



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXIV CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA MATERNO-INFANTILE, PEDIATRIA DELLO SVILUPPO E
DELL'EDUCAZIONE, PERINATOLOGIA

**APPROCCIO PROTEOMICO ALLO STUDIO
DELL'INFERTILITÀ**

Settore scientifico-disciplinare: Ginecologia e Ostetricia MED/40

DOTTORANDO / A
ELISA GIACOMINI

COORDINATORE
Chiar.mo Prof. ALESSANDRO VENTURA

RELATORE / SUPERVISORE / TUTORE
Chiar.mo Prof. GIUSEPPE RICCI

ANNO ACCADEMICO 2010 / 2011

INDICE

1- INTRODUZIONE	3
1.1 INFERTILITÀ	3
1.2 Infertilità maschile	4
1.2.1 Spermioγραμμα	4-6
1.2.2 Plasma seminale	6-8
1.3 Infertilità femminile	9
1.3.1 La qualità degli ovociti	9-11
1.3.2 Fluido follicolare	11-13
1.4 Le tecniche di fecondazione assistita: dalla IUI alla ICSI	14-15
1.5 PROTEOMICA	16
1.5.1 Elettroforesi bidimensionale	16-17
1.5.2 Spettrometria di massa	17-18
1.5.3 Programma Ludesi Redfin Solo	18
1.6 NPC2	19
1.7 M2BP	20
1.8 LCN-1	21
1.9 PIP	22-23
2- SCOPO	24

3- MATERIALI E METODO	25
3.1 Plasmi seminali	25-26
3.2 Fluidi follicolari	27-28
3.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	29
3.3.1 Plasmi seminali	29-32
3.3.2 Fluidi follicolari	33-35
3.4 WESTERN BLOT	36
3.4.1 Plasmi seminali	36-37
4- RISULTATI	38
4.1 Plasmi seminali	38-47
4.2 WESTERN BLOT	48
4.2.1 Plasmi seminali	48-51
4.3 Fluidi follicolari	52-58
5- DISCUSSIONE	59-63
6- BIBLIOGRAFIA	64-69

1- INTRODUZIONE

1.1 INFERTILITÀ

Per l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'*infertilità* è l'incapacità di una coppia di concepire dopo un anno o più di rapporti non protetti, mentre per *sterilità* si intende l'incapacità da parte della coppia di avere un figlio a causa di una precisa patologia permanente.

Esiste inoltre un tipo di infertilità secondaria che riguarda quelle coppie che hanno già avuto un figlio, ma non riescono più ad averne.

Secondo dati dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) l'infertilità riguarda in Italia circa il 15% delle coppie e svariate possono esserne le cause, oltre a quelle maschili e femminili (Fig.1) un ruolo non trascurabile è dovuto certamente allo stile di vita, alla ricerca del primo figlio in età avanzata, all'uso di droghe, all'abuso di alcol, al fumo, alle condizioni lavorative e all'inquinamento.

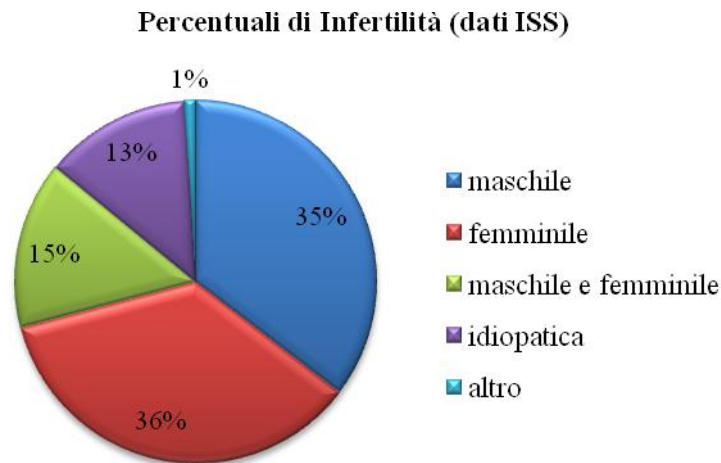


Figura 1: Dati raccolti dal Registro Nazionale sulla Procreazione Medicalmente Assistita dall'ISS

1.2 Infertilità maschile

Negli ultimi 50 anni la concentrazione di spermatozoi 10^6 /ml (milioni/millilitro) si è quasi dimezzata a causa delle condizioni ambientali e dello stile di vita e questo spiega perché circa il 35% delle cause di infertilità sia di origine maschile. In molti casi non è solo la concentrazione degli spermatozoi a essere diminuita rispetto ai parametri indicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco vaginale, WHO 1999), ma anche la motilità e la morfologia sono compromesse.

Talvolta queste anomalie sono spiegabili eseguendo accurati test diagnostici, che portano all'identificazione di patologie specifiche quali: infezioni, infiammazioni dovute a traumi, varicocele, criptorchidismo, ipospadia, tumori testicolari, alterazioni genetiche a carico del cromosoma Y.

Altre volte invece i test diagnostici non danno alcun riscontro evidente.

1.2.1 Spermioγραμμα

Per formulare diagnosi di infertilità maschile l'esame che viene eseguito di routine nei laboratori, è lo spermioγραμμα, che consente di valutare le diverse caratteristiche del liquido seminale.

Il liquido seminale viene raccolto dai pazienti per masturbazione in un contenitore appropriato e con un'astinenza tra 2 e 7 giorni.

Quest'analisi prende in esame sia caratteristiche macroscopiche del liquido seminale quali:

- **Liquefazione** valutata dopo 15-20 minuti dalla raccolta
- **Volume** (2-5ml)
- **Aspetto o Colore** (avorio opalescente)
- **Viscosità**
- **pH** (7,2-8)

che caratteristiche microscopiche, valutate con l'ausilio di un microscopio ottico, come:

- **Concentrazione** (espressa in milioni/ millilitro) misurata su camera di Makler (Makler A., 1980), emocitometro di Neubauer o Microcell (Ginsburg KA. & Armant DR., 1990)
- **Vitalità** calcolata come percentuale di spermatozoi che si muovono e nel caso in cui sia <20% si esegue il test dell'eosina/negrosina
- **Motilità** espressa come percentuale di spermatozoi che si muovono con motilità progressiva rapida, progressiva lenta, discinetici e immobili
- **Morfologia** espressa come percentuale di forme morfologicamente normali (senza alterazioni a carico della testa, del colletto o tratto intermedio, della coda o la presenza di residui citoplasmatici)
- **Cellule della linea germinale**
- **Cellule rotonde** (concentrazione espressa in milioni/millilitro e misurata sulla camera di conta)

Viene inoltre valutata la presenza di agglomerati, agglutinazioni ed emazie.

Eseguendo il test della perossidasi è possibile identificare e contare i leucociti polimorfonucleati presenti tra le cellule rotonde del campione e se la loro concentrazione supera il milione/millilitro, c'è un'infezione o un'infiammazione a carico dell'apparato urinario o riproduttivo maschile. Questo test viene eseguito mescolando una miscela di acqua ossigenata e benzidina con il liquido seminale intero (volume 1:1), in questo modo l'enzima perossidasi contenuto nei granuli dei leucociti polimorfonucleati reagisce con l'acqua ossigenata della miscela e queste cellule assumono una colorazione rossiccia, che ci permette di contarle e distinguerle dal resto delle cellule rotonde presenti nel campione.

In base ai parametri di normalità del liquido seminale stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità si definiscono:

Normozospermici o *Normospermici* (N) quei campioni che hanno concentrazione $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$, motilità progressiva totale $\geq 50\%$ o motilità progressiva rapida $\geq 25\%$, morfologia $\geq 30\%$ oppure $\geq 14\%$ (Kruger TF. e al., 1996).

Oligozospermici o *Oligospermici* (O) quei campioni che hanno una concentrazione $< 20 \times 10^6/\text{ml}$. Ci sono inoltre diversi gradi di oligospermia: lieve ($\geq 10 \times 10^6/\text{ml}$), moderata ($< 10 \times 10^6/\text{ml}$ e $\geq 5 \times 10^6/\text{ml}$) e severa ($< 5 \times 10^6/\text{ml}$ e $\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$).

Criptomozospermici o *Criptospermici* quei campioni che hanno una concentrazione $< 1 \times 10^6/\text{ml}$.

Azospermici sono quei campioni in cui gli spermatozoi sono assenti.

Astenozospermici o *Astenospermici* (A) quei campioni che hanno una motilità progressiva $< 50\%$ e può avere diversi gradi: lieve $\geq 30\%$, moderata $< 30\%$ e $\geq 20\%$, severa $< 20\%$.

Teratozospermici o *Teratospermici* (T) quei campioni che hanno una percentuale di forme normali $< 30\%$ oppure $< 14\%$ (Kruger TF. e al. 1996).

Molto spesso i campioni presentano più alterazioni contemporaneamente.

1.2.2 Plasma seminale

Il liquido seminale è formato da una componente cellulare e da una componente fluida.

La componente cellulare è costituita in prevalenza dagli spermatozoi, tuttavia, nei campioni di liquido seminale sono presenti anche cellule epiteliali di sfaldamento e cellule rotonde, che possono essere leucociti oppure cellule della linea germinale (spermatogoni, spermatidi e spermatozoi).

La componente fluida, cioè il plasma seminale è composto da sostanze che servono a fornire l'energia necessaria alla sopravvivenza e al movimento degli spermatozoi, e inoltre li protegge dalle secrezioni acide del tratto riproduttivo femminile. In questo modo consente agli spermatozoi di raggiungere intatti l'ovocita e quindi concorre alla fecondazione.

Contiene alte concentrazioni di fruttosio, ormoni, glicosaminoglicani (GAG) e la concentrazione di proteine presenti varia tra i 35 e i 55 mg/ml (Pilch B. and Mann M., 2006).

Il plasma seminale è una complessa miscela di secrezioni derivanti dai testicoli, dall'epididimo, dalle ghiandole accessorie maschili, come le vescicole seminali, la prostata e le ghiandole bulbouretrali (Pilch B. and Mann M., 2006).

Per la diversa origine dei suoi tanti componenti si può considerare una fonte di bio-marcatori per molti disordini che coinvolgono l'apparato riproduttivo maschile (Yamakawa K. e al., 2007).

Grazie alla spettrometria di massa (MS), che consente di identificare le proteine precedentemente separate utilizzando diverse tecniche come l'elettroforesi bidimensionale (2-DE) o la cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC), negli ultimi anni, diversi studi si sono concentrati sulla proteomica delle cellule spermatiche (Naaby-Hansen S. e al., 1997, Pixton KL. e al., 2004) e del plasma seminale (Pilch B. e Mann M., 2006), per costruire delle mappe proteiche utilizzabili da tutta la comunità scientifica.

Nello studio di Yamakawa (Yamakawa K. e al., 2007) l'identificazione e la caratterizzazione di proteine presenti nel plasma seminale con tecnica 2-D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) serve a gettare le basi per spiegare alcune forme d'infertilità maschile.

Grazie a questo studio sappiamo che l'espressione proteica del plasma seminale è relativamente variabile tra i diversi individui. E questa variabilità è dovuta al fatto che la maggior parte delle proteine presenti nel plasma seminale è di natura extracellulare e pertanto gli effetti della proteolisi sono estremamente differenti.

Yamakawa e i suoi collaboratori hanno confrontato campioni di plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* e *Azoospermici* e sono riusciti a identificare quattro marcatori correlabili con azoospermia non-ostruttiva (Stabilin 2 STAB2, 135Kd centrosomal protein CP135, Guanine nucleotide-releasing protein GNRP e Prolactin-inducibile protein PIP) e due marcatori di azoospermia ostruttiva (Prolactin-inducibile protein PIP e Epididymal secretory protein E1 NPC2).

Utilizzando come modello questo studio, ma con un approccio proteomico un po' diverso, abbiamo deciso di analizzare, per questo progetto di dottorato, plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* e confrontarli con campioni derivanti da soggetti *Oligo-Astenozoospermici*, per individuare dei bio-marcatori proteici espressi in maniera differente nei due gruppi di campioni presi in esame.

1.3 Infertilità femminile

Il 36% delle cause d'infertilità in Italia secondo dati dell'Istituto Superiore di Sanità è dovuto a fattori femminili, primo fra tutti l'età. Le condizioni economiche e sociali imposte dalla società fanno sì che le donne cerchino di concepire il primo figlio in età tardiva e questo di per sé diminuisce le probabilità di concepimento. Infatti, maggiore è l'età della donna e minore è la sua riserva ovarica. Inoltre anche la qualità degli ovociti sarà minore con conseguente aumento del verificarsi di anomalie cromosomiche a carico del feto.

Oltre all'età, iter diagnostici accurati possono evidenziare altre cause d'infertilità femminile quali: endometriosi, problemi endocrini che portano ad anovulazione, alterazioni a carico delle tube, sindrome dell'ovaio policistico che porta ad alterazioni del ciclo mestruale, tumori, malformazioni uterine, infezioni e malattie genetiche. Può anche non esserci alcun fattore evidente, ma le abitudini, lo stile di vita e l'inquinamento non devono essere sottovalutati.

1.3.1 La qualità degli ovociti

Per le tecniche di fecondazione assistita di II livello (FIVET e ICSI) si ricorre al prelievo degli ovociti della paziente direttamente dai follicoli presenti nell'ovaio (Fig.2). Questo piccolo intervento avviene in sala operatoria e può essere eseguito in anestesia locale, oppure la paziente può essere sottoposta a blanda sedazione. Il prelievo avviene con l'ausilio di un ago collegato a una sonda ecografica trans-vaginale. I liquidi raccolti in provette Falcon sono analizzati dall'embriologo.

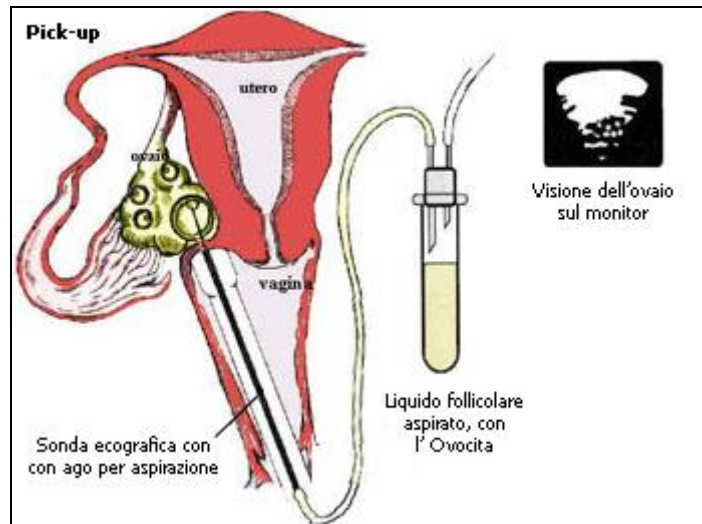


Figura 2: Schema di un prelievo oocitario

I follicoli sono stimolati a crescere e gli ovociti al loro interno vengono fatti maturare fino allo stadio di metafase 2 (M2), grazie alla somministrazione di un'opportuna e personalizzata terapia ormonale (agonisti e antagonisti della gonadotropina corionica, gonadotropina ricombinante, gonadotropina menopausale urinaria e gonadotropina corionica).

