



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE VETERINARIE  
CICLO XXIV**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**STUDIO DEL PROTEOMA DEL SEME CONGELATO EQUINO  
MEDIANTE ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE**

**VET/10**

**DOTT.SSA BONACCINI PAMELA**

**TUTOR**

**PROF. STEFANO ROMAGNOLI**

**COORDINATORE DELLA SCUOLA DI DOTTORATO**

**PROF. MASSIMO MORGANTE**

**ANNO ACCADEMICO 2011/2012**

## **COLLABORAZIONI**

Rivolgo i miei più sentiti ringraziamenti al Prof. Luigi Bonizzi e alla Dott.ssa Paola Roncada per avermi accolto nel loro laboratorio di Proteomica presso l'Università degli studi di Milano, dandomi la possibilità di svolgere questa tesi, e al Prof. Stefano Romagnoli per essere stato il mio docente guida e per la collaborazione che ci lega da oltre 6 anni.

Un ringraziamento speciale va senz'altro al Prof. Massimo Morgante, per l'amicizia e la saggezza che mi ha sempre mostrato, al Prof. Pietro Celi dell'Università di Sidney per il legame epistolare, e a tutto lo staff del Dipartimento Di Scienze Sperimentali Veterinarie (SperiVet) dell'Università di Padova, per avermi accolto naufraga, e come in famiglia, per quasi due anni.

Si ringrazia inoltre la Dott.ssa Maria Elena Falomo e il Centro Di Incremento Ippico di Vigonza (PD) per i campioni di seme che mi sono stati forniti per le analisi.

Grazie a queste collaborazioni è stato possibile partecipare al Simposio della SivasZoo a Udine (giugno 2009), al Covegno sulla qualità alimentare ad Alghero, SS, (9-11 dicembre 2011), come speaker al Congresso Sisvet di Tropea VB (7-9 settembre 2011), partecipare al poster per il Congresso della società italiana di Proteomica (ITPA) a Torino (27 giugno 2011), e al Corso Teorico-Pratico Avanzato Biorad di Pcr Real Time, presso la sede Biorad di Segrate, MI, (ottobre 2011). Inoltre il lavoro è stato inoltrato alla revisione da parte del comitato scientifico del Congresso Mondiale ICAR, nella sezione andrologia, che si terrà a Vancouver (Canada) i prossimi 29-31 luglio 2012.

## **RINGRAZIAMENTI**

Le cose belle di questi tre anni vengono solo da persone belle: Milena e Ilaria, le sorelle che avrei voluto avere, le notti di sfogo con Elisa, la gatta Gaia gitana come me e Duchessa, paziente dato per spacciato, a ricordarmi che sarò sempre un clinico onesto e tenace. E ancora Tommaso e Giovanni, Tiziana e Maristella, Samuele, le passeggiate liberatorie con Max, i rientri in piena notte dal call center con Ivan mai retribuiti, l'appuntamento fisso in mensa, la macchinetta del caffè, il cestino della carta, e anche il mio sgabello a SperiVet, che altrimenti non avrei avuto un posto a sedere.

A riguardare indietro trovo sorrisi, e abbracci, e addii che sono arrivederci, e non vedo finalmente più manipolatori di sentimenti, abusi e giochi di potere, lavaggi del cervello, debiti, case fredde, corsie d'ospedale cercate o involontarie, domeniche desolanti e desolate. Perdonati, dimenticati, pagati con contrappassi infernali.

L'ultimo plauso va a me, dunque, che pur non andando più avanti e odiando me e le mie scelte, nel profondo, amo quello che ho fatto, o almeno quello che avrei voluto fare.

Resterà un sogno, ma almeno l'ho vissuto, contro ogni pronostico, con coraggio, onestà, umiltà, e senza mai rinnegare chi sono. Io, nessuno, centomila. Quella che scrive, tanto, perché ha tanto da raccontare.

## **INDICE**

<b>1 – INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>1.1 – Andrologia equina: stato dell’arte</b>	<b>4</b>
<b>1.2 – L’era post-genomica</b>	<b>6</b>
<b>1.3 – la Proteomica</b>	<b>7</b>
<b>1.4 – La proteomica applicata allo studio del seme</b>	<b>8</b>
<b>1.5 – Metodologie in proteomica</b>	<b>11</b>
1.5.1. – Preparazione del campione	12
1.5.2 – Elettroforesi bidimensionale	13
1.5.2.1 - Prima dimensione – Isoelettrofocalizzazione	14
1.5.2.2 – Equilibratura delle strisce	17
1.5.2.3. - Seconda dimensione – SDS-PAGE	18
1.5.2.4 – Colorazione del gel	18
1.5.3 – Analisi d’immagine	20
1.5.4 – Database di mappe bidimensionali	20
1.5.5 – Spettrometria di massa	21
<b>2 – SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>23</b>
<b>3 – MATERIALI E METODI</b>	<b>25</b>
3.1 – Caratteristiche dei campioni	25
3.2 – Estrazione delle proteine	25
3.3 – Quantificazione delle proteine	26
3.4 – Elettroforesi monodimensionale	26
3.5 – Elettroforesi bidimensionale	27
<b>4 – RISULTATI</b>	<b>30</b>
4.1 – Prova per stabilire il numero minimo di paillette/analisi	31
4.2 – Prova per stabilire il numero minimo di lavaggi utili a purificare il campione dall’extender	32

4.3 –Analisi comparativa mediante 2D SDS-PAGE di seme congelato di stalloni con parametri seminali diversi post-scongelo	34
<b>5 – DISCUSSIONE</b>	<b>35</b>
5.1 – Differenze nell’espressione proteica tra individui con parametri seminali diversi	37
5.2 – Problematice nell’utilizzo di seme congelato	38
5.3 – Proteine del plasma seminale e ROS	39
<b>6 – CONCLUSIONI</b>	<b>48</b>
<b>7 - BIBLIOGRAFIA</b>	<b>52</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Andrologia equina: stato dell'arte**

Con il miglioramento delle biotecnologie inerenti l'inseminazione artificiale (IA), la conservazione e il trasporto del materiale seminale, il potenziale riproduttivo maschile ha assunto un'importanza spiccata in termini zootecnici e commerciali. Mentre molti studi e progressi sono stati attuati nel management delle fattrici, pochi sono i dati a disposizione in letteratura riguardanti il miglioramento dell'efficienza riproduttiva maschile. Nel cavallo la selezione degli stalloni impiegati come riproduttori è basata soprattutto sulla valutazione delle performance sportive e delle caratteristiche morfofunzionali dell'animale. Attualmente il valore riproduttivo di uno stallone è stimato essenzialmente sulla base di parametri seminali classici (concentrazione, motilità progressiva e totale, morfologia, numero totale di spermatozoi), benché sia ormai noto che tale valore è il risultato di complesse interazioni di tipo genetico, ambientale e biologico. Nonostante sia riscontrabile una correlazione positiva tra tali parametri e il tasso di concepimento, in realtà non sempre con l'IA si ottiene la fertilizzazione, pur in presenza di fattrici di comprovata fertilità. Il valore riproduttivo degli stalloni non è al momento quantificabile, diversamente da quanto accade nel bovino, mediante l'assegnazione di un Indice Genetico Quantitativo basato su test di progenie, e i dati sull'Indice di Fertilizzazione (percentuale di concepimento per ciclo ovarico) sono sporadici e non sempre attendibili, soprattutto in seguito all'utilizzo di seme congelato. È noto infatti che la crioconservazione attiva reazioni ossidative e riduce il tempo di sopravvivenza degli spermatozoi post-scongelo, il che implica tra l'altro un più attento monitoraggio della maturazione follicolare della fattrice. Alcuni studi e prove empiriche suggeriscono inoltre che anche le alte performance lavorative possono essere correlate negativamente con la fertilità.

Rispetto alla specie bovina la qualità del seme congelato equino è molto inferiore, il che ne limita fortemente la commerciabilità. Si stima che solo il 20-50% degli stalloni abbiano parametri seminali accettabili dopo lo scongelamento (Vidament et al, 1997). Molti protocolli di congelamento sono stati testati per migliorare la qualità del seme da impiegare nell'IA, ma forti variazioni intra e inter individuali non sono ancora state chiarite con le convenzionali analisi del seme (Salazar et al., 2011). L'ipofertilità nello stallone attualmente non è

facilmente identificabile se non mediante approccio a posteriori, il che implica ripercussioni sia di tipo temporale che commerciale sul miglioramento zootecnico equino.

Poiché l'obiettivo primario in andrologia veterinaria resta l'ottimizzazione delle produzioni e la riduzione dei costi, la messa in commercio di test rapidi e a larga scala per la valutazione del potenziale riproduttivo e della congelabilità del seme, potrebbero fornire un ottimo ausilio ai Centri di Incremento Ippico. Da qui l'esigenza della messa a punto di un pannello di biomarcatori predittivi della qualità del seme post scongelamento negli stalloni.

## **1.2 L'era post-genomica**

La genomica negli ultimi decenni ha chiarito molti importanti interrogativi biologici, rappresentando per anni la base della ricerca scientifica e dell'industria biotecnologica. Sequenziando il genoma, per la prima volta in biologia si è arrivati a capire la complessità di un organismo dal punto di vista del contenuto della sua informazione (Williams e Hochstrasser, 1997). Come spesso però accade nel mondo scientifico, una volta ottenuti i primi genomi completi è subito apparso evidente il limite dell'informazione che questi potevano fornire (Nowak, 1995). Questi limiti non sono dovuti a deficienze tecnologiche associate alla costruzione di mappe di DNA, ma piuttosto al limite di informazioni che si possono ricavare sulla regolazione molecolare e tutti i conseguenti processi che si svolgono all'interno della cellula. L'enorme mole di informazioni contenuta nel genoma fornisce un elenco di proteine che possono essere espresse da quel genoma in qualsiasi cellula che componga l'organismo studiato, ma non fornisce nessuna informazione sulle proteine che verranno effettivamente espresse o rese attive in un determinato momento o comparto cellulare. In secondo luogo, la conoscenza dell'esatta sequenza nucleotidica di un gene non consente comunque di predire il tipo cellulare in cui la proteina codificata verrà espressa, né indica in quale stadio dello sviluppo o del differenziamento, o ancora, in risposta a quale stimolo, questa espressione si potrà verificare. A questo va aggiunto che la conoscenza della sequenza nucleotidica di un gene non consente neanche di predire le eventuali modificazioni post-traduzionali alle quali il polipeptide potrà andare incontro dopo la sua sintesi. Anche un approccio basato solo sull'analisi dell' RNA messaggero non permette di ottenere indicazioni sulla presenza e sul livello di espressione di una proteina, in quanto non vi è una correlazione lineare fra tra quantità di mRNA e quantità di proteina (Gygi et al., 1999). Occorre quindi sottolineare che l'assioma dei biologi "un gene = una proteina" ormai è stato superato da una

realtà che è invece molto più complessa. In un organismo il genoma può essere visto come l'insieme delle regole che decidono come si legheranno insieme gli amminoacidi per formare le proteine, senza però fornire poi indicazioni predittive su espressione e modificazioni a cui tali proteine potranno andare incontro. Conseguentemente, la presenza di un gene nella molecola di DNA non indica se e quando verrà tradotto in un polipeptide, o in che quantità, così neppure la natura della sua competenza funzionale. Nella cellula il DNA rappresenta una "molecola della memoria" relativamente statica, che rimane pressoché tale durante tutta la vita dell'organismo. Le proteine rappresentano le "molecole di lavoro" e quindi il loro studio rappresenta il passo fondamentale per una comprensione realistica degli eventi biologici a livello molecolare. Attualmente la proteomica è una delle più fruttuose tecnologie di ricerca postgenomica, indispensabile per evidenziare il ruolo delle proteine espresse in un tessuto e le interazioni proteina-proteina per lo studio delle funzioni cellulari. Se la genomica da una parte può fornire ausilio nell'identificazione di modificazioni puntiformi di nucleotidi con effetti ripercuotibili sui caratteri fenotipici, la proteomica comparativa può mettere in luce alcune modificazioni post traduzionali del corredo proteico.

### **1.3 La proteomica**

Il termine proteoma fu introdotto da Wilkins et al. (1996) per identificare le proteine (prote-) espresse da un genoma (-oma). Per proteoma attualmente si intendono tutte le proteine espresse da un genoma, da un tessuto, o da un tipo cellulare, nella cascata di eventi regolatori che conducono dal gene alla proteina finita e attiva; il proteoma può dunque essere visto come il prodotto finale del genoma (Rabilloud, 1999), in un determinato momento della vita cellulare. Tale definizione evidenzia come tra il comparto proteico di un organismo, di un tessuto, o di un tipo cellulare, e il corredo genomico, vi sia uno stretto e complicato rapporto di espressione. Con il concetto di proteoma è stato introdotto per la prima volta anche il concetto del fattore "tempo". I complessi proteici alla base dei meccanismi biologici possono difatti subire molte variazioni (glicosilazioni, fosforilazioni, etc), legate anche a fattori temporali o temporanei, quali lo stato fisiologico o patologico, lo stato riproduttivo, l'accrescimento, la stagionalità.

Le tecnologie necessarie per un progetto di proteomica sono molte e più complicate di quelle utilizzate per il sequenziamento del DNA. Come prima cosa, l'alfabeto di base è maggiore, quattro nucleotidi per il DNA rispetto ai 20 amminoacidi (più tutti quelli modificati) per le

proteine. Si deve considerare inoltre che l'editing dell'mRNA porta a messaggeri modificati e di conseguenza a tipi differenti di polipeptidi. Anche le proteine stesse possono essere modificate dopo la loro sintesi, con tagli o aggiunte di vari gruppi come zuccheri, fosfati, solfati, metili, acetili, lipidi.

Sebbene il proteoma di una cellula in un dato momento rappresenti solo l'espressione di una parte del genoma, è molto complesso. Esistono infatti molti potenziali fattori di variabilità tra un gene ed il suo corrispondente prodotto attivo. Questi includono soppressioni, amplificazioni, splicing e modificazioni co- e post- traduzionali. Tutto ciò puntualizza l'importanza dello studio del proteoma come scienza vera e propria, che come tale dovrebbe essere considerata di pari importanza allo studio del genoma, e forse anche di più.

Avvalendosi di tecnologie avanzate come la spettrometria di massa (Mass Spectrometry, MS) è attualmente possibile determinare quali modificazioni post-traduzionali siano avvenute a carico delle proteine, informazioni finora scarsamente presenti in letteratura. E' doveroso ricordare come in molti campi della medicina umana l'approccio proteomico sia molto seguito, soprattutto in campo oncologico, neurologico, infettivo e farmacologico, sia a scopi prognostici che diagnostici. Sta inoltre diventando essenziale nello studio delle proteine immunogeniche e della qualità dei prodotti agro-alimentari.

Con il miglioramento delle tecnologie bioinformatiche e l'affinamento di programmi computerizzati sempre più maneggevoli e specifici, la proteomica ha dunque aperto una nuova era di immagazzinamento e decifrazione di meccanismi biologici finora poco esplorati.

## **1.4 La proteomica applicata allo studio del seme**

Gli spermatozoi sono cellule uniche, sotto molti aspetti. Sono responsabili della trasmissione del patrimonio genetico paterno all'oocita, e vanno incontro a molte modificazioni cellulari, funzionali e cromatiniche nel corso della spermatogenesi.

Gli spermatogoni si dividono e danno origine agli spermatociti primari, i quali dopo una complessa ricombinazione genica danno luogo a spermatidi aploidi. Gli spermatidi successivamente vanno incontro ad un processo di differenziazione chiamato spermiogenesi, durante la quale subiscono marcati rimodellamenti della cromatina e cellulari (Fig 1). I nucleosomi vengono disassemblati e gli istoni rimossi e rimpiazzati da protamine caricate positivamente, formando un complesso toroidale col Dna (Oliva et al., 2009). Nei mammiferi si ritiene che il 15% circa del Dna resti associato agli istoni. A livello cellulare gran parte del

citoplasma viene rimosso, e un ampio flagello e la vescicola acrosomiale vengono assemblati allo spermatozoo. Infine tali cellule vanno incontro alla maturazione, processo che attraverso il transito nell'epididimo comporta la compattazione della cromatina mediante ponti disolfidi tra le protamine, e l'acquisizione di svariate funzioni cellulari e di membrana (Baker et al., 2005). Nelle vie genitali femminili gli spermatozoi andranno infine incontro alla capacitazione, un processo culminante con l'iperattivazione spermatica. Prima che lo spermatozoo penetri l'oocita, avviene infine il segnale di riconoscimento tra le due cellule, e la reazione acrosomiale. Una volta penetrato, il pronucleo maschile dello spermatozoo va incontro ad un ulteriore rimodellamento cromatinico, durante il quale le nucleoprotamine vengono disassemblate e si forma una nuova struttura nucleosomale e cromatinica (Oliva et al., 2009).

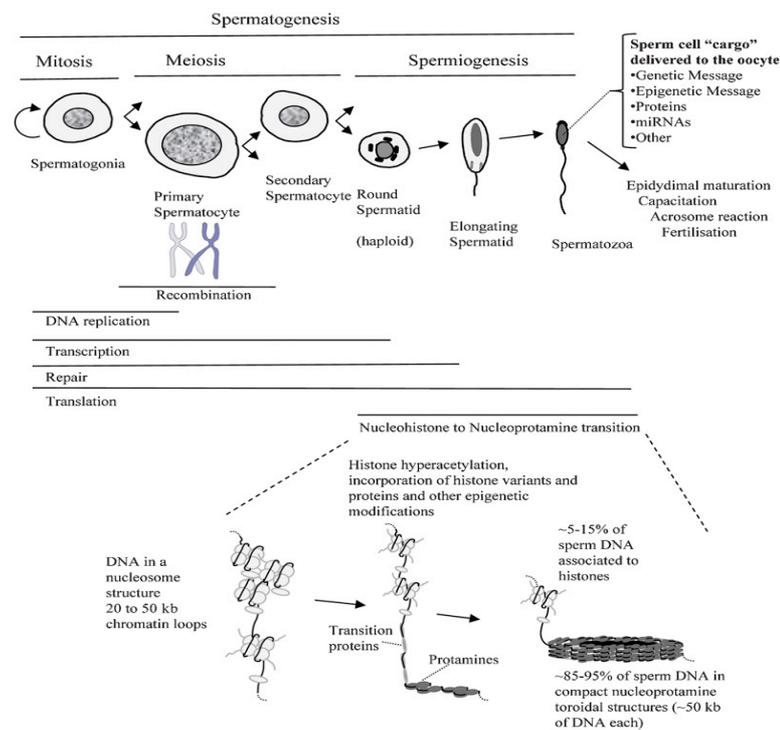


Fig 1 – Rappresentazione schematica delle principali modificazioni genetiche e cromatichiniche che si verificano nella spermatogenesi. La parte in alto rappresenta i cambiamenti cellulari che portano gli spermatogoni (sinistra) a divenire spermatozoi (destra). La parte in basso rappresenta i basilari cambiamenti cromatinici che avvengono di pari passo alla maturazione spermatica, e che implicano la transizione dei nucleostoni in nucleoprotamine e il successivo impacchettamento del Dna nella tipica struttura toroidale. La ritenzione degli istoni associati al Dna è molto variabile in base alle specie. ( da Oliva et al, 2009, modificato)

La facile reperibilità del materiale seminale e l'importanza biologica dei processi riproduttivi ha favorito in passato una fioritura di studi sulla composizione, sui meccanismi di differenziazione e le funzioni di tali cellule. Recenti avanzate tecnologie, quali quelle proteomiche, hanno portato all'identificazione e allo studio funzionale di svariate proteine, nozioni prima altrimenti inaccessibili.

