

## AÏLLAMENT DEL NUCLI D'ESPERMATOZOIDES HUMANS I ANÀLISI DEL SEU PROTEOMA

Sara de Mateo,<sup>1</sup> Josep Maria Estanyol,<sup>2</sup> José Luís Ballecà<sup>3</sup> i Rafael Oliva<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

<sup>3</sup> Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial.

---

### Resum

Recents estudis publicats pel nostre laboratori van descriure parcialment el proteoma de l'espermatozoide humà gràcies a la tècnica de gels 2D i l'anàlisi MALDI-TOF MS. En aquests estudis es van trobar diverses proteïnes nuclears, com són factors de transcripció, que podrien indicar que l'espermatozoide també té el potencial de proporcionar aquestes proteïnes a l'oòcit. Aquest treball s'ha enfocat en la descripció del proteoma nuclear de caps aïllats d'espermatozoides humans. Hem obtingut caps d'espermatozoides segons dues metodologies diferents: sonicació i tractament amb CTAB. Ambdues metodologies són convenients per a l'obtenció de caps d'espermatozoides. Tanmateix, l'eficàcia del tractament amb CTAB és més alta que amb sonicació. Hem aconseguit així el 100 % de caps sense cap fragment de cua connectat a través de l'estratègia del CTAB, i la seva puresa s'ha provat amb microscòpia electrònica. Una vegada els caps d'espermatozoides humans van ser aïllats, les seves proteïnes nuclears van ser extretes i analitzades per espectrometria de masses. La identificació de diversos tipus diferents d'histones no ens va sorprendre, ja que més del 15 % del DNA dels espermatozoides es troba empaquetat amb histones i el 85 % amb protamines. Altres proteïnes també van ser identificades i localitzades al nucli de l'espermatozoide per primera vegada en el model humà. Per tant, serà interessant aclarir la funció d'aquestes proteïnes en l'espermatozoide humà madur i explorar el seu paper potencial en el procés de fertilització.

**Paraules clau:** proteòmica, sonicació, CTAB, espectrometria de masses.

### Abstract

Previous recent studies in our laboratory have contributed with the identification of the whole human sperm proteome using a 2D approach followed by MALDI-TOF MS analysis. Several nuclear proteins, some potentially involved in transcription, were detected indicating that the sperm cell also has the potential to deliver these proteins to the oocyte. In the present work we have focused in the sperm nuclear proteomic identification using isolated human sperm heads. We have isolated sperm heads using two different methodologies, sonication and CTAB treatment. Both methodologies were suitable to obtain sperm heads, however, efficiency of CTAB treatment was higher than sonication. Nearly 100% of heads without any tail fragments attached to them were obtained by CTAB and their purity was also tested by electron microscopy. Once human sperm heads were isolated, nuclear sperm proteins were separated by 2D, excised from the gels and analyzed with mass spectrometry. The identification of several different types of histones was expected as approximately 15% of sperm DNA is known to be compacted by histones and 85% by protamines. However several additional proteins were also identified for the first time, and hence, localized in sperm nucleus. Therefore, it will be interesting to find out the function of these proteins in mature spermatozoa and to explore its potential role in the subsequent fertilization process.

**Key words:** proteomics, sonication, CTAB, mass spectrometry.

---

## INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

L'espermatozoide humà és una cèl·lula molt accessible que es pot purificar i estudiar fàcilment. Recentment s'han publicat articles en què es descriuen a gran escala la composició proteica d'aquests esper-

matozoides gràcies a la tecnologia d'espectrometria de masses (Baker *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2009). El nostre laboratori també ha col·laborat en la descripció proteòmica de l'espermatozoide humà gràcies a la tècnica de gels bidimensionals i l'anàlisi MALDI-TOF MS (Martínez-Heredia *et al.*, 2006, Mateo *et*

*al.*, 2007). En aquest treball es van trobar diverses proteïnes involucrades en transcripció i d'altres processos nuclear, i això indica que l'espermatozoide podria tenir també el potencial de proporcionar aquestes proteïnes a l'oòcit per al desenvolupament zigòtic. L'estudi que es presenta aquí es troba enfocat en l'aïllament de caps d'espermatozoide humà mitjançant dues metodologies diferents: la sonicació i el tractament amb CTAB (vegeu la figura 1). Posteriorment s'intenta descriure el proteoma nuclear gràcies a l'espectrometria de masses.

