

## DETECCIÓ DE PRECURSORS DE LA PROTAMINA P2 EN CÈL·LULES D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS INFÈRTILS

Núria Torregrosa,<sup>1</sup> Juan Martínez,<sup>1</sup> José Luis Ballejà,<sup>2</sup> Marvin Meistrich,<sup>3</sup> Rafael Oliva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratori de Genètica Humana, Grup de Genètica Humana. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: [roliva@ub.edu](mailto:roliva@ub.edu).

<sup>2</sup> Unitat de Reproducció Assistida, ICGON. Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona.

<sup>3</sup> Departament of Experimental Radiation Oncology. The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Houston, Texas 77030, EUA.

---

### Resum

Estudis previs demostren que en els espermatozoides de determinats pacients infèrtils hi ha una disminució en els nivells de protamina P2. També, s'ha observat, utilitzant anticossos contra la protamina P2, que aquesta disminució podria ser deguda a una manca de processament provada a través de l'augment en els nivells de precursors de P2 (preP2). L'objectiu de l'actual projecte és detectar i confirmar la presència de precursors de protamina P2 en espermatozoides humans utilitzant un anticòs específic per a la part precursora de la protamina P2 del ratolí. Els resultats assolits en l'anàlisi per *Western blot* indiquen la presència de precursor de la P2 en dues mostres de testicles humans. A més, en les anàlisis per *Western blot* de les mostres de proteïnes aïllades d'espermatozoides de diferents ejaculacions es detecten bandes amb diferents mobilitats relatives en moltes de les mostres i aquest senyal varia en les diferents mostres d'ejaculació humana. Aquests resultats suggereixen que l'anticòs reconeix els precursors de la protamina P2 humana i que hi ha diferents nivells d'aquest en les diverses mostres. S'obre, per tant, la possibilitat d'analitzar mostres addicionals i de detectar la presència de precursors de la protamina P2 a través d'immunocitoquímica.

**Paraules clau** Infertilitat, protamina P2, precursor de la protamina P2 (preP2), *Western blot*, anticòs.

### Abstract

**Detection of protamine P2 precursors in the spermatozoa of infertile patients.** Previous studies have reported decreased protamine 2 levels in the sperm cells of infertile patients. Subsequently, using anti protamine P2 antibodies, evidence has been presented that patients with a decreased amount of P2 may have increased levels of P2 precursors (preP2). We have initiated a project to detect and confirm the presence of protamine P2 precursors using an antibody specific for the precursor part of the mouse protamine P2. Western analysis indicates the presence of potentially specific signals in samples from two human testis. Furthermore, Western analysis of protein samples isolated from human sperm from infertile patients also indicate the presence of bands with different mobility in many of the samples. There are also marked differences in the signal detected in the different human sperm samples. These results suggests that the antibody is recognising human P2 precursors and that different levels of P2 precursors are presents in different human sperm samples. The possibility is now open to analyse additional samples and to detect the presence of P2 precursors through immunocytochemistry.

**Key words** Infertility, protamine P2, P2 precursor (preP2), Western blot, antibody.

---

## INTRODUCCIÓ

El reemplaçament, pràcticament complet, de les histones del nucli de l'espermatozoide per les protamines té lloc en la majoria de vertebrats mitjançant un pro-

cés d'elevada complexitat (Subirana, 1985; Poccia, 1986; Mezquita *et al.*, 1985; Oliva i Dixon, 1991). Les protamines estan presents en totes les espècies de mamífers (Oliva i Dixon, 1991). En alguns mamífers (com ara la rata, el ratolí o l'home) s'ha descrit que

l'organització inicialment nucleosòmica és reemplaçada per un conjunt de proteïnes de transició (TP1 i TP2) i posteriorment per la formació de complexos de nucleoprotamina que originen una cromatina altament condensada (Dadoune, 1995).

