Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 33-38 (2022)

ALTERACIONS EN EL PROCESSAMENT DE LA PROTAMINA 2 EN PACIENTS INFÈRTILS NORMOZOOSPÈRMICS DETECTADES MITJANÇANT EXPECTROMETRIA DE MASSES

Judit Castillo[1#*], Marina Gay[2#], Alberto de la Iglesia[1], Gianluca Arauz-Garofalo[2], Ada Soler-Ventura[1], Mar Vilanova[2], Marc Palmada[1], Juan Manuel Corral[4], Marta Guimerà[5], Alicia Diez[5], Marta Vilaseca[2], Meritxell Jodar[1,3*], Rafael Oliva[1*]

[1] Grup de Biologia Molecular de la Reproducció i el Desenvolupament, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica i Universitat de Barcelona. Casanova 143, 08036, Barcelona.
[2] Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Baldiri Reixac 10-12, 08028, Barcelona.
[3] Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, 08036, Barcelona.
[4] Servei d'Urologia, Unitat d'Andrologia i Institut Clínic de Nefrologia i Urologia (ICNU) de l'Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, 08036, Barcelona.
[5] Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia (ICGON) de l'Hospital Clínic de Barcelona. Rosselló, 161, 08036, Barcelona.
Ambdues autores han contribuït igual a l'estudi.
*Autors corresponents: Judit Castillo (juditcastillo@ub.edu), Meritxell Jodar (mjodar@clinic.cat) i Rafael Oliva (roliva@ub.edu).

Resum

El DNA de l'espermatozoide humà presenta el 85-95% del DNA empaquetat per protamines, unes proteïnes petites i extremadament bàsiques que donen lloc a una cromatina amb estructura única i altament compacta. Mitjançant l'aplicació de tècniques d'alt rendiment com la espectrometria de masses *Top-Down* (TD) a l'estudi de les protamines de l'espermatozoide madur, s'han identificat proteoformes madures i immadures intactes, truncades i modificades. Per tant, la cromatina espermàtica presenta diversos nivells d'informació, resultant en una complexitat elevada que suggereix que les protamines podrien estar influint no només en l'accessibilitat del material genètic si no també en la funcionalitat de l'espermatozoide. De fet, el desequilibri en la relació protamina 1/protamina 2 (P1/P2), quantificada per mètodes convencionals, ha estat relacionat amb casos d'infertilitat masculina. Tot i això, les desregulacions específiques que resultarien en una relació P1/P2 alterada encara no s'han establert. En aquest estudi hem aplicat la espectrometria de masses TD per identificar alteracions del perfil de proteoformes de les protamines que puguin explicar la relació P1/P2 alterada en pacients infèrtils normozoospèrmics. Els resultats mostren que l'abundància de proteoformes immadures de la P2 respecte a les seves proteoformes madures és significativament superior en els pacients amb relació P1/P2 alterada. Aquesta desregulació es dona per l'alteració específica de les formes intermèdies HPS1 i HPI2, suggerint un mal processament de la P2 en aquests pacients. El coneixement específic d'aquestes alteracions obre una porta al desenvolupament d'estratègies per identificar i adreçar noves causes moleculars d'infertilitat masculina.

Abstract

A substantial amount (85-95%) of the human sperm DNA is packaged by protamines, which are small and extremely basic proteins that give rise to a chromatin with a unique and highly compacted structure. By applying high-throughput techniques to the study of mature sperm protamines, such as the Top-Down (TD) Mass Spectrometry, several mature and immature intact, truncated and modified proteoforms have been identified. These data add layers of information into the sperm chromatin, resulting in a high complexity that suggests that protamines may affect not only the accessibility of the genetic information but also the sperm functionality. In fact, the imbalance in the protamine 1/protamine 2 ratio (P1/P2), quantified by conventional methods, has been associated with male infertility. However, the specific deregulations that would result in an altered P1/P2 ratio have not yet been established. In this study, we applied TD Mass Spectrometry to identify alterations in the protamine proteoforms profile that may

explain the altered P1/P2 ratio in infertile normozoospermic patients. The results show that the abundance of immature P2 proteoforms in comparison to that of the mature proteoforms is significantly higher in patients with altered P1/P2 ratio. This deregulation is due to the specific alteration of the HPS1 and HPI2 intermediate forms, suggesting a disrupted processing of P2 in these patients. Specific knowledge of these alterations will allow the development of strategies to identify and address new molecular causes of male infertility.

