



שינויים בפרופיל הפרוטאומי של תאי זרע לאחר חשיפה לקוטל העשבים אטרזין - תוצאות ראשוניות

אליסה קומסקי-אלבז, דורית קלו, צביקה רוט

הפקולטה לחקלאות;

המרכז לחקר תאי זרע בבע"ח (ASRC);

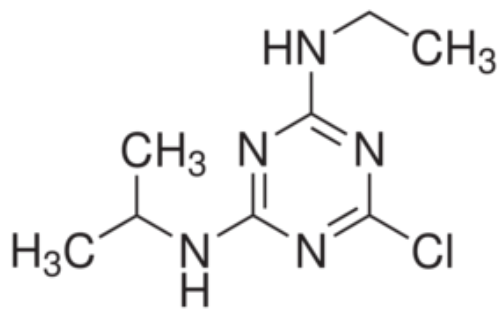
מרכז מצוינות למחקר בחקלאות, בריאות וסביבה, האוניברסיטה העברית בירושלים

מהו אטרזין?



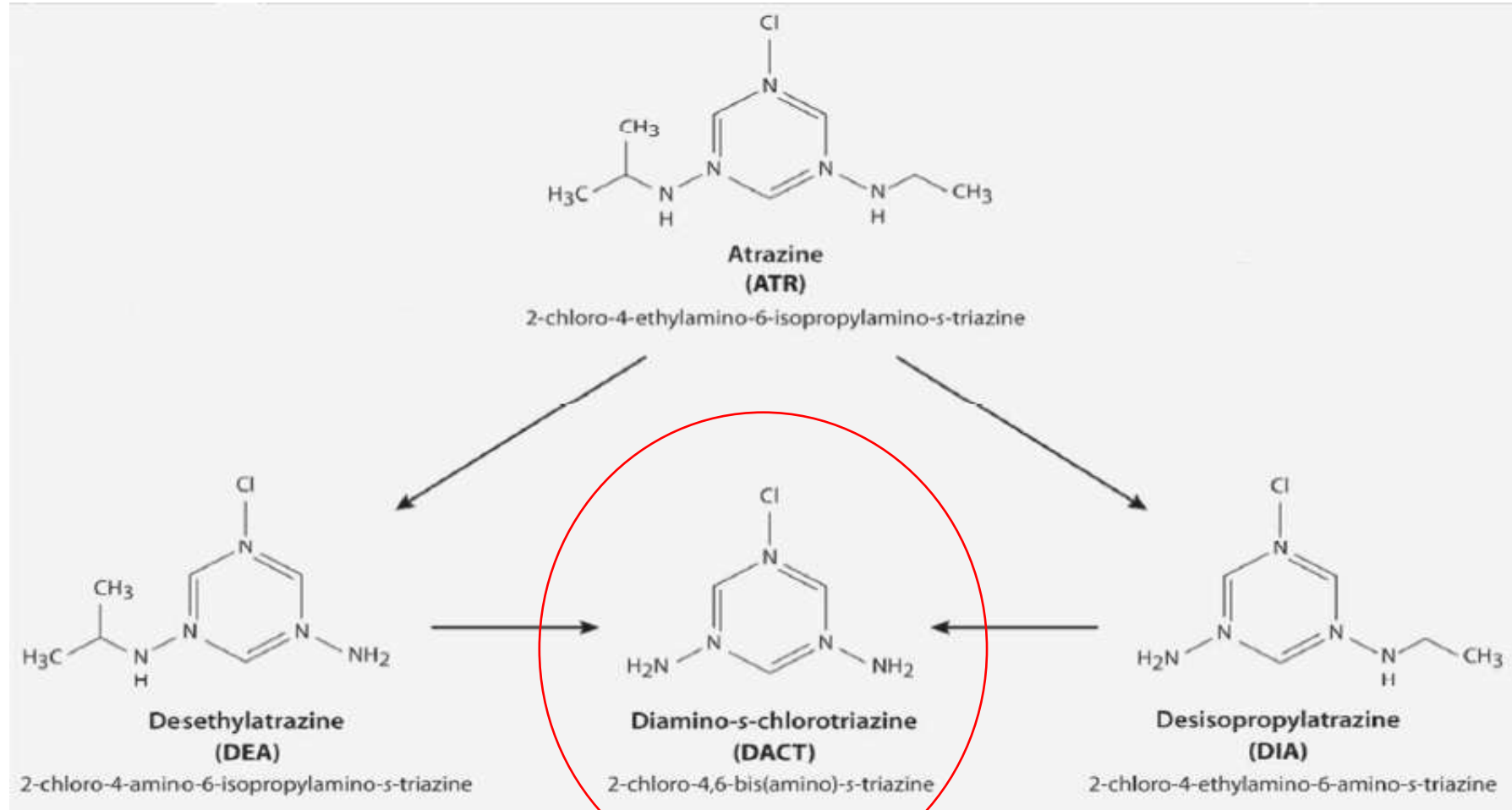
- אטרזין (ATZ) הינו אחד מקוטלי העשבים הנפוצים ביותר בעולם.
- הוא משמש לקטילת עשבים בעיקר בגידולי תירס וקנה הסוכר.
- חשיפה לאטרזין מתבצעת דרך צריכת מים או מזון מזהמים, נשימת התרסיס או ספיגתו דרך העור.
- אטרזין הינו מזהם סביבתי ידוע ומוגדר כמשבש פעילות אנדוקרינית (EDC).

Diamanti-Kandarakis E et al., Endocr Rev, 2009

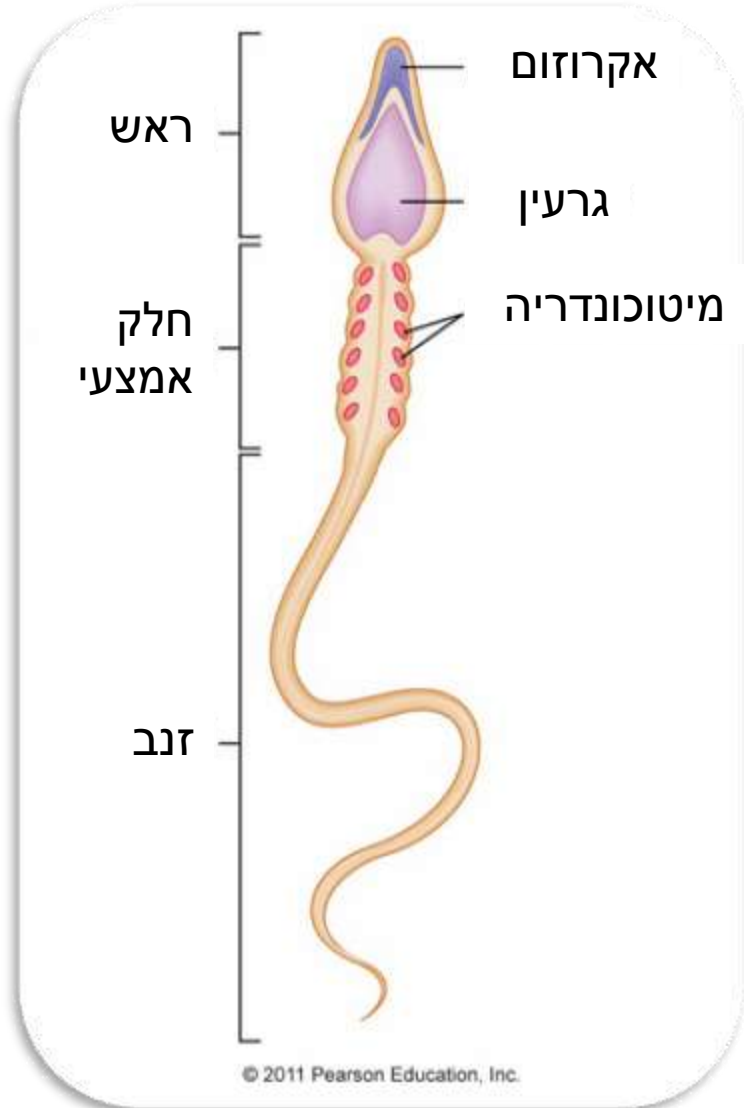


1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine

מטבוליזם של אטריזין



תא הזרע



- **אקרזום** - שלפוחית בקצה ראש תא הזרע, המכילה אנזימים מעכלים
- **ריאקציית אקרזום** - שפיכת תוכן האקרזום לצורך קישור וחדירה לביצית
- **מיטוכונדריה** - מאגר האנרגיה של תא הזרע. מצוי בחלק האמצעי של התא



Effect of the herbicide atrazine and its metabolite DACT on bovine sperm quality



Alisa Komsky-Elbaz^{a,b}, Zvi Roth^{a,b,*}

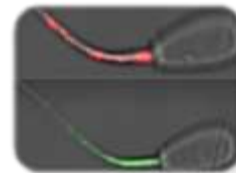
^a Department of Animal Sciences, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University, Rehovot 76100, Israel