Les protamines són proteïnes molt carregades positivament a causa de l'elevada quantitat d'arginines que contenen; en humans se'n coneixen dues formes: la protamina 1 (P1) i la protamina 2 (P2), en una raó normalment regulada i aproximada d'1/1 (Corzett *et al.*, 2002). Diversos estudis han demostrat la correlació entre una raó anormal de P1/P2 i la infertilitat masculina (Chevaillier *et al.*, 1987; Balhorn *et al.*, 1988; de Yebra *et al.*, 1993, 1998; Carrell i Liu, 2001; Aoki *et al.*, 2005). Específicament s'ha vist una reducció en el contingut de la protamina P2 en alguns pacients infèrtils i un augment del seu precursor (de Yebra *et al.*, 1998). També s'ha observat un augment en la quantitat de precursor de la P2 en ratolí *knock out* per a les proteïnes de transició (Tnp1 i Tnp2) (Zhao, *et al.*, 2004).

En aquest estudi ens hem proposat analitzar la quantitat de precursor de protamina P2 en espermatozoides humans i determinar la possible correlació de variacions en els seus nivells amb problemes d'infertilitat masculina.

## MATERIAL I MÈTODES

### *Preparació de les mostres i extracció de protamines*

L'extracció de proteïnes nuclears de testicle es va fer tal i com està descrit a partir de testicle congelat homogeneïtzat (de Yebra, 1995). El mètode d'extracció de proteïnes nuclears dels espermatozoides d'ejaculació dels pacients infèrtils es va fer a partir de mostres fresques. Es va partir d'un volum d'ejaculació de cada mostra corresponent aproximadament a  $14 \times 10^6$  espermatozoides i es va rentar amb Ham F10 1X dues vegades. Seguidament el sediment es va rentar amb Tritó X-100, Tris 1M pH 8, 1 M de  $MgCl_2$ , i finalment un rentat amb  $H_2O$  amb PMSF 1 mM. Es continuà amb el protocol descrit (de Yebra, 1995).

### *Separació i anàlisi de proteïnes*

La separació de les proteïnes es va dur a terme mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida àcid (de Yebra *et al.*, 1998). Els gels van ser tenyits amb blau de Comassie o transferits (75 V, una hora) a membranes Immobilon-P (Millipore) tal i com està descrit (de Yebra *et al.*, 1998). Una vegada hibridades les membranes amb l'anticòs anti-preP2 i després de detectar

el senyal per *Western blot* (vegeu més avall), van ser tenyides amb vermell de Ponceau (BioRad) per tal de detectar la quantitat total de proteïna transferida a la membrana.

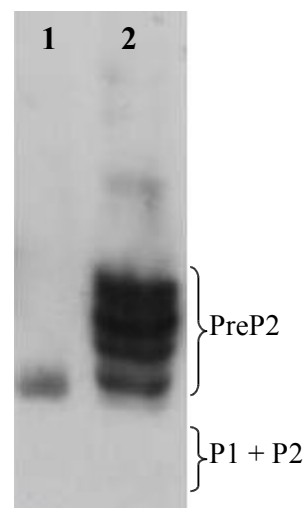
### **Immunotinció Western blot**

Les membranes van ser bloquejades amb solució 1 (1XTBS-0,1 % Tween 20) + llet desnatada al 5 % durant una hora a temperatura ambient i agitació constant i després rentades amb solució 1 tres vegades. A continuació les membranes van ser incubades amb anticòs primari contra el precursor de la P2 (Zhao *et al.*, 2004) O/N a 4° C a dilució 1:5000 o 1:2000. Es prosseguí amb tres rentats en solució 1 + 5 % de llet desnatada. S'hibridà amb anticòs secundari (ECL<sup>TM</sup>, Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody from Donkey; Amersham Biosciences) durant una hora a temperatura ambient i es revelà mitjançant el substrat de la peroxidasa (ECL<sup>TM</sup>, Western Blotting Analysis System Amersham Biosciences).

## RESULTATS

L'anàlisi *Western* de proteïnes de testicle de ratolí, control positiu, i una mostra de protamines humanes aïllades d'espermatozoides hibridat amb l'anticòs anti-preP2 demostren la presència de senyal en els dos casos (vegeu la figura 1).

L'anàlisi *Western* de set mostres de testicle humà amb anticòs contra el precursor de la protamina P2



**Figura 1** Anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2). Carril 1: protamines humanes aïllades de nuclis d'espermatozoides. Carril 2: extracció de proteïnes de testicle de ratolí, control positiu.

