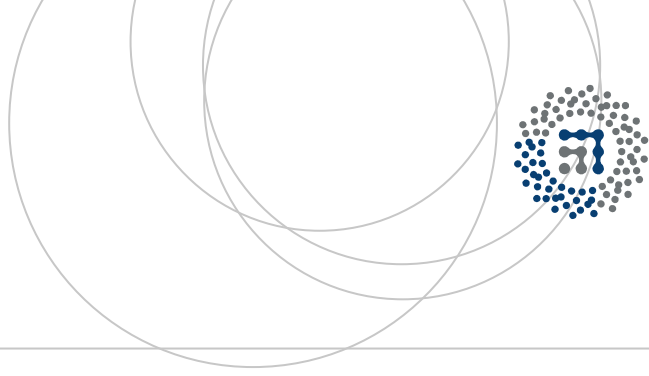


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu amaierako lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Angiotensina 1-7-ren eragina giza espermatzoideen mugikortasunean eta Akt-ren fosforilazioan

Egilea:
Lorea Cortés Meler
2015eko ekaina.

Zuzendariak:
Asier Valdivia
Ekaitz Agirregoitia

AURKIBIDEA

AURKIBIDEA	3
1 SARRERA.....	4
1.1 GIZA ESPERMATOZOIDEEN FISILOGIA ETA EGITURA	4
1.2 ERRENINA-ANGIOTENSINA SISTEMA	5
1.2.1 <i>Mas hartzailea</i>	5
1.3 PI3K/AKT BIDEZIDORRA.....	6
1.3.1 <i>MasR eta PI3K/ Akt bidezidorra</i>	6
2 HELBURUA.....	7
3 MATERIALA ETA METODOAK.....	7
3.1 LAGINEN PRESTAKUNTZA.....	7
3.1.1 <i>Laginen bilketa</i>	7
3.1.2 <i>Espermatozoideen kontzentrazioaren neurketa</i>	7
3.2 INKUBAZIO-SAIOAK.....	7
3.3 WESTERN BLOT SAIOAK.....	8
4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	10
4.1 MAS HARTZAILEAREN ADIERAZPENA ESPERMATOZOIDEETAN	10
4.2 ANG 1-7-K ESPERMATOZOIDEEN MUGIKORTASUNEAN DUEN ERAGINA	11
4.3 ANG 1-7/MAS1 HARTZAILEAREN BIDEZKO PI3K/AKT BIDEZIDORRAREN AKTIBAZIOA	13
5 ONDORIOAK.....	15
6 BIBLIOGRAFIA.....	15

1 Sarrera

1.1 Giza espermatozoideen fisiologia eta egitura

Espermatozoidea 60 μm -ko luzera duen zelula oso ezberdintzatua da. Espermatozoidea bi zatitan banatzen da: burua eta isatsa. Buruan akrosoma, nukleoa eta zitoplasma aurkitzen dira (Browder et al., 1991). Akrosoma tamaina handiko besikula jariatzailea da, eta buruaren gune apikalean kokatzen da. Besikularen barnean, entzima hidrolitikoak daude eta oozitoaren matrize extrazelularren, hots, *zona pellucida*-ren liseriketaz arduratzen dira (De los reyes & Barros 2000). Nukleoa akrosomaren azpian kokatzen da, eta bertan DNA oso kondentsatua eta funtzio ezezaguneko RNA aurkitzen dira. Espermatozoideen zitoplasma hedadura txikikoa da, izan ere, parte handia galtzen da espermatogenesisian.

Isatsa 4 zatiz osatuta dago: lepoa, erdiko atala, atal nagusia eta bukaerako atala. Enbrioiaren zatiketa zelularraz arduratzen den zentrioloa lepoan kokatzen da. Erdiko atala tubulo itxurako egitura da. Bertan, mitokondrioak daude, ATP molekularen ekoizleak direnak. Horiak, zelularen behar energetikoak asetzeaz gain, flageloaren mugimendua sustatzen dute. Atal nagusian eta bukaerakoan axonema dago, 9+2 mikrotubuluaren egitura bereizgarria duena eta flageloaren astinketaren eragilea dena (Aitken., 2013; Ramalho-Santos et al., 2007).

Fisiologia eta egitura normala duen oozito bat ernaltzeko espermatozoideek duten gaitasunari ernaltze-gaitasuna deritzo (Yanagimachi, 1994). Espermatozoide batek ernaltze-gaitasuna eskuratzeko, kapazitazioa deituriko prozesua pairatu beharko du. Prozesu horretan, erreakzio jakin batzuen bidez espermatozoidearen mintz plasmatikokoaren lipido eta proteinen osaketa aldatzen da (Schuel et al., 2005). *In vivo*, kapazitazioa hazia isuri eta gero gertatzen da, espermatozoidea likido seminaletik aldentzen denean eta ugaltze-traktu emean aurkitzen diren fluidoekin kontaktuan jartzen denean, hain zuzen ere. Kapazitazioan, espermatozoideek *zona pellucidari* lotzeko gaitasuna, erreakzio akrosomikoa egiteko gaitasuna eta mugikortasun hiperaktiboa eskuratzen dute. Erreakzio-akrosomikoa akrosomaren edukien askapena da eta mintz akrosomikoa eta espermatozoidearen mintz plasmatikoa elkartzean gertatzen da. Kapazitazio prozesuan espermatozoideek mugikortasun hiperaktiboa eskuratzeko nahitaezkoa da. Izan ere, motilitateak baimentzen du espermatozoideak ugaltze-traktu emean lekualdatzea (Kim et al., 2005), eta *zona pellucidaren* barnean sartzea (Stauss et al., 1995).

Espermatozoideek ez dute RNAren *de novo* sintesirik egiten. Gainera, ezin dute RNA molekularik proteinetara itzuli, nukleoko kromatina oso kondentsatuta dagoelako, zitoplasma eskasa delako eta organulu kopuru txikia dagoelako. Hori dela eta, espermatozoideek ezin dute konposatu proteiko berririk sintetizatu (Miller et al., 2006), beraz, oozitoraino heldu behar dira espermatogenesisian

eskuraturiko material zelularrak erabiliz. Hala ere, mitokondrioko erribosomek hainbat mRNA molekula itzuli dezaketen ala ez eztabaidan dago (Miller et al., 2006).

1.2 *Errenina-Angiotentsina sistema*

Errenina-Angiotentsina sistema (RAS, *Renin Angiotensin System*) hormona-sistema da, presio-arterialaren mantenuaz eta elektrolito eta fluidoaren homeostasiaren arduratzen dena. Sistema honek presio arteriala, tono baskularra, odol-bolumena eta transmisio-sinpatikoa erregulatzen du. RASren osagaien artean honako hauek aurki ditzakegu: errenina, hau da, giltzurrunetako zelula yuxtaglomerularretan sintetizatzen den proteasa, eta angiotentsina II (Ang II), gorputzaren odol-hodi uzkuertzaila garrantzitsuenetarikoa dena.