Solo gli ovociti in metafase 2, infatti, possono essere fecondati dando origine a embrioni con assetti cromosomici corretti.

Il fluido follicolare viene analizzato allo stereo-microscopio per vedere se ci sono degli ovociti al suo interno. Una volta individuati, questi vengono delicatamente separati dal resto del liquido con l'ausilio di una pipetta Pasteur di vetro e vengono conservati in appositi terreni di coltura in incubatore a 37°C a una percentuale di CO₂ controllata, mentre il resto del fluido follicolare viene eliminato.

Gli ovociti sono circondati dalle cellule della corona radiata e dalle cellule del cumolo ooforo, che lo avvolgono formando una specie di nuvola biancastra con al centro un pallino nero, cioè l'ovocita vero e proprio. L'occhio esperto dell'embriologo, in base alle caratteristiche del cumolo ooforo, può stabilire se l'ovocita è maturo o meno. Per averne l'assoluta certezza,

comunque, è opportuno rimuovere le cellule del cumulo e della corona radiata e analizzare l'ovocita al microscopio a un ingrandimento superiore.

- L'ovocita è in **metafase 2 (M2)** se è presente solo il primo globulo polare.
- Se nel citoplasma dell'ovocita è visibile il nucleo e non c'è il primo globulo polare allora si parla di **vescicola germinale (GV)**.
- Se il nucleo non è più visibile, ma il primo globulo polare non è ancora presente si parla di ovocita in **metafase 1 (M1)**.

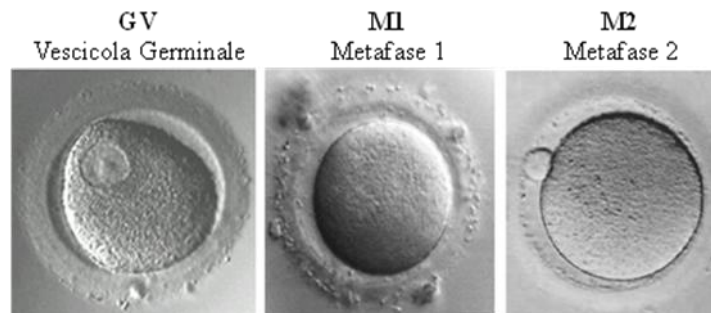


Figura 3: I tre stadi della maturazione dell'ovocita

1.3.2 Fluido follicolare

Il fluido follicolare che contiene l'ovocita, è comunemente descritto come un derivato del plasma sanguigno e delle secrezioni delle cellule della parete del follicolo, della corona radiata e del cumolo ooforo (Fortune JE., 1994; Schweigert FJ. e al., 2006). La concentrazione di peptidi e proteine in questo fluido è il risultato del trasferimento di tali sostanze dal plasma sanguigno ed è influenzata dal metabolismo delle strutture follicolari (Schweigert FJ. e al., 2006).

Questo liquido svolge diverse funzioni fisiologiche, come fornire il nutrimento e le sostanze necessarie alle cellule del cumolo e all'ovocita per consentirne una corretta maturazione e contribuire al processo di ovulazione e fertilizzazione (Richards JS., 1994; Tsafriri A., 1995; Tsafriri A. e Reich R., 1999; Schweigert FJ. e al., 2006).

Il fluido follicolare contiene diverse sostanze: ormoni, fattori di crescita (TGF β), interleuchine, radicali liberi dell'ossigeno (ROS), fattori anti-apoptotici, zuccheri, prostaglandine, amminoacidi, peptidi e proteine (Revelli A. e al., 2009).

È facilmente ottenibile durante il prelievo degli ovociti ed è per questo motivo che la sua composizione è stata oggetto di diversi studi per la ricerca di bio-marcatori di qualità ovocitaria (Schweigert FJ. e al., 2006).

Lo studio di fluidi follicolari con risonanza magnetica nucleare (NMR) (Antonietta De Gisi 2010) ha messo in evidenza come la concentrazione di alcuni zuccheri tra cui il glucosio, il lattosio e il piruvato sia strettamente legata alla bontà del follicolo, poiché sono usati come fonte di energia dall'ovocita.

Inoltre, sempre da questo studio è emerso che il mioinositolo usato generalmente per la sintesi dei lipidi, la struttura e la crescita cellulare, può essere considerato come un bio-marcatore dell'idoneità dei follicoli da utilizzare per la fecondazione assistita.

Questo studio ha confermato quanto la concentrazione di ormoni, come steroidi, FSH, LH, prolattina e fattori di crescita sia importante per la corretta maturazione dei follicoli e per la successiva ovulazione.

Tuttavia è emerso che la concentrazione di amminoacidi presenti nel fluido follicolare è minore rispetto a quella del plasma sanguigno, da cui deriva, anche se la concentrazione di alcuni di questi, come la glutammina è comunque molto importante. Infatti, la glutammina viene trasformata in ammoniaca e glutammato, che diminuisce lo stress ossidativo e sembra essere coinvolta nella sintesi degli acidi nucleici, evento fondamentale per il completamento della meiosi da parte dell'ovocita.

Jarkovska ha analizzato il proteoma del fluido follicolare e lo ha confrontato con quello del plasma sanguigno e da questo studio sono emerse delle differenze che riguardano i fattori della cascata del complemento e della coagulazione (Jarkovska K. e al., 2011).

Altri studi, invece, utilizzando sempre delle tecniche di proteomica, hanno cercato di creare una mappa delle proteine presenti nel fluido follicolare che fosse utilizzabile da tutta la comunità scientifica (Lee HC. e al., 2005; Hanrieder J. e al., 2008, Angelucci S. e al., 2006).

Prendendo come riferimento lavori sui fluidi follicolari che avessero un approccio di tipo proteomico, abbiamo impostato questo progetto di dottorato, in cui abbiamo provato a confrontare le proteine presenti nei fluidi follicolari contenuti ovociti maturi (M2) con lo spettro proteico dei fluidi follicolari contenuti ovociti immaturi (GV o M1) per evidenziare le differenze presenti e quindi individuare dei possibili bio-marcatori di maturità ovocitaria.

1.4 Le tecniche di fecondazione assistita: dalla IUI alla ICSI

Per risolvere i differenti casi di infertilità si ricorre a diverse tecniche di fecondazione assistita dalle più semplici alle più complesse:

- **IUI** o inseminazione intrauterina o inseminazione semplice. Viene usata in casi di infertilità idiopatica, cioè quando non c'è alcuna causa evidente di infertilità, oppure quando le tube della donna sono entrambe o una sola è pervia e i parametri del liquido seminale sono poco al di sotto della norma. Il campione di liquido seminale viene capacitato (cioè viene trattato per essere in grado di fecondare l'ovocita) e depositato nella cavità uterina della paziente attraverso l'ausilio di un sottile catetere.
- **FSP** o inseminazione intratubarica. Il seme, dopo essere stato capacitato, viene depositato nelle tube della paziente per favorire ulteriormente l'incontro tra ovocita e spermatozoo. Le indicazioni sono le stesse della IUI.
- **FIVET** o fecondazione in vitro con trasferimento dell'embrione. Viene eseguita nel caso di infertilità idiopatica in cui i precedenti tentativi di inseminazione semplice non siano andati a buon fine o in casi di infertilità tubarica. Dopo un'opportuna stimolazione ormonale, gli ovociti della paziente vengono prelevati e messi ad incubare con il liquido seminale capacitato del partner. Si procede alla verifica della corretta fecondazione e dello sviluppo embrionale. L'embrione o gli embrioni ottenuti vengono trasferiti in utero utilizzando un sottile catetere.
- **ICSI** o iniezione intra-citoplasmatica dello spermatozoo nell'ovocita. Viene usata in casi di infertilità maschile severa e in casi di ripetuti fallimenti delle tecniche precedenti. Lo spermatozoo viene iniettato direttamente nel citoplasma dell'ovocita, utilizzando un ago sottilissimo e facendo attenzione a non andare a ledere il fuso mitotico dell'ovocita. Anche in questo caso occorre verificare che l'ovocita sia stato fecondato correttamente.

Si aspetta, quindi, il corretto sviluppo dell'embrione che viene trasferito nella cavità uterina della paziente, utilizzando un sottile catetere, come per la FIVET.

1.5 PROTEOMICA

La proteomica è quella branca della biologia molecolare, che raggruppa le tecniche che servono a valutare e caratterizzare il complesso di proteine presenti in cellule, organismi o fluidi biologici. Della proteina o delle proteine oggetto di studio si riesce a identificare non solo la sequenza aminoacidica, ma anche la struttura tridimensionale, la funzione, le modificazioni post-traduzionali, la quantità e l'interazione con altre proteine o con DNA o RNA.

Il termine proteoma è stato usato per la prima volta da Wasinger nel 1995 (Wasinger VC. e al., 1995) e costituisce l'insieme delle proteine presenti in una cellula o in un fluido biologico ed è in continuo cambiamento secondo gli stimoli che la cellula o le cellule ricevono. Il fluido biologico, infatti, è costituito dalle proteine che le cellule riversano al loro esterno in risposta a determinati stimoli e allo stesso tempo le cellule sono influenzate dalle concentrazioni e dai tipi di proteine presenti nel fluido biologico che le circonda.

La tecnica principale di cui si avvale la proteomica per lo studio delle proteine è l'elettroforesi bidimensionale (2-DE) su gel di poliacrilamide.

1.5.1 Elettroforesi bidimensionale

Questa tecnica permette di separare complesse misture di proteine estratte da cellule, tessuti o fluidi biologici. Si definisce bidimensionale perché è eseguita in due passaggi distinti e consequenziali.

Il primo passaggio, noto come prima dimensione, consiste in un'isoelettrofocalizzazione, "isoelectric focusing" (IEF), in cui le proteine vengono separate in base al loro specifico punto isoelettrico, pI (Wilkins MR. e al., 1996). Il punto isoelettrico è il pH in cui la carica netta della proteina è pari a zero, cioè il pH in cui tutte le cariche presenti sugli amminoacidi e sugli estremi carbossi e ammino-terminali si annullano.

Il secondo passaggio, noto come seconda dimensione, consiste in un'elettroforesi su gel di poliacrilamide, "SDS-poliacrylamide gel electrophoresis" (SDS-Page), in cui le proteine si separano in base al loro specifico peso molecolare (MW "molecular weight") (Wilkins MR. e al., 1996).

Per visualizzare le proteine sul gel di poliacrilamide si utilizzano solitamente le colorazioni con Coomassie Colloidale o Argento, che permettono entrambe di vedere spot che contengono fino a 10ng di proteina.

Teoricamente a ogni spot presente sul gel corrisponde una sola specie proteica. La stessa proteina può essere presente in spot diversi, se possiede delle modificazioni post- traduzionali che ne fanno variare il punto isoelettrico, come ad esempio la fosforilazione, oppure ne fanno variare il peso molecolare, come ad esempio le glicosilazioni. Nel caso di modificazioni che fanno variare il pI, si osserverà uno spostamento della proteina in senso orizzontale sul gel, se invece la modificazione fa variare il MW, lo spot corrispondente alla proteina si sposta in senso verticale sul gel.

1.5.2 Spettrometria di massa

Gli spot di interesse solitamente vengono tagliati dai gel per identificare la specie proteica presente attraverso l'analisi con spettrometro di massa.

La proteina viene digerita con enzimi ad alta specificità di taglio, come la tripsina; in questo modo si ottengono delle masse peptidiche che saranno analizzate dallo spettrometro di massa, collegato a una banca dati.

La spettrometria di massa si fonda sulla possibilità di separare miscele di ioni (nel nostro caso le masse peptidiche) in base al loro rapporto massa/carica (m/z) utilizzando dei campi magnetici.

Le masse peptidiche vengono caricate sullo spettrometro di massa che schematicamente si può considerare formato da tre blocchi: nel primo blocco si producono gli ioni e si procede a

un'ulteriore frammentazione dei campioni, nel secondo blocco, cioè l'analizzatore, gli ioni prodotti vengono separati in base al loro rapporto massa/carica e nel terzo blocco il rapporto massa/carica viene rilevato dal rilevatore.

Molto spesso la maggior parte degli ioni possiede una sola carica ($z=1$), in questo modo si può considerare il rapporto massa/carica (m/z) come corrispondente alla massa in Dalton (Da).

I dati ottenuti dal rilevatore vengono elaborati e si ottiene così lo spettro di massa, che viene inserito in una banca dati di spettri, che consente l'identificazione del campione analizzato.

1.5.3 Programma Ludesi Redfin Solo

In questo studio di dottorato per confrontare i diversi gruppi di campioni presi in esame, ci siamo avvalsi dell'ausilio del programma a pagamento Ludesi Redfin Solo che consente di sovrapporre le immagini scannerizzate dei diversi gel ottenuti con elettroforesi bidimensionale.

La sovrapposizione viene eseguita manualmente utilizzando l'immagine di uno dei gel da noi ottenuti come base e usando degli spot particolarmente evidenti come riferimenti.

Le immagini dei gel vengono sovrapposte una ad una. Una volta caricate tutte le immagini di interesse, l'operatore stabilisce i gruppi di confronto.

Il programma elabora statisticamente i dati ottenuti.

Per questo studio di dottorato e per entrambi i tipi di campioni (sia plasmi seminali sia fluidi follicolari) abbiamo deciso di considerare come attendibili solo gli spot, la cui intensità fosse $>1,5$, Anova $p<0,05$ e Mann-Whitney $p<0,05$.

All'operatore spetta poi il compito di selezionare ulteriormente gli spot di interesse, verificando la loro posizione sul gel. Infatti, se lo spot si trova in una zona con una cattiva risoluzione ed è difficilmente distinguibile dagli spot che lo circondano, viene scartato dall'analisi successiva, anche se dal resoconto fornito dal programma, risulta espresso in maniera diversa e statisticamente significativa nei due gruppi presi in esame.

1.6 NPC2

Epididymal secretory protein E1 conosciuta anche come NPC2 (Nieman-Pick C2) o come HE1 (Human epididymis-specific protein 1) è una delle proteine ottenute dall'analisi di massa dei plasmi seminali.

Il suo gene è altamente conservato nei mammiferi di diverse specie (Kirchhoff C. e al., 1996).

Una mutazione a carico del gene NPC2 porta a una malattia autosomica caratterizzata dall'accumulo di colesterolo negli organelli subcellulari, con manifestazioni cliniche diverse, quali epato-splenomegalia, disfunzioni neurologiche progressive severe, come atassia, distonia e demenza e può manifestarsi sia nell'infanzia sia in età adulta (Millat G. e al., 2001).

Questa proteina di 151aa (aminoacidi) è prodotta in minima parte dalle ghiandole sessuali accessorie (vescicole seminali e prostata), mentre la maggior parte è secreta dai vasi deferenti e dal corpus dell'epididimo e si riversa nel plasma seminale. Ciò spiega perché nei pazienti con azoospermia ostruttiva la sua presenza in questa componente del liquido seminale risulta alterata (Yamakawa K. e al., 2007).

Nel plasma seminale sono state identificate due forme N-glicosilate di NPC2, mentre una sola forma non glicosilata è stata associata agli spermatozoi eiaculati (Légaré C. e al., 2006).