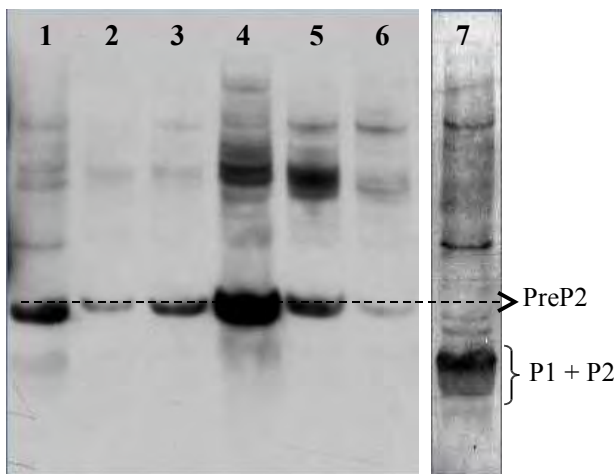
va detectar senyal a dos dels testicles corresponents a individus de disset i quaranta-tres anys, respectivament (no mostrat). La resta de mostres sense senyal corresponen a pacients d'edats més avançades, entre cinquanta-cinc i vuitanta-quatre anys, que van requerir una orquiectomia per càncer de pròstata.

Respecte a les mostres d'ejaculació, també es van observar possibles precursors de la protamina P2 en diferents quantitats i mobilitat electroforètica en les diferents mostres analitzades (vegeu la figura 2, carrils 1-6 i la figura 3). A més, també es va observar que la mobilitat relativa electroforètica dels precursors variava a les mostres de testicle respecte del senyal obtingut a partir de proteïnes d'espermatozoides de l'ejaculació.

**DISCUSSIÓ**

La detecció de senyal amb l'anticòs anti protamina P2 de ratolí en mostres de testicle de ratolí, de proteïnes humanes aïllades de nuclis d'espermatozoides (vegeu la figura 1) i de proteïnes extreïdes de testicle humà (vegeu la figura 2, carril 8) indiquen que l'anticòs de ratolí reconeix també les protamines humanes, malgrat que té tres aminoàcids diferents. Tot i així, en cinc de les mostres de teixit testicular no s'han detectat precursors. L'edat avançada d'aquests cinc pacients podria ser la raó per la qual no ha estat possible detectar evidència d'aquests precursors possiblement ja processats.

La disminució en la mobilitat de precursors de la

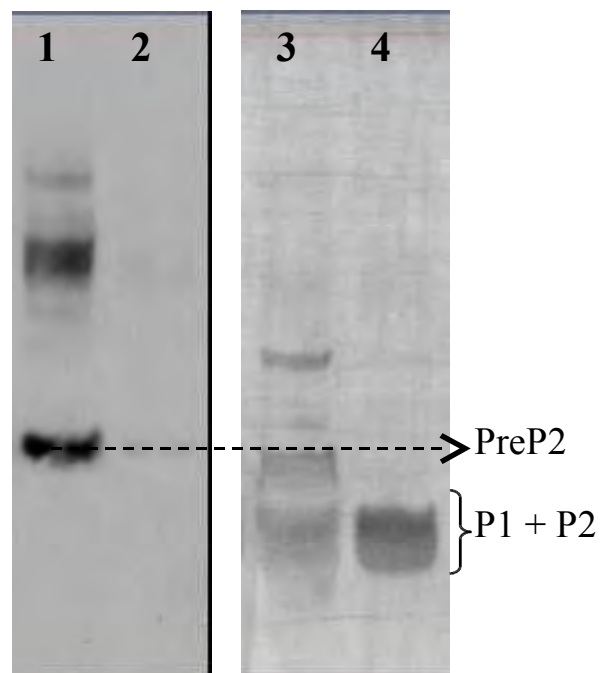


**Figura 2** Carrils 1-6: anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) de sis mostres independents de proteïnes aïllades de nuclis d'espermatozoides de diferents mostres d'ejaculació de pacients infèrtils. Carril 7: membrana tenyida amb vermell de Ponceau amb el total de proteïnes de la mostra corresponent al carril 2.

protamina P2 en el teixit testicular respecte als precursors de la P2 presents en espermatozoides seria deguda a un inferior processament del precursor de manera que tindria una major grandària i, per tant, menys mobilitat electroforètica.