Dena den, azkeneko 10 urteetan burututako ikerketek sistemaren osagai berriak aurkitu dituzte eta horiek hainbat ehunetan agertzen direnez, sistemaren zeregina zabalagoa dela plazaratu dute. Esate baterako, ugaltze-aparatu arraren funtzionalitatea tokiko errenina-angiotentsina sistemaren menpekoa dela frogatuta dago: Alde batetik, RASren osagai batzuk (errenina, angiotentsina I, angiotentsina II, angiotentsinogenoa, Entzima Angiotentsina-Eraldatzailea 1, Entzima Angiotentsina-Eraldatzailea 2 eta Angiotentsina 1-7-ren Mas hartzailea) aurkitu dira ugaltzen epididimoan eta testikuluetan (Langford et al., 1993; Speth et al., 1999; Leung & Sernia, 2003; Fuchs et al., 2005; Alenina et al., 2002). Horretaz gain, arratoien eta gizakien espermatidetan eta espermatozoide helduetan Angiotentsina I eta II-ren hartzaileak aurkitu dira, AT1 eta AT2, hurrenez urren (Vinson et al., 1995; Könh et al., 1998). RASren osagai guzti horiek arren ugalkortasunarekin erlazionaturiko funtzioak betetzen dituzte; alde batetik, AngII espermatozoideen mugikortasunarekin zerikusia duten prozesuetan inplikaturik dago, batez ere hiperaktibazioan (Vinson et al., 1996), abiaduran (Vinson et al., 1996) eta erreakzio akrosomikoaren indukzioan (Gur et al., 1998). Bestalde, Entzima Angiotentsina-Eraldatzailea (ACE) kapazitazioan garrantzitsua da eta Entzima Angiotentsina Eraldatzailea 2 (ACE2), Leydig zelulek burutzen duten esteroidogenesisian eta bestelako funtzioetan inplikaturik dago (Douglas et al., 2004). Modu berean, Angiotentsina 1-7 (Ang 1-7) molekularren hartzaileak, hau da, Mas hartzaileak espermatogenesisiaren hainbat prozesuetan eginkizun garrantzitsua du (Leal et al., 2009).

Ang 1-7 hormona heptapeptidikoa da eta RAS-aren osagai garrantzitsuenetarikoa da. Ang 1-7k ere arren ugaltze-aparatuaren zereginak ditu (Passos-Silva, et al., 2013), hala nola, testikuluetan aurki daiteke, edota Leydig zeluletan (Reis et al., 2010). Azpimarratzekoa da AngII-ren eraginaren kontrako efektuak eragiten dituela ehun askotan, esate baterako basodilatazioa, diuresia, natriuresia, eta abar (Ferrario et al., 1997; Ferrario et al., 2005). Beraz, AngII molekularren efektuen erregulaturikoa da.

1.2.1 Mas hartzailea

Mas hartzaillea (MasR) G proteinari loturiko hartzaillea (GPCR) da, eta bere ligando nagusia Ang 1-7 molekula da. Hartzaillea arratoi eta saguen garunean, giltzurrunean, bihotzean, endotelioan eta barrabiletan aurkitu da (Alenina et al., 2008). Aurreko esperimentu batzuetan, giza sexu-ehunetan ere Mas hartzaillea eta Ang 1-7 aurkitu dira, esate baterako, Leydig zelulen zitoplasman, tubulo seminiferoetan, (Reis et al., 2010) eta espermatozoideen mintz plasmatikoa (Blázquez, 2014). Mas hartzaillea metabolismo androgenikoarekin guztiz erlazionatuta dago. Esate baterako, Mas hartzaillearen genea ezabatzean, Leydig zeluletan testosterona sintetizatzeaz arduratzen diren proteinen adierazpena aldatzen da (Xu et al., 2007). Espermatogenesi prozesua andeatuta duten indibiduoek, gainera, ACE2, Ang 1-7 eta Mas hartzaillearen kopurua murriztuta dute (Reis et al., 2010; Leal et al., 2009). Horrek guztiak adierazten du Mas hartzailleak espermatogenesia erregulatzen duela, ACE2 eta Ang 1-7 molekulekin batera.

1.3 *PI3K/Akt bidezidorra*

Azkeneko urtetan Akt (Protein kinase B, PKB)-ren bidezidorra garrantzia hartzen joan da, intsulinak eragiten dituen seinale intrazelularretan parte hartzen duela ikusi delako. Honetaz gain, beste hazkuntza-faktoreen seinaleen transdukzioan ere parte hartzen duela aurkitu da, eta seinale guzti hauek bateratuz, frogatu da bidezidor horrek hazkuntza zelularra, biziraupen zelularra, transkripzioaren erregulazioa eta elikagaien metabolismoa eragiten dituela (Brazil D.P et al., 2001). Hori dela eta, garrantzia handiko seinaleztapen bidezidorra dela esaten da.

Fosfatidil inositol 3-kinasa (PI3K) mintz plasmatikoa fosfatidil inositol bifosfatoa (PIP2) fosfatidil inositol trifosfatora (PIP3) fosforilatzen duen proteina da (Hawkins et al., 1992). Akt serina edo treonina hondarrak fosforila ditzakeen proteina kinasa bat da. Hainbat seinaleen bidez PI3K aktibatzen denean, PIP3 lipidoaren eraginez Akt-ren lekualdatzea gertatzen da, zitoplasmatik mintz plasmatikora (Andjelkovic et al., 1997). Lekualdatzearen ondorioz, fosfoinositolaren menpeko 1 kinasa (PDK1) eta Akt-ren arteko gertutasuna dela eta, eta bi molekulen arteko kontaktua gertatuko da, eta Akt fosforilatuko da (Stephens et al., 1998). Akt-ren fosforilazioa gertatzen denean bere kinasa-aktibitatea sustatzen da, proteina aktibatuz. Orduan, itu-proteinak fosforilatzeko gaitasuna eskuratuko du eta erantzun-zelular jakina bideratuko da.

1.3.1 *MasR eta PI3K/ Akt bidezidorra*

Aurretik aipatu denez, PI3K/Akt bidezidorrak intsulinaren seinaleztapenean parte hartzeaz gain, beste molekulen seinaleztapenean parte hartzen du baita ere, esate baterako, AngII-rena (Velloso et al., 2006). Ang 1-7-k zeluletan dituen eraginak AngII-ren kontrakoak izan ohi direnez, Ang 1-7-k intsulinaren mekanismoan eragina ote duen ikertu zen. Adibidez, Ang 1-7-k Mas hartzailleari lotzean JAK2, IRS-1 eta Akt-ren, hots, intsulinaren seinaleztapen bidezidorraren partaideen fosforilazioa eragiten du

arratoien bihotzean (Giani et al., 2007), eta baita bihotza ez den beste ehun batzuetan ere (Muñoz et al., 2010). Beste adibideen artean, azpimarratzekoa da Mas hartzailleak intsulinaren bidezidorraren aktibazioa eragiten duela Ang 1-7-ra lotzen denean, eta Ang 1-7-k AngII-ren efektuak arintzen dituela intsulinaren itu-ehunetan (Muñoz et al., 2012).