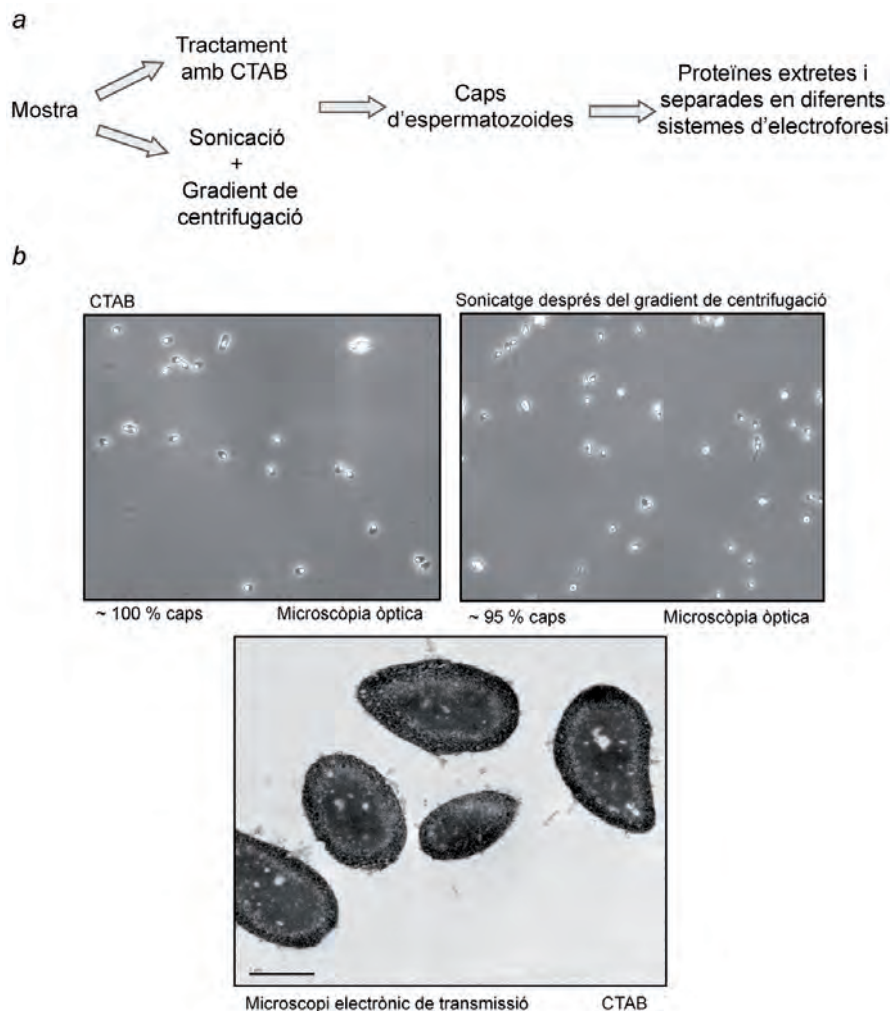
### Sonicació

Les mostres amb un alt comptatge ( $> 200 \times 10^6$  espermatozoides totals) van ser sonicades uns minuts en gel i es va fer un seguiment de l'eliminació de les

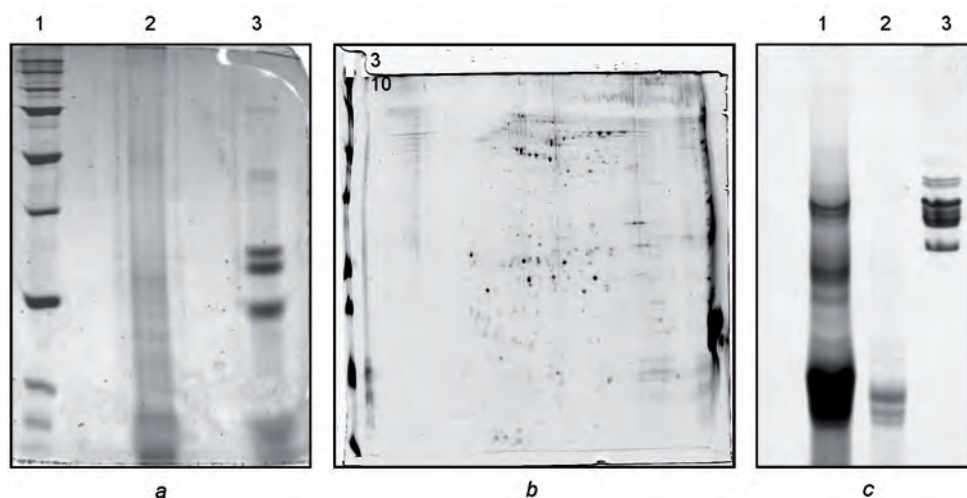
cues amb el microscopi òptic. Les mostres van ser sonicades fins que almenys un 80 % de les cèl·lules espermàtiques no presentaven visiblement cap tros de cua adherida. Seguidament, un gradient de densitat consistent en un primer coixí de 0,40 mg/ml CsCl, un segon coixí de sacarosa 2 M i finalment el sonicat sobre aquests dos coixins, va ser ultracentrifugat a 100.000 g uns 45 min. El sediment es va resuspendre en 50 mM Tris pH 7,4 (Sotolongo *et al.*, 2005).