Lo studio delle proteine contenute negli spermatozoi risale a molti anni prima dei primi studi di proteomica. Il pioniere in questo campo è ritenuto Friederich Miescher, che nel 1874 identificò nello sperma di salmone alcuni componenti proteici di basilare importanza, poi ribattezzate protamine, che apparivano accoppiate a quello che egli chiamò nucleine, e che in seguito è stato meglio conosciuto come Dna (Oliva et al, 2009).

Si è iniziato a parlare di proteomica dello sperma nel 1997, e da allora diversi studi sono stati condotti al fine di identificare il corredo proteico totale nelle specie di maggior rilievo scientifico (Aitken e Baker, 2008, Oliva et al, 2008, Aitken e Nixon, 2009, Gadella 2009, Oliva et al, 2009).

Il vantaggio offerto dalla proteomica è quello di avere in una sola separazione elettroforetica bidimensionale un quadro completo delle proteine espresse in quel dato momento da un preciso comparto cellulare di un individuo.

Da qualche anno in campo andrologico si sta concentrando l'attenzione sulla messa a punto di pannelli di SNP (modificazioni puntiformi di nucleotidi), per valutare l'associazione tra fenotipo e genotipo e mettere a punto dei test di valutazione del valore riproduttivo altamente high throughput. Se da un lato però un approccio mediante genomica funzionale può essere utile per creare database, pannelli di screening e metodi di analisi dell'espressione genica estensivi e relativamente rapidi, tuttavia non fornisce abbastanza informazioni a livello proteico, sia per quanto riguarda le isoforme prodotte da un dato gene, sia per quanto concerne le modificazioni post-traduzionali. Difatti è ormai chiaro che il numero dei geni codificanti per le proteine nei mammiferi è sorprendentemente ridotto (circa 25000 nell'uomo) rispetto al numero delle proteine effettivamente presenti in un organismo (300000 o più), e ciò è dovuto a meccanismi di alternative splicing e modificazioni post-traduzionali (modificazioni lipidiche, glicosilazioni, fosforilazioni, proteolisi). Se la genomica da una parte può fornire ausilio nell'identificazione di modificazioni puntiformi di nucleotidi con effetto sui caratteri fenotipici, la proteomica comparativa può mettere in luce alcune modificazioni post-traduzionali del corredo proteico, anche in campo andrologico.

In andrologia la proteomica può assumere dunque un ruolo fondamentale, soprattutto in quanto gli spermatozoi sono "candidati ideali": si tratta di cellule infatti altamente

specializzate, che possiedono una ridotta quantità di organelli e citosol rispetto alle cellule somatiche; non possiedono il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, i lisosomi, perossisomi e ribosomi, e dopo la maturazione i processi di trascrizione e traduzione vengono completamente silenziati. Presentano poi una membrana molto complessa e ricca in proteine, che subisce riarrangiamenti importanti durante la maturazione post-testicolare nell'epididimo e nelle vie genitali femminili. In più le proteine spermatiche sono responsabili non solo delle funzioni cellulari stesse, ma anche dell'interazione con l'oocita.

Bisogna tuttavia sottolineare che i metodi di estrazione proteica nello sperma sono estrapolati da quelli di altri tipi di tessuti, e tale approccio non specifico potrebbe inficiare l'estrazione di proteine idrofobiche (come le proteine di membrana) o alcuni complessi proteici di grosse dimensioni. In tale contesto, individuare arbitrariamente dei marker di fertilità risulterebbe un'impresa titanica. In considerazione di ciò, l'approccio proteomico più immediato e probabilmente più fruttuoso è quello comparativo.

L'utilizzo dell'Elettroforesi monodimensionale (1-DE) in passato ha permesso l'accesso a notevoli informazioni concernenti la presenza delle maggiori proteine degli spermatozoi. Soltanto negli ultimi anni in medicina umana, grazie all'affinamento di tecnologie di Elettroforesi Bidimensionale (2-DE) è stato possibile identificare un numero sempre più elevato di proteine e chiarire alcuni punti oscuri riguardanti il loro funzionamento, interazioni e modificazioni. Studi condotti sull'uomo confermano la presenza di almeno 1000 spot proteici in campioni normospermici (Oliva et al., 2009). La conseguente escissione dai gel dei 145 spot più rilevanti e la successive analisi mediante tecnologia MS hanno condotto all'identificazione di 98 proteine diverse, e alla stima percentuale in base alla loro funzione biologica: produzione di energia (23%), implicazione in processi di trascrizione, sintesi di altre proteine, trasporto e turnover cellulare (23%), partecipazione al ciclo cellulare, ai meccanismi di apoptosi e di reazione allo stress ossidativo (10%), ai segnali di traduzione (8%) o di riconoscimento cellulare (7%), al metabolismo (6%). Un 10% è rappresentato da componenti strutturali del citoscheletro e delle flagella, e dunque proteine fondamentali per l'esplicazione del movimento degli spermatozoi. Nel restante 11% la funzione non è ancora stata decifrata (Martinez-Heredia et al., 2006).

## **1.5. Metodologie per lo studio del proteoma**

Le tecnologie necessarie per un progetto di proteomica sono molte e più complicate che quelle utilizzate per il sequenziamento del DNA. Come già accennato, l'alfabeto di base è maggiore (quattro nucleotidi per il DNA contro i 20 amminoacidi normali più tutti quelli modificati per le proteine). Inoltre va considerato che l'editing dell'mRNA conduce a messaggeri modificati, e di conseguenza a tipi differenti di polipeptidi. Anche le proteine stesse possono venire modificate dopo la loro sintesi, con tagli o aggiunte di vari gruppi come zuccheri, fosfati, solfati, metili, acetili, lipidi.

La cosa basilare da capire prima di ogni esperimento, che richiede una cascata precisa di passaggi strettamente tempo-dipendente e legati a precise condizioni fisico-chimiche, è il tipo di campione che si vuole analizzare, e dunque quali tipi di proteine ci si aspetta di separare e caratterizzare. E' difatti di primaria importanza scegliere l'adeguata soluzione di solubilizzazione per un certo tipo di substrato, di lavaggio o un protocollo di pre-frazionamento. Una volta preparato correttamente il campione si può procedere alla separazione in due tempi dei vari polipeptidi mediante elettroforesi bidimensionale. Tale tecnica difatti consente di separare migliaia di polipeptidi contemporaneamente e su di un unico gel, con una risoluzione e una riproducibilità adeguata. L'elettroforesi bidimensionale è il cuore di ogni analisi proteomica, poiché i polipeptidi così preparati saranno poi pronti per eventuali analisi di approfondimento. I gel ottenuti possono essere analizzati, previa conversione in immagini, da specifici programmi computerizzati, che consentono di valutare le differenze qualitative ma anche quantitative dei diversi campioni in esame. Gli spot proteici più interessanti possono infine essere processati mediante spettrometria di massa per il calcolo dell'effettivo peso molecolare e dunque per l'identificazione del complesso.

### **1.5.1 Preparazione del campione**

La preparazione del campione è il passaggio più importante e critico dell'analisi proteomica tanto che la sua accuratezza può influenzare la buona riuscita dell'intero esperimento. Non esiste un protocollo universale di preparazione perché i campioni che si possono analizzare presentano natura e caratteristiche diverse; si pensi ad esempio a tessuti o a fluidi biologici. E' molto difficile, infatti, trovare un unico protocollo capace di solubilizzare tutti i polipeptidi

presenti nel campione, Ad esempio alcune proteine idrofobiche come quelle di membrana, o quelle nucleari, o ancora quelle poco accessibili perché situate in tessuti ben resistenti, come la pelle o i capelli, possono risultare insolubili nei normali tamponi di denaturazione. Le protamine ad esempio, le più abbondanti proteine nucleari, non sono rilevabili con una elettroforesi convenzionale 2D, in quanto sono molto basiche e, a causa della loro forte carica positiva, tendono a focalizzarsi alla fine delle strip dopo la prima dimensione, quindi al di fuori degli usuali valori di pI considerati nella prima dimensione dell'elettroforesi 2D. In più sono insolubili in SDS, classico reagente utilizzato in seconda dimensione, e dunque l'approccio migliore per il loro studio sarebbe probabilmente quello in due step, processando indipendenti aliquote di seme mediante 1-D PAGE acidica e 2D PAGE convenzionale per le restanti proteine (Oliva et al., 2009).

E' dunque evidente l'importanza della messa a punto di protocolli di solubilizzazione studiati per avere una buona solubilità sia in presenza di proteine idrofobiche, sia idrofiliche, sia polipeptidi ricchi in cisteine, evitando anche la degradazione proteolitica. La consultazione di banche dati bibliografiche può essere utile per costruire a priori una mappa teorica delle proteine potenzialmente presenti in un dato comparto cellulare, al fine, ad esempio, di stabilire il range di pH ottimale da utilizzare, o la composizione della soluzione di denaturazione. Un'ottimale preparazione del campione prevede non solo l'estrazione dal campione biologico, ma anche l'eliminazione di sostanze che possono interferire con la tecnica analitica, e il mantenimento in apposita soluzione durante l'intero processo di separazione. Questi tre passaggi rappresentano l'intero processo di solubilizzazione delle proteine. Si tratta quindi di un processo che attraverso l'uso di sostanze chimiche presenti nel tampone di solubilizzazione del campione, permette la rottura delle interazioni non covalenti tra proteine e tra queste e le sostanze interferenti l'analisi (acidi grassi, DNA, RNA ecc.) (Rabilloud 1999; Herbert, 1999). Lo scopo del tampone di solubilizzazione è quello di ridurre tutte le proteine alla loro struttura primaria, inibire le modificazioni proteiche, disattivare le proteasi, e soprattutto prevenire la riagggregazione delle proteine rompendo i ponti disolfuro ed i legami idrogeno e srotolando i peptidi in modo da esporre tutti gruppi al tampone di lisi. Un tampone di solubilizzazione ottimale generalmente contiene una concentrazione elevata di agenti denaturanti, un detergente zwitterionico ed un riducente, per fornire un ambiente denaturante efficace.

L'urea è l'agente caotropo maggiormente utilizzato. La sua funzione è quella di denaturare le le proteine, favorendo lo srotolamento nella loro struttura primaria rompendo i ponti idrogeno intra e inter -molecolari. In alcune particolari condizioni di incompatibilità dei

reagenti, la stessa funzione può essere svolta dalla Tiourea. La semplificazione delle proteine nella loro struttura primaria è requisito necessario per farsi che ad ogni proteina corrisponda solo un determinato valore di pI.

I detergenti vengono generalmente aggiunti per incrementare la solubilità proteica al relativo punto isoelettrico. Come detergenti vengono utilizzati quelli non ionici, come Triton X-100, o quelli zwitterionici, tra i quali il CHAPS (Fig. 2). Anche l' SDS (Sodium Dodecil Fosfato) è un detergente, ma essendo carico negativamente si lega alle proteine formando micelle che possono interferire nella valutazione del corretto pI. Tuttavia può essere utilizzato nell'IEF se in concentrazione inferiore allo 0,25% e in rapporto inferiore a 1/8 con i detergenti non ionici o zwitterionici.

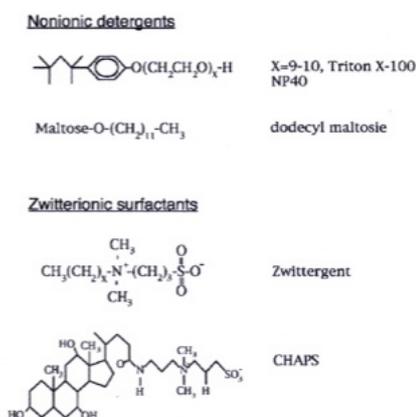
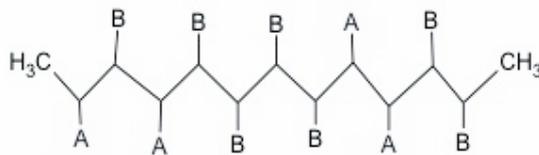


Fig. 2 – Forma chimica dei principali detergenti non ionici e zwitterionici

Gli agenti riducenti ( come il DTT, ditiotreitolo, 50mM) hanno la funzione di mantenere aperti i ponti disolfuro presenti consentendo quindi alle proteine di permanere nel loro stato più ridotto. A questi composti possono essere anche aggiunti inibitori di proteasi utili a prevenire la degradazione dei polipeptidi da parte di alcuni enzimi proteolitici che conservano una certa attività in presenza di urea e detergenti.

Infine si aggiungono gli anfoterici carrier, piccole molecole organiche polimeriche altamente solubili e anfoteriche, che aumentano la solubilità delle proteine e inibiscono le interazioni col gel. Al loro pI hanno il massimo valore tamponante, e vengono scelte in un range specifico a seconda della finestra di pH scelta nell'IEF (fig. 3)

Le miscele di anfolini sono scelte opportunamente a seconda dell'intervallo di pH usato per l'isolettrofocusing



A: gruppo acido  
B: gruppo basico

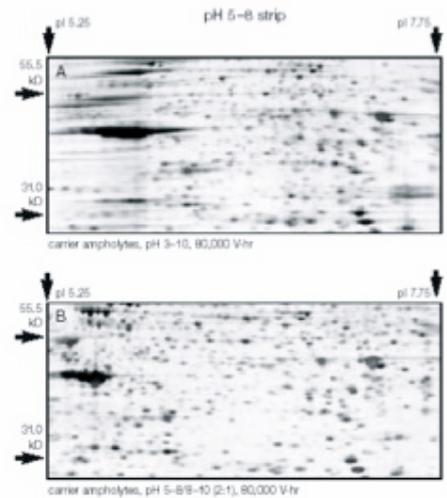


Fig. 3 – Schema della struttura chimica delle anfoline che migliorano la focalizzazione in IEF (destra)

Una volta ottenuta la solubilizzazione delle proteine i campioni devono essere quantificati sulla base della concentrazione delle proteine nella soluzione tampone. Tale passaggio è di estrema importanza nell'analisi proteomica, in quanto alcune classi di proteine molto abbondanti in determinati tipi di substrato (ad esempio l'albumina e le immunoglobuline nel siero, o le caseine nel latte), spesso vanno a mascherare le proteine in minoranza che si trovano nelle immediate vicinanze del medesimo intervallo di separazione (fig 4).

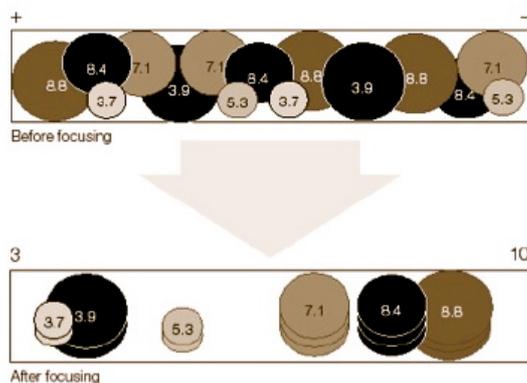


Fig. 4 – Schematizzazione della migrazione proteica in IEF

### 1.5.2 L'Elettroforesi Bidimensionale

Tra le tecnologie disponibili per lo studio del proteoma l'Elettroforesi Bidimensionale (Two-Dimensional Polyacrylamide gel Electrophoresis, 2D-PAGE) rappresenta la tecnica di elezione perché attualmente è l'unica che consente di separare migliaia di proteine contemporaneamente e su di un unico gel con una risoluzione ed una riproducibilità adeguata (Görg et al, 2004). La comprensione del network delle proteine e delle loro variazioni

quantitative in un contesto globale, come può essere quello di un estratto cellulare, dipende fortemente dalla capacità di analizzare le proteine contemporaneamente e di riuscire a quantificarne le variazioni nell'espressione (Marcus et al., 2009).

Si definisce bidimensionale poiché l'insieme delle proteine presenti in un campione vengono separate mediante due processi distinti e orientati tra loro perpendicolarmente (Gidding et al., 1984). Nell'elettroforesi bidimensionale le proteine vengono difatti inizialmente separate secondo il loro punto isoelettrico (prima dimensione) e successivamente secondo la loro massa molecolare (seconda dimensione) (Fig. 5).

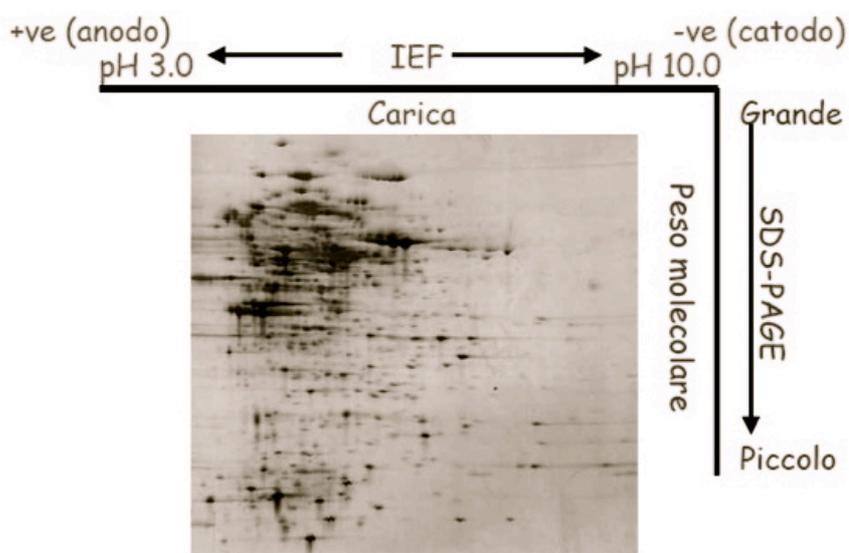


Fig 5 – Schema dell'Elettroforesi Bidimensionale (2D-SDS PAGE). Prima dimensione secondo i pI (punti isoelettrici), definita Isoelettrofocusing (IEF); Seconda dimensione in base ai mW (pesi molecolari), definita SDS-PAGE (Polyacrylamide gel electroforesis in SDS buffer)

Questa tecnica, che inizialmente prevedeva l'uso di anfoliti carrier per la formazione di un gradiente di pH (O'Farrel, 1975), è stata successivamente migliorata con l'avvento delle Immobiline, le quali hanno permesso l'ottenimento di un gradiente di pH immobilizzato nel gel. L'introduzione di tali gradienti in IEF ha permesso un notevole passo migliorativo della tecnica, con rese superiori di riproducibilità e risoluzione. Per molti anni difatti la tecnica non aveva riscontrato successo a causa della scarsa riproducibilità che rendeva praticamente

impossibile il confronto tra analisi di laboratori differenti, e poiché la resa di risoluzione era ottimale solo per piccole quantità di proteine. Tutto ciò era essenzialmente dovuto alla presenza di anfoline (sostanze anfotere) nella corsa in prima dimensione, utilizzate per generare il gradiente di pH desiderato. L'introduzione del metodo IPG (strip di gel in gradiente di pH immobilizzato) (Bjellqvist et al., 1982) ha consentito dunque di rendere stabile il gradiente di pH, polimerizzato insieme alla matrice di acrilamide, fino a pH 12 (Görg et al., 2000), e di analizzare fino a 12 mg di proteine in prima dimensione (Fig. 6).