Ikerketa guzti horiek bateratuz, argi eta garbi dago Ang 1-7-k hainbat ehunetan intsulinaren bidezidorra erabiltzen duela, Mas hartzaillea dela medio, zeluletan eragina izateko. Hala ere, oraindik ez dago frogatuta Ang 1-7-k intsulinaren bidezidorra erabiltzen duenik espermatozoideetan, eta hori da, hain zuzen ere, lan honetan ikertuko duguna. Gure hasierako hipotesia da Ang 1-7-k Mas hartzaillearen bidez Akt-ren fosforilazioa eragiten duela. Bestalde, aipatuta dago Ang 1-7-k AngII-ren efektu kontrajarriak eragiten dituela; hori dela eta, AngII-k espermatozoideen mugimendua sustatzen duela jakinik, Ang 1-7-k espermatozoideen mugimendua geldiarazten duela uste dugu.

2 Helburua

Lanaren helburuak hiru dira: alde batetik, Mas hartzaillearen presentzia giza-espermatozoideetan ikertzea; bestalde, Ang 1-7-akespermatozoideen mugikortasunean duen eragina aztertzea; azkenik, Ang 1-7-ak espermatozoideen zelula-barneko Akt-ren fosforilazioan duen eragina aztertzea.

3 Materiala eta metodoak

3.1 Laginen prestakuntza

3.1.1 Laginen bilketa

Esperimentuetan erabilitako laginak Barakaldoko Gurutzetako Unibertsitate Ospitaleko Lagunduriko Ugalketa Unitatetik eskuratu ziren, esperma-emaielen adostasun informatua lortu ondoren.

3.1.2 Espermatozoideen kontzentrazioaren neurketa

Laginak fase-kontrasteko mikroskopio baten bidez aztertu ziren. Analisi kuantitatiborako, irudien analisirako SCA softwarea (Sperm Class Analyzer[®]) erabili zen.

Espermatozoideak haziaren plasmatik banatu ziren zentrifugazioaren bidez (2200 rpm, 15 min), eta PBS (*Phosphate Buffer Saline*)-an disolbatuz, laginen kontzentrazioa doitu zen: mugikortasunaren azterketan laginaren kontzentrazioa 50-100 milioi espermatozoide/ml izan zen, eta Westen Blot saioetarako, ordea, 30 milioi espermatozoide/ml. Laginen kontzentrazioak Makler hemozitometroa erabiliz neurtu ziren.

3.2 Inkubazio-saioak

Ang 1-7-k espermatozoideen mugimenduan duen eragina ikertzeko, inkubazio-saioak burutu ziren. Kultibo saiodiak Mas hartzailearen agonistaren (Ang 1-7) eta antagonistaren (A779) hainbat kontzentraziorekin inkubatu ziren zenbait denbora tartetan. Kultiborako saiodiak honakoak izan ziren: kontrola (PBS), Ang 1-7 10^{-8} M, Ang 1-7 10^{-7} M, Ang 1-7 10^{-6} M, Ang 1-7 10^{-7} M eta A779 antagonista 10^{-6} M (kasu horretan, lagina antagonistarekin aurreinkubatu zen 10 minutuz), eta azkenik, A779 antagonista 10^{-6} M. Saiodi bakoitzari espermatozoideak gehitu zitzaizkion, 30 milioi espermatozoide/ml kontzentrazioa heldu arte. Laginak 37°C -an inkubatu ziren eta mugikortasuna 0 (T0), 10 (T10), 30 (T30) eta 60 (T60) minututan aztertu zen. Kontuan hartu behar da T0-ko saiodia tratamendu bakoitza gehitu eta berehalako egoerari dagokiola. Saiodi bakoitzeko espermatozoideen mugikortasuna SCA softwarearekin neurtu zen. Software honek 3 segunduro argazki bat ateratzen du; espermatozoideen ibilbidearen eta abiaduraren kontuan hartuz, softwareak mugikortasunaren arabera sailkatzen ditu, *World Health Organization*-ek zehazten dituen 4 kategoriatan: a mugikortasun motakoak (mugikortasun progresibo azkarra, non espermatozoideen abiadura $\geq 25 \mu\text{m/s}$), b motakoak (mugikortasun progresibo motela, non abiadura $\leq 25 \mu\text{m/s}$), c motakoak (mugikortasun ez-progresiboa, non abiadura $\leq 5 \mu\text{m/s}$) eta d motakoak (mugikortasun eza). Laginen kontzentrazioa 30 milioi espermatozoide/ml ingurukoa zen, baina datuak normalizatzeko eta euren artean konparagarriak izateko, mugikortasun-azterketan ehunekoak erabili ziren. Desberdintasun adierazgarriak aurkitzeko faktore baten ANOVA analisi estatistikoa burutu zen ($P \leq 0.05$).

3.3 *Western Blot* saioak

3.3.1 Proteinak eskuratzea

Laginak uneoro izotzean mantendu ziren. Saiodi bakoitzari honakoak gehitu zitzaizkion: RIPA $150 \mu\text{l}$, proteasen inhibitzaileen 1 koktelaren $1.5 \mu\text{l}$, proteasen inhibitzaileen 3 koktelaren $1.5 \mu\text{l}$, fosfatasa inhibitzailearen $1.5 \mu\text{l}$ eta DNAsaren $1.5 \mu\text{l}$. Nahasteak 30 minutuz irabiagailuan utzi ziren. Ondoren, sonikatu ziren hurrengo programa erabiliz: 15 pulsu 40-ko anplitudean 0.5 zikloan, gero 15 pulsu 40-ko anplitudean 0.5 zikloan eta azkenik 15 pulsu 70-ko anplitudean 0.5 zikloan. Tartean 20 segunduz lagina hozten utzi zen. Lagin sonikatuak zentrifugatu ziren, 14.500 g -ko indarra erabiliz 15 minutuan, 4°C -an. Gainjalkina jaso eta izoztu zen.

3.3.2 Proteinen kuantifikazioa

Proteinak kuantifikatzeko Azido Bizikoninikozko (BCA) saioa burutu zen, Smith et al.-ek (1985) deskribatu duten moduan. Absorbantziaren neurketa Fluostar Optima (BMG LABTECH) espektrofotometroan egin zen, *Optima control* softwarea erabiliz. Absorbantzia 570 nm luzean neurtu zen. Laginaren 2 erreplika erabili ziren.

3.3.3 Elektroforesia eta transferentzia

Elektroforesirako laginak honela prestatu ziren: laginak diluitu ziren, proteina-kontzentrazio txikiena zuenaren proteina kontzentrazioa ailegatu arte. Kontzentrazio txikienera ailegatzeko lagin bakoitzaren μl kopuru jakina kargatu zen, eta horri gehitu zitzaizkion $4 \mu\text{l}$ *Sample Buffer* (SBF) 5X eta ura $20 \mu\text{l}$ -ra arte. Laginak $100 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra 10 minutuz mantendu ziren termoblokean. Elektroforesirako gelak poliakrilamidazkoak ziren, % 12-ko kontzentrazioan. Ondoren, laginak 10minutuz 100 V-etan eta 50 minutuz 180 V-ean korriarazi ziren BioRad-ek (Hercules, California) eskaintzen duen elektroforesirako tresneria erabiliz.