INTRODUCCIÓ

L'espermatozoide humà conté una estructura de la cromatina única amb un 85-95% del DNA condensat per protamines en estructures toroidals extremadament compactes i un 5-15% associat a histones en estructures nucleosòmiques més accessibles (Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Oliva and Castillo, 2011; Castillo *et al.*, 2014). Aquesta distribució no es dona a l'atzar i constitueix una marca epigenètica molt rellevant per a la fertilització i el desenvolupament embrionari pre-implantacional (Castillo *et al.*, 2014).

Els espermatozoides humans presenten dos tipus de protamines madures, la protamina 1 (P1), de 51 aminoàcids, i la família de la protamina 2 (P2), que està formada pels components HP2, HP3 i HP4. La P2 és el resultat del processament per proteòlisi d'un precursor comú de 102 aminoàcids (Pre-P2) que resulta en els tres components madurs que difereixen entre si en només 1-4 aminoàcids de l'extrem N terminal (Oliva, 2006; Balhorn, 2007). El Pre-P2 també dona lloc a altres proteoformes immadures, com son la HPI1, la HPI2, la HPS1 i la HPS2, la funció de les quals en l'espermatozoide madur és desconeguda (de Mateo *et al.*, 2012). A més, mitjançant espectrometria de masses *Top-Down* (TD), el nostre grup ha identificat recentment diverses proteoformes de protamines truncades i proteoformes amb modificacions post-traduccionals, principalment fosforilacions, en l'espermatozoide humà (Soler-Ventura *et al.*, 2020; Arauz-Garofalo *et al.*, 2021). Tot això evidencia que el paper de les protamines en el empaquetament del DNA patern és més complex del que es creia.

Diversos estudis relacionen possibles alteracions en el perfil de proteoformes de les protamines humanes amb casos d'infertilitat masculina. Per exemple, la fosforilació de les protamines és necessària per a una correcta remodelació de la cromatina espermàtica durant la espermatogènesi (Oliva and Dixon, 1991; Papoutsopoulou *et al.*, 1999) i alteracions en el seu patró, tant en les proteoformes madures com en les immadures, afectarien a la capacitat fertilitzant dels espermatozoides (Wu *et al.*, 2000; Azpiazu *et al.*, 2014; Itoh *et al.*, 2019). D'altra banda, relacions P1/P2, determinades per mètodes electroforètics convencionals, per fora del rang establert com normal (0,8-1,2) s'han associat amb dany en el DNA espermàtic i desajustos en els processos de fertilització i desenvolupament embrionari (Castillo *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2016). No obstant, s'han detectat discrepàncies entre diferents estudis, fent que l'impacte real de les alteracions en els nivells de protamines, així com la seva causa, encara no es trobin del tot clarificats. Per tal d'incrementar el coneixement de les proteoformes de les protamines i la seva relació amb casos d'infertilitat d'origen desconegut, en aquest estudi hem aplicat espectrometria de masses TD per identificar alteracions en el perfil de proteoformes de les protamines d'espermatozoides normals que puguin explicar la presència d'una relació P1/P2 alterada.

MATERIAL I MÈTODES

Recol·lecció i processament de les mostres biològiques. Les mostres de semen van ser obtingudes, sota previ consentiment informat, d'homes que acudeixen a la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona per dur a terme un seminograma d'avaluació de la fertilitat. Els ejaculats van ser recollits després de 3-5 dies d'abstinència sexual i l'avaluació dels paràmetres seminals es va dur a terme amb el sistema CASA. Només aquelles mostres classificades com a normozoospèrmiques d'acord a les guies de la Organització Mundial de la Salut van ser incloses a l'estudi (World of Health Organization,

2010). Els espermatozoides van ser purificats per gradient de densitat al 50% i la presència de cèl·lules contaminants es va monitoritzar per microscòpia òptica. Mostres amb >1% de cèl·lules contaminants es van excloure de l'estudi.