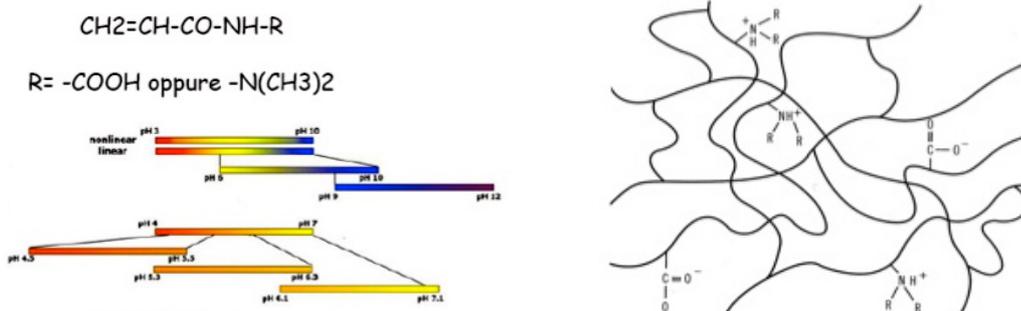


Fig. 6 – Schema del principio delle Immobiline, utilizzate in IEF con strip IPG a gradiente di pH modificato. A sinistra la struttura chimica base. A destra schematizzazione della maglia di acrilamide; i gruppi R possono essere carbossilici o amminici

L'alta capacità di carico proteico ha così permesso attualmente di poter caratterizzare i singoli spot ottenuti in 2D-IPG-PAGE mediante varie e sofisticate tecniche microchimiche (spettrometria di massa, sequenziamento amminoacidico, microsequenziamento N-terminale). L'introduzione dei gradienti immobilizzati nella prima dimensione dell'elettroforesi bidimensionale dunque ha consentito di avere un'altissima riproducibilità dei risultati tra laboratori differenti, consentendo la costruzione per comparazione di gel diversi di mappe elettroforetiche di riferimento (Map Master) catalogabili in banche dati specifiche (ad esempio Swiss-2DPAGE, Siena-2DPAGE).

Grazie alla quantità di informazioni ottenibili, l'Elettroforesi Bidimensionale attualmente ha assunto un ruolo importante nella ricerca medico-scientifica e si sta affermando come metodo "high throughput", ovvero "su larga scala".

### 1.5.2.1 Prima dimensione – Isoelettrofocalizzazione su gradiente di pH immobilizzato

L'isoelettrofocalizzazione (IsoElectric Focusing, IEF) è un metodo di separazione delle proteine che, sfruttando la loro carica elettrica, permette di separarle in base al loro punto isoelettrico (pI). Le proteine sono delle molecole anfotere, cioè sono molecole che variano la loro carica a seconda del pH del mezzo in cui esse si trovano. Quando si analizza una miscela proteica con questo metodo, le proteine tenderanno a migrare verso l'anodo o verso il catodo a seconda della loro carica netta. Quest'ultima è definita come la somma di tutte le cariche positive e negative di tutti gli amminoacidi formanti la catena polipeptidica (Westermaier et al., 2001). Per definizione il punto isoelettrico di una proteina coincide con il valore di pH in cui la proteina ha carica netta uguale a zero. Quindi una proteina sarà caricata positivamente a valori di pH inferiori al suo punto isoelettrico mentre lo sarà negativamente a quelli superiori. Una proteina posta in un gradiente di pH sotto l'influenza di un campo elettrico si muoverà verso il suo punto isoelettrico, in cui avrà carica netta uguale a zero. Fino a quando è applicato un campo elettrico l'effetto della diffusione delle proteine non sarà presente in quanto alla diffusione si oppone la forza elettromotrice che riporta ogni proteina al suo punto isoelettrico ottenendo così bande molto ben risolte (Fig. 7).

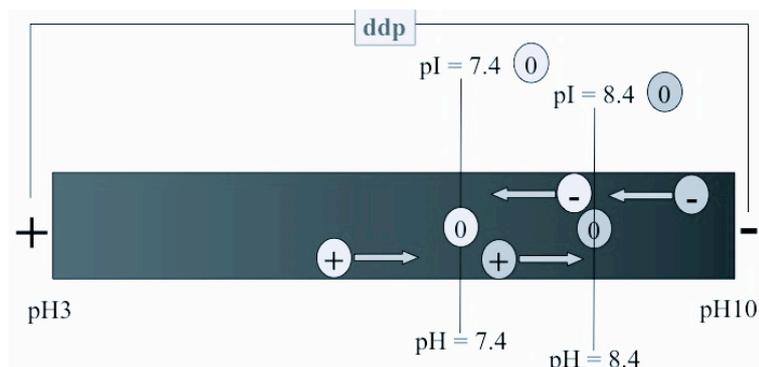


Fig 7 – Schematizzazione del principio di migrazione proteica verso l'anodo o il catodo in IEF

Questa tecnica elettroforetica viene quindi utilizzata per la separazione di proteine in miscele complesse sfruttando la capacità di discriminare tra punti isoelettrici che differiscono anche solo di 0,01 unità di pH (Westermaier et al., 2001). Attualmente il gradiente di pH è ottenuto mediante l'utilizzo delle Immobiline, che sono dei derivati dell'acrilammide a cui sono stati aggiunti differenti gruppi funzionali che hanno permesso l'ottenimento di molecole con pK ben distribuiti e compresi in un range da 1 a 12. Tali composti vengono co-polimerizzati nel

gel determinando così un gradiente di pH immobilizzato che garantisce un'elevatissima stabilità nel tempo (Gorg et al., 2000). Il pH del gradiente sarà in funzione della quantità di Immobiline con determinati pK usati nella polimerizzazione del gel. Grazie a tali molecole si possono ottenere gradienti di pH lineari o estesi e i range di pH possono essere molto vari, dallo standard 3-10 a gradienti di pH molto ristretti che possono anche essere di una sola unità di pH. Nell'IEF con IPG (ovvero la prima dimensione di separazione elettroforetica con strip di gel secondo gradienti di pH immobilizzato) la carica superficiale di un composto anfotero cambia e diminuisce, in accordo con la sua curva di titolazione, muovendosi lungo i gradienti di pH fino a raggiungere una posizione di equilibrio stabile nel punto in cui il pH eguaglia il punto isoelettrico: essendo in quella regione la mobilità uguale a zero, la molecola si ferma, indipendentemente dall'applicazione di una corrente elettrica, poiché il gradiente preesiste al passaggio di corrente stesso, essendo stato creato al momento della polimerizzazione del gel (Fig. 8)

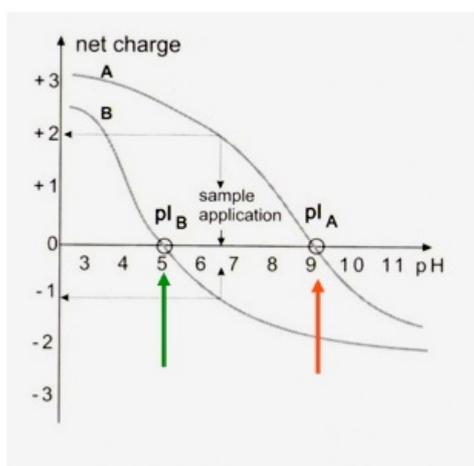


Fig. 8 – Schematizzazione dell'annullamento della carica netta di proteine con diverso pI

Dunque il vantaggio dell'utilizzo delle IPG strip consiste nel fatto che il gradiente di pH è esistente prima della corsa elettroforetica, viene cioè copolimerizzato, e dunque reso insolubile, entro le fibre della matrice stessa di poliacrilamide. Le IPG strip possono essere acquistate già pronte in commercio oppure realizzate in laboratorio. Dopo la polimerizzazione il gel col gradiente di pH immobilizzato dell'intervallo voluto viene tagliato in strisce, della larghezza di 3mm. In ogni caso le strip dovranno poi essere rigonfiate con agenti denaturanti, detergenti e riducenti (tipicamente urea 7-8M, tiourea 2M, CHAPS 2-4%, DTT 1-2%) per un periodo di tempo sufficientemente lungo (da 6 ore fino a overnight) (Fig. 9)

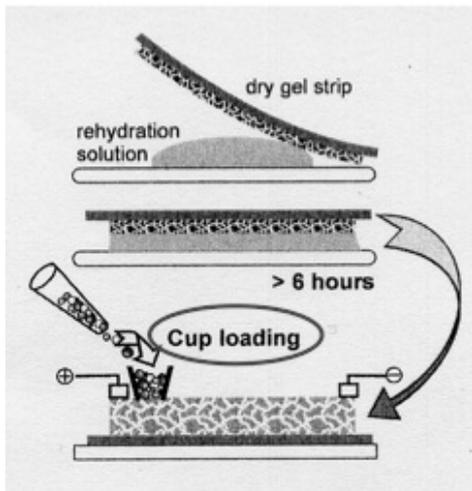
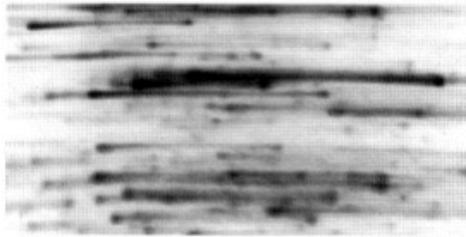


Fig. 9 – Schematizzazione della reidratazione delle IPG strip e del Cup loading (caricamento per IEF)

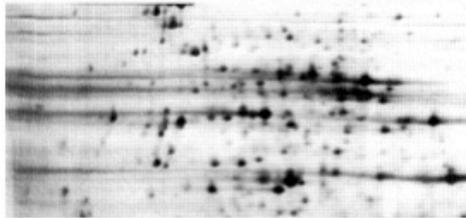
L'innovazione dell'introduzione delle Immobiline ha dunque permesso di risolvere i problemi del focusing tradizionale, dove il pH costante tamponato del mezzo di separazione conferiva alla superficie delle molecole una densità di carica, e dunque una mobilità, costante, che limitava la determinazione dell'esatto punto isoelettrico e la rivelazione finale. In più la sintesi di Immobiline basiche ha permesso di coprire intervalli di pH più ampi e estremamente alcalini.

Nella focalizzazione isoelettrica la solubilizzazione delle proteine rappresenta uno step critico, in quanto le repulsioni elettrostatiche tra complessi proteici non possono essere impiegate, poiché è necessario mantenere la carica nativa. Ciò solleva tre problematiche: la solubilizzazione iniziale del campione (dove esistono notevoli interazioni tra proteine a diverso punto isoelettrico o tra proteine e altri composti interferenti, come gli acidi nucleici) risulterà minima a carico di alcuni componenti rispetto ad altri; durante l'entrata del campione nel gel si produce un effetto "stacking" dovuto alla transizione tra fase liquida e gel, e alla forte frizione esistente, che può tradursi in precipitazione delle proteine; infine, in prossimità del punto isoelettrico la solubilità delle proteine è minima, forse a causa della carica netta pressoché nulla, il che favorisce la precipitazione delle proteine (Fig. 10).



#### UNDER-FOCUSING:

Non è stato applicato un numero di Vh sufficiente per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot mostra una coda e lo spot stesso non è ben definito, indice del fatto che non è perfettamente focalizzato.



#### OVER-FOCUSING:

E' stato applicato un numero di Vh altamente superiore a quello necessario per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot risulta focalizzata mentre alcuni, pur essendo ben focalizzati, mostrano una coda. Si distingue nettamente dal under-focusing.

#### PRECIPITAZIONE nella IEF

Si notano (soprattutto in una regione ben delimitata del gel) delle forti striature orizzontali, indice del fatto che la proteina è precipitata nella prima dimensione e non ha focalizzato. Durante la seconda dimensione il precipitato è stato risolubilizzato dall'SDS.

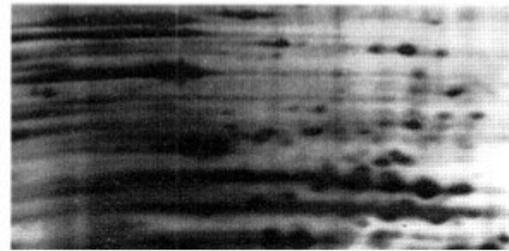


Fig. 10 – Comuni problematiche di focalizzazione in relazione al voltaggio applicato (Westemaier et al, 2001)

La precipitazione proteica è da evitare dove possibile poiché non è detto che tutte le proteine precipitino allo stesso modo e che, parimenti, tornino tutte in soluzione successivamente, il che può alterare il campione.

E' dunque chiaro che la focalizzazione isoelettrica si esplica al meglio con protocolli che minimizzano le interazioni idrofobiche e i legami a idrogeno, ad esempio mediante l'impiego di caotropi e detergenti. Le interazioni idrofobiche si esplicano in presenza di acqua, e sono responsabili in primis di alcune interazioni proteina-proteina e del legame dei lipidi e di altre molecole piccole apolari. Campioni contenenti molti lipidi possono comportare delle difficoltà in prima dimensione, in base alla struttura supramolecolare di questi ultimi, ovvero se si presentano come monomeri o assemblati. I monomeri si legano spesso a proteine che fungono da carrier lipidici, e questo legame può falsare il peso molecolare. Per ovviare a ciò, è utile introdurre nel tampone di solubilizzazione un detergente. Se invece i lipidi si presentano in forma assemblata, si può procedere alla denaturazione o alla precipitazione con etanolo o acetone. Gli acidi nucleici, così come i polisaccaridi, dovrebbero essere eliminati, in quanto incrementano la viscosità del campione in soluzione e compromettono la separazione

elettroforetica. La centrifugazione a 10000g può già bastare ad ovviare a tale problematica. Altrimenti si può ricorrere a Dna- o Rna-asi, ma tali enzimi ovviamente verranno poi visualizzati nel gel finale.

Le IPG strip reidratate a sufficienza saranno posizionate capovolte (ovvero col gel in alto) in un apposito strip holder, e il campione verrà caricato ad una delle loro estremità (catodo o anodo) in un apposito cup loader, e infine ricoperto con olio di paraffina, al fine di impedire l'assorbimento da parte del gel dell'anidride carbonica presente nell'aria, che altrimenti porterebbe ad un'acidificazione della matrice con conseguente errata lettura dei punti isoelettrici. Dopo l'applicazione di un campo elettrico con valori prestabiliti di voltaggio e trascorsa completamente la focalizzazione (mediamente 13-20 ore), la separazione in prima dimensione è completata, e si può procedere ai passaggi intermedi di equilibratura, prima di passare alla seconda dimensione. Il voltaggio utilizzando la tecnica di cup loader anziché di rehydration loader (dove le strip vengono rigonfiate con una soluzione contenente il campione stesso) viene aumentato gradualmente, rispettando un limite di amperaggio massimo per numero di strip caricate. A fine corsa può essere utile applicare il massimo voltaggio in modo da rifocalizzare anche le proteine che possono essere diffuse lateralmente. Al termine della focalizzazione le strip possono essere anche congelate a  $-80^{\circ}\text{C}$  ed essere sottoposte alla seconda dimensione successivamente, il che rappresenta una delle pochissime fasi dove sia possibile interrompere la catena d'analisi.

### **1.5.2.2 Equilibratura delle strisce**

Le strisce IPG necessitano di due fasi di equilibratura, ciascuna della medesima durata di 15 minuti in un apposito tampone di equilibratura. Il tampone di base contiene generalmente una soluzione 6M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, 50 mM di TRIS/HCl a pH 8,8 (condizione standard per l'efficacia dell'SDS) e 0,01% di Bromo Phenol Blue (BBF) utilizzato come tracciante di corsa. Urea e Glicerolo vengono utilizzati principalmente per diminuire gli effetti endosmotici (Gorge et al, 1988) nel passaggio tra la prima e la seconda dimensione e per favorire la completa interazione con l'SDS. Gli effetti endosmotici si verificano poiché le cariche fisse nella matrice del gel delle IPG strip non possono muoversi, ma possono generare dei controioni e quindi un vero e proprio flusso d'acqua verso il catodo; il glicerolo in particolare, aumentando la densità del medium, impedisce tale artefatto. Il DTT

(diodiotreitolo) al 1% di concentrazione (agente riducente) è l'elemento aggiunto alla soluzione di equilibratura nel primo passaggio, e ha la funzione di ridurre completamente le proteine; nel secondo passaggio viene invece aggiunta la iodoacetamide (IAA) al 2,5% (agente alchilante) per rimuovere l'eccesso di DTT (fig. 11), responsabile altrimenti dei cosiddetti "point streaking" (strisciate) nei gel colorati con l'argento, ma soprattutto per garantire la rottura irreversibile dei ponti disolfuro e quindi mantenere le proteine separate nella forma più lineare possibile (Gorge et al, 1997).

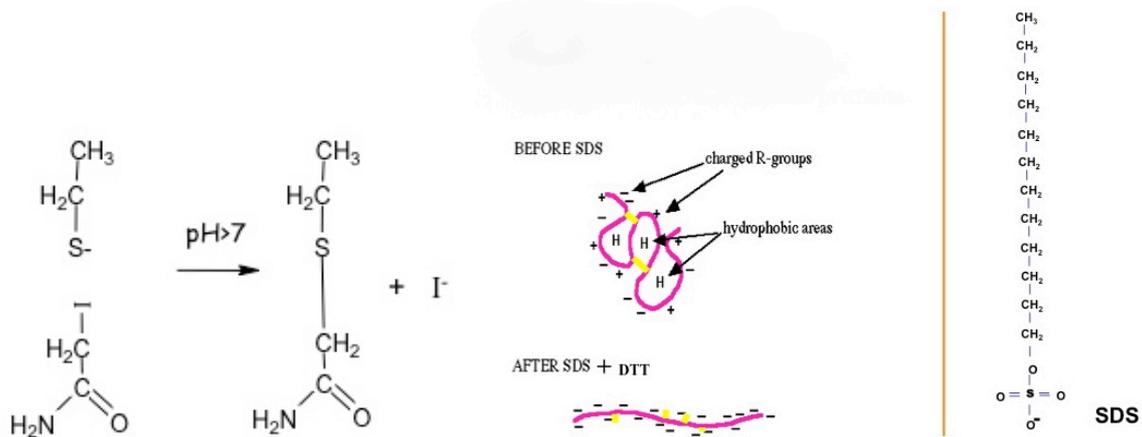


Fig. 11 – Schematizzazione della reazione stechiometrica (riduzione-alchilazione) mediante DTT e Iodoacetamide nella fase di equilibratura delle strip IPG sottoposte a IEF (sinistra), azione denaturante dell'SDS sulle proteine che vengono così caricate negativamente per la seconda dimensione (al centro), e schema della composizione chimica dell'SDS (destra)

Al termine dei due passaggi di equilibratura (15' con 1% DTT e 15' con 2,5% di IAA) le IPG strip devono essere lavate in tampone SDS-glicina (che costituisce anche il tampone di corsa della seconda dimensione) al fine di rimuovere l'eccesso della soluzione di equilibratura. Infine le strip vengono delicatamente appoggiate ad un'estremità dei gel di seconda dimensione e sottoposte a corsa elettroforetica SDS-PAGE (fig. 12).