BioRad-en transferentziarako tresneria erabili zen transferentzia egiteko. Elektroforesi gelak PVDF (AmershamTM HybondTM) mintzetara transferitu ziren, izotzean, 100 V-ko tentsioa erabiliz ordu batean zehar.

3.3.4 Antigorputzekin inkubatzea

Antigorputzak diluitzeko, esnea diluitzeko eta garbiketak egiteko BLOTTO disoluzioa erabili zen: Tris-HCl 0,2 M pH 7,4 (200ml), NaCl (17,56 g), Triton X-100 (2 ml) eta ur destilatua (1800 ml).

Antigorputzak erabili baino lehen PVDF mintzak ordubete blokeatu ziren % 5-eko esne disoluzioa erabiliz. Hainbat antigorputz erabili ziren proteinak mintzetan detektatzeko: anti S473 FosfoAkt1 (untxiaren IgG monoklonala, MILLIPORE) 1:300 kontzentrazioan eta anti-Mas hartzailea (untxian sortua, Alomone Labs) 1:200 kontzentrazioan. Kasu bietan, *Overnight* inkubatzen utzi ziren $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -an irabiagailuan. 5 minutuko garbiketak egin ziren Blotto-n, 5 aldiz.

Antigorputz sekundarioak ondorengoak izan ziren: anti fosfoAkt-a detektatzeko, anti-untxiaren IgG (ahuntzak sorturikoa), HRP-ri lotuta (Cell Signalling Technology) 1:3000 kontzentrazioan, eta antigorputz berdina 1:1000 kontzentrazioan anti-Mas hartzailea detektatzeko. Bi kasuetan ilunpean ordu batez inkubatu ziren giro-tenperaturan.

3.3.5 Errebelazioa

Antigorputz sekundarioak Errefau minaren peroxidasa (HRP) entzimari lotuta daude. PVDF mintz bakoitzari entzimaren substratuaren, hots, ECL-aren 1.5 ml gehitu zitzaion, ur oxigenatuaren $0.5 \mu\text{l}$ -rekin batera. Entzimak askatzen duen kimioluminiszentzia BioRad-en Chemi-Doc aparatuarekin neurtu zen *Quantity One* softwarea erabilita.

3.3.6 Stripping

Mintzak errebelatu eta gero, stripping prozedura aplikatu zitzaizkien: guanidina tiozianatoarekin mintzak tratatu ziren 10-15 segundoz. Honela, mintzari loturiko antigorputzak kendu ziren. Ondoren, mintzak ordu batez %5-eko esne-disoluzioan blokeatzen utzi ziren eta gero ordu batez anti β -aktina (HRP-rekin konjokatua, 1:25.000 kontzentrazioan) (SIGMA, Saint Louis, Missouri) antigorputzarekin inkubatu ziren giro tenperaturan eta ilunpean. Aurreko antigorputzetarako errebelazio-prozedura berdina jarraitu zen kasu honetan.

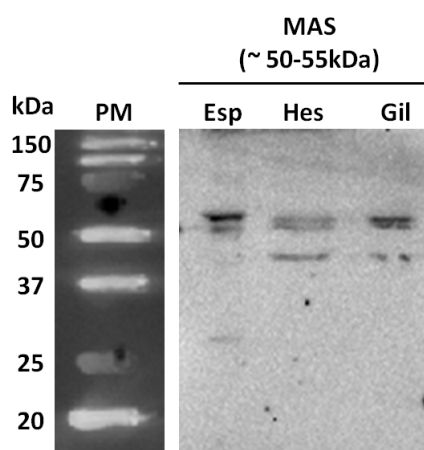
3.3.7 Dentsitometria

Akt fosforilatuaren banden dentsitatea β -aktinaren bandaren intentsitatearekin konparatu zen, laginaren karga-kantitatea normalizatzeko. Lortutako bandak densitometratu ziren tratamendu bakoitzeko aldaketak aztertzeko eta emaitzak normalizatzeko, fosfoAkt banda guztiak lagin berdineko β -aktina bandekin alderatu ziren Quantity One softwarea erabiliz. Tratamendu bakoitzean gertatzen den fosfoAkt-ren aldaketa aztertzeko SPSS programa erabili zen. Fase bakoitzeko laginen emaitzak bateratu ziren eta horien batezbestekoa \pm SEM (batezbesteko errore estandarra) erabili zen bide bateko ANOVA egiteko. Post-hoc testa Bonferronirena izan zen. Datu adierazgarria izateko $P < 0,05$ izan zen.

4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA.

4.1 Mas hartzaillearen espresioa espermatozoideetan

Aurretik aipatu den bezala, errenina-angiotentsina sisteman parte hartzen duten hainbat elementu aurkitu izan dira arren ugaltze-aparatuaren organo batzuetan (Vinson, 1995; Könh, 1998). Hori dela eta, Ang 1-7 -ren Mas hartzaillea espermatozoideetan aurki daitekeela pentsatzen da. Gure ikerketa taldearen aurreko lan batean (Blázquez, 2014), PCR (Polimerase Chain Reaction) eta immunofluoreszentzia teknikak erabiliz Mas hartzaillearen presentzia baieztatu zen, RNA zein proteina mailan. Hala ere, proteina horren presentzia ez da oraindik baieztatu Western Blot teknikaren bidez. Horregatik, lan honetan Mas hartzaillearen presentzia espermatozoideetan baieztatzeko Western Blot teknika erabili da (**1. IRUDIA**). Mas hartzaillearen espresioaren kontrol positibo moduan heste lodiko eta giltzurrunetako zelulak erabili ziren. *Expasy*-ren *Compute Mw* softwarean Mas hartzaillearen sekuentzia polipeptidikoa (UNIPROTKB webgunean