^b Center of Excellence in Agriculture and Environmental Health, Jerusalem, Israel

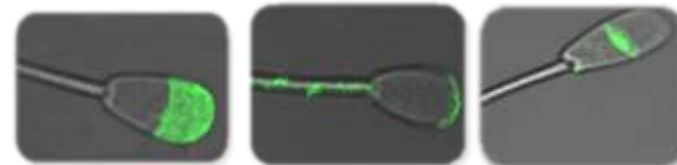
במחקר הקודם ממעבדתנו – נזק רב-גורמי של ATZ ו-DACT לתאי הזרע:



• חיות

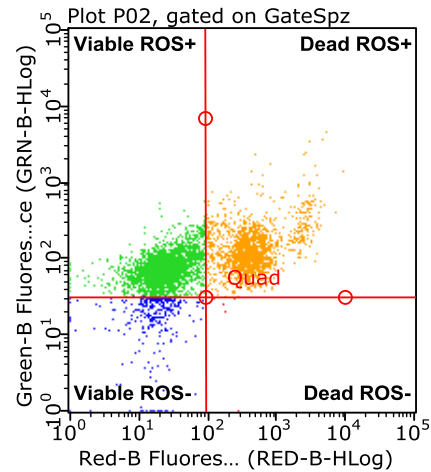


• פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה ($\Delta\Psi_m$)



• שלמות ותפקוד האקרזום

מבגבון...?



- ייצור רדיקלים חופשיים (ROS)
(EasyCyte FACS; H2DCFDA)

Sperm-Halosperm kit

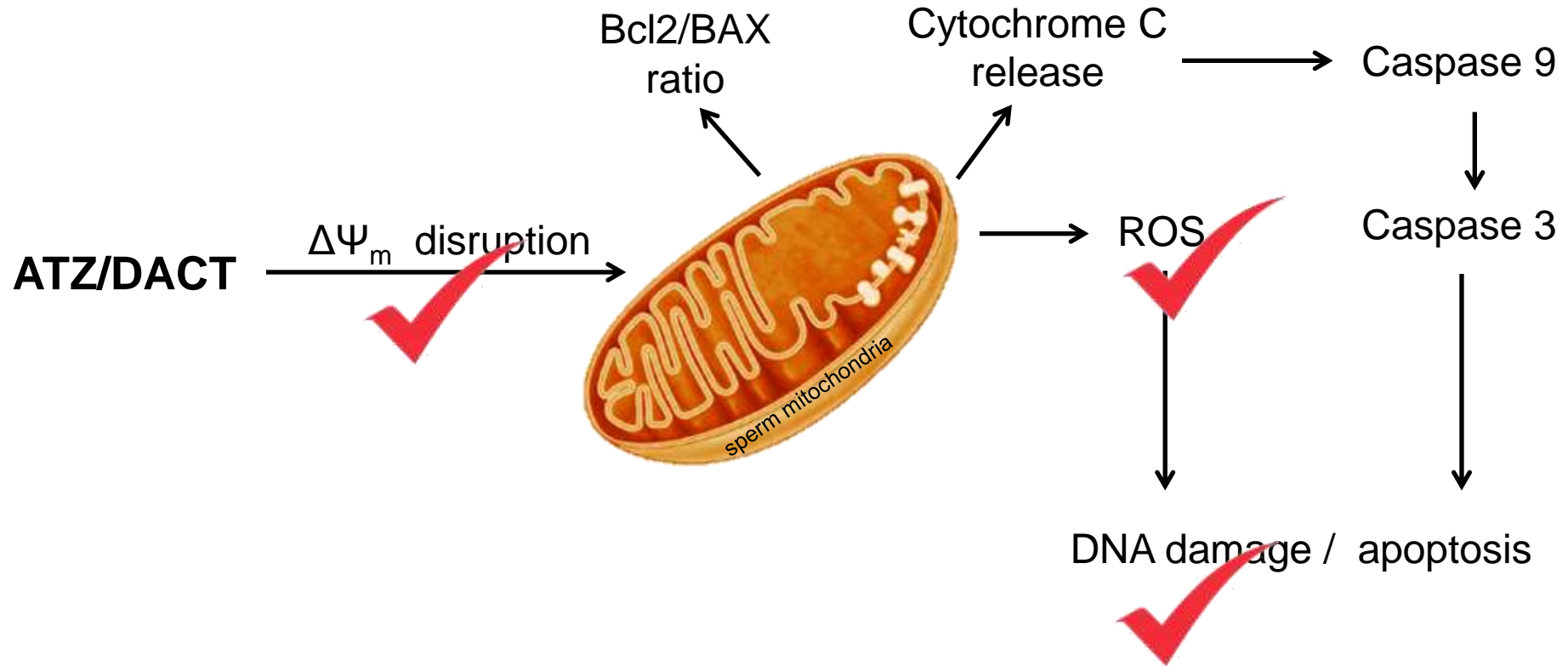


- שלמות ה-DNA

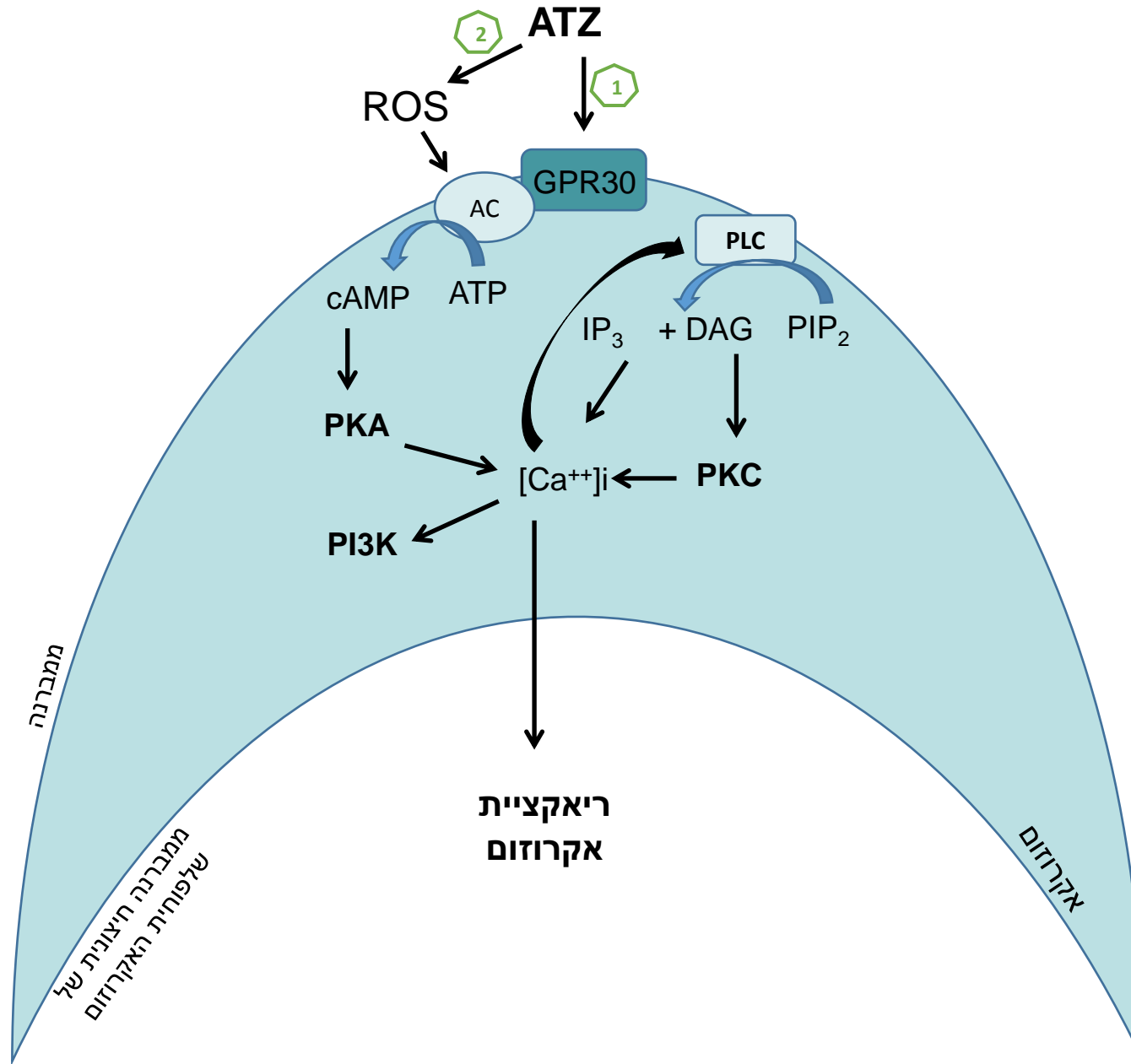


- פוטנציאל הפוריות (IVF)

