

Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

# Furina, PCSK4 eta PCSK6 proprotein konbertasen adierazpenaren analisia Gopc -/- saguen barrabiletan

**Egilea:**

Aitziber Velado Egusquiza

**Zuzendariak:**

Edurne Alonso Arana

Laura Gomez Santos

## Aurkibidea

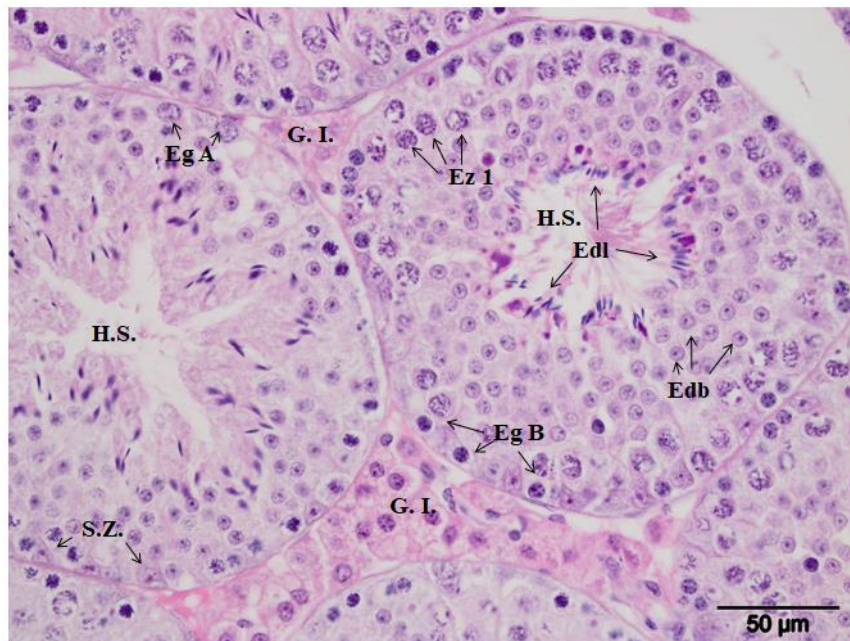
1.	Sarrera .....	1
1.1.	Espermatozoiden ekoizpen prozesua.....	2
1.1.1.	Zitoeskeletoaren egitura garrantzitsuak espermiogenesisian.....	2
1.1.2.	GOPC proteina.....	3
1.2.	Protein konbertasak.....	4
1.2.1.	PCSK3 edo Furina .....	5
1.2.2.	PCSK4.....	5
1.2.3.	PCSK6.....	6
2.	Helburuak.....	6
3.	Materialak eta metodoak.....	6
3.1.	Analisi molekularrerako teknikak (RT-qPCR).....	6
3.1.1.	cDNAREN eskurapena .....	6
3.1.2.	Multiplex preanplifikazioa.....	7
3.1.3.	qPCR .....	8
3.1.4.	Datuen tratamendu estatistikoa .....	8
3.2.	Teknika histologikoak .....	8
3.2.1.	Laginen tindaketa Hematoxilina-Eosinarekin.....	9
3.2.2.	Immunohistokimika .....	9
4.	Emaitzak.....	9
4.1.	Analisi molekularra .....	9
4.2.	Analisi histologikoa.....	10
4.2.1.	Antigorputzen kontzentrazioak .....	10
4.2.2.	Antigorputz sekundarioa .....	10
4.2.3.	<i>Antigen retrieval</i> .....	11
4.2.4.	Detergentea .....	11
4.2.5.	Loturen blokeoa .....	11
4.2.6.	Seinalearen errebelatua .....	11
5.	Eztabaida.....	12
6.	Bibliografia .....	14

# 1. Sarrera

Munduko Osasun Erakundeak (MOE) ernalezintasuna osasun arazo globala kontsideratzen du, ez soilik mundu mailako jaiotza-tasa murrizten ari delako, baizik eta seme-alabak izateko arazoak dituzten pertsonen osasun mentalean daukan eraginagatik ere <sup>1</sup>. 2015. urtean egindako ikerketa baten arabera, mundu mailan 30 milioi gizon ernalezin daude, eta nahiz eta zaila izan bikote bakoitzaren ernalezintasunaren faktore eragilea identifikatzea, mundu mailan gutxi gora behera kasu erdiak gizonak eragindakoak dira <sup>2</sup>.

Gizonezkoen ernalezintasuna eragiten duten hainbat faktore daude, inguruneak zein genetikoak izan daitezkeenak. Orain arte, eragile genetikoaren transmisioa hautespen naturalak eragozten zuen, baina laguntzaren bidezko ugalketari esker, gero eta ugariagoak dira. Eragile mota horien artean delezioak, translokazioak, aneuploidiak eta mutazio autosomikoak daude, adibidez, eta horien ondorioz esperman arazo desberdinak sor daitezke: kopuru ezegokia (azoospermia edo oligozoospermia) edo morfologia ezegokia (teratozoospermia) <sup>3</sup>.

Teratozoospermiaren adibide bat globozoospermia da: akrosomarik gabeko espermatozoide borobilen ekoizpena, hain zuzen <sup>4</sup>. Horren tratamendua garatzeko garrantzitsua izango da lehenik eta behin fenotipo globozoospermikoaren analisia egitea, ondoren konponbidea aurkitu ahal izateko. Gainera, ernalezintasuna eragiten duten egoeren analisiaren bidez, horiek konpontzeko tratamenduak garatzeaz gain antisorgailu berrien garapena ere egin daiteke.



**1.irudia. C57 BL/6 sagu baten barrabilaren mozketaren histologikoa Hematoxilina-Eosina tindaketarekin.** Bertan hodixka seminiferoak ikus daitezke (H.S.) eta haien arteko gune interstizialak (G.I.), non Leydig zelulak dauden. Hodixka seminiferoen barruan leinu espermatojenikoko zelula-mota desberdinak ikus daitezke: A Espermatogoniak (Eg A), B Espermatogoniak (Eg B), espermatozito primarioak (Ez 1), espermatozido borobilak (Edb) eta espermatozido luzeak (Edl). Hodixka seminiferoen oinaldean Sertoli zelulen (S.Z.) nukleoak ere ikus daitezke.

## 1.1. Espermatozoideen ekoizpen prozesua

Espermatogenesisia hodixka seminiferoen epitelioan ematen da bertako Sertoli zelula somatikoaren sostengu fisiko eta metabolikoari esker. Gune interstizialeko Leydig zelulek ekoizten duten testosteronari esker, espermatogonia deituriko zelula amak bikoiztu egingo dira espermatogonia A eta espermatogonia B bana sortzeko. A motako zelulak mitosiaren bidez banatzen jarraituko dira haien populazioa mantentzeko eta B motako zelulak espermatozito primario bihurtuko dira meiosian sartzeko. Meiosi horren lehenengo zatiketaren ondorioz bi espermatozito sekundario sortuko dira eta bigarren zatiketa amaitzerakoan zitoplasma erabat ez bananduta duten lau espermátida borobil lortuko dira (1. irudia).

