



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

Lorena María López Cabanas

**Identificación de proteínas fosforiladas pola proteína quinasa
dependente de AMPc en espermatozoides de mexillón
*Mytilus galloprovincialis***

Traballo Fin de Grao
Xuño 2025

RESUMO

Identificación de proteínas fosforiladas por a proteína quinasa dependente de AMPc en espermatozoides de mexillón *Mytilus galloprovincialis*.

As modificacións postraducionais que sofren as proteínas tras a súa síntese, entre elas a fosforilación, son factores determinantes para a súa funcionalidade. As proteína quinases e proteína fosfatasas catalizan o proceso de fosforilación reversible nas proteínas. Unha das proteína quinases máis estudadas é a proteína quinasa dependente de AMPc (proteína quinasa A; PKA), implicada na regulación de numerosos procesos fisiolóxicos. En mamíferos, a PKA desempeña un papel clave na regulación da motilidade espermática, catalizando a fosforilación de diferentes proteínas estruturais do flaxelo, enzimas do metabolismo enerxético ou factores reguladores da expresión xénica. Con todo, en moitos organismos invertebrados con fecundación externa, como os moluscos bivalvos, non existe apenas información acerca da implicación da PKA na regulación deste proceso. Utilizando o mexillón *Mytilus galloprovincialis* como especie modelo, neste traballo propuxémonos como obxectivo identificar proteínas presentes nos espermatozoides que son fosforiladas *in vitro* por esta enzima, concretamente, pola isoforma C₄, específica destas células. Mediante estudos de proteómica (LC-MS/MS), identificáronse como substratos da PKA aproximadamente 100 proteínas presentes en lisados espermáticos. Entre estas, a maioría son proteínas cun papel estrutural presentes nos flaxelos, destacando fundamentalmente diferentes isoformas da cadea pesada da dineína axonémica; ademais, tamén se identificaron proteínas implicadas no metabolismo enerxético, concretamente, rutas de obtención de ATP; e outras relacionadas con cascadas de sinalización e con procesos de síntese e degradación de proteínas. Os resultados obtidos suxiren que, ao igual que acontece en mamíferos, a PKA parece desempeñar un papel clave na regulación da motilidade espermática en organismos con fecundación externa, como son os moluscos bivalvos.

Palabras clave: Fosforilación de proteínas, proteína quinasa dependente de AMPc (PKA), motilidade espermática, *Mytilus*, molusco, proteómica.

RESUMEN

Identificación de proteínas fosforiladas por la proteína quinasa dependiente de AMPc en espermatozoides de mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

Las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas tras su síntesis, entre ellas la fosforilación, son factores determinantes para su funcionalidad. Las proteína quinasas y proteína fosfatasa catalizan el proceso de fosforilación reversible en las proteínas. Una de las proteínas quinasas más estudiadas es la proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A; PKA), implicada en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. En mamíferos, la PKA desempeña un papel clave en la regulación de la motilidad espermática, catalizando la fosforilación de diferentes proteínas estructurales del flagelo, enzimas del metabolismo energético o factores reguladores de la expresión génica. Sin embargo, en muchos organismos invertebrados con fecundación externa, como los moluscos bivalvos, no existe apenas información acerca de la implicación de la PKA en la regulación de este proceso. Utilizando el mejillón *Mytilus galloprovincialis* como especie modelo, en este trabajo planteamos como objetivo identificar proteínas presentes en los espermatozoides que son fosforiladas in vitro por esta enzima, concretamente, por la isoforma C₄, específica de estas células. Mediante estudios de proteómica (LC-MS/MS), se han identificado como sustratos de la PKA aproximadamente 100 proteínas presentes en lisados espermáticos. Entre estos, la mayoría son proteínas con un papel estructural presentes en los flagelos, destacando fundamentalmente diferentes isoformas de la cadena pesada de la dineína axonémica; además, también se han identificado proteínas implicadas en el metabolismo energético, concretamente, rutas de obtención de ATP; y otras relacionadas con cascadas de señalización y con procesos de síntesis y degradación de proteínas. Los resultados obtenidos sugieren que, al igual que ocurre en mamíferos, la PKA parece desempeñar un papel clave en la regulación de la motilidad espermática en organismos con fecundación externa, como son los moluscos bivalvos.

Palabras clave: Fosforilación de proteínas, proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), motilidad espermática, *Mytilus*, molusco, proteómica.

ABSTRACT

Identification of proteins phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase in spermatozoa of the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

The post-translational modifications that proteins undergo after synthesis, including phosphorylation, are determining factors for their functionality. Protein kinases and protein phosphatases catalyse the reversible phosphorylation process in proteins. One of the most studied protein kinases is cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A; PKA), involved in the regulation of numerous physiological processes. In mammals, PKA plays a key role in the regulation of sperm motility, catalysing the phosphorylation of different structural proteins of the flagellum, metabolic enzymes or regulatory factors of gene expression. However, in many invertebrate organisms with external fertilization, such as bivalve molluscs, there is little information about the involvement of PKA in the regulation of this process. Using the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a model species, in this work we aim to identify proteins present in spermatozoa that are phosphorylated in vitro by this enzyme, specifically, by the C₄ isoform, specific to these cells. By proteomics studies (LC-MS/MS), approximately 100 proteins present in sperm lysates have been identified as PKA substrates. Among these, most are proteins with a structural role present in flagella, mainly isoforms of the axonemic dynein heavy chain; in addition, proteins involved in energy metabolism have also been identified, specifically, pathways for obtaining ATP; and others related to signalling cascades and protein synthesis and degradation processes. The results obtained suggest that, as in mammals and other species, PKA seems to play a key role in the regulation of sperm motility in organisms with external fertilization, such as bivalve molluscs.

Keywords: Protein phosphorylation, cAMP-dependent protein kinase (PKA), sperm motility, *Mytilus*, mollusc, proteomics.

ABREVIATURAS

PTM = modificación postraducional (*post-translational modifications*)

P_i = fosfato inorgánico

PK = proteína quinasa (*protein kinase*) / PP = proteína fosfatasa (*protein phosphatase*)

ATP = adenosín trifosfato

AMPc = adenosin-3',5'-monofosfato cíclico

PKA = proteína quinasa dependente de AMPc; proteína quinasa A

Subunidad R = subunidade reguladora

Subunidad C = subunidade catalítica

R = arxinina / Y = isoleucina / S = serina / T = treonina

AKAPs = proteínas de ancoraxe á quinasa A (*Kinase A anchoring proteins*)

AC = adenilato ciclaza / sAC = adenilato ciclaza soluble / GC = guanilato ciclaza

GPCR = receptor acoplado a proteínas G

DTT = ditiotreitól

BSA = seroalbúmina bovina

PKI = inhibidor da proteína quinasa

SDS = dodecilsulfato sódico

APS = persulfato amónico

TEMED = tetrametiletilendiamina

AMBIC = bicarbonato amónico

ACN = acetonitrilo

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

SDS-PAGE = electroforese en xel de poliacrilamida con SDS

PBS = tampón fosfato salino

TTBS = tampón Tris Tween salino

LC-MS/MS = cromatografía líquida acoplada a masas/masas

DDA = análise dependente de datos / DIA = análise independente de datos

FDR = *false discovery rate*

SWATH = adquisición de ventá secuencial de todos os espectros de masas teóricos

FC = *fold change*

DUF = dominio de función descoñecida (*domain of unknown function*)

CFAP = proteínas asociadas a cilios e flaxelos (*cilia and flagellar-associated proteins*)

IFT = transporte intraflaxelar (*intraflagellar transport*)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. A fosforilación de proteínas como mecanismo de regulación	9
1.2. A proteína quinasa dependente de AMPc	11
1.2.1. Subunidades R e C.....	12
1.2.2. PKA en <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
1.3. O mexillón como modelo experimental	15
1.4. O rol da PKA na regulación da motilidade espermática	18
2. OBXECTIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material biolóxico	22
3.2. Reactivos	22
3.2.1. Reactivos inorgánicos.....	22
3.2.2. Reactivos bioquímicos.....	22
3.2.3. Anticorpos.....	22
3.2.4. Reactivos de electroforese e Western Blotting	22
3.2.5. Reactivos de proteómica.....	22
3.3. Metodoloxía	23
3.3.1. Obtención de mostras de espermatozoides	23
3.3.2. Lisado de espermatozoides	23
3.3.3. Determinación da concentración de proteínas.....	23
3.3.4. Fosforilación <i>in vitro</i> das proteínas espermáticas.....	23
3.3.5. Electroforese en xel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	24
3.3.6. Western Blotting	25
3.3.7. Identificación de substratos da PKA mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS)	26
4. RESULTADOS E DISCUSIÓN	30
4.1. Resultados	30
4.1.1. Determinación da concentración de proteína nas mostras dos lisados de espermatozoides.....	30
4.1.2. Fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas en lisados de espermatozoides por PKA (isoforma C ₄)	30
4.1.3. Identificación das proteínas espermáticas fosforiladas mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS)	32

4.2. Discusión	35
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. A fosforilación de proteínas como mecanismo de regulación

Tras a súa síntese, moitas proteínas son obxecto das denominadas modificacións postraducionais ou a adición reversible de diferentes grupos químicos aos aminoácidos que as constitúen. Estas afectan de xeito transitorio á súa estrutura tridimensional ou conformación, o que se traduce nun cambio a nivel funcional, de estabilidade ou de localización intracelular, relevante e, en ocasións, imprescindible nun gran número de contextos.

A necesidade de que se produzan estas modificacións nace de que a complexidade biolóxica non pode ser capturada só por xenes e proteínas, pois aportan información funcional moi limitada (Aggarwal et al., 2021). Ademais deste enfoque, segundo o cal se limitan a posibilitar a actividade proteica, son consideradas un mecanismo regulador fundamental ao determinar o modo no que se comportan as células internamente e con respecto ao seu entorno. Por recibir, procesar e precisar responder a estímulos de xeito constante, requiren na resposta interruptores rápidos e reversibles, o que representan estas modificacións para as proteínas (Prabakaran et al., 2012).

A definida como a máis relevante é a fosforilación: implica a unión dun grupo fosfato inorgánico (Pi) mediante un enlace éster a unha proteína, concretamente, a aqueles aminoácidos que conteñen grupos hidroxilo na cadea lateral, é dicir, serina, treonina e tirosina.

Como principal motivo da importancia desta modificación, que se produce nun proceso dinámico e específico (Ptacek & Snyder, 2006), está a ubicuidade: repórtanse fosfatos inorgánicos en arredor dun 30% das proteínas en lévedo, moscas e humanos (Cohen, 2000). En consecuencia, afecta, como outras modificacións, á localización, actividade, interacción ou estabilidade destas biomoléculas na sinalización de mecanismos que subxacen a múltiples procesos fisiolóxicos. (transcrición de xenes e tradución fosforilando factores de regulación, respostas metabólicas, respostas que fomentan o crecemento e diferenciación en determinadas etapas do desenvolvemento celular, de indución da apoptose ou procesos de transporte (revisado en Fischer, 2013). Con todo, tamén se detecta en condicións patolóxicas, enfermidades hereditarias, diabetes, as enfermidades de Parkinson e Alzheimer, enfermidades víricas, bacterianas e, prominentemente, pola súa participación na transformación oncoxénica, no cancro. Disfuncións nesta modificación considéranse factores causais en enfermidades (Beausoleil et al., 2004), como algunhas das mencionadas.

Nas cascadas de sinalización, a fosforilación de proteínas está regulada como reacción; á súa vez, regula procesos e é, en moitos casos, o derradeiro paso das rutas, nas que pode ter dúas consecuencias para os seus substratos: activación, de xeito que estas executan a súa función final, ou inactivación, que leva á inhibición da súa actividade, ben para o progreso doutros procesos, no caso de que a proteína tivera un papel inhibitorio, ou ben para detelo en resposta ao ligando iniciador da transdución. Responsables desta última son as enzimas que catalizan o proceso: ao tratarse de reaccións reversibles, a catálise está a cargo de pares de enzimas que exercen efectos contrarios nas proteínas.

A fosforilación (figura 1.1.1), en concreto, implica a transferencia dun P_i entre dúas moléculas: un doador (ATP) e, neste caso, unha proteína. Neste sentido, é catalizada pola denominada proteína quinasa, que incorpora o grupo coa enerxía liberada ao romperse o enlace entre os fosfatos no nucleótido.

A reacción inversa baséase na mesma dinámica: a enzima, neste caso, unha proteína fosfatasa, cataliza a rotura do enlace éster que se formou na proteína, para a liberación do fosfato nunha reacción de hidrólise.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

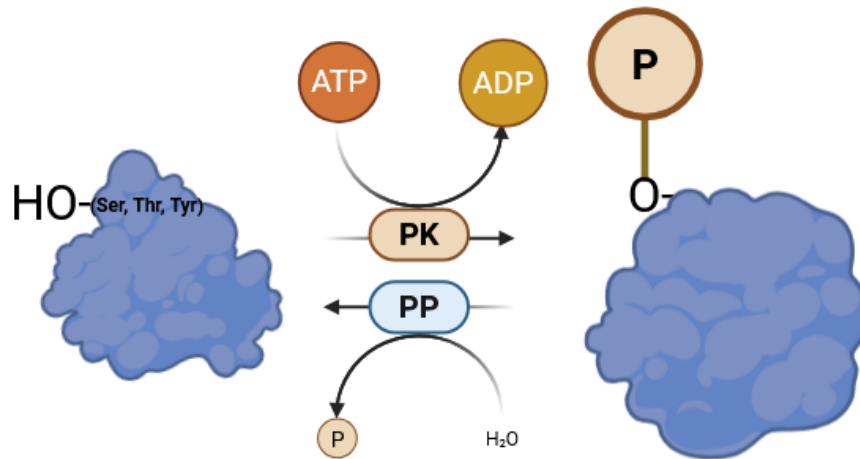


Figura 1.1.1. Mecanismo de acción reversible das enzimas proteína quinasa e proteína fosfatasa sobre unha proteína para a regulación da súa actividade. A fosforilación, catalizada pola quinasa, prodúcese en residuos aminoacídicos con grupos hidroxilo require dun grupo fosfato aportado polo ATP e da enerxía liberada na rotura do enlace no nucleótido; a reacción inversa, que cataliza a fosfatasa, é unha reacción de hidrólise sobre a proteína na que se libera do fosfato. (Imaxe propia creada en Biorender (<https://BioRender.com>) e exportada baixo licencia académica).

Por ser as responsables da incorporación do grupo fosfato, son de maior interese as quinases, moléculas sorprendentemente dinámicas que evolucionaron para converterse en interruptores moleculares altamente regulados (Baro Graf et al., 2020). A regulación é fundamental, tanto para estas como para as fosfatasas, especialmente para manter un equilibrio na concentración de produtos e reactivos nas reaccións que catalizan en función das necesidades.

No caso dos humanos, o quinoma comprende aproximadamente 540 quinases organizadas en 9 subfamilias, entre elas, o grupo de proteínas quinases A, G e C, no que se engloban 63 proteínas en familias de serina/treonina quinases (Manning et al., 2002). Matízase a diferenciación entre este grupo e o das tirosina quinases porque este aminoácido, a diferenza dos outros dous, é aromático, o cal condiciona a facilidade da súa incorporación á estrutura da proteína.

1.2. A proteína quinasa dependente de AMPc

A proteína quinasa A (PKA) (Walsh et al., 1968), é a principal mediadora das accións do nucleótido AMPc (Sutherland & Rall, 1960), que actúa como segundo mensaxeiro dentro da vía de sinalización na que participa a enzima (figura 1.2.2). Trátase dunha serina-treonina quinasa ubicua, evolutivamente conservada e estudada a diferentes niveis (Hao et al., 2016), en multitude de organismos.

A PKA considérase unha quinasa prototípica, pero moitos aspectos da mesma convértena nunha enzima única: principalmente, a súa estrutura. A diferenza doutras coa mesma función, a PKA -no seu estado inactivo- é un complexo tetramérico no que se ensamblan dúas subunidades reguladoras (R) e dúas catalíticas (C). É a unión do AMPc a sitios específicos das reguladoras o que promove a disociación da holoenzima nun dímero de subunidades R e en dúas subunidades C, activas por medio dun cambio conformacional. Estas últimas son as responsables da fosforilación dos numerosos substratos da enzima.

A secuencia consenso $RRXS^P/TPY$ (Gibbs & Zoller, 1991) (figura 1.2.1) é o sitio das proteínas no que a enzima leva a cabo a fosforilación, sendo X un residuo aleatorio e o derradeiro un aminoácido grande e hidrofóbico. Sempre que exista esta secuencia, unha proteína pode ser obxecto da fosforilación pola PKA. A segunda arxinina da secuencia é máis variable e pode estar representada por outros aminoácidos.