Extracció i purificació de protamines. Els espermatozoides purificats van ser sotmesos a una extracció àcida de protamines, seguint protocols estandarditzats pel nostre grup de recerca (Soler-Ventura et al., 2018). És important destacar que primerament es va realitzar una extracció específica d'histones i altres proteïnes bàsiques associades de forma feble al DNA que poguessin interferir en les anàlisis per espectrometria de masses, mitjançant tractaments consecutius amb HCl 0,5M a 37°C (Soler-Ventura et al., 2018). Una vegada obtingut l'extracte de protamines purificades, una alíquota de cada mostra es va analitzar per electroforesi àcida en gels d'urea i acrilamida (*acid-urea polyacrilamide gel electrophoresis*, AU-PAGE) juntament amb quantitats creixents d'un estàndard de protamines humanes (Mengual et al., 2003), per tal de quantificar les protamines P1 i P2. Segons la relació P1/P2, les mostres es van dividir en dos grups: normals (N) si presentaven una relació P1/P2 entre 0,8 i 1,2 (n=5) i alterades (A) si presentaven una relació P1/P2 per fora d'aquest rang (n=3).

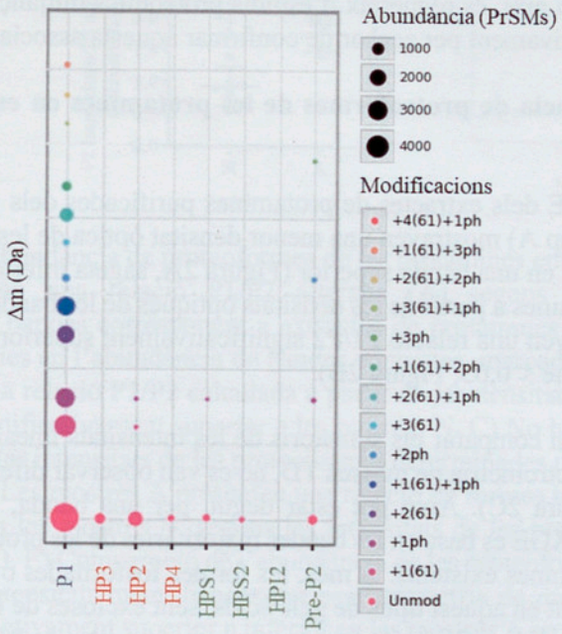

Figura 1. Proteoformes de protamines humanes identificades en espermatozoides normals (n=5) per espectrometria de masses *Top-Down*. El color de la rodona indica diferents tipus de modificacions a la protamina 1 (P1), als components madurs de la família de la protamina 2 (HP2, HP3 i HP4) i a les formes immadures de la protamina 2 (Pre-P2, HPS1, HPS2, HPI2). La mida de la rodona indica l'abundància de cada proteoforma segons el número d'espectres (PrSMs) identificats per espectrometria de masses.

Identificació de proteoformes de les protamines per espectrometria de masses *Top-Down* i estadística. Els extractes de protamines purificades es van preparar i analitzar per espectrometria de masses TD tal i com es descriu al nostre estudi previ (Soler-Ventura et al., 2020). Per a la identificació i validació de proteoformes es va utilitzar el *software* Proteome Discoverer amb el node ProSight PD i la classificació basada en l'algoritme DBSCAN posada a punt pel nostre grup (Arauz-Garofalo et al., 2021). L'anàlisi diferencial de les proteoformes es va dur a terme amb el logaritme dels valors d'intensitats i aplicant el mètode FDR Benjamini & Hochberg. Diferències amb FC > 1,5 i p-value < 0,05 es van considerar estadísticament significatives. Pel càlcul de les relacions P1/P2 i P2 immadura/P2 madura es va utilitzar la suma dels valors lineals de les intensitats de totes les proteoformes corresponents a cada tipus de protamina. El grup "P2 immadura" inclou les proteoformes de Pre-P2, HPI1, HPI2, HPS1 i HPS2.