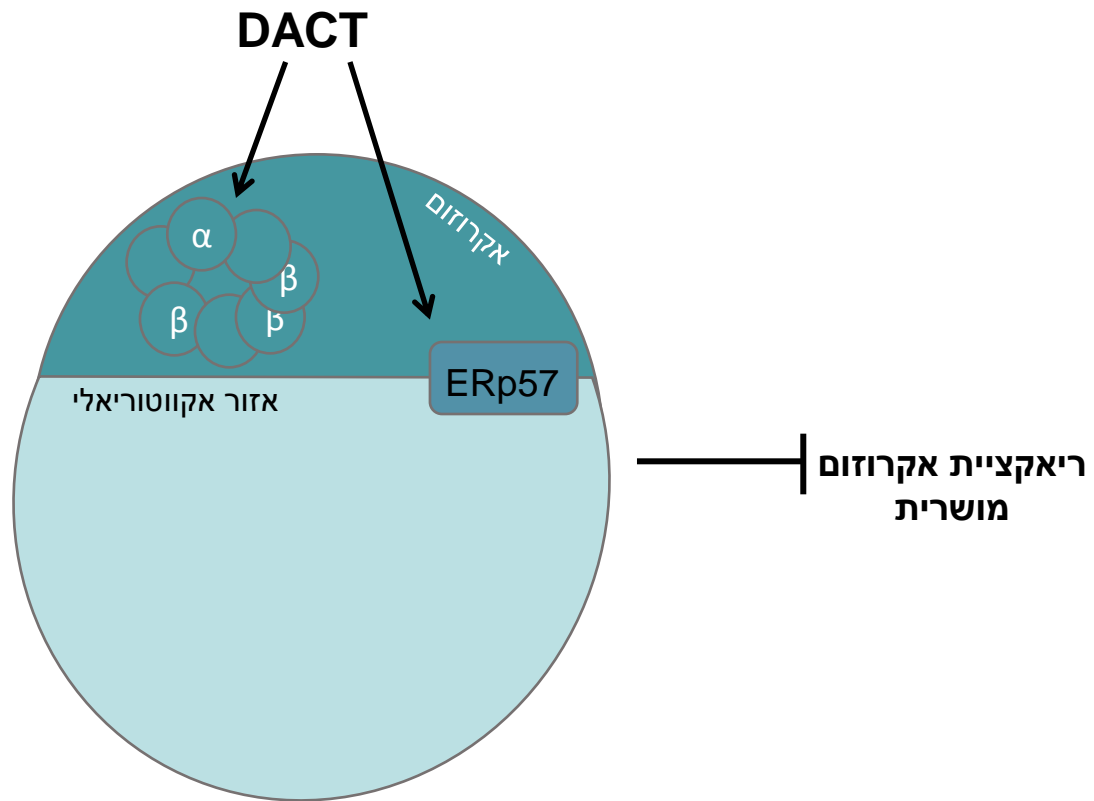
מנגנון אפשרי – פגיעה בפעילות מיטוכונדריואלית



מנגנון אפשרי – ATZ – פגיעה בריאקציית אקרזום



מנגנון אפשרי – DACT – פגיעה בריאקציית אקרזום



❖ DACT נקשר לחלבונים ERp57 ו- PA28a בתאי בלוטת יותרת המח בחולדות

Dooley et al., Chem Res Toxicol, 2008

❖ החלבון ERp57 מתבטא באקרזום; תפקיד בקישור הזרע לביצית; רמתו ירודה באי-פיריון הזכר

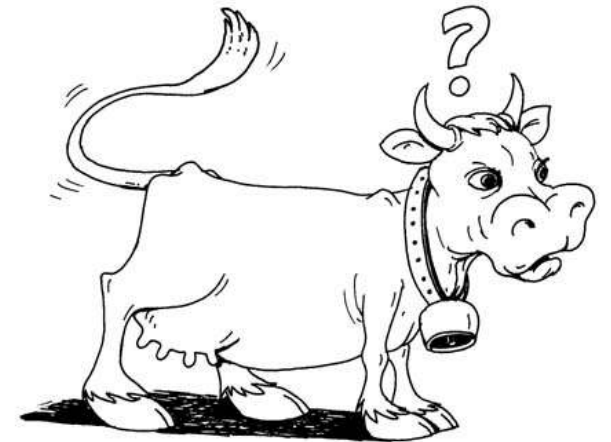
Zhang et al., Mol Hum Reprod, 2007

❖ החלבון PA28 שייך למערכת היוביקוטין-פרוטאזום, המעורבת בריאקציית האקרזום וחדירת הזונה פלוצידה של הביצית

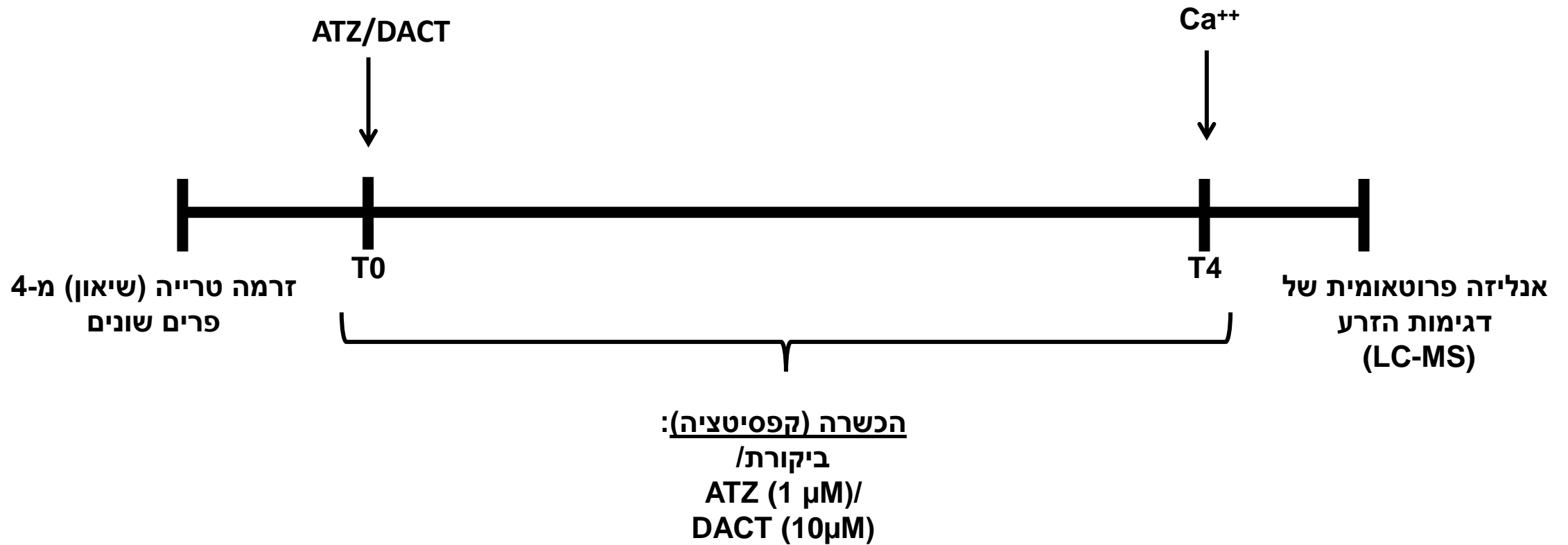
Sutovsky, Reproduction, 2011 ❖

מטרת המחקר

לזהות שינויים במכלול החלבונים המתבטאים בגנום
(פרוטאום) ובתהליכים תאיים בעקבות חשיפת תאי זרע
לאטרזין והמטבוליט הראשי שלו, DACT



תכנון הניסוי



Proteomic analysis

(The Nancy and Stephen Grand Israel
National Center for Personalized Medicine,
Weizmann Institute of Science)

הפקת חלבונים



פירוק לפפטידים



הפרדה ב-UPLC

(Ultra performance liquid chromatography)