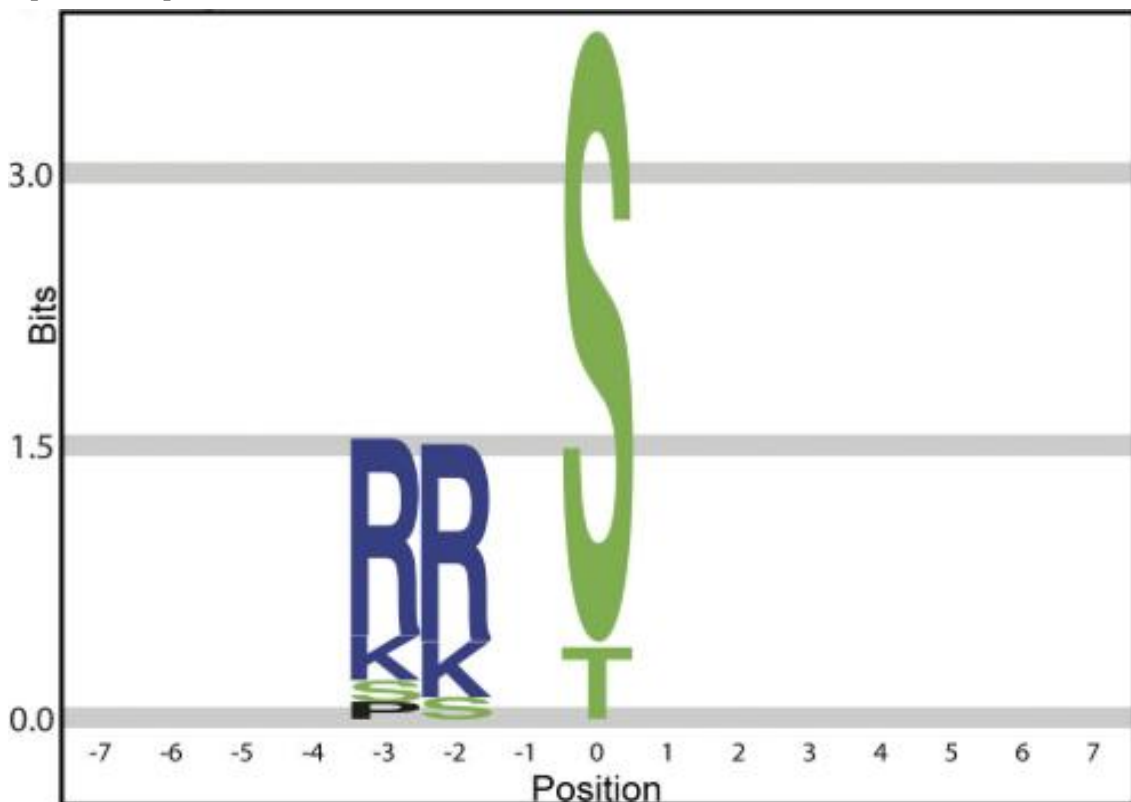


Figura 4.1.5. Abundancia relativa dos diferentes residuos aminoacídicos que conforman a secuencia consenso na que fosforila a PKA. O tamaño das letras referencia a maior probabilidade de atopar un determinado aminoácido nunha certa posición (Imaxe extraída de Douglass et al., 2012).

O feito de ser ubicua no organismo, ao igual que a modificación que cataliza, refire unha ampla distribución da PKA: pode atoparse tanto no citoplasma como no núcleo, e pode fosforilar substratos en ambos compartimentos celulares. Non obstante, isto non reduce a especificidade da proteína quinasa en rutas de sinalización á hora de modificar os substratos necesarios en cada caso.

O habitual é que a PKA responda á presenza do AMPc nun radio de acción delimitado e determinado polas denominadas proteínas de ancoraxe da quinasa A ou AKAPS (Wong & Scott, 2004), que se unen ás subunidades reguladoras no seu dominio de dimerización e acoplamento, cuxa existencia determina simultaneamente a súa conformación dimérica das subunidades R e a unión a estas proteínas. Consiste en catro hélices localizadas na rexión aminoterminal da proteína, e na fenda hidrofóbica que se xera é onde se une a hélice anfipática da AKAP con alta afinidade. Poden ser específicas de certas subunidades ou presentar unha especificidade dual, e a súa función é dirixir á PKA á fosforilación de certos substratos (revisado en Taylor et al., 2013). A súa existencia e a meticulosidade de acción das moléculas que están involucradas nas cascadas de transdución de sinais determinan que, no momento en que se precisen, as proteínas substrato da PKA estarán fosforiladas para conducir a sinal do ligando e inducir a resposta celular pertinente.

1.2.1. Subunidades R e C

Os modelos animais maioritarios para o estudo estrutural da enzima son especies de mamíferos.

No caso do dímero de subunidades R, nestas especies hai catro tipos ou isoformas destas (RI α , RI β , RII α , RII β), codificadas por catro xenes (revisado en Taylor et al., 2012). Existen variacións puntuais entre as distintas subunidades, aínda que a estrutura xeral está conservada (Zhang et al., 2015). Fundamentalmente, diferéncianse a nivel bioquímico na afinidade polo AMPc, maior para as subunidades RII, e na localización subcelular. Tamén se distinguen pola súa distribución: as isoformas α son ubicuas, pero as β están menos distribuídas. RI β é específica do cerebro e RII β , do tecido nervioso, endocrino, adiposo ou reprodutivo. A súa función principal é actuar como sensores do AMPc grazas á presenza de dominios de unión ao nucleótido. A súa detección permite a actividade da subunidade C, limitada no estado inactivo pola presenza dunha secuencia inhibidora que se une ao seu sitio catalítico. Segundo a variante da subunidade R, esta última secuencia pode ser fosforilada pola C, pois é semellante á secuencia consenso da PKA para isoformas de tipo II (RRXS) (revisado en Baro Graf et al., 2020).

As subunidades catalíticas son codificadas por tres xenes: PRKACA e PRKACB, parálogos moi conservados por un fenómeno de duplicación xénica en etapas temperás da evolución dos vertebrados (Søberg et al., 2013), e PRKACC, que dan lugar a tres isoformas: α , β e γ (revisado en Taylor et al., 2012). Os mamíferos poden expresar variantes destas debido, en xeral, a fenómenos de corte e empalme dos distintos tipos de exón 5'. En consecuencia, hai catro variantes da isoforma β (C β 1, C β 2, C β 3 e C β 4) e dúas da isoforma α (C α 1 e C α 2). A nivel estrutural, e dado o feito de que proceden de xenes parálogos, todas estas variantes presentan a mesma morfoloxía dentro do núcleo catalítico: lóbulo C-terminal de maior tamaño e N-terminal máis pequeno, entre os que se localiza o sitio activo, de unión a ATP e a catións divalentes, normalmente, Mg²⁺. As diferenzas na estrutura localízanse maioritariamente nos extremos terminais, por segmentos cortos e variables específicos en aminoácidos ou secuencias peptídicas, que non son parte do núcleo de catálise. Con respecto á distribución tisular, C α 1 e C β 1 son ubicuas e o resto das variantes de C β están presentes en tecido neuronal e linfoide.

A única que só se detecta nun tipo de tecido en específico é C α 2, presente exclusivamente en espermatocitos e espermatozoides maduros: en ratos, os machos C α 2 nulos, que non expresan a proteína, son infértiles (Nolan et al., 2004), e non hai compensación para a súa actividade por outras proteínas quinases. A subunidade C γ está menos estudada: non se evidencia funcionalidade nos órganos nos que se detecta ou a súa tradución a partir do xen que a codifica (revisado en Taylor et al., 2013 e Baro Graf et al., 2020).

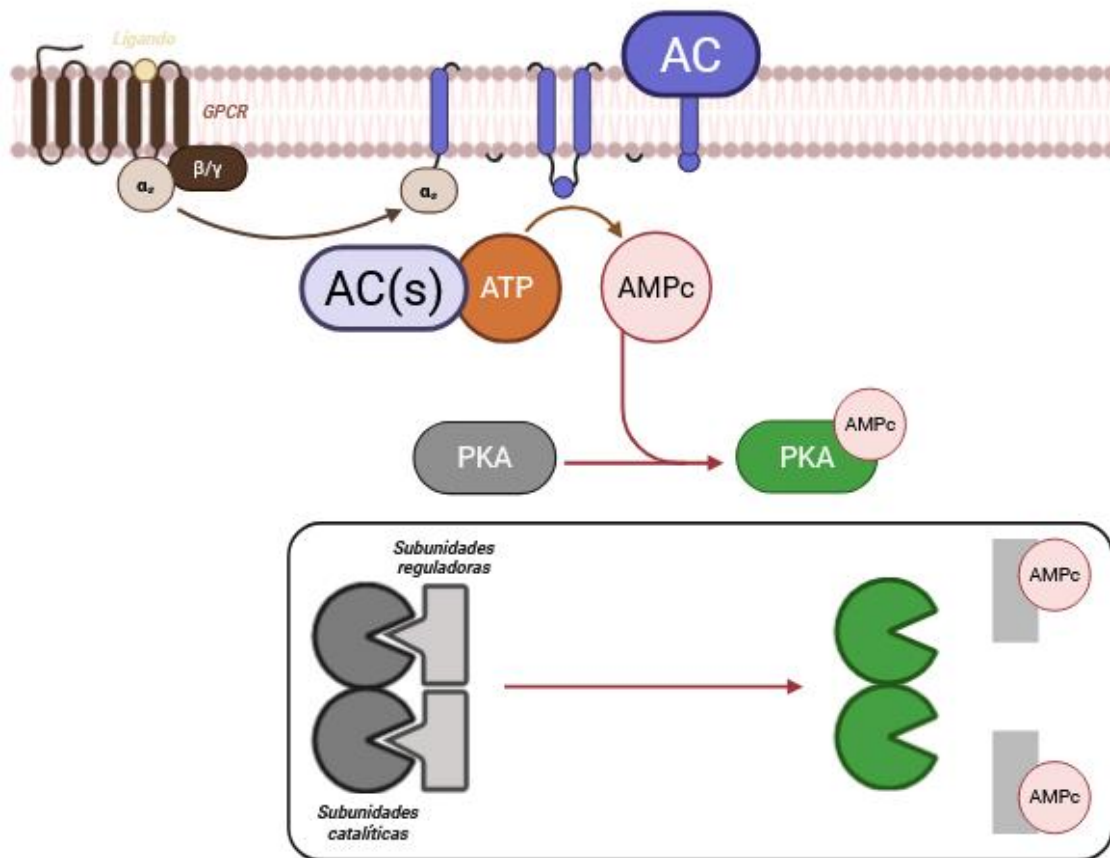


Figura 1.2.2. Vía de activación da PKA. Na ruta está involucrado un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) e hai síntese de AMP cíclico. Detalle: estrutura da PKA. En estado inactivo (gris), as subunidades reguladoras bloquean os centros activos das subunidades catalíticas, pero a unión do AMPc provoca un cambio conformacional nas primeiras, que se separan das segundas, xerando a enzima activa (verde) (Imaxe propia creada en <https://BioRender.com> e exportada baixo licenza académica).

A activación da AC de membrana ou soluble, enzima que sintetiza AMPc, e a da PKA están conservadas, pero augas abaixo na vía hai moitas diferenzas entre organismos filoxeneticamente afastados aos mamíferos nunha gran variedade de procesos. Neles, tamén se poden caracterizar isoformas homólogas ás identificadas en humanos ou ratos, con certas peculiaridades en función da especie.

1.2.2. PKA en *Mytilus galloprovincialis*

No mexillón mariño *Mytilus galloprovincialis*, a especie presente nas costas galegas, a PKA participa na regulación de diferentes procesos fisiolóxicos: exemplos son a regulación da contracción do músculo denominado “catch”, que mantén pechada a cuncha do molusco bivalvo cando está exposto ao aire e xera condicións anaerobias (Béjar & Villamarín, 2006); ou etapas do desenvolvemento gametoxénico. O grupo de investigación no que se levou a cabo o traballo (Proteínas e Metabolitos ou PROMET) realizou nos últimos anos un estudo en profundidade en relación coa purificación e a caracterización da proteína quinasa nesta especie, con numerosos traballos nos que se identificaron isoformas das subunidades C e R (figura 1.2.3).

En primeiro lugar, purificáronse dúas isoformas diferentes de R que se denominaron R_{myt1} (Rodríguez et al., 1998; Díaz-Enrich et al., 2003) e R_{myt2} (Cao, Ramos-Martinez, et al., 1995a; Bardales et al., 2007), que presentan características estruturais e funcionais homólogas das subunidades RI e RII de mamíferos. Isto pódese explicar por diverxencia xénica ao longo da evolución.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

A continuación, as subunidades purificadas foron as analíticas, nesta especie, cinco: C₄, C₅, e C₆ en manto de mexillón, o órgano que ocupa maior espazo no corpo do animal; e en músculo adutor posterior (PAM) C₁, C₂, C₃ (revisado en Bardales et al., 2008). Os estudos estruturais levados a cabo mostran que estas isoformas están potencialmente codificadas no mesmo xen e que se xeran, como no caso das de mamíferos, por *splicing alternativo*. A principal diferenza está no seu peso molecular e na súa distribución tisular, así como, en relación coa estrutura, no extremo aminoterminal da proteína, no que a secuencia aminoacídica difire en maior ou menor medida.

Recentemente, demostrouse que a isoforma C₄, purificada a partir de tecido de manto, exprésase especificamente en espermatozoides (resultados pendentes de publicación). Esta identificouse mediante estudos de proteómica, concretamente, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) e a súa secuencia é A0A8B6GIP6_MYTGA (UniProt). Caracterízase, como se mencionou previamente, por presentar unha secuencia específica no extremo N-terminal da proteína.

Esta isoforma foi empregada para a realización dos estudos de fosforilación *in vitro* que se recollen neste traballo.



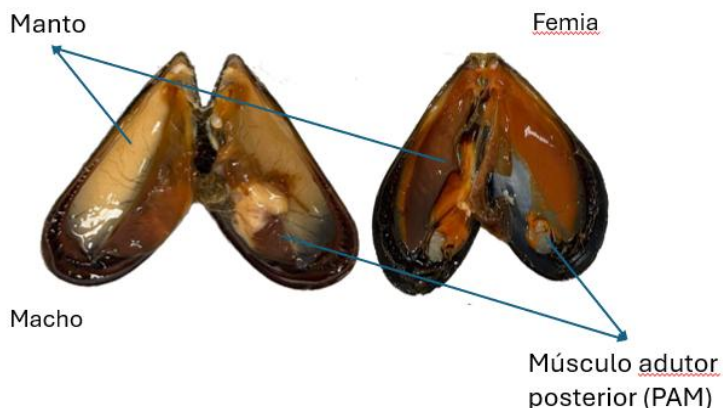
Figura 1.2.3. Isoformas das subunidades R e C da PKA en mamíferos e *M. galloprovincialis*. Móstranse as equivalencias entre as variantes. En negra, destácanse as isoformas presentes de xeito específico en espermatozoides. (Imaxe propia creada en <https://BioRender.com> e exportada baixo licenza académica).

1.3. O mexillón como modelo experimental

No grupo PROMET, a especie de estudo é *M. galloprovincialis*. Presenta un interese aplicado moi alto dada a importancia que representa a especie a nivel económico e medioambiental nas costas de Galicia, así como a facilidade da súa adquisición e manexo. Anatomicamente, o corpo, que presenta un certo grao de diferenciación a nivel tisular, está contido nunha cuncha triangular con valvas simétricas unidas pola charnela. Estas mantéñense pechadas grazas ao denominado músculo *catch*, en cuxo mecanismo participa a PKA, como xa se comentou. Tamén se mencionou o feito de que estaba involucrada en etapas do desenvolvemento dos gametos, nalgunha das cales o grupo de investigación se focaliza: en concreto, a adquisición de motilidade nos espermatozoides, proceso paralelo á capacitación dos gametos masculinos e previo á fecundación.

No que respecta á súa reprodución, os mexillóns son organismos dioicos sen dimorfismo sexual aparente: as diferenzas non se aprecian por detalles da súa morfoloxía externa, como o tamaño ou a forma da cuncha, senón que resulta preciso abrir os espécimes e fixarse na coloración do manto que, durante a etapa de madurez sexual, está invadido por cúmulo de células xerminais que constitúen as gónadas. O órgano no que están contidas, en *Mytilus*, recibe o nome de bolsa de Polichinela. Se o exemplar é macho, o seu manto presenta unha tonalidade clara, mentres que nas femias ten unha cor tella ou alaranxada intensa (figura 1.3.1) en momentos previos ao desove, cando os dous lóbulos do manto e outros tecidos do animal están ocupados pola bolsa. Tras a posta, este tecido desaparece (revisado en Caceres-Martinez & Figueras Huerta, 2014).

Figura 1.3.1. Anatomía xeral dun exemplar de mexillón macho (esquerda) e femia (dereita) no último estadio do desenvolvemento gametoxénico. Indícanse o manto, que contén foliculos gonadais cheos nestes exemplares, e o músculo adutor posterior (PAM), no que se detectaron tamén isoformas da subunidade catalítica da PKA.



O sistema reprodutivo de *M. galloprovincialis* está constituído por numerosos condutos ramificados a través do manto, que se estreitan e rematan en foliculos gonadais. É no epitelio xerminar destes órganos onde se producen as divisións das espermatogonias e das oogonias para, en última instancia e tras xerar varios tipos celulares, xerar os gametos. Contrariamente ao que acontece nas femias, os foliculos dos individuos machos son numerosos e uniformes e, ademais de células en división e unha rede circulatoria abundante, no tecido hai células de reserva, responsables do almacenamento de substratos do metabolismo enerxético, e de soporte, que as poñen en contacto coas xerminais. Exemplos das primeiras son as células vesiculares, que conteñen glucóxeno en gran cantidade no seu interior e aportan enerxía a demanda, e células adipogranulares, con, sobre todo, gránulos lipídicos, fontes inmediatas de nutrientes. En machos, as células de soporte denomínanse células de Sertolí, e en femias, células foliculares: establecen comunicación mediante unións de membrana para transporte de pequenas moléculas (figura 1.3.2). A medida que progresa o desenvolvemento dos gametos, o número de células de reserva redúcese, ocupando os gametos o espazo no manto. É a través dos condutos polos cales estes saen ao medio unha vez completado o proceso a través do poro xenital, anterior ao PAM (revisado en Caceres-Martinez & Figueras Huerta, 2014).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

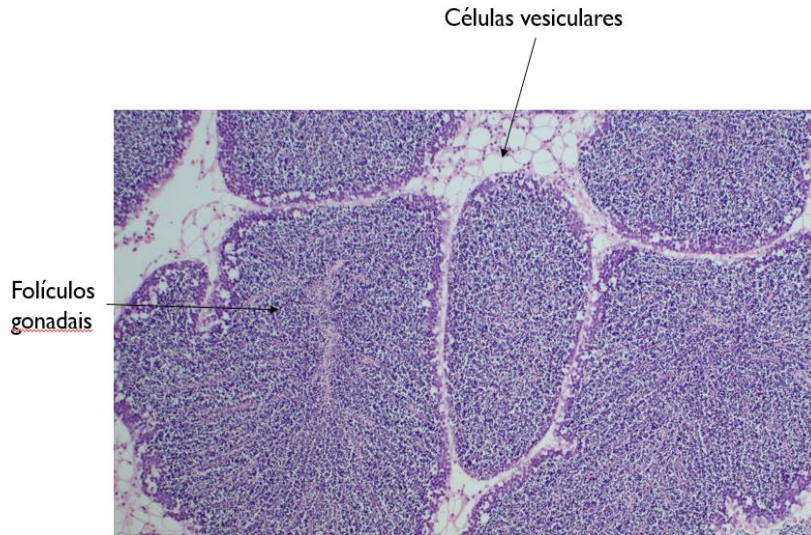


Figura 1.3.2. Corte histolóxico do manto dun mexillón macho no que se aprecian folículos gonadais con espermatozoides e células de almacenamento de enerxía. (Imaxe do grupo PROMET).