Meiositik lortutako zelula haploide horiek espermiogenesi deituriko desberdintzapen prozesua pairatuko dute. Berrantolaketa estruktural bat da, non akrosomaren sorrera, nukleoaren konpaktazioa, zelularen luzapena, flageloaren biogenesisia, mitokondrien berrantolaketa eta zitoplasma gehienaren ezabaketa ematen den.

Sertoli zelulez gain, sostengu hormonal ematen duten bestelako zelula somatikoak daude gune interstizialean, hain zuzen ere, Leydig zelulak. Horien funtzio nagusia testosterona ekoiztea da, espermatozoideen ekoizpenerako ezinbestekoa dena. Aipatutako zelula-mota guztiak identifikatzea oso erreza da hodixka seminiferoen zeharkako ebakidura batean 1. irudian ikus daitekeen moduan.

### 1.1.1. Zitoeskeletoaren egitura garrantzitsuak espermiogenesisian

Aipatu den moduan, espermiogenesisian zehar berrantolaketa estruktural nabaria ematen da eta, horretarako, zitoeskeletoaren parte-hartzea ezinbestekoa da. Izan ere, akrosomaren eraketarako Golgi aparatuko besikulak garraiatu egiten dira mikrotubuluetan zehar eta, akrosoma sortzen den bitartean, akroplaxoma deituriko egituraren bidez nukleora ainguratzen dira. Gainera, espermiogenesisian zeharreko aurretik-atzerako garraioa *manchette* deituriko egitura baten bidez ematen da, nukleora ainguratzen dena horren luzapen prozesua eragiteko. Azkenik, flageloaren axonema ere zitoeskeletoaren parte da. Nahiz eta beste batzuk egon, zitoeskeletoak prozesu horretan zehar sortzen dituen egituren artean bi azaldu beharra dago: akroplaxoma eta *manchette*-a<sup>5</sup>.

Akroplaxoma nukleoa eta akrosomaren artean sortzen den egitura da, plaka baten modukoa. Akrosomaren azpiko eremua ere deitu daiteke, eta bi egitura desberdinetan banatuta dago: akroplaxomaren plaka eta eraztun marginala. Bere funtzio nagusia nukleoa eta akrosoma elkarri lotuta mantentzea da espermátidaren elongazioan zehar, eta keratina 5, F-aktina eta profilina IV proteina estrukturalen filamentuz osatuta dago<sup>5</sup>.

*Manchette*-ren egiturari dagokionez, akrosomaren biosintesia hasi eta gero sortzen da, eta espermatozoidearen burua luzatzeko ezinbestekoa da. Akrosoma kokatuta dagoen nukleoaren alde berean dago *manchette*-ren eraztun perinuklearra, eta bertatik bestelako piruak atera egiten dira, zentrosomaren

alderantz. Egitura horien bidez, nukleoaren luzapena eta besikulen aurretik-atzerako garraioa ahalbidetzen dira. Aipatutako egitura mikrotubuluz eta aktinazko piruz osatzen da <sup>5</sup>.

Azaldutako bi egiturak (akroplaxoma eta *Manchette*-a) espermatidaren bururaren elongazioaz arduratzen dira, aldi berean elementu desberdinen lotura mantenduz. Elkarlan hori akastuna bada, espermatiden elongazioa ez da ondo emango eta globozoospermia azalduko da <sup>5</sup>.

Zitoeskeletoaren egitura guzti horiek eratzeko hainbat proteinen arteko elkarlana ezinbestekoa da, haien *knockout*-ak eginez gero teratozoospermiak sortzen direlako. Horien adibide batzuk FU, LRGUK1, Hrb, HOOK1 eta GOPC dira. Bereziki *Manchette*-a ondo eratzten ez denean, globozoospermia emango da, espermatidaren burua ez delako luzatuko <sup>6</sup>.

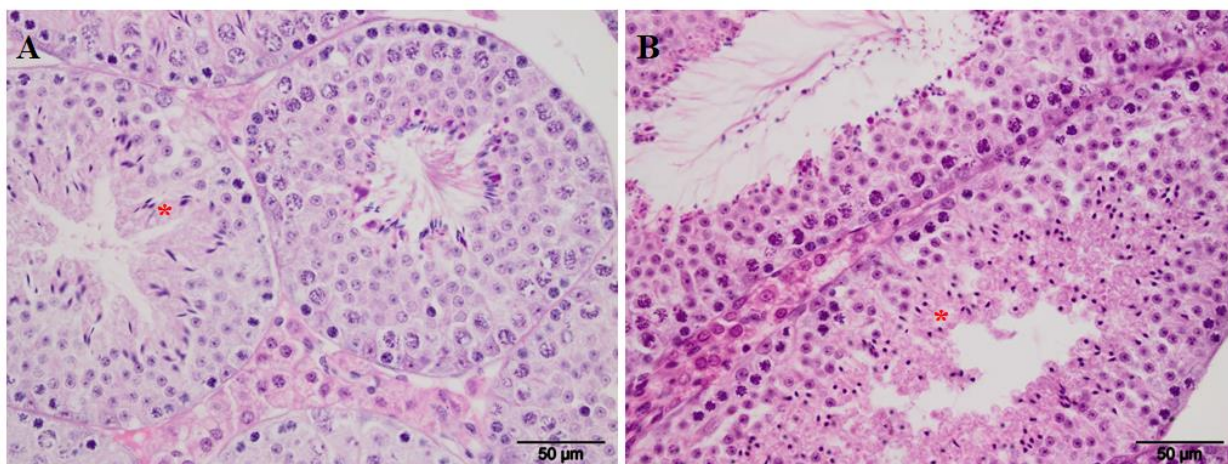
### 1.1.2.GOPC proteina

GOPC (*Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein*) hainbat ehunetako zelulen trans-Golgi sarean (TGS) aurki daitekeen proteina da. Bere izenak adierazten duen moduan, *coiled-coil* eta PDZ motiboak ditu bere baitan, eta horiei esker beste hainbat proteinekin elkarri eragiteko gaitasuna du. Elkarrekintza horien ondorioz, hainbat zeharkako funtzio izango ditu, haien artean besikulen garraioaz eta fusioaz arduratzea eta zitoeskeletoaren berrantolaketan parte-hartzea. Golgi aparatutik mintzerako besikulen garraioan parte hartzen du, bertan egongo diren proteinak erregulatuz eta ondorioz zelularen egoera orokorrean eragin handia du <sup>5</sup>.

Espermatogenesiari dagokiola, bere adierazpena nabaritu egiten da espermatozitoetan eta espermatida borobiletan zelulen trans-Golgi zonaldean. Espermatida luzeetan, aldiz, nahiz eta espresioa mantendu, zitosolean banatuagoa dago. Izan ere, espermatozoideen garapenaren momentu horretan akrosomaren osaeran parte hartzen du batez ere GOPC. Besikula proakrosomikoak garraiatu egiten ditu Golgi aparatutik alde perinuklearrera, bertan elkarren artean fusionatzeko eta honen ondorioz akrosoma eratzeko <sup>5</sup>.

Proteina baten funtzioak ondo ulertzeko horren falta duen organismo bati erreparatzea interesgarria izaten da, eta GOPC proteinaren *knockout* diren saguak globozoospermikoak dira, hau da, buru borobildun espermatozoideak ekoizten dituzte. Globozoospermiaren ezaugarri fenotipikoen artean ondokoak daude: nukleo borobilak, zitoeskeleto desantolatua, flageloaren morfologia espirala eta akrosoma falta <sup>5</sup>.