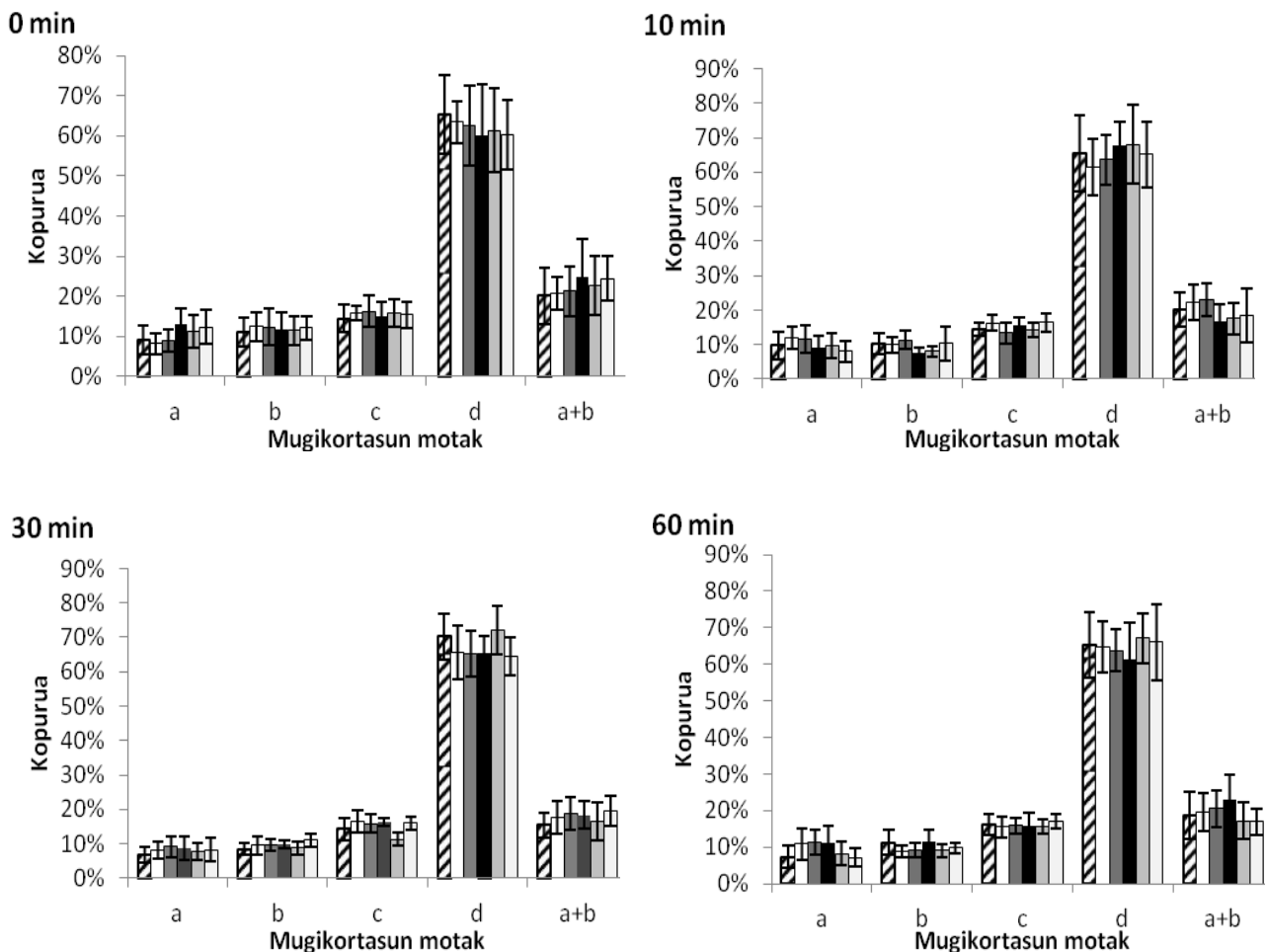
1. IRUDIA: Mas hartzaillearen western blotaren analisia giza espermatozoideetan (Esp), giza hestean (Hes) eta giza giltzurrunean (Gil). Esp: espermatozoideak Ang 1-7 10^{-6} M-ekin inkubatua. Pisu molekularreko markatzaileak (kDa) blotaren ezkerrean agertzen dira. n=3

adierazita dagoena) ipini ondoren, horren masa molekular teorikoa 43kDa ingurukoa dela kalkulatzen du, beraz, kontrol positibo bietan agertzen den 43 kDa-eko banda proteina natiboari dagokiola esan daiteke. 50 eta 55 kDa inguruko gainontzeko bandak, Mas hartzaille glikosilatu teorikoari egokitu daitezke (UniProtKB). Espermatozoideetan, banda natiboa ez da agertzen, beraz pentsa dezakegu

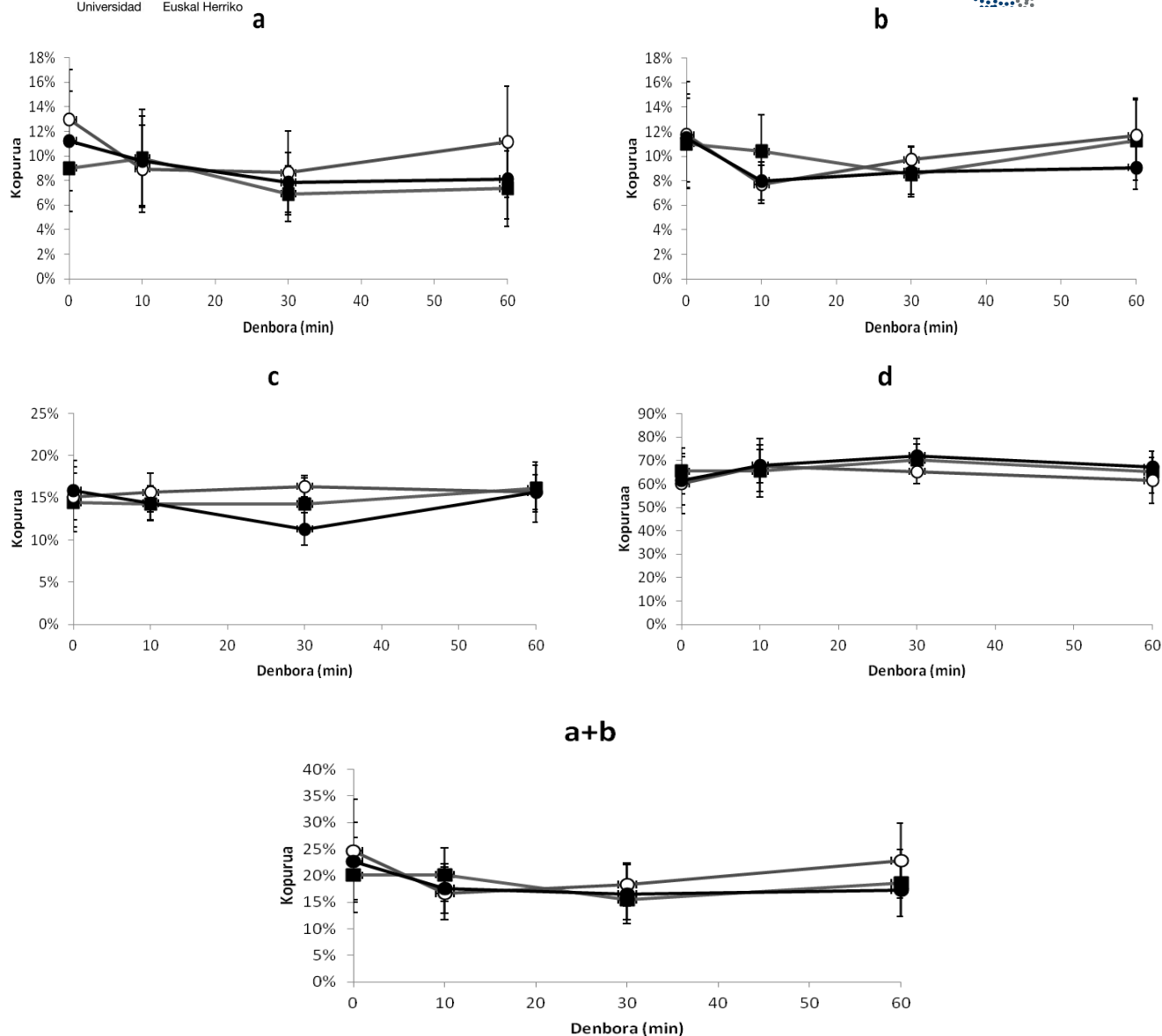
zelula hauetan proteina glikosilatua beti espresatzen dela, edota Ang 1-7-ren tratamenduaren ondorioz proteina glikosilatzea. Dena den, hipotesi hauek baieztatzeko datu esperimental gehiago behar dira. Mas hartzaila espermatozoideetan dagoela guztiz baieztatuta geratu den arren, oraindik ez dago oso argi zein izan daitekeen hartzaille horren funtzioa espermatozoideetan. Litekeena da AngII-k eragiten dituen kontrako efektuak eragitea (esate baterako, hiperaktibazioaren inhibizioa eta abar) (Ferrario et al., 1997; Ferrario et al., 2005), baina oraindik ikertzeaz dago zein ondorio fisiologiko ekar ditzake Ang 1-7-a erabiltzeak espermatozoideetan. Gainera, oraindik ere ezezagunak dira Mas hartzaille aktibatuak erabiltzen dituen mekanismo molekularrak zelula barnean erantzuna sorrarazteko.