Mass chromatography

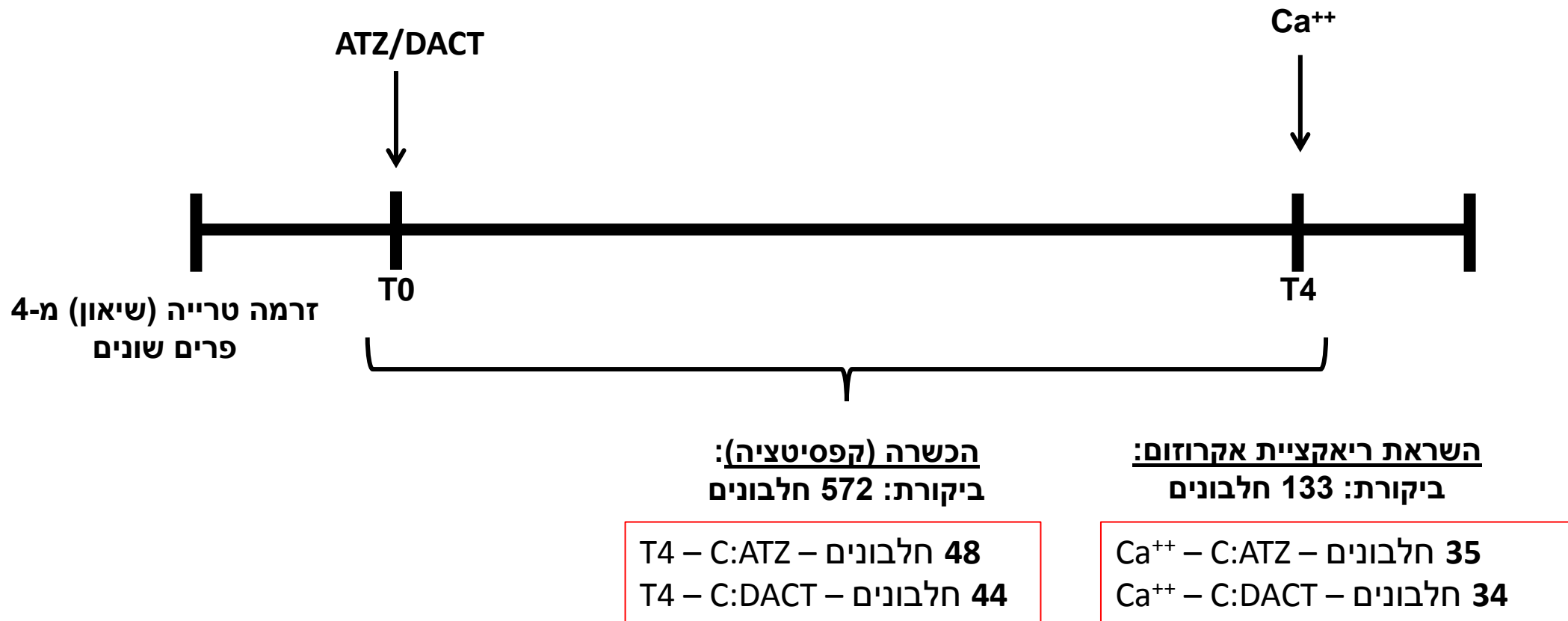


אנליזה ואפיון של חלבונים בעלי ביטוי שונה

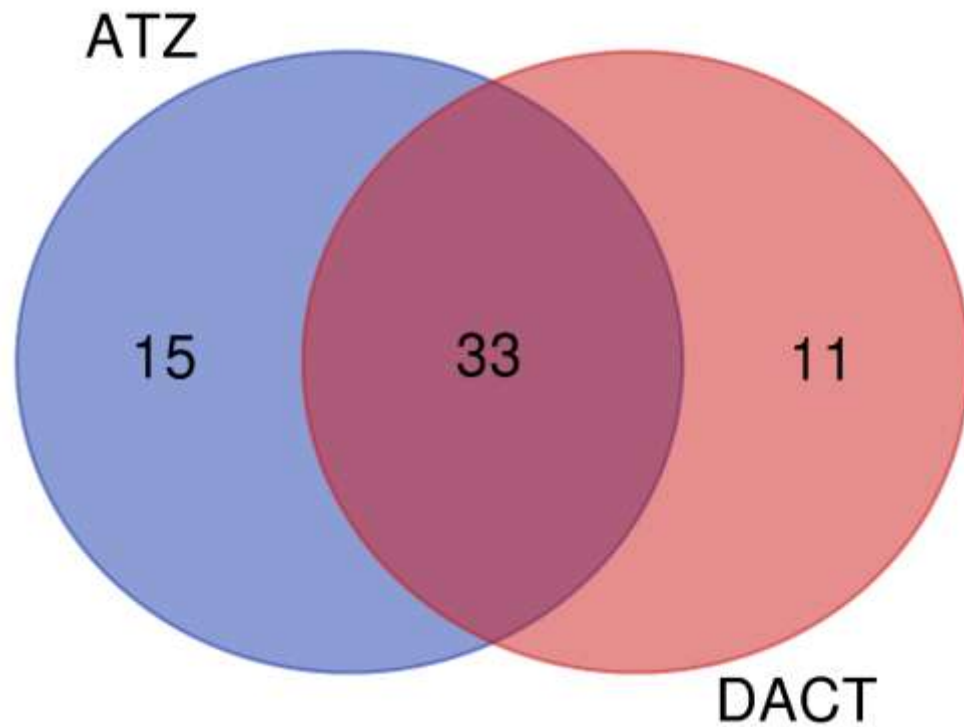
(DAVID, PANTHER, STRING, KEGG)

תוצאות

בסה"כ זהו 1916 חלבונים

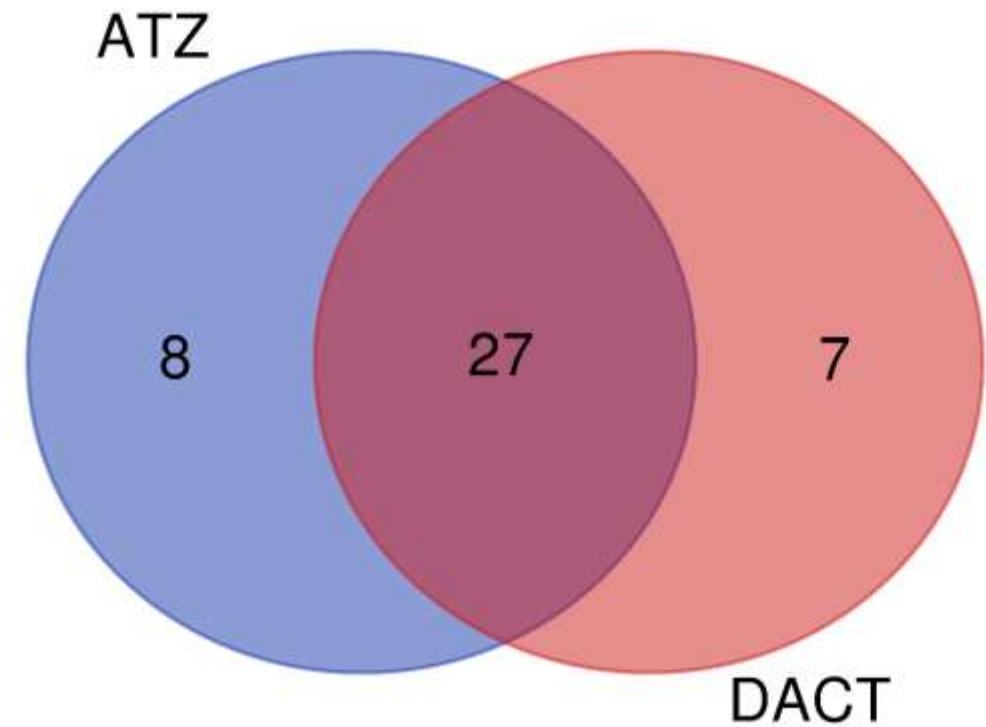


הכשרה (קפסיטציה) (T4)



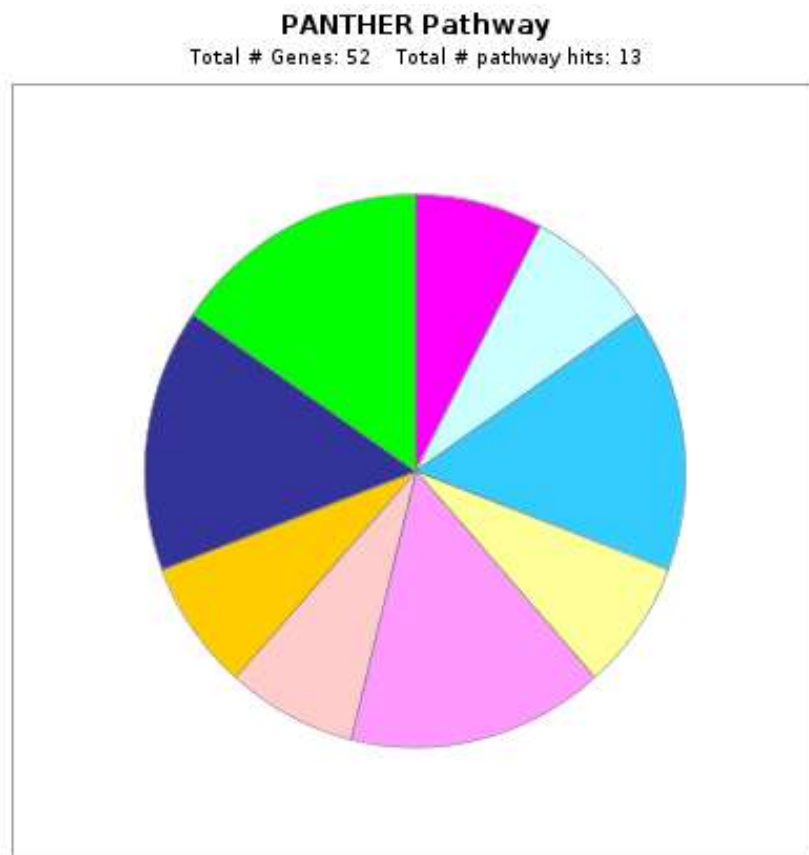
Names	total	elements
ATZ DACT	33	XPNPEP3 GK2 HDAC11 ETFDH TSGA10 UCHL5 CCDC116 MECR RAB14 LOC528959 EFCAB12 ACSL3 B4GALT4 CNDP2 SCAMP2 XPO1 GOT1L1 SLC06A1 ESD SPCS3 CHCHD6 GEMIN6 SRPK1 ADCY10 AZGP1 COASY ENPEP PPP6C BAG6 CHDH Ociad1 CLN5 C10orf67
ATZ	15	HSPA2 PPP4C VRK3 VAT1 PPIF CYR61 SORT1 NANS CST11 ODF1 LMNA MTCH2 LOC782688 NDUFAF5 UBE2D2
DACT	11	AHCY PRPSAP1 PAOX KERA NPEPPS RARS PSMC1 FAM170B FAM81B SLC25A12 IQCA1