O mexillón, e os moluscos bivalvos en xeral, son organismos de fecundación externa. É no medio mariño onde, coa liberación dos gametos por parte de machos e femias adultos, ten lugar a reprodución. O cigoto, unha vez formado, inicia a súa división ata alcanzar un estadio de embrión multicelular, a partir do cal se xeran diferentes fases larvárias con capacidade de desprazamento autónomo (figura 1.3.3). A larva pedivelíxera é a derradeira, previa á metamorfose que dá lugar aos individuos xuvenís e, nela, *M. galloprovincialis* desenvolve o pé e adquire a capacidade de asentarse sobre o substrato, pasando a ser unha forma de vida bentónica na idade adulta. Considéranse como tal cando adquiren a capacidade de reproducirse (revisado en Peteiro et al., 2007).

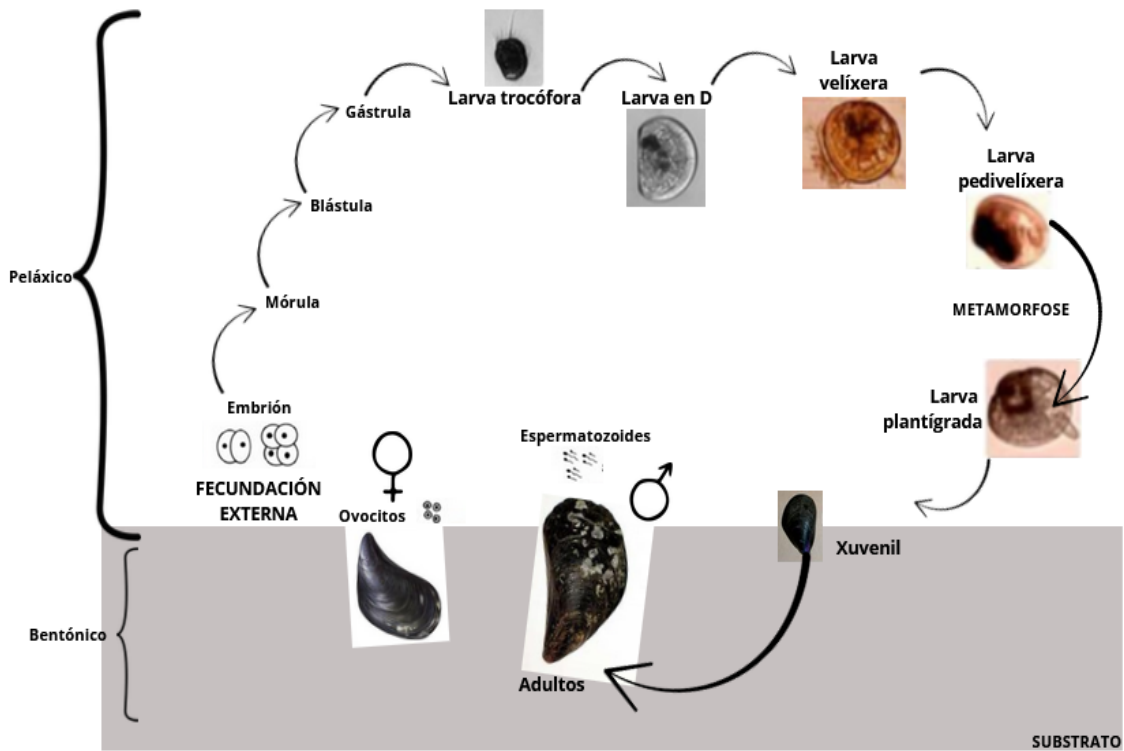


Figura 1.3.3. Ciclo de vida do mexillón *M. galloprovincialis*. Tras a fecundación, a división do cigoto xera un embrión multicelular, a mórula, que en sucesivas divisións pasa a xerar varios estadios larvários ata o desenvolvemento do pé, órgano anatómico que posibilita o asentamento; é seguido da metamorfose a exemplares xuvenís, que se convierten en adultos cando adquiren a capacidade de reproducirse. (Imaxe adaptada de Charles, 2019).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

En *M. galloprovincialis*, o desove prodúcese maioritariamente ao comezo da primavera, con postas secundarias o resto do ano (Caceres-Martinez & Figueras Huerta, 2014). Tras este, os gametos non adoitan estar totalmente preparados para a fertilización. No medio mariño experimentan procesos internos posteriores que conducen á súa activación, nos que factores ambientais (temperatura, pH e salinidade (osmolaridade)) propicios son imperativos para que se produzan con éxito. As condicións afectan en diferente grao aos procesos que acontecen a nivel intracelular, e, en casos extremos, determinan que se completen con éxito ou non. Diferentes estudos (Eads et al., 2016) demostran a interacción entre o aumento de temperatura da auga, a acidificación e a fertilización, e a motilidade espermática en *M. galloprovincialis*, como consecuencia do quecemento global. Coñecer o xeito no que a temperatura e o pH afectan de forma concreta aos distintos axentes implicados no proceso é un dos puntos de grande interese nos estudos xa existentes. Entre as biomoléculas involucradas, están a proteína quinasa A, os seus substratos nesta vía de sinalización e as proteínas responsables da súa activación corrente arriba en espermatozoides.

1.4. O rol da PKA na regulación da motilidade espermática

En case todas as especies, o esperma permanece en estado inactivo no interior dos espécimes macho, a expensas da súa liberación ao medio na columna de auga correspondente durante o desove, ou ben no oviduto. Neste punto, o esperma ten movemento, pero a medida que se enfronta a condicións de capacitación, adquiren un tipo particular de motilidade, a hiperactivación (Yanagimachi, 1994), baseado en golpes moi curvos e de gran amplitude do flaxelo (Suarez & Pacey, 2006). As sinais que activan a adquisición da motilidade poden variar entre especies e ambientes e incluír cambios na osmolaridade celular, na concentración iónica (especialmente, de bicarbonato), ou ben por sinais químicas liberadas polos ovos.

Ademais das enormes diferenzas existentes no fenómeno da reprodución entre os diferentes taxóns, a cascada de sinalización que activa a motilidade está moi conservada corrente abaixo do receptor a través dos fillos caracterizados, principalmente, mamíferos e equinodermos, moi próximos entre si (revisado en Baro Graf et al., 2020; Speer et al., 2021). Con todo, pese á vital importancia deste proceso para o éxito reprodutivo ao longo dos fillos de *Metazoa*, os mecanismos moleculares que regulan a activación do esperma coñécense de xeito limitado.

Hai un grande interese en afondar no coñecemento da vía, dada a importancia destes mecanismos para determinar a adecuación dos animais nun ambiente cambiante ante as modificacións nas condicións dos ecosistemas polo cambio climático. Polo seu pequeno tamaño, os espermatozoides son moi susceptibles a perturbacións ambientais. Os mecanismos concretos polos que se reduce a súa actividade son pouco coñecidos, pero aqueles procesos aos que afectan están máis estudados: o metabolismo celular ou a acidificación do citosol son algúns exemplos, implicados na motilidade espermática en moitas especies (Christen et al., 1983). Estes vense moi afectados pola acidificación e o aumento da temperatura da auga, dous dos principais factores causantes do estrés que afectan aos ecosistemas oceánicos.

O aumento do pH no citosol espermático é un mensaxeiro intracelular crítico de indución da motilidade. En ourizos de mar, a unión de determinados péptidos a receptores da guanilato ciclasa activa intercambiadores espermáticos específicos, neste caso, Na^+/H^+ , o que aumenta o pH intracelular coa expulsión dos protóns. Trátase dun mecanismo moi conservado, que en mamíferos evolucionou de forma diferente: nestes, a entrada de bicarbonato desde o tracto reprodutor feminino, estimulada pola proxesterona é o responsable da alcalinización.

En ambas clases de animais, este fenómeno estimula a produción de AMPc vía adenilato ciclasa soluble e a activación da PKA, que, en consecuencia, fosforila proteínas dos flaxelos e outras presentes nos espermatozoides. A activación conxunta dos canais de calcio CatSper estimula a frecuencia flaxelar (figura 1.4.1), cuxo aumento é sostido.

Cada compoñente desta vía parece ser necesario para motilidade e fertilización en mamíferos. No caso concreto da PKA, a inhibición da súa actividade afecta á progresión do proceso, o cal foi demostrado mediante enfoques xenéticos: en ratos mutados ($\text{Ca}2$ nulos), non hai motilidade, debido a que, por ausencia de actividade da enzima, o proceso está inhibido (Nolan et al., 2004) (Morgan et al., 2008). Isto reafirma a presenza, no proceso, da vía dependente da adenilato ciclasa e o AMPc. O feito de que se detecte a súa participación en especies distantes a nivel filoxenético, como son mamíferos e equinodermos, apoia de que se trata dun proceso conservado que, en traballos recentes chegou a identificar incluso en cnidarios (figura 1.4.2) (revisado en Speer et al., 2021).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

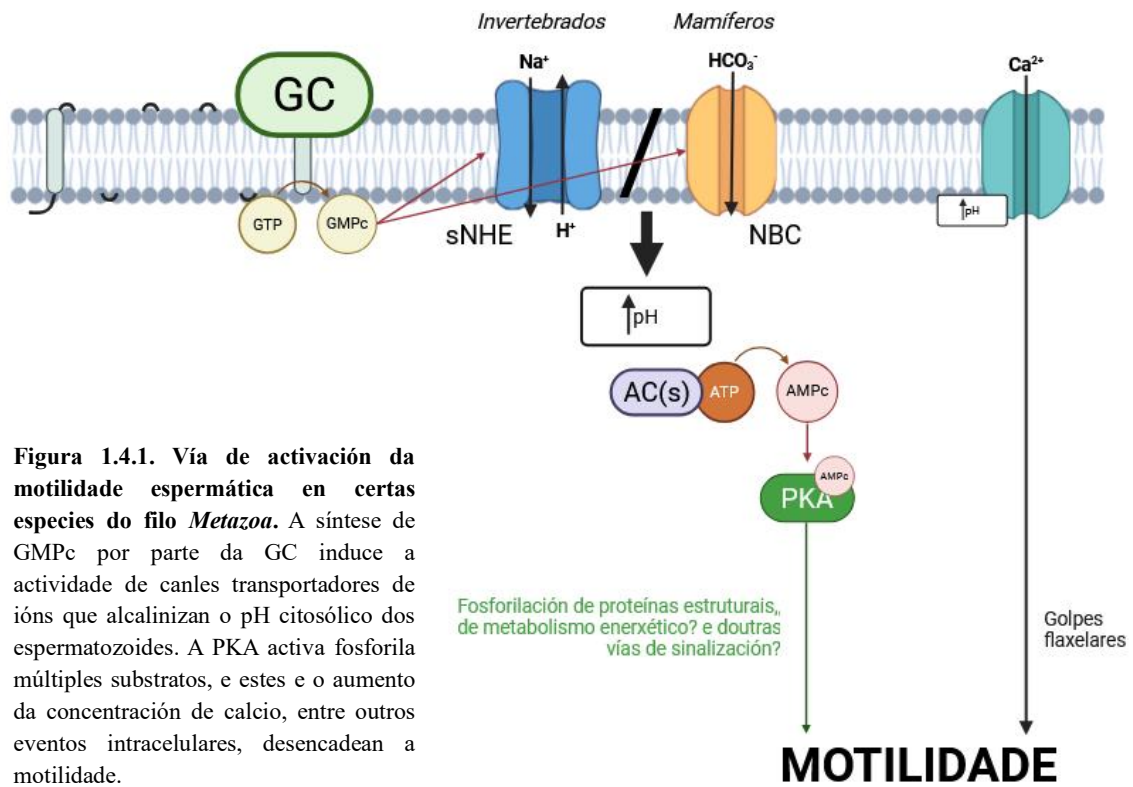


Figura 1.4.1. Vía de activación da motilidade espermática en certas especies do filo Metazoa. A síntese de GMPc por parte da GC induce a actividade de canles transportadores de ións que alcalinizan o pH citosólico dos espermatozoides. A PKA activa fosforila múltiples substratos, e estes e o aumento da concentración de calcio, entre outros eventos intracelulares, desencadean a motilidade.

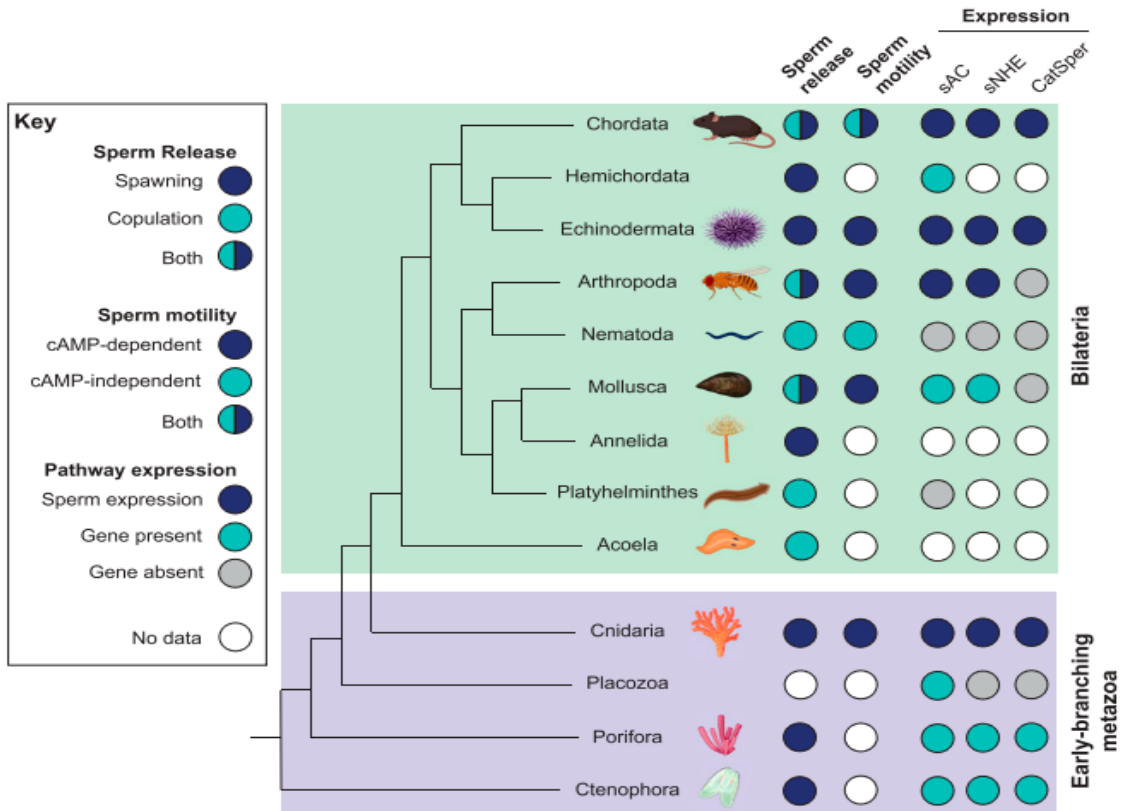


Figura 1.4.2. Conservación evolutiva da vía de activación da motilidade espermática augas arriba nos filos metazoarios. As diferentes estratexias de liberación e motilidade espermática e de expresión da vía indícanse na lenda: a cor azul escura indica liberación do esperma ao medio, dependencia da vía do AMPc e expresión da vía no esperma. A cor verde auga refire copulación, independencia da vía do AMPc e presenza do xen da proteína correspondente. A cor gris indica a ausencia do xen e a branca, ausencia de información ao respecto. Sperm release = liberación do esperma; sperm motility = motilidade espermática; sNHE = intercambiador sodio-protóns (Imaxe extraída de Speer et al., 2021).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

No esperma humano, un aumento da concentración de AMPc e a activación da vía dependente deste resulta nun aumento da velocidade e da linearidade no movemento do esperma (Leclerc et al., 1996); por outra parte, certas condicións que inactivan a PKA demostraron diminuír a porcentaxe de esperma hiperactivado (Luconi et al., 2005). Na nosa especie, ademais, identificáronse isoformas das subunidades reguladoras e catalíticas, distribuídas en toda a morfoloxía dos gametos masculinos. Reportouse a presenza da subunidade RII α en cabeza e flaxelo, detectándose tamén nestas rexións a subunidade C, maioritaria a α nas colas e distribuída sen uniformidade por elas, ao igual que RII β . Na cabeza dos espermatozoides, a distribución da isoforma C α varía tamén segundo a rexión. Estudos en ratos demostraron que a PKA, ademais de na fracción soluble do citoplasma, tamén se atopa ancorada ao citoesqueleto. A isoforma C α 2 localízase maioritariamente na cola en esperma ovino e murino, ao igual que a subunidade reguladora RII α , asociada ao axonema central. A RI α presenta unha distribución máis xeral en cabezas e colas (revisado en Baro Graf et al., 2020).

Pese á mencionada conservación da activación da sAC e da PKA no filo *Metazoa*, hai aspectos do proceso que, corrente abaixo, difiren, especialmente entre animais de fecundación externa e interna. En xeral, pódese afirmar que o mecanismo de motilidade espermática non se coñece tanto en organismos distintos a mamíferos.

No caso de *M. galloprovincialis* e outras especies de mexillón, por exemplo, descoñécese exactamente cales son os substratos que fosforila a PKA. Posiblemente, como no caso de equinodermos e mamíferos, algunhas das proteínas que experimentan esta modificación son as estruturais do axonema. A hipótese propónse tomando en consideración que os sitios de fosforilación teñen menos liberdade evolutiva para diverxer e deberían estar conservados en organismos relacionados (Ptacek & Snyder, 2006). Con todo, dada a distancia filoxenética entre as especies previamente mencionadas e o mexillón, é complicado que todas as proteínas sexan homólogas entre si. Certamente, hai poucos traballos nos que se recolla o gran número de proteínas substrato da PKA en espermatozoides de mexillón ou, en xeral, en especies de invertebrados con fecundación externa.