4.2 Ang 1-7-k espermatozoideen mugikortasunean duen eragina

Sarreran aipatu den moduan, AngII-ak espermatozoideen mugikortasuna areagotzen du. Ang 1-7k AngII-ren kontrako efektuak eragin ohi dituenez (Ferrario et al., 1997; Ferrario et al., 2005), espermatozoidearen mugikortasuna moteltzen duela uste da. Ang 1-7-rekin hainbat inkubazio egin



2. IRUDIA. Mas hartzaillearen agonista (Ang 1-7) eta antagonistaren (A779) eragina giza espermatozoideen mugikortasunean 0, 10, 30 eta 60 minutuetan, a, b, c, d eta a+b motako mugikortasunen protzentajearen sortutako erantzuna. \square Kontrola, \square Ang 1-7 10^{-8} M, \blacksquare Ang 1-7 10^{-7} M, \blacksquare Ang 1-7 10^{-6} M, \square Ang 1-7 (10^{-7} M) eta A779 (10^{-6} M), \square A779 (10^{-6} M).



3. IRUDIA. Mas hartzailearen agonista eta antagonistaren eraginaren konparaketa giza espermatozoideen mugikortasunean denboran zehar a, b, c, d eta a+b motako mugikortasunean protzentajeen sortutako erantzuna. ■ Kontrola, ○ Ang 1-7 10^{-6} M, ● Ang 1-7 10^{-7} M eta A779 (10^{-6} M).

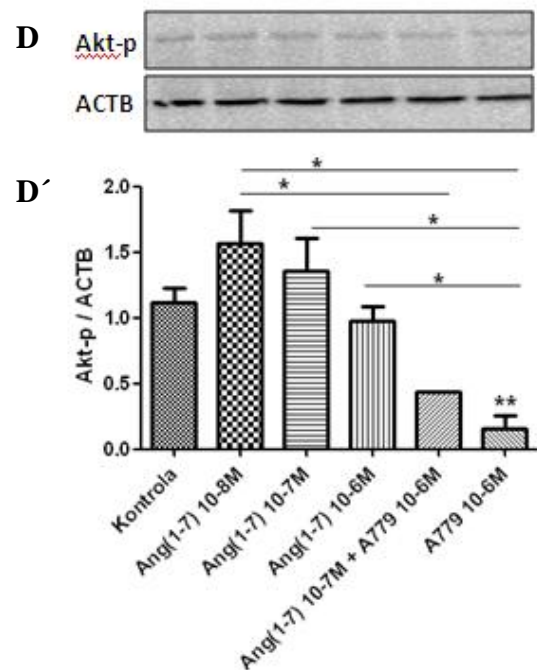
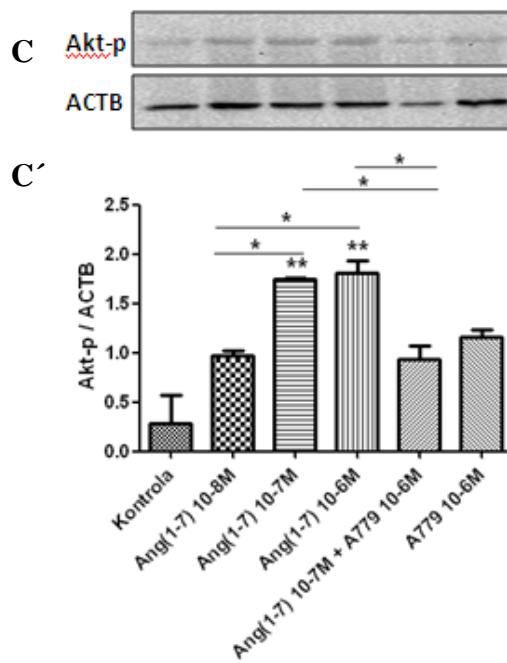
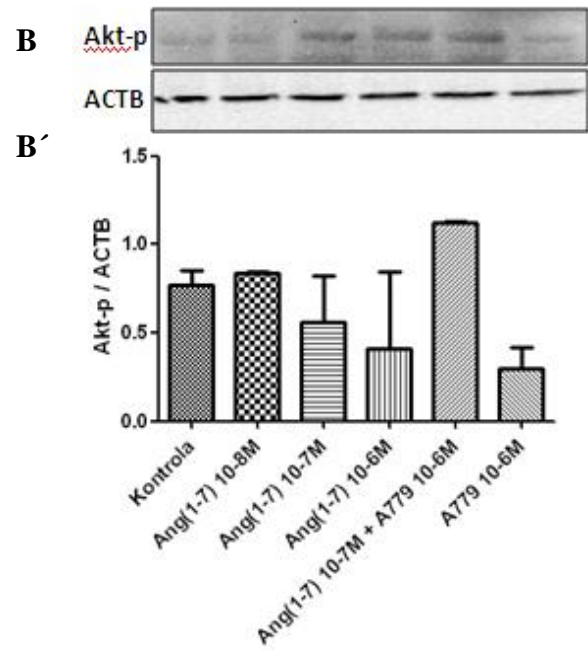
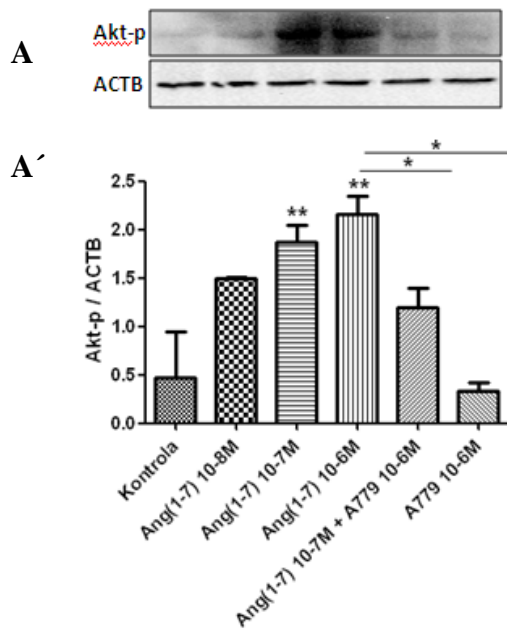
eta gero lortutako mugikortasunaren emaitzak 2. Eta 3. Irudietan adierazita daude. Irudietan espermatozoideen mugikortasuna adierazita dago hainbat parametroen arabera. Inkubazio-denboraren araberako grafikoak (2. IRUDIA) erakusten du ez edozein tratamendua erabilita ere ez dela mugikortasunaren aldaketa esanguratsurik gertatzen. Modu berean, mugikortasun-motaren araberako grafikoan (3. IRUDIA) emaitza berdinak lortzen dira. Emaitzen arabera, espermatozoideek ez dute mugikortasun-aldaketa pairatu edozein tratamendua erabilita ere. Beraz, esan daiteke Ang 1-7k espermatozoideen mugimenduan ez duela eraginik. Hala ere, emaitza horiek ez dute esan nahi Ang 1-7 molekula bestelako efekturik ez duenik eragiten (Muñoz et al., 2010). Dena den, kontuan hartu behar da mugikortasunaren azterketa egitean lagin-tamaina txikia erabili zela; litekeena da lagin-tamaina handitzean lagin bakoitzaren errorea txikiagoa izatea eta honela, estatistikoki adierazgarria