La sua sequenza rivela una tasca di legame al colesterolo, con stechiometria 1:1 ed una K_d di 3-50nM (Friedland N. e al., 2003). Pertanto la sua funzione sembra essere quella di legarsi agli spermatozoi non completamente maturi con una maggiore concentrazione di colesterolo sulla superficie; segregare questo colesterolo facendo cambiare il rapporto colesterolo/fosfolipidi di membrana e favorire così la corretta maturazione degli stessi spermatozoi durante il transito all'interno dell'epididimo (Jones R., 1998).

Il rimodellamento della membrana è essenziale per acquisire la motilità flagellare, perciò si può ragionevolmente supporre che questa proteina sia importante per una corretta motilità spermatica.

1.7 M2BP

Galectin-3-binding protein (LGALS3BP) o M2BP (Mac-2-binding protein) è anch'essa presente nel plasma seminale dei campioni analizzati.

È una proteina ubiquitaria di 585aa prodotta da cheratinociti e fibroblasti.

La sua funzione principale sembra essere quella di promuovere l'adesione cellulare, sia cellula-cellula, che cellula- matrice extracellulare (Sasaki T. e al., 1998). Inoltre possiede all'N-terminale un dominio SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) che le conferisce proprietà immunologiche (Müller SA. e al., 1999).

È stata anche identificata come tumor-associated antigen (Tinari N. e al., 1997).

M2BP è stata identificata nel plasma seminale umano (Tsuruya S. e al., 2006), nelle secrezioni prostatiche e nelle cellule prostatiche tumorali (Bair EL. e al., 2006).

In uno studio recente (Block AS. e al., 2011) la presenza di questa proteina è stata verificata anche nei prostasomi, che sono delle vescicole secrete dall'epitelio prostatico durante l'eiaculazione. La loro funzione sembra essere quella di mediare le comunicazioni intercellulari e inoltre sembrano possedere proprietà immuno-modulatorie (Simpson RJ. e al., 2009).

È stato anche ipotizzato che i prostasomi siano in grado di migliorare la funzione spermatica, aumentando la motilità degli spermatozoi stessi (Arienti G. e al., 2004) e li proteggano dal sistema immunitario femminile, agendo su di esso come immunosoppressori (Burden HP. e al., 2006).

Il ruolo che M2BP svolge nel liquido seminale non è ancora chiaro. Si può supporre, però, che avendo funzione di adesione cellulare favorisca il legame degli spermatozoi ai prostasomi, in modo tale che questi ultimi possano aumentarne la motilità e possano essere protetti all'interno dell'apparato riproduttivo femminile da un attacco del suo sistema immunitario (Block AS. e al., 2011).

1.8 LCN-1

Lipocalin-1 (LCN-1) o Tear Lipocalin (Tlc) conosciuta anche come Von Ebner gland protein (VEGP) è anch'essa presente nei campioni di plasmi seminali.

È una proteina di 176aa appartenente alla superfamiglia delle lipocaline, la cui caratteristica principale è quella di possedere un'ampia tasca che può legare un'enorme varietà di molecole lipofile come: acidi grassi, alcol grassi, fosfolipidi, glicolipidi, colesterolo, retinolo, isoprostani, acido arachidonico e metaboliti dell'acido arachidonico (Redl B. e al., 1992, Glasgow BJ., 1995, Lechner M. e al., 2001).

LCN-1 sembra essere prodotta da diverse ghiandole esocrine, comprese le ghiandole lacrimali, le ghiandole sottolinguali, la prostata, le ghiandole del tratto tracheo-bronchiale e le ghiandole sudoripare (Redl B., 2000).

Non è ben chiaro cosa comporti il suo aumento a livello del plasma seminale.

È opportuno però ricordare che il plasma seminale ha diversi effetti e funzioni immunosoppressive sia all'interno dell'apparato riproduttivo maschile, che femminile, mediati dalle prostaglandine (Chiu WW. e al., 2003). Pertanto una quantità elevata di LCN-1 legando tali mediatori, potrebbe causare una diminuzione della funzione immunosoppressiva del plasma seminale.

1.9 PIP

Prolactin inducible protein (PIP o GPIV4) conosciuta anche come Gross Cystic Disease Fluid Protein 15 (GCDFP15) è un'altra proteina rilevata nei campioni di plasma seminale.

PIP è un polipeptide a catena singola di 146aa con un peso molecolare teorico di 16,5kDa e un punto isoelettrico teorico di 5,47 (Murphy LC. e al., 1987).

Questa proteina però ha diverse isoforme: 12kDa, 33kDa e 54kDa (Akiyama K. e Kimura H., 1990). L'isoforma di 12kDa probabilmente è un frammento proteolitico di PIP, mentre le altre isoforme potrebbero essere forme multimeriche della proteina.

Sappiamo anche che PIP in alcuni casi, come per la PIP presente nella saliva, può presentare delle modificazioni post-traduzionali come glicosilazioni (Rathman WM. e al., 1989).

È stato dimostrato che questa proteina è capace di prevenire l'interazione tra alcune molecole e regioni specifiche di CD4 (Autiero M. e al., 1995). Il legame tra PIP e CD4 inibisce l'apoptosi dei linfociti T (Caputo E. e al., 1999). Grazie alla sua abilità nel legare CD4 è stato possibile scoprire che PIP è in grado di legarsi alla regione post-acrosomiale degli spermatozoi, cioè è in grado di legare gli spermatozoi dopo capacitazione (Bergamo P. e al., 1997), anche se si ignora la sua funzione. Poiché esistono tutte queste evidenze è possibile affermare che tale proteina agisce come immuno-modulatore (Chiu WW. e Chamley LW, 2003).

Chiu ha inoltre ipotizzato che PIP legando il frammento costante (Fc) delle Immunoglobuline G (IgG), se diminuita possa essere associata a infertilità nei pazienti che presentano nel liquido seminale anticorpi anti-spermatozoo (ASA). Purtroppo però non ha quantificato esattamente quante fossero le molecole di PIP in grado di legare le IgG e pertanto non è stato possibile correlare lo stato di infertilità con i livelli totali di PIP immunoreattiva.

Inoltre da questo studio è emerso che l'isoforma più pesante della proteina (54kDa) non è presente in nessuno dei campioni fertili.

Dallo studio di Yamakawa (Yamakawa K. e al., 2007) PIP risulta alterata sia nei soggetti con azoospermia ostruttiva, che in quelli con azoospermia non-ostruttiva e questo permette di affermare che viene prodotta e poi riversata nel plasma seminale dalle vescicole seminali, dai testicoli e dall'epididimo.

Non è tuttora chiaro quale sia l'effetto causato da un aumento di PIP nel plasma seminale.

2- SCOPO

Questo progetto di dottorato ha due obiettivi principali:

Il primo obiettivo è quello di confrontare le proteine presenti nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* (N) con quelle presenti nei plasmi seminali di soggetti *Oligo-Astenozoospermici* (O/A). Questo confronto ha lo scopo di individuare e identificare delle proteine, che si possano considerare come dei bio-marcatori di fertilità.

In particolare, le proteine che risultano in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti N, si potrebbero ragionevolmente considerare come dei bio-marcatori di fertilità veri e propri.

Nel caso in cui le proteine siano maggiormente espresse nei plasmi seminali di soggetti O/A, si potrebbero considerare come degli indicatori di qualche anomalia, che potrebbe influire sul corretto funzionamento e assetto degli spermatozoi.

Il secondo obiettivo è quello di confrontare le proteine presenti nei fluidi follicolari contenenti ovociti maturi (M2) con quelle presenti nei fluidi follicolari contenenti ovociti immaturi (M1 o GV). Il fine di questo confronto è quello di trovare delle proteine che possano essere considerate dei bio-marcatori di maturità ovocitaria.

In particolare, le proteine che sono maggiormente presenti nei fluidi follicolari contenenti ovociti maturi si potrebbero considerare dei bio-marcatori di maturità ovocitaria veri e propri.

Le proteine che sono in quantità maggiore nei fluidi follicolari contenenti ovociti immaturi sarebbero un indicatore del fatto che l'ovocita non ha ancora raggiunto la metafase 2 e quindi il loro dosaggio prima del prelievo ovocitario, potrebbe comunque rivelarsi utile quanto il dosaggio di alcuni ormoni come, ad esempio, l'estradiolo.

3- MATERIALI E METODI

3.1 Plasmi seminali

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti presso la Struttura Semplice Dipartimentale di Procreazione Medicalmente Assistita dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Burlo Garofolo di Trieste, previo consenso informato.

Ogni singolo campione è stato analizzato eseguendo lo spermioγραμμα secondo le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (Manuale per l'analisi del liquido seminale della WHO del 1999).

Tra i liquidi seminali 20 sono stati scelti e utilizzati per questa Tesi di dottorato.

Secondo le caratteristiche del liquido seminale, i 20 campioni presi in esame sono stati divisi in due gruppi distinti:

1. Plasmi seminali di campioni *Normozoospermici* (N)
2. Plasmi seminali di campioni *Oligo-Astenozoospermici* (O/A)

Ognuno dei due gruppi è costituito da 10 campioni.

Si definiscono *Normozoospermici* (N) quei campioni che hanno una concentrazione di spermatozoi superiore ai 20 milioni/ml ed una motilità progressiva totale espressa in percentuale superiore al 50%. In particolare la concentrazione di spermatozoi media dei campioni N è di $70,3 \pm 41,1 \times 10^6$ /ml, mentre la motilità progressiva media è di $53 \pm 4,5\%$.

I campioni *Oligo-Astenozoospermici* (O/A) invece hanno una concentrazione di spermatozoi inferiore ai 20 milioni/ml e una motilità progressiva espressa in percentuale minore del 50%. La concentrazione di spermatozoi media di questi campioni è di $7,9 \pm 5,8 \times 10^6$ /ml, mentre la motilità progressiva è di $16 \pm 11,4\%$.

Il plasma seminale è la sola componente del liquido utilizzata in questo studio, mentre la componente cellulare è stata eliminata.

Per ottenerlo si procede alla sua separazione dalla componente cellulare mediante centrifugazione (300g x 20 minuti). Si preleva il sopranatante (plasma seminale) mentre il pellet che contiene le cellule presenti nel campione viene eliminato.

Al plasma seminale è stata aggiunta un'aliquota d'inibitore di proteasi (MIP25X Roche) in modo da impedire la degradazione delle proteine presenti da parte di questi enzimi.

Tutti i campioni di plasmi seminali, opportunamente sigillati e identificati con un codice numerico, sono stati conservati in freezer a -80°C fino al momento dell'analisi bidimensionale.

3.2 Fluidi follicolari

All'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste durante la procedura per la fecondazione in vitro (IVF) sono stati raccolti, separatamente dagli altri, i fluidi follicolari provenienti dal primo follicolo aspirato al momento del prelievo degli ovociti ("pick-up"). Previo consenso informato consegnato alle pazienti, che si sottoponevano a tale trattamento.

È stato raccolto solo il fluido del primo follicolo aspirato, perché a differenza dei fluidi successivi non viene diluito e quindi alterato con il terreno di lavaggio per i follicoli stessi. Inoltre, tra questi fluidi, solo quelli che contenevano un ovocita, sono stati conservati per essere analizzati in questo studio di dottorato.

Ogni ovocita è stato liberato meccanicamente (micropipette Cook) e con l'aiuto dell'enzima ialuronidasi (Medicult), dalle cellule del cumolo ooforo e della corona radiata per proseguire nelle fasi successive delle tecniche di fecondazione assistita (per eseguire una ICSI). In questo modo con l'aiuto di un microscopio (Olympus) è stato possibile individuare le diverse caratteristiche morfologiche dell'ovocita contenuto nel fluido follicolare raccolto.

Secondo le caratteristiche dell'ovocita in essi contenuti, i fluidi follicolari sono stati divisi in due gruppi principali:

1. Fluidi follicolari che contengono un ovocita maturo in metafase 2 (M2)
2. Fluidi follicolari che contengono un ovocita immaturo allo stadio di vescicola germinale (GV) o in metafase 1 (M1)

Gli ovociti in fase M1 e GV non possono essere inseminati, perché il loro corredo cromosomico è ancora diploide e quindi un'eventuale fertilizzazione forzata potrebbe dare origine a embrioni non-sani con un assetto cromosomico non-corretto e molto probabilmente incompatibile con la vita.

Il gruppo dei fluidi follicolari associati a ovociti immaturi è costituito solamente da 6 campioni.

Il numero è così limitato, perché la terapia farmacologica cui sono sottoposte le pazienti che

accedono ai trattamenti per la fecondazione assistita, fa in modo che gli ovociti che vengono recuperati con il prelievo siano praticamente tutti maturi, in modo da poter essere inseminati e si possano fertilizzare in maniera corretta.

Per eseguire il confronto delle proteine espresse in maniera diversa nei due gruppi in esame, è stato analizzato lo stesso numero di fluidi follicolari contenenti ovociti maturi.

Ciascun fluido, dopo che l'ovocita è stato recuperato per il trattamento IVF, è stato centrifugato (500g x 10 minuti) per eliminare la componente cellulare residua, cioè cellule epiteliali di sfaldamento e cellule del sangue, per evitare che interferissero con le analisi successive.

A ciascun soprannatante, come per i plasmi seminali, è stata aggiunta un'aliquota d'inibitore di proteasi (MIP 25X Roche) ed è stato conservato in freezer a -80°C fino al momento dell'analisi bidimensionale. Anche in questo caso ciascun campione è stato identificato con un codice numerico.

3.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

3.3.1 Plasmi seminali

La concentrazione di proteine in ciascun plasma seminale è stata valutata con metodica Bradford (Kruger NJ., 1994), che prevede appunto l'utilizzo di questo reagente e di uno spettroscopio. L'assorbanza (Abs) ricavata dalla lunghezza d'onda (OD) ottenuta dallo spettroscopio viene inserita in una curva di concentrazione dell'Albumina, che ci permette di estrapolare la concentrazione di proteina totale presente nel campione.

Per ciascun campione è stata analizzata un'aliquota contenente 500µg di proteine.

Le proteine contenute in ciascun campione di plasma seminale sono state precipitate, tutta la notte a 4°C in camera fredda, usando TCA (Acido Tri-Cloro acetico, Sigma) al 10%. Sono stati eseguiti 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno a 14000rpm a 4°C con Etere-EtanoLo (volume 1:1), per eliminare l'acido in eccesso. I campioni, poi, sono stati lasciati all'aria per permettere all'Etere-EtanoLo rimasto di evaporare completamente.

Le proteine sono state risospese in 250µl di DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) cui è stato aggiunto l'1% di IPG Buffer 3-11NL (GE Healthcare), per facilitare l'isoelettrofocalizzazione.

Ogni campione è stato sottoposto a sonicazione (4 ripetizioni da 12000V per 5 secondi), in modo da eliminare gli agglomerati rimasti, perché non potessero influire sulla separazione delle proteine durante la prima e la seconda dimensione.

Ciascun campione di plasma seminale è stato caricato su una striscia pH3-11 IPG strip da 130mm (GE Healthcare).

La corsa per la separazione delle proteine a seconda del loro diverso punto isoelettrico (pI) è stata condotta su un apparecchio della Bio-Rad (IPGphor) a 20°C.

Prima di iniziare l'isoelettrofocalizzazione ciascuna strip, su cui è stato precedentemente caricato il campione, è stata lasciata a idratare passivamente per almeno 8 ore.