*Gopc* *-/-* saguen espermatogenesisian ikus daitekeen lehenengo akatsa espermatida borobiletan ematen da, ez delako besikula proakrosomikoa sortzen, baizik eta akroplaxomari loturik ez dauden hainbat besikula txiki bakunak (pseudoakrosoma deritzona). Dena den, nahiz eta espermatida fasera arte ez aurkeztu akats morfologikorik, Sertoli zelulen eta espermatiden arteko loturak ez dira ondo osatzen. *Knockout* saguek sortzen dituzten espermatozoideak, beraz, forma globularrekoak dira eta flageloa nukleoaren inguruan tolestuta daukate (2. irudia) <sup>5</sup>.



**2.irudia.** Mikroskopia optikoaren bidez lortutako C57 BL/6 saguen barrabilen irudiak egoera basatian (**A**) eta *Gopc* genearen *knockout* baten ondorioz (**B**) Hematoxilina-Eosina tindaketarekin. Desberdintasuna espermatida luzeetan ikus daiteke (\*), A irudian nukleo luzatuarekin agertzen direlako eta B irudian, globozoospermia dela-eta, forma borobilarekin.

## 1.2. Proprotein konbertasak

Proteina asko sintetizatu bezain laster funtzionalak izango balira, zelulari kalte bat suposatuko liokete haien eginkizunak direla eta. Hori ekiditeko, proteina askok eraldaketa post-transdukzional deiturikoak pairatzen dituzte jariatze bidezidorrean, erregulazio sistema gisa jarduten dutenak. Aldaketa horiek proteina aitzindariari mozketak edota adizioak izan daitezke, eta mota bakoitzerako entzimak daude dagozkien konpartimenduetan. Horietako batzuk proprotein konbertasa (PC) familiakoak dira, bakterioen subtilisinaren antzeko proteinen antza duten serina proteinasak. Proprotein konbertasak tratamendu proteolitikoaz arduratu egiten dira, produktuen funtzioa erregulatuz <sup>7</sup>.

Orain arte, PC familiako 9 proteasa identifikatu dira: PC1/3, PC2, Furina, PC4, PC5, PACE4, PC7, SKI eta NARC-1. Gaur egun, horiek izendatzeko PCSK (*Proprotein convertase subtilisin/kexin*) nomenklatura erabiltzen da, hau da, PCSK1, PCSK2, PCSK3, PCSK4, PCSK5, PCSK6, PCSK7, PCSK8 eta PCSK9 deitzen dira hurrenez hurren. Bertatik, lehenengo 7-ak legamietako kexina proteasaren antza dute, PCSK8 pirolisinaren antza du eta PCSK9 K proteinasarena. Bakoitzak bere funtzio propioa dauka, eta hori betetzeko zelularen eta organismoaren eremu desberdinetan adierazi egiten da <sup>7</sup>.

Proprotein konbertasak garrantzi biologiko handiko molekulen prozesamenduan parte hartzen dute, hala nola, hormona peptidikoak, proteina birikoak eta mintzeko hartzaileak <sup>8</sup>. Hori dela-eta, hainbat egoera patologikoekin erlazionatu egin dira, eta farmako berrien diseinurako iturri interesgarriak izan daitezke. Gainera, molekula askoren funtzioa erregulatzen dutenez aktibatuz zein inaktibatuz, zelularen bidezidorretan desoreka egoerak ematen direnean haien ekoizpena desregulatu daiteke. Izan ere, PCSK familiako hainbat proteina erlazionatu egin dira patologia edo egoera fisiologiko desberdinekin, adibidez, minbizia, obesitatea, ernalezintasuna eta gaixotasun koronarioak <sup>9 10</sup>.

Beraz, proprotein konbertasa familiako proteinak egoera fisiologikoen aurre izan ditzaketen erantzunak direla eta, ugaltze-aparatuan aurkitu egin diren ondorengo 3 proprotein konbertasen espresioa aztertzea interesgarria izan daiteke: PCSK3 edo furina, PCSK4 eta PCSK6. Horrela, *Gopc* *-/-* egoera basatiarekin konparatu eta proteina horren faltak dituen eraginak aztertzea posible izango da.

### 1.2.1. PCSK3 edo Furina

Furina proprotein konbertasen familiatik identifikatu egin zen lehenengo proteina izan zen, legamien kexina entzimarekin zuen homologia zela-eta <sup>7</sup>. Konbertasa hori kaltzioren menpeko funtzioa du eta proprotein konbertasarik ugariena da. Izan ere, ornodun guztien eta ornogabe askoren ehun guztietan espresatu egiten da <sup>11</sup>. Beste konbertasen moduan, bestelako proteinen prozesamenduan aritzen da horiek aktibatzeke zein inhibitzeke. Bere jarduera hain garrantzitsua da *furin* *-/-* saguak enbrioi moduan hiltzen direla <sup>12</sup>.

I motako mintzeko furinak TGS-an, endosometan edota zelularen kanpo mintzean prozesatu ditzake bere ituak, betiere beharrezko adostasun sekuentzia badaukate <sup>13</sup>. Furinaren ituak konstitutiboki jariatzen diren molekula asko dira, adibidez, hazkuntza faktoreak, haien hartzaileak, mintzeko glikoproteinak, odolaren koagulazio-faktoreak eta hormona polipeptidikoak <sup>7</sup>.

Behin ekoiztu denean, Furina garraiatu egiten da TGS-aren bidez zelularen kanpo mintzera, eta bertatik endosomen bidez barneratu egiten da berriz. Dena den, nahiz eta hainbeste molekulen prozesamenduan parte hartu, bere prozesamendu propioa ere badu, funtzionalki aktiboa izateko jasan behar duena.

### 1.2.2.PCSK4

PCSK4 edo PC4 ugaltze-aparatuko espezifikoa den proprotein konbertasa da, emeetan obulutegietan dauden makrofagoen antzeko zeluletan eta arretan espermatidetan bereziki espresatzen dena, alegia <sup>14 15</sup>. Espermiogenezian espermatidak hainbat aldaketa pairatzen ditu, eta bestelako egoeretan espresatzen ez diren proteina asko ekoizten dira, prozesamendua beharko dutenak. Horiek izango dira, ziur aski, PCSK4-ren ituak (adibidez, PACAP, ADAM familiako zenbait proteina eta zenbait hazkuntza faktore) <sup>7</sup>.

PCSK4 entzimaren aktibitatea besikula akrosomikoetan hasi eta akrosomaren gaineko mintz zelularrari lotuta ematen da gehienbat. Izan ere, nahiz eta akrosomaren barnean egon garapenaren zenbait momentutan, bertan ez du aktibitaterik. Bere kokapena dela-eta, uste da espermatozoideen kapazitazioa eta obuluarekin elkarrekintza ahalbidetzen duten proteinen prozesamenduan parte hartzen duela<sup>16</sup>.