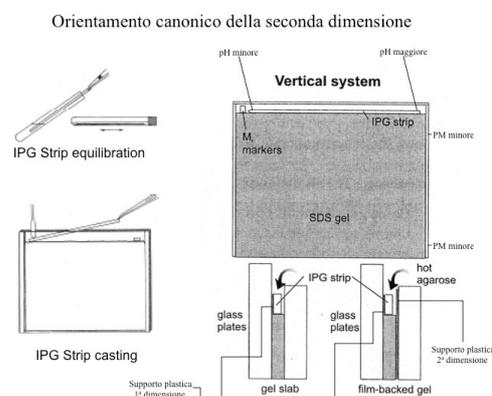


Fig. 12 – Rappresentazione schematica del caricamento delle IPG strip sui Gel Caster nella seconda dimensione

### 1.5.2.3 Seconda dimensione – SDS-PAGE

La seconda dimensione è un elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). E' un metodo elettroforetico di separazione delle proteine in funzione del loro peso molecolare. Un campo elettrico è applicato alle proteine denaturate e caricate negativamente in modo uniforme con l'SDS. Essendo l'SDS un detergente ionico surfattante, una volta posto in soluzione acquosa forma delle micelle che si legano alle proteine mascherandone le loro cariche intrinseche in modo da conferire loro una carica netta negativa. La separazione elettroforetica avverrà quindi in base alla massa molecolare delle proteine, che tenderanno a migrare verso l'anodo (+) tramite un effetto setaccio creato dalla struttura porosa del gel di poliacrilamide (Herbert, 1997). Difatti nella polimerizzazione (con acrilamide, bis-acrilamide, TEMED, APS, Fig. 13), variando la concentrazione di acrilamide (AA) si ottiene la variazione delle dimensioni dei pori.

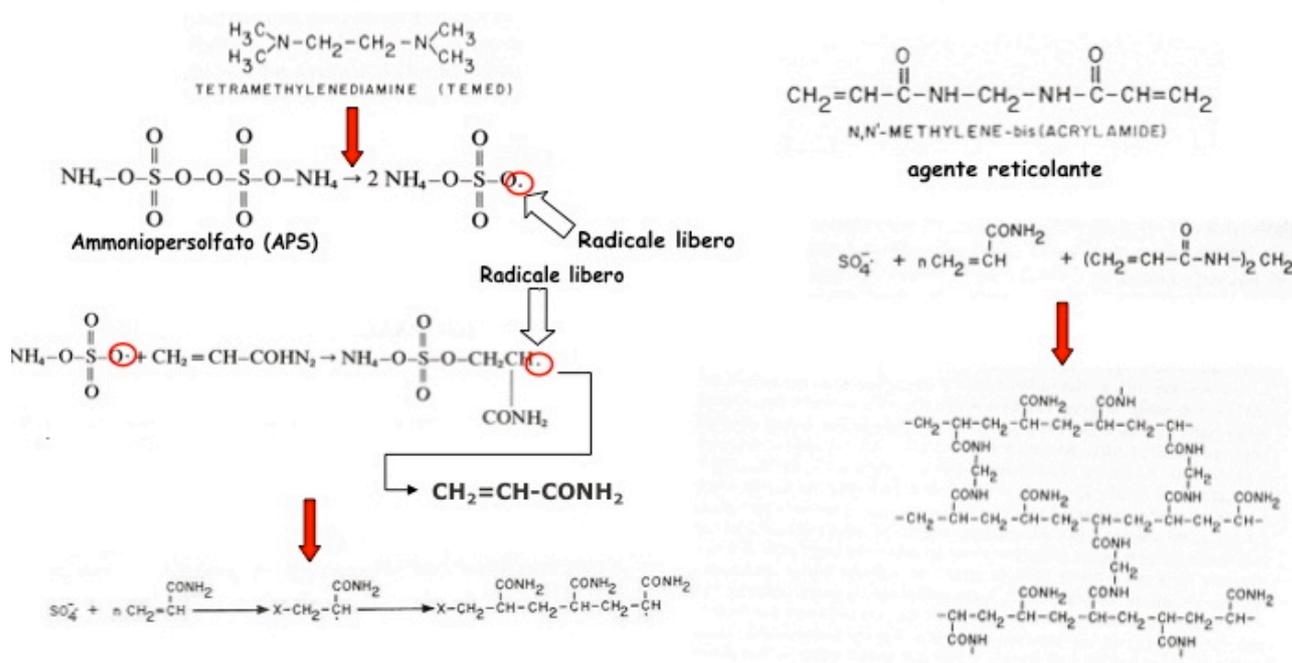


Fig. 13 – Rappresentazione schematica della reazione chimica che avviene nella polimerizzazione

Aumentando la percentuale di acrilamide si otterranno dei pori di dimensione minore che quindi permetteranno una migliore risoluzione delle quelle proteine a basso peso molecolare (Fig. 14).

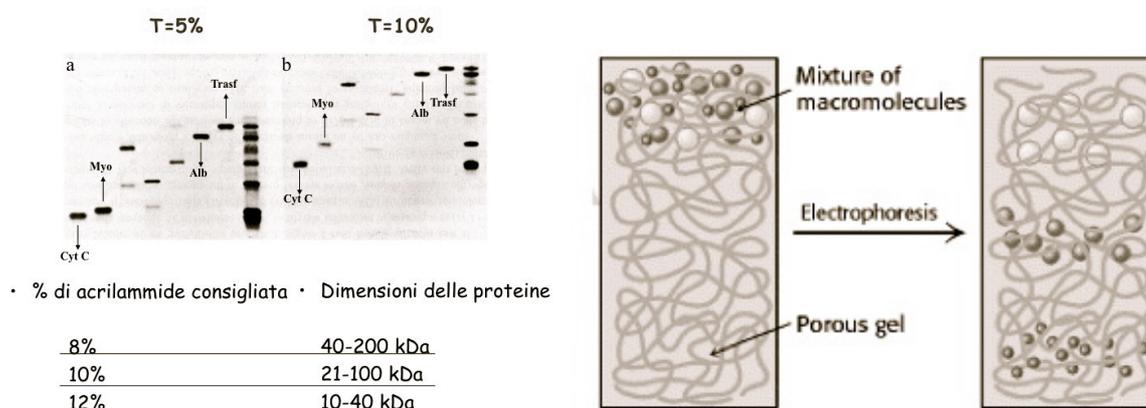


Fig. 14 – Percentuale di acrilamide consigliata (sinistra) nella polimerizzazione di gel SDS page a gradiente di porosità; schematizzazione della migrazione delle proteine con dimensioni diverse (destra)

Mediante l'utilizzo di gradientatori è possibile ottenere gel con differenti percentuali di acrilamide (AA), dove le dimensioni dei pori saranno decrescenti dall'alto verso il basso. Le proteine migreranno in base al loro mW, in maniera più rapida e compiendo maggiori distanze se questo valore è basso, viceversa in modo più lento se è elevato. Difatti la velocità di migrazione di una proteina in un campo elettrico ( $v$ ) dipende dal valore del campo elettrico stesso ( $E$ ), dalla carica netta totale della proteina ( $z$ ) e da un coefficiente d'attrito che dipende dalla viscosità del mezzo di migrazione ( $f$ ), secondo la legge fisica

$$v = \frac{Ez}{f}$$

Le IPG strip vengono poste nella parte alta del gel polimerizzato e mantenuto in posizione tramite una soluzione riscaldata di agarosio allo 0,5% (mai superiore ai 60°C a causa dell'incompatibilità chimica con l'Urea), che garantisce anche la continuità fisica tra le IPG strip e il gel di poliacrilamide e l'assenza di bolle d'aria. Al lato della strip viene posizionato uno specifico marcatore per la corretta visualizzazione dei diversi mW.

Le proteine, a questo punto già separate in base al loro punto isoelettrico, e aventi ora la medesima carica, corrono ortogonalmente rispetto al senso di corsa in prima dimensione.

Le condizioni di corsa vengono stabilite al fine di favorire in un primo step la migrazione delle proteine dalle IPG strip al gel SDS-PAGE con iniziale accumulo all'interfaccia, e nel secondo step la migrazione in base al mW, impostando valori fissi di amperaggio per gel fino a termine della corsa.

#### **1.5.2.4 Colorazione del gel**

La colorazione ha lo scopo di rendere visibili le proteine sul gel. Una tecnica di colorazione ottimale dovrebbe garantire una elevata sensibilità e linearità, essere quantitativa, essere compatibile con analisi collaterali o consequenziali, ed essere il più possibile semplice ed economica. Una colorazione che possiede tutte queste caratteristiche non esiste, tutte presentano dei vantaggi e degli svantaggi. Attualmente le tecniche basate sulla fluorescenza sono in rapido sviluppo perché molto accurate a livello quantitativo, caratterizzate da un'elevata sensibilità, e sono compatibili con le metodiche di identificazione delle proteine e delle loro modificazioni post-traduzionali. Purtroppo presentano ancora degli svantaggi legati principalmente ai costi elevati e alla laboriosità della metodica.

Le colorazioni attualmente più utilizzate sono quelle organiche con Coomassie (R e G) e quella al nitrato d'argento. Le metodiche di colorazione basate sull'utilizzo del Coomassie sono stabili, riproducibili, veloci e quantitative e sono anche compatibili con l'analisi in MS. Lo svantaggio principale di queste tecniche è tuttavia la sensibilità, anche se dopo la messa a punto di colorazioni al Coomassie G colloidale si è ottenuto un notevole miglioramento in questi termini (Candiano et al., 2004). Lo stato colloidale è intermedio tra quello delle soluzioni liquide vere e proprie (caratterizzate da ioni e piccole molecole con diametro particellare compreso tra 0,001 – 0,1  $\mu\text{m}$ , disciolte in un solvente) e quello di sospensioni sedimentabili. Il Coomassie G 250 è poco solubile nella soluzione di colorazione e dunque forma una soluzione colloidale, nella quale una piccola porzione di colorante si lega alle proteine passando in soluzione, finché, non legandosi più, ritorna in dispersione colloidale e infine precipita.

Le tecniche di colorazione che utilizzano l'argento nitrato sono basate sulla saturazione del gel con gli ioni argento e sul legame tra questi ultimi e le proteine: la precipitazione di argento metallico determina la colorazione del gel. Questi metodi hanno limiti di rilevazione



### **1.5.3 Analisi di immagine**

Le informazioni ottenute in un gel di elettroforesi bidimensionale sono elevate ed una loro corretta analisi prevede l'utilizzo di software dedicati all'analisi dell'immagine. Per questo le mappe bidimensionali vengono digitalizzate utilizzando appositi scanner densitometrici che garantiscono un'ottima risoluzione. Le immagini ottenute vengono quindi analizzate con software specifici per individuare differenze quantitative e qualitative tra gli spot. L'analisi di immagine si compone di vari passaggi di elaborazione che vengono effettuati sulle immagini. Tali passaggi prevedono l'individuazione degli spot (detection), un loro confronto fra gel differenti (matching), la quantificazione dei volumi, l'ottenimento di profili d'espressione e l'analisi statistica dei dati. Il principale problema dei software attualmente in commercio è nella loro non completa automatizzazione che permetta un'analisi più completa e precisa senza l'intervento manuale da parte dell'operatore. Il passaggio più critico è quello dell'identificazione degli spot (spot detection), dove è richiesto l'intervento dell'operatore per validare l'operato del software. E' infatti possibile che il software riconosca come spot un rumore di fondo o non riconosca come spot una proteina presente in bassa quantità. Dopo l'identificazione di uno spot vengono fornite a quest'ultimo una serie di caratteristiche quali area, volume, coordinate x/y ecc.

Passaggio successivo è quello del confronto tra due o più mappe bidimensionali basato anche sulla creazione di gel virtuali di riferimento che contengono la totalità degli spot rilevati in un determinato esperimento (Map Master). In tale passaggio i singoli spot vengono sovrapposti al gel di riferimento o con altri gel facenti parte dell'esperimento per valutarne il livello di espressione e la presenza in tutti i gel e quindi in tutti i campioni in esame.

### **1.5.4 Database di mappe bidimensionali**

Come accennato, l'introduzione dei gradienti immobilizzati in prima dimensione ha permesso l'ottenimento di un elevato grado di riproducibilità nell'esecuzione di mappe bidimensionali anche tra laboratori differenti. Ciò ha permesso la costruzione di mappe elettroforetiche di riferimento caratteristiche di differenti tessuti, organi, cellule, microorganismi ecc (map master). Tali mappe possono essere inserite in banche dati specifiche che contengono anche iper-link degli spot identificati. Le informazioni presenti in queste banche dati non si limitano

alle immagini dei gel ma contengono tutte le informazioni esistenti sulle proteine in questione. Attualmente i data base sono sempre più specifici e informativi contenendo informazioni non solo sulla singola proteina, ma anche sulle modifiche post-traduzionali, sulla struttura e, quando note, sulle interazioni con altre proteine.

L'elevata riproducibilità ottenuta nell'esecuzione di gel bidimensionali permette il riconoscimento di spot basandosi sul confronto (matching) di una mappa con quelle già presenti in database o pubblicate da altri autori. Tale metodologia può permettere di ipotizzare la corrispondenza degli spot con proteine note anche se non è possibile effettuare analisi di spettrometria di massa. Tale metodo consente tuttavia solo un semplice riconoscimento di quegli spot proteici ben caratterizzati, ma è ovvio che non può essere utilizzato per l'identificazione di spot non ancora identificati.

## Databases of 2D-electrophoretic maps

**WORLD-2DPAGE** : <http://au.expasy.org/ch2d/2d-index.html>

Name	URL	Images of sample gels
<b>SWISS-2DPAGE</b>	<a href="http://www.expasy.ch/ch2d">http://www.expasy.ch/ch2d</a>	Human liver, plasma, platelets, kidneys, HepG2, HepG2SP, lymphoma, etc., and also <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i>
<b>NIMH-NCI Protein Disease Database (PDD)</b>	<a href="http://www.pdd.ncifcrf.gov/">http://www.pdd.ncifcrf.gov/</a>	Plasma, urine, cerebrospinal fluid
<b>Argonne Protein Mapping Group (PMG)</b>	<a href="http://www.anl.gov/BIO/PMG/">http://www.anl.gov/BIO/PMG/</a>	Mouse liver, cell lines of mammary gland cancer and hyperthermophilic organisms
<b>HEART-2DPAGE</b>	<a href="http://www.chemie.fu-berlin.de/user/pleiss/">http://www.chemie.fu-berlin.de/user/pleiss/</a>	Human heart
<b>HSC-2DPAGE</b>	<a href="http://www.harefield.nthames.nhs.uk">http://www.harefield.nthames.nhs.uk</a>	Human, mouse, and rat heart
<b>Mito-pick</b>	<a href="http://www.dsv cea.fr/thema/MitoPick/Mito2D.html">http://www.dsv cea.fr/thema/MitoPick/Mito2D.html</a>	Human mitochondria
<b>Yeast 2D-PAGE</b>	<a href="http://yeast-2dpage.gmm.gu.se/">http://yeast-2dpage.gmm.gu.se/</a>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>2D PAGE</b> Max-Planck-Institute	<a href="http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/">http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/</a>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i>

### 1.5.5 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente di misurare la massa di molecole e atomi attraverso la conversione degli analiti in ioni gassosi ad elevata mobilità che vengono poi analizzati. Il principio di funzionamento di tali strumenti si può suddividere in due parti principali: 1) una fonte di ionizzazione che introduce il campione nella macchina; 2) un apparato di misura della massa degli ioni introdotti. Esistono principalmente due tipi di spettrometri utilizzati negli studi proteomici: la “matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), che genera ioni da campioni in fase solida e misura la loro massa in un tubo dove gli ioni volano in tempi diversi in base alla loro massa, e l’“electrospray ionisation mass spectrometry” (ESI-MS), che genera ioni da campioni in fase liquida e ne misura la massa o tramite un apparecchio definito quadrupolo o in un tubo di volo come quello descritto sopra.

L'abbinamento dell'elettroforesi 2D alla spettrometria di massa prevede l'escissione degli spot d'interesse dal gel e, dopo decolorazione per eliminare possibili interazioni del colorante, la successiva digestione delle proteine mediante proteasi. Ogni proteina è caratterizzata da un insieme specifico di peptidi che è specifico e caratteristico per ogni proteasi utilizzata e può essere paragonabile all'impronta digitale della proteina. La proteasi maggiormente utilizzata è la tripsina. Il digerito triptico, che si ottiene per digestione in situ della proteina con tripsina, viene successivamente analizzato mediante spettrometria di massa e la massa dei singoli peptidi viene determinata. L'insieme dei peptidi che si ottengono mediante digestione di una proteina è caratteristico e quindi una loro analisi permette l'identificazione della proteina. Le masse dei peptidi del campione analizzato vengono confrontate con quelle teoriche generando una serie di punteggi che rappresentano il confronto fra la massa teorica e quella determinata sperimentalmente. La proteina risultata come la più probabile sarà quella che darà la migliore sovrapposizione tra la massa dei peptidi analizzati con quelli dei dati teorici. Il numero di peptidi osservati e l'accuratezza della loro misurazione concorreranno a dare sicurezza e attendibilità all'identificazione.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è la messa a punto di un corretto metodo di estrazione delle proteine da campioni di seme congelato di stalloni con differenti caratteristiche di "congelabilità" del seme, al fine di mettere in evidenza eventuali fluttuazioni individuali del corredo proteico post-scongelo.

Come già detto, gli spermatozoi sono cellule particolari rispetto alle altre cellule somatiche o germinali, e l'assenza della sintesi proteica post maturazione li rende dei candidati ideali per indagini proteomiche.

E' stimato che nell'uomo l'infertilità interessi circa il 15% delle coppie in età riproduttiva (Stephen EH et Chandra A, 1998) e il potenziale riproduttivo delle future generazioni sia in declino. Nonostante si ritenga comunemente che sia la componente femminile a incidere maggiormente sull'infertilità, recenti scoperte in medicina umana rivelano che più del 50% dei casi siano imputabili a difetti della componente maschile, e che nel 25% di questi ultimi le cause non siano ancora identificabili (Turek PJ, 2005). Indagini sulla qualità sub ottimale degli spermatozoi dovuta a parametri seminali anormali (motilità, morfologia, concentrazione, frammentazione del dna) sono state ampiamente studiate in varie specie, ma tuttora molti aspetti fisiologici e patologici degli spermatozoi restano vagamente conosciuti e ancora da sottoporre a studi approfonditi.

Negli ultimi dieci anni in medicina umana sono proliferati gli approcci proteomici sul seme, portando all'identificazione di numerose proteine specifiche spermatiche. Studi sul proteoma spermatico hanno dimostrato come modificazioni post-traduzionali possono indurre negli spermatozoi cambiamenti sia fisiologici (come la capacitazione, la reazione acrosomale, la fertilizzazione, e persino variazioni della motilità) che patologici.

Purtroppo, nonostante l'interesse crescente per questa complessa e affascinante branca della biotecnologia, al momento la proteomica resta un sistema da collaudare, velocizzare e affinare. Recenti studi condotti da Li et al. (2007) e Martinez-Heredia (2008) dimostrano che su quasi 4000 spots visualizzati nel primo studio, e oltre 1000 nel secondo, sono stati identificate solo 16 e 98 proteine rispettivamente. Gli ostacoli più complicati da gestire sono quelli relativi alle variabili pre-analitiche, quali il campionamento, la scelta delle condizioni fisico-chimiche delle soluzioni di solubilizzazione, nonché le variabili legate a fattori individuali, come l'età, la razza, la nutrizione, lo stile di vita e lo stress. (Colantonio e Chan, 2005). I recenti sviluppi della bioinformatica hanno tuttavia contribuito a valorizzare le

tecnologie proteomiche basate su grandi quantità di dati difficilmente gestibili senza appropriati programmi computerizzati.