O feito de coñecer o proceso de motilidade espermática corrente abaixo nesta especie, como se propón neste traballo, é importante tanto para a contribución á investigación básica como nun contexto aplicado. A identificación dos substratos ofrecería a posibilidade de influír nos procesos reprodutivos e, consecuentemente, mellorar a calidade e cantidade do esperma, así como aumentar a produción. Isto tería un impacto positivo na acuicultura, e tamén relevancia na economía galega en xeral, dada a súa importancia como sector produtivo. Tamén resulta de interese desde un punto de vista medioambiental pola influencia que o cambio climático e as súas consecuencias (quecemento da auga, acidificación, etc.) teñen sobre a reprodución de *M. galloprovincialis* e doutras especies mariñas. Existindo unha caracterización previa da proteína quinasa nesta especie, e a identificación dunha isoforma propia de espermatozoides, confirmar o seu papel e descubrir as súas proteínas substrato permite establecer a súa implicación na motilidade espermática de mexillón e, neste contexto, resulta un reto científico de grande interese.

2. OBXECTIVOS

Coñécese o importante papel da PKA na regulación de motilidade espermática en mamíferos, mais non existe información publicada neste momento da súa implicación no proceso, particularmente, corrente abaixo, en moitos organismos con fecundación externa, como son os moluscos bivalvos.

Este traballo Fin de Grao enmárcase nunha liña de investigación que busca coñecer o papel da PKA no mecanismo molecular subxacente á motilidade en espermatozoides de mexillón *M. galloprovincialis*. Esta foi iniciada e está sendo desenvolvida no grupo no que se realizou este proxecto que, tras demostrar a presenza específica en espermatozoides da subunidade C₄ da PKA, busca identificar proteínas substrato da enzima, candidatas potenciais a participar no proceso regulador previamente mencionado.

Neste contexto, os obxectivos concretos propostos para o traballo son:

1. Demostrar a capacidade da PKA para fosforilar *in vitro* proteínas presentes en lisados de espermatozoides de mexillón.
2. Identificar, mediante estudos de proteómica (LC-MS/MS) proteínas substrato da PKA presentes en espermatozoides.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biolóxico

Utilizáronse mexillóns da especie *M. galloprovincialis*, de entre 6 e 8 cm, adquiridos nun supermercado local.

3.2. Reactivos

3.2.1. Reactivos inorgánicos

Os reactivos inorgánicos (de grao analítico) foron adquiridos a Merck Farma y Quimic e Sigma Aldrich. As sales para preparar auga de mar, pola súa banda, foron adquiridas da casa Sera marin.

3.2.2. Reactivos bioquímicos

- Tampón de lisis (tampón RIPA) Thermo Fisher Scientific
 - Cóctel de inhibidores de proteasas e fosfatasas Thermo Fisher Scientific
 - DTT Sigma Aldrich
 - BSA Sigma Aldrich
 - ATP Sigma Aldrich
 - PKI5-24 Sigma Aldrich
 - Subunidade C da PKA (isoforma C₄) Op* (Bardales et al., 2008)
 - Subunidade R da PKA (R_{myt2}) Op* (Cao, Ramos-Martinez, et al., 1995a)
- *Obtención propia = Op

3.2.3. Anticorpos

- *Anti-phospho-PKA substrates* Cell signalling Technology
- *Anti rabbit-IgG* Sigma Aldrich

3.2.4. Reactivos de electroforese e Western Blotting

- SDS Sigma Aldrich
- Acrilamida/bis ao 30% BioRad
- APS BioRad
- TEMED BioRad
- Colorante Coomassie Brilliant Blue X Sigma Aldrich
- Metanol Panreac AppliChem
- Ácido acético Panreac AppliChem
- Tris Merck
- Glicina Sigma Aldrich
- NaCl Panreac
- Tween 20 Vorquimica
- Leite desnatada en polvo C.L. Asturiana
- Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate Millipore
- Marcadores de peso molecular BioRad

3.2.5. Reactivos de proteómica

- AMBIC Sigma Aldrich
- Metanol HPLC grade
- ACN HPLC grade
- DTT Sigma Aldrich

- | | |
|--|--------------------------|
| • Iodoacetamida | Sigma Aldrich |
| • Tripsina porcina modificada | Promega |
| • Ácido fórmico | Sigma Aldrich |
| • Kit de enriquecemento de fosfopéptidos | Thermo Fisher Scientific |

3.3. Metodoloxía

3.3.1. Obtención de mostrás de espermatozoides

En primeiro lugar, preparouse unha disolución de auga de mar artificial empregando sales comerciais e axustouse o valor de osmolaridade e de pH aos da auga de mar natural.

A continuación, abríronse mexillóns e seleccionáronse exemplares machos no último estadio do desenvolvemento gametoxénico, en base ao aspecto morfolóxico do tecido. Tomáronse tecidos de manto e depositáronse sobre placas Petri que contiñan a auga de mar preparada, recollendo os espermatozoides liberados de forma directa ou mediante cortes no tecido. As suspensións de espermatozoides recollidos diluíronse con auga de mar e centrifugáronse 5 minutos a 2000 rpm (296xg) nunha centrífuga de mesa (MiniSpin™, Eppendorf). Este proceso de lavado repetiuse tres veces. Os precipitados do derradeiro lavado, que contiñan os espermatozoides, conxeláronse a -20 °C ata o momento do seu uso.

3.3.2. Lisado de espermatozoides

As mostrás -as suspensións celulares- desconxeláronse e homoxeneizáronse en proporción 1:2 con tampón de lisis (RIPA: Tris 25 mM (pH = 7,6), NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 1% e SDS 0,1%), ao que se engadiu DTT 1 mM e o correspondente volume do cóctel de inhibidores de proteasas e fosfatasas 100x con EDTA 0,5 M. A homoxeneización levouse a cabo en xeo nun homoxeneizador mecánico Potter-Elvehjen (Labbox Labware).

Os homoxenados mantivéronse 1 h en xeo e, posteriormente, centrifugáronse nunha centrífuga refrixerada Micro Star 30R (VWR) durante 20 minutos a 4 °C e 18850xg. En última instancia, os sobrenadantes obtidos (lisados de espermatozoides) recolléronse coidadosamente, mesturáronse e repartíronse en alicuotas que se conxelaron a -20 °C ata o seu uso.

3.3.3. Determinación da concentración de proteínas

Empregouse o método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na unión do colorante azul de Coomassie G-250 ás proteínas para a súa cuantificación.

Para construír a recta patrón, empregáronse cantidades crecentes de BSA (entre 2 e 20 µg). Tanto nestas mostrás como nas mostrás problema con proteínas espermáticas, convenientemente diluídas, axustouse o volume a 100 µL con auga Milli Q e engadiuse 1 mL de reactivo de Bradford (0,01% (p/v) de azul de Coomassie G-250, 4,7% (v/v) de etanol, 8,5% de ácido fosfórico en 50 mL de etanol ao 95%).

Proseguíuse medindo a absorbancia das mostrás estándar e problema a 595 nm cun espectrofotómetro UV/Visible (Lan Optics), empregando un branco para axustar a absorbancia a 0. A partir dos datos de absorbancia e as cantidades de mostra patrón correspondentes, elaborouse unha recta patrón coa cal se estimou a concentración de proteínas na mostra problema (ver Resultados, apartado 5.1.1).

3.3.4. Fosforilación *in vitro* das proteínas espermáticas

Coa intención de constatar que a PKA é capaz de fosforilar proteínas espermáticas *in vitro*, procedentes de células lisadas, realizouse o ensaio esquematizado a continuación (táboa 3.3.1)

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Mostras de lisados espermáticos foron incubadas en presenza (control de fosforilación; F) e en ausencia (control negativo; C) de PKA, concretamente, da isoforma C₄ purificada. Adicionalmente, outra mostra incubouse con PKA e PKI5-24 (inhibidor específico da PKA), para confirmar que a fosforilación é realizada en concreto por esta (control de inhibición de fosforilación; F+I). Como control positivo, utilizouse unha mostra de subunidade R_{myt2} purificada, cuxa fosforilación pola subunidade C foi previamente demostrada (Cao, Ramos-Martinez, et al., 1995b).

Táboa 3.3.1. Fosforilación de proteínas en lisados de espermatozoides.

Reactivos	C	F	F + I	R _{myt2} C	R _{myt2} F
Solución de fosforilación*	+	+	+	+	+
Proteína	200 µg**	200 µg	200 µg	-	-
R_{myt2}	-	-	-	0,1 µg	0,1 µg
PKI	-	-	0,1 µg	-	-
Subunidade C₄	-	0,1 µg	0,1 µg	-	0,1 µg

*Contén tampón fosfato 20 mM (pH = 7), DTT 0,5 mM, MgCl₂, 2 mM e ATP 0,2 mM

**A cantidade de proteínas determinouse en base á concentración de proteínas obtidas mediante o método de Bradford.

As mesturas incubáronse nun baño de auga durante 30 minutos a 24 °C. Transcurrido ese tempo, detivéronse as reaccións mediante a adición de EDTA ata unha concentración 5 mM e, a continuación, analizáronse mediante electroforese SDS-PAGE, Western Blotting e estudos de proteómica (LC-MS/MS).

3.3.5. Electroforese SDS-PAGE

3.3.5.1. Construción dos xeles de poliácridamida

Os xeles electroforéticos, separador e concentrador, elaboráronse a partir das seguintes disolucións:

- Solución A: 30% de acrilamida/bis 37,5/1 (2,6% C).
- Solución B: tampón Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,8).
- Solución C: tampón Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,8).
- Solución D: SDS 10% (p/v).
- APS 10%.
- TEMED.

Para a construción de dous xeles, engadíronse os volumes indicados (táboa 3.3.2) das disolucións anteriores.

Táboa 3.3.2. Volumes dos compoñentes dos xeles

Reactivos	Xel separador	Xel concentrador
Auga MilliQ	8 mL	4,5 mL
Solución B	5 mL	-
Solución C	-	1,9 mL
Solución D	200 µL	75 µL
Solución A	6,7 mL	1 mL

TRABALLO DE FIN DE GRAO

APS	100 µL	37,5 µL
TEMED	12,5 µL	7,5 µL

Unha vez preparado o primeiro xel, encheuse con el o espazo entre os cristais ata aproximadamente 1,5 cm de separación con respecto ao bordo superior. Para evitar a formación de meniscos, cubriuse a súa superficie cun pequeno volume de isopropanol. Finalmente, engadiuse na cámara o xel concentrador e, de inmediato, colocouse o peine para xerar os pocillos.

3.3.5.2. Tratamento das mostras proteicas

A cada mostra de lisados de espermatozoides engadíuselle 1/4 de volume de tampón de mostra (Tris-HCl 250 mM, pH = 6,8; glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (v/v), β-mercaptoetanol 20% (v/v) e SDS 8% (p/v)). Prosegiuse incubándoas 5 minutos nun baño de auga a ebulición, microcentrifugáronse e, unha vez arrefriadas a temperatura ambiente (TA), aplicáronse directamente nos pocillos dos respectivos xeles.

3.3.5.3. Desenvolvemento da electroforese

A cubeta de electroforese encheuse con tampón de electroforese (Tris-glicina pH = 8,3, preparado por dilución da seguinte solución 5x: 15 g de Tris, 72 g de glicina, 5 g de SDS, e auga Milli Q c.s.p. 1 L). Antes da aplicación das mostras, preequilibráronse os xeles facendo pasar ao seu través unha corrente de 200 V durante aproximadamente 20 minutos, e, unha vez aplicadas, realizouse a electroforese ata que o colorante azul de bromofenol alcanzou a parte final do xel (aproximadamente 30 minutos a 200 V). En paralelo ás mostras problema, aplicouse unha mostra de marcadores de peso molecular de electroforese nun xel e de Western Blotting no outro.

3.3.5.3. Tinguidura e destinguidura

A electroforese, como se deduce do anterior, levouse a cabo por duplicado, tinguíndose só un dos xeles preparados cunha solución colorante (azul de Coomassie R-250 0,1% (p/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v), e auga). O obxectivo que subxace a esta tinguidura é determinar a presenza de proteínas nas mostras para realizar a reacción de inmunotransferencia. Este primeiro xel somerxeuse na solución de coloración 1 h a TA en axitación orbital suave, e destinguíuse cunha solución descolorante (metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v), e auga), coa que se realizaron unha serie de lavados en axitación constante ata que se eliminou por completo a tintura excedente.

3.3.6. Western Blotting

O segundo xel empregouse para a realización desta técnica. En primeira instancia, as proteínas foron transferidas a unha membrana de fluoruro de polivinilideno ou PVDF (Immobilon, Millipore), previamente acondicionada para a súa utilización. A inmunotransferencia levouse a cabo durante 90 minutos a 4 °C e 300 mA nun equipo de transferencia Mini Trans-Blot (BioRad). Unha vez realizada, a membrana someteuse aos seguintes procesos:

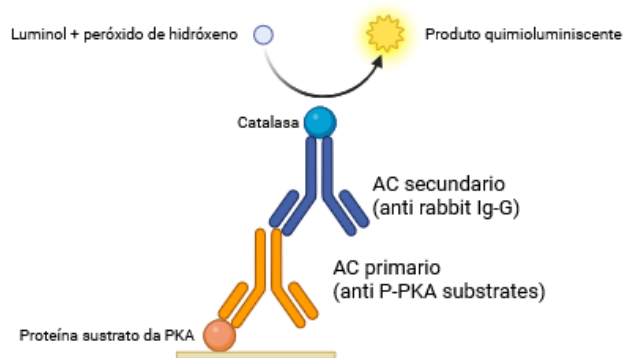
- Bloqueo: incubouse a membrana con solución de bloqueo, preparada con leite descremada ao 5% en tampón TTBS (Tris/HCl 20 mM, pH = 7,5; NaCl 0,15 mM, Tween-20 0,1% (v/v)) durante 6 horas a 4 °C e en axitación orbital.
- Lavados: realizáronse 3 lavados de 10 min en axitación constante con TTBS a TA.
- Incubación co anticorpo primario: a membrana tratouse con *anti-phospho-PKA substrates* diluído 1:1000 en TTBS + BSA 5% (p/v) durante 8 h a 4 °C e en axitación orbital.

O uso deste anticorpo para a detección de substratos da enzima validouse no esperma de moitas especies en diferentes estudos (Harrison, 2004; Kaneto et al., 2008; O'Flaherty et al., 2004).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

- Lavados: leváronse a cabo 4 lavados adicionais de 10 minutos en axitación constante con TTBS a TA.
- Incubación co anticorpo secundario: a membrana tratouse 1 h a TA en axitación orbital con *anti rabbit-IgG* conxugado con peroxidasa diluído 1:50 000 en TTBS.
- Lavados: leváronse a cabo 4 lavados máis nas mesmas condicións.
- Relevado: a detección das proteínas fosforiladas realizouse cun método de quimioluminiscencia (ECL Ultra, Millipore). Este está baseado na reacción de oxidación dun substrato en presenza de peróxido de hidróxeno, catalizada por unha peroxidasa de rábano unida ao anticorpo secundario e que xera un produto luminiscente na zona da membrana na que está a proteína (figura 3.3.1). Para que se produza a reacción, a membrana incubouse durante 5 minutos co reactivo ECL Ultra; seguidamente, captúrouse unha imaxe dixital a diferentes tempos de exposición nun sistema de documentación de xeles (Diversity 4, Syngene).

Figura 3.3.1. Esquema da reacción de quimioluminiscencia que permite o revelado da membrana. Detéctanse de xeito específico as proteínas fosforiladas debido á unión a estas do anticorpo primario, á do anticorpo secundario a este e á reacción catalizada pola enzima que leva acoplada.



A membrana, finalmente, tinguiuse con azul de Coomasie R-250 (solución colorante) durante 10 minutos e, a continuación, destinguíuse con solución descolorante.

3.3.6.1. Cuantificación das bandas proteicas reveladas no Western Blotting

As bandas proteicas reveladas no Western Blot cuantificáronse mediante densitometría coa aplicación “Gel analyzer” para comparar cuantitativamente as mostras control e as fosforiladas.

3.3.7. Identificación de substratos da PKA mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS)

3.3.7.1. Fosforilación de proteínas

Mostras de lisado de espermatozoides de mexillón (200 μg de proteína; 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) incubáronse con solución de fosforilación en ausencia (control negativo; C) e en presenza (control de fosforilación; F) de PKA (isoforma C₄) durante 30 minutos nun baño de auga a 24 °C. Transcorrido este tempo, detivéronse as reaccións mediante a adición de EDTA ata unha concentración de 5 mM e as mostras C e F, preparadas por triplicado, conxeláronse a -20°C ata o momento do seu uso.

3.3.7.2. Dixestión proteolítica con tripsina

As proteínas presentes nas mostras C e F concentráronse nun xel de electroforese SDS-PAGE. As bandas proteicas resultantes tinguíronse con azul de Coomasie ao 0,1%, recortáronse en anacos de xel e sometéronse a dixestión tríptica seguindo un protocolo estandarizado (Shevchenko et al., 1996), adaptado pola plataforma de proteómica do Instituto de Investigación Sanitaria do Hospital Clínico Universitario de Santiago.