השראת ריאקציית אקרוזום (Ca⁺⁺ ינופור)



Names	total	elements
ATZ DACT	27	BCS1L EIF3A TSGA10 TCTEX1D2 SPG7 TMEM126A NDUFS1 LOC613282 ATP1A4 CCT8 TMED7 DPP3 MDM1 FAM3C DHTKD1 L2HGDH TCEB1 LRRIQ3 LOC782688 GALNT3 CLTA UQCC1 RNASET2 RPL7A ALDH2 IQGAP2 HEXA
ATZ	8	MSRA PSMD4 FAM71F2 DBI LTA4H FSCN1 PROM1 AP1B1
DACT	7	RPS6 ARMC10 EFCAB12 CD59 KPNA4 CAMK4 MPST

השפעה של חשיפת תאי הזרע לאטרזין על הפרופיל הפרוטאומי



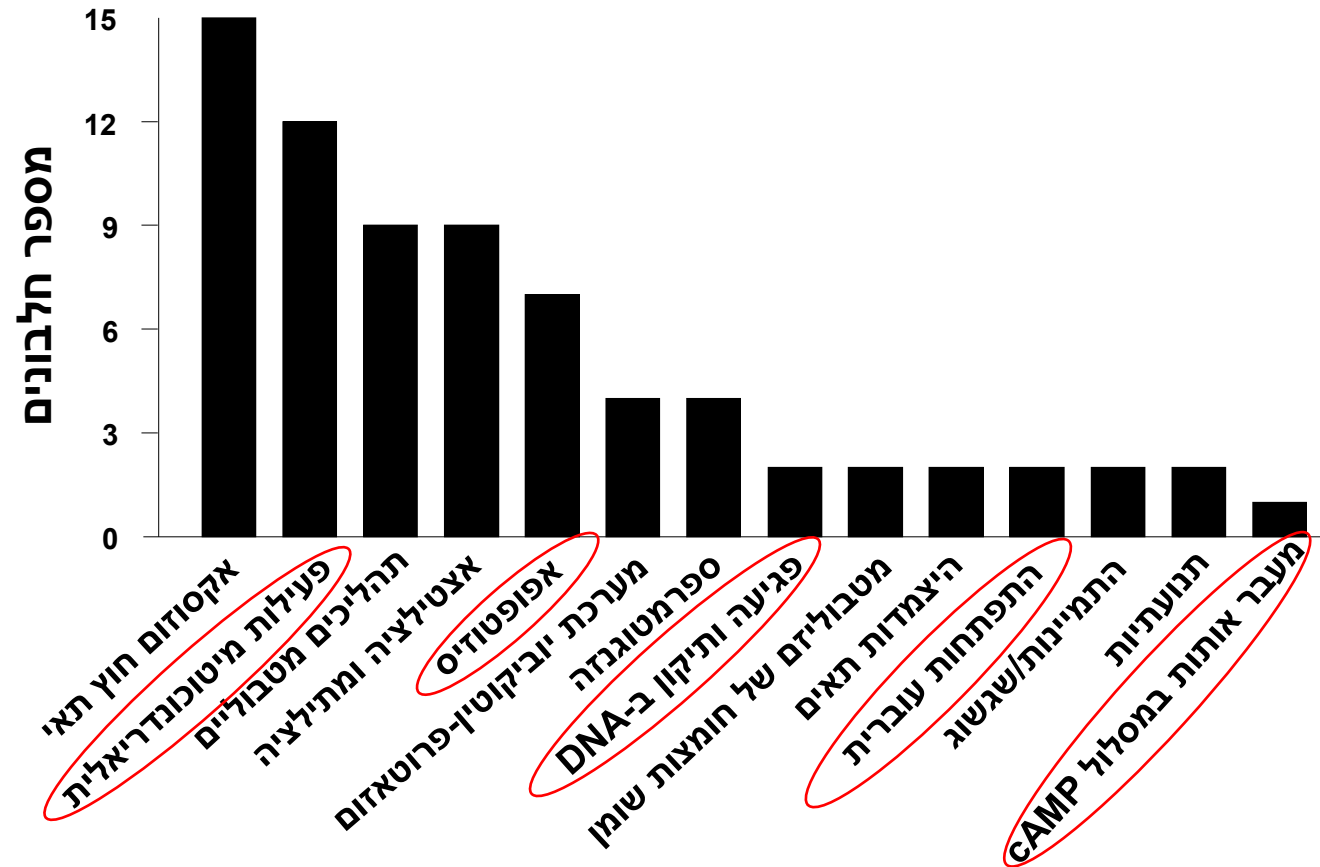
**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Pathway hits

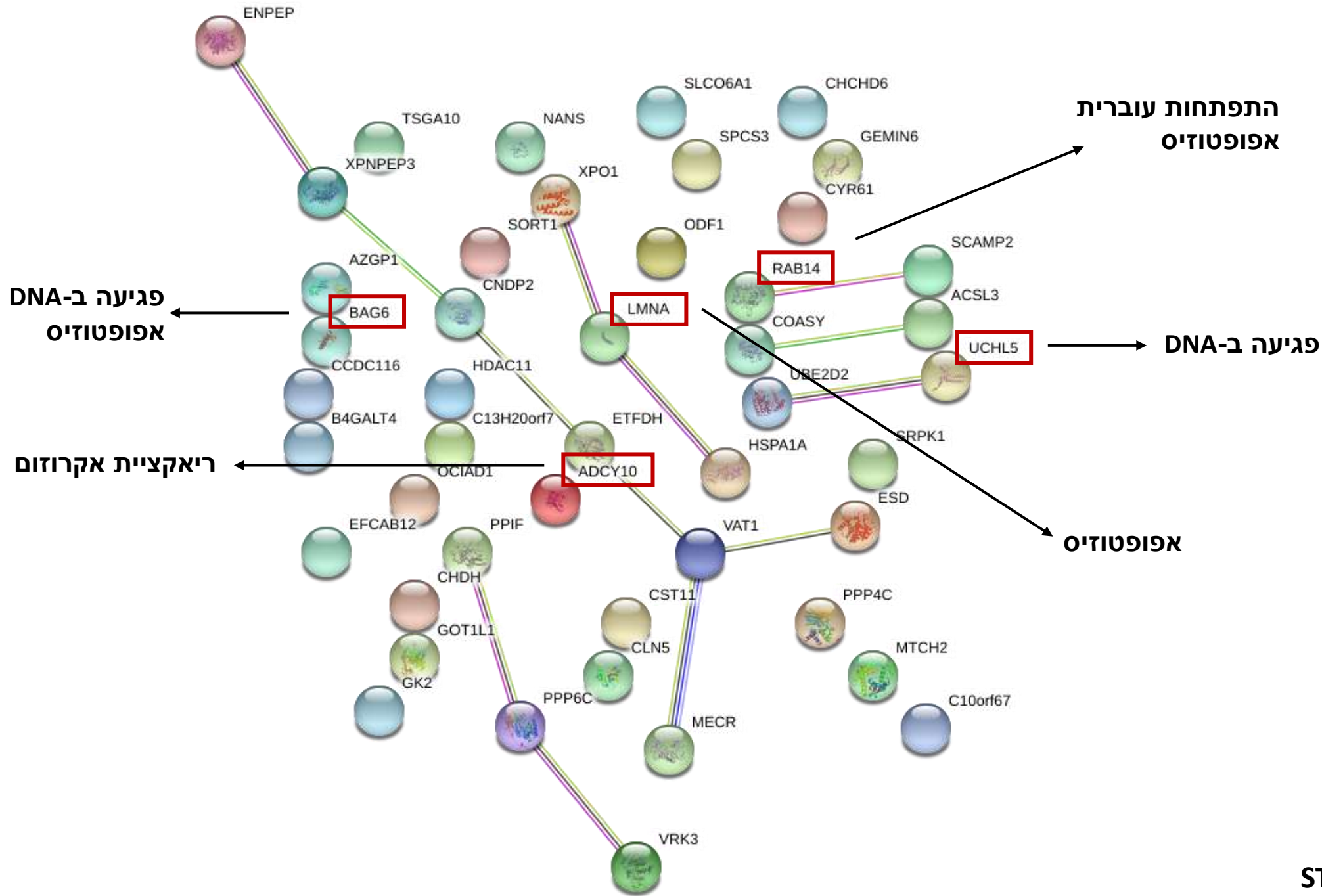
- [Apoptosis signaling pathway \(P00006\)](#)
- [Asparagine and aspartate biosynthesis \(P02730\)](#)
- [EGF receptor signaling pathway \(P00018\)](#)
- [FAS signaling pathway \(P00020\)](#)
- [FGF signaling pathway \(P00021\)](#)
- [Huntington disease \(P00029\)](#)
- [Parkinson disease \(P00049\)](#)
- [Ubiquitin proteasome pathway \(P00060\)](#)
- [Vasopressin synthesis \(P04395\)](#)