Izan ere, *Pcsk 4* *-/-* saguen espermatozoideek kapazitazio goiztiarra jasateko probabilitate altua daukate, mintzeko hartzaileen hipersentikortasuna eragiten duena. Hartzaile hipersentikor horiek erreakzio akrosomikoa ere behar baino lehenago gertatzea eragingo dute eta, beraz, PCSK4-rik gabeko espermatozoideak ez dira obulua ernaltzeko gai izango <sup>17 16</sup>.

### 1.2.3.PCSK6

Neuropeptido ugariko ehunetan espresatu ohi da PCSK6 edo PACE 4. Gainera, erregulazio bereziko proprotein konbertasa da, zelulen kanpo mintzeko Heparan-Sulfato proteoglikanoekin (HSPG) kontaktuan dagoenean baino ez duelako aktibitaterik <sup>7</sup>. Horren ondorioz, bere substratuak mintzera loturiko eta matrize estrazelularreko proteinak dira, eta PCSK6-ren erregulazioa mintz zelularreko konposaketaren araberakoa izango da <sup>18</sup>.

Nahiz eta gizakietan detektatu izan, orain arte ez da PCSK6-ren espresioa aztertu saguen barrabiletan, baina bai prostatan eta obulutegietan. Izan ere, bere kokapen fisikoa dela eta, tumoregenesian parte hartzen duten matrize estrazelularreko zenbait molekula prozesatu egiten ditu, haien artean, metaloproteasak <sup>19</sup>. Eragin hori kontuan izanda, prostatako, obulutegiko eta bularreko minbizian metastasiaren arriskuaren markatzaile gisa identifikatu egin da, proprotein konbertasen eragina berretsiz egoera patologikoetan <sup>20</sup>.

## 2. Helburuak

Lan honen helburu orokorra *Gopc* genearen *knockout*-ak furina, PCSK4 eta PCSK6 proprotein konbertasen adierazpenean daukan eragina aztertzea da. Helburu nagusi hori betetzeko hurrengo helburu espezifikokoak aztertuko ditugu:

- Proprotein konbertasen adierazpena kuantitatiboki aztertzea C57 BL/6 *wild type* eta *Gopc* *-/-* saguen barrabiletan eta bi egoerak konparatzea.
- Proprotein konbertasen *in situ* kokapena aztertzea *Gopc* *-/-* eta *wild type* saguen barrabilen ebaki histologikoetan eta bi egoerak konparatzea.

## 3. Materialak eta metodoak

### 3.1. Analisi molekularrerako teknikak (RT-qPCR)

Furina, PCSK4 eta PCSK6 proteinen geneen adierazpena neurtzeko mRNA-ren kuantifikazioa burutu zen. Horretarako, lehenik eta behin mRNA parafinazko blokeetatik eskuratu zen eta alderantzizko transkripzioaren bidez cDNA bihurtu zen. Ondoren, multiplex preanplifikazioa egin eta qPCR-a burutu zen. RPL13 eta RPS15 *housekeeping* gene mitokondrialak erabili ziren kontrol positibo gisa eta hasleak kontaminatutak ez zeudela ziurtatzeko kontrol negatiboak ere egin ziren cDNA ordez ura erabiliz.

#### 3.1.1.cDNAren eskurapena

Esperimentu honen abiapuntuak parafinazko blokeetatik lortutako RNA-ren disoluzioak izan ziren (C57 BL/6 sagu *wild type* eta *Gopc* *-/-*) eta, beraz, gure interesekoa zen cDNA lortzeko alderantzizko transkripzioa



burutu zen. Hori egiteko *iScript™ cDNA Synthesis* Kit komertziala erabili zen (Bio-Rad), etanolarekin eta RNaseZAP-rekin (Sigma) tratatutako ingurunean.

RNA mota bakoitzeko 1 µg nahastu egin zen kit komertzialeko *5x iScript reaction mix*-eko 4 µl-rekin eta 1µl alderantzizko transkriptasarekin eta nukleasarik gabeko urarekin 20 µl-tara eramanez nahasketa. Behin laginak prestatu zirenean, *C1000™ Thermal cycler* (Bio-Rad) termozikladorean 1. taulan adierazitako protokoloa bete zen.

Pausua	Denbora (minutu)	Temperatura (°C)
<b>Hasiera</b>	5	25
<b>Alderantzizko transkripzioa</b>	20	46
<b>Alderantzizko transkriptasaren inaktibazioa</b>	1	95
<b>Amaiera</b>	∞	4

**1.taula.** Blokeetatik lortutako mRNA laginaren alderantzizko transkripzioa egiteko jarraitu zen protokoloa.

### 3.1.2. Multiplex preanplifikazioa

Normalean ehunetatik lortutako RNA nahiko kalitate txarrekoa izaten da, eta are gehiago ehun hori parafina bloke baten barruan egon bada. Beraz, lortutako cDNA kalitate onekoa zela ziurtatzeko, qPCRa egin baino lehen Multiplex preanplifikazioa burutu zen *Platinum® Multiplex PCR Master Mix 2x* (Life Technologies) erreakzio kit-a erabiliz.

Lehenik eta behin, anplifikatu beharreko geneen hasleen nahasketa prestatu zen (Furina, PCSK4, PCSK6, RPL13 eta RPS15), *forward* eta *reverse* hasle bakoitza 0,625 µM-tako kontzentrazioan utziz. Multiplex preanplifikazioa egiteko erabili zen nahasketa 25 µl *Platinum® Multiplex PCR Master Mix 2x* (Life Technologies), 5 µl hasleen nahasketa, 2 µl cDNA (100 ng) eta 18 µl DEPC tratatutako uraz osatuta zegoen. Behin hori prestatu zenean, 2. taulako protokoloa jarraitu zen *C1000™ Thermal cycler* (Bio-Rad) termozikladorean.

Pausua	Denbora (minutu)	Temperatura (°C)
<b>Hasiera</b>	2	95
<b>Anplifikaziorako 14 zikloak</b>	0,5	95
	1,5	60
	0,5	72
<b>Geldiketa</b>	10	72
<b>Amaiera</b>	∞	4

**2.taula.** cDNA-ren preanplifikazioa egiteko termozikladorean jarraitu zen protokoloa

### 3.1.3.qPCR

qPCRa egiteko 96 putzutako plaka bat erabili zen, non cDNA mota desberdinetan (*Wild type eta Gopc-/-*) gene bakoitzaren amplifikazio kuantitatiboa egin zen. 2 cDNA motaz gain, hasleen kontrol negatiboak ere egin ziren cDNA gabe, kontaminatuak ez zeudela ziurtatzeko. Preamplifikaziotik lortutako soluzioa 50 ng/ $\mu$ l-tako kontzentrazioa zuela onartu zen, eta qPCR-a egiteko 30 ng baino ez zirenez behar, 1:8 diluzioak egin ziren.

Putzu bakoitzean 10 $\mu$ l-tako bolumen totala gehitu zen ondoko osagaiekin: 4,5  $\mu$ l *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied biosystems), 0,5  $\mu$ l hasle nahastea (dagokion genearen *forward + reverse* 6,25  $\mu$ M-etan), 0,2  $\mu$ l DEPC-rekin trataturiko ura eta 4,8  $\mu$ l dagokion cDNA .