den aldaketa ikus ahalko litzateke. Bestalde, esan beharra dago AngII-rekin ez zirela tratatu espermatozoideak; interesgarria izango litzateke AngII-k mugimenduaren sustapena eragiten duela ziurtatzeko, aurretik deskribatu den bezala (Vinson et al. 1996), esperimendu horrek kontrol positibo moduan erabil genezake hurrengo saioretan. Bestalde, aipatu beharra dago mugimendua sustatzen ez duen arren, frogatuta dagoela Ang 1-7k bestelako eraginak dituela espermatozoideak ez diren hainbat ehunetan. Esate baterako, Muñoz et al.-ek (2010) deskribatu zuten Ang 1-7-ren eraginez glukogeno sintasa entzima fosforilatzen zela gibelean eta muskulu eskeletikoan. Aurreko beste ikerketa askotan (Muñoz et al., 2010; Muñoz et al., 2012; Sampaio et al., 2007) Ang 1-7-ren seinaleztapenean eta intsulinarenean antzekotasunak aurkitu direnez, hurrengo ikerketetan bide metaboliko hori aztertzea komenigarria izango litzateke. Bestalde, AngII-k erreakzio-akrosomikoaren indukzioa eragiten du (Gur et al., 1998), beraz, interesgarria izango litzateke Ang 1-7k prozesu horretan eragin ditzakeen ondorioak aztertzea.

4.3 Ang 1-7/Mas1 hartzailearen bidezko Akt-ren fosforilazioa

Aurretiaz burututako ikerketetan Ang 1-7-k PI3K/Akt bidezidorra aktibatzen duela frogatu da (errebisiorako, ikus 1.3.1 atala). Hori dela eta, Akt-ren aktibazioa (hots, fosforilazioa) gertatzen den ikertu dugu. Hainbat tratamendu eta inkubazio-denboratan Akt-ren fosforilazioa eman dela baieztatu dugu (**4. IRUDIA**). Hori dela eta, PI3K/Akt.-ren bidezidorra Ang 1-7-k aktibatzen duela frogatuta dago. Western Blotaren Akt fosforilatuaren (pAkt) bandak dentsitometratu ondoren (**4. IRUDIA**) honakoa esan dezakegu: T0 eta T30-an adierazgarria da Akt-ren fosforilazioaren desberdintasuna kontrola 10^{-7} M eta 10^{-6} M kontzentrazioekin alderatuz gero. 10^{-8} M ez da adierazgarria baina N handitzean adierazgarria izatea espero da. Antagonista jartzen denean ikusten da desfosforilazioarako tendentzia dagoela, baina ez da adierazgarria. Antagonistak bakarrik ez du fosforilaziorik sortzen eta adierazgarria da desberdintasuna 10^{-7} M eta 10^{-6} M-arekin alderatuz gero. T60-aren inguruan honakoa esan dezakegu: Adierazgarria da kontrola , 10^{-8} eta 10^{-7} M-eko kontzentrazioen fosforilazio maila antagonistaren erabilerarekin lortu diren fosforilazioekin alderatuta.

Emaitzak orokorrean aztertuz Ang 1-7 ingurunera gehitu eta berehala (T0) dosi-menpeko Akt-ren fosforilazioaren handipena ikus daiteke. Gainera, espermatozoideak agonistaz gain A779 antagonistarekin batera inkubatu zirenean Akt-ren fosforilazioa saihestu zen modu adierazgarrian. Antagonistak berak bakarrik sortutako pAkt ez zen desberdina izan kontrolarekin alderatuz. T10-ean ez da fosforilazio-maila esanguratsurik aurkitu; hori fosforilazio prozesuaren erregulazioaren islapena izan daiteke. T30-ean eta T60-an, Akt-ren fosforilazioa gertatzen da, baina ez dago oso argi zein izan daitekeen horren azalpena; alde batetik, ez dugu ahaztu behar Ang 1-7-a ez dela mediotik kendu inkubazio prozesuan zehar. Hori dela eta, pentsa daiteke Ang 1-7-a berriro Mas hartzaileari lot



4. IRUDIA. FosfoAkt-ren banden intentsitatea A) T0-an, B) T10-ean, C) T30-ean eta D) T60-an. A'), B'), C') eta D'), denbora bakoitzarekiko banden dentsimetria emaitzei dagokie. Emaitzak β -aktina (ACTB) kontzentrazioarekiko eta kargatu zen proteina kopuruarekiko normalizatuta daude. Datu estatistikoki adierazgarriak "*" ikurrak adierazita daude. "**" ikurrak kontrolarekiko adierazgarriak direla adierazten du.

daitekeela eta horrela Akt-ren fosforilazioa gertatzen da. Dena den, litekeena da Akt-ren fosforilazioa beste arrazoiengatik gertatzea, esate baterako espermatozoideen apoptosiarengatik (Maddika et al., 2007). Ikerketa sakonagoa burutu beharko litzateke emaitza horiek justifikatzeko.