Valors de p-value < 0.05 (T de Student en mostres desaparellades) es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Proteoformes de les protamines en espermatozoides normals

L'anàlisi del grup de mostres control (N) per espectrometria de masses TD va revelar 12 proteoformes diferents de la P1, 5 proteoformes dels components madurs de la P2 i 7 proteoformes dels components immadurs de la P2 (Figura 1). Les diferents proteoformes incloïen formes no modificades (*unmod*), formes fosforilades (*ph*) i formes amb un increment de massa de 61 Da (Figura 1) que podria correspondre a la unió de Zn^{2+} a les molècules de protamines (Figura 1). Aquests resultats són consistents amb estudis previs, tant del nostre grup com d'altres, que demostren la presència de fosforilacions i de Zn^{2+} a les molècules de protamines, validant així la nostra tècnica (Chira et al., 1993; Bal et al., 2001; Castillo et al., 2015; Soler-Ventura et al., 2020). Cal destacar que la presència de Zn^{2+} només ha estat identificada en la P2 per mètodes convencionals. Per tant, la nostra estratègia seria la primera en suggerir que aquesta unió també es dona en P1. Tot i així, es requereix d'estudis proteòmics mitjançant espectrometria de masses amb plasma acoblat inductivament per acabar de confirmar aquesta associació.

Diferències en l'abundància de proteoformes de les protamines en espermatozoides amb relació P1/P2 alterada

L'anàlisi per AU-PAGE dels extractes de protamines purificades dels pacients que presentaven una relació P1/P2 alterada (grup A) mostraven una menor densitat òptica de les bandes corresponents a la P2 i una major densitat òptica en una banda superior (Figura 2A, sageta inferior i superior, respectivament). La quantificació de protamines a partir de les densitats òptiques de les bandes (OD-PAGE) va revelar que aquestes mostres presentaven una relació P1/P2 significativament superior al grup N (1,4 ± 0,1 vs 1,0 ± 0,2, respectivament, p-value < 0,05; Figura 2B).

No obstant, quan es van comparar els sumatoris de les intensitats lineals de les proteoformes de P1 i de P2 obtingudes per espectrometria de masses TD, no es van observar diferències significatives entre els dos grups analitzats (Figura 2C). Això pot estar degut, per una banda, a que la quantificació de les relacions P1/P2 per OD-PAGE es basa en les bandes majoritàries de les protamines, no incloent la totalitat de proteoformes de protamines existents. A més, les formes fosforilades o amb un increment de càrrega migrarien de forma diferent en aquest tipus de gels àcids, sent excloses de l'anàlisi. Per altra banda, el fet que proteoformes de la P1 s'identifiquin de forma més òptima que les de P2 per espectrometria de masses dona lloc a una diferència d'abundàncies que emmascararia qualsevol diferència entre els dos tipus de protamines. Per tant, el càlcul de relacions P1/P2 amb dades d'espectrometria de massa perdria significança. Aquestes limitacions desapareixen quan es comparen intensitats de proteoformes del mateix tipus de protamina. De fet, quan comparem l'abundància de proteoformes immadures de la P2 amb la de les proteoformes madures, podem observar com el grup A presenta una relació significativament superior al grup N (1,8 ± 0,3 vs 0,9 ± 0,3, respectivament, p-value < 0,05; Figura 2D). A més, l'anàlisi comparatiu de les intensitat de les proteoformes entre ambdós grups va mostrar que aquesta alteració es donava principalment per una abundància significativament superior de les formes immadures HPS1 i HPI2 al grup A (Figura 2E).