L'obiettivo principale di questo lavoro è dunque la stesura di un protocollo di elettroforesi bidimensionale efficiente e ripetibile per lo studio del seme congelato equino, al fine di creare una map master specifica per la specie, eventualmente correlabile ai parametri di motilità post-scongelo. La futura eventuale integrazione tra tecniche genomiche, proteomiche e seminologiche avanzate (concentrazione, motilità, integrità di membrana, stato della cromatina, Osmotic test, integrità del Dna) potrebbe contribuire alla messa a punto di un progetto integrato di studio della fertilità in vivo, e di una banca dati esaustiva da utilizzare per individuare biomarker di fertilità e mettere a punto metodi di screening più rapidi, predittivi e altamente high throughput.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Caratteristiche dei campioni**

Il seme congelato di sei stalloni in stabulazione presso il Centro di Riproduzione Equina Intermizoo Spa (Vigonza, PD), è stato sottoposto ad analisi elettroforetiche bidimensionali. La scelta degli stalloni è stata randomizzata sulla base della disponibilità di materiale seminale congelato conservato.

Per ogni prova sono state scongelate da una a quattro paillettes commerciali da 0,5 mL di seme conservate con extender commerciale INRA82 (formula dichiarata: glucose, 5 g; lactose 300mg; raffinose, 300 mg; trisodium citrate dihydrate, 60 mg; potassium citrate, 82 mg; Hepes, 952 mg; penicillin, 10 I.U./ml; gentamycin, 10 ug/ml; water to 100 ml and UHT skimmed milk, 100 ml).

Per ciascun animale erano state precedentemente già calcolate, tramite il dispositivo computerizzato CASA (computerized assisted sperm analyzer, Hamilton Thorne Biosciences, IVOS, Animal Version 12.3D Bild 002), le medie dei seguenti parametri seminali post-scongelo: motilità totale (MOT) e spermatozoi progressivamente motili (PMS= progressive motile spermatozoa).

Le analisi di proteomica sono state tuttavia condotte in cieco, sia per quanto riguarda i parametri di motilità che di concentrazione totale di spermatozoi per paillette.

#### **3.2 Estrazione delle proteine**

Dopo scongelamento in bagnetto a 37°C per 2 minuti il materiale seminale è stato trasferito in eppendorf da 2 mL e sottoposto a centrifugazione (2000g = 5070 rpm per 20' a 25°C). Dopo l'eliminazione del surnatante (S) il pellet rimasto è stato diluito con PBS a 37°C in proporzione 1:1 rispetto al volume iniziale di campione. Sono state ripetute 4-8 centrifugazioni stoccando di volta in volta il surnatante.

I pellet proteici così ottenuti sono stati risospesi in 600 µL di uno specifico tampone di solubilizzazione/denaturazione contenente 7M Urea, 4%, 2M Thiourea, CHAPS, 1% DTT, 2%

Ampholine 3.5-10, 15mM Tris. Ciascun surnatante eliminato è stato invece risospeso in 800  $\mu\text{L}$  di tampone di estrazione e poi stoccato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per future analisi.

Dopo i lavaggi e i cicli di centrifugazione ciascun campione risospeso è stato sottoposto a sonicazione al fine di migliorare la solubilizzazione delle proteine e la resa di estrazione, mediante 5 cicli da 20'' con sonicatore, intervallati da 1 minuto di riposo, mantenendo refrigerato in ghiaccio. Un ulteriore centrifuga a 2010 G (= 5070rpm) per 5' è stata effettuata alla fine del processo al fine di eliminare ogni residuo cellulare. I campioni sono stati mantenuti in agitazione con ancoretta magnetica per 1h e 30'.

### **3.3 Quantificazione proteica**

La quantificazione della concentrazione proteica  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  è stata eseguita usando un kit dedicato (2D QuantiKit, Amersham) seguita da lettura allo spettrofotometro, e calcolata mediante metodo di Bradford (Fig.16).

Dopo aver risospeso i campioni nel buffer mediante blanda centrifugazione, 2, 4 e 8  $\mu\text{L}$  di sospensione di ciascun campione sono stati trasferiti in altrettante eppendorf da 2 mL. Contemporaneamente sono state preparate 5 eppendorf per la determinazione della curva di Titolazione Standard, con concentrazioni rispettivamente allo 0, 5, 10, 15, 20% di BSA (siero albumina bovina), ovvero di 0, 2,5, 5, 7,5, 10  $\mu\text{L}$ .

Questo kit è basato sul legame specifico del rame con le proteine: mediante uno spettrofotometro è possibile quantificare la misura del rame non legato. La densità di colore rilevata dallo spettrofotometro sarà dunque inversamente proporzionale alla concentrazione di proteine. Tale sistema ha un range di sensibilità compreso tra 0-50  $\mu\text{g}$ , e i suoi componenti sono tutti compatibili con i reagenti del tampone di solubilizzazione dell'IEF. La concentrazione delle proteine si calcola mediante confronto tra l'assorbanza di ciascun campione con la curva standard di taratura, essendo nota la concentrazione di BSA.

In ogni eppendorf preparata, compreso il Blank (acqua deionizzata) e quelle con BSA, vengono aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di Precipitante e successivamente di 500 $\mu\text{L}$  di Coprecipitante. Dopo centrifugazione a 10000g per 5' a temperatura ambiente, il contenuto di ogni eppendorf viene svuotato: le proteine, precipitate, restano sulle pareti. Ad ogni eppendorf vengono a questo punto aggiunti 500 $\mu\text{L}$  di Copper Solution (100 parti di Copper e 400 parti di ddH<sub>2</sub>O) e 1 mL di Colour Solution (100 parti di Reagente A più 1 parte di reagente B). Dopo 15 minuti il

contenuto di ogni eppendorf è trasferito in cuvette trasparenti monouso, e quindi letto allo spettrofotometro per la misura dell'assorbanza e la determinazione della concentrazione proteica.

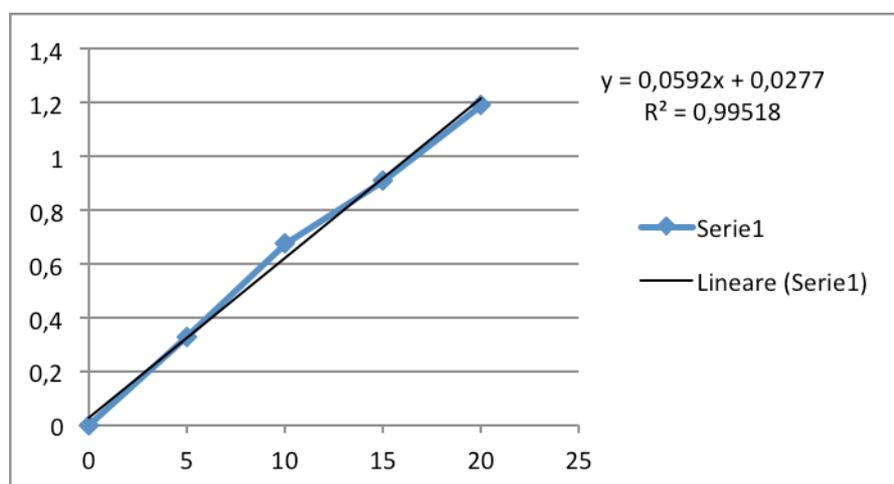


Fig. 16– Foglio di lavoro Excell per calcolo della retta di taratura standard di BSA, lettura dell'assorbanza di 2-4-8 µL di ciascun campione, creazione della retta di estrapolazione e calcolo della concentrazione proteica µg/µL

### 3.4 Elettroforesi monodimensionale

Inizialmente e come approccio metodologico di screening gli estratti proteici ottenuti e i surnatanti ricavati da ciascuna centrifugazione post-diluizione in PBS 1:1, sono stati analizzati mediante elettroforesi monodimensionale su gel al 10% di acrilamide. Per ciascun pozzetto sono stati seminati 10 µg di proteina. La separazione è stata eseguita utilizzando il seguente protocollo di base:

- Primo step 10mA gel per 15 minuti
- Secondo step 20 mA gel fino al completamento della corsa elettroforetica

I gel ottenuti sono stati colorati con coomassie G250 colloidale e le immagini sono state acquisite mediante il sistema per l'acquisizione delle immagini Pharos FX (Bio-Rad).

L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software Quantity One 4.6.3 (BIORAD).

### 3.5 Elettroforesi bidimensionale

La separazione delle proteine in prima dimensione è stata eseguita utilizzando IPG-strip pH 4-8 di 7 cm di lunghezza preparate nel nostro laboratorio e IPG-strip 3-10 da 13 cm commerciali (GE Healthcare). Le strip a gradiente di pH immobilizzato sono state mantenute in uno specifico tampone di rigonfiamento (Urea7M, Thiourea2M, Chaps4%, DTT 1%, Ampholine0,5%, BBF q.b.) overnight, facendo attenzione all'omogenea distribuzione del reswelling buffer mediante bilanciamento dell'apposito strip-holder, e infine coperte con olio di paraffina per evitare il contatto con l'aria e quindi la modificazione delle condizioni ambientali standard.

Sono stati caricati circa 70µg di proteine per campione in IEF in caso di colorazione in Silver e 300µg per quella in Coomassie colloidale. Il campione opportunamente portato a volume è stato caricato in appositi cup loading al catodo, e la separazione è stata eseguita utilizzando il seguente protocollo di base:

Step 1	100V	per 3h
Step 2	500V	per 3h
Step 3	1000V	per 3h
Step 4	2000V	per 2h
Step 5	4000V	per 2h
Step 6	6000V	per 2h
Step 7	8000V	per 2h
Step 8	10000V	over night

L'IEF è stata effettuata utilizzando l'Ettan IPGPhor III (GE Healthcare) fino al raggiungimento di almeno 80KV/h totali.

Dopo l'equilibratura delle strip, mediante reazione stechiometrica (15' + 15') con due passaggi in buffer (SDS, Urea, Glicerolo, Tris-HCl4x) con aggiunta di DTT 1% e successivamente di IAA al 2,5%, la seconda dimensione è stata eseguita in una cella Bio-Rad

PROTEAN II xi (Bio-Rad) utilizzando gel di poliacrilammide con concentrazione di AA del 12,5%. I gel sono stati polimerizzati utilizzando uno specifico protocollo (acrilamide gel stock solution, AA, H<sub>2</sub>O, Tris, Sds10X, Temed, APS) e adeguati su appositi gel-caster BioRad®. Ad avvenuta polimerizzazione, si è provveduto a isolare la superficie esposta all'aria con isopropanolo per 2' e successivamente a lavare la superficie del gel con 3 passaggi in SDS 1X, al fine di eliminare ogni residuo di isopropanolo. Successivamente la superficie del gel è stata ricoperta con agarosio riscaldato fino alla sua fase liquida per agevolare il posizionamento delle strip e del marker specifico (3 µg).

La seconda dimensione è stata eseguita in tampone di corsa SDS-GLY 10x (running buffer con TRIS 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%). Sono stati impostati due step, uno a 20 µA per gel nei primi 20', e poi raddoppiando a 40 µA per gel fino a fine corsa.

### **3.6 Visualizzazione degli spot proteici**

I gel ottenuti sono stati colorati utilizzando colorazioni in Silver stain o Coomassie G250 colloidale.

#### **Protocollo Silver Stain (200mL)**

- ✓ FIX (over night)  
Etanolo 80 mL  
Acido Acetico 20 mL
  
- ✓ SENSITIZE (1h)  
Sodio Tiosolfato 0,6g  
Sodio Acetato 13,6g  
Etanolo 60 mL  
1 mL glutaraldeide all'uso
  
- ✓ LAVAGGI (4x8 min)
  
- ✓ STAIN (1h al buio)

Argento nitrato 0,5g  
80µL di formaldeide al momento dell'uso

- ✓ STOP  
EDTA 2,92

### **Protocollo Coomassie Colloidale (200mL)**

- ✓ FIX (3 passaggi da 3', oppure over night)  
Etanolo 30%  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%
- ✓ LAVAGGI (3 per 30')  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%
- ✓ EQUILIBRATION  
Ammonio Solfato 15%  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%  
Etanolo 18%
- ✓ STAIN (1h al buio)  
Aggiungere nelle vaschette molto lentamente una quantità adeguata di soluzione di Coomassie G-250 al 2-4%, precedentemente scaldata.

Per i mini gel i tempi vanno ridotti di 1/3 e i volumi dimezzati

Le immagini dei gel, dopo essere state acquisite mediante scansione con il sistema per l'acquisizione delle immagini Pharos FX (Bio-Rad), sono state analizzate con software dedicato Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

## 4. RISULTATI

Sono state eseguite almeno due ripetizioni di 2D-SDS PAGE 12,5% per ciascun campione, con IPG-strip a pH 4-8 NL di 7 cm homemade, e a pH 3-10 da 13 e 18 cm commerciali (GE Healthcare). Per ogni campione è stata valutata la resa di estrazione e di visualizzazione degli spot partendo da 1, 2 e 4 paillettes per analisi. Entrambe le colorazioni, Silver Stain e Coomassie Collodale, sono state utilizzate nei mini gel, mentre solo la colorazione Silver per i gel di maggiori dimensioni.

L'analisi comparativa dei gel ottenuti ha portato ad evidenziare non solo differenze nella visualizzazione degli spot proteici, ma anche problematiche legate all'utilizzo di seme congelato con extender a base di latte scremato.

### 4.1 Prova per stabilire il numero minimo di paillettes per analisi

Sono state estratte le proteine totali da 1 e 2 paillettes di seme congelato dello stesso stallone secondo il protocollo sopra descritto, effettuando 4 centrifugazioni a 2000G per 20" a 20°C, seguite da sonicazione e quantificazione secondo metodo Bradford mediante 2D QuantiKit (Amersham) e spettrofotometria.

Essendo nota la concentrazione delle proteine per campione su  $\mu\text{L}$ , si è proceduto al calcolo dei  $\mu\text{L}$  necessari per seminare 70 $\mu\text{g}$  di proteine in prima dimensione, valore ottimale per la visualizzazione in gel colorati con Silver Stain.

E' stato quindi eseguito uno specifico protocollo in IPG fino al raggiungimento di almeno 87000 Vhrs totali.

Condizioni allo Start	100V	40 $\mu\text{A}$ /strip	0W	
Condizioni allo Stop	>7600 V	119 $\mu\text{A}$ /strip	2W	>23hrs Tot

La seconda dimensione è stata eseguita su gel da 75 ml al 12,5% di acrilamide, in tampone di corsa SDS-GLY 10x (running buffer con TRIS 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%). Sono stati impostati due step, uno a 20  $\mu\text{A}$  per strip nei primi 20', e poi raddoppiando a 40  $\mu\text{A}$  per strip, con le seguenti condizioni di corsa:

Condizioni di Start	102V	40 $\mu\text{A}$	4W	
Condizioni di Stop	>450V	80 $\mu\text{A}$	>38W	>2 hrs Tot

Si è proceduto quindi a colorazione con protocollo Silver Stain (200 mL per gel) dei gel relativi alla 2D-SDS PAGE di 1 e 2 paillettes di seme congelato (fig.17).

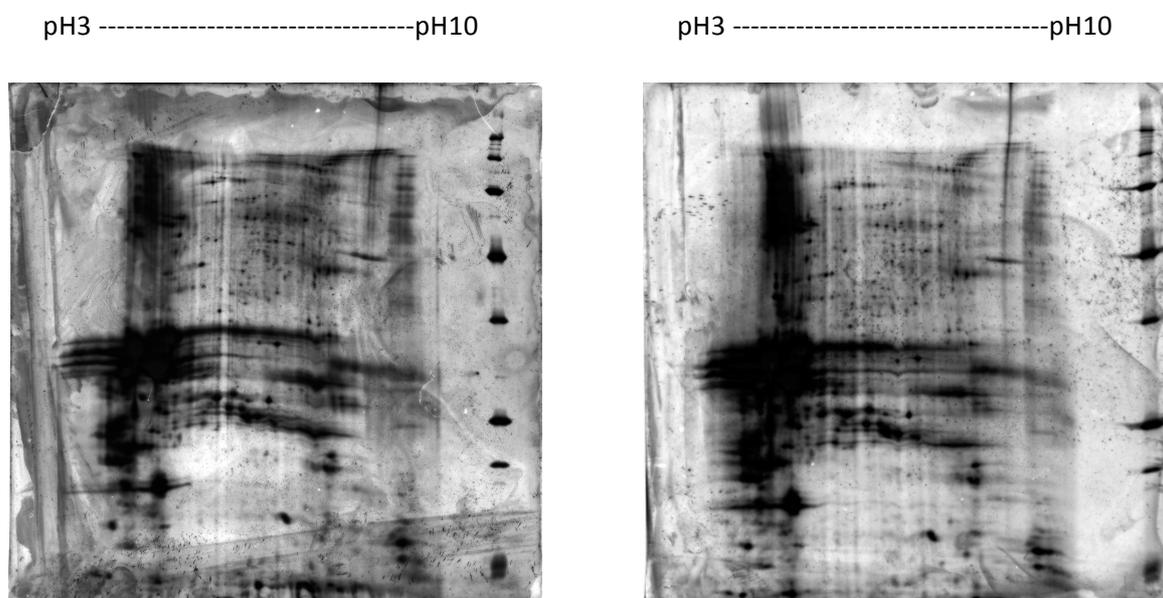


Figura 17 – 2D-SDS PAGE delle proteine contenute in 1 (a sinistra) e 2 (a destra) paillettes di seme congelato equino in Extender INRA82, IPG 3-10 pH NL 13 cm (70µg) in Silver Stain.

Circa a livello del pH 4 è ben visibile un grosso spot multiplo che ricorda molto l'immagine tipica delle caseine del latte, e che certamente è dovuto alla presenza dell'extender INRA82 a base di latte scremato in polvere.

#### **4.2 Prova per stabilire il numero minimo di lavaggi utili a purificare il seme congelato dall'extender**

E' stata effettuata una elettroforesi monodimensionale comparativa delle proteine estratte secondo il protocollo sopra descritto da 1 e da 2 paillettes di seme congelato, con le proteine del latte scremato per uso alimentare, al fine di valutare se i grossi spot visibili nella precedente prova con 2D SDS PAGE potevano essere imputati all'uso dell'extender INRA

82, il quale è composto per circa il 98% da latte scremato in polvere (fig. 18).