A la figura 3 es poden observar grans diferències en el senyal de *Western* en dues de les mostres analitzades. En el carril 1 es detecta precursor, mentre que a la mostra del carril 2 no hi ha cap senyal. Al tenyir la membrana amb vermell de Ponceau (carrils 3 i 4), es detecta el total de proteïna de cada carril i s'observa que el carril 3 té bandes amb menys mobilitat electroforètica que les formes madures de les protamines P1 i P2, mentre a la mostra del carril 4 la majoria de bandes corresponen a protamines madures. Així, sembla que a la mostra de l'esquerra (figura 3, carril 1), menys processada, el precursor de la protamina P2 pot ser detectat mitjançant l'anàlisi *Western* a diferència de la mostra de la dreta (carril 2) que no tindria precursors, ja que s'han processat i, per tant, s'han obtingut formes madures de la protamina P2 que s'observen al carril 4.

Respecte a les bandes detectades per l'anàlisi *Western*, amb menys mobilitat electroforètica, podrien detectar diferents grups de precursors de les protamines



**Figura 3** Carrils 1 i 2: anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) de dues mostres independents de proteïnes aïllades de nuclis d'espermatozoides de dos pacients infèrtils. Carrils 3 i 4: membrana tenyida amb vermell de Ponceau amb el total de proteïnes de les mostres corresponents als carrils 1 i 2, respectivament.

P2 o ser unions inespecífiques, de manera que és necessari estudiar-ho més detalladament.

Tot i que aquest treball és preliminar, els resultats assolits reafirmen que determinats pacients infèrtils presenten menys processament del precursor de la protamina P2, que esdevé en una producció inferior de protamina P2 (de Yebra *et al.*, 1998). En propers experiments s'analitzaran els precursors de la protamina de diferents mostres addicionals d'ejaculacions de pacients infèrtils i s'intentarà correlacionar problemes d'infertilitat amb l'existència de precursors de la protamina P2 no processats. Així doncs, en aquest treball s'ha obert la possibilitat d'analitzar mostres addicionals i, a més, de detectar la presència de precursors de la protamina P2 a través d'immunocitoquímica.

## AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projectes de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D) BMC2003-03937 i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O. N. T. està subvencionada amb una Beca de l'IDIBAPS.

## BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARREL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.* [Advance Access published February 10]
- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44:52-55.
- CARRELL, D. T.; LIU, L. (2001). «Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis». *J. Androl.*, 22:604-610.
- CHEVAILLIER, P.; MAURO, N.; FENEUS, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. (1987). «Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men». *Lancet.*, 2:806-807.
- CORZETT, M.; MAZRIMAS, J.; BALHORN, R. (2002). «Protamine 1:protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals». *Mol. Reprod. Dev.*, 61:519-527.
- DADOUNE, J. P. (1995). «The nuclear status of human sperm cells». *Micron.*, 26:323-345.
- DE YEBRA, M. (1995). *Alteracions del contingut de nucleoproteïnes de les cèl·lules espermàtiques. Relació amb la infertilitat en l'home*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10553-10557.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69:755-759.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin proteins and chromatin structure in spermatogenesis». Dins: REEK, G. R.; GOODWIN, G. H.; PUIGDOMENECH, P. *Chromosomal Proteins and Gene Expression*. Nova York: Plenum Press, p. 315-332.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prot. nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94.
- POCCIA, D. (1996). «Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development». *International Review of Cytology*, 105:1-65
- SUBIRANA, J. A. (1982). «Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA». Dins: ANDRÉ, J. *The Sperm Cell*. L'Haia: Martinus Nijhoff, p. 197-213.
- ZHAO, M.; SHIRLEY, C. R.; HAYASHI, S.; MARCON, L.; MOHAPATRA, B.; SUGANUMA, R.; BEHRINGER, R. R.; BOISSONNEAULT, G.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M. L. (2004). «Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development». *Genesis*, 38:200-213.