

## CORRELACIÓ DE PROTEÏNES DE L'ESPERMATOZOIDE HUMÀ AMB LA INTEGRITAT DEL DNA, AMB EL CONTINGUT DE PROTAMINES I AMB ELS NIVELLS DE PRECURSOR DE PROTAMINA 2

Sara de Mateo,<sup>1</sup> Juan Martínez-Heredia,<sup>1</sup> Jose Manuel Vidal-Taboada,<sup>1</sup> David Domínguez-Fandos,<sup>1</sup>  
Josep M. Estanyol,<sup>3</sup> Jose Luis Balleca,<sup>2</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. [roliva@ub.edu](mailto:roliva@ub.edu).

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

[balleca@clinic.ub.es](mailto:balleca@clinic.ub.es).

<sup>3</sup>Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, SCT-PCB-IDIBAPS

[jmestanyol@ub.edu](mailto:jmestanyol@ub.edu).

---

### Resum

La tècnica de gels bidimensionals ha permès descriure al voltant de 98 proteïnes que es troben a l'espermatozoide humà (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). Aquest treball ha caracteritzat una gran diversitat de proteïnes pel que fa a la seva localització i funció. Estudis de fertilitat masculina indiquen que la integritat del DNA, la relació de protamines i la presència de precursor de protamina P2 són de gran importància (Torregrosa *et al.*, 2006). Per tant, en aquest estudi s'ha caracteritzat la relació en l'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes amb paràmetres com la relació P1/P2, la presència de precursors de P2 i el dany en el DNA amb la tècnica de TUNEL. També s'ha trobat una gran quantitat de proteïnes en què l'expressió es correlaciona molt significativament amb l'expressió d'altres proteïnes. Això ens pot portar a identificar la funció d'aquestes proteïnes a l'espermatozoide humà i, per tant, a esbrinar algunes causes d'infertilitat masculina i, en futurs estudis, la possible utilitat diagnòstica i de tractament.

**Paraules clau** Infertilitat, proteòmica, protamina P2, precursor de protamina P2 (preP2), TUNEL.

### Abstract

2D SDS-PAGE assay has allowed us to describe around 98 proteins of the human spermatozoa (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). This study has identified a large diversity of proteins with different localization and function. It is also known that the DNA integrity, the protamine ratio and the detection of protamine P2 precursor are important in the study of human fertility (Torregrosa *et al.*, 2006). Therefore, in this study we have described the relation between the protein expression of some proteins of the human spermatozoa and the P1/P2 ratio, the presence of P2 precursor and the DNA integrity by TUNEL assay. We have also found a large number of protein with a expression that correlates with that of other proteins at a high significance. These findings could allow us to identify the function of these proteins in the human spermatozoa and to identify some causes of male infertility. In further studies it may also be useful as a diagnosis tool or to orient the treatment.

**Key words** Infecundity, proteomics, protamines, protamine P2 precursor (preP2), TUNEL assay.

---

## INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

L'espermatozoide humà conté una gran multitud d'altres proteïnes a més de les ja esmentades protamines que compacten el DNA (Oliva i Dixon, 1991). Actualment s'està intentat esbrinar quines són aquestes proteïnes addicionals. Tot i així, el contin-

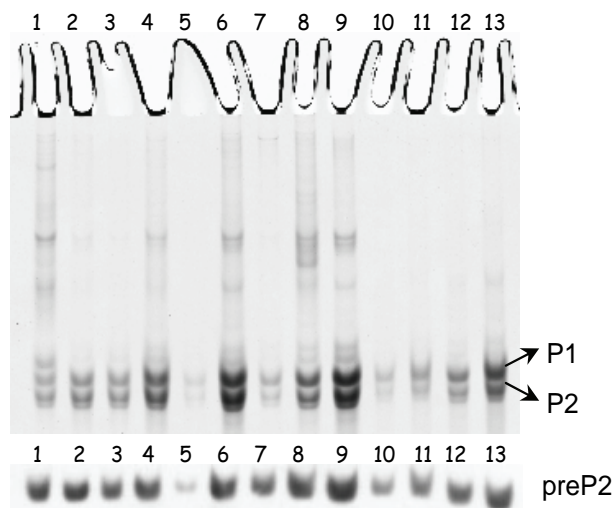
gut de proteïnes de l'espermatozoide humà ja es troba parcialment descrit amb la utilització de la tècnica de gels bidimensionals i la tecnologia MALDI-TOF en l'article del nostre grup publicat a *Proteomics* (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). En aquest treball es van picar els *spots* més intensos dels gels 2D i es van identificar 98 proteïnes diferents.