Aquests resultats indicarien que els pacients infèrtils normozoospèrmics amb una relació P1/P2 alterada presentarien un processament de la P2 defectuós, havent una major quantitat de formes immadures en els espermatozoides. L'associació entre una alteració en la relació Pre-P2/P2 i defectes en la quantitat i motilitat dels espermatozoides (Torregrosa *et al.*, 2006), així com en les taxes d'implantació i l'assoliment d'un embaràs (de Mateo *et al.*, 2009), ha estat demostrada per tècniques convencionals. Tot i així, aquests estudis no van poder discernir quines proteoformes concretes de la P2 estaven sent quantificades, ni quines es trobaven implicades en aquesta desregulació. D'altra banda, cal destacar que el grup A també va mostrar una abundància significativament inferior de la proteoforma P1 + 2 (61) + 2 ph, el que podria derivar en un possible impacte en la compactació de la cromatina.

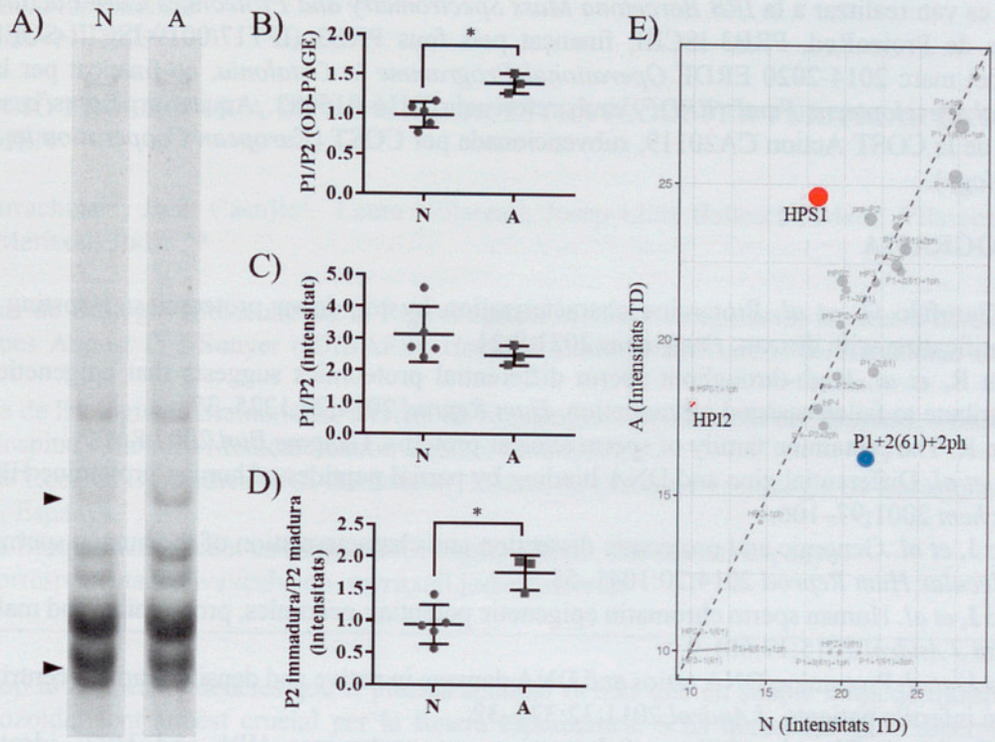

Figura 2. Diferències en l'abundància de proteoformes de les protamines entre espermatozoides normals (N) i espermatozoides amb una relació P1/P2 alterada (A) segons determinació per mètodes convencionals. A) Patró de bandes corresponent a extractes de protamines purificades mitjançant AU-PAGE. S'observen diferències en l'abundància de bandes concretes, marcades amb una sageta negra. B) Les mostres A presenten una relació P1/P2 calculada a partir de les densitats òptiques quantificades per AU-PAGE (OD-PAGE) significativament superior a les mostres N. C) No hi ha diferències en la relació P1/P2 obtinguda a partir de les intensitats de les proteoformes determinades per espectrometria de masses TD entre mostres N i A. D) Les mostres A presenten una relació de formes immadures i formes madures de la protamina 2 superior a les mostres N, segons les intensitats de les proteoformes identificades per espectrometria de masses TD. E) Comparació de l'abundància de les proteoformes de les protamines entre mostres N i A segons les intensitats quantificades per espectrometria de masses TD. Les proteoformes amb una abundància significativament superior o inferior en les mostres A en comparació amb les mostres N es troben marcades amb color vermell (●) i blau (●), respectivament. * p-value < 0,05.