Behin neurketa bakoitzeko hiruna putzu bete zirenean, plaka plastikozko film garden batekin estali zen, putzu bakoitza ondo banatuz, zentrifugatu zen segundo batzuk (1500 rpm-tara heltzeko moduan) eta *CFX96™ Real-Time System* (Bio-Rad) termozikladorea erabiliz 3. taulako protokoloa jarraitu zen.

Pausua	Denbora (minutu)	Temperatura (°C)
Hasiera	10	95
Amplifikaziorako 40 ziklo	0,25	95
	1	60

**3.taula.** qPCR-a egiteko termozikladorean jarraitu zen protokoloa.

### 3.1.4.Datuen tratamendu estatistikoa

qPCR analisiaren bidez Ct balioak lortu ziren, amplifikatutako gene zehatz batek detektatu ahal izateko atalasea gainditzeko behar duen amplifikazio-ziklo zenbakiari egiten diona erreferentzia. Geneen adierazpenaren analisi konparatiboa egiteko Livak metodoa erabili zen<sup>21</sup>.

Behin datuak izanda, lagin bakoitzeko kontrol endogenoarekiko normalizatu ( $\Delta Ct = Ct_{\text{aztertutako genea}} - Ct_{\text{housekeeping}}$ ) eta haien artean konparatu ziren ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intereseko datuak}} - \Delta Ct_{\text{kalibrazio-datuak}}$ ).  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  formularen bidez adierazpenaren aldaketak lortu eta konparatu ziren. Datuen desbiderapen estandarra kalkulatu zen eta emaitzen adierazgarritasun estatistikoa baieztatu zen T-Student probaren bidez,  $p < 0,05$  muga ezarriz.

## 3.2. Teknika histologikoak

Parafinazko blokeetan inkluitutako laginen 4  $\mu$ m-ko mozketak egin ziren *Shandon™ Finesse™ 325* mikrotomoa (Thermo Scientific) erabiliz. Ebaketak *Poly-L-lysine Solution* 0,1% (*p/v*) in *H2O* (Sigma-Aldrich) %10 tratatutako portaobjuetan jarri eta 37C-tan sikatu ziren.

### 3.2.1.Laginen tindaketa Hematoxilina-Eosinarekin

Ehunetatik lortutako mozketak berez ez daukate kolorerik, eta elementu desberdinak ikusi ahal izateko tindatu behar dira. Ebaketak desparafinatu eta hidratatu ostean, hematoxilina eta eosinarekin tindatu ziren haien azterketa histologikorako, eta behin berriro deshidratatu zirenean, *DPX mountant for histology* (Sigma) erabiliz estalkiak jarri ziren. Metodologia hori jarraituz, 1. eta 2. irudiak lortu ziren.

### 3.2.2.Immunohistokimika

Aztertutako proteinen espresioa *in situ* behatzeko analisi immunohistokimikoak egin ziren Anti-PCSK6 antigorputz primarioa eta hori ezagutuko zuen antigorputz sekundarioa erabiliz, peroxidaren erreakzioaren bidez detektatuko zen seinalea amplifikatzeko. Erabilitako laginak sagu *wild type*-n eta *Gopc*-/-en barrabiletako mozketak izan ziren, eta PCSK6-ren adierazpenaren kontrol positibo gisa gibelaren mozketak erabili ziren.

Desparafinatu eta hidratatu egin ziren laginak eta %1-era diluitutako *10% Heat mediated antigen retrieval solution pH 6,0*-n (abcam) inkubatu ziren 98°C-tan. Horrela, mozketen antigenoak eskuragarri jarri ziren eta, ondoren, seinale inespezifikoa ekiditeko peroxidasa endogenoa blokeatu egin zen PBS-n %3-ra diluitutako H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-n inkubatuz 30 minututan zehar. Mozketak permeabilizatzeko asmoz, PBS-n diluitutako detergentean inkubatu ziren eta antigorputzen lotura inespezifikoa blokeatu egin ziren laginak blokeo soluzioan ordu batez inkubatuz.

Laginak antigorputz primarioarekin inkubatu egin ziren 4°C-tan gau osoa. Ondoren, antigorputz sekundarioarekin 2 ordutan zehar inkubatu ziren inguruko tenperatura. Seinale positiboak ikusi ahal izateko, *Kit Solution DAB* (Invitrogen, Thermo Scientific) erabili zen etxearen espezifikazioak jarraituz eta hematoxilinarekin kontrastatu ziren laginak. Amaitzeko, deshidratatu eta estalki batez estali ziren *DPX mountant for histology* (Sigma) erabiliz.

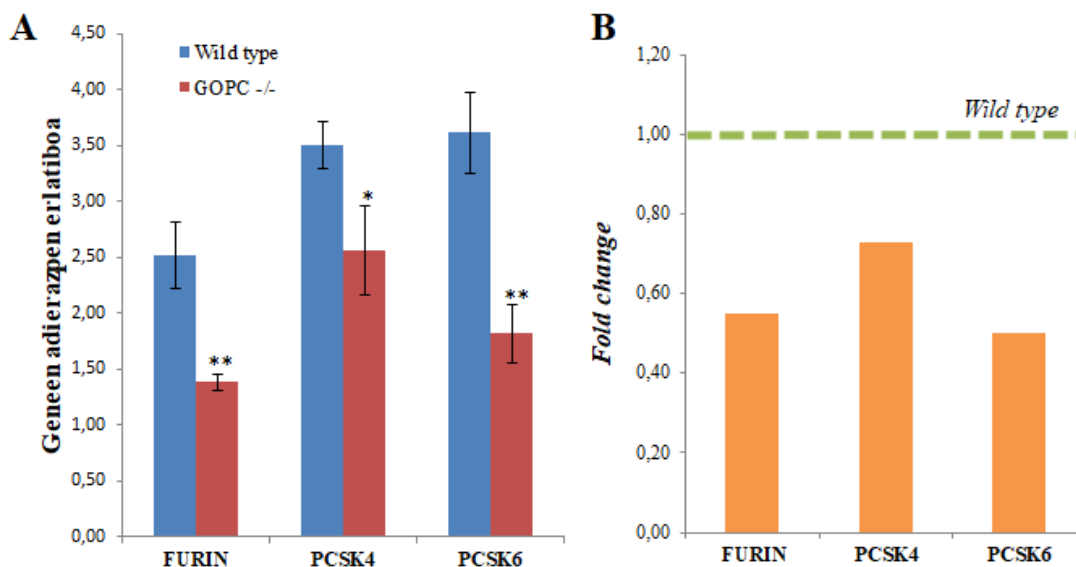
## 4. Emaitzak

### 4.1. Analisi molekularra

RT-qPCR-aren bidez, furina, PCSK4 eta PCSK6 sagu *wild type* zein *Gopc* -/-en barrabiletan adierazten direla baieztatu zen. Gainera, analisia kuantitatiboa zenez, bi egoeren arteko konparazioa eginez ikusi zen 3 geneen adierazpena jaitsi egiten zela *knockout* egoeran (1. grafikoa). T-student proba eginda, PCSK6 eta furinaren adierazpenaren aldaketak PCSK4-rena baino estatistikoki adierazgarriagoak zirela ikusi zen.