No Thermoblock *Thermomixer compact* (Eppendorf) realizáronse varios procedementos:

TRABALLO DE FIN DE GRAO

- Lavados: os anacos do xel incubáronse con solución de lavado (AMBIC 50 mM e metanol ao 50%), durante 10 minutos a 22 °C e 500 rpm en catro ocasións.
- Deshidratación con ACN: a incubación realizouse 10 minutos a 22 °C e 500 rpm.
- Redución con DTT: alicuotas desconxeladas de DTT 10 mM en AMBIC 50 mM usáronse para reducir as proteínas presentes nos anacos do xel, rompendo conseguintemente os enlaces por ponte disulfuro inter e intracatenarios. Permaneceron 30 minutos en incubación, a 56 °C e 500 rpm en escuridade.
- Lavados: os anacos do xel incubáronse 10 minutos a 22 °C e 500 rpm con solución de lavado catro veces.
- Deshidratación con ACN: 10 minutos a 22 °C e 500 rpm.
- Alquilación con iodoacetamida: empregouse unha disolución de iodoacetamida 55 mM en AMBIC 50 mM, preparada no momento de ser empregada, con obxecto de carbamidar os grupos sulfhidrilo e evitar a formación dos enlaces disulfuro (20 minutos, TA, escuridade).
- Catro lavados e deshidratación con ACN.

Tras cada paso de deshidratación dos anacos do xel, realizouse o secado dos volumes nun equipo Speed Vac (Thermo Finnigan) 10 minutos a TA e 1300 rpm.

En última instancia, levouse a cabo a dixestión tríptica, baseada en rehidratar o xel coa cantidade necesaria de tripsina 0,025 µg/µL; cando as pezas do xel se volveron turxentes (transparentes), engadiuse o dobre de volume de AMBIC 20 mM, e iniciouse unha incubación a 37 °C e 500 rpm en escuridade durante 16 h, na que se produciu a rotura das proteínas en fragmentos peptídicos.

Os produtos do corte coa tripsina son os péptidos, que serán obxecto da análise por espectrometría de masas. A súa extracción dos xeles realizouse mediante tres incubacións a TA e 650 rpm con diferente volume de solución de extracción (ACN ao 60% e ácido fórmico ao 0,5%) e ACN na última incubación, e distintos tempos de incubación (20, 30 e 20 minutos, respectivamente). Despois, os volumes agrupáronse e leváronse ao Speed Vac para o secado, almacenándose a -20 °C ata o seu uso.

3.3.7.3. Enriquecemento de fosfopéptidos

Este procedemento realizouse seguindo un protocolo adaptado do incluído no kit de enriquecemento de fosfopéptidos utilizado. Este contén columnas de óxido de titanio en formato de puntas, adaptadores para tubos eppendorf e tres buffers (*Binding/Equilibration buffer* ou tampón de unión e equilibrado; *Phosphopeptide elution buffer* ou tampón de elución de fosfopéptidos e *Wash buffer* ou tampón de lavado). A adaptación foi realizada pola plataforma de proteómica do Instituto de Investigación Sanitaria do Hospital Clínico Universitario de Santiago e consiste en cinco pasos:

- Resuspensión: os péptidos extraídos e secados resuspendéronse en 150 µL de tampón de unión e equilibrado nun vórtex.
- Preparación das columnas: engadíronselles 20 µL de tampón de lavado e centrifugáronse 2 minutos a 3000xg nun equipo de Beckman Coulter; despois, engadíronselles 20 µL de tampón de unión e equilibrado e centrifugáronse nas mesmas condicións.
- Unión dos fosfopéptidos ás columnas: pasáronse por elas as suspensións peptídicas centrifugando 5 minutos a 1000xg, procedemento que se repetiu pasando de novo o filtrado polas mesmas.
- Lavados: realizáronse para eliminar todos os péptidos non adheridos e, por tanto, non fosforilados.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

No primeiro utilizáronse 20 μL de tampón de unión e equilibrado e centrifugáronse as columnas 2 minutos a 3000xg; no segundo usáronse 20 μL de tampón de lavado, cunha centrifugación nas mesmas condicións. Estes lavados repetíronse e, por último, engadíronse ás columnas 20 μL de auga LC-MS, centrifugándose do mesmo xeito.

- Elución dos fosfopéptidos: empregáronse 50 μL de tampón de elución de fosfopéptidos, e centrifugouse 5 minutos a 1000xg. Este paso repetiuse.

Tras a dixestión e antes do enriquecemento, sempre nos quedamos cun 10% da mostra dixerida, o *Imput*. Despois do enriquecemento, dispónse de mostras cos fosfopéptidos (*Elute*) e dos eluatos recollidos entre cada paso de lavado (*Wash*). Todos os péptidos dixeridos resuspendéronse en 25 μL de solución A (auga e ácido fórmico ao 0,1%) nun vórtex e sonicáronse 10 minutos.

3.3.7.4. Ensaio cualitativo

LC-MS/MS

No equipo cromatográfico micro, inxectáronse 4 μL de cada mostra nun loop (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ de velocidade de fluxo) onde a mestura se resuspendeu apropiadamente na fase móvil A (auga ultrapura LC/MS e ácido fórmico ao 0,1%). Os péptidos pasaron a unha precolumna de sílica en fase reversa YMC-TRIART (C18, 5 x 0,5 mm, 3 mm de tamaño de partícula e 120 Å de tamaño de poro, o cal é axeitado para os péptidos dixeridos con tripsina; YMC Technologies) para eliminar posibles contaminantes que poden danar a columna de captura column Chrom XP (C18, 150 x 0,3 mm, 3 mm de tamaño de partícula e 120 Å de tamaño de poro (Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX)). coa que se conecta en liña. A velocidade de fluxo nela é de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$; así, os péptidos sepáranse por polaridade en base a un gradiente de elución de 2% a 90% de fase móvil B (ACN) en 90 minutos. Despois, ionízanse directamente mediante microionización ESI.

A adquisición de datos realizouse nun sistema Triple-TOF 6600 (SCIEX) cun fluxo de traballo DDA, mediante o software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX) e condicións preestablecidas de fontes e interfaces. Os criterios de selección de ións foron un cociente masa carga (m/z) de entre 350 e 1400, estados de carga de +2-+5, tolerancia de masa de 250 ppm e limiar de abundancia de máis de 200 cps. Entre as análises, os ións elimínanse cada 15 segundos e o equipo calíbrase automaticamente cunha mestura de péptidos trípticos coñecidos (PepcalMix) ás 2 horas.

Os arquivos resultantes procesáronse co software ProteinPilot™ 5.0.1 (SCIEX) con dous algoritmos: Paragon™, para a busca na base de datos e obter a taxa de falso positivo (FDR), mediante un axuste non lineal, e Progroup™, para a agrupación da información. As buscas realizáronse en UniProt cunha base de datos de *M. galloprovincialis*; seleccionouse como modificación fixa a carbamidometilación da cisteína causada pola iodoacetamida, e como modificacións variables, a oxidación das metioninas e a fosforilación. Considéranse como correctamente identificadas as proteínas cun FDR < 1% (Shilov et al., 2007; Tang et al., 2008), o que quere dicir que se detectaron con menos dun 1% de erro.

3.3.7.5. Ensaio cuantitativo (SWATH)

Creación da librería espectral

O método de adquisición usado para construír a librería de pooles a partir das mostras é DDA, e a tecnoloxía, micro-LC-MS/MS. Unha librería ampliada con máis mostra da mesma especie permite unha mellor representación de péptidos e proteínas.

Engadíronse 4 μL de cada pool a un sistema micro-LC Ekspert Nlc425 (Eksigent) (5 $\mu\text{L}/\text{min}$) cunha columna YCM-Triart (C18, 150 μm x 0,3 mm, 120 Å, s-3 μm ; YMC CO.Japan) e solventes A e B. O gradiente empregado vai de 5% a 95% de solvente B en 30 minutos, 5 minutos de solvente B a 90% e 5 minutos a 5% para o correcto equilibrado da columna; en total, o *run* ten 40 minutos. Os péptidos eluídos inxectáronse directamente no espectrómetro de masas Triple-TOF 6600 cuadrupolo-TOF híbrido (SCIEX) cun sistema de adquisición DDA en modo de ións

TRABALLO DE FIN DE GRAO

positivos (250 ms de escáner dos masas, tamaño entre 400 e 1250 m/z, e 25 ms para entre 100 e 1500 m/z; 2,8 s de tempo total). A interface entre o microLC e o MS é unha microfonte (SCIEX) cunha voltaxe de 2600 V para a ionización dos péptidos.

As identificacións proteicas e peptídicas realizáronse con ProteinPilot como no caso anterior. Os espectros identificados cun nivel de confianza do 99% usáronse na librería espectral co obxectivo de extraer as áreas SWATH: para isto, empregouse a opción MS/MS^{ALL} versión 2.0 (SCIEX) incluída no software PeakView versión 2.2 (SCIEX).

Cuantificación relativa por adquisición SWATH

Realizouse cun sistema LC-MS/MS TripleTOF 6600 (AB SCIEX). Analizáronse as mostras C e F preparadas por triplicado (3 *Imput*, 3 *Elute* e 3 *Wash* de cada tipo, 18 en total) cun método de adquisición DIA. Analizáronse 4 µL de cada cun sistema LC-MS cun método de adquisición diferente ao utilizado para a creación da librería espectral: neste caso, SWATH-MS. O proceso baséase en repetir un ciclo de 100 escáneres (ventás TOF MS/MS) superpostos 1 m/z e no illamento previo do precursor secuencial de ancho variable (péptido) nun rango de masas de 400 a 1250 m/z cun escáner TOF MS, con 50 ms de tempo de adquisición por ciclo. Para cada conxunto de mostras, a anchura das ventás optimizouse de acordo á densidade iónica detectada, para o cal se usou a folla de cálculo *SWATH variable window calculator* (SCIEX).

Co software PeakView (versión 2.2) e SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0), extraéronse os datos dos perfís cromatográficos de ións fragmentados e procesáronse coa librería espectral. Para as áreas (parámetro que permite determinar a presenza relativa de fragmentos peptídicos dunha proteína na mostra), seleccionáronse aquelas con máis de dez péptidos e sete transicións ou fragmentos iónicos a partir da intensidade da sinal, e ventás de 5 minutos e 30 ppm de ancho. A cuantificación SWATH intentouse con todas as proteínas da librería e axustáronse os tempos de retención dos péptidos, seleccionados para cada proteína, mediante unha recta de calibrado para todas as mostras no curso da cromatografía. Xerouse un cromatograma iónico para cada fragmento e a área dos picos peptídicos obtívose sumando as áreas dos picos dos fragmentos iónicos correspondentes. A cuantificación calculouse sumando as áreas dos picos dos péptidos correspondentes a cada proteína, considerando só aqueles cun FDR < 1% (valor determinado con anterioridade). Estes valores exportáronse ao software MarkerView (AB SCIEX) para un análise cuantitativo relativo. Diferentes estudos (Luo et al., 2017; Meyer & Schilling, 2017; Ortea et al., 2018; Tan & Chung, 2018) usaron este software, que emprega de forma precisa picos espectrais e cromatográficos directamente dos datos SWATH crús. A aliñación dos datos que logra compensa as pequenas variacións en valores de tempo de retención e masa, asegurando que compostos idénticos en distintas mostras se comparen precisamente entre si.

Para controlar a perda desigual de mostra durante o desenvolvemento experimental, realizouse una normalización global *most likely ratio* de todas as áreas dos picos extraídos dos péptidos e dos fragmentos peptídicos cos replicados de cada mostra.

4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Determinación da concentración de proteína nas mostras dos lisados de espermatozoides

Para estandarizar a cantidade de proteína a empregar nos ensaios de fosforilación *in vitro*, realizouse o método de Bradford (ver Material e métodos, apartado 3.3.3). Os valores de absorbancia e de concentracións de BSA empregáronse para elaborar a recta patrón (Figura 4.1.1), a partir da cal se determinou a concentración proteica, tendo en consideración a dilución realizada, o volume inicial de mostra problema engadido ás cubetas e a súa absorbancia.

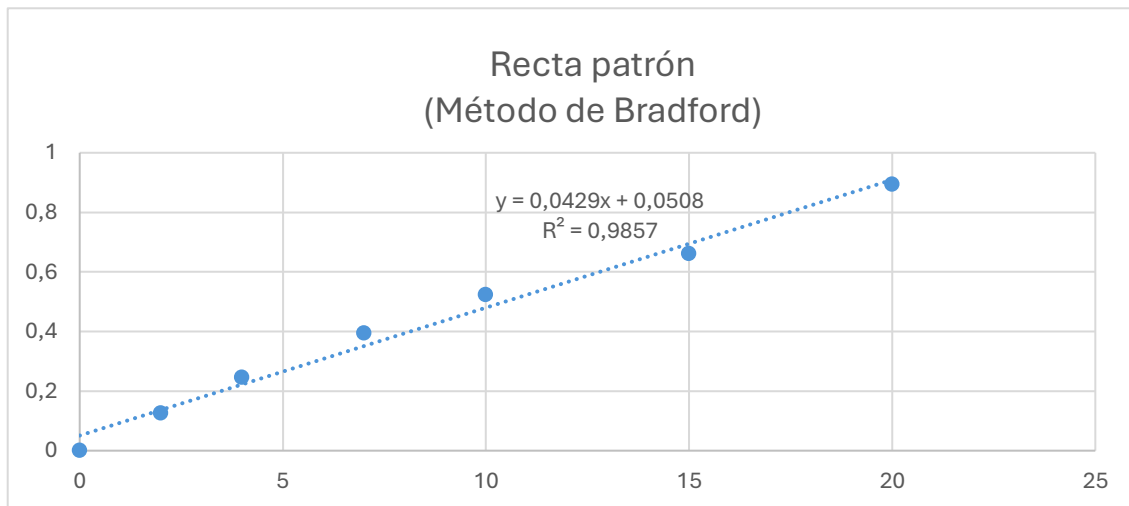


Figura 4.1.1. Recta de calibrado obtida en base aos resultados de absorbancia de concentracións crecentes de BSA como mostra patrón dentro do método de Bradford. O valor R é de 0,9928, indicando que o modelo de regresión empregado é axeitado.

A partir da ecuación da recta patrón, obtívose un valor de concentración de proteínas na mostra de lisado de espermatozoides de 12 µg/µL.

4.1.2. Fosforilación *in vitro* de proteínas en lisados de espermatozoides por PKA (isoforma C₄)

Como primeira aproximación experimental aos obxectivos do traballo e coa intención de demostrar que a PKA, concretamente a isoforma C₄, expresada especificamente en espermatozoides de mexillón, é capaz de fosforilar diferentes proteínas substrato, alícuotas procedentes dun lisado de espermatozoides incubáronse en ausencia (control negativo, C) e en presenza (control de fosforilación, F) de C₄. Para comprobar a especificidade de fosforilación, incubouse outra alícuota en presenza de C₄ e o péptido PKI5-24, un inhibidor específico da PKA. Como control positivo da fosforilación, empregouse tamén unha mostra da subunidade R incubada en presenza e ausencia da subunidade C₄, dado que a subunidade R_{myt2} é fosforilada pola catalítica (Cao, Ramos-Martinez, et al., 1995b) (ver Material e métodos, apartado 3.3.4).

As mostras control e fosforiladas foron analizadas mediante electroforese SDS-PAGE e Western Blotting, co anticorpo *anti-phospho-PKA substrates* que reconece especificamente a secuencia consenso dos substratos da PKA fosforilados na serina ou na treonina (RRXS^P/T^PI). Os resultados do Western Blotting móstranse na figura 4.1.2.

As bandas reveladas na figura B foron cuantificadas mediante análise densitométrico. Os resultados móstranse na figura 4.1.3.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

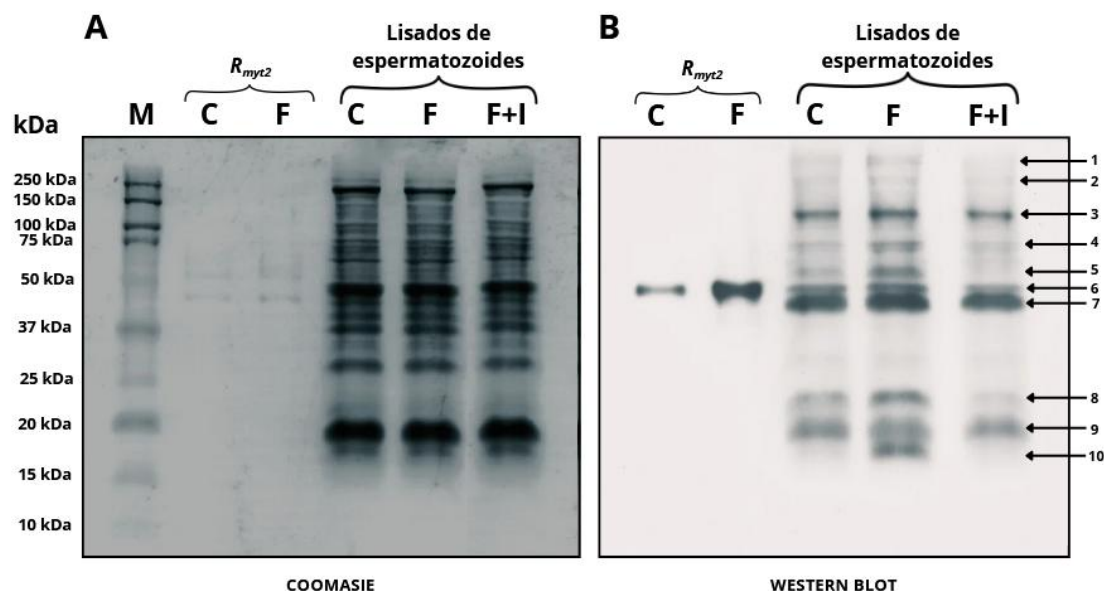


Figura 4.1.2. Membrana de PVDF tinguida con azul de Coomassie ao 0,1% (A) e Western Blot revelado (B). A imaxe da membrana tinguida obtívose co equipo Geldoc go gel imagin system (BioRad), e a revelada, co sistema de documentación de xeles Diversity 4, Syngene. M: marcadores de peso molecular para Western Blotting; C: controis negativos (sen C_4); F: controis de fosforilación (con C_4); F+I: control de inhibición de fosforilación (C_4 + PKI).