La corsa è stata condotta in più fasi:

1. 3 ore di idratazione attiva a 50V
2. 1 ora di corsa a gradiente a 500V
3. 2 ore di corsa a gradiente a 1000V
4. 8000V di corsa rapida V/ora fino a 48000V
5. 1000V di corsa rapida per 24 ore

L'ultimo passaggio viene eseguito per sicurezza in modo da evitare che le proteine contenute nelle strisce non diffondano in maniera disordinata, quando rimangono a temperatura ambiente e prive di carica.

Le strip possono essere conservate a -20°C fino all'esecuzione della seconda dimensione, che consiste in un'elettroforesi su gel di poliacrilamide, che permette alle proteine, precedentemente separate in base al loro punto isoelettrico, di separarsi in base al loro specifico peso molecolare.

Prima di procedere con la seconda dimensione le strisce vengono immerse separatamente in agitazione, per 15 minuti in 1ml di IEF Equilibration Buffer (50mM di Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 6M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, Blu di Bromofenolo e H_2O) addizionato con 0,01% di DTT (Di-Tio-Treitololo) (Sigma). Successivamente vengono immerse in agitazione per altri 15 minuti con 1ml di IEF Equilibration Buffer addizionato con 0,05% di Iodoacetamide (Sigma). Vengono poi lavate per qualche secondo con una soluzione 1X Tampone di Corsa (Glicina, Tris-base, SDS e H_2O), prima di essere caricate sul gel.

Il gel ha uno spessore di 1,5mm. Viene preparato un Running Gel al 14% di Acrilamide/Bis (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, Bis - acrilamide 14%, APS 10%, SDS 10%, TEMED e H_2O) che consente la separazione ottimale delle proteine sia di alto che di basso peso molecolare. Per permettere la compattazione delle proteine, prima di procedere alla loro separazione su Running

Gel, le strisce vengono appoggiate su strato di Stacking Gel (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, Bis-acrilamide, APS 10%, SDS 10%, TEMED e H₂O) e il tutto viene sigillato con Agarosio NA 0,5% in 1 X Tampone di Corsa, a cui è stato aggiunto un po' di Blu di Bromofenolo in modo da poter visualizzare il fronte della corsa. L'elettroforesi viene eseguita utilizzando apparecchiatura Amersham in un Tampone di Corsa 0,5X.

In alcune corse è stato aggiunto, come riferimento, un marcatore di peso molecolare (Prestained protein marker, New England BioLabs) con una distribuzione da 7kDa a 175kDa circa, secondo le indicazioni della casa produttrice.

Le proteine vengono fissate al gel immergendole per almeno un'ora in agitazione, in una soluzione di Fissaggio (7% acido acetico, 10% etanolo e H₂O).

Ogni gel viene colorato con Coomassie Brilliant Blue G250 Colloidale (Sigma) (per colorare 4 gel: 600 ml H₂O, 70 ml acido orto fosforico, 100 g ammonio solfato, 1,2 g Coomassie G-250, portare la soluzione a 800ml con H₂O. Aspettare 30 min e aggiungere 200 ml di metanolo. Lasciare almeno 1 ora in agitazione) per 48 ore a temperatura ambiente in agitazione costante. Per eliminare l'eccesso di colorante i gel vengono successivamente sciacquati con abbondante acqua distillata. Le proteine appaiono sui gel come degli spot colorati in blu.

Tutti i 20 gel sono stati scannerizzati e successivamente sigillati in una piccola quantità di H₂O e azide (al 10%) all'interno di un sacchetto di plastica trasparente e conservati a 4°C.

Le immagini dei gel sono state salvate in formato .tiff, con una risoluzione di 300dpi. In seguito sono state elaborate con Photoshop per eliminare i marcatori di peso molecolare e le zone con cattiva risoluzione. Le immagini opportunamente modificate sono state caricate sul programma Ludesi Redfin Solo per confrontare e identificare ciascuno spot espresso in maniera diversa nei 2 gruppi di campioni presi in esame.

Il programma Ludesi Redfin Solo consente di sovrapporre le immagini di ciascun gel, mantenendo fissi alcuni spot presi come riferimento (almeno 100 spot). Per selezionare gli spot

veramente differenti sono stati impostati manualmente alcuni filtri (Anova $p < 0,05$, Mann-Whitney $p < 0,05$, intensità espressa in pixel $> 1,5$ volte).

I risultati forniti dal programma sono stati controllati dall'operatore che ha eseguito un'ulteriore selezione degli spot.

Gli spot così individuati sono stati tagliati dai gel nei quali erano più visibili e, opportunamente conservati e sigillati, sono stati spediti in Germania per essere identificati mediante spettrometria di massa dalla ditta Proteome Factory, tramite Euroclone.

3.3.2 Fluidi follicolari

Come per i campioni di plasmi seminali anche per i campioni di fluidi follicolari è stata valutata la concentrazione totale di proteine presente con metodica Bradford.

Poiché la quantità di Albumina e di Immunoglobuline G (IgG) in questo tipo di campioni, derivati dal plasma sanguigno, è molto elevata abbiamo cercato di eliminare l'eccesso di queste proteine con un Kit apposito (Depletion of Albumin and IgG Kit della Qiagen).

La quantità iniziale di proteine caricata in ciascuna colonnina del Kit è pari a 2500µg. Dopo l'eliminazione dell'Albumina e delle IgG in eccesso la quantità di proteine analizzate nelle fasi successive varia da campione a campione (rimane il 17-27% della concentrazione di proteine di partenza).

Le proteine vengono precipitate usando 10% di TCA a 4°C per tutta la notte, in camera fredda. I successivi lavaggi con Etere-Etano (1:1) consentono l'eliminazione dell'acido rimasto, per permettere la reidratazione ottimale delle proteine stesse in 250 µl di DeStreak Rehydration Solution addizionata con 0,6% di IPG Buffer 3-11NL.

I campioni sono stati sottoposti a sonicazione (4 ripetizioni da 12000V per 5 secondi) per eliminare gli agglomerati presenti.

L'isoelettrofocalizzazione delle proteine dei fluidi follicolari viene eseguita usando le stesse condizioni adottate per l'analisi dei plasmi seminali. Vengono usate anche le stesse strisce (pH3-11 IPG strip da 130mm). I campioni vengono messi ad idratare passivamente a contatto con le strip per almeno 8 ore. Successivamente le strisce contenenti i campioni vengono posizionate sulla IPGphor per l'esecuzione della prima dimensione.

I passaggi eseguiti dall'apparecchio sono:

1. 3 ore di idratazione attiva a 50V
2. 1 ora di corsa a gradiente a 500V
3. 2 ore di corsa a gradiente a 1000V

4. 8000V di corsa rapida V/ora fino a 48000V
5. 1000V di corsa rapida per 24 ore

A questo punto le proteine sulle strisce si sono separate in base al loro diverso punto isoelettrico. Prima di procedere con la seconda dimensione le strisce vengono immerse separatamente in agitazione per 15 minuti in 1ml di IEF Equilibration Buffer addizionato con 0,01% di DTT. Successivamente vengono immerse in agitazione per altri 15 minuti con 1ml di IEF Equilibration Buffer a cui è stato aggiunto lo 0,05% di Iodoacetamide. Le strip vengono poi lavate per qualche secondo con una soluzione 1X Tampone di Corsa, prima di essere caricate sul gel, esattamente come per i plasmi seminali.

Anche per la separazione delle proteine dei fluidi follicolari secondo il loro specifico peso molecolare si usa un Running Gel con una percentuale di Acrilamide/Bis del 14%. Per rendere compatto il fronte delle proteine, le strisce vengono appoggiate su uno Stacking Gel e sigillate con 0,5% Agarosio NA in 1X Tampone di Corsa, a cui viene aggiunto un po' di Blu di Bromofenolo.

In alcune corse, proprio come per i campioni di plasmi seminali, vengono aggiunti i marcatori di peso molecolare (7-175kDa).

I gel vengono lasciati correre ben oltre l'uscita del fronte colorato nella soluzione di corsa, poiché la maggior parte delle proteine contenute nei fluidi follicolari ha un elevato peso molecolare. In questo modo si può ottenere una buona separazione delle proteine e quindi degli spot distinti gli uni dagli altri.

Le proteine vengono fissate sul gel utilizzando una soluzione 7% Acido Acetico e 10% Etanolo, in cui i gel vengono lasciati per almeno un'ora in agitazione a temperatura ambiente.

Per visualizzare gli spot si utilizza una colorazione con Coomassie Brilliant Blue G250 Colloidale (la stessa soluzione usata per i plasmi seminali), in cui i gel rimangono immersi in

agitazione per 48 ore. Per eliminare il background, i gel vengono sciacquati con abbondante H₂O distillata.

In seguito vengono scannerizzati e le immagini vengono salvate in formato .tiff, con una risoluzione di 300dpi.

Le immagini opportunamente modificate con Photoshop sono state caricate nel programma Ludesi Redfin Solo e sono state sovrapposte una ad una, usando l'immagine di un solo gel come riferimento. Tra le 12 immagini dei gel di fluidi follicolari caricate nel programma, sono stati creati i due gruppi di confronto tra cui eseguire l'analisi.

Anche per l'analisi dei campioni di fluidi follicolari sono stati impostati manualmente dei filtri (intensità >1,5, Anova p<0,05 e Mann-Whitney p<0,05).

I gel sono stati conservati in buste di plastica sigillate a 4°C, leggermente idratati da una soluzione formata da H₂O e azide, per impedire la formazione di muffe e altre contaminazioni.

3.4 WESTERN BLOT

3.4.1 Plasmi seminali

Dall'analisi dei plasmi seminali con spettrometria di massa sono state identificate 4 proteine, una per ognuno dei 6 spot che sono stati mandati ad analizzare.

In 2 spot la contaminazione da cheratina è risultata troppo forte per consentire l'identificazione delle proteine presenti.

È stata eseguita una successiva analisi con western blot contro le proteine: *Epididymal secretory protein E1* e *Galectin-3-binding protein*, che sono risultate in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* e potrebbero essere considerate come bio-marcatore di fertilità.

Epididymal secretory protein E1 (NPC2) e *Galectin-3-binding protein* (M2BP) sono state analizzate utilizzando due anticorpi policlonali commerciali (Abnova), ciascuno contro la proteina di interesse, sintetizzati in topo (mouse).

Sono stati corsi due SDS-Page al 10% di Acrilamide/Bis, con 4 campioni di plasmi seminali N e 4 campioni di plasmi seminali O/A per entrambi i gel. La quantità di proteina caricata per ciascun campione, in ogni singolo pozzetto è uguale ed è pari a 100µg. Il volume totale di campione caricato è pari a 45µl, così ripartito Xµl di campione di plasma seminale + Yµl di H₂O fino a raggiungere un volume di 40µl + 5µl di Tampone di Caricamento o Loading Buffer (LB).

Eseguita la corsa su gel, le proteine sono state trasferite su membrana di PVDF (poli-vinilid-fluoride) (Amersham), usando come Tampone di Trasferimento una soluzione 0,5X di Tampone di Corsa, a cui viene aggiunto il 10% di Metanolo.

Il trasferimento è stato condotto per 1 ora a 200mA, per testare la proteina NPC2, poiché ha un basso peso molecolare. Mentre il trasferimento su membrana per testare M2BP è stato condotto

per 2 ore nelle stesse condizioni, poiché la proteina ha un peso molecolare più elevato e fa quindi più fatica ad uscire dalle maglie create dalla poliacrilamide nel gel.

Le proteine sono state fissate sulla membrana di PVDF con una soluzione 3% Albumina (Sigma) in PBS, per 1 ora a 4°C in agitazione costante. L'incubazione con l'anticorpo primario diluito 1:1000 in 3% Albumina in PBS è stata condotta per tutta la notte a 4°C in agitazione costante.

Poi sono stati eseguiti 3 lavaggi, da 15 minuti ciascuno a RT ("room temperature"/ temperatura ambiente) in agitazione, con una soluzione 0,1% Tween (Sigma) in PBS, per eliminare l'anticorpo primario non legato alla proteina di interesse presente sulla membrana di PVDF.

Quest'ultima è stata incubata con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con HRP ("horse-raddish-peroxidase") (Dako) diluito 1:2000 in una soluzione 3% Albumina in PBS, per almeno un'ora in agitazione a temperatura ambiente.

Sono stati eseguiti 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno a RT in agitazione con PBS-Tween, per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario.

La membrana è stata incubata per 5 minuti con Femto (Pierce) diluito 1:3 con H₂O distillata. Una lastra autoradiografica viene posizionata sopra la membrana, precedentemente trattata, e così sovrapposte vengono sigillate in una cassetta di alluminio perché non si muovano. Dopo pochi secondi o minuti di esposizione la lastra viene sviluppata in camera oscura. L'esposizione è variabile per ottenere l'immagine migliore. Per sviluppare la lastra si utilizzano una Soluzione di Sviluppo, che viene poi eliminata con abbondante H₂O e per fissare gli ioni argento, si utilizza una Soluzione di Fissaggio. La lastra viene, poi, pulita con H₂O e asciugata in incubatore a 56°C.

Le bande scure, formate dai precipitati d'argento, apparse sulle due lastre corrispondono all'anticorpo coniugato alla proteina di interesse, rispettivamente NPC2 in una e M2BP nell'altra.

4- RISULTATI

4.1 Plasmi seminali

Presso il centro di Procreazione Medicalmente Assistita dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste è stato eseguito lo spermioγραμμα dei 20 campioni di liquido seminale opportunamente selezionati per questo progetto di dottorato.

Secondo le caratteristiche intrinseche di ciascun campione, il plasma seminale da esso ottenuto è stato inserito in uno dei seguenti gruppi:

1. Plasmi seminali di campioni *Normozoospermici* (N)
2. Plasmi seminali di campioni *Oligo-Astenozoospermici* (O/A)

Il plasma è stato separato dalla componente cellulare mediante centrifugazione. Il sopranatante è stato prelevato e conservato a -80°C , con l'aggiunta di inibitore di proteasi, fino al momento dell'analisi.

Sono stati analizzati 10 campioni appartenenti al gruppo N e li abbiamo confrontati con 10 campioni appartenenti al gruppo O/A.

La concentrazione media degli spermatozoi dei campioni di liquido seminale del gruppo *Normozoospermici* è pari a $70,3 \pm 41,1 \times 10^6/\text{ml}$, mentre la motilità media è pari al $53 \pm 4,5 \%$.

La concentrazione media degli spermatozoi dei campioni di liquido seminale del gruppo *Oligo-Astenozoospermici* è pari a $7,9 \pm 5,8 \times 10^6/\text{ml}$, mentre la motilità è pari al $16 \pm 11,4\%$.

Con metodica Bradford è stato possibile ricavare la concentrazione proteica totale di ciascun campione di plasma seminale.

	concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l N}$	media \pm sd		concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l O/A}$	media \pm sd
1	12,9	15,47 \pm 3,9	1	16,5	17,52 \pm 3,4
2	13,3		2	20,6	
3	22,7		3	21,2	
4	14,9		4	20,3	
5	13,5		5	18,3	
6	20,4		6	17,4	
7	17,2		7	13,7	
8	14,4		8	19,1	
9	9,1		9	10,2	
10	16,3		10	17,9	

Tabella 1: concentrazione proteica di ciascun campione di plasma seminale

La media della concentrazione proteica nei due gruppi di campioni di plasmi seminali N (15,47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e O/A (17,52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) non risulta dissimile.