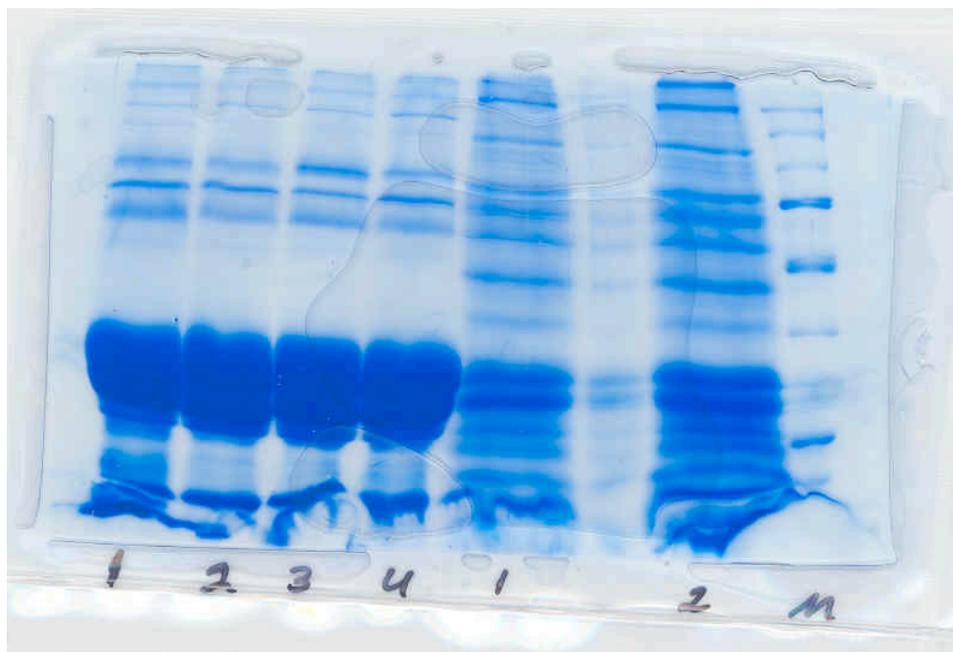


Figura 18 – 1D di campioni di latte scremato (1-4, a sinistra) e delle proteine estratte da 1 e 2 paillettes di seme equino congelato (a destra, col marcatore) con extender INRA 82 (Palmer et al., 1982) (glucose, 5 g; lactose 300mg; raffinose, 300 mg ; trisodium citrate dihydrate, 60 mg; potassium citrate, 82 mg; Hepes, 952 mg; penicillin, 10 I.U./ml; gentamycin, 10 ug/ml; water to 100 ml and UHT skimmed milk, 100 ml)

L'evidente similarità delle bande dei campioni comparati, ha richiesto la messa a punto di un protocollo standardizzato di estrazione delle proteine seminali da seme congelato diverso da quello utilizzato per le classiche analisi proteomiche da altri tessuti, al fine di eliminare la componente delle caseine dell'extender, senza al contempo inficiare la resa di estrazione stessa.

Si è proceduto quindi ad una nuova estrazione proteica da 2 paillettes di seme, per un totale di 8 cicli di centrifugazione (2000g, per 20', a 25°C), ogni volta risospendendo il pellet proteico ottenuto con PBS a 37°C in rapporto 1:1 col volume iniziale, e stoccando i successivi surnatanti (S1-S8).

Successivamente è stata effettuata l'estrazione proteica dai surnatanti stessi, dopo risospensione in tampone di solubilizzazione (800 µL per aliquota), e alla quantificazione mediante spettrofotometria. E' seguita quindi una elettroforesi monodimensionale, seminando per ciascun campione 10µg di proteine, con le seguenti condizioni di corsa

Condizioni allo Start	61V	10 $\mu$ A	1W
Condizioni allo Stop	>400V	20 $\mu$ A	9W
>2 hrs Tot			

I gel ottenuti, in triplice ripetizione, sono stati colorati quindi in Silver Stain (fig. 19).

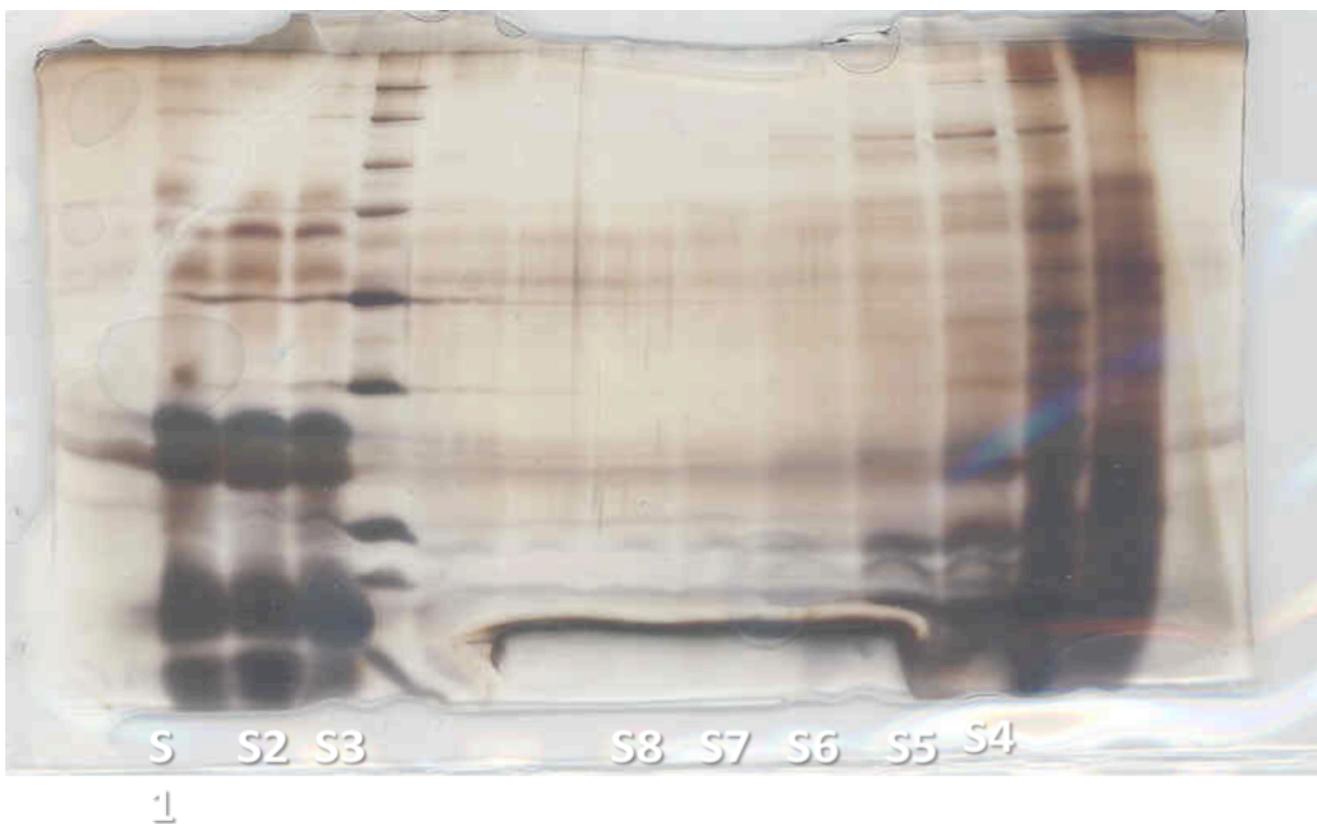


Figura 19 – 1D dei surnatanti ottenuti da 8 centrifugazioni e lavaggi scalari del pellet proteico di seme congelato con extender INRA82

### 4.3 Analisi comparativa di gel 2D-SDS PAGE di seme congelato di stalloni con diversi parametri di motilità post-scongelo

Il seme congelato di quattro stalloni in stabulazione presso il Centro di Riproduzione Equina Intermizoo spa (Vigona, PD), è stato sottoposto ad analisi elettroforetiche bidimensionali. Quattro paillettes commerciali da 0,5 mL di seme conservate con extender commerciale INRA82 (Palmer et al., 1982) sono state utilizzate per ciascuna analisi, con doppia ripetizione.

In accordo con le linee guida della WBFSH (World Breeding Federation for Sport Horses), che stabilisce come standard minimo di utilizzo del seme congelato un valore di 35% di PMS, i soggetti analizzati sono stati inquadrati come “good” (campioni 6 e 7) e “bad” freezer (campioni 3 e 5).

Di ciascun animale erano state precedentemente calcolate, tramite il dispositivo computerizzato CASA (computerized assisted sperm analyzer, Hamilton Thorne Biosciences, IVOS, Animal Version 12.3D Bild 002), le medie dei seguenti parametri seminali post-scongelo: motilità totale (MOT) e spermatozoi progressivamente motili (PMS= progressive motile spermatozoa) (tab.1).

STALLONE	MOT %		PMS %	
	Media	d.s.	Media	d.s.
Campione 3	34.7	8.7	27.1	5.5
Campione 6	59.9	6.4	46.3	7.3
Campione 5	22.7	9.8	19.4	7.8
Campione 7	43.1	10.1	34.7	8.4

Tabella 1 - Medie e deviazioni standard di %MOT e %PMS post scongelamento. I campioni 3 e 5 sono stati considerati “bad” freezer, e i campioni 6 e 7 “good” freezer in accordo con le linee guida del WBFSH

Le analisi di proteomica sono state condotte in cieco, sia per quanto riguarda i parametri di motilità che di concentrazione totale di spermatozoi/paillette.

Sono state utilizzate IPG strip a pH 4-8 non lineare 13 cm (GE Healthcare®).

La seconda dimensione è stata eseguita su gel da 75 ml al 12,5% di acrilamide (AA 30%, Tris, SDS10%, TEMED, APS10%, acqua a volume), in tampone di corsa SDS-GLY 10x (running buffer con TRIS 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%). Si è proceduto quindi a colorazione con protocollo Silver Stain (200 mL per gel).

Le immagini dei gel sono state acquisite mediante scansione con il sistema per l'acquisizione delle immagini Pharos FX (Bio-Rad). L'analisi comparativa mediante software dedicato Image Master 2D Platinum (GE Healthcare, NJ, USA) ha permesso l'identificazione, la quantificazione e la comparazione degli spot visualizzati, e dunque la creazione di una mappa di riferimento (Map Master) con 124 spot diversi, ottenuta mediante cross-matching di tutti i gel prodotti. Per ogni spot sono stati stimati dal software il peso molecolare mW e il punto isoelettrico pI, basandosi sulla posizione del marcatore e sulla distribuzione del gradiente di pH nelle IPG strip. Per minimizzare gli errori causati dalla modificazione manuale degli spot visibili dopo scannerizzazione, il contenuto proteico relativo di ogni spot (espresso in pixel) è stato normalizzato e convertito in percentuale sulla base dell'ammontare totale delle proteine rilevate. Il volume relativo (PSV, percent spot volume) di ogni spot su ciascun gel 2D è stato calcolato dal software mediante la formula  $PSV = v/vTOT \times 100\%$  (dove v indica il volume del singolo spot, vTOT il volume totale di tutti gli spot considerati in una determinata area). Un sistema numerico è stato applicato dal software per assegnare ad ogni spot rilevato un numero identificativo arbitrario. L'analisi comparativa ha evidenziato numerose differenze inter-individuali. Le modificazioni più significative sono state a carico di 10 spot (fig. 20). Alcuni spot sono stati identificati mediante ricerca bibliografica di mappe proteomiche esistenti in altre specie (Martinez-Heredia et al., 2006; Mortarino et al., 2008; Jobim et al, 2004; Novak et al., 2010; Cardozo et al, 2006; Lehay et al, 2001, Swiss Prot Data Bank).

I dati sono poi stati analizzati utilizzando ANOVA con un cut-off di significatività statistica di  $P < 0,05$ .

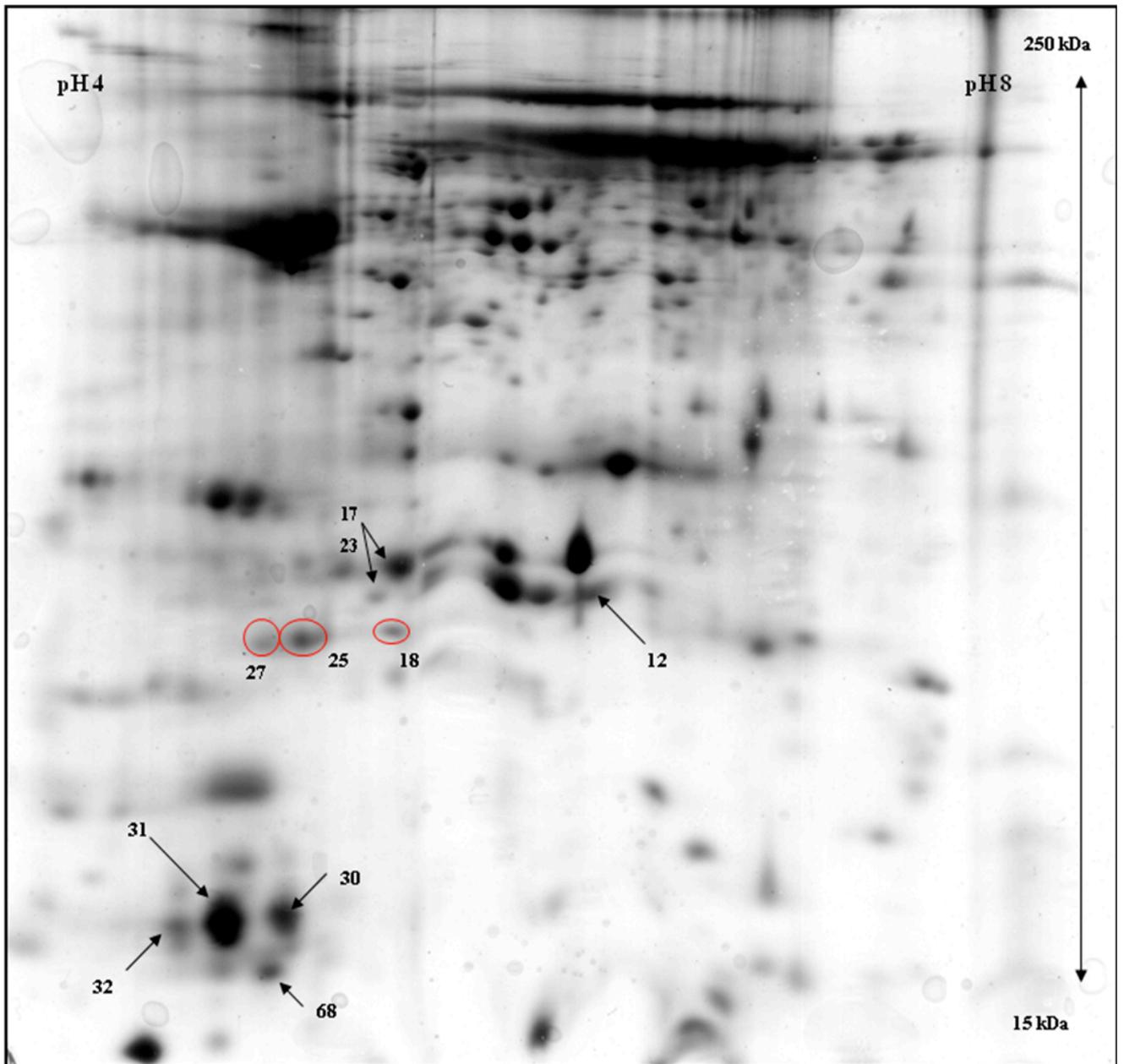
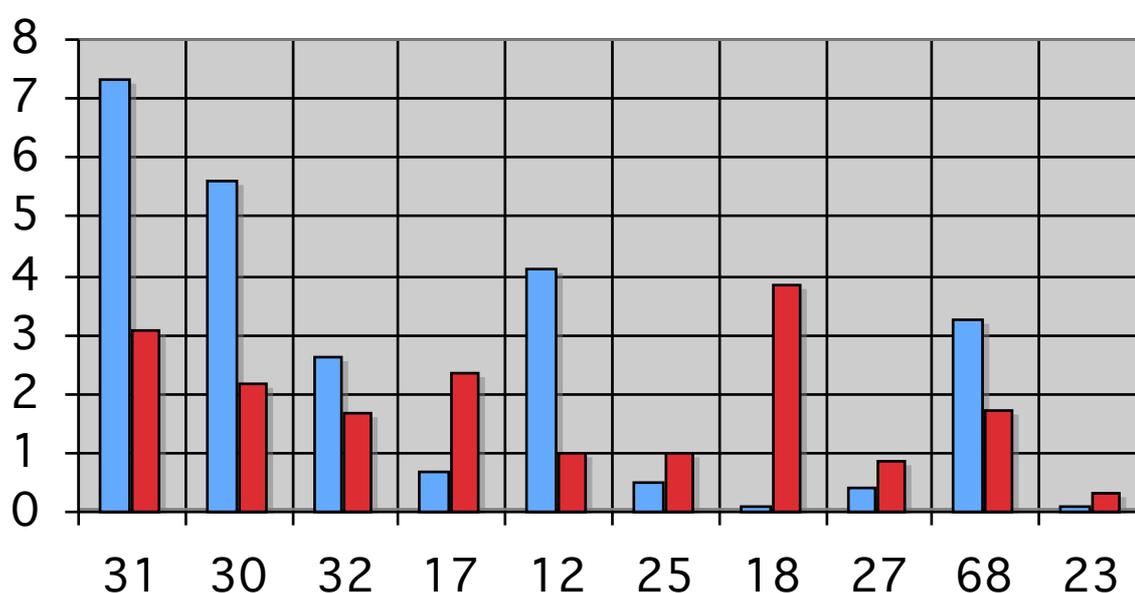


Figura 20 – Map Master del proteoma di seme equino congelato, IPG pH 4-8 NL 13 cm 12,5% AA, Silver Stain. In evidenza gli spot proteici che hanno mostrato maggior variabilità nella visualizzazione e nell'analisi d'immagine

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 Differenze nell'espressione proteica tra individui con parametri seminali diversi

Dai dati elaborati risulta che stalloni con alta (campione 6 e 7) o bassa (campione 3 e 5) motilità post-scongelo possiedono una diversa espressione a carico di alcuni spot proteici nei gel 2D SDS-PAGE (tab. 2)



Tab. 2 – PSV (volume percentuale) di alcuni spot rilevati nei gel in 2D SDS-PAGE del seme di stalloni clusterizzati in good e bad freezer in base alle differenze dei parametri di motilità MOT e PMS post-scongelo ( $P < 0,05$ )

Gli spots 27, 25 e 18 risultano corrispondere alla sp32 (proacrosin binding protein, 28-29kDa, pI 4.8-5.2) proteina implicata nella capacitazione e ben conservata tra le specie. Tale proteina inattiva la fosforilazione della tirosina durante la capacitazione e viene persa dalla membrana plasmatica dopo la reazione acrosomiale. E' stata ampiamente descritta nel suino, come proteina con un peso molecolare compreso tra 25 e 29 kDa, nonostante dalla sequenza amminoacidica si deduca che il suo precursore abbia un peso molecolare di 61 kDa. La p32 probabilmente è implicata nella conversione del precursore inattivo della proacrosina in acrosina. Nei gel tale proteina appare sottoforma di una catena di tre spot con punti isolettrici

lievemente dissimili, ad indicare probabilmente modificazioni post-translazionali (Leahy et al, 2011) quali la fosforilazione che avviene alla capacitazione.

Lo spot 12 sembrerebbe corrispondere alla CRISP3 (cysteine-rich secretory protein), 25 kDa, pI 7,54), proteina specie specifica del plasma seminale equino e correlata positivamente alla fertilità (Novak et al, 2010); tuttavia, nella sua isoforma contenente l'acido glutammico al posto della lisina in posizione 208, sembra essere correlata negativamente alla fertilità. Nel topo sembra implicata nella fusione con l'oocita (Da Ros et al., 2008).

Gli spots 17 e 23 corrisponderebbero alle isoforme della kallicreina (27 kDa pI 5.51), proteine del plasma seminale correlate negativamente alla concentrazione spermatica e positivamente al volume di eiaculato. (Novak et al., 2008). Tale correlazione induce a supporre che la sua abbondanza nel seme sia indice di una relazione inversa con la fertilità, in quanto stalloni che producono seme più concentrato presentano una migliore "congelabilità", e sottolinea come l'abbondante presenza di plasma seminale non sia predisponente per un buon congelamento.