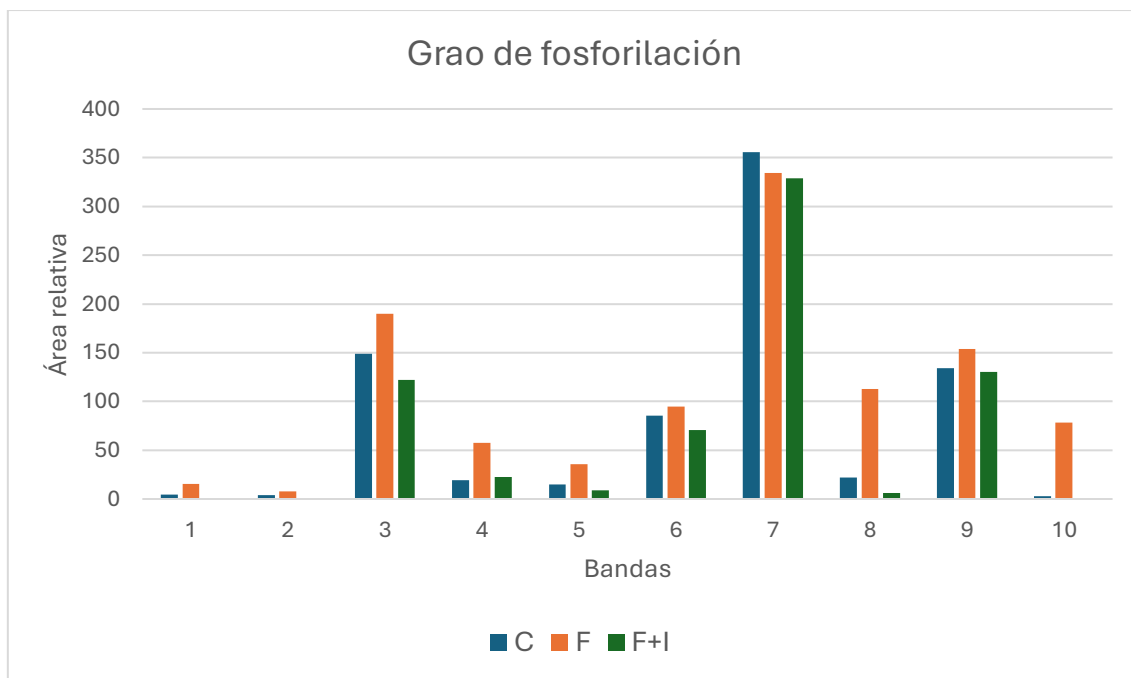


Figura 4.1.3. Cuantificación mediante densitometría do nivel de fosforilación das proteínas presentes nos lisados de espermatozoides de mexillón. C: controis negativos (sen C_4); F: controis de fosforilación (con C_4); F+I: control de inhibición de fosforilación (C_4 + PKI).

En vista desta información, resultante da análise por Western Blotting das proteínas dos extractos espermáticos de *M. galloprovincialis*, podemos afirmar que:

- A banda da proteína R_{myt2} incubada con subunidade C_4 é máis intensa que a do control, o que indica que esta proteína é fosforilada especificamente pola PKA e que o anticorpo empregado reconece de xeito específico substratos desta enzima.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

- Na calle do control negativo obsérvanse numerosas bandas proteicas de diferente peso molecular na imaxe revelada (B), o que indica que nos lisados de espermatozoides existen varias proteínas xa fosforiladas pola PKA. Estas proteínas presentan unha fosforilación basal, levada a cabo potencialmente pola enzima endóxena. Na cuantificación tamén se aprecia isto.
- En xeral, observáronse bandas con maior intensidade nos controis de fosforilación que nos controis negativos. Isto é particularmente evidente nas bandas 1, 4, 5, 8 e 10. Nas bandas 6 e 7 non é tan pronunciada porque existe unha fosforilación basal importante.
- A presenza do péptido PKI5-24, inhibidor específico da PKA, revirte a fosforilación, como mostran practicamente todas as bandas proteicas. Isto enfatiza a idea de que a fosforilación é levada a cabo por esta enzima e non por outras proteína quinasas que, potencialmente, poden estar presentes nos lisados.
- Na membrana tinguida con azul de Coomasie (A), nas tres calles nas que se aplicaron mostras de lisados hai un perfil proteico similar. Dado que a intensidade das mesmas nesta imaxe se relaciona coa cantidade de proteína presente nas bandas, a diferenza na imaxe revelada non é debida a variacións na cantidade de proteína aplicada e só pode atribuírse ao grao de fosforilación.

Estes resultados indican, en resumo, que existen numerosas proteínas en lisados espermáticos que son fosforiladas *in vitro* especificamente pola PKA.

4.1.3. Identificación das proteínas espermáticas fosforiladas mediante LC-MS/MS

Como segundo obxectivo, propúxose identificar proteínas presentes nestas células e fosforiladas pola enzima. Presúmese que moitos destes substratos terán un rol importante na motilidade espermática, manifesto na función que desempeñen nela, ou ben no mecanismo molecular que regula este proceso.

Con esta finalidade, realizouse un estudo proteómico no que se analizaron mostras control negativo (C) e de fosforilación (F), incubadas en ausencia e presenza, respectivamente, da isoforma C₄ da PKA nun ensaio de fosforilación *in vitro*, e preparadas por triplicado. Tras unha dixestión tríptica con diferentes tratamentos para a obtención de péptidos, enriquecéronse concretamente os fosfopéptidos con columnas de óxido de titanio (TiO₂). Finalizado o desenvolvemento experimental, obtivéronse tres mostras: o denominado *Input*, a fracción de solución peptídica non enriquecida; o *Elute*, mostra eluída da columna que contén os péptidos que se adheriron a ela e, por tanto, foron fosforilados, e o *Wash*, mostra con solucións peptídicas resultantes dos lavados da columna e na que están presentes péptidos non fosforilados (ver Material e métodos, apartado 3.3.7).

A aplicación do método SWATH, co que se efectuou a análise cuantitativa das mostras, permitiu obter información acerca da abundancia relativa das proteínas en cada unha delas en función das áreas dos picos dos espectros de masas e dos picos cromatográficos, tanto dos péptidos que as conforman como da secuencia obtida tras a ionización. Estas proteínas forman parte dunha librería ampliada construída cun ensaio previo e á que se engadiron proteínas adicionais presentes en bases de datos de *M. galloprovincialis*. Adicionalmente, o ensaio cualitativo previamente levado a cabo posibilitou a súa detección, identificando aquelas presentes a partir de espectros de masas. Os datos resultantes das análises recóllense en follas de Excel, e traballouse sobre os das proteínas presentes na mostra *Elute* control, derivada da elución do control negativo (C) da columna, e no *Elute* fosforilado, que procede do eluato do control de fosforilación (F) e contén os péptidos fosforilados por C₄ no ensaio *in vitro* (figura 4.1.4).

TRABALLO DE FIN DE GRAO

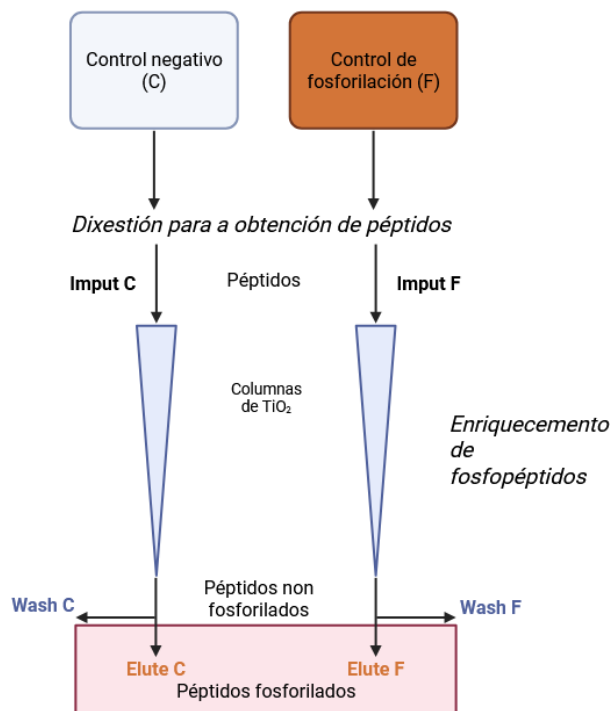


Figura 4.1.4. Desenvolvemento experimental no estudo proteómico. Os péptidos das proteínas procedentes das mostras control e fosforiladas pasáronse por columnas de óxido de titanio para o enriquecemento de fosfopéptidos, e recolléronse tres fraccións con diferente contido peptídico, que se someteron a espectrometría de masas e a ensaios cuantitativos e cualitativos posteriores. Os datos que se comparan son os de *Elute C* fronte a *Elute F*, e a razón desta decisión é que, por proceder destas mostras, as proteínas identificadas en calquera das dúas mostras teñen fosfopéptidos na súa estrutura.. (Imaxe propia creada <https://BioRender.com> e exportada baixo licenza académica).

A identificación das proteínas fosforiladas pola PKA nas mostras realizouse en base a dous criterios:

- A principal diferenza entre a mostra control e a fosforilada é que na segunda hai isoforma C₄ da subunidade C engadida de forma esóxena. Por tanto, se se detectan proteínas na mostra *Elute F* ($\text{mean } 2 F > 0$), estas teñen que ser fosforiladas pola enzima engadida adicionalmente, é dicir, son probablemente fosforiladas pola PKA.
- O concepto de *Fold Change*. Este é o cociente entre as medias das áreas calculadas para as proteínas, magnitude que se relaciona á súa vez coa abundancia relativa das mesmas nas mostras. Neste caso, é resultado de dividir a media das áreas da proteína en C entre a media das de F, no caso de que se detecte en ambas. Se está presente só nas mostras de *Elute F*, a media é 0. Seleccionáronse as proteínas cun valor de FC < 1.

En función de, especialmente, a primeira afirmación, pódese establecer que todas as proteínas presentes en maior cantidade no *Elute F* ($\text{mean } 2 F > \text{mean } 1 C$), son fosforiladas pola PKA. Se estiveran en maior proporción no *Elute* control, poderían estar fosforiladas basalmente, pero non pola PKA, xa que, de ser o caso, a fosforilación aumentaría dada a presenza da enzima. Todas estas proteínas son significativas por presentar fosfopéptidos e por ter un FDR < 1%.

Unha vez realizada a identificación, os códigos das proteínas introducíronse en UniProt para identificar na súa secuencia un potencial motivo de fosforilación por PKA, o seu peso molecular e a súa localización intracelular.

O listado de proteínas identificadas como substrato da PKA recóllese na táboa 4.2.1. En total, identificáronse 100 proteínas cun valor de FC < 1. Un porcentaxe moi significativo delas teñen polo menos un sitio de fosforilación que se axusta á secuencia consenso presente nos substratos da PKA (RRXS/TI). Outro porcentaxe presenta unha secuencia próxima á consenso, é dicir, dous aminoácidos básicos nas posicións -2 e -3 (RK, KR ou KK).

Estas proteínas clasificáronse adicionalmente en base á súa función en cinco grupos, que se recollen na táboa 4.2.2.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Táboa 4.2.1. Proteínas identificadas mediante LC-MS/MS como substratos da PKA.

UniProt AC	PROTEIN NAME	Mean1 C	Mean2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6EYD8	Elongation factor 2	0,00	731,87	0,0000	94	KKGTV	CITOPLASMA
A0A8B6HJJ9	14-3-3 protein beta/theta/zeta	0,00	829,01	0,0000	29	RRSSW	CITOPLASMA
A0A8B6GA99	E1 ubiquitin-activating enzyme	0,00	878,56	0,0000	116	KRVSK	CITOPLASMA/NÚCLEO
A0A8B6GIC2	Myosin heavy chain 6/7 (fragment)	0,00	1801,18	0,0000	200	RKSSA	CITOPLASMA/ MIOFIBRIÑAS
A0A8B6DR79	glutamate dehydrogenase [NAD(P)(+)]	0,00	1395,59	0,0000	60	RRLTV	MITOCONDRIA
A0A8B6C0A8	Uncharacterized protein	0,00	875,81	0,0000	58	RRRTI	MEMBRANA
A0A8B6EIG3	Acetyl-CoA acyltransferase 2	0,00	1389,99	0,0000	42	RLVSY	MITOCONDRIA
A0A8B6D7A5	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	0,00	1373,33	0,0000	54	RKHSN	MITOCONDRIA
A0A8B6BIP0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,00	2829,24	0,0000	17,5	-	CITOPLASMA
A0A8B6F9R9	Phosphodiesterase	0,00	1121,45	0,0000	93	REQSK	UBICUA
A0A8B6FFY1	Phosphodiesterase	0,00	661,30	0,0000	60	RRLSS	UBICUA
A0A8B6GN87	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	0,00	1090,96	0,0000	35,7	RYQST	MITOCONDRIA
A0A8B6C6M3	Nucleoside-diphosphate kinase	0,00	875,20	0,0000	43,0	RPRTL	CITOPLASMA/ CITOESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6DJC7	T-complex protein 1 subunit alpha	0,00	875,80	0,0000	59,9	KKISG	CITOPLASMA
A0A8B6ERM7	Guanine nucleotide-binding protein G(I)(S)(T) subunit beta-1 (Fragment)	0,00	1080,68	0,0000	33,5	RSPSF	UBICUA
A0A8B6DFY0	Spectrin beta chain	0,00	943,77	0,0000	280,6	RRLSG	CITOESQUELETO
A0A8B6FQY4	Meiosis-specific nuclear structural protein-1	0,00	1822,68	0,0000	66,5	RRLTA	NÚCLEO
A0A8B6GFS3	Dynein heavy chain, axonemal	0,00	761,50	0,0000	353,2	RKETE RKESI	CITOESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6GS71	Ca ²⁺ transporting ATPase, plasma membrane (Fragment)	0,00	875,81	0,0000	22,1	IRGSK	MEMBRANA

TRABALLO DE FIN DE GRAO

UniProt Code	PROTEIN NAME	Mean 1 C	Mean 2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6GBE6	ATP synthase-coupling factor-6, mitochondrial (fragment)	0,00	1395,13	0,0000	11,6	RNISS	MITOCONDRIA
A0A8B6EYI6	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0,00	616,87	0,0000	110,0	RQESH RADSW	CITOPLASMA
A0A8B6BNZ8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	0,00	1747,87	0,0000	43,3	RAVSI	MITOCONDRIA
A0A8B6FC56	Obg-like ATPase 1 (Fragment)	0,00	1395,59	0,0000	38,0	-	CITOPLASMA
A0A8B6GRL5	Intraflagellar transport protein 172 (fragment)	0,00	888,63	0,0000	64,3	RKFSQ	CILIOS /FLAXELOS
A0A8B6FIC7	20S proteasome subunit alpha 6 (Fragment)	0,00	1000,28	0,0000	13,6	LRDTL	PROTEASOMA
A4UDY5	Vitelline coat lysin M7 (Fragment)	0,00	827,17	0,0000	20	-	UBICUA
A0A8B6EAH3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein	0,00	494,21	0,0000	28,9	KKTSE KKVTV	CITOPLASMA
I6SBG2	Glutathione peroxidase	0,00	650,39	0,0000	19,5	-	UBICUA
A0A8B6C249	Receptor expression-enhancing protein	315,58	2436,25	0,1295	23,8	-	UBICUA
A0A8B6D2W1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/A3	426,87	3004,94	0,1421	33,4	REDSG	UBICUA
A0A8B6HT02	Armadillo repeat-containing protein 4	557,43	3813,09	0,1462	120,6	RTNSE	UBICUA
A0A8B6GV38	Ankyrin repeat and SOCS box protein 17	304,14	2075,40	0,1465	43,4	-	UBICUA
A0A8B6F587	MICOS complex subunit MIC60	856,48	5250,05	0,1631	81,4	RRSTS	MITOCONDRIA
A0A8B6EYF6	Tubulin beta chain	689,05	4098,81	0,1681	50,1	KRVSE	MICROTÚBULOS
A0A8B6F6T3	Serine/threonine-protein phosphatase	343,40	2009,20	0,1709	35,2	RGVSY	CITOPLASMA/NÚCLEO
A0A8B6C6W9	RNA helicase	199,16	1118,26	0,1781	89,5	RVGST	NÚCLEO
A0A8B6BWH9	Fructose biphosphate aldolase	576,20	2812,79	0,2049	39,5	KRNSA	CITOPLASMA
A0A8B6BVQ6	Dynein heavy chain, axonemal	583,81	2791,18	0,2092	382,6	RRFTT	CITOESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6F1Y8	Fas-associated factor 2	323,31	1395,57	0,2317	51,8	RLMSE	CITOPLASMA/ RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

TRABALLO DE FIN DE GRAO

UniProt Code	PROTEIN NAME	Mean 1 C	Mean 2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6EF06	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (Fragment)	543,88	2299,06	0,2366	65,7	RLIST	MITOCONDRIA
A0A8B6BE54	RIIa domain-containing protein	675,84	2445,69	0,2763	95,8	KKRTE	CITOPLASMA
A0A8B6H753	Dynein axonemal heavy chain	479,40	1690,95	0,2835	121,4	RRVSD	CITOEESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6H3D0	Vesicle -associated membrane protein-associated protein A	686,50	2271,40	0,3022	27,6	RPNSG	MEMBRANA
A0A8B6E7F9	Myosin heavy chain 6/7 (Fragment)	450,73	1390,00	0,3243	435,5	KRKTE	CITOPLASMA, MIOFIBRIÑAS
A0A8B6GHQ1	TEKTIN	294,16	875,81	0,3359	62,0	RTQSD RSQSE RLVSE	CITOEESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6GX49	Ras-related protein Rab-7A	585,20	1654,44	0,3537	23,0	KKFSN RFQSL RAVTA	LISOSOMAS/ ENDOSOMAS
A0A8B6EL21	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	1446,08	4035,59	0,3583	99,8	KKKTD	MITOCONDRIA
A0A8B6GU63	Cytosolic nonspecific dipeptidase	584,14	1610,06	0,3628	17,5	-	CITOPLASMA
A0A8B6DRK8	Malic enzyme	584,72	1599,17	0,3656	67,6	KKLSE	MITOCONDRIA
A0A8B6GV47	ADP/ATP traslocase	674,06	1765,04	0,3819	33,3	-	MITOCONDRIA
A0A8B6CSE1	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	656,61	1687,79	0,3890	59,1	KRSTV KRLTD	MITOCONDRIA
A0A8B6C153	Citrate synthase	2468,85	6023,11	0,4099	52,1	RPKSF RNSSS	MITOCONDRIA
A0A8B6GCQ5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	583,81	1394,63	0,4186	48,8	-	RETÍCULO ENDOPLASMICO (MEMBRANA)
A0A8B6FNL2	Carbonic anhydrase	1153,61	2755,15	0,4187	71,4	RRQSP	SECRETADA
A0A8B6F1X3	Kelch-like protein	575,88	1365,64	0,4217	60,1	-	UBICUA
A0A8B6D980	Spectrin Alpha	1314,03	3107,19	0,4229	278,5	RKRTI	CITOEESQUELETO