Les protamines són les encarregades d'empaquetar el nucli de l'espermatozoide dins d'una estructura compacta i aerodinàmica gràcies a l'elevada proporció d'arginines que conté la seva seqüència. Una relació de protamines (P1/P2) anòmala i la presència de precursor de protamina P2 (preP2/P2) en els espermatozoides humans està relacionat amb infertilitat (Balhorn *et al.*, 1988; de Yebra *et al.*, 1993, 1998; Aoki *et al.*, 2005; Torregrosa *et al.*, 2006). A més, la valoració del dany al DNA amb la tècnica de TUNEL, que ens permet identificar les cèl·lules apoptòtiques, també mostra una relació amb la infertilitat masculina (Oosterhuis *et al.*, 2000; Torregrosa *et al.*, 2006).

Totes aquestes dades ens han dut a fer aquest estudi, en què es volen trobar relacions entre l'expressió de certes proteïnes de l'espermatozoide humà i els paràmetres ja descrits com a importants per a la infertilitat humana masculina. Sobretot volem identificar aquelles proteïnes que tenen diferències significatives i esbrinar la seva funció en l'espermatozoide i la seva relació amb la causa de la infertilitat.

### Mostres

Aquest estudi s'ha fet amb 44 mostres de semen humà de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb el previ consentiment informat dels pacients, i 10 donants de semen com a controls. D'aquestes 54 mostres es van fer gels 2D amb dues o més rèpliques per augmentar la fiabilitat



**Figura 1** Gel de poliacrilamida acídica tenyit amb Comassie Blue en què es poden observar la protamina P1 i protamina P2 de diverses mostres (carrils 1 al 9) i de l'estàndard de protamines (carrils 10 al 13). A sota veiem una membrana hibridada amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) i la seva detecció quimioluminiscent. Aquest Western Blot correspon a la rèplica del gel tenyit amb Comassie que observem a sobre.

dels resultats. Es va determinar el dany del DNA amb la tècnica de TUNEL de 30 mostres, i la relació de protamines i la determinació de presència de preP2 de 34 mostres. A l'estadística s'han fet servir 101 *spots* dels gels 2D per tal de comparar la intensitat normalitzada d'aquests amb estratificació amb P1/P2, preP2/P2 i dany nuclear.

### Determinació de l'expressió de les proteïnes amb gels bidimensionals

Els gels 2D es van fer segons la metodologia descrita a l'article de Martínez *et al.* (2006). Es van seleccionar els espermatozoides de les altres cèl·lules amb un gradient de Percoll al 50 % (Mengual *et al.*, 2003), es van lisar les cèl·lules i les proteïnes es van separar segons el seu punt isoelèctric (primera dimensió) en tires de 17 cm i un pH de 5 a 8. La segona dimensió o separació per pes molecular es va fer amb gels de SDS al 12 % d'acrilamida. Amb tinció argèntica es van posar de manifest els *spots* que componen les proteïnes de l'espermatozoide. La densitat normalitzada d'un conjunt de 101 *spots* es va determinar amb el programari de BioRad PD-Quest. S'aparellen (*matching*) els *spots* que tenen el mateix punt isoelèctric i el mateix pes molecular com la mateixa proteïna i es comparen les densitats d'aquests entre grups de pacients.

### Determinació de la relació P1/P2 i preP2/P2

L'extracció i determinació de la relació de protamines i la presència de precursor de P2 es troba descrita a l'article del nostre grup de Torregrosa *et al.* (2006). Es van extreure les proteïnes nuclears segons el protocol descrit a de Yebra *et al.* (2005). Aquestes es van separar amb un gel de poliacrilamida acídica per replicat. Un dels gels es va tenyir amb Comassie Blue i l'altre es va transferir a una membrana per a la determinació de precursor de preP2 mitjançant immunotinció quimioluminiscent i Western Blot (figura 1). La membrana es va hibridar amb l'anticòs contra preP2 i es va detectar amb un anticòs secundari que genera un producte quimioluminiscent. Les densitats de P1 i P2 del gel tenyit amb Comassie i la densitat de la banda de preP2 del gel transferit es van determinar amb el programari de BioRad Quantity One.

### Determinació del dany del DNA amb TUNEL

La determinació del dany nuclear o d'apoptosi es va fer segons Torregrosa *et al.* (2006). Es va identificar el percentatge d'espermatozoides TUNEL positius de cada mostra (caps amb fluorescència verda forta)

fent servir l'observació al microscopi òptic de fluorescència amb dos observadors.