Konbertasen arteko adierazpen erlatiboari dagokionez, *Wild type* egoeran PCSK6 proteina da gehien adierazten dena, horren ostean PCSK4 eta azkenik furina. *Gopc* -/- egoeran, nahiz eta hiru konbertasen

adierazpena jaitzi, PCSK6 aldaketa bortitzagoa jasango du eta, beraz, *Pcsk4* genea izango da gehien transkribatzen dena eta *Pcsk3* (Furina) gutxien transkribatzen dena.



**1.grafikoa.** (A) Proprotein konbertasen adierazpenaren analisi erlatiboa. Marren bidez desbiderapen estandarra adierazi zen eta izartxoek bidez T-Student proban lortutako adierazgarritasunari buruzko emaitza (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) (B) *Gopc* -/- egoeran konbertasen adierazpenaren aldaketa (*fold change*) *Wild type* egoerarekiko (marra berdea).

## 4.2. Analisi histologikoa

Lan honen entregatze-datarako ez ziren lortu emaitza erabilgarririk immunohistokimika teknikaren bidez. Dena den, prozeduratik emaitza onak lortzeko asmoz, protokoloan hainbat parametro aldatuz joan ziren.

### 4.2.1. Antigorputzen kontzentrazioak

Lehenik eta behin, Anti-PCSK6 antigorputz primarioaren (4. taula) 3 kontzentrazio desberdinekin egin zen prozedura fabrikatzaileak zehaztutako tartea jarraituz: 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$  eta 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Zenbait saiakera egin ostean, eta seinalerik lortzen ez zenez, kontzentrazio altuago batean lan egin zen: 1,66  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4.2.2. Antigorputz sekundarioa

Hasiera batean zuzenean HRP-rekin markatuta zegoen *anti-rabbit* antigorputz sekundarioa erabili zen kontzentrazio desberdinetan. Emaitzak lortzen ez zirenez, biotinilatua zegoen beste antigorputz bat erabili zen, 9  $\mu\text{g/ml}$ -tako kontzentrazioan. Azken antigorputz hori beste analisi immunohistokimikoetan erabili zen laborategian, eta beraz, balidatuta zegoen. Erabilitako antigorputzak 4. taulan erreferentziatuta daude.

Antigorputzak	Etxea	Erreferentzia
<i>Anti-PCSK6 antibody produced in rabbit</i>	Sigma-Aldrich	HPA004774
<i>Anti rabbit IgG-biot</i>	Sigma	B8895
<i>Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-rabbit IgG (Fab')<sub>2</sub> (HRP)</i>	abcam	ab102279

**4.taula.** Immunohistokimikarako erabilitako antigorputzak

#### 4.2.3. Antigen retrieval

%1-era diluitutako 10% Heat mediated antigen retrieval solution pH 6,0-n (abcam) inkubazio denbora luzatu zen 98°C-tan, ehunean eta immunohistokimikaren emaitzetan izango zuen eragina ikusteko. Ehuna ez zen kaltetu eta laginaren zenbait eremutan tindaketa oso arina ikusi zen. Ez zen erabilgarria izan.

#### 4.2.4. Detergentea

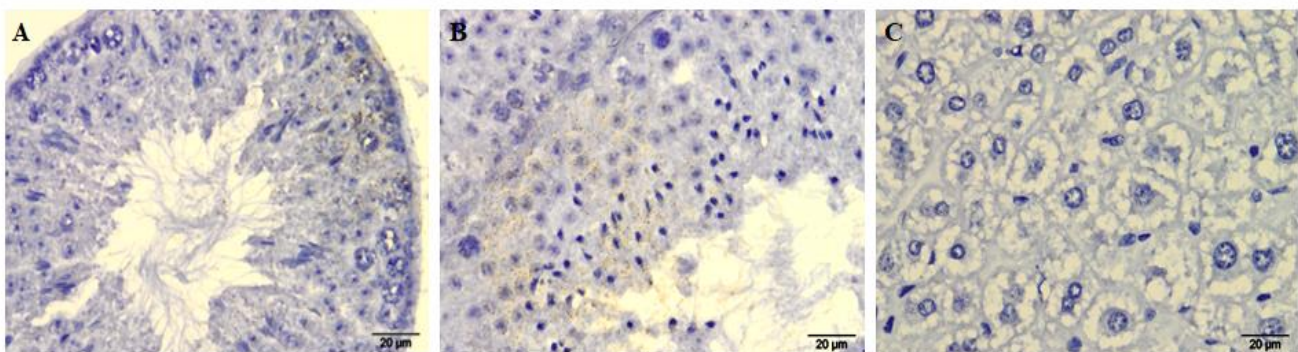
Tween 20 eta Triton X-100 detergenteen eragina konparatu zen eta emaitza antzekoak lortu ziren. Gauza bera gertatu zen ehunaren permeabilizazio pausuan detergentearen kontzentrazioa igo zenean, PBTx0,1%-etik PBTx0,2%-ra Tween 20-ren kasuan eta PBTx1%-era Triton X-100-ren kasuan.

#### 4.2.5. Loturen blokeoa

Ez zenez detektatzen antigorputzen loturarik, blokeo soluziotik BSA kendu egin zen saiakera batean, antigorputzaren lotura ehunera errazten bazen ikusteko, baina ez zen emaitza faboragarririk lortu.

#### 4.2.6. Seinalearen errebelatua

Laginak DAB-rekin inkubazio denbora aldatuz joan zen seinale gehiago lortzeko nahian. Hasiera batean minutu bakarra uzten zen, ondoren 2 eta amaieran 5. Emaitza hoberenak lortu ziren 5 minututako inkubazioarekin, baina inoiz ez ziren erabilgarriak izan.



**3. irudia.** Egindako analisi immunohistokimikoetatik lortutako emaitzen irudiak barrabil *wild type* (A) eta *knockout*-etan (B) eta gibelean (C). Gibela kontrol positibo gisa erabili ziren.

Beraz, nahiz eta azaldutako aldaketa guztiak egin protokoloan, ez ziren emaitza erabilgarririk lortu analisi immunohistokimikoaren bidez. *Wild type* eta *Gopc* *-/-* laginetan tindaketa arina baino ez zen lortu eta kontrol positiboan ez zen seinalerik detektatu (3. irudia).

## 5. Eztabaida

Organismo baten zelulen barruan milioika proteina daude, elkarren artean erlazionatuta daudenak haien funtzio eta kokapenaren bidez. Horietatik bakar bat kentzerakoan erlazio orekatua apurtu eta ezusteko hainbat ondorio egon daitezke. *Gopc* genearen *knockout*-a egiterakoan eta ondorioz izen berdina duen proteina ezabatuz, globozoospermia deituriko malformazioa eragiteaz gain bestelako proteinetan ondorioak ere eragiten direla ikusi dugu, M. Bizkarguenaga et al-ek 2019-an argitaratutako lanean GCNF proteina nuklearrarekin ikusi zen moduan<sup>5 22</sup>.

qPCR teknikaren bidez bi lagin desberdinen datuak konparatu nahi zirenez, bakoitzetik lortutako emaitzak bateratu ahal izateko *housekeeping* geneen barne-kontrolak ezinbestekoak dira. Horiek zelula guztietan berdin adierazten diren geneak izan behar dira (*housekeeping*), eta normalean zitoeskeletoko elementuak erabiltzen dira, tubulinaren modukoak, baina azaldu dugun moduan, *Gopc* *-/-* egoeran zitoeskeletoaren antolaketa arazoak daude eta, horregatik, RPL13 eta RPS15 gene mitokondrialak erabiltzea erabaki zen. Behin emaitzak izanda, RPL13 erabili zen kalkuluak egiteko bi laginen artean adierazpen uniformeena zeukana zelako.