חשיפה ל- 1 μ M ATZ פגעה בביטוי של 48 חלבונים

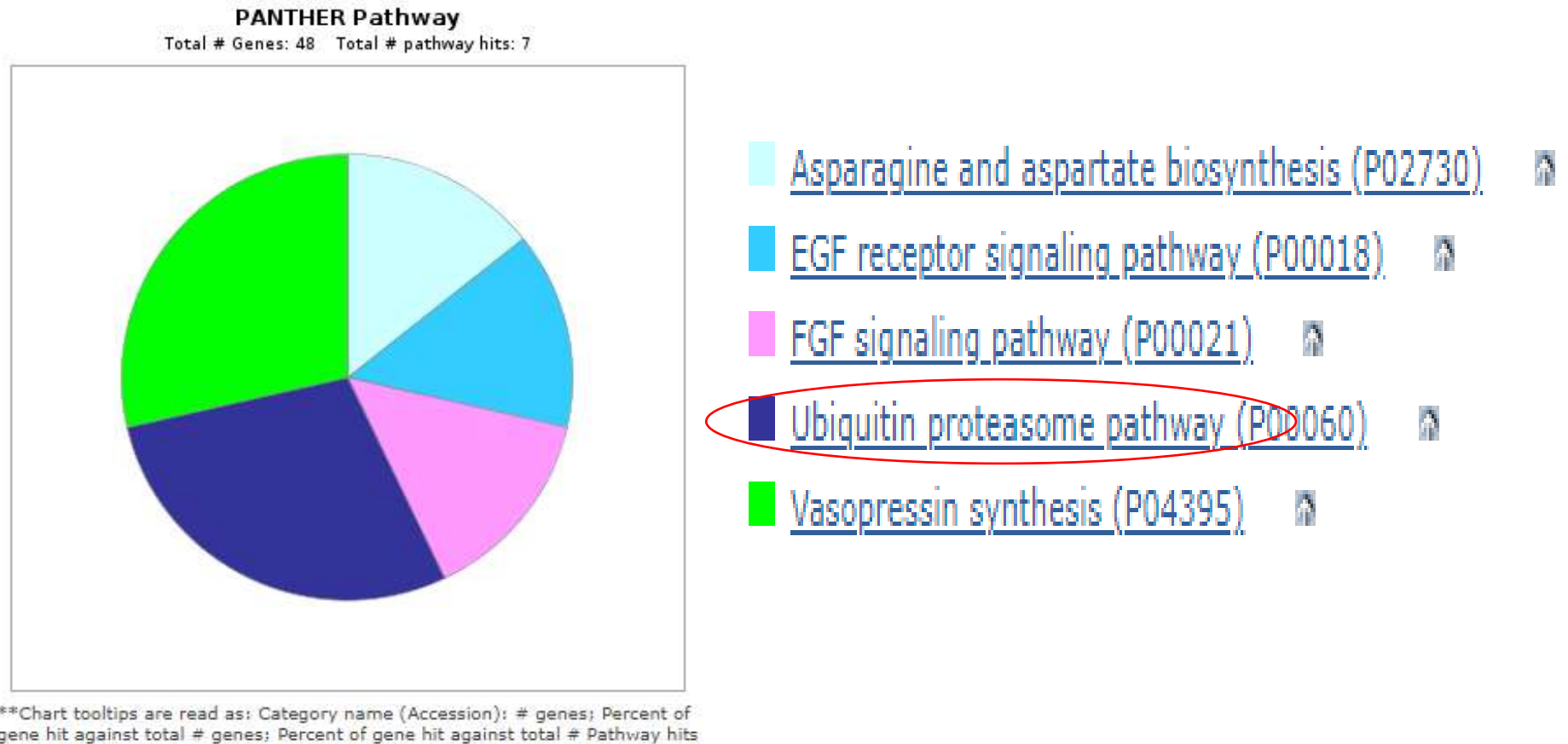
מעורבות החלבונים בתהליכים ביולוגים בתאי זרע

שנחשפו לאטרזין





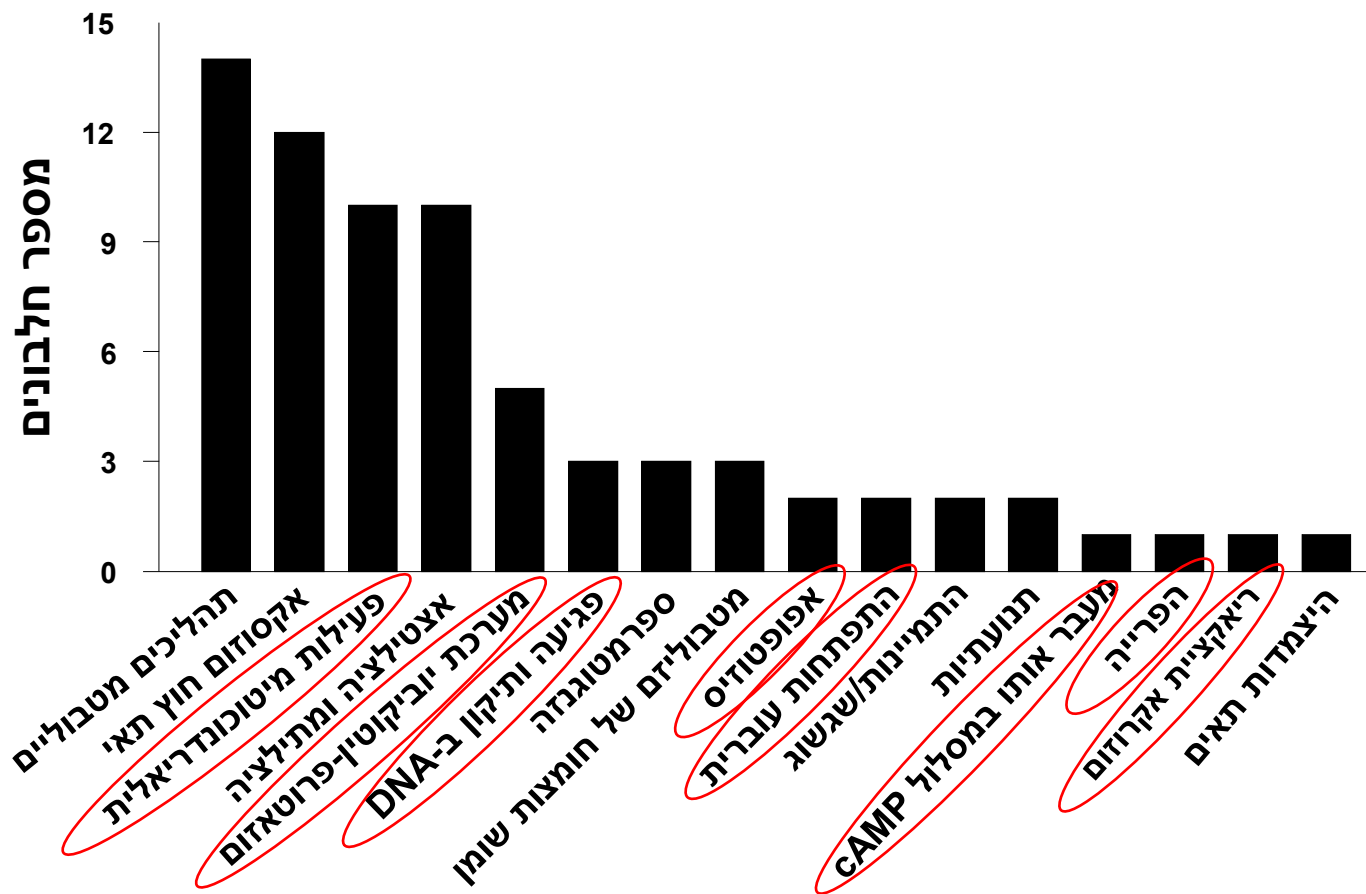
השפעה של חשיפת תאי הזרע ל-DACT על הפרופיל הפרוטאומי