Per l'analisi bidimensionale sono stati utilizzati 500 μg di proteine per ciascuno dei 20 campioni presi in esame. Le proteine sono state precipitate tutta la notte in camera fredda utilizzando il 10% di TCA. Per togliere l'eccesso di acido, che può andare a interferire con la sospensione delle proteine nella soluzione di riidratazione e con il pH delle stesse, i campioni sono stati lavati con una soluzione 1:1 di Etere-Etanolo.

Per equilibrare la DeStreak Rehydration Solution e per favorire la separazione delle diverse specie proteiche durante la prima dimensione si aggiunge l'1% di IPG Buffer 3-11NL.

Le proteine in soluzione vengono sonicate per eliminare tutti gli aggregati presenti nel campione, perché non possano interferire durante l'isoelettrofocalizzazione.

Ciascun campione è stato caricato su apposite strisce di gel (IPG strip) ed è stato lasciato assorbire passivamente su queste strisce per almeno 8 ore. Una volta adsorbito sulla strip il

campione viene messo nell'apposito apparecchio, dove, grazie a diversi gradienti elettrici, le proteine si separano le une dalle altre in base al loro diverso punto isoelettrico.

Le diverse specie proteiche si distribuiscono dal polo positivo al polo negativo dell'apparecchio partendo da quelle con pI più acido (pH3) a quelle con pI più basico (pH11). Le proteine con pI più acido e più basico di quello indicato si accumulano in corrispondenza dei due poli e, in seguito, sono state escluse dall'analisi.

Le proteine presenti sulle strisce di gel vengono trattate con un agente riducente (DTT), che rompe i ponti disolfuro tra gli aminoacidi della catena polipeptidica e con un agente alchilante (Iodoacetamide), che si lega covalentemente al gruppo tiolico della cisteina in modo che i ponti disolfuro non si possano riformare. In questo modo le proteine perdono la loro conformazione tridimensionale e rimangono lineari. Tutto ciò per facilitarne la successiva separazione in base al loro specifico peso molecolare.

Le strip vengono caricate sul gel al 14% di Acrilamide/Bis e grazie al campo elettrico applicato dall'apparecchio di corsa le proteine si possono separare in base al loro peso molecolare. La percentuale di Acrilamide/Bis è stata scelta per consentire una buona separazione sia delle proteine ad alto, che a basso peso molecolare.

Le proteine ad alto peso molecolare si distribuiscono sulla parte superiore del gel, mentre quelle a basso peso molecolare si distribuiscono sulla parte inferiore. La corsa viene fermata subito dopo l'uscita dal gel del fronte colorato, in modo da non perdere nel Tampone di Corsa le proteine con peso molecolare più basso.

Per avere un riferimento sui pesi molecolari delle diverse proteine, la corsa di alcuni gel è stata eseguita aggiungendo dei marcatori di peso molecolare (7-175kDa).

Nei campioni di plasmi seminali sono maggiormente presenti proteine a basso peso molecolare, che si collocano sulla parte inferiore del gel.

Si procede poi al fissaggio delle proteine tra le maglie di acrilamide, utilizzando una soluzione alcolica contenente il 10% di Etanolo e il 7% di Acido Acetico.

I gel sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue G250 Colloidale per 48 ore in agitazione. Per la preparazione della soluzione di colorante è molto importante seguire l'ordine dei reagenti, in modo che i diversi elementi si solubilizzino e si formino il minor numero possibile di residui cristallizzati. Questi, infatti, possono formare delle macchie sul gel che non hanno nulla a che fare con gli spot che contengono una proteina.

Questa colorazione consente di visualizzare spot che contengono fino a 10ng di proteina, ed è stata scelta perché molto più sensibile della colorazione con Coomassie Brilliant Blue R-250, anche se le particelle colloidali risultano meno solubili e perciò si formano più facilmente dei precipitati.

Per vedere meglio gli spot, che risultano colorati in blu, e per eliminare l'eccesso di colorante che andrebbe ad interferire con la successiva analisi, si decolorano i gel, lavandoli con acqua distillata. Eliminato l'eccesso di colorante dai gel, questi vengono scannerizzati e le immagini vengono salvate in formato .tiff, con una risoluzione di almeno 300dpi sia in scala di grigi (16 grey scale), sia mantenendo i colori (24 color).

Il formato e la risoluzione sono fondamentali per caricare le immagini dei gel nel programma Ludesi Redfin Solo e procedere con l'analisi.

Ottenute le immagini, i gel vengono immersi in acqua e azide, che serve ad impedire che muffe ed altri organismi possano contaminare gli stessi gel, che successivamente vengono conservati e sigillati all'interno di buste di plastica in camera fredda.

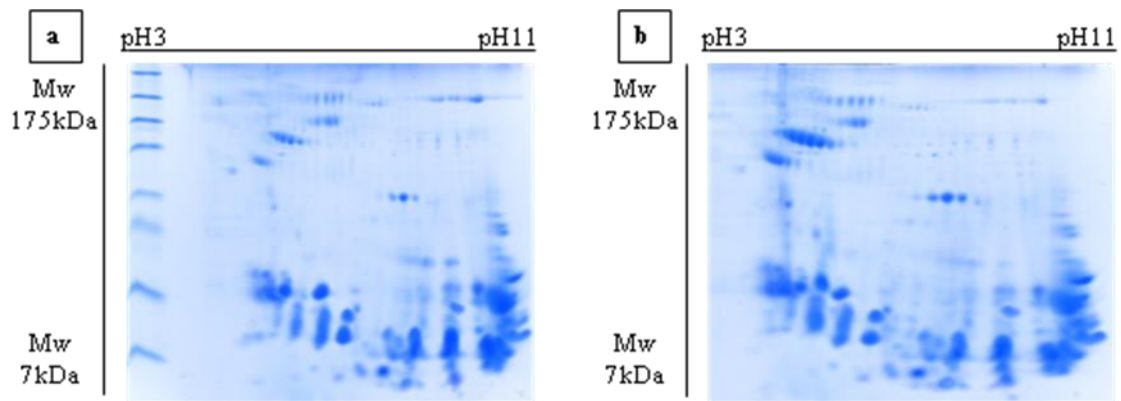


Figura 4: a) gel di plasma seminale N; b) gel di plasma seminale O/A

Le immagini dei gel vengono elaborate con il programma Photoshop, che ci consente di ritagliarle in modo da escludere le zone periferiche non focalizzate, che interferirebbero nell'analisi con Ludesi, prestando attenzione a non eliminare nessuno spot di potenziale interesse.

Le immagini così modificate sono caricate sul programma Ludesi Redfin Solo. L'immagine di un solo gel viene utilizzata come gel base su cui andranno sovrapposti gli altri gel uno alla volta. Questa operazione viene svolta manualmente da un operatore che individua nei due gel alcuni spot in comune (almeno un centinaio, per un'analisi corretta) e elaborando l'immagine fa in modo che combacino, in questo modo, se l'operazione è stata svolta correttamente, anche gli altri spot presenti tenderanno a sovrapporsi tra loro.

Questa operazione è stata condotta per tutti i 20 gel di plasmi seminali. L'operatore può così formare i due gruppi, ciascuno costituito da 10 gel, tra cui il programma esegue il confronto.

Abbiamo ottenuto un elaborato in cui è stato possibile aggiungere manualmente dei filtri (intensità >1,5, Anova $p < 0,05$, Mann-Whitney $p < 0,05$) per eliminare la maggior parte degli spot che il programma identifica erroneamente come differenzialmente espressi tra plasmi seminali N e O/A. In questo modo è stato possibile selezionare solo quegli spot che presentavano un'effettiva e statisticamente significativa differenza tra i due gruppi di campioni presi in esame.

Il resoconto iniziale fornito dal programma indicava 30 spot espressi in maniera diversa nei due gruppi di plasmi seminali di soggetti N e O/A su un totale di 1028 spot. È stato possibile ridurre ulteriormente il numero degli spot andando a verificare in quale zona del gel, questi spot fossero presenti. Abbiamo infatti escluso dai risultati tutti quegli spot che si trovavano in zone con una cattiva risoluzione, perché troppo vicini ad altri spot e quindi confondibili con essi. In conformità a tali criteri di esclusione solo 6 spot sono stati considerati come differenti nei due gruppi di campioni di plasmi seminali *Normozoospermici* ed *Oligo-Astenozoospermici*.

Solo 2 spot sono maggiormente espressi nei campioni di plasmi seminali di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*, mentre 4 risultano in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici*.

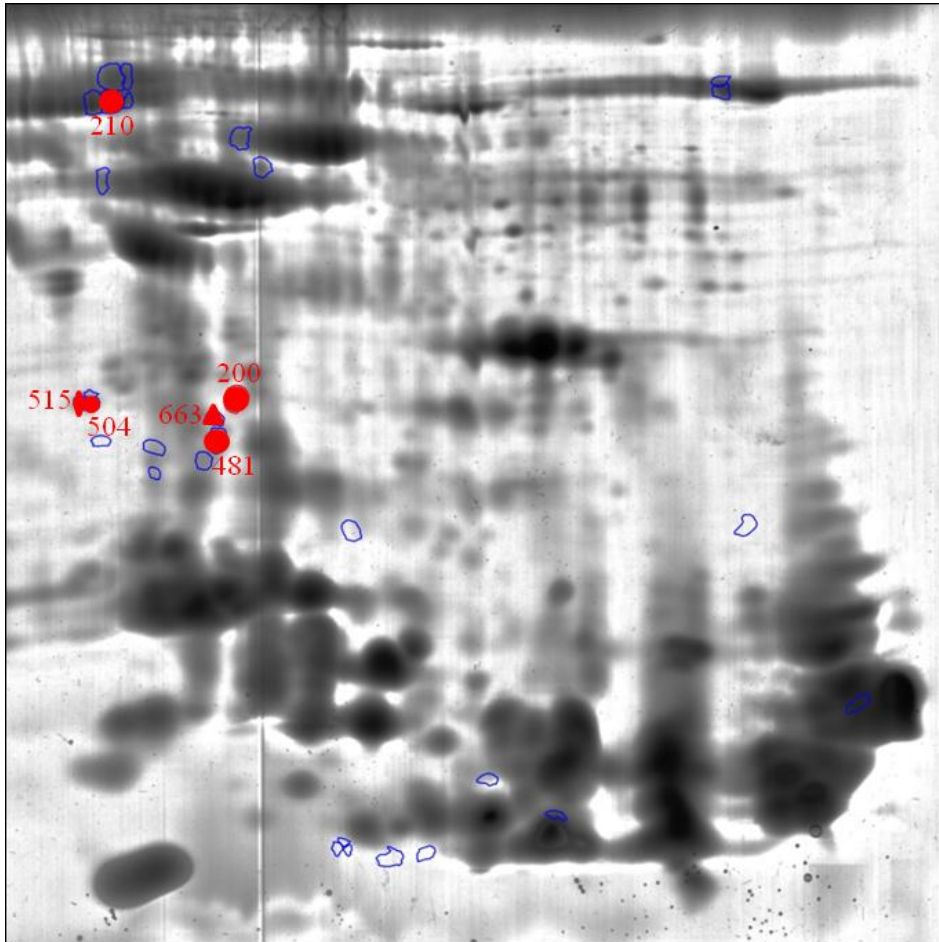


Figura 5: Gel di plasma seminale con indicati i punti corrispondenti agli spot espressi in maniera diversa nei due gruppi di campioni di soggetti N e O/A

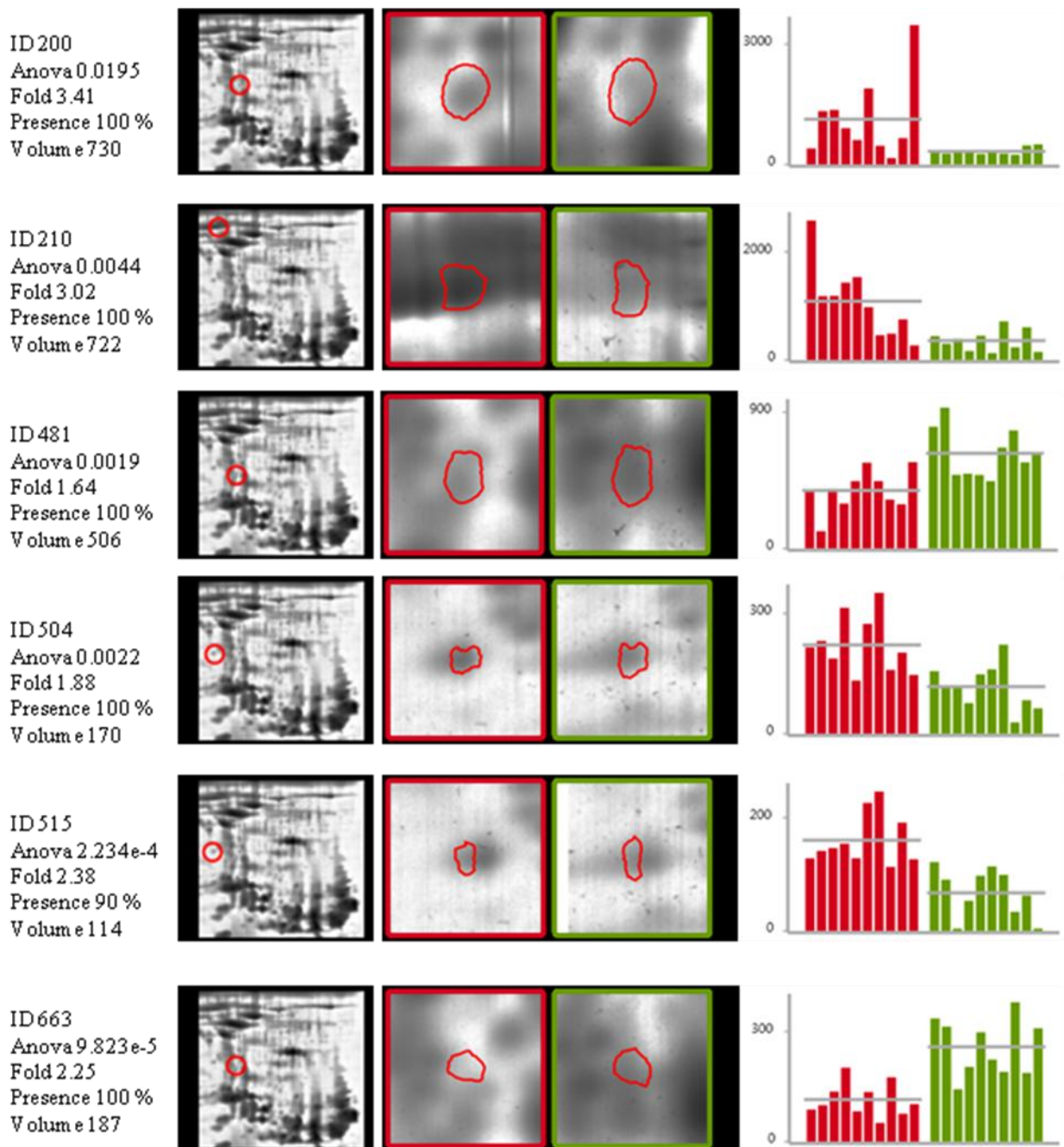


Figura 6: Resoconto sugli spot di interesse ottenuto con Ludesi Redfin Solo; in rosso sono indicati i campioni di plasmi seminali di soggetti N, mentre in verde sono indicati i plasmi seminali di soggetti O/A

Confrontando le diverse immagini sono stati individuati i gel in cui gli spot di interesse erano maggiormente visibili. Per ogni singolo spot sono stati scelti 3 gel in cui lo stesso spot era ben individuabile. Lo spot è stato tagliato dai 3 gel selezionati. I pezzettini di poliacrilamide contenente la proteina da identificare sono stati messi in una provetta Eppendorf da 1,5ml pulita. Ogni provetta è stata siglata con il numero identificativo ottenuto dal resoconto del programma

Ludesi Redfin Solo. Tutte le procedure sono state eseguite cercando di evitare contaminazioni con cheratina, una proteina molto stabile e resistente, prodotta dai cheratinociti e presente sull'epidermide, sulle unghie e sui capelli.