Beraz, RPL13 gene mitokondrialaren adierazpena erreferentzia gisa erabiliz, ikusi da aztertutako 3 konbertasen adierazpena jaisten dela GOPC gabeko saguen barrabiletan, bereziki Furina eta PCSK6-rena. Aldaketa hori azaltzeko GCNF faktore nuklearraren kasua aipa daiteke *Gopc* *-/-* egoeran. 2019. urtean argitaratutako lan batean behatu zen *Gcnf* genearen transkripzioa GOPC proteinaren gabeziaren ondorioz areagotu egiten zela. *Gopc* *-/-* indibiduoetan GCNF proteina nukleoan eta zitoeskeletoko egitura den *manchette*-an bereziki metatu egiten zela ikusi zen, proteinaren kopuru askoz handiagoa azalduz *wild type* indibiduoekin alderatuta. Kasu horretan formulatutako hipotesia izan zen GOPC proteinak bideratutako garraioaren oztopatzearen ondorioz, GCNF-ren adierazpena igo egiten zela<sup>22</sup>.

Nahiz eta aztertutako propotein konbertasen kasuan kontrako emaitza lortu adierazpenari dagokionez, antzeko arrazonamendua erabili daiteke fenomenoaz azaltzeko, bereziki Furina eta PCSK6 konbertasetan. Izan ere, PCSK4 oso konbertasa espezifiko da gonadetan baino ez baita adierazten, eta beraz, bere ituak ere askoz espezifikoagoak izango dira<sup>7</sup>. Furina eta PCSK6-ren kasuan, hainbat ehun desberdinetan hainbat itu desberdin prozesatu egiten dituzte, eta aniztasun horren ondorioz, errazagoa izango da *knockout* egoera batean haien ituren batengan eragina egotea.

Zelularen bidezidor askoren erregulazioa *feedback*-en bidez ematen da, hau da, erreakzio baten produktuak edo horren ezak prozesuaren parte den entzima baten ekoizpena eragin edo inhibituko du. Kasu

honetan, gerta daiteke GOPC proteinaren gabeziaren ondorioz, konbertasa bakoitzaren ituren bat ez ekoiztea, edo entzimen eta ituen arteko kontaktua ez ematea. Normalean entzima baten ekoizpena areagotu daiteke *feedback*-aren bidez prozesatu beharreko aitzindaria metatzen bada, baina *knockout*-aren ondorioz itua bera ez badago eskuragarri, gerta daiteke entzimaren transkripzioa ere jaistea.

Konbertasen adierazpenaren aldaketak behatzeaz gain, qPCR-aren ondorioz baieztatu egin da saguen barrabiletan PCSK6 proprotein konbertasaren adierazpena dagoela. Neuropeptidoen prozesamenduan aritzen den entzima denez, bere itu-multzo probableena neuropeptido gonadalen sistema izango da: gonadetan ekoiztu edo haiengan zuzenean eragina duten neuropeptidoen multzoa<sup>7</sup>. Dena den, oraindik ez dago argi zein den multzo horretako molekula gehien funtzionamendua eta eginkizuna. Izan ere, hipotalamo-hipofisi-pituitario ardatzetik kanpoko seinale-molekula neural asko ez dira ikertu, eta normalean haiei buruz gehiago jakiteko isolatu behar direnez, haien funtzioari buruzko informazioa integratzea zaila izaten da<sup>23</sup>.

Gainera, geneen transkripzio mailari buruzko informazioarekin soilik ezin dira *knockout*-aren eraginari buruzko hipotesi sendoak formulatu. Horretarako, proteinen *in situ* azterketa ere egitea oso erabilgarria da. Orain arte saguen barrabiletan aztertu ez denez eta adierazpenaren aldaketa bortitzena pairatu duenez, PCSK6-ren analisi immunohistokimikoa egiten saiatu da, baina ez dira emaitza erabilgarriak lortu lan honen entregatze-datarako.

Hori azaltzeko hainbat arrazoi egon daitezke. Adibidez, egia da barrabiletan detektatu dena qPCR-aren bidez mRNA izan dela eta ez proteina. Zenbait kasutan, transkripzioaren bidez lortzen den mRNA guztia ez da itzultzen, baina gibel-laginak erabili ditugunez kontrol positibo gisa, ez dago bertan seinaleak ez izateko arrazoirik<sup>24</sup>. Gainera, anti-PCSK6 antigorputzak berriak dira eta orain arte ez dira lana egindako laborategian erabili eta, beraz, gerta daiteke protokoloan zenbait aldaketa gehiago egin behar izatea emaitza positiboak lortu baino lehen. Hori dela eta, saiakera gehiago egingo dira etorkizunean emaitza egokiak lortzeko asmoz.

PCSK6-ren *in situ* adierazpenari buruzko informaziorik ez daukagunez saguetan, errazena izango litzateke giza barrabiletan dagoen PCSK6-ren adierazpena mantentzea. Azken finean, hori da proteinaren adierazpena *in situ* aztertzearen helburu nagusia. Nahiz eta jada jakin gizakietan adierazi egiten dela, saguetan emaitza homologoak lortzen badira proteinaren funtzionamenduari buruzko ikerkuntza asko erraztu egiten da, saguetan lortutako emaitzak nolabait estrapolagarriak izango direlako eta giza laginak erabiltzearen arazoak ekidin ahalko direlako.

*The Human Protein Atlas* data basearen arabera, PCSK6-ren adierazpen altua dago giza barrabiletan<sup>25</sup>. Zelula mailan aztertzerakoan, hodixka seminiferoen zeluletan PCSK6 seinale altua dago eta Leydig zeluletan pixka bat baxuagoa<sup>26</sup>. Hori ulergarria da Leydig zelulak leinu espermatogenikoko zelulen eraldaketarako seinalizazioa bideratzen dutelako. Gainera, aipatzekoa da PCSK6-ren eta PCSK4-ren adierazpen patrioiak bat egiten dutela espermatida borobiletan.

PCSK4-ren identifikatutako lehenengo itua PACAP neuropeptidoa izan zen eta, beraz, nolabaiteko erreduantzia egon daiteke bi konbertasen artean <sup>27</sup>. Dena den, argi dago ez direla izango baliokideak funtzioari dagokionez, *Pcsk4* -/- saguak guztiz ernalezinak baitira. Adierazpen patrioaren arabera konbertasen funtzioa ondorioztatzen bada, PCSK6-rena neuropeptidoen presentziaren arabera izango da ehun desberdinetan eta PCSK4-rena ugaltze-aparatuarekiko espezifikoa izango da.