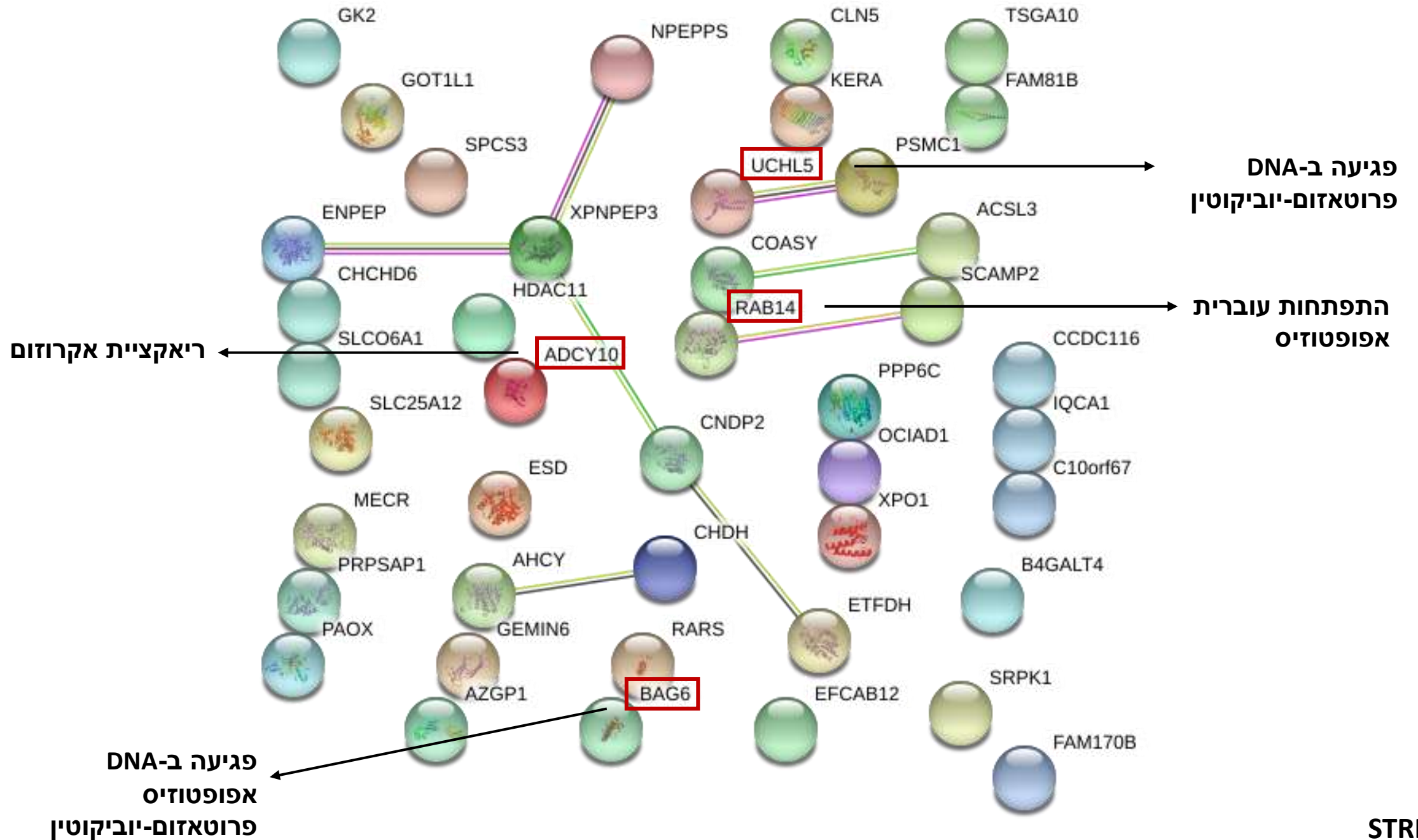


חשיפה ל- DACT 10 μ M פגעה בביטוי של 43 חלבונים

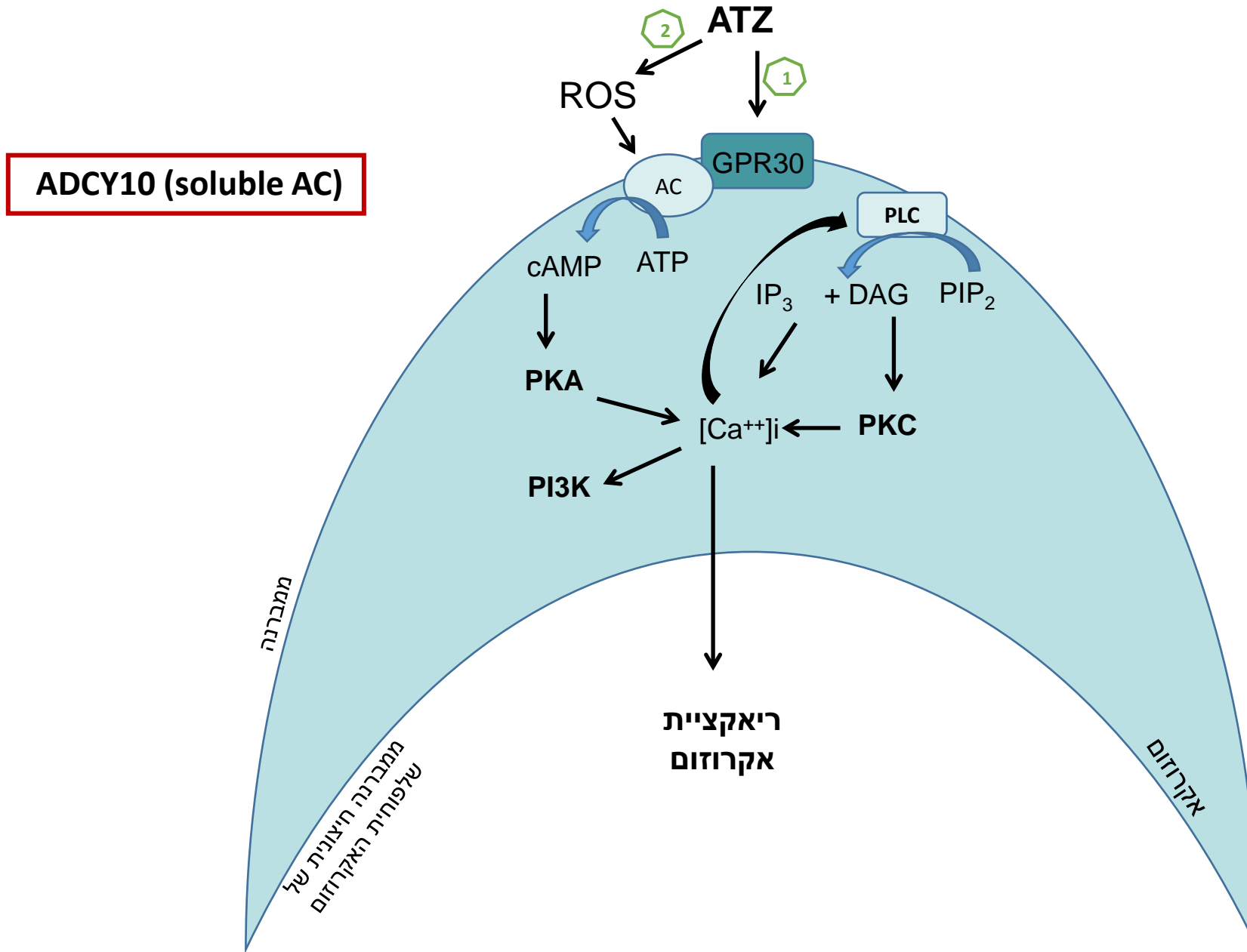
מעורבות החלבונים בתהליכים ביולוגים בתאי זרע