Gli spots 31 e 32 sembrano essere simili alla aSFP (acidic protein bovin seminal plasma, 11-12 kDa pI 4.9), la quale è secreta dalle vescicole seminali, dalle ampulle e dall'epididimo, ma non dai testicoli. Tale proteina ha una sequenza amminoacidica simile per oltre il 50% ai polipeptidi appartenenti alla famiglia delle spermadesine (Mortarino et al., 1998), implicate nella capacitazione, nell'interazione con la zona pellucida dell'oocita e dunque nella fertilizzazione. Tale proteina tuttavia non sembra possedere nessuna attività di interazione con la zona pellucida, ma studi recenti dimostrano che possiede un ruolo di protezione della membrana spermatica dalla perossidazione lipidica indotta dai ROS (reactive oxygen species), ed è risultata associabile ad una migliore congelabilità nel seme di toro (Jobim et al., 2004). Gli spot 68 e 30, potrebbero corrispondere alla BSP A1/A2 bovina (16 kDa, pI 4.7-5.5) detta anche PDC109, proteina del plasma seminale che si lega specificatamente ai fosfolipidi di membrana degli spermatozoi all'eiaculazione e promuove la capacitazione. Si tratta della più abbondante proteina legante l'eparina nel plasma seminale bovino. La drastica diminuzione (70-80%) di tale proteina nel seme bovino dopo lo scongelamento e la sua abbondanza nel plasma seminale dei tori con buona congelabilità, induce a pensare che abbia un ruolo determinante nella protezione della membrana spermatica durante le procedure di crioconservazione (Jobim et al., 2004).

L'unico studio effettuato in 2D-SDS PAGE sull'intero eiaculato di stallone (Brando et al., 1999) ha rilevato 3 proteine (SP-2, 72 kDa e pI 6.0; SP-3, 18 kDa e pI 4.3; SP-4, 16 kDa e pI 6,5) presenti in concentrazioni più elevate negli stalloni con parametri di fertilità bassi, mentre l'SP-1 (72 kD e pI 5,6) era positivamente correlata con la fertilità, suggerendo una

certa omologia con la proteina a 55 kDa bovina associata alla fertilità negli studi di Killian et al. (1993). Le proteine del plasma seminale equino sono nel 70% dei casi a basso peso molecolare e spesso formano aggregazioni (Calvete et al., 1994); possono essere raggruppate in tre grandi categorie: proteine trasportatrici della fibronectina di tipo 2 (Fn-2), proteine secretorie ricche in cisteina (cysteine-rich secretory proteins, CRISPs) e spermadesine (Topfer-Petersen et al., 2005). Le proteine SP-1 e SP-2 (chiamate anche HSP-1 e HSP-2 in base al loro ordine di apparenza in cromatografia secondo lo studio di Calvete et al., 1994), sono corte proteine del tipo Fn-2, e simili alle proteine leganti l'eparina bovine, associate con la capacitazione. Le proteine Fn-2 si legano alla membrana fosfolipidica dello spermatozoo mediante la sfingomielinina, causando cambiamenti nella struttura della membrana stessa. L'ampulla è il sito di secrezione principale dell' SP-1 e SP-2, mentre nella cauda dell'epididimo è la proteina EQ-12, sempre della stessa famiglia, ad essere più abbondante (Ekhlesi-Hundriesen et al., 2005). Queste proteine sembrano correlate positivamente con la concentrazione spermatica nello stallone.

L'HSP-4 rilevata nello studio di Calvete et al., 1994, non è ancora stata identificata, ma è presumibile sia legata alla sintesi di calcitonina, i cui livelli sono correlati alla scarsa motilità del seme di uomini infertili (Munga et al., 2001). L'unica spermoadesina identificata nel plasma seminale equino è la HSP-7, simile alla AWN-1 suina, ritenuta responsabile dell'attività di legame alla zona pellucida.

Nel suino tra le spermadesine non leganti l'eparina vanno ricordate le PSP-1 e PSP-II, poiché sembrano mostrare benefici effetti sulla motilità del seme con un comportamento dose- e tempo-dipendente (Centurione et al., 2003).

La composizione del plasma seminale quindi varia tra le specie e non sempre è possibile stabilire una comparazione corretta. Alcune di queste proteine variano la loro concentrazione con la stagione. Negli ovini alcune proteine plasmatiche sembrano prevenire lo shock da raffreddamento e i relativi danni alla membrana, quali la P14 (14 kDa) e P20 (20 kDa). La P14 è simile alla PDC-109 bovina (chiamata anche BSP A1/A2) (2,3) e alla GSP-14/15 kDa. Probabilmente si tratta di due forme glicosilate o fosforilate della stessa P14 (Bergeon et al. 2006), che stabilizza la membrana e partecipa alla capacitazione rilasciando colesterolo e legando quello HDL e l'eparina.

In questo studio la correlazione tra PVC e parametri seminali mette in luce come gli spot rilevati, dopo chiaramente conferma della loro effettiva corrispondenza con le sequenze amminoacidiche depositate, potrebbero essere i candidati ideali come biomarker di buona congelabilità del seme e parametri di motilità post scongelamento nello stallone, in linea con i

cut-off suggeriti dal WBFSH. Ovviamente sono necessarie ulteriori indagini e una casistica molto più ampia per confermarne la validità. Tuttavia se il protocollo di estrazione e di separazione elettroforetica è efficace, così come risulta dal presente studio, la spettrometria di massa, le colorazioni fluorescenti e l'identificazione dell'esatta sequenza amminoacidica di tali spot potrebbero in futuro consentire la messa a punto test di screening rapidi (ELISA, ad esempio), e semplificare notevolmente la scelta degli stalloni da impiegare nei programmi di congelamento del seme.

## **5.2 Problematiche nell'uso di seme congelato**

L'analisi proteomica del seme congelato in extender a base di latte scremato ha evidenziato la difficoltà nell'estrazione e nella visualizzazione degli spot proteici attorno al pH 4 (pI teorico delle caseine del latte), e dunque ha richiesto diverse modifiche dei normali protocolli impiegati nell'elettroforesi bidimensionale e della preparazione del campione, al fine di garantire l'ottimizzazione della resa di estrazione. L'utilizzo di seme congelato anziché fresco in questo studio è stato vincolato dalla disponibilità dei campioni da analizzare, ma va sottolineato che tutto ciò può rappresentare un vantaggio in termini prettamente commerciali. L'obiettivo ultimo in andrologia veterinaria, rispetto a quella umana, resta comunque l'ottimizzazione dei costi e la minimalizzazione degli sprechi. Attualmente l'aumentata richiesta di seme congelato nell'applicazione della IA e i contrastanti studi sul reale valore predittivo della motilità del seme post-scongelo presuppongono che vengano messi a punto dei test di verifica dell'effettivo valore fertilizzante del seme congelato. Un numero considerevole di stalloni considerati fertili rimane infatti escluso dai programmi di monta a causa di una scarsa resa dopo lo scongelamento e del basso indice di fertilizzazione (Loomis and Graham, 2008). Inoltre vi è un alto grado di variabilità individuale nella risposta ai protocolli di congelamento, soprattutto rispetto ai parametri di motilità del seme (Sieme et al., 2008), tuttora non chiarita dalle analisi seminologiche tradizionalmente prese in considerazione nei Centri di Incremento, così come sono scarsamente conosciuti i meccanismi di risposta allo stress ossidativo conseguente alla crioconservazione e la risposta cellulare al congelamento. La classificazione dei soggetti in "buoni" o "cattivi" riproduttori è basata soprattutto sui parametri di motilità spermatica post-congelamento, con particolare attenzione alla percentuale degli spermatozoi progressivamente motili (PMS). Circa il 30%

degli stalloni mostrano una buona “congelabilità” del seme, con più del 40% di spermatozoi progressivamente motili post scongelamento, ma tuttora circa il 20% degli stalloni presentano meno del 20% di PMS e vengono esclusi dai programmi di monta. Vidament et al., (1997) suggeriscono di accettare come stalloni solo i soggetti che esibiscono più del 35% di spermatozoi progressivamente motili post-scongelamento e con una velocità “rapida” (superiore ai  $30\mu\text{ms}^{-1}$ ) e per più di un terzo degli eiaculati di una stagione riproduttiva. Loomis e Graham (2008) suggeriscono invece di inserire nel programma di congelamento solo stalloni la cui motilità progressiva post-scongelamento sia superiore al 30% dopo incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti in almeno il 25% degli eiaculati totali.

Il seme di stallone è generalmente congelato utilizzando un medium di congelamento, l’extender, che consiste in linea di massima in latte scremato, tuorlo d’uovo e glicerolo come crioprotettivo. L’extender o mestruo diluente serve essenzialmente a prolungare la vita degli spermatozoi e permetterne la conservazione a lungo termine nello stato di congelamento, fornendo loro sostanze nutritive (zuccheri), stabilizzando i sistemi enzimatici, mantenendo le membrane integre, controllando il pH e l’osmolarità (attraverso gli elettroliti), aumentando le difese antiossidanti, proteggendoli dallo shock da freddo (tramite proteine) e dai cataboliti tossici prodotti dagli spermatozoi stessi e prevenendo la crescita microbica (con l’utilizzo di antibiotici). Serve anche a rendere il seme più maneggevole, poiché gli spermatozoi non diluiti tendono ad agglomerarsi rendendo impossibile una loro corretta valutazione in microscopia (Alvarenga et al., 2005). L’extender aumenta inoltre il volume totale di eiaculato, permettendo l’inseminazione di un numero maggiore di fattrici. Sono stati effettuati molti studi per trovare il diluente ideale, ma la risposta resta soggettiva. L’effetto protettivo dei diluitori nei confronti dello shock da raffreddamento è stato dimostrato nel lavoro di Aurich et al. (2006). L’efficacia dei diluitori è generalmente stimata tramite la valutazione della motilità spermatica post scongelamento e del tasso di concepimento, ma spesso si tiene conto solo del parametro motilità che è quello più semplice da valutare nella specie equina. Nella cellula spermatica il freddo e lo stress osmotico sono le principali cause di danno alle membrane. Secondo Graham il principale danno da freddo al quale gli spermatozoi vanno incontro è quello che si verifica a carico della membrana plasmatica. Altri danni causati dal freddo che si possono verificare sono la formazione dei cristalli di ghiaccio, le alterazioni del DNA, lo stress osmotico e quello ossidativo. Sia la membrana cellulare che quella mitocondriale sono vulnerabili ai processi di congelamento e scongelamento e sembrano essere le strutture più sensibili. Un eventuale danno al DNA

indotto dal congelamento e dallo scongelamento, necessiterebbe difatti di un maggiore periodo d'incubazione post scongelamento per manifestarsi, in confronto alla perdita dell'integrità della membrana cellulare e del potenziale di membrana mitocondriale; ciò suggerisce che il DNA è una struttura meno vulnerabile e che un approccio esclusivamente genomico non potrebbe condurre all'individuazione di marcatori predittivi della buona congelabilità del seme.

Anche lo scongelamento danneggia le cellule a causa della ricristallizzazione e della modificazione del gradiente osmotico, procurando ulteriori danni alla membrana o morte cellulare. Generalmente, cellule congelate in modo rapido richiedono anche uno scongelamento rapido. Processi di raffreddamento troppo rapidi o troppo lenti possono causare danni letali per le cellule spermatiche: gli abbassamenti troppo rapidi della temperatura portano alla formazione di numerosi cristalli di ghiaccio intracellulari, perché l'acqua non ha il tempo necessario per portarsi nello spazio extracellulare; con un raffreddamento troppo lento invece, la cellula va incontro a una disidratazione eccessiva, mentre un raffreddamento più graduale permette all'acqua di uscire dalla cellula e di ghiacciare esternamente. La velocità di raffreddamento ideale dipende dalla permeabilità della membrana cellulare all'acqua in relazione alla presenza di ghiaccio extracellulare e di sostanze crioprotettive, per cui non è mai costante e deve essere in funzione della tecnica di congelamento adottata. Bisogna inoltre tener conto delle dimensioni dei cristalli di ghiaccio: più sono grandi i cristalli di ghiaccio, più danni arrecano alle cellule, mentre è noto che i microcristalli che si formano con un abbassamento ultrarapido della temperatura non causano danni diretti. Se lo scongelamento non è altrettanto rapido tuttavia, i microcristalli si possono aggregare e formare dei complessi voluminosi che danneggiano irreversibilmente la cellula. Nella maggior parte dei casi le cellule con cristalli di ghiaccio intracellulari che coinvolgono più del 10%-15% dell'acqua iniziale o che si sono disidratate troppo, diventano osmoticamente inattive o vanno incontro a lisi, perché la membrana cellulare perde la sua integrità strutturale.

L'abbassamento della temperatura quindi determina dei cambiamenti reversibili o meno a carico dello spermatozoo, chiamati "cold shock" o shock da freddo. Lo shock da freddo modifica l'ultrastruttura della membrana cellulare, in modo spesso irreversibile: con l'abbassarsi della temperatura la fase fluida della porzione lipidica passa a quella solida e la porzione proteica si aggrega.

Questi cambiamenti rendono la membrana instabile e ne alterano la permeabilità: le pompe ioniche ATP dipendenti perdono efficienza, con conseguente eccessiva

fuoriuscita di  $K^+$  e ingresso di  $Na^{2+}$ , portando a una persistente depolarizzazione e all'apertura dei canali al  $Ca^{2+}$ . La perdita dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$  porta infine all'attivazione di enzimi ad attività litica come le ATPasi, le fosfolipasi, le proteasi e le endonucleasi, con conseguenti alterazioni del corredo proteico.

Sarebbe importante valutare anche il rapporto della diluizione con extender: l'aggiunta di volumi maggiori di diluente aumenta lo stress osmotico perché incrementa il gap di osmolarità tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare dovuto alla riduzione della concentrazione di glicerolo extracellulare.

Nel lavoro di Peña & Linde-Forsberg (2000) la diluizione 1:4 del seme ha comportato valori più bassi di motilità progressiva immediatamente dopo lo scongelamento, anche se ha migliorato la longevità delle cellule rispetto a diluizioni minori. Studi recenti tuttavia contrastano con quelli precedenti, dimostrando che non esiste una correlazione positiva tra l'integrità di membrana e i parametri di motilità spermatica nello stallone (Foster et al., 2011).

L'importanza dell'utilizzo dell'extender nel seme congelato è inattaccabile; tuttavia la sua presenza complica notevolmente le analisi proteomiche, inficiando la resa di estrazione proteica, la corretta focalizzazione in IEF e la nitida visualizzazione degli spot nei gel in 2D SDS-PAGE. In questo studio è stato dimostrato che effettuando 4 lavaggi in PBS dei campioni di seme congelato è stato possibile eliminare gran parte delle caseine presenti nell'extender INRA82, ma è ovvio che ogni manipolazione aggiuntiva del seme scongelato va a inficiare la resa di estrazione proteica e favorire le modificazioni proteiche (con conseguente spostamento dei valori di mW e pI rispetto a quelli teorici) causate dall'attivazione di enzimi ad attività proteolitica. In futuro potrebbe essere utile correlare le analisi proteomiche relative a campioni di seme fresco e congelato anche con extender diversi, meglio se non a base di latte scremato.

### **5.3 Proteine del plasma seminale e ROS**

L'astenozoospermia, ovvero la ridotta motilità spermatica, è una causa comune di infertilità soprattutto nella specie umana (Wang et al., 2009). Recenti studi dimostrano che oltre l'80% di campioni seminali di soggetti infertili possiedono una bassa motilità (Curi et al, 2003). Diversi studi mediante 2D SDS-PAGE e spettrometria di massa dimostrano che la presenza

del plasma seminale ricco in fruttosio e insulin-like growth factor-I è associata ad una migliore motilità del seme (LI et al., 2008). Wang et al., (2009) hanno dimostrato un incremento di 3,3 volte dei ROS è presente nei campioni di seme di soggetti astenozoospermici.

Il plasma seminale è secreto dall'epididimo e dalle ghiandole sessuali accessorie, e contiene molti tipi di proteine, ioni, lipidi e carboidrati, e rappresenta il medium fisiologico per la maturazione finale degli spermatozoi (Jobim et al., 2004). La sua importanza ai fini del mantenimento della motilità spermatica è stato dimostrato nel bovino e nell'ovino (Baas et al., 1983; Graham, 1994), e anche per quanto concerne la resistenza allo shock da raffreddamento in seme congelato bovino (Pursel, 1973). Il plasma seminale può influenzare in vari modi la resa al congelamento del seme. Tuttora esistono scuole di pensiero contrastanti a favore o contrarie alla sua persistenza nei protocolli di congelamento. Essendo un'importante fonte di sostanze antiossidanti, una volta che questo viene eliminato gli spermatozoi diventano più vulnerabili agli effetti tossici delle ROS. In questo studio gli spot che hanno subito maggiori modificazioni tra soggetti "good" e "bad" freezer sembrano corrispondere proprio a proteine specifiche del plasma seminale.

La produzione di energia attraverso la via aerobica implica la produzione di piccoli quantitativi di forme reattive dell'ossigeno (ROS, reactive oxygen species) che si formano durante le normali reazioni di ossido-riduzione della respirazione cellulare, ma anche metalli di transizione liberi come il  $Fe^{2+}$  e il  $Cu^+$  possono catalizzarne la produzione. Le specie reattive sono mantenute entro livelli non dannosi grazie a fisiologici meccanismi di difesa cellulari. L'accumulo di ROS che comporta un danno ossidativo alle cellule spermatiche è il risultato di uno squilibrio tra i sistemi di produzione e eliminazione dei radicali liberi. Gli effetti dell'accumulo di ROS sono principalmente tre: la perossidazione lipidica con la formazione di perossidi, sostanze molto instabili e reattive che inducono una reazione a catena autocatalitica; alterazioni ossidative a carico delle proteine (ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi, formazione di legami crociati proteine-proteine e frammentazioni della catena proteica); e infine danni al DNA (legami tra le basi e rotture dei filamenti). Lo stesso processo di congelamento del seme è una delle principali cause di eccessiva produzione di ROS. Quest'ultima è associata alla riduzione della motilità, alla ridotta capacità di fusione con l'oocita e, in senso lato, all'infertilità. Le specie reattive più comuni sono l'anione superossido, il perossido d'idrogeno, i radicali perossidi e idrossilici, l'ossido nitrico e l'anione perossinitrico. Il perossido d'idrogeno è una specie radicale molto reattiva e un potente iniziatore della perossidazione lipidica ed è

considerato la specie reattiva più tossica a causa della sua capacità di attraversare facilmente e rapidamente le membrane, di inibire le attività enzimatiche e le funzioni cellulari. La sua tossicità è collegata principalmente all'attivazione dell'enzima glutatione perossidasi/reduccasi. La catalasi è l'enzima d'elezione nella protezione della cellula da questa specie reattiva. Nell'eiaculato umano i radicali dell'ossigeno vengono prodotti dagli spermatozoi stessi e dai leucociti eventualmente presenti nel liquido seminale, ed è stato confermato essere così anche nel toro, nel topo e nel coniglio, per cui si può ipotizzare un processo analogo anche nel cavallo.

