Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 39-43 (2022)

VALIDACIÓ PROTEÒMICA DE LA MILLOR ESTRATÈGIA PER PURIFICAR EXOSOMES DEL SEMEN

Ferran Barrachina[1,2], Judit Castillo[1], Laura Villareal[3], Josep Lluís Ballescà[1], Marta Vilaseca[3], Rafael Oliva[1,4]* Meritxell Jodar[1,4]*

[1] Laboratori de Biologia Molecular de la Reproducció i el Desenvolupament, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, i Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya.
[2] Programa de Biologia de Membranes, Divisió de Nefrologia, Departament de Medicina, Massachusetts General Hospital i Harvard Medical School, Boston, MA, EUA.
[3] Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona), Institut de Ciència i Tecnologia de Barcelona (BIST), Barcelona, Espanya.
[4] Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Espanya.
*Autors corresponents: roliva@ub.edu, meritxell.jodar@ub.edu

Resum

Cada cop hi ha més evidències que el plasma seminal és més que un simple mitjà de transport per a l'espermatozoide, sent aquest crucial per la funció espermàtica. S'ha demostrat que l'espermatozoide incorpora proteïnes dels exosomes alliberats per l'epidídim i per les diferents glàndules sexuals accessòries, i que algunes d'aquestes proteïnes poden ser rellevants per la fertilitat. Els mètodes més utilitzats per l'aïllament d'exosomes seminals son la ultracentrifugació simple (UC) o la UC en coixins de sacarosa, però cap dels dos mètodes garanteixen l'aïllament d'una població pura d'exosomes, ja que altres vesícules extracel·lulars (VE) i cossos apoptòtics amb mida i densitat similars també es podrien aïllar al mateix temps. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi és el de determinar la metodologia òptima per al correcte aïllament i purificació d'exosomes seminals. L'avaluació proteòmica dels exosomes aïllats mitjançant diverses tècniques indica que l'aproximació metodològica més adequada per obtenir una població més pura d'exosomes és la combinació de l'UC del plasma seminal en un coixí de sacarosa del 25-30% amb una posterior selecció mitjançant perles magnètiques conjugades amb un anticòs contra el marcador específic d'exosomes CD63. Es van detectar un total de 832 proteïnes en els exosomes CD63+, moltes d'elles implicades en processos biològics importants per a la funció dels espermatozoides. A més a més, es van identificar proteïnes específiques d'epidídim, pròstata i vesícules seminals, suggerint que totes aquestes glàndules sexuals participarien en l'alliberament d'exosomes CD63+.

Abstract

Seminal plasma seems to play a much important role in sperm function than simply being a medium to carry spermatozoa. It has been shown that spermatozoa incorporate proteins from the exosomes released by the epididymis and by the different accessory sex glands, being some of these proteins relevant for fertility. The methods most commonly used to isolate seminal exosomes are ultracentrifugation (UC) or UC in a sucrose cushion. However, none of these methods can ensure the isolation of a pure population of exosomes, since other extracellular vesicles (EV) and apoptotic bodies with similar size and density could also be isolated at the same time. The aim of this study is, therefore, to determine the best methodology for the isolation of a pure population of seminal exosomes. The assessment of the proteomic content from the EV isolated through different methods revealed that the purification approach based on UC in a 25-30% sucrose cushion followed by CD63-magnetic beads selection was the most suitable methodology to isolate the purest population of seminal exosomes. A total of 832 proteins were detected in CD63+ seminal exosomes, many of them involved in biological processes important to sperm function. In addition, we detected specific proteins from epididymis, prostate, and seminal vesicles, suggesting that all these sexual glands would participate in the release of CD63+ exosomes.