I campioni sono stati spediti in Germania alla ditta Proteome Factory, dove è stata eseguita la spettrometria di massa.

La proteina presente nello spot viene liberata dalla poliacrilamide, viene frammentata usando un enzima (tripsina) ad alta specificità di taglio e nello spettrometro di massa viene ionizzata. Le masse peptidiche ionizzate che si sono formate passano nell'analizzatore, dove vengono separate in base al rapporto massa/carica e poi questi rapporti vengono rilevati con la formazione di spettri specifici. Questi spettri vengono inseriti in una banca dati (Mascot) che fornisce diverse proteine possibili per ciascun singolo spot, a seconda del numero di spettri di cui trova la corrispondenza.

Sono stati calcolati il punto isoelettrico (pI) e il peso molecolare (Mw) sperimentali delle proteine che dovevano essere identificate e li abbiamo confrontati con pI e Mw teorici delle possibili proteine individuate dall'analisi di massa. In questo modo siamo riusciti a identificare una sola proteina possibile per ciascuno spot.

La tabella 2 presenta i risultati ottenuti dall'analisi con spettrometria di massa, dopo aver confrontato i dati sperimentali e teorici.

Spot	pI sperimentale	MW sperimentale	Score>70	Proteine possibili	pI teorico	MW teorico	N	O/A
200	5,8	29,5kDa	133	Epididymal secretory protein E1 precursor	6,95	16,5kDa	>	
210	4,6	77,6kDa	258	Galectin-3-binding protein	5,08	63,3kDa	>	
481	5,3	28,2kDa	79	Lipocalin-1 precursor	5,26	19,2kDa		>
504	4,9	30,2kDa	234	Unnamed protein product (Keratin)	5,17	59,5kDa	>	
515	4,3	30,2kDa	482	type I Keratin 16	4,99	51,2kDa	>	
663	5,2	28,8kDa	198	Prolactin-inducible protein precursor	5,47	13,5kDa		>

Tabella 2: identificazione delle proteine presenti negli spot analizzati con spettrometro di massa

Due degli spot analizzati risultano contaminati da cheratina e perciò non è stato possibile capire quali proteine contenessero.

Le altre proteine identificate invece sono:

- ✚ Epididymal secretory protein E1 precursor, conosciuta come Nieman Pick 2 (NPC2) maggiormente presente nel plasma seminale di soggetti *Normozoospermici*
- ✚ Galectin-3-binding protein conosciuta come Mac-2-binding protein (M2BP) anch'essa maggiormente presente nel plasma seminale di soggetti *Normozoospermici*
- ✚ Lipocalin-1 precursor (LCN-1) è conosciuta anche come Tear Lipocalin e Von Ebner gland protein, risulta maggiormente presente nel plasma seminale di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*
- ✚ Prolactin-inducible protein precursor (PIP) conosciuta anche come Gross Cystic Disease Fluid Protein 15 risulta maggiormente presente nel plasma seminale di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*.

4.2 WESTERN BLOT

4.2.1 Plasmi seminali

Per questo studio di dottorato ci siamo concentrati sulle due proteine identificate che risultano maggiormente espresse nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici*, cioè NPC2 e M2BP, che possono essere considerate come potenziali bio-marcatori di fertilità.

Inoltre su queste due proteine c'è molto materiale in letteratura collegato al plasma seminale e pertanto abbiamo cercato un'ulteriore conferma della loro presenza nei campioni esaminati.

Per questo motivo è stata eseguita un'analisi di western blot, con NPC2 e M2BP come "bersaglio".

Sono stati scelti degli anticorpi commerciali policlonali, poiché questa caratteristica li rende in grado di riconoscere più epitopi della proteina di interesse. In questo modo sarebbero teoricamente capaci di legarsi ad essa anche se un epitopo di riconoscimento non risultasse esposto.

Sono stati eseguiti 2 western blot distinti ed utilizzando campioni di plasma seminale differenti; uno per ciascuna delle due proteine da testare.

In entrambe le analisi abbiamo preparato un SDS-Page al 10% di Acrilamide/Bis con 10 pozzetti disponibili per caricare i campioni. In entrambi abbiamo seguito lo stesso schema di caricamento dei campioni: nei primi 4 pozzetti sono stati caricati 4 campioni di plasmi seminali di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*, poi abbiamo caricato i marcatori di peso molecolare, in altri 4 pozzetti abbiamo caricato i plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* e l'ultimo pozzetto è stato caricato con H₂O, come controllo negativo, per essere certi che non ci fossero contaminazioni o falsi positivi.

A ciascun campione sono stati aggiunti 5µl di LB. Il Tampone di Caricamento contiene Glicerolo, che grazie al suo peso, mescolato al campione gli impedisce di fuoriuscire dal pozzetto e Blu di Bromofenolo, che serve a formare e visualizzare il fronte di corsa colorato.

Per il trasferimento delle proteine su membrana abbiamo usato 2 tempi differenti.

Per eseguire il western contro NPC2 il trasferimento è stato eseguito in una sola ora, perché questa proteina ha un peso molecolare piuttosto basso (Mw teorico di 16,5kDa e Mw sperimentale di 29,5kDa). Sappiamo, infatti, che proteine a basso peso molecolare si trasferiscono più velocemente sulla membrana, rispetto a quelle ad alto peso molecolare, perché si liberano più facilmente dalle maglie formate dall'acrilamide. Pertanto, se si esegue un trasferimento troppo lungo si rischia di perdere le proteine più piccole, che potrebbero oltrepassare la membrana diffondersi nel Tampone di Trasferimento.

Per permettere, invece, che M2BP, che ha un peso molecolare più elevato (Mw teorico di 63,3kDa e Mw sperimentale di 77,6kDa) si trasferisca sulla membrana di PVDF il trasferimento è stato condotto per 2 ore.

La membrana su cui le proteine si sono trasferite in una sola ora è stata messa ad incubare per tutta la notte con l'anticorpo primario fatto in topo contro NPC2. Per evidenziare la sua adesione alla membrana, in corrispondenza della proteina di interesse, è stato usato un anticorpo secondario anti-topo coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). La membrana viene incubata con Femto, che reagisce chimicamente con HRP ed è capace di eccitare, tramite la chemiluminescenza generata, gli ioni argento presenti sulla lastra fotografica, che viene esposta sulla membrana. Sulla lastra si formano dei precipitati d'argento in corrispondenza della proteina legata all'anticorpo primario contro NPC2.

Quest'ultimo essendo un anticorpo policlonale è stato in grado di riconoscere le diverse isoforme della proteina presenti nel plasma seminale, compresa quella di interesse con un peso molecolare sperimentale di 26,5kDa. Dall'analisi condotta in letteratura, probabilmente, l'isoforma di NPC2

di interesse è una forma N-glicosilata, compatibile con quella rilevata dallo studio di Légaré (Légaré C. e al., 2006).

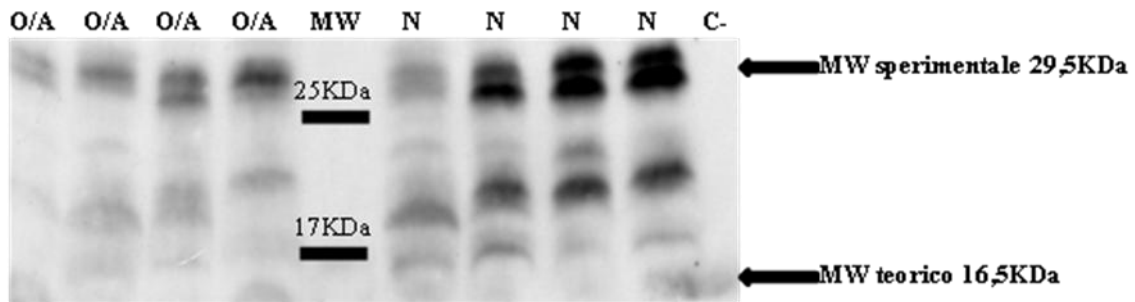


Figura 7: Risultato Western Blot con anticorpo policlonale anti-NPC2

Nonostante l'analisi con western blot non sia quantitativa si può notare dalla Fig.7 che i campioni di plasmis seminali di soggetti *Normozoospermici* presentano una quantità maggiore di anticorpo e di conseguenza di NPC2, ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti col programma Ludesi Redfin Solo.

Il western eseguito contro la proteina M2BP non ha dato risultati altrettanto buoni. Il trasferimento delle proteine sulla membrana è stato eseguito per 2 ore, in modo da consentire il passaggio di M2BP dal gel di acrilamide al PVDF. Anche per questa analisi abbiamo usato un anticorpo policlonale, per evitare il non riconoscimento di qualche epitopo.

Purtroppo però questo anticorpo commerciale è risultato altamente aspecifico e si è legato anche ad altre proteine oltre che a quella di interesse. Tra le proteine cui l'anticorpo si è legato in maniera molto aspecifica ci sono anche alcuni marcatori di peso molecolare.

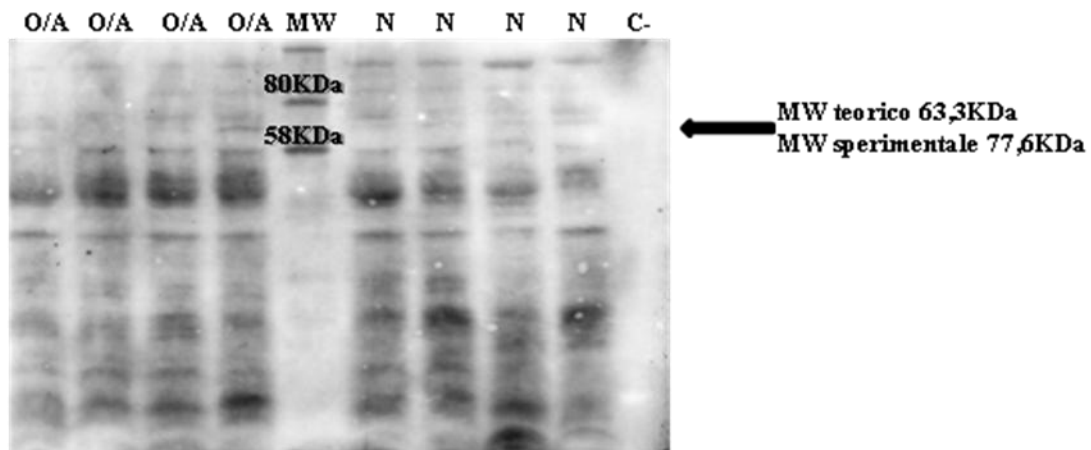


Figura 8: Risultato Western Blot con anticorpo policlonale anti-M2BP

Si nota dalla lastra, nonostante la distribuzione diversa delle proteine presenti, che la quantità totale delle proteine caricate su gel per ciascun campione è la stessa (100µg).

Le membrane in PVDF purtroppo non si colorano con Rosso Ponceau. L'utilizzo di questo tipo di colorazione ci avrebbe permesso di essere certi, da un punto di vista visivo, di aver caricato la stessa quantità di campione in ciascun pozzetto. Inoltre, poiché la colorazione con Rosso Ponceau è reversibile, avremmo potuto utilizzare la stessa membrana per il western blot, semplicemente sciacquandola con abbondante H₂O distillata.

Abbiamo provato a cercare in letteratura colorazioni alternative che potessimo eseguire nei nostri laboratori, ma purtroppo l'unica colorazione possibile è risultata quella con Coomassie Brilliant Blue R250. Questa però è irreversibile e quindi non ci avrebbe permesso di proseguire l'analisi, perché avrebbe interferito nel legame tra l'anticorpo primario e la proteina di interesse presente sulla membrana.

Perciò questa lastra, seppure inutile per confermare ulteriormente la presenza di M2BP nei plasmii seminali, si può considerare come una conferma nell'aver eseguito correttamente il primo fondamentale passaggio per l'analisi di western blot.

4.3 Fluidi follicolari

Per questo progetto di dottorato sono stati raccolti e conservati, durante i prelievi degli ovociti (pick up), i fluidi follicolari che altrimenti sarebbero stati scartati, perché inutilizzati nelle procedure di fecondazione assistita.

Alle pazienti che si sono sottoposte a IVF (Inseminazione in Vitro), dopo un'opportuna stimolazione farmacologica, viene aspirato, sotto controllo ecografico, il contenuto di ogni singolo follicolo che abbia raggiunto una certa dimensione (>15mm). Si suppone, infatti, che all'interno di ogni liquido aspirato ci sia un ovocita che abbia completato la metafase 2 (M2) e sia quindi pronto per essere utilizzato per le procedure successive, cioè sia possibile inseminarlo per ottenere un embrione sano. Non sempre però gli ovociti contenuti nei follicoli di una certa dimensione hanno raggiunto la completa maturazione e si trovano ancora o allo stadio di vescicola germinale (GV) oppure in metafase 1 (M1), nonostante le pazienti si siano sottoposte a una terapia farmacologica adeguata. Per questo motivo ci siamo chiesti se il contenuto proteico del fluido follicolare in cui l'ovocita si trova possa in qualche modo influire sulla capacità dell'ovocita stesso di maturare e quindi se ci sia qualche proteina che si possa considerare come un bio-marcatore di maturità ovocitaria.

Abbiamo raccolto da ciascuna paziente il primo fluido follicolare aspirato e abbiamo conservato solo quelli che contenevano un solo ovocita. Abbiamo scelto solo il primo fluido, perché è privo di contaminazioni da parte del terreno di lavaggio con cui i follicoli vengono sciacquati per recuperare tutti gli ovociti presenti. I fluidi prima di essere conservati sono stati sottoposti a centrifugazione per eliminare tutta la componente cellulare presente nel campione ed è stata aggiunta un'adeguata quantità di inibitore di proteasi. Gli ovociti delle pazienti, per cui è stata eseguita ICSI, sono stati denudati, cioè sono state rimosse le cellule del cumolo ooforo e della corona radiata. In questo modo, utilizzando il microscopio è possibile identificare le caratteristiche che ci permettono di classificarlo come M2, M1 o GV.