### Anàlisi estadística

Mitjançant el programa estadístic SPSS es van determinar les diferències de densitats dels *spots* estratificant segons els paràmetres abans esmentats amb la prova estadística no paramètrica Mann-Whitney. Es van estratificar les mostres segons la relació de protamines en quatre grups: donants, mostres amb P1/P2 normal ( $<$  mitjana dels donants  $\pm$  una desviació estàndard  $<$ ), mostres amb P1/P2 baixa ( $<$  mitjana donants  $\pm$  una desviació estàndard) i mostres amb P1/P2 alta ( $>$  mitjana  $\pm$  desviació estàndard) i es van comparar aquests grups de dos en dos. Es van analitzar estadísticament les diferències d'expressió de proteïnes entre les mostres amb valors extrems de precursor de protamina P2 i de percentatge d'esper-

matozoides TUNEL positius. Les correlacions d'Spearman de les proteïnes amb diferències significatives també es van caracteritzar. A més, es va explorar la possibilitat de trobar proteïnes que tenen una expressió que es correlaciona amb l'expressió d'una altra proteïna. Sorprenentment, es va trobar un conjunt de proteïnes que sembla que es troben relacionades pel que fa a la seva expressió. Es determina una diferència significativa amb  $p < 0,05$  tant per Mann-Whitney com per Spearman.

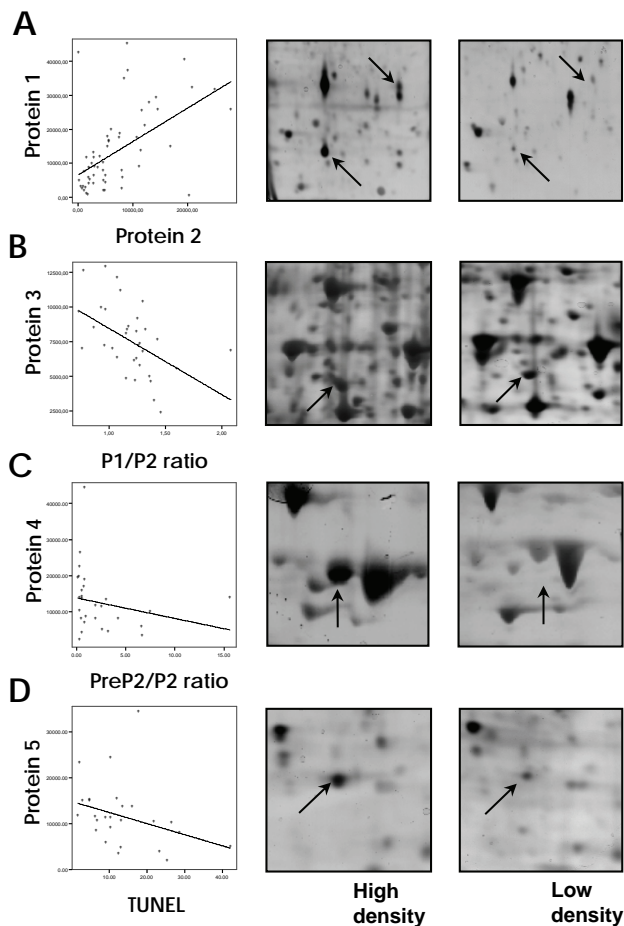
### RESULTATS I DISCUSSIÓ

Estratificant les mostres amb valors de protamines trobem que 20 proteïnes tenen expressió diferencial entre els donants (mitjana = 1,23; desv. est. = 0,16) i les mostres amb P1/P2 normal (1,07-1,39), 16 proteïnes entre donants i mostres amb P1/P2 baixa ( $<$  1,07) i 9 proteïnes entre donants i mostres amb P1/P2 alta ( $>$  1,39). També s'han trobat altres proteïnes que tenen diferències d'expressió comparant les densitats d'aquestes entre els grups de mostres amb P1/P2 normal, baixa i alta. Només una de totes aquestes proteïnes té una correlació significativa amb P1/P2 (figura 2B).

La determinació de la presència de precursor de P2 i la comparació entre les mostres amb més i menys quantitat de preP2 ens indica que hi ha quatre proteïnes que tenen significativament diferent la seva expressió. Hi ha vuit proteïnes més que es troben sobreexpressades a les mostres amb més proporció d'espermatozoides TUNEL positius i una proteïna subexpressada en aquest grup extrem. Tant les quatre proteïnes trobades amb preP2/P2 i les nou amb TUNEL presenten correlacions significatives amb el paràmetre estudiat (figura 2C i D).

Per finalitzar, hem trobat 64 parells de proteïnes en què la seva expressió es correlaciona amb una significació menor de 0,001 i un coeficient de correlació major de  $\pm 0,5$  (figura 2A).