Emaitza horiekin guztiekin, Ang 1-7-ren bidez aktibatzen den Mas hartzaileak PI3K/Akt bidezidorraren aktibazioa espermatozoideetan eragiten duela frogatuta gelditzen da, aurretik beste zelula mota batzuetarako deskribatu den bezala (Muñoz et al., 2010). Aurreko atalean komentatu denez, Muñoz et al.-ek (2010) frogatu zuten glukogeno sintasaren fosforilazioa Mas hartzailearen bidez gerta zitekeela muskulu eskeletikoan eta gibelean. Hori dela eta, Ang 1-7k glukogeno sintasa molekulan edota horrek parte hartzen duen bidezidor metabolikoetan duen eragina aztertzea komenigarria izango litzateke. Bestalde, esan beharra dago Akt proteina guztiz aktibatzen 2 fosforilazio pairatu behar dituela (Alessi et al., 1996); Akt-an fosforilatu behar den T308a gune katalitikoan dago eta fosforilatzen denean aktibatzen da. Guk aztertutikoa, S473, gune hidrofobikoan dago eta fosforilatzen denean aktibitatea areagotzen da (Hart eta Vogt, 2011). Beraz, ezin dezakegu esan Akt guztiz aktiboa denik ez dakigulako T308 hondarra S473-rekin batera fosforilatu den ala ez. Muñoz et al.-ek (2010) deskribatu zuten Ang 1-7-ren bidez bi hondarrak batera fosforilatzen zirela ehun adipotsuan, gibelean eta muskulu eskeletikoan; hori dela eta, pentsa daiteke seguruenik espermatozoideetan ere biak fosforilatzen direla eta Akt guztiz aktibatzen dela. Hala ere, beste hondarra fosforilatu dela ziurtatu beharra dago datu esperimentalen bidez.

5 ONDORIOAK

- Mas hartzailea giza espermatozoideetan espresatzen da.
- Ang 1-7k 10^{-8} M – 10^{-6} M kontzentrazio tartean ez du eraginik espermatozoideen mugikortasunean.
- Ang 1-7 heptapeptidoak Akt-ren fosforilazioa eragiten du. Fosforilazioaren intentsitatea Ang 1-7-ren kontzentrazioaren menpekkoa da.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Aitken RJ, 'Human spermatozoa: Revelations on the road to conception' (2013), *F1000Prime Reports*.
2. Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, Walther T. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis (2002). *J Histol Cytol.* 50:691–696.
3. Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7) (2008). *Exp Physiol.* 93: 528–537.
4. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1 (1996). *The EMBO Journal* 15(23): 6541-6551.
5. Andjelkovic M, Alessi D.R., Meier R., Fernandez A, Lamb N.J., French M, Cron P., Cohen P, Lucocq J.M., Hemmings B.A. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B (1997). *J. Biol. Chem.* 272: 31515-31524.
6. Blázquez, P. Detección e inmunolocalización del receptor Mas en los espermatozoides humanos (Gradu amaierako lana) (2014). *Biología Zelularreko saila, Medikuntza fakultatea, UPV/EHU*.

7. Brazil D.P., Hemmings B.A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow (2001). *Trends Biochem. Sci* 26: 657-664.
8. Browder LW, Ericsson CA, Jeffery WR. Developmental Biology (1991).cap 3, edit Saunders Collage Publishing, New Cork..
9. De los Reyes M., Barros C. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida (2000). *Anim Reprod Sci.* 58: 215-228.
10. Douglas G.C., O'Bryan M.K., Hedger M.P., Lee D.K., Yarski M.A., Smith A.I., Lew R.A. The novel angiotensin-converting enzyme (ACE) homolog, ACE2, is selectively expressed by adult Leydig cells of the testis (2004). *Endocrinology.* 145: 4703-4711.
11. Ferrario CM, Chapell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DL. Counterregulatory functions of angiotensin-(1-7) (1997). *Hypertension* 30: 535-541.
12. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and funtional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function (2005). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2281-H2290.
13. Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Shur BD, Bernstein KE. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE (2005). *Nature Med.* 11: 1140-1142.
14. Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors (2007). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1154-H1163.
15. Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S, Zamir N. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa (1998). *Am J Physiol* 275: E87-93.
16. Hart JR and Vogt . Phosphorilation of AKT: a Mutational Analysis (2011). *Oncotarget.* 20112(6): 467-476.
17. Hawkins, P. T., Jackson, T. R., and Stephens, L. R. Plateletderived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns (4,5)P2 3-OH kinase (1992). *Nature* 358(6382):157-9.
18. Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass (2005). *Proc Natl Acad.* 102(50):18028-33.
19. Kohn FM, Muller C, Drescher D, Neukamm C, Henkel Ri, Hagele W, Hinsch E, Habenicht UF & Schill WB. Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions (1998). *Andrologia.* 30: 207-215.
20. Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice (1993). *Biol Reprod.* 48: 1210-1218.
21. Leal, M. C., Pinheiro, S. V., Ferreira, A. J., Santos, R. A., Bordoni, L. S., Alenina, N., Bader, M. and Franca, L. R. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats (2009). *J. Anat.* 214: 736-743.
22. Leung OS, Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones (2003). *J Mol Endocrinol.* 30(3): 263-270.
23. Maddika S et al. Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death (2007). *Cell Prolif* 40(6):835-848
24. Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa (2006). *Hum Reprod Update.* 12(6):757-67.
25. Muñoz MC, Giani JF, Burghi V, Mayer MA, Carranza A, Taira CA, Dominici FP. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7) (2012). *Regulatory Peptides* 177: 1-11 .
26. Muñoz MC, Giani JF, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas (2010). *Regulatory peptides* 161: 1-7.
27. Passos-Silva, Verano-Braga, Santos. Angiotensin- (1-7): beyond the cardio-renal actions (2013). *Clinical Science* 124: 443-456.
28. Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S and Gamboa S. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy (2007). *Modern Research and Educational Topics in Microscopy 1:* 394-402.
29. Reis, A. B., Araujo, F. C., Pereira, V. M., Dos Reis, A. M., Santos, R. A. and Reis, F. M. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility (2010). *J. Mol. Histol.* 41: 75-80.
30. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, Tapias da Mata Machado L, Schiffirin EL, Touryz RM. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways (2007). *Hypertension* 49: 185-192.
31. Schuel H, Burkman LJ. Endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm (2005). *Biol Reprod.* 73(6):1078-86.
32. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid (1985). *Analytical Biochemistry* 150: 76-85 .
33. Speth RC, Daubert DL, Grove KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too? (1999). *Regul. Pept.* 79: 25-40.

34. Strauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida (1995). *Biol Reprod* 53(6):1280–5.
35. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter G.F., Homlmes A.B., Graffney P.R., Reese C.B., McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins P.T. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B (1998). *Science* 279:710-714.
36. Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems (2006). *Diabetes Metab Res Rev* 22: 98-107.
37. Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. Angiotensin II stimulates sperm motility (1996). *Regul Pept.* 67:131-135.
38. Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E and Djahanbakhch O. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm (1995). *J Endocrinol.* 144(2):369-78.
39. Xu P, Santos RAS, Bader M, Alenina N. Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1–7)-receptor Mas-deficient mice (2007). *Regul Pept.* 138: 51–55.
40. Xu Q, Lin HY, Yeh SD, et al. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells (2007b). *Endocrine.* 32: 96–106.
41. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, & Neill JD. The Physiology of Reproduction (1994). 2. *argitalpenean.* New York: Raven Press: 189 -317.
42. World Health Organization: Collection and examination of human semen. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (1999). 4. *argitalpenean.* Cambridge University Press argitaletxea, Cambridge.

WEBGUNEAK:

1. UNIPROTKB (<http://www.uniprot.org/>) MasRren P35410 sarrera, 24/06/2015-ean kontsultatua
2. ExPASy-ren masa molekularren iragarlea (http://web.expasy.org/compute_pi/), 24/06/15-ean kontsultatua