TRABALLO DE FIN DE GRAO

UniProt Code	PROTEIN NAME	Mean 1 C	Mean 2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6D0B7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	613,20	1395,59	0,4394	10,2	RAWTR	UBICUA
A0A8B6DJ12	Outer dense fibber protein 3	3796,61	8463,39	0,4486	27,6	HRRTD	CITOEESQUELETO
A0A8B6FBQ2	Pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)	2266,17	4660,83	0,4862	38,9	RRLTE	MITOCONDRIA
A0A8B6GYR0	Actin	351,54	717,22	0,4901	105,7	RKYSV	UBICUA
A0A8B6F7Q0	Tropomyosin	691,09	1395,59	0,4952	27,0	RKISM	UBICUA
A0A8B6GJA5	Solute carrier family 25 (Mitochondrial phosphate transporter), member 23/24/25/4	690,87	1390,00	0,4970	77,5	RHDTN	MITOCONDRIA
A0A8B6EH82	Leucyl aminopeptidase	695,27	1388,62	0,5007	56,0	-	CITOPLASMA
A0A8B6CGZ3	Aconitate hydratase, mitochondrial	1511,64	2982,95	0,5068	84,6	RFDTD	MITOCONDRIA
A4UDQ7	Vitelline coat lysin M7 (Fragment)	415,97	817,66	0,5087	20,0	-	SECRETADA
A0A8B6EKF3	Protein disulfide-isomerase	324,02	634,81	0,5104	54,8	KKKTG	RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (LUMEN)
A0A8B6GGE1	Large subunit ribosomal protein L23Ae	450,23	785,72	0,5730	93,5	RRSTI	RIBOSOMAS
A0A8B6FJ56	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	567,99	983,26	0,5777	39,1	RAGSQ	MITOCONDRIA
A0A8B6FZP6	Ras-related protein Rab-3C (Fragment)	761,47	1310,21	0,5812	19,7	RVVST	UBICUA
A0A8B6EZW6	Cilia-and flagella-associated protein 45	434,01	745,20	0,5824	66,5	KRKSK	CILIOS/FLAGELOS
A0A8B6ELT5	TauD/TfdA-like domain-containing protein	571,06	967,25	0,5904	36,8	-	LISOSOMAS/ ENDOSOMAS
A0A8B6DML0	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (Fragment)	2037,68	3423,97	0,5951	82,3	RKATN	CITOSOL/NÚCLEO
U3GM45	17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 10	857,97	1421,43	0,6036	27,5	-	MITOCONDRIA
A0A8B6CA14	Trichohyalin-plectin-homology domain-containing protein	526,19	854,99	0,6154	65,6	KKKSK	MICROTÚBULOS AXONEMA
A0A8B6DTH0	TRAF3-interacting protein 1	1360,53	2209,68	0,6157	62,2	KRESR	CITOEESQUELETO/ AXONEMA

TRABALLO DE FIN DE GRAO

UniProt Code	PROTEIN NAME	Mean 1 C	Mean 2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6EY33	Actin beta/gamma 1	1695,67	2724,35	0,6224	41,8	<u>RKYSV</u>	UBICUA
A0A8B6C9P6	DUF4455 domain-containing protein	859,03	1365,16	0,6293	171,0	<u>RRSSK</u>	UBICUA
A0A8B6CT20	Adenylate kinase	3199,89	5016,08	0,6379	82,0	<u>KKETE</u>	UBICUA
A0A8B6GKK5	14-3-3 protein epsilon	563,78	861,20	0,6546	470	<u>RRASW</u>	NÚCLEO
A0A8B6F7Z1	RNA helicase	583,81	875,81	0,6666	63,4	<u>KKPSG</u>	MEMBRANA
Q3LF65	Heat shock cognate 71	897,54	1315,61	0,6822	71,3	<u>KRNTT</u>	UBICUA
A0A8B6DUG1	Cytosol aminopeptidase	586,12	851,36	0,6885	57,2	<u>KKLTN</u> <u>KKVSV</u>	CITOPLASMA
A0A8B6G8A7	Tubulin Alpha chain	3149,98	4560,71	0,6907	50,1	-	MICROTÚBULOS
A0A8B6BWA9	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	1208,43	1747,82	0,6914	53,5	SRASR	MITOCONDRIA
A0A8B6H7L7	Adenylate kinase	1410,89	2015,30	0,7001	54,4	RYHSL	UBICUA
A0A8B6DW57	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 1	1359,39	1918,74	0,7085	195,9	<u>RKNTF</u>	MEMBRANA
A0A8B6HE83	Carnitine O-palmitoyl transferase 1, liver isoform	666,56	875,81	0,7611	87,7	RLSTR	MITOCONDRIA
A0A8B6G0R5	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta (Fragment)	691,09	847,18	0,8158	19,3	RCQSA	MITOCONDRIA
A0A8B6F3E6	Ig-like domain-containing protein (Fragment)	1142,06	1390,00	0,8216	195,1	<u>RRMSE</u> <u>RRLSF</u>	MEMBRANA
A0A8B6G7X6	Dynein heavy chain, axonemal	1168,11	1367,99	0,8539	205,0	<u>KRNSP</u>	CITOESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6GFA2	ATP synthase subunit B	5293,15	6012,30	0,8804	32,8	<u>KKISQ</u>	MITOCONDRIA
A0A8B6E942	Dynein heavy chain, axonemal	1256,13	1390,00	0,9037	128,7	<u>RRHTA</u>	CITOESQUELETO/ AXONEMA
A0A8B6D9B6	Actin beta/gamma 1	621,30	683,23	0,9094	41,8	<u>RKYSV</u>	UBICUA
A0A8B6DBA4	26S proteasome regulatory subunit T6	1200,94	1309,41	0,9172	29,8	IRVSG	UBICUA

TRABALLO DE FIN DE GRAO

UniProt Code	PROTEIN NAME	Mean 1 C	Mean 2 F	FOLD CHANGE (C/F)	MW (kDa)	MOTIVO FOSFO	LOCALIZACIÓN
A0A8B6HL24	ODAD1 central coiled coil region domain-containing protein	1833,10	1976,13	0,9276	63,6	<u>KKISK</u>	CILIOS/FLAGELOS
A0A8B6FDJ9	Cilia- and flagella- associated protein 77	1849,90	1993,40	0,9280	30,1	<u>RRKTA</u>	UBICUA
A0A3L5TR45	cystathionine gamma-lyase (Fragment)	4016,94	4299,40	0,9343	37,0	IRLSV	CITOPLASMA / MEMBRANA
A0A8B6G720	CFA20 domain-containing protein	2443,74	2586,78	0,9447	22,8	<u>KRITD</u>	AXONEMA
A0A8B6H7Z8	Methyltransferase type 11 domain-containing protein	941,79	995,67	0,9459	33,3	SRCSF	/CITOPLASMA MIOFIBRIÑAS
A0A8B6H9X2	Myosin heavy chain 6/7	583,81	608,89	0,9588	406,9	<u>RKLSA</u> <u>RKATA</u>	UBICUA

As proteínas en negra e sombreadas son as que conteñen unha secuencia consenso idéntica, con dúas arxininas nas posicións iniciais; as proteínas en vermello presentan unha secuencia aproximada que comeza con RK, KR ou KK.

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Táboa 4.2.2. Clasificación funcional das proteínas identificadas como substratos da PKA.

GRUPO	Nº	TIPOS	PROTEÍNAS DE ESPECIAL INTERÉS
1. PROTEÍNAS ESTRCUTURAIAS	27	Proteínas do citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none"> espectrina alfa, espectrina beta actina, tropomiosina, miosina 6/7 heavy chain
		Proteínas estruturais do axonema	<ul style="list-style-type: none"> dineína (cadea pesada, isoformas) <ul style="list-style-type: none"> tubulina, cadea beta
		Proteínas asociadas a cilios e flaxelos (<i>CFA-proteins</i>)	<ul style="list-style-type: none"> CFA 77, CFA 45, CFA 20
		Proteínas del complexo de transporte intraflaxelar (IFT proteins).	<ul style="list-style-type: none"> IFT 54, IFT 172
		Outras	<ul style="list-style-type: none"> ODAD-1 (outer dynein arm docking complex subunit 1)
2. PROTEÍNAS METABOLISMO ENERXÉTICO	18	Enzimas de rutas catabólicas de glicosa e ácidos grasos, cadea respiratoria, ATP sintasa, etc.	<ul style="list-style-type: none"> Piruvato deshidrogenasa (E2)
3. PROTEÍNAS RUTAS SINALIZACIÓN	12	Proteínas relacionadas con rutas de sinalización	<ul style="list-style-type: none"> 14-3-3- protein (beta/theta/zeta) <ul style="list-style-type: none"> 14-3-3 protein épsilon <ul style="list-style-type: none"> Fosfodiesterasa Anhidrasa carbónica Ig-like domain containing protein
4. PROTEÍNAS IMPLICADAS NA BIOSÍNTESE/DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS	11	Proteínas relacionadas coa transcripción, traducción, pregamento ou degradación de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> Large subunit ribosomal protein L23Ae <ul style="list-style-type: none"> Ubiquitin-activating enzyme (E1) Ubiquitin conjugating enzyme (E2) 20S proteasome subunit alpha 6
5. OUTRAS PROTEÍNAS	32	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas Proteínas de transporte (intracelular, membrana) Proteínas implicadas en meiose Proteínas implicadas en fecundación Proteínas non caracterizadas ou con funcións descoñecidas 	<ul style="list-style-type: none"> DUF4455 domain-containing protein Meiosis-specific nuclear structural protein-1

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Un importante número de substratos da PKA teñen funcións estruturais e están presentes no axonema, compoñente citoesquelético central do flaxelo, ademais de no citoplasma. Proteínas como a actina, a tropomiosina e isoformas da cadea pesada da miosina conforman microfilamentos dentro do citoplasma celular. No flaxelo, os filamentos citoesqueléticos presentes son microtúbulos, constituídos por subunidades de tubulina, tamén fosforilada pola enzima. Nesta estrutura hai proteínas adicionais que distribúen moléculas ao longo do axonema, as denominadas proteínas de transporte intraflaxelar, ou asociadas a estes orgánulos, como as CFAP.

En menor medida, detéctase unha maior abundancia relativa no *Elute F* de proteínas involucradas no metabolismo enerxético, principalmente, enzimas catabólicas presentes na membrana mitocondrial (compoñentes da ATP sintasa, proteínas dos complexos de transporte electrónico na cadea respiratoria) ou na matriz, como é caso da subunidade E2 da piruvato deshidroxenasa, que cataliza a conversión de piruvato a acetil-CoA. Estas enzimas están involucradas na degradación aeróbica de ácidos graxos e/ou de glicosa para a obtención do ATP necesario para xerar o movemento flaxelar

En terceiro lugar, a PKA fosforila proteínas que interveñen en cascadas de sinalización: entre estas, podemos destacar as fosfodiesterasas, que regulan a concentración de segundos mensaxeiros (hidrolizan nucleótidos cíclicos como o AMPc e o GMPc), a anhidrasa carbónica, que elimina o bicarbonato no citosol, ou os diferentes tipos de proteínas 14-3-3, implicadas en rutas de transdución de sinais.

Outro grupo de substratos da PKA estarían relacionadas con procesos de regulación da concentración proteica, como a súa síntese (factores de transcripción nucleares e de tradución citoplasmáticos), o seu pregamento e a súa degradación mediada polo proteasoma e por marcaxe con ubiquitina.

Finalmente, moitas proteínas detectadas teñen funcións que non están vinculadas aos anteriores procesos; por exemplo, proteínas de transporte, as implicadas na meiose, na fecundación, e outras con función descoñecida, como aquelas que presentan dominios DUF.

4.2. Discusión

A vía de activación da motilidade espermática parece ser un mecanismo conservado augas arriba da PKA en moitos dos fillos de *Metazoa*. O proceso está descrito en detalle para numerosas especies, especialmente, en mamíferos e equinodermos. Esencialmente, o proceso comeza coa activación da sAC que provoca o aumento do nivel de AMPc e a conseguinte actividade da PKA na fosforilación de substratos (Speer et al., 2021). Pese a esta conservación a nivel molecular, existen diferenzas na ruta, e a maioría débense ao tipo de fertilización que presentan os organismos. Os factores externos non afectan do mesmo xeito se a fecundación é no interior do aparato reprodutor feminino, que ten condicións de temperatura e pH constantes, ou nun medio acuático externo, moito máis propenso a alteracións, en especial ante a situación climática actual, que compromete de xeito significativo os ecosistemas fluviais e mariños. Os cambios na temperatura, pH ou salinidade na auga poderían influír na cascada de sinalización que regula a motilidade e afectar ao proceso de fecundación, polo que resulta lóxico pensar na existencia de modificacións adaptativas nos mecanismos que culminan na unión dos gametos canto maior é o grao de dependencia que estes teñen coas condicións ambientais.

A información publicada acerca das proteínas substrato da PKA, implicadas na activación do proceso ou involucradas nel dun xeito directo, é escasa en xeral, e, particularmente en organismos diferentes dos mamíferos. Por esta razón, resulta interesante a identificación daqueles substratos da PKA en espermatozoides que poden ter un papel clave na regulación da motilidade e, por tanto, na fecundación. Levar a cabo un estudo desta dimensión non adoita ser o método máis empregado cando se presenta este obxectivo: a maior parte dos traballos publicados limitáanse á purificación de moléculas illadas (Gazo et al., 2017); non obstante, consideramos que dispoñer de tal cantidade de información pode ser unha vantaxe para definir o proceso con máis nivel de detalle naquelas especies nas que está pouco descrito, o cal permitirá tamén comparalo co de aquelas máis estudadas.

Neste traballo, en primeiro lugar, demostrouse que a PKA, concretamente, a isoforma C₄, é capaz de fosforilar *in vitro* diversas proteínas de entre 15 e 250 kDa presentes en espermatozoides de *M. galloprovincialis*. A continuación, mediante LC-MS/MS identificáronse aproximadamente 100 de estas proteínas como substratos da PKA.

A análise das secuencias destas proteínas, depositadas na base de datos UniProt, permitiu identificar, na maior parte dos casos, o motivo de fosforilación característico da PKA, e este foi o principal criterio polo que se propuxeron como candidatas a ter un papel clave na motilidade, de forma directa ou indirecta. Por outra banda, obtívose información acerca do seu peso molecular e da súa localización subcelular. Detectáronse en todos os compartimentos da célula, o que se pode explicar pola ubicuidade da enzima e da modificación, tamén nesta especie. A clasificación funcional (figura 4.2.1) realizouse en base a unha busca bibliográfica.

As proteínas estruturais presentes no flaxelo, as involucradas na obtención de enerxía por parte das células ou en rutas de sinalización xa se identificaron como potencialmente fosforiladas pola enzima nas especies nas que a vía se caracterizou. Moitos destes individuos, ao igual que *M. galloprovincialis*, teñen fecundación externa. Isto, *a priori*, permite confirmar que o proceso de motilidade é máis conservado a nivel molecular do que ese afirma, tamén corrente abaixo.

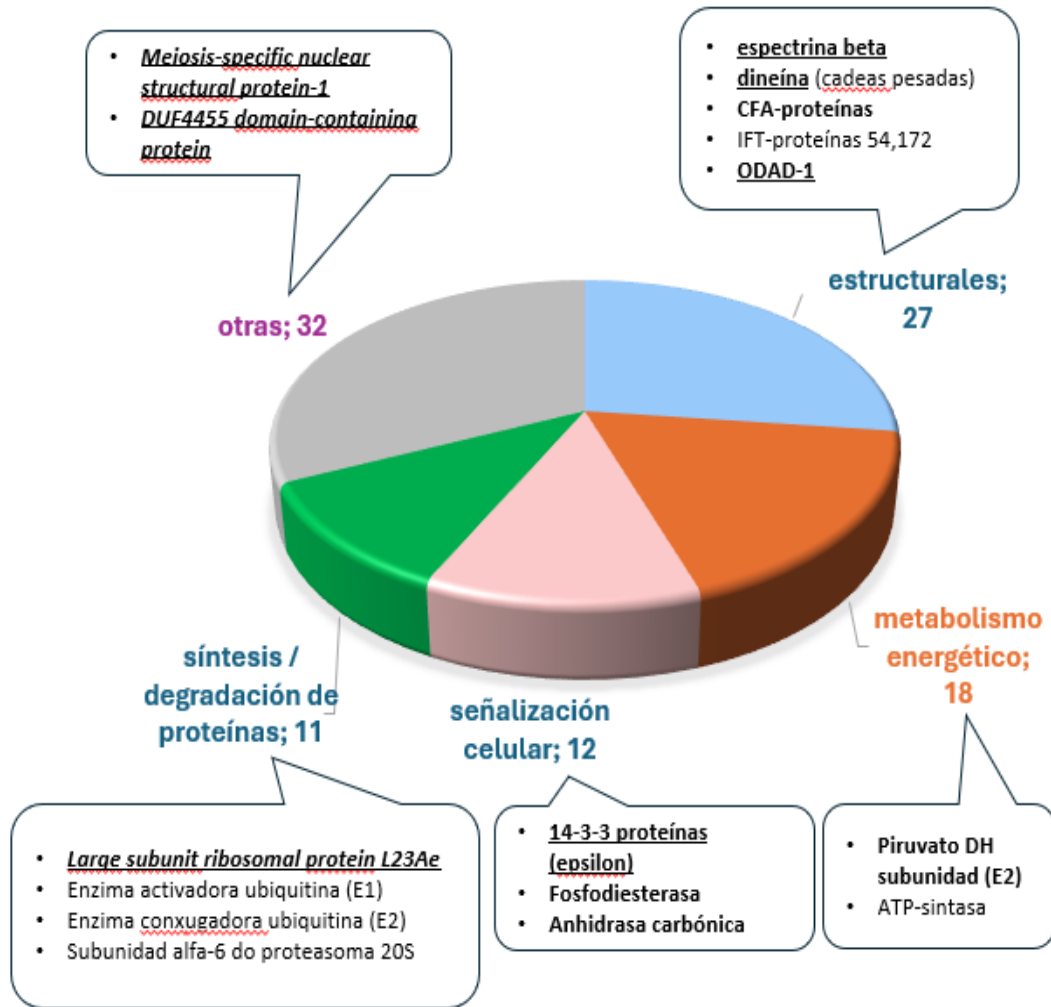


Figura 4.2.1. Función das principais proteínas substrato da PKA en espermatozoides de mexillón *M. galloprovincialis*. Indícanse algunhas das identificadas maioritariamente e os procesos xerais nos que están involucradas. (Imaxe do grupo PROMET exportada baixo licenza académica).