INTRODUCCIÓ

El plasma seminal és un biofluid constituït per secrecions de l'epidídim i les glàndules sexuals accessòries masculines, com per exemple la pròstata i les vesícules seminals, que juga un paper crucial en el procés reproductiu (Jodar *et al.*, 2017; Barrachina *et al.*, 2017; Barrachina *et al.*, 2019). De fet, el contacte de l'espermatozoide testicular encara immadur i immòbil amb el plasma seminal fa que l'espermatozoide guanyi motilitat i adquireixi capacitat de fertilització (Owen *et al.*, 2005). Recentment, hem inferit l'origen extra-testicular de 165 proteïnes presents en l'espermatozoide humà mitjançant una anàlisi integrativa de les dades proteòmiques i transcriptòmiques de l'espermatozoide, testicle, epidídim i de les diferents glàndules sexuals accessòries. El transcrits i proteïnes d'aquestes 165 proteïnes no s'han detectat en el testicle, però la seva abundància a nivell transcriptòmic i proteòmic és relativament elevada en almenys l'epidídim o una glàndula sexual accessòria (Castillo *et al.*, 2018). S'ha proposat que la comunicació intercel·lular entre l'espermatozoide i les glàndules sexuals accessòries es duu a terme mitjançant la interacció dels espermatozoides amb el gran nombre d'exosomes (10^{11}-10^{12}) presents en el plasma seminal (Jodar *et al.*, 2016; Jodar *et al.*, 2019). Cada vegada existeix una major evidència de la participació dels exosomes presents en els diferents fluids corporals en la comunicació intercel·lular, a través de la incorporació selectiva del seu contingut (proteïnes, RNAs o lípids) en la cèl·lula diana. De fet, recentment hem demostrat en el model murí, la incorporació de 4 d'aquestes 165 proteïnes extra-testiculars a l'espermatozoide mitjançant exosomes d'origen epididimal (Barrachina *et al.*, 2022). Per aquest motiu, sembla obvi pensar que els exosomes presents en el semen podrien tenir un paper crucial en la funció de l'espermatozoide.

Les estratègies que s'han seguit fins ara per aïllar els exosomes seminals s'han basat en la ultracentrifugació, la cromatografia per exclusió de mida i els gradients de densitat de sacarosa/iodixanol. No obstant, aquestes metodologies utilitzades no han pogut assegurar la completa eliminació de partícules lipídiques que no siguin exosomes, d'agregats de proteïnes associats de forma inespecífica amb les vesícules extracel·lular o d'altres contaminants com els cossos apoptòtics. Amb l'objectiu d'optimitzar el procés de purificació dels exosomes seminals, en aquest treball compararem la composició proteòmica dels exosomes aïllats amb dues metodologies diferents.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques. Les mostres de semen humà van ser obtingudes, sota previ consentiment informat, de 17 pacients infèrtils normozoospèrmics de la Unitat de Reproducció assistida de l'Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, de l'Hospital Clínic (Barcelona, Espanya). La determinació dels paràmetres seminals es va dur a terme mitjançant el sistema informatitzat *Computer-assisted sperm analysis* (Proiser). L'avaluació dels paràmetres seminals es va realitzar seguint les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organization, 2010).

Purificació dels exosomes seminals. Les mostres de semen es van centrifugar a 500*g* per a precipitar i separar els espermatozoides del plasma seminal, seguit d'una segona centrifugació a 1.500*g*, per tal d'eliminar altres restes cel·lulars. El sobrenedant restant, corresponent al plasma seminal lliure de cèl·lules, es va filtrar (0,45µm seguit de 0,20 µm) per a poder assegurar l'eliminació de tot tipus cel·lulars o microvesícules. Seguidament, les mostres de plasma seminal purificat es van ajuntar per obtenir prou volum per a les anàlisis posteriors. Els exosomes seminals van ser aïllats utilitzant dues metodologies diferents: 1) ultracentrifugació (UC) en un coixí de sacarosa entre el 25-30% i 2) UC en un coixí de sacarosa entre el 25-30%, seguit d'una immuno-selecció dels exosomes CD63+.