Negli ovociti M2 il nucleo non è più visibile nel citoplasma dell'ovocita, ma il primo globulo polare è già stato estruso.

Gli ovociti delle pazienti che si sottopongono a FIVET non sono denudati e pertanto non potendo classificare con certezza il grado di maturità degli ovociti, non abbiamo usato i fluidi corrispondenti in questo progetto.

Solamente 6 dei fluidi follicolari raccolti contenevano un ovocita immaturo (GV o M1). Il numero è molto basso perché tutte le pazienti sono stimolate con farmaci che servono a far crescere i follicoli e a far maturare gli ovociti al loro interno. È stato eseguito il confronto con lo stesso numero di fluidi follicolari contenenti, invece, degli ovociti maturi (M2).

Fino al momento dell'analisi con elettroforesi bidimensionale i campioni sono stati conservati in freezer a -80°C.

Come per i plasmi seminali di ciascun campione è stata misurata la concentrazione di proteine presenti con metodica Bradford.

	concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ M1 e GV	media \pm sd		concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ M2	media \pm sd
1	46	$53,3 \pm 7,8$	1	41	$58,3 \pm 9,5$
2	45		2	66	
3	48		3	56	
4	60		4	67	
5	62		5	61	
6	59		6	59	

Tabella 2: concentrazione proteica di ciascun campione di fluido follicolare

La media delle concentrazioni proteiche dei campioni di fluidi follicolari contenenti ovociti immaturi ($53,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$) è simile a quella dei fluidi follicolari contenenti ovociti maturi ($58,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Questi campioni essendo dei derivati del plasma sanguigno sono molto ricchi di proteine come Albumina e IgG, che possono andare a interferire nell'analisi di elettroforesi bidimensionale, perciò utilizzando un kit specifico, abbiamo cercato di eliminare la maggior parte di queste

proteine. Il kit è formato da alcune colonnine all'interno delle quali si trova una resina in grado di legare in maniera specifica l'Albumina e le IgG in eccesso.

La stessa quantità iniziale di proteina (2,5mg) per ciascun fluido follicolare viene caricata sulla colonna per la purificazione dalle proteine indesiderate. La quantità di proteina che rimane è molto variabile, non solo perché i campioni sono diversi tra loro, ma c'è un certo grado di variabilità, seppur minima, anche per lo stesso campione. La percentuale della concentrazione delle proteine rimanenti rispetto alla concentrazione di partenza varia dal 17% al 27%.

Come per i plasmi seminali anche le proteine dei fluidi follicolari vengono precipitate con TCA al 10%, per tutta la notte in camera fredda. Si procede poi eseguendo dei lavaggi con una soluzione Etere-Etano (1:1), che serve a eliminare l'acido rimasto, in modo che non interferisca con la successiva sospensione delle proteine in DeStreak Rehydration Solution.

I campioni vengono caricati sulle strisce per la prima dimensione e lasciati ad idratare passivamente su di esse per almeno 8 ore prima di inserirli nell'IPGphor, dove le proteine si separeranno in base al loro specifico punto isoelettrico, grazie alle differenze di carica a cui sono sottoposte.

Le strisce vengono lavate con una soluzione contenente DTT, per consentire ai ponti disolfuro presenti sulle proteine di rompersi. Poiché è importante che i ponti disolfuro non si riformino e le proteine mantengano la loro conformazione lineare, si lavano le strisce con una soluzione contenente Iodoacetamide. L'eccesso di DTT e Iodoacetamide viene eliminato con breve lavaggio in una soluzione 1X Tampone di Corsa.

I campioni vengono caricati per la seconda dimensione su gel di Acrilamide/Bis al 14%, per permettere una buona separazione tra le proteine ad alto e a basso peso molecolare.

Dopo alcuni tentativi per ottenere una buona risoluzione degli spot abbiamo notato che la maggior parte delle proteine presenti nei fluidi follicolari avevano un peso molecolare superiore ai 17kDa, corrispondenti al penultimo marcatore di peso molecolare (secondo le indicazioni della

casa produttrice). Perciò la corsa è stata condotta lasciando che il fronte colorato fuoriuscisse nel Tampone di Corsa e l'ultimo marcatore di peso molecolare si avvicinasse al limite inferiore del gel.

Dopo aver fissato le proteine tra le maglie di acrilamide grazie alla soluzione di Fissaggio, è stata eseguita la colorazione con Coomassie Brilliant Blue G250 Colloidale in modo da poter visualizzare il maggior numero di spot possibili (fino a 10ng di proteina).

Per eliminare l'eccesso di colorante i gel sono stati decolorati con H₂O distillata.

L'acquisizione dell'immagine di ogni gel di fluido follicolare è stata eseguita con uno scanner ed è stata salvata in formato .tiff con una risoluzione di 300dpi per consentirne l'utilizzo da parte del programma Ludesi Redfin Solo.

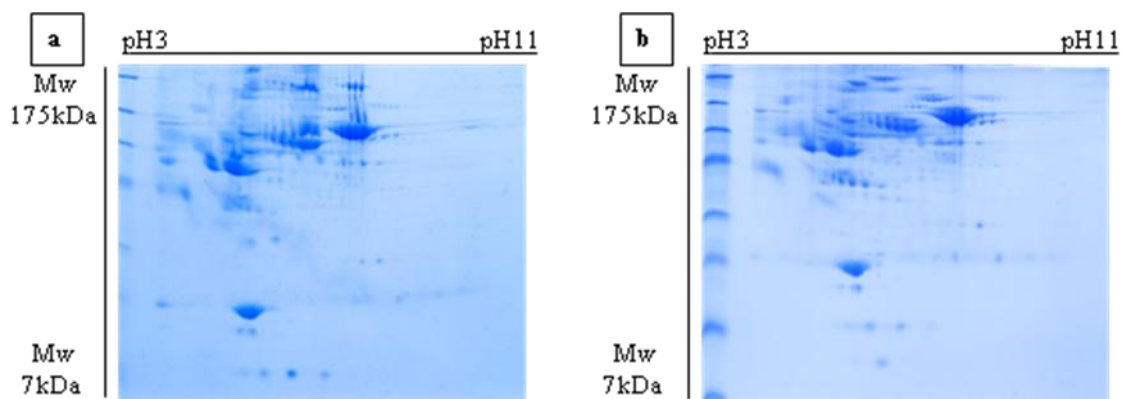


Figura 9: a) gel di fluido follicolare contenente un ovocita M1 o GV; b) gel di fluido follicolare contenente un ovocita M2

Le immagini dei gel di fluidi follicolari sono state elaborate con il programma Photoshop per eliminare i marcatori di peso molecolare e le aree periferiche di proteine non focalizzate, che interferirebbero con la successiva analisi in Ludesi Redfin Solo. Le immagini modificate sono state caricate sul programma e usando un gel come riferimento, gli altri sono stati sovrapposti manualmente a esso, uno spot alla volta. Questa operazione è stata eseguita per tutte e 12 le immagini relative ai fluidi follicolari.

L'operatore ha formato i due gruppi di confronto, quello costituito dai 6 gel di fluidi follicolari contenenti ovociti immaturi e quello dei 6 gel di fluidi follicolari contenenti ovociti maturi.

All'elaborato ottenuto dal programma sono stati aggiunti manualmente dei filtri (intensità >1,5, Anova $p < 0,05$, Mann-Whitney $p < 0,05$) per poter eliminare la maggior parte degli spot che potessero dare dei falsi positivi. Inoltre, un'ulteriore selezione è stata operata per eliminare gli spot, che si trovano in zone del gel in cui c'è una cattiva risoluzione.

Inizialmente il resoconto fornito dal programma indicava 26 spot come espressi in maniera differente nei due gruppi di campioni di fluidi follicolari su 1236 spot totali.

Grazie alla selezione dell'operatore però solo 5 spot si trovano in zone del gel con una buona risoluzione e pertanto solo questi si possono considerare come un risultato attendibile.

Tutti e 5 gli spot risultano maggiormente presenti nei fluidi follicolari contenenti ovociti M2.

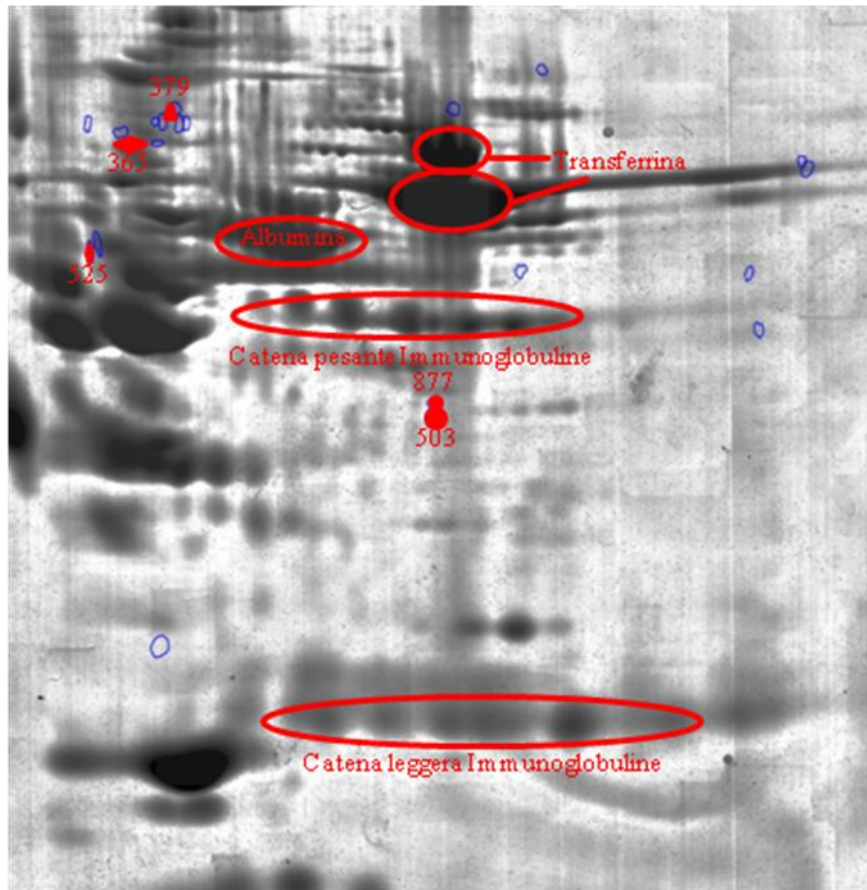


Figura 10: Gel di fluido follicolare con indicati i punti corrispondenti agli spot espressi in maniera diversa nei due gruppi di campioni contenenti ovociti GV/M1 o M2. Sono indicate le principali proteine di derivazione plasmatica (Albumina, Transferrina e catene pesanti e leggere delle Immunoglobuline).

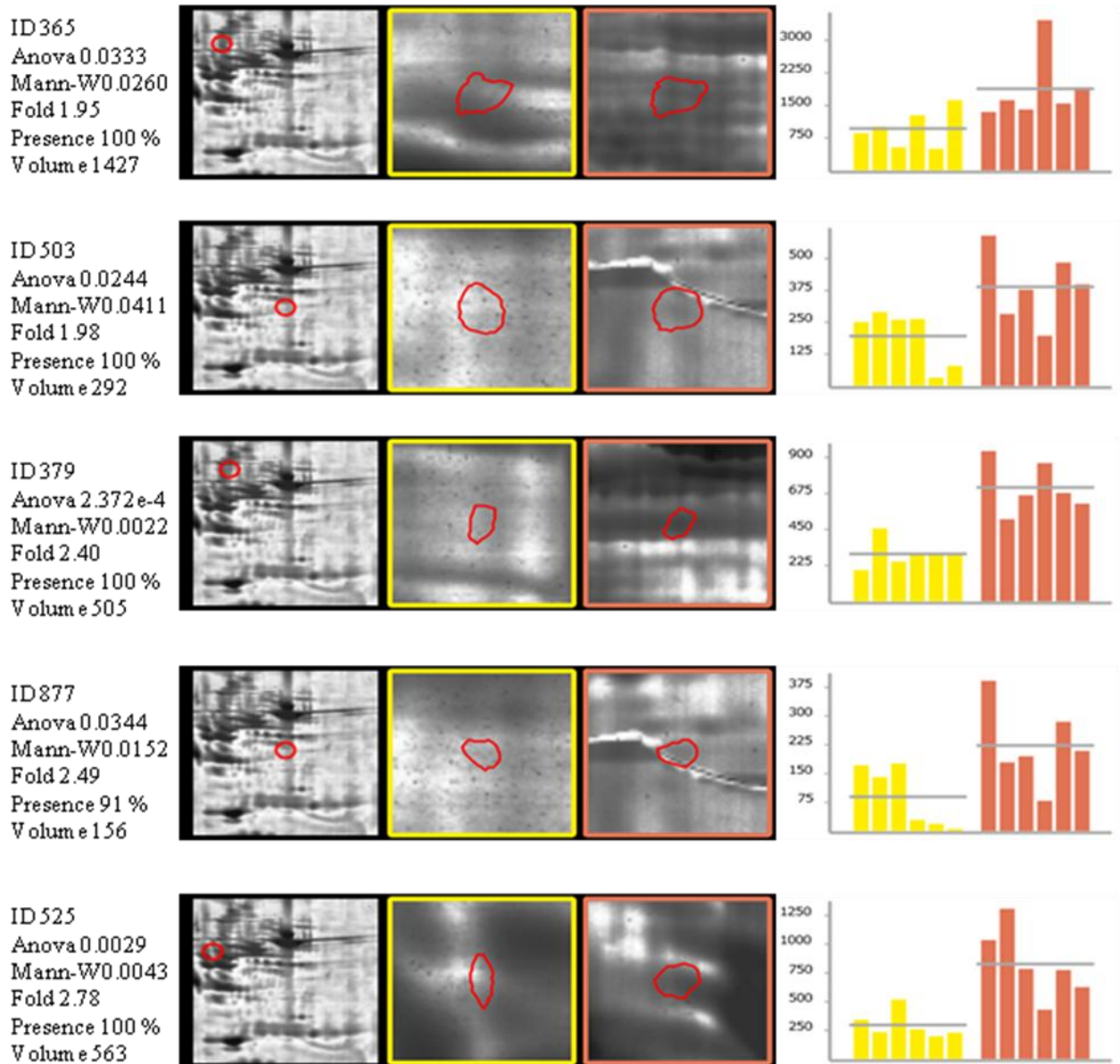


Figura 11: Resoconto sugli spot di interesse ottenuto con Ludesi Redfin Solo; in giallo sono indicati i campioni di fluidi follicolari contenenti ovociti GV e M1, mentre in rosa sono indicati i campioni contenenti ovociti M2.

Purtroppo non è stato possibile mandare ad analizzare gli spot di interesse con spettrometro di massa per mancanza di tempo.

5- DISCUSSIONE

Utilizzando l'elettroforesi bidimensionale combinata con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 4 proteine espresse in maniera differente nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici* e *Oligo-Astenozoospermici*.

Altre 2 proteine risultavano espresse in maniera differente nei due gruppi di campioni analizzati, in particolare risultavano in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti N, ma purtroppo a causa della contaminazione con cheratina non è stato possibile identificarle. Questo tipo di contaminazione non è infrequente quando si utilizzano queste tecniche (Xu B. e al., 2011).