Determinem com a valor de normalitat de relació P1/P2 la mitjana dels donants utilitzats en aquest estudi  $\pm$  una desviació estàndard. Així, hem agrupat els pacients segons el seu valor de P1/P2 en quatre grups: P1/P2 normal, baixa, alta i donants. Comparant les densitats de les proteïnes entre el grup de donants i el grup de pacients amb P1/P2 normal observem que hi ha un gran nombre de proteïnes amb diferències d'expressió. Això ens pot indicar que hi ha altres anomalies en l'espermatozoide, que no es relacionen amb el contingut de protamines, i que fan que els pacients tinguin problemes de fertilitat. Aquestes altres anomalies en l'espermatozoide poden estar relacionades amb aquestes proteïnes dife-



**Figura 2** A) Diagrama de dispersió d'un parell de proteïnes que tenen una correlació d'Spearman  $<$  0,001 i un coeficient de correlació  $>$  0,5. Al costat dret veiem la comprovació visual de la diferència d'expressió d'aquestes dos proteïnes. B) Diagrama de dispersió d'una proteïna que té una correlació significativa ( $P < 0,05$ ) amb P1/P2. C) PreP2/P2 i D) TUNEL, i al costat dret les comprovacions visuals de cadascuna.

rencials. Com calia esperar, també trobem una gran varietat de proteïnes que es trobem més o menys expressades en pacients amb P1/P2 baixa o alta comparat amb els donants. Aquestes proteïnes són de gran importància, ja que ens poden portar a identificar quines són importants en l'empaquetament correcte del nucli espermàtic i, per tant, quines són importants en la fertilitat masculina.

La reducció de protamina 2 i l'augment del seu precursor també es relacionen amb la mala qualitat dels espermatozoides (de Yebra *et al.*, 1998). Hem trobat un conjunt de proteïnes que tenen expressió diferencial entre els grups de pacients amb elevat i baix contingut de preP2. L'estudi d'aquestes proteïnes també ens podria indicar les causes o conseqüències de l'elevada presència de precursor i, per tant, la seva relació amb la infertilitat.

Pel que fa a la integritat del DNA, se sap que un elevat dany provoca una reducció de la viabilitat dels espermatozoides i que aquest dany està relacionat amb el contingut de protamines (Aoki *et al.*, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006). Això ens indica que les proteïnes que es troben sub o sobreexpressades en els espermatozoides amb elevat dany al DNA són importants per a futurs estudis de fertilitat. Un exemple d'algunes d'aquestes proteïnes són les subunitats del proteasoma.

La troballa més sorprenent d'aquest treball és la enorme quantitat de proteïnes en què la seva expressió es troba relacionada amb l'expressió d'altres proteïnes amb una significació molt elevada ( $p < 0,001$ ). És de gran importància determinar quina relació hi ha entre aquestes proteïnes per tal de trobar quines vies moleculars poden estar afectades en la infertilitat.

Aquest treball ens està donant una gran informació per a trobar les causes moleculars d'alguns casos d'infertilitat masculina. Posteriors estudis ens ajudaran a entendre quina és la funció d'aquestes proteïnes, la seva localització en l'espermatozoide amb tècniques d'immunocitoquímica que ja s'estan posant en marxa, i la possible utilització d'aquestes proteïnes com a diagnòstic i potser com a orientació en el tractament d'algunes causes d'infertilitat humana masculina.

## AGRAÏMENTS

Subvencionat amb el projecte de recerca del Ministeri de Ciència i Tecnologia U-2006-BMC03479-O (Plan Nacional I+D) i per fons europeus. S. de M. es troba subvencionada per la beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya FI.

## BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.* 20: 1298-1306.
- AOKI, V. W.; EMERY, B. R.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2006). «Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity». *J. Androl.*, 27: 890-898.
- DE YEBRA, M.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.
- DE YEBRA, M. (1995). *Alteracions del contingut de nucleoproteïnes de les cèl·lules espermàtides. Relació amb la infertilitat en l'home*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- 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.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J., ESTANYOL, J. M., BALLESCÀ, J. L., OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6: 4356-4369.
- MENGUAL, L. (2003). *Infertilitat masculina: causes, factors de risc genètic i caracterització molecular dels espermatozoides*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- TORREGROSA, N.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M. I.; SHIRLEY, C. R.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients». *Hum. Reprod.*, 21: 2084-2089.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Protamine genes and the histone to protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- OOSTERHUIS, G. J.; MULDER, A. B.; KALSBECK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C. B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES, I. (2000). «Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?». *Fertil. Steril.*, 74: 245-250.