Extracció i quantificació de proteïnes. Les mostres d'exosomes es van resuspendre en una solució de lisi (5% SDS en PBS) i bullir a 95ºC durant 5 min. Després, les mostres d'exosomes es van centrifugar a 16.000*g* per 10 min, i es va determinar la concentració de proteïnes del sobrenadant utilitzant el BCA Protein Assay Kit (PierceTM BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), seguint

les recomanacions del fabricant. Les proteïnes es van precipitar durant tota la nit en un 80% d'acetona, i el precipitat proteic va ser recollit per centrifugació a 17.530*g* per 10 min a 4 ºC (Barrachina *et al.*, 2019).

Anàlisis d'espectrometria de masses. . Les mostres d'exosomes primer es van reduir i seguidament es van digerir amb tripsina segons el protocol FASP usant dispositius Amicon Ultrafilter (30 kDa) (Winiewski *et al.*, 2009). Els pèptids digerits es van acidificar i es van carregar a una precolumna PepMap100 de 300 µm × 5 mm, 5 µm, 100 Å, C18 µ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) a un cabal de 15 µl/min, utilitzant un sistema cromatogràfic Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Els pèptids es van separar mitjançant una columna analítica C18 NanoEase MZ HSS T3 (75 µm × 250 mm, 1, 8 µm, 100Å) i es va utilitzar l'espectròmetre de masses Orbitrap Fusion Lumos™ Tribrid (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Cada mostra d'exosomes es va analitzar per triplicat.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Diferències proteòmiques dels exosomes seminals segons la metodologia emprada per la seva purificació

Les dades proteòmiques dels exosomes aïllats mitjançant la immuno-selecció amb el CD63 van revelar un enriquiment dels marcadors proteics clàssic d'exosomes com són el CD63, CD81 i CD9 en comparació amb els exosomes obtinguts mitjançant la UC en coixins de sacarosa. A més, els marcadors de contaminació Annexina A1 (marcador de microvesícules) i Annexina A5 (marcador de vesícules apoptòtiques) es veuen disminuïts en els exosomes CD63+ (Taula 1). Per tant, les dades proteòmiques indiquen que la metodologia d'aïllament d'exosomes basada en la immuno-selecció amb CD63 és la més òptima per obtenir la població més pura d'exosomes.

Número d'adhesió a Uniprot	Nom de la proteïna	UC en coixins de sacarosa 25-30%			Immuno-selecció CD63		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
Marcadors clàssics d'exosomes							
P08962	Antigen CD63	48	43	42	155	139	103
P60033	Antigen CD81	13	14	14	24	27	22
P21926	Antigen CD9	96	78	63	144	137	115
Marcadors de microvesícules							
P04083	Anexina A1	107	105	88	52	47	34
Marcadors de vesícules apoptòtiques							
P08758	Anexina A5	76	91	79	41	39	27

Taula 1. Avaluació proteòmica dels marcadors proteics típics d'exosomes i d'altres vesícules contaminants en exosomes aïllats mitjançant ultracentrifugació en un gradient de sacarosa del 25-30% i mitjançant la immuno-selecció amb l'anticòs CD63. L'anàlisi proteòmica es va realitzar en tres rèpliques (R1-3). Els números representen PSMs (*peptide spectrum matches*).

Contingut proteic dels exosomes seminals CD63+

Es van identificar un total de 832 proteïnes amb una elevada seguretat (almenys 1 pèptid únic i un FDR <1%) en els exosomes CD63+. Com era d'esperar, aquestes proteïnes estaven enriquides en funcions generals dels exosomes, com són la "exocitosis", la "transferència per vesícules" i els "processos del

sistema immunitari", entre d'altres. No obstant, també es va identificar un enriquiment significatiu en processos biològics importants per a la funció dels espermatozoides, tal com s'observa per a l'enriquiment en els termes del Gene Ontology corresponents al "reconeixement d'espermatozoides" i a la "glicòlisi canònica". Aquests resultats va corroborar que aquesta població específica d'exosomes seminals podria estar implicada en la motilitat espermàtica i en l'adquisició del potencial de fertilització de l'espermatozoide.