Le cellule scongelate sembrano più sensibili all'ossidazione rispetto a cellule non congelate, perché lo stesso grado di ossidazione viene raggiunto a concentrazioni di ROS inferiori (Wang et al., 2009). Questo potrebbe essere dovuto all'eliminazione del plasma seminale che contiene le risorse antiossidanti naturali del seme. Il danno da ROS ai fosfolipidi di membrana causa un aumento della permeabilità della membrana stessa, con perdita dell'equilibrio osmotico ed elettrolitico (aumento intracellulare di  $\text{Na}^+$  e di  $\text{Ca}^{2+}$  e riduzione intracellulare di  $\text{K}^+$ ). Può causare inoltre la distruzione diretta o l'inattivazione di enzimi (perossidazione delle proteine), in particolar modo a carico degli enzimi acrosomiali, del citoscheletro e dell'assonema, e persino danneggiare l'integrità del DNA. Infatti la perossidazione del DNA può portare alla formazione di legami crociati, sostituzione di basi o addirittura alla rottura di porzioni di DNA. L'ossidazione dei gruppi SH (tioli) delle proteine risulta essere associata all'inibizione della motilità e della capacità fecondante. La perossidazione lipidica è stata invece positivamente correlata a reazioni acrosomiali anomali e perdita della fluidità di membrana, con conseguente riduzione della motilità spermatica post scongelamento e del potenziale di fertilizzazione degli spermatozoi.

Questi danni ossidativi possono causare un'alterazione del metabolismo cellulare, tra cui la riduzione dei livelli di ATP, che conduce ad un'irreversibile perdita della motilità e della capacità fecondante degli spermatozoi. Gli effetti causati dalle specie reattive dell'ossigeno dipendono dalla loro natura, quantità, momento e durata dell'esposizione. La produzione controllata di ROS da parte degli spermatozoi ha una funzione di controllo e di mediatore di eventi fisiologici come la capacitazione, l'iperattivazione, la reazione acrosomiale e la fusione oocita-spermatozoo, per cui lo scopo finale dei protocolli di congelamento non deve essere quello di eliminare completamente le specie reattive, ma di mantenerle entro livelli fisiologici. Una quantità eccessiva di ROS al contrario è fortemente tossica per la cellula spermatica; può essere dovuta alla deplezione o all'inefficienza dei

meccanismi di controllo enzimatici, può essere causata dalla presenza di troppi spermatozoi difettosi o danneggiati, o da leucociti presenti nel materiale seminale. La produzione endogena di ROS può essere aumentata anche dal processo di congelamento e scongelamento del seme in sé e la frammentazione nucleare progredisce in modo lineare con il numero dei cicli di congelamento-scongelamento. Il danno al DNA da parte delle specie reattive dell'ossigeno avviene molto prima di qualsiasi alterazione visibile nella fusione sperma-oocita o nella motilità, e consiste nella formazione di nuovi legami (cross-linking), nella frammentazione e nello scambio di basi della sequenza genica ed è causato dalla perossidazione lipidica. Alcuni fattori possono incrementare lo stato ossidativo delle cellule durante la loro criopreservazione.

Anche se gli spermatozoi sembrano beneficiare della presenza del plasma seminale durante il raffreddamento, ci sono numerosi effetti negativi che può esplicare sulla motilità in concentrazioni eccessive (Jakso et al., 1991, Brinsko et al., 2000).

Secondo Scherzer et al. un contenuto di plasma seminale inferiore al 12% del volume totale del seme diluito ha dimostrato di migliorare la qualità del seme congelato e addirittura, l'aggiunta di circa 30% di plasma seminale di seme di stalloni good freezer ha migliorato la motilità progressiva post scongelamento del seme di stalloni bad freezer, dimostrando che forse non tutti i componenti del plasma seminale sono dannosi per il mantenimento della motilità progressiva. La concentrazione ottimale di plasma seminale è ad oggi stimata attorno al 5-10% o anche meno (Todd et al., 2001). Molte differenze di composizione ed effetti sugli spermatozoi sono presenti nel plasma seminale di individui diversi o anche nelle frazioni di eiaculato dello stesso individuo: la frazione più ricca di cellule sembra essere più resistente al congelamento (Karesoski et al., 2006).

## 6. CONCLUSIONI

Nonostante l'approccio genomico-funzionale basato sullo studio del Dna e dell'Rna (per esempio l'analisi d'espressione genica con microarray) siano estensivamente utilizzate e di enorme importanza scientifica, tuttavia non chiariscono niente di importante a livello dell'espressione proteica, delle isoforme che possono essere prodotte da un medesimo gene, o l'esistenza di modificazioni post-traduzionali. (Brwis, 1999). Lo studio della caratterizzazione, dell'espressione e dell'identificazione delle proteine è difficoltoso quanto essenziale per aprire nuovi capitoli sulla conoscenza dei meccanismi cellulari. La proteomica è una tecnica interdisciplinare, in quanto richiede la conoscenza integrata di molteplici campi di ricerca scientifica: genomica, spettrometria di massa, bioinformatica, separazione proteica. Nonostante il numero dei geni codificanti proteine nei mammiferi sia sorprendentemente piccolo (nell'uomo se ne contano circa 22-25000) (Stein, 2004), è ormai chiaro che il numero delle proteine è notevolmente superiore (almeno 300000) (Harrison et al, 2002), in seguito agli splicing alternativi, proteolisi, fosforilazione, glicosilazione, etc.). Ogni tipo cellulare esprime ovviamente solo una parte del proteoma globale di un individuo, forse 10-12000 proteine diverse. Ma i fluidi, come il siero o l'eiaculato, possono essere molto più complessi, anche perché possono contenere prodotti di degradazione delle proteine stesse, o altri tipi di cellule, microbi (Anderson and Anderson, 2002). Tuttavia non sono i grandi numeri a rendere la proteomica una scienza molto complessa, ma semmai quelli piccoli: la difficoltà primaria nella messa a punto di un disegno sperimentale è garantire l'identificazione delle proteine meno abbondanti, che potrebbero essere quelle biologicamente rilevanti.

Altro step fondamentale è l'ottimizzazione del metodo di estrazione delle proteine, poiché l'utilizzo di detergenti non caricati nell'IEF rende difficile la solubilizzazione di alcune proteine molto idrofobiche (come quelle della membrana) o di complessi proteici molto grossi (Rabilluud, 2009). Ecco perché in molti studi i peptide mass fingerprintings (PMFs) sono quasi tutti identificabili con proteine del citosol quindi solubili e raramente della membrana (Secciani et al., 2009).

L'importanza crescente dell'utilizzo di metodologie proteomiche per lo studio degli spermatozoi è dovuta al fatto essi rappresentano il modello ideale post-genomico .

E' chiaro che lo studio di cellule intere non pre-frazionate non può fornire informazioni definitive a proposito delle proteine localizzate a livello subcellulare.

Tuttavia la proteomica può essere integrata da altre metodologie, quali l'utilizzo di anticorpi e reazioni colorimetriche.

Una correlazione statistica tra i dati relativi alla congelabilità del seme e alle variazioni dell'espressione proteica potrebbe condurre all'identificazione di potenziali biomarker di qualità seminale in vivo. A livello molecolare l'esito finale della riproduzione dipende essenzialmente dalle complicate interazioni tra molteplici proteine. Nel'ultimo decennio studi effettuati sull'interazione oocita spermatozoo hanno dimostrato che la presenza e le varie interazioni tra specifici prodotti proteici sono il punto di partenza dello sviluppo della vita nell'uomo e negli animali tipicamente oggetto di studi scientifici (De Mateo et al., 2008). Tuttavia molti aspetti di tali interazioni restano tuttora inspiegati a livello molecolare. Il crescente interesse nei confronti dei meccanismi riproduttivi, soprattutto in relazione alle problematiche riguardanti l'infertilità umana e degli animali d'allevamento, e la messa a punto di tecnologie di genomica e proteomica sempre più specifiche, hanno contribuito a ridurre il gap esistente tra fenotipo e meccanismi molecolari. In particolare proteine coinvolte nell'interazione sperma-oocita e proteine specifiche del tratto riproduttivo femminile o maschile. Forze evolvuzionistiche non ancora completamente decifrate possono inoltre essere d'aiuto nella stesura di un albero funzionale relativo a proteine dalle potenzialità funzionali non ancora chiarite.

La popolazione spermatica è talmente varia che sarebbe necessario un approccio proteomico futuro con proteine pre-frazionate, cellule in diverso stato funzionale (immaturi vs maturi, capacitati e non, con parametri seminologici normali o difettosi) o localizzazione (ad esempio quelli stoccati nel caput o nella coda dell'epididimo, dove avvengono la maggiori modificazioni post-traduzionali essendo silenziata la trascrizione genica) (Aitken et Baker, 2007). Negli spermatozoi umani sono stati rilevati molti recettori proteici sulla superficie (baker et al., 2007), quali i recettori per la tirosina kinasi/fosfatasi, per il progesterone, canali ionici quali i GIC (glutamated-gated Ion Channel).

Creando delle mappe proteomiche sempre più accurate. Questi dati sono preliminari ad una ricerca ben più ampia. Interessante sarebbe l'analisi del proteoma tra spermatozoi a diverso stato funzionale (maturi e immaturi; capacitati e non, con parametri seminali normali o difettosi, quali la motilità, la concentrazione, anche nello stesso individuo, in periodi fisiologici diversi della propria attività riproduttiva. Interessante sarebbe dunque il confronto tra analisi proteomica e stato ossidativo degli spermatozoi.

Come già detto gli spermatozoi sono cellule dalle limitate difese contro i ROS (reactive oxygen species), a causa del complesso riarrangiamento del loro DNA e dell'estrusione di gran parte del citoplasma durante le ultime fasi della spermatogenesi. I ROS sono normalmente prodotti dagli stessi spermatozoi, poiché giocano un ruolo importante nella capacitazione, nell'attivazione e nella fusione con l'oocita, e i loro effetti deleteri sono normalmente bilanciati dalla presenza di scavengers, molecole dal potere antiossidante. La manipolazione e i metodi di crioconservazione amplificano gli effetti deleteri dei ROS sul seme, per cui anche stalloni di provata fertilità possono dare risultati deludenti quando si applicano le biotecnologie. Un'accurata indagine proteomica delle modificazioni subite a livello proteico in seguito ad aumentato livello di ROS, potrebbe dimostrare una correlazione significativa tra i livelli di stress ossidativo cellulare e performances riproduttive, in modo da ampliare il database di informazioni seminologiche. E' stato riscontrato che i livelli di radicali liberi (reactive oxygen species) sono 3,3 volte più alti negli uomini astenospermici rispetto a quelli sani, e che tale dato mostra correlazione positiva con la downregolazione della DJ-1 (20 kDa), una proteina coinvolta nel controllo dello stress ossidativo. Mentre sembrano essere up-regolate la gliceraldeide -3-fosfato deidrogenasi (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – GADPH), la L-lactate dehydrogenase B chain e la clisteri. L'omologo è la SP221 o Cap1 del ratto. (Wang et al, 2004)

Tali informazioni, uniti alle moderne tecnologie di microarray, potrebbero fornire la messa a punto di un test rapido, semplice e relativamente economico per lo screening della congelabilità del materiale seminale e del potenziale riproduttivo degli stalloni.

Questo lavoro ha quindi degli indubbi limiti e problemi non risolti, ma si tratta di uno studio pilota per testare nuovi approcci e ipotizzare quali proteine possono avere un ruolo chiave nello studio della fertilità e congelabilità del seme equino, finora poco chiaramente indagata.

Lo studio potrebbe essere ampliato in futuro aumentando il numero di campioni testati sia da soggetti con buoni parametri che sub fertili, e procedere con ulteriori indagini mediante MS.

Benché finora gli studi proteomici condotti sul seme in campo veterinario siano piuttosto sporadici e strettamente correlati ad una strumentazione di laboratorio sofisticata e personale tecnico adeguatamente preparato, in futuro non è escludibile una sua applicazione in larga scala di tipo clinico. L'obiettivo più prossimo resta la decifrazione dell'intero proteoma spermatico delle specie di interesse medico. Collateralmente, nuovi approcci proteomici condotti sul plasma seminale, la fosforilazione o la capacitazione, e studi comparativi con un numero sempre più vasto di popolazioni cellulari "normali" o anormali, possono condurre all'identificazione di biomarkers inequivocabili. Da questo punto di vista la ricerca veterinaria

potrebbe essere di grande aiuto anche a quella umana, avendo a disposizione modelli di studio in alto numero e reperibilità.

Questi dati confermano che la proteomica può essere di notevole ausilio in andrologia. Un'indagine proteomica affiancata da tecnologia MS potrebbe svelare modificazioni a carico del corredo proteico indotte da alti livelli di ROS nel seme anche di cavalli sottoposti a intensi esercizi fisici, al fine di svelare finalmente scientificamente, e non solo tramite prove empiriche, se esiste una correlazione diretta tra stress fisico e stress ossidativo anche nelle cellule spermatiche. L'utilizzo di questa tecnica elettroforetica potrebbe inoltre permettere lo studio delle modificazioni dei parametri seminali allo scongelamento utilizzando protocolli diversi di crioconservazione. Infine l'identificazione di ulteriori spot con diversa espressione e la correlazione con parametri seminali e dati sulla fertilità potrebbero consentire l'individuazione di biomarkers predittivi del potenziale riproduttivo degli stalloni e la messa a punto di test di screening facilmente commercializzabili.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Aitken RJ, Baker MA. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl*, 2007; 31:295-302.
- Aitken RJ, Nixon B. Proteomics of human sperm. In Krause WK, Naz RK. *Immune Infertility*, Berlin, Springer Verlag, 2009; pp 3-12.
- Baker MA, Hetherington L, Reeves G, Muller J, Aitken J. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics*, 2008; 8:2312-2321.
- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2005; 5: 1003-1012.
- Baker A, Reeves G, Hetherington L, Muller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene product present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Applic*, 2007; 1: 524-532.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1982; 6: 317-339.
- Brewis IA, Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod* 2010, vol 16, no 2, pp 68-79
- Calvel P, Rolland AD, Jégou B, Pineau C. Testicular postgenomics: targeting the regulation of spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2010; 365:1481-1500.
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004; 25(9): 1327-1333.
- Cardozo JA, Fernandez-juan , Forcada F, Abecia A, Muino-Blanco T, Cebrian-perez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 2006; 6: 841-850
- Chan CC, Shui HA, WU CH, Wang CY, Sun GH, Chen HM, WU GJ. Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *J proteome Res*, 2009, 1-26
- Colantonio DA, Chan DW. The clinical application of proteomics. *Clin Chim Acta*, 2005. 357: 151-158.

- Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cystein-rich secretory protein 1 (CRISP1). 2008, *Dev Biol*, 320: 12-8.
- De Mateo S, Martinez-Heredia J, Estanyol JM, Domiguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. *Proteomics*, 2007; 7: 4264-4277
- Du Plessis S, Kashou AH, Benjamin J, Yadav SP, Argwall A. *Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. Reprod Biology and Endocrinology*, 2011; 9:36
- Findlay GD, Swanson WJ. *Proteomics enhances evolutionary and functional analysis of reproductive proteins. bioassay*, 2010, 32:26-36.
- Foster ML, Varner DD, Hinrichs K, Teague S, LaCaze K, Blanchard TL, Love CC. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. *Theriogenology*, 2011; 75:1499-1505
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. Stallion epididimal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of reproduction*, 2000; 62: 1790-1803
- Gadella BM. Sperm surface proteomics. In Krause WK, Naz RK. *Immune infertility: the impact of immunoreactions of human infertility*, Berlin, Springer Verlag, 2009; pp 38-48.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*, 2008; 52: 473-480.
- 
- Gidding J.C. Two-dimensional separation: concept and promise. *Anal. Chem.*, 1984; 56: 1258A– 1260A, 1262A, 1264A.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000; 21: 1037-1053.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004; 4: 3665–3685
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.*, 1999; (3): 1720-30.
- Herbert B. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999; 20: 600-663.

- Hedegaard J., Horn P., Lametsch R., Møller H.S., Roepstorff P., Bendixen C., Bendixen E. UDP-Glucose pyrophosphorylase is upregulated in carriers of the porcine RN-mutation in the AMP-activated protein kinase. *Proteomics*, 2004; 4: 2448–2454.
- Jin L.T., Hwang S.Y., Yoo G.S., Choi J.K. Sensitive silver staining of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using an azo dye, calconcarboxylic acid, as a silver-ion sensitiziar. *Electrophoresis*, 2004; 25: 2494-2500.
- Jobim
- Lacourt A., Tarrant P. V. Glycogen depletion patterns in myofibres of cattle during stress. *Meat Science*, 1985; 15: 85-93.
- Le Roy P., Elsen J.M., Caritez J.C., Talmant A., Juin H., Sellier P., Monin G. Comparison between the three porcine RN genotypes for growth, carcass composition and meat quality traits. *Genet. Sel. Evol.*, 2000; 32(2): 165–186.
- Leahy T, Marti JJ, Crosset B, Evan G, Maxwell WMC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm. *Theriogenology*, 2011; 75:962-971.
- Li LW, Fan LQ, Zhu WB, Nie HC, Sun BL, Luo KL, Liao TT, Tang L, Lu GX. Establishment of a high resolution 2-D reference map of human spermatozoa proteins from fertile sperm-bank donors. *Asian J Androl*, 2007; 9:321-329.
- Loomis
- Marcus K., Joppich C., May C., Pfeiffer K., Sitek B., Meyer H., Stuehler K. High-resolution 2DE. *Methods Mol Biol.*, 2009; 519: 221-40.
- Martinez-Heredia J, Estanyol JM, Balleca JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*, 2006; 6: 4356-4369.
- Martinez-Heredia J, De Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008; 23: 783-791.
- Mortarino M, Tedeschi G, Negri A, Ceciliani F, Gottardi L, Maffeo G, Ronchi S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of null seminal plasma proteins. *Electrophoresis*; 1998; 19: 797 - 801
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT, Biomarkers of in vivo fertility sperm and seminal plasma of fertile stallions, 2010. *Theriogenology*, 74: 956-967.
- Nowak R. Bacterial genome sequence bagged. *Science*, 1995; 269: 468-470.

- O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.*, 1975; 250(10): 4007-21.
- Oliva R, Martinez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54: 23-36.
- Oliva R, De Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. *Proteomics*, 2009; 9: 1004-1017.
- Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC, Memili E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC System Biology*, 2008; 2:19.
- Puri P, Myers K, Kline D, Vijayaraghavann S. Proteomic analysis of bovine sperm YWHA binding partners identify proteins involved in signaling and metabolism. *Biology of Reproduction*, 2008; 79:1183-1191.
- Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol.* 1999; 112: 9-19.
- Salazar JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristic of stallion sperm. *Theriogenology*, 2011; in press.
- Scherzer J, Fayrer-Hosken R.A., Aceves M, Hurley D.J., Ray L.E., Jones L., Heusner G.L. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Australian Veterinary Journal*, 2009: Vol 87, n7
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987; 4:406-425.
- Stephen EH, Chandra A. Update projections of infertility in the United States 1995-2025. *Fertil Steril* 1998, 70: 30-34.
- Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D, Argwall A. Evaluation of sperm protein in infertile men – a proteomic approach. *Fertility and Sterility*, 2011; in press.
- Turek PJ. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat Clin Pract Urol* 2005. 2:226-238.
- Vidament M, Dupere AM, Julianne P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 1997; 48: 907-919.
- Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, Lin B, Li RS. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl*, 2009; 11:484-491

- Wilkins M., Williams K., Appel R., Hochstrasser D. (Springer, Berlin Heidelberg New York) "Proteome research: new frontiers in functional genomics", 1997 pp. 1-12.
- Williams K., Hochstrasser D. Introduction to the proteome. In Wilkins M., Williams K., Appel R., Hochstrasser D. (Springer, Berlin Heidelberg New York) "Proteome research: new frontiers in functional genomics", 1997 pp. 1-12
- Westermeier R., Postel W., Weser J., Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1983; 8: 321-33