CONCLUSIÓ

L'aplicació de tècniques d'alt rendiment mitjançant espectrometria de masses per a l'anàlisi de les protamines permet un estudi en major profunditat de la cromatina de l'espermatozoide i de possibles noves causes moleculars en casos d'infertilitat d'origen desconegut. Tot i que l'alteració dels nivells de protamines s'ha relacionat amb problemes d'infertilitat, mai s'ha aconseguit identificar la causa última d'aquesta desregulació i el seu impacte real en la funció espermàtica. Amb el nostre estudi hem pogut identificar alteracions en proteoformes concretes que explicarien una relació P1/P2 alterada degut a un mal processament de la P2. El coneixement específic d'aquestes alteracions obre una porta al desenvolupament d'estratègies per identificar i adreçar noves causes moleculars en els casos d'infertilitat, així com de poder classificar millor els pacients infèrtils amb infertilitat de causa desconeguda.

AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat finançat pels programes "Proyectos Prueba de Concepto ProteoRed" de la Plataforma en Red de Proteómica Carlos III (concedit a RO) i "Acción Estratégica en Salud" del Ministerio de Ciencia e Innovación i l'Instituto de Salud Carlos III (projecte PI20/00936 a RO, CD17/00109 a JC i FI17/00224 a AI). JC és professora Serra Húnter. Els anàlisis d'espectrometria de

masses es van realitzar a la *IRB Barcelona Mass Spectrometry and Proteomics Core Facility,* la qual és membre de ProteoRed, PRB3-ISCIII, finançat pels fons PRB3 (IPT17/0019-ISCIII-SGEFI/ERDF) i dintre del marc 2014-2020 ERDF *Operational Programme in Catalonia,* co-finançat per la *European Regional Development Fund (ERDF)* amb referència IU16-015983. Aquest article es basa en treball derivat de la COST Action CA20119, subvencionada per COST (*European Cooperation in Science and Technology*).

BIBLIOGRAFIA

Arauz-Garofalo G, *et al.* Protamine characterization by top-down proteomics: Boosting proteoform identification with dbscan. *Proteomes* 2021;9:21.

Azpiazu R, *et al.* High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Hum Reprod* 2014;29:1225–37.

Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007;8:227.

Bal W, *et al.* Differential zinc and DNA binding by partial peptides of human protamine HP2. *Mol Cell Biochem* 2001;97–106.

Castillo J, *et al.* Genomic and proteomic dissection and characterization of the human sperm chromatin. *Molecular Hum Reprod* 2014;20:1041–53.

Castillo J, *et al.* Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl* 2015;17:601-9.

Castillo J, *et al.* Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl* 2011;32:324–32.

Chira F, *et al.* Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim Biophys Acta* 1993;1203:109–14.

de Mateo S, *et al.* Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009;91:715–22.

de Mateo S, *et al.* Protamine 2 Precursors and Processing. *Protein Pept Lett* 2012;18:778–85.

Itoh K, *et al.* Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo. *Sci Signal* 2019;12:eaao7232.

Mengual L, *et al.* Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Andrology* 2003;24:438–47.

Ni K, *et al.* The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2016;4:789–99.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417–35.

Oliva R, Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl* 2011;13:24–30.

Oliva R, Dixon GH. Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991;40:25–94.

Papoutsopoulou S, *et al.* SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2972–80.

Simon L, *et al.* Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:724–34.

Soler-Ventura A, *et al.* Mammalian Sperm Protamine Extraction and Analysis: A Step-By-Step Detailed Protocol and Brief Review of Protamine Alterations. *Protein Pept Lett* 2018;25:424–33.

Soler-Ventura A, *et al.* Characterization of Human Sperm Protamine Proteoforms through a Combination of Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches. *J Proteome Res* 2020;19:221–37.

Torregrosa N, *et al.* Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;21:2084–89.

World of Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010

Wu JY, *et al.* Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* 2000;25:448–52.