1. Proteínas con función estrutural.

Destacamos as seguintes:

- A espectrina beta interacciona activamente con outras proteínas citoesqueléticas, como a espectrina alfa, coa que forma un heterodímero, a ankirina ou a actina, en cuxas secuencias tamén se detectaron fosfopéptidos no estudo proteómico. Na secuencia da espectrina beta está presente o motivo exacto que é fosforilado pola PKA, con dúas arxininas nas posicións -2 e -3. A función do heterodímero de espectrina é o mantemento da estrutura e integridade da membrana celular formando unha rede baixo esta dentro do citoesqueleto (TERADA et al., 2005), potencialmente relevante no proceso de fecundación.
- A dineína (Grotjahn & Lander, 2019) é a proteína da que máis isoformas se identificaron como substratos da PKA, en particular, das súas cadeas pesadas. Estas forman os dominios motores principais, que conteñen dominios ATPasa e de unión a microtúbulos, e son as responsables da xeración da forza necesaria para o movemento en flaxelos. Para isto, empregan a enerxía da hidrólise do ATP.

Precisamente por posibilitar o movemento flaxelar, considéranse os substratos da PKA máis relevantes dentro do proceso de motilidade.

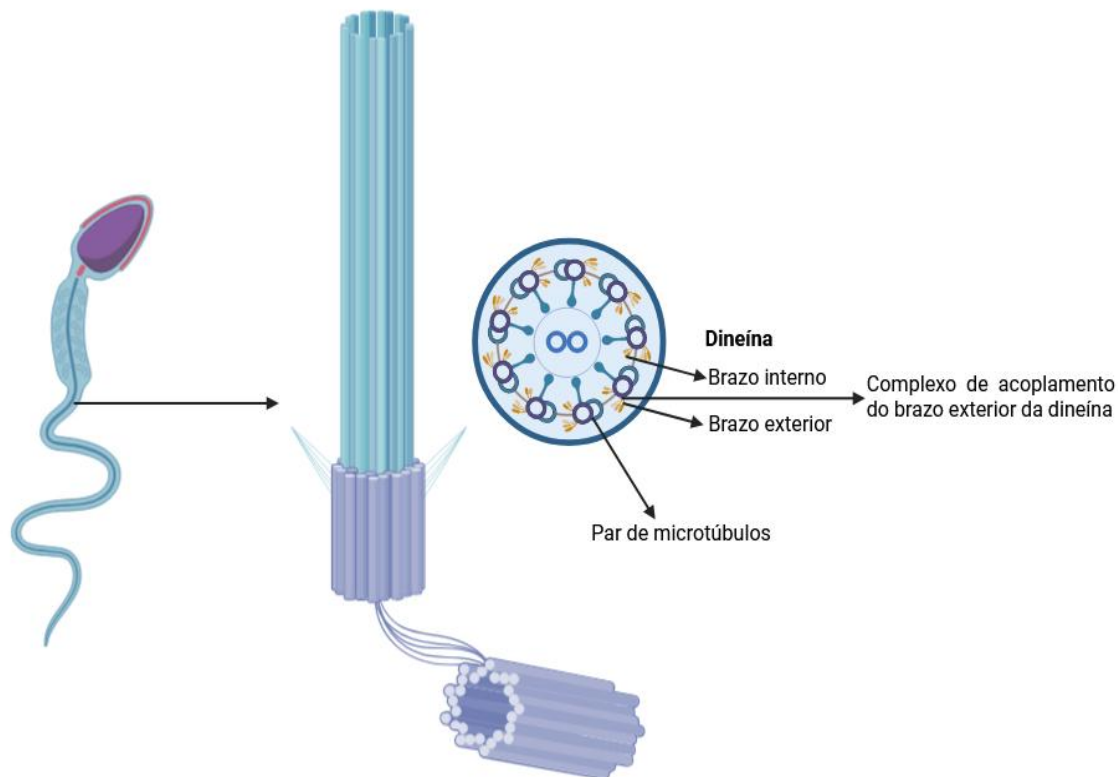
TRABALLO DE FIN DE GRAO

A fosforilación por PKA das isoformas desta proteína axonémica, nunha secuencia idéntica ou aproximada á consenso, detectouse noutras especies de moluscos (Stephens & Prior, 1992).

- As CFAP, como a 20 e a 45, teñen un papel estrutural no axonema: por interacción con outras facilitan o movemento do flaxelo (Wu et al., 2023). É particularmente interesante a súa presenza neste órgano en relación coa motilidade, presentando actividade auxiliar á da dineína. Ten un sitio de fosforilación específico para PKA.
- As proteínas IFT 54 e 172 participan na formación, mantemento e funcionamento de cilios e flaxelos. Normalmente, levan a cabo a súa función mediante o movemento de materiais ao longo do axonema por medio dun transporte bidireccional (Klena & Pigino, 2022). Estas tamén presentan secuencias semellantes ou idénticas á consenso dos substratos

Na figura 4.2.2. reflíctese a estrutura do axonema flaxelar e as principais proteínas presentes neste, conservadas en animais. Moitas das detectadas nos lisados espermáticos de *Mytilus* tamén se identificaron en equinodermos, concretamente, en ourizo de mar (Loza-Huerta et al., 2013). A súa fosforilación parece ser imprescindible para o incremento da súa actividade, na que participan desempeñando diferentes funcións.

Figura 4.2.2. Esquema da estrutura do axonema, o compoñente central dos flaxelos. Detalle da sección transversal



do mesmo e das proteínas citoesqueléticas que o constitúen. (Imaxe propia creada en <https://BioRender.com> e exportada baixo licenza académica).

2. Proteínas relacionadas coa obtención de ATP.

Existe certa lóxica na abundancia de proteínas mitocondriais entre os substratos da PKA en gametos masculinos. Estas preséntanse nunha maior proporción no flaxelo destas células ante o maior requerimento enerxético para dispoñer de movemento autónomo. Proteínas como a ATP sintasa ou a NADH deshidroxenasa da cadea de transporte electrónico (flavoproteína 2, ubiquinona), son substratos da PKA tanto en *Mytilus* como, por exemplo, en ourizo de mar (Loza-

Huerta et al., 2013). A piruvato deshidroxenasa matricial tamén o é, así como outras enzimas do catabolismo de glúcidos e lípidos.

3. Proteínas implicadas en procesos de sinalización.

Outras proteínas de relevancia manifesta son proteínas de sinalización. Neste apartado, destacamos fundamentalmente a 14-3-3 epsilon, dimérica (Eisa et al., 2021), unha proteína involucrada en regulación e altamente conservada. Presenta un motivo de fosforilación por PKA e participa en rutas de transdución de sinais (vía MAPK) en respostas a estrés, regulación do ciclo celular e modulación da apoptose.

4. Proteínas que regulan a concentración proteica.

Dentro destas, destacamos fragmentos das distintas subunidades do proteosoma 20S e 26S, que son tamén substratos da PKA en *Mytilus* e noutras especies (Zapata-Carmona et al., 2019), así como proteínas involucradas no proceso de tradución, como aquelas que forman parte da subunidade maior do ribosoma. A implicación do proteosoma na regulación da motilidade foi descrita en moitas publicacións recentes (Inaba et al., 1998).

Todas as proteínas destacadas, ben activadas pola PKA e que, en determinados casos, poden regular a súa actividade, propóñense como candidatas a estudos adicionais para profundar no estudo do mecanismo molecular que subxace á motilidade espermática en *Mytilus*, o cal podería realizarse mediante a súa purificación ou determinado o seu comportamento *in vivo* de forma illada.

5. CONCLUSIÓNS

A realización deste traballou levou a extraer unha serie de conclusións:

1. A PKA, en concreto a isoforma C₄, fosforila *in vitro* e de forma específica proteínas en lisados de espermatozoides de *M. galloprovincialis*.
2. Identificáronse 100 proteínas fosforiladas nos lisados espermáticos que poden definirse como substratos da PKA.
3. As proteínas detectadas, fundamentalmente, desempeñan funcións estruturais no flaxelo, pero tamén están involucradas no metabolismo enerxético, en rutas de sinalización, ou na regulación da síntese e degradación doutras proteínas.
4. Como candidata para seguir profundando neste estudo, destacamos a cadea pesada da dineína, presente no axonema.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, S., Tolani, P., Gupta, S., & Yadav, A. K. (2021). Chapter Three - Posttranslational modifications in systems biology. In R. Donev & T. Karabancheva-Christova (Eds.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 127, pp. 93–126). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.03.005>
- Bardales, J. R., Hellman, U., & Villamarín, J. A. (2007). CK2-mediated phosphorylation of a type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.008>
- Bardales, J. R., Hellman, U., & Villamarín, J. A. (2008). Identification of multiple isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *FEBS Journal*, 275(18), 4479–4489. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06591.x>
- Baro Graf, C., Ritagliati, C., Stival, C., Luque, G. M., Gentile, I., Buffone, M. G., & Krapf, D. (2020). Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110992>
- Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villén, J., Li, J., Cohn, M. A., Cantley, L. C., & Gygi, S. P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12130–12135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404720101>
- Béjar, P., & Villamarín, J. A. (2006). Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from a catch muscle of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: Purification, characterization, and phosphorylation of muscle proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 450(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.024>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Caceres-Martinez, J., & Figueras Huerta, A. (2014). *Estudios sobre el ciclo gonadal*.
- Cao, J., Ramos-Martinez, J. I., & Villamarín, J. A. (1995a). Characterization of a cAMP-Binding Protein from the Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 232(2), 664–670. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.664zz.x>
- Cao, J., Ramos-Martinez, J. I., & Villamarín, J. A. (1995b). Characterization of a cAMP-Binding Protein from the Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 232(2), 664–670. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.664zz.x>
- Charles, M. (2019). *Etude des organismes pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (Mytilus sp.)*.

- Christen, R., Schackmann, R. W., & Shapiro, B. M. (1983). Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 258(9), 5392–5399. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81902-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81902-4)
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 596–601. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6)
- Díaz-Enrich, M. J., Ibarguren, I., Hellman, U., & Villamarín, J. A. (2003). Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00259-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00259-5)
- Douglass, J., Gunaratne, R., Bradford, D., Saeed, F., Hoffert, J. D., Steinbach, P. J., Knepper, M. A., & Pisitkun, T. (2012). Identifying protein kinase target preferences using mass spectrometry. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(7), C715–C727. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00166.2012>
- Eads, A., Kennington, W., & Evans, J. (2016). Interactive effects of ocean warming and acidification on sperm motility and fertilization in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 562, 101–111. <https://doi.org/10.3354/meps11944>
- Fischer, E. H. (2013). Cellular regulation by protein phosphorylation. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 430, Issue 2, pp. 865–867). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.024>
- Gazo, I., Dietrich, M. A., Prulière, G., Shaliutina-Kolešová, A., Shaliutina, O., Cosson, J., & Chenevert, J. (2017). Protein phosphorylation in spermatozoa motility of *Acipenser ruthenus* and *Cyprinus carpio*. *Reproduction*, 154(5), 653–673. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0662>
- Gibbs, C. S., & Zoller, M. J. (1991). Identification of electrostatic interactions that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 30(22), 5329–5334. <https://doi.org/10.1021/bi00236a001>
- Hao, Y., Frey, E., Yoon, C., Wong, H., Nestorovski, D., Holzman, L. B., Giger, R. J., DiAntonio, A., & Collins, C. (2016). An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK. *ELife*, 5, e14048. <https://doi.org/10.7554/eLife.14048>
- Harrison, R. A. P. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular Reproduction and Development*, 67(3), 337–352. <https://doi.org/10.1002/mrd.20028>
- Inaba, K., Morisawa, S., & Morisawa, M. (1998). Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *Journal of Cell Science*, 111(8), 1105–1115. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.8.1105>

- Kaneto, M., Krisfalusi, M., Eddy, E. M., O'Brien, D. A., & Miki, K. (2008). Bicarbonate-Induced phosphorylation of p270 protein in mouse sperm by cAMP-Dependent protein kinase. *Molecular Reproduction and Development*, 75(6), 1045–1053. <https://doi.org/10.1002/mrd.20839>
- Leclerc, P., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1996). Cyclic Adenosine 3',5'monophosphate-Dependent Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Relation to Human Sperm Capacitation and Motility1. *Biology of Reproduction*, 55(3), 684–692. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.3.684>
- Loza-Huerta, A., Vera-Estrella, R., Darszon, A., & Beltrán, C. (2013). Certain Strongylocentrotus purpuratus sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(11), 5305–5315. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.029>
- Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G., & Baldi, E. (2005). Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate1. *Biology of Reproduction*, 72(1), 22–32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032490>
- Luo, Y., Mok, T. S., Lin, X., Zhang, W., Cui, Y., Guo, J., Chen, X., Zhang, T., & Wang, T. (2017). SWATH-based proteomics identified carbonic anhydrase 2 as a potential diagnosis biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *Scientific Reports*, 7, 41191. <https://doi.org/10.1038/srep41191>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Meyer, J. G., & Schilling, B. (2017). Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(5), 419–429. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1322904>
- Morgan, D. J., Weisenhaus, M., Shum, S., Su, T., Zheng, R., Zhang, C., Shokat, K. M., Hille, B., Babcock, D. F., & McKnight, G. S. (2008). Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20740–20745. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810971105>
- Nolan, M. A., Babcock, D. F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K. A., & McKnight, G. S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit $\alpha 2$ orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13483–13488. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405580101>
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2004). Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Molecular Human Reproduction*, 10(5), 355–363. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah046>

- Ogawa, K., & Inaba, K. (2003). Sperm motility-activating complex formed by t-complex distorters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(4), 1155–1159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.137>
- Ortea, I., Ruiz-Sánchez, I., Cañete, R., Caballero-Villarraso, J., & Cañete, M. D. (2018). Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection. *Journal of Proteomics*, 175, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.003>
- Peteiro, L. G., Filgueira, R., Ayala, A. M., & Fernández-Reiriz, M. J. (2007). *Ciclo reproductivo de moluscos bivalvos*.
- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., & Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 4(6), 565–583. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1185>
- Ptacek, J., & Snyder, M. (2006). Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends in Genetics*, 22(10), 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.08.005>
- Rodríguez, J. L., Barcia, R., Ramos-Martínez, J. I., & Villamarín, J. A. (1998). Purification of a Novel Isoform of the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase from the Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 359(1), 57–62. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0879>
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., Hunter, C. L., Nuwaysir, L. M., & Schaeffer, D. A. (2007). The Paragon Algorithm, a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9), 1638–1655. <https://doi.org/10.1074/mcp.T600050-MCP200>
- Søberg, K., Jahnsen, T., Rognes, T., Skålhegg, B. S., & Laerdahl, J. K. (2013). Evolutionary Paths of the cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Catalytic Subunits. *PLOS ONE*, 8(4), e60935-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060935>
- Speer, K. F., Allen-Waller, L., Novikov, D. R., & Barott, K. L. (2021). Molecular mechanisms of sperm motility are conserved in an early-branching metazoan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(48), e2109993118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109993118>
- Stephens, R. E., & Prior, G. (1992). Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. *Journal of Cell Science*, 103(4), 999–1012. <https://doi.org/10.1242/jcs.103.4.999>
- Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>

- Sutherland, E. W., & Rall, T. W. (1960). THE RELATION OF ADENOSINE-3', 5'-PHOSPHATE AND PHOSPHORYLASE TO THE ACTIONS OF CATECHOLAMINES AND OTHER HORMONES. *Pharmacological Reviews*, 12(3), 265–299. [https://doi.org/10.1016/S0031-6997\(25\)06975-3](https://doi.org/10.1016/S0031-6997(25)06975-3)
- Tan, H. T., & Chung, M. C. M. (2018). Label-Free Quantitative Phosphoproteomics Reveals Regulation of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein upon Stathmin-1 Silencing in a Pair of Isogenic Colorectal Cancer Cell Lines. *PROTEOMICS*, 18(8), 1700242. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700242>
- Tang, W. H., Shilov, I. V., & Seymour, S. L. (2008). Nonlinear Fitting Method for Determining Local False Discovery Rates from Decoy Database Searches. *Journal of Proteome Research*, 7(9), 3661–3667. <https://doi.org/10.1021/pr070492f>
- Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., & Kornev, A. P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 646–658. <https://doi.org/10.1038/nrm3432>
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J. M., Keshwani, M. M., & Kornev, A. P. (2013). PKA: Lessons learned after twenty years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(7), 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.007>
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., & Krebs, E. G. (1968). An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), 3763–3765. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)34204-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)34204-8)
- Wong, W., & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 959–970. <https://doi.org/10.1038/nrm1527>
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371–372. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0967199400002240>
- Zhang, P., Knape, M. J., Ahuja, L. G., Keshwani, M. M., King, C. C., Sastri, M., Herberg, F. W., & Taylor, S. S. (2015). Single Turnover Autophosphorylation Cycle of the PKA RII β Holoenzyme. *PLOS Biology*, 13(7), e1002192-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002192>