A més, hem observat que 54 de les 832 proteïnes identificades en els exosomes CD63+ corresponen a proteïnes de l'espermatozoide a les quals havíem inferit un origen extra-testicular (Castillo *et al.*, 2018) (Taula 2). La identificació d'algunes proteïnes en els exosomes seminals CD63+ amb un origen específic en les vesícules seminals va resultar ser molt interessant, ja que fins ara es creia que els exosomes provenien principalment de l'epidídim (epididimosomes) i de la pròstata (prostasomes) (Baskaran et al., 2020), però els nostres resultats suggereixen que les vesícules seminals també podrien contribuir en la secreció d'exosomes. Aquestes dades reforcen la idea de la comunicació activa entre el espermatozoide i l'epidídim, la pròstata o les vesícules seminals mitjançant la incorporació del contingut dels exosomes.

Possible òrgan d'origen	**Proteïnes identificades en els exosomes CD63+**
Epidídim	CAMP, EDDM3B, LIPI, WFDC8, WFDC9, ELSPBP1, DEFB129, ADAM7, SCGB2A1, S100A7
Pròstata	ALOX15B, SYT7, CEACAM1, ANPEP, ACP3, KLK2, RAB3B, TGM4, FOLH1, GNMT, CD177, ZG16B, GDF15
Vesícules seminals	ENPP3, SEMG1, LPL, PAEP, SLC26A3, MUC6, FCGBP
Epidídim/Pròstata	HGD
Epidídim/Vesícules seminals	CRISP1, ECM1, PATE1, PATE2
Epidídim/Vesícules seminals/Pròstata	SULT2B1, TMPRSS2, LTF, CAT, GLA, MME, CTSH, CDH1, BASP1, SEMG2, CRYL1
Vesícules seminals/Pròstata	KLK3, LYN, PIP, PGC, DPP4, CD38, SFN, SPOCK3

Taula 2. Llistat de proteïnes d'exosomes CD63+ d'homes normozoospèrmics amb un possible origen específic de l'epidídim, la pròstata o les vesícules seminals (n=54).

CONCLUSIÓ

Els resultats proteòmics indiquen que la metodologia més adequada per obtenir una població més pura d'exosomes és la ultracentrifugació en un coixí de sacarosa del 25-30% seguit de la immuno-selecció amb CD63. Aquesta primera aproximació, a més, obre la porta a la purificació d'altres poblacions específiques d'exosomes seminals, com per exemple la purificació d'exosomes segons el seu origen (epidídim, vesícules seminals o pròstata), per tal de poder determinar el paper específic de cada glàndula sexual accessòria a la funció espermàtica. La possible implicació dels exosomes CD63+ en la motilitat dels espermatozoides i en la fusió espermatozoide-òvul emfatitza el paper fonamental dels exosomes seminals en la maduració post-testicular dels espermatozoides, així com en l'adquisició de les funcions necessàries per a una bona fecundació.

AGRAÏMENTS

Finançat pel Ministerio de Ciencia e Innovación (PI16/00346, PI20/00936 a RO). 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.

BIBLIOGRAFIA

Baskaran, S., Panner Selvam, MK., Agarwal, A. 2020. Exosomes of male reproduction. Adv Clin Chem, 95:149-163.

Barrachina, F. *et al.*, 2017. L'estudi del plasma seminal mitjançant proteòmica d'alt rendiment suggereix una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí. Biologia de la reproducció, 15, 79-84.

Barrachina, F. *et al.*, 2019. Stable-protein Pair Analysis as A Novel Strategy to Identify Proteomic Signatures: Application To Seminal Plasma From Infertile Patients. Mol Cell Proteomics 18, S77–S90.

Barrachina, F. *et al.*, 2022. Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. Hum Reprod *https://doi-org.sire.ub.edu/10.1093/humrep/deac015*

Castillo, J., Jodar, M., Oliva, R. 2018. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. Hum Reprod Update 24,535