Konbertasa desberdinen ituen arteko erreduantzia egotea ez da kontzeptu berria, eta horri buruz informazio gehiago lortzeko genoma osoko adierazpenaren korrelazio analisi bat egin zen. Horren bidez, proteina konbertasa bakoitza bere ituekin erlazionatu egin zen, eta ondoren konbertasa desberdinen arteko erreduantzia aztertu zen. Ikerketa horren bidez ikusi zen PCSK4-ren ituen %10,6-a teilakatu egiten zela PCSK6-ren ituekin, baina kontrako kasuan %6,7-a baino ez zen teilakatu PCSK4-rekin. Datu horiek bat datoz PCSK4-ren espezifikotasun handiagoarekin, bi konbertasen arteko erlazioa mantenduz <sup>28</sup>.

Izan ere, PCSK6-ren ituek erlazio estuagoa daukate PCSK1 eta PCSK2-ren ituekin PCSK4-rekin baino, %15,8 eta %28,5, hurrenez hurren. Horren azalpen bat izan liteke lehenengo bi konbertasak nerbio sisteman espresatzen direlako, neuropeptido asko adierazten baitira ehunean. Aldiz, PCSK4-ren kasuan konbertasa zehatz baten ituekin duen erlazio estuena dauka PCSK6-rekin. Horren gainetik dagoen bakarria konbertasen adostasun sekuentzia orokorra daukaten proteinek dauka, %20,2-a. Dena den, nahiz eta beste konbertasekin erlazio estuagoa izan, ehun hain desberdinetan adierazten den proteina baten ituen %6,7-a ehun espezifikoa bakarrean adierazten den beste entzima batek ezagutu ahal izatea ez da gutxi, eta interesgarria izango litzateke etorkizunean bi entzima horien arteko erlazioa gehiago aztertzea <sup>28</sup>.

Egia da *Pcsk4* -/- saguak ernalezinak direla eta logikoa da pentsatzea indibiduo horietan PCSK6-k ezingo duela konbertatu PCSK4-ren funtzio guztiak <sup>16</sup>. Honela bada ere, interesgarria izango litzateke bi konbertasa horien azterketa bateratua egitea, batak adierazpena neurtuz bestearen *knockout* egoeran, adibidez, nolabaiteko erantzun konbertatzailea ematen den ala ez ikusteko.

Dena den, gizakietan lortutako datuak saguetara estrapolatzerakoan, kontuan izan behar da proteinen espresioa espezie batetik bestera aldatzen dela. PCSK4-ren kasuan, adibidez, saguen lerro espermatogenikoko zeluletan eta Sertoli zelulak barneratutako gorputz erresidualetan baino ez da adierazten, baina gizakietan Leydig zeluletan ere detektatu egin da <sup>16 29</sup>. Horregatik da hain garrantzitsua proteinen adierazpen patrioak aztertzea *in situ* saguaren moduko animalia modeloetan: gizakietan aztertu badira ere, adierazpenaren antzekotasunak etorkizunean egiten diren ikerketetan erabili daitezken lagin motak determinatuko dutelako.

## 6. Bibliografia

1. van der Poel, S. Z. Historical Walk: The HRP Special Programme and Infertility. *Gynecol. Obstet. Invest.* **74**, 218–227 (2012).
2. Agarwal, A. *et al.* A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13**, 37 (2015).



3. O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C. & Agarwal, A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil. Steril.* **93**, 1–12 (2010).
4. Dam, A. H. D. M. *et al.* Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* **13**, 63–75 (2007).
5. Bizkarguenaga, M. B. Distribución de las proteínas acrosómicas GCNF Y SP56 en ratones infértiles GOPC y en un modelo de globozoospermia inducida mediante bloque de GOPC. (2018).
6. Lehti, M. S. & Sironen, A. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *REPRODUCTION* **151**, R43–R54 (2016).
7. Seidah, N. G. The Proprotein Convertases, 20 Years Later. in **768**, 23–57 (2011).
8. Bergeron, F., Leduc, R. & Day, R. Subtilase-like pro-protein convertases: From molecular specificity to therapeutic applications. *J. Mol. Endocrinol.* **24**, 1–22 (2000).
9. Artenstein, A. W. & Opal, S. M. Proprotein Convertases in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2507–2518 (2011).
10. Gyamera-Acheampong, C. & Mbikay, M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: a review. *Hum. Reprod. Update* **15**, 237–247 (2009).
11. Seidah, N. G. *et al.* Precursor Convertases: An Evolutionary Ancient, Cell-Specific, Combinatorial Mechanism Yielding Diverse Bioactive Peptides and Proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**, 9–24 (1998).
12. Roebroek, A. J. *et al.* Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125**, 4863–76 (1998).
13. Furin. NEB. [https://international.neb.com/products/p8077-furin#Product Information](https://international.neb.com/products/p8077-furin#Product%20Information). (2019ko ekainak 8an kontsultatua)
14. Torii, S., Yamagishi, T., Murakami, K. & Nakayama, K. Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. *FEBS Lett.* **316**, 12–16 (1993).
15. Tadros, H., Chrétien, M. & Mbikay, M. The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *J. Reprod. Immunol.* **49**, 133–152 (2001).
16. Gyamera-Acheampong, C. *et al.* Sperm from Mice Genetically Deficient for the PCSK4 Proteinase Exhibit Accelerated Capacitation, Precocious Acrosome Reaction, Reduced Binding to Egg Zona Pellucida, and Impaired Fertilizing Ability1. *Biol. Reprod.* **74**, 666–673 (2006).
17. Iamsaard, S. *et al.* Enzymatic activity of sperm proprotein convertase is important for mammalian fertilization. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2817–2826 (2011).
18. Tsuji, A. *et al.* Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1645**, 95–104 (2003).
19. Fu, Y., Campbell, E. J., Shepherd, T. G. & Nachtigal, M. W. Epigenetic regulation of proprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **1**, 569–76 (2003).
20. Panet, F. *et al.* PACE4 is an important driver of ZR-75-1 estrogen receptor-positive breast cancer proliferation and tumor progression. *Eur. J. Cell Biol.* **96**, 469–475 (2017).
21. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
22. Bizkarguenaga, M., Gomez-Santos, L., Madrid, J. F., Sáez, F. J. & Alonso, E. Increase of germ cell nuclear factor expression in globozoospermic *Gopc*<sup>-/-</sup> knockout mice. *Andrology* **7**, 319–328 (2019).
23. McGuire, N. L. & Bentley, G. E. Neuropeptides in the gonads: from evolution to pharmacology. *Front. Pharmacol.* **1**, 114 (2010).
24. Roebroek, A. J. M. *et al.* Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 53442–50 (2004).
25. PCSK6 proteinaren adierazpen patroia. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140479-PCSK6/tissue>. (2019ko ekainak 15ean kontsultatua)
26. PCSK6 proteinaren adierazpen patroia barrabiletan. The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140479-PCSK6/tissue/testis>. (2019ko ekainak 15ean kontsultatua)
27. Li, M. *et al.* Testis-specific prohormone convertase PC4 processes the precursor of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Peptides* **19**, 259–268 (1998).
28. Turpeinen, H. *et al.* Identification of proprotein convertase substrates using genome-wide expression correlation analysis. *BMC Genomics* **12**, 618 (2011).
29. PCSK4 proteinaren adierazpen patroia barrabiletan. The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115257-PCSK4/tissue/testis#rnaseq>. (2019ko ekainak 16an kontsultatua)