שנחשפו ל-DACT

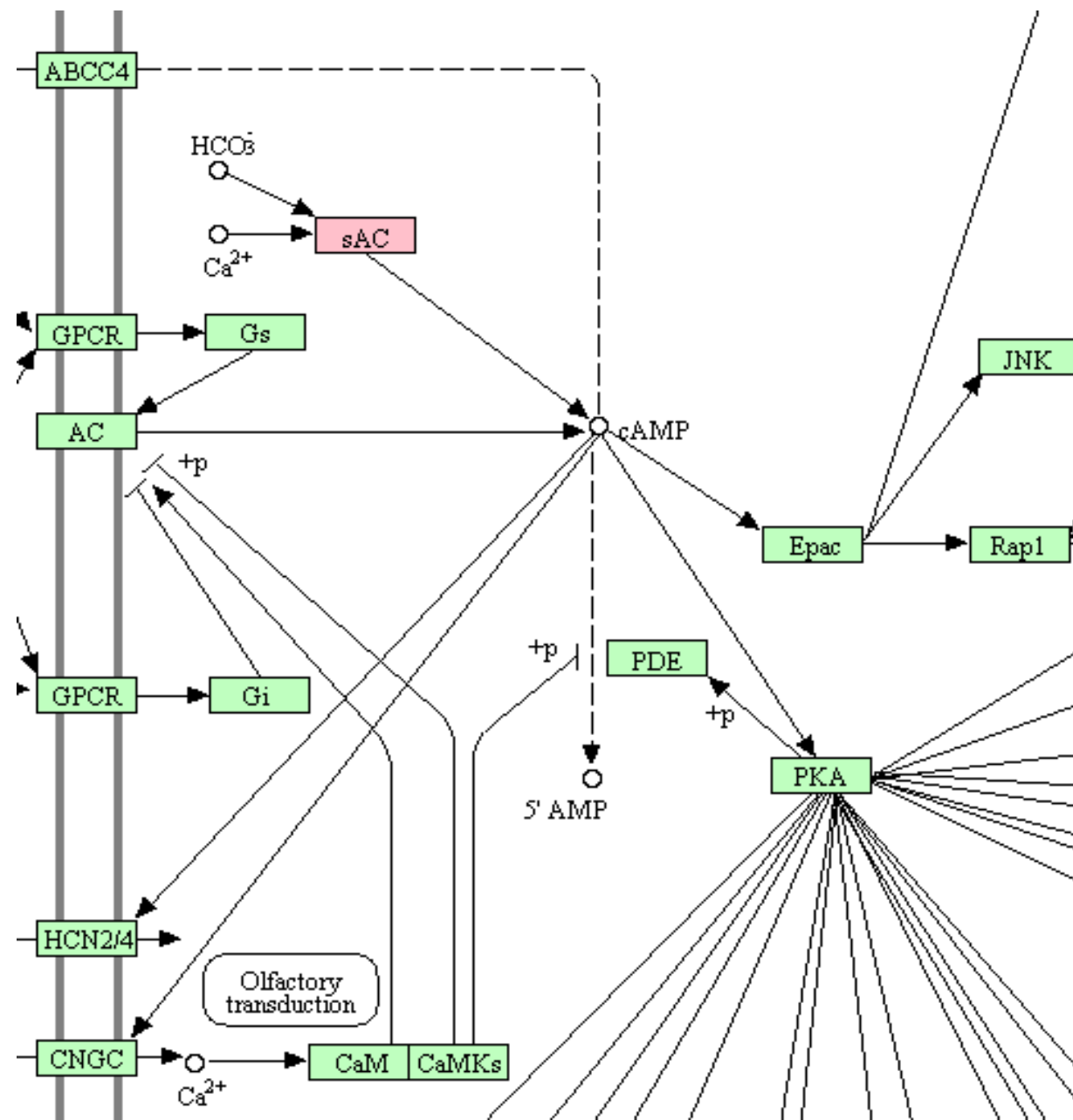




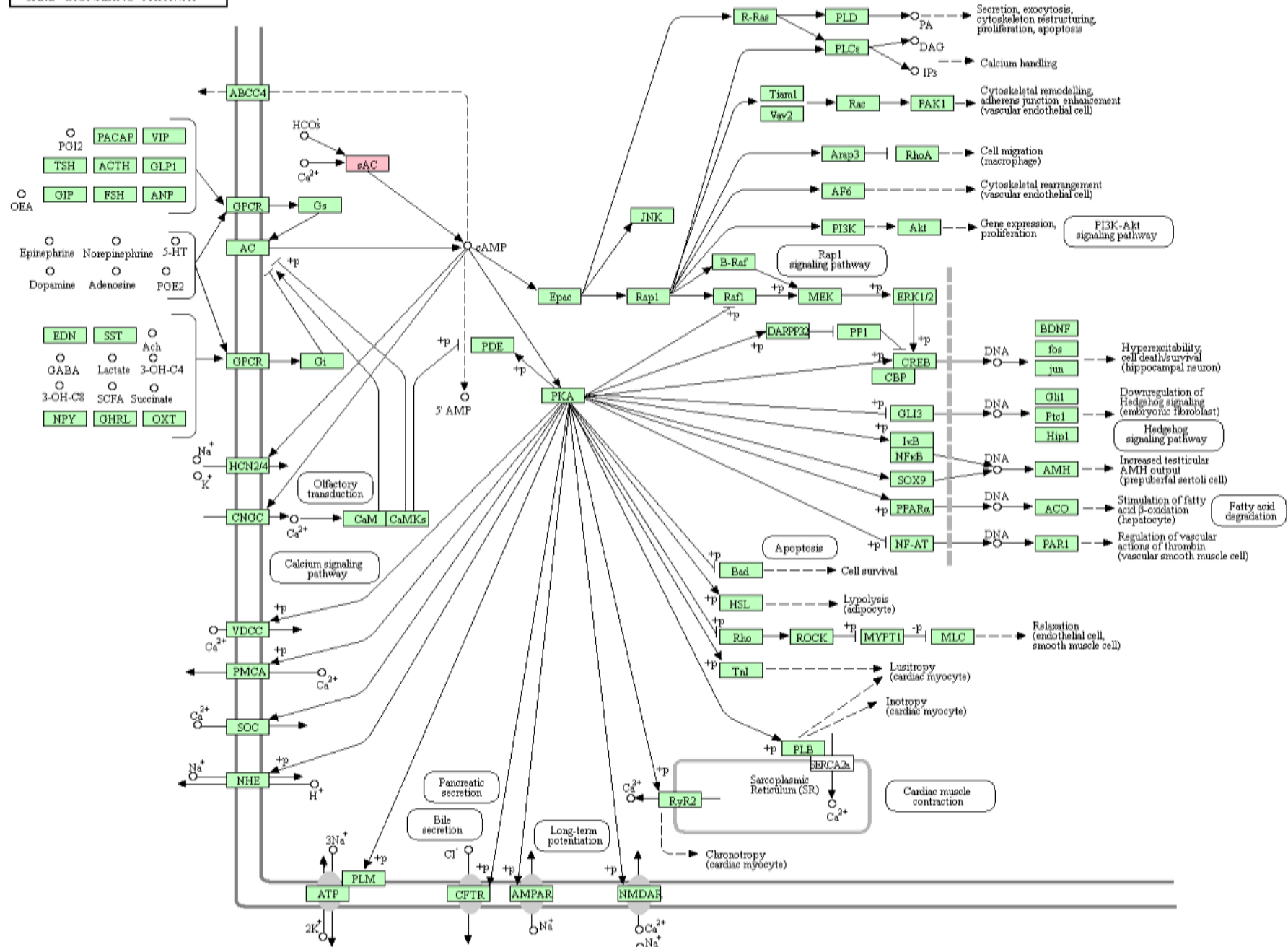
מנגנון אפשרי – ATZ – פגיעה בריאקציית אקרזום



ADCY10 (soluble AC)



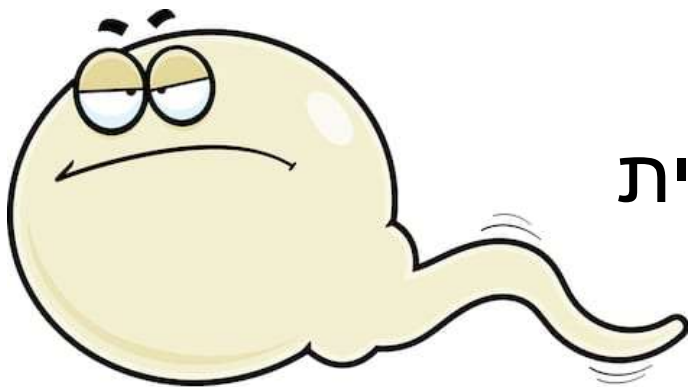
cAMP SIGNALING PATHWAY



מסקנות

- הממצאים ממשיכים לחשוף את הסיכון הטמון בחשיפת תאי זרע ל- ATZ/DACT

- אנליזה פרוטאומית חשפה שינויים במגוון רחב של חלבונים ותהליכים תאיים הנמצאים בבסיס הפגיעה של DACT/ATZ בתאי הזרע



- אחד המנגנונים המשמעותיים הוא פגיעה בראקציית האקרזום, במסלול AC-cAMP-PKA



פרופ' צבי רוט
דר' דורית קלו
שירה יעקבי-ארצי
רותם ויינברגר
עומר כהנשטם
דן רכס
מוטי סקציאר
פז מנדלסון
רון שרון
נעמה סרבניק



דר' יואל זרון

טניה קוגן
רונית לאור

תודה רבה!!!

ללא
אטרזין...?



HU-CEAEB - המרכז למצוינות בחקלאות
ובריאות הסביבה

ASRC - המרכז לחקר תאי זרע בבעלי חיים