### Tractament amb CTAB

Les mostres que també presentaven un alt comptatge, prèviament netejades, van ser incubades amb 1 % CTAB a 4 °C uns 30 min i els caps espermàtics van ser obtinguts després de diversos rentats i centri-



**Figura 1.** Aïllament de caps d'espermatozoides humans. *a)* Protocol d'aïllament de caps, extracció i separació de proteïnes nuclears. *b)* Imatges de caps d'espermatozoide, amb microscòpia òptica i electrònica.



**Figura 2.** Proteïnes nuclears de caps d'espermatozoide d'humà. *a)* Gel monodimensional SDS-PAGE; carril 1, estàndard de pes molecular; carril 2, mostra; carril 3, estàndard d'histones. *b)* Gel bidimensional amb tires de 17 cm i pH de 3-10 (BioRad). *c)* Gel àcid; carril 1, mostra; carril 2, estàndard de protamines; carril 3, estàndard d'histones.

fugacions suplementats amb 0,05 % de digitonina per minimitzar l'agrupació dels nuclis (Wykes i Krawetz, 2003).

#### **Gels bidimensionals, SDS-PAGE i àcids per a la identificació de proteïnes**

Una vegada els caps d'espermatozoide humà van ser aïllats, les proteïnes nuclears van ser extretes i separades amb electroforesi monodimensional SDS-PAGE, gels bidimensionals segons Mateo *et al.* (2007) i gels àcids segons Mateo *et al.* (2008). Els *spots*-bandes d'aquests gels (vegeu la figura 2) van ser escindits i identificats amb espectrometria de masses (MALDI-TOF o MS/MS), tal com es descriu a Martínez-Heredia *et al.* (2006).

## **RESULTATS I DISCUSSIÓ**

Tant la sonicació com el tractament amb CTAB van ser adequats per obtenir caps d'espermatozoides humans aïllats, sense cap tros de cua adherit. No obstant això, el tractament amb CTAB ofereix una eficiència major que la sonicació. Després del gradient de centrifugació de les mostres sonicades, al voltant del 90 % dels caps espermàtics sense cua van ser recuperats, però es van trobar diferents eficiències i el temps de sonicació necessari variava entre les mostres utilitzades. D'altra banda, quasi el 100 % de caps sense cap fragment de cua unit van ser detectats amb l'aïllament amb CTAB en totes les mostres ana-

litzades. La puresa dels caps obtinguts amb CTAB va ser també testejat amb el microscopi electrònic per assegurar-nos de no tenir cap tros de cua adherida que no poguéssim veure amb el microscopi òptic (vegeu la figura 1). La figura 2 mostra les proteïnes extretes dels caps espermàtics carregats a un gel monodimensional SDS-PAGE, a un gel bidimensional i a un gel monodimensional àcid. Els resultats preliminars d'identificació de proteïnes es van obtenir gràcies a l'escissió de *spots*/bandes dels gels, seguida de l'anàlisi d'aquests per espectrometria de masses. Diversos tipus d'histones i altres proteïnes addicionals van ser identificats. Altres estudis d'immunofluorescència estan sent realitzats per immunolocalitzar al cap de l'espermatozoide aquestes proteïnes noves i, per tant, per confirmar la seva localització nuclear.

Concloem, per tant, que la detecció d'histones no ens va sorprendre, ja que vora el 15 % del DNA dels espermatozoides està compactat per histones i el 85 % per protamines. La principal troballa nova és que altres proteïnes han estat també identificades i, per tant, localitzades en el nucli espermàtic per primera vegada. Alguns d'aquests resultats es troben en concordança amb el fet que la formació del cap transcorre durant l'espermioogènesi gràcies a la natura d'algunes de les proteïnes identificades en aquest treball. Per tant, descobrir la funció d'aquestes proteïnes en l'espermatozoide madur i explorar el seu paper potencial en el procés de fertilització serà un tema important a estudiar (Oliva *et al.*, 2008, 2009).

## AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479 i per fons europeus. S. de M. es troba subvencionada per una beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya FI.

## BIBLIOGRAFIA

- BAKER, M. A.; REEVES, G.; HETHERINGTON, L.; MÜLLER, J.; BAUR, I.; AITKEN, R. J. (2007). «Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis». *Proteomic*, 1: 524-532.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6(15): 4356-4369.
- MATEO, S. DE; GÁZQUEZ, C.; GUIMERÀ, M.; BALASH, J.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2008). «Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome». *Fertil. Steril.*, 91(3): 715-722.
- MATEO, S. DE; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa». *Proteomics*, 7(23): 4264-4277.
- OLIVA, R.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M. (2008). «Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(1): 23-36.
- OLIVA, R.; MATEO, S. DE; ESTANYOL, J. M. (2009). «Sperm cell proteomics». *Proteomics*, 9(4): 1004-1017.
- SOTOLONGO, B.; HUANG, T. T.; ISENBERGER, E.; WARD, W. S. (2005). «An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments». *J. Androl.*, 26(2): 272-280.
- WYKES, S. M.; KRAWETZ, S. A. (2003). «The structural organization of sperm chromatin». *J. Biol. Chem.*, 278(32): 29471-29477.