NPC2 e M2BP si trovano in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici*.

Sappiamo, grazie allo studio di Légaré (Légaré C. e al., 2006) che esistono due forme N-glicosilate di NPC2 nel plasma seminale e ciò spiega perché ci sia una differenza di peso molecolare, tra la proteina identificata in questo studio (che corrisponde probabilmente a una forma N-glicosilata) e il peso teorico indicato dall'ExPASy Proteomics Server (che indica il peso molecolare della proteina senza modificazioni post-traduzionali).

Per avere un'ulteriore conferma della sua identità abbiamo eseguito anche un western blot, utilizzando un anticorpo policlonale commerciale, che ha permesso di individuare nei campioni analizzati sia la forma di interesse (quella con peso molecolare più elevato), che le forme di peso molecolare inferiore. Inoltre, seppure questo tipo di analisi non sia quantitativo, sembra evidente dalla lastra di sviluppo, che i campioni N contengono una quantità maggiore di questa proteina, confermando ulteriormente i risultati ottenuti con Ludesi Redfin Solo.

NPC2 possiede una tasca di legame al colesterolo, che gli permette di segregare il colesterolo presente sulla membrana degli spermatozoi, facendo variare il rapporto colesterolo/ fosfolipidi di

membrana, favorendo il processo di maturazione degli spermatozoi stessi nell'epididimo (Jones R., 1998).

Da ciò si può presumere che se NPC2 risulta in quantità minore, gli spermatozoi non sono processati correttamente e poiché sappiamo che il rimodellamento della membrana è essenziale per acquisire la motilità flagellare, ne risulta che questa proteina è essenziale per una corretta motilità spermatica.

Pertanto essendo l'espressione di NPC2 diminuita nei plasmi seminali di soggetti *Oligo-Astenozoospermici* simile alla condizione dei pazienti vasectomizzati e poi sottoposti a vasovasostomia analizzati da Sullivan (Sullivan R. e al., 2011) possiamo presumere che anche sulle membrane degli spermatozoi dei pazienti O/A ci sia un aumento del colesterolo e dei domini di ancoraggio, che potrebbero causare un'alterazione della motilità e degli eventi di capacitazione. Pertanto questi spermatozoi possiedono una minore capacità di fertilizzare l'ovocita. Se queste supposizioni sono corrette possiamo ragionevolmente considerare NPC2 come un bio-marcatore di fertilità.

Anche M2BP potrebbe essere considerata come un bio-marcatore di fertilità, poiché è maggiormente espressa nei plasmi seminali di soggetti *Normozoospermici*.

Altri studi confermano la sua presenza nel plasma seminale umano (Tsuruya S. e al., 2006), anche se il western da noi eseguito non ha dato i risultati sperati.

Block (Block AS. e al., 2011) ha recentemente dimostrato la presenza di questa proteina nei prostasomi, delle vescicole con proprietà immuno-modulatorie e di comunicazione intercellulare (Simpson RJ. e al., 2008), in grado di aumentare la motilità spermatica (Arienti G. e al., 2004) e di proteggere gli spermatozoi dal sistema immunitario femminile (Burden HP. e al., 2006) (Block AS. e al., 2011).

M2BP è una proteina con funzione di adesione cellulare ed è quindi ragionevole supporre che favorisca il legame tra gli spermatozoi e i prostasomi, permettendo a questi ultimi di svolgere la

loro funzione di protezione delle cellule spermatiche dal sistema immunitario femminile. Inoltre questo legame tra spermatozoi e prostasomi potrebbe anche far aumentare la motilità degli spermatozoi stessi come supposto da Arienti (Arienti G. e al., 2004).

Tuttavia la funzione di M2BP nel plasma seminale non è ancora chiara, come non è chiaro cosa comporti una sua diminuzione.

Altre due proteine LCN-1 e PIP sono espresse in quantità maggiore nei plasmi seminali di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*.

LCN-1 possiede una tasca di legame per le molecole lipofile come l'acido arachidonico e i suoi metaboliti, tra cui le prostaglandine (Redl B. e al., 1992, Glasgow BJ. e al., 1995, Lechner M. e al., 2001).

Se il suo aumento nel plasma seminale di soggetti O/A comporti un'eccessiva segregazione di prostaglandine, facendo diminuire le capacità immunosoppressive di questa componente del liquido seminale non è ancora stato dimostrato, anche se le speculazioni di Chiu (Chiu WW. e al., 2003) sembrano compatibili con la nostra ipotesi.

La proteina PIP possiede diverse isoforme (Akiyama K. e Kimura H., 1990), quella di 33kDa è quella che si avvicina di più alla isoforma evidenziata nei nostri esperimenti (Mw sperimentale 28,8kDa).

Bergamo (Bergamo P. e al., 1997) ha dimostrato che questa proteina è in grado di legare gli spermatozoi capacitati, anche se non sappiamo che effetto produca questo legame.

Secondo Chiu e altri ricercatori (Chiu WW. e Chamley LW., 2003) questa proteina potrebbe agire come immuno-modulatore ed è stato ipotizzato che sia anche in grado di legare la regione costante (Fc) delle IgG.

Tutto ciò però non chiarisce l'effetto causato da un suo aumento nel plasma seminale di soggetti *Oligo-Astenozoospermici*.

Ed è ancora meno chiara quale possa essere la sua funzione poiché, nello studio di Yamakawa (Yamakawa K. e al., 2007), PIP risulta completamente assente nei soggetti con azoospermia ostruttiva ed anche in alcuni plasmi seminali di soggetti con azoospermia non-ostruttiva. E ciò è in apparente contrasto con i nostri risultati, in cui questa proteina risulta invece aumentata nel plasma seminale di soggetti O/A rispetto al plasma seminale di soggetti N.

Il confronto tra fluidi follicolari contenenti ovociti immaturi e fluidi follicolari contenenti ovociti maturi risulta incompleta, perché per mancanza di tempo, non è stato possibile identificare le proteine contenute negli spot di interesse, con l'analisi con spettrometro di massa.

L'analisi dei fluidi è risultata più complessa rispetto a quella dei plasmi seminali.

Innanzitutto perché i campioni con le caratteristiche necessarie per rientrare nello studio sono stati difficili da recuperare e poi perché la preparazione del protocollo per l'analisi con elettroforesi bidimensionale per ottenere dei gel di buona qualità è stata piuttosto lunga.

Infatti, inizialmente avevamo provato a precipitare le proteine ottenute dopo l'eliminazione dell'eccesso di Albumina e IgG con Acetone a -20°C. Dopo svariati tentativi, cambiando diversi fattori del protocollo, ci siamo accorti che l'Acetone conteneva una qualche contaminazione che produceva delle strisciate verticali sui gel, incompatibili con la successiva analisi con Ludesi Redfin Solo. Sostituendo l'Acetone con TCA siamo riusciti a ottenere dei gel e quindi delle immagini che potessero essere usate per le analisi successive.

Inoltre, la maggior parte delle proteine contenute in questi campioni ha un elevato peso molecolare perciò per riuscire a separarle nel miglior modo possibile, abbiamo dovuto correre diversi gel dello stesso campione e fermare la corsa a tempi diversi, fino a ottenere il gel con la risoluzione migliore.

Poiché i fluidi follicolari derivano dal plasma sanguigno (Schweigert FJ. e al.,2006; Angelucci S. e al., 2006; Hanrieder J. e al.,2008) non ci aspettavamo enormi differenze tra i due gruppi di

campioni presi in esame e, infatti, dall'analisi con Ludesi Redin Solo, solamente 5 spot e quindi presumibilmente 5 proteine risultano espresse in maniera diversa. In particolare queste proteine risultano in quantità maggiore nei fluidi follicolari contenenti ovociti maturi e quindi si potrebbero considerare come dei bio-marcatore di maturità ovocitaria.

Quando verranno identificate, valutando quali sono le loro funzioni finora conosciute, sarà possibile decidere come utilizzarle.

Infatti, un'ipotesi potrebbe essere quella di aggiungerle ai terreni di coltura degli ovociti immaturi per stimolarli a raggiungere la metafase 2, oppure potrebbero essere dosate prima del prelievo ovocitario assieme ad alcuni ormoni (estradiolo) per verificare il grado di maturazione degli ovociti che si stanno per prelevare.

6- BIBLIOGRAFIA

Akiyama K, Kimura H. Isolation of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Sep 3;1040(2):206-10.

Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1764(11):1775-85. Epub 2006 Sep 14.

Arienti G, Carlini E, Saccardi C, Palmerini CA. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *J Cell Mol Med*. 2004 Jan-Mar;8(1):77-84.

Autiero M, Cammarota G, Friedlein A, Zulauf M, Chiappetta G, Dragone V, Guardiola J. A 17-kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells. *Eur J Immunol*. 1995 May;25(5):1461-4.

Bair EL, Nagle RB, Ulmer TA, Laferté S, Bowden GT. 90K/Mac-2 binding protein is expressed in prostate cancer and induces promatrilysin expression. *Prostate*. 2006 Feb 15;66(3):283-93.

Bergamo P, Balestrieri M, Cammarota G, Guardiola J, Abrescia P. CD4-mediated anchoring of the seminal antigen gp17 onto the spermatozoon surface. *Hum Immunol*. 1997 Nov;58(1):30-41.

Block AS, Saraswati S, Lichti CF, Mahadevan M, Diekman AB. Co-purification of Mac-2 binding protein with galectin-3 and association with prostasomes in human semen. *Prostate*. 2011 May 15;71(7):711-21. doi: 10.1002/pros.21287. Epub 2010 Oct 28.

Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. Prostasomes--their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update*. 2006 May-Jun;12(3):283-92. Epub 2005 Dec 22.

Caputo E, Carratore V, Ciullo M, Tiberio C, Mani JC, Piatier-Tonneau D, Guardiola J. Biosynthesis and immunobiochemical characterization of gp17/GCDFP-15. A glycoprotein from seminal vesicles and from breast tumors, in HeLa cells and in *Pichia pastoris* yeast. *Eur J Biochem.* 1999 Oct;265(2):664-70.

Chiu WW, Chamley LW. Human seminal plasma antibody-binding proteins. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Sep;50(3):196-201.

Chiu WW, Chamley LW. Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. *J Reprod Immunol.* 2003 Dec;60(2):97-111.

De Gisi Antonietta. NMR metabolic profile of human follicular fluid *NMR Biomed* 2010 Jun.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994, 50:225-232.

Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2512-7. Epub 2003 Feb 18.

Ginsburg KA, Armant DR. The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertil Steril.* 1990 May;53(5):882-7.

Glasgow BJ. Tissue expression of lipocalins in human lacrimal and von Ebner's glands: colocalization with lysozyme. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995 Aug;233(8):513-22.

Hanrieder J, Nyakas A, Naessén T, Bergquist J. Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. *J Proteome Res.* 2008 Jan;7(1):443-9. Epub 2007 Nov 30.

Jarkovska K, Kupcova Skalnikova H, Halada P, Hrabakova R, Moos J, Rezabek K, Gadher SJ, Kovarova H. Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Mol Hum Reprod*. 2011 Nov;17(11):679-92. Epub 2011 Jun 22.

Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*. 1998;53:73-84.

Kirchhoff C, Osterhoff C, Young L. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol Reprod*. 1996 Apr;54(4):847-56.

Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:9-15.

Lechner M, Wojnar P, Redl B. Human tear lipocalin acts as an oxidative-stress-induced scavenger of potentially harmful lipid peroxidation products in a cell culture system. *Biochem J*. 2001 May 15;356(Pt 1):129-35.

Lee HC, Lee SW, Lee KW, Lee SW, Cha KY, Kim KH, Lee S. Identification of new proteins in follicular fluid from mature human follicles by direct sample rehydration method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Korean Med Sci*. 2005 Jun;20(3):456-60.

Légaré C, Thabet M, Gatti JL, Sullivan R. HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. *Mol Hum Reprod*. 2006 Jul;12(7):461-8. Epub 2006 Jun 13.

Makler A. Distribution of normal and abnormal forms among motile, non-motile, live and dead human spermatozoa. *Int J Androl*. 1980 Dec;3(6):620-8.

Manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco vaginale, WHO 1999.

Menkveld R, Rhemrev JP, Franken DR, Vermeiden JP, Kruger TF. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril*. 1996 Mar;65(3):637-44.

Millat G, Chikh K, Naureckiene S, Sleat DE, Fensom AH, Higaki K, Elleder M, Lobel P, Vanier MT. Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am J Hum Genet*. 2001 Nov;69(5):1013-21. Epub 2001 Sep 20.

Müller SA, Sasaki T, Bork P, Wolpensinger B, Schulthess T, Timpl R, Engel A, Engel J. Domain organization of Mac-2 binding protein and its oligomerization to linear and ring-like structures. *J Mol Biol*. 1999 Aug 27;291(4):801-13.

Murphy LC, Tsuyuki D, Myal Y, Shiu RP. Isolation and sequencing of a cDNA clone for a prolactin-inducible protein (PIP). Regulation of PIP gene expression in the human breast cancer cell line, T-47D. *J Biol Chem*. 1987 Nov 5;262(31):15236-41.

Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1997, 56:771-787. 9.

Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*. 2006;7(5):R40. Epub 2006 May 18.

Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl FL, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod* 2004, 19:1438-1447.

Rathman WM, Van Zeyl MJ, Van den Keybus PA, Bank RA, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Isolation and characterization of three non-mucinous human salivary proteins with affinity for hydroxyapatite. *J Biol Buccale*. 1989 Sep;17(3):199-208.

Redl B, Holzfeind P, Lottspeich F. cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily. *J Biol Chem.* 1992 Oct 5;267(28):20282-7.

Redl B. Human tear lipocalin. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 18;1482(1-2):241-8.

Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 May 4;7:40.

Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 1994 Dec;15(6):725-51.

Sasaki T, Brakebusch C, Engel J, Timpl R. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1606-13.

Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2006 Nov;21(11):2960-8. Epub 2006 Aug 7.

Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 2009 Jun;6(3):267-83.

Sullivan R, Legare C, Thabet M, Thimon V. Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? *J Androl.* 2011 Nov;32(6):686-97. Epub 2011 Mar 25.

Tinari N, D'Egidio M, Iacobelli S, Bowen M, Starling G, Seachord C, Darveau R, Aruffo A. Identification of the tumor antigen 90K domains recognized by monoclonal antibodies SP2 and

L3 and preparation and characterization of novel anti-90K monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Mar 17;232(2):367-72.

Tsafri A, Reich R. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999;107(1):1-11.

Tsafri A. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol.* 1995;377:121-40.

Tsuruya S, Tsuda R, Ikematsu K, Matsumoto H, Kagawa S, Nakasono I. Homology between ABH-carrier alpha2-seminoglycoprotein and Mac-2 binding protein. *Leg Med (Tokyo).* 2006 Oct;8(5):273-8. Epub 2006 Sep 5.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995 Jul;16(7):1090-4 .

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 1996 Jan;14(1):61-5.

Xu B, Zhang Y, Zhao Z, Yoshida Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Ismail TA, Yaoita E, Yamamoto T. Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *J Proteomics.* 2011 Jun 10;74(7):1022-9. Epub 2011 Mar 23.

Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J Androl.* 2007 Nov-Dec;28(6):858-65. Epub 2007 Jun 6.