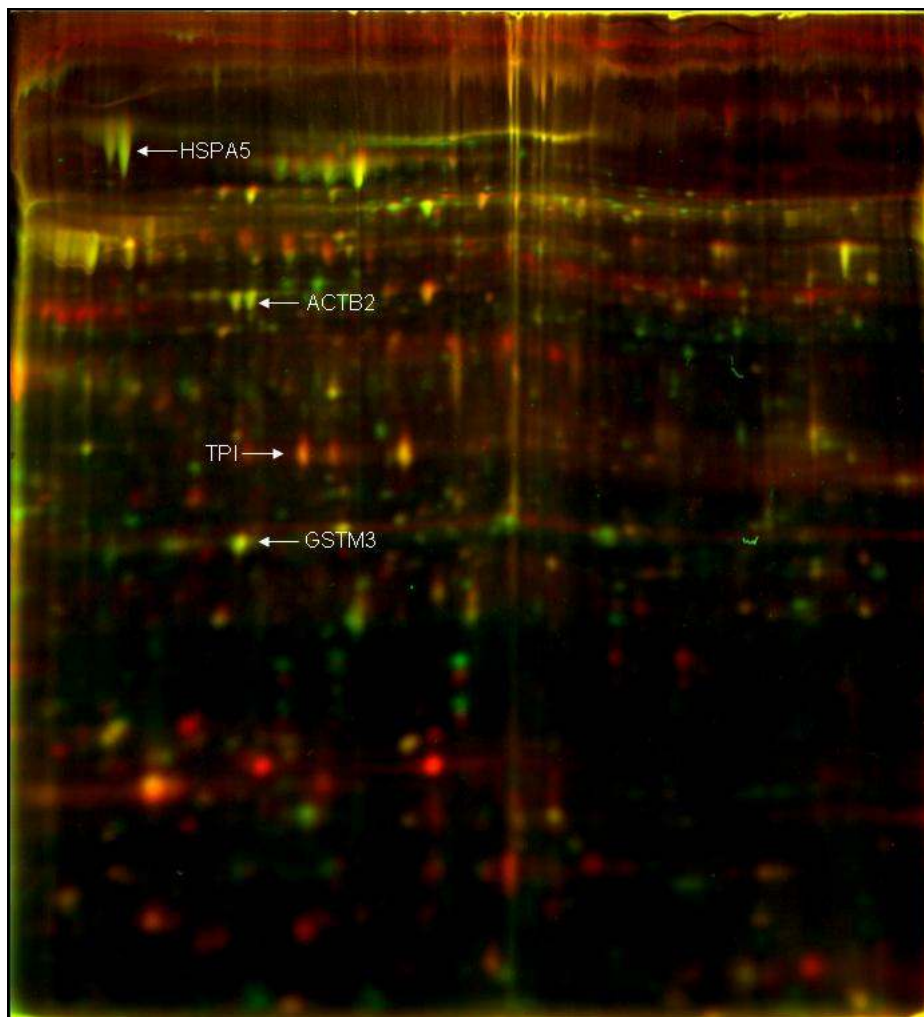


Fig 4.16 Gel DIGE on es comparen un pacient astenozoospèrmic amb un donant de semen de fertilitat provada. En vermell, els punts reprimits al pacient; en verd, els punts sobreexpressats.

Per tal de comprovar la correspondència entre el patró proteic descrit prèviament (Martínez-Heredia et al., 2006) i el patró proteic assolit amb la tinció DIGE, es van retallar 4 punts escollits per ser fàcilment identificables. Els resultats es veuen a la Taula 4.7 i a la Fig 4.16. La identificació d'aquestes proteïnes coincideix amb la realitzada prèviament en mostres independents amb la tinció argèntica.

| Nom del punt | Nom de la proteïna | Nombre d'accés | Puntuació MOWSE | Pèptids coincidents(%) | % Proteïna coberta | PM/pI determinat | PM/pI esperat | Funció |
|--------------|--|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| HSPA5 | Precursor de la proteïna regulada per glucosa de 78 kDa (GRP 78) | P11021 | 9.3e+009 | 25/86 (29%) | 42% (275/654 AA's) | 71.6/5.46 | 72/5.07 | Facilita l'assemblatge de complexos proteïcs multimèrics dins del RE |
| ACTB | Actina del citoesquelet | P60709 | 4.3e+004 | 9/37 (24%) | 27% (102/375 AA's) | 47.4/5.65 | 42/5.29 | Involucrades en motilitat cel·lular, estructura i integritat |
| TPI1 | Trioses fosfat isomerasa 1 | CAG46503 | 1.11e+005 | 11/75 (14%) | 41% (103/249 AA's) | 31.3/5.95 | 27/6.45 | Juga un important paper en algunes vies metabòliques (inclosa la glicòlisis) |
| GSTM3 | Glutatió S-transferasa Mu 3 | P21266 | 1.75e+005 | 11/44 (25%) | 46% (105/225 AA's) | 26.8/5.97 | 26/5.37 | Pertany a la classe <i>mu</i> d'enzimes involucrades en la detoxificació de carcinògens, drogues, toxines i productes de l'estrés oxidatiu |

Taula 4.7 Proteïnes d'espermatozoide humà identificades per MS en el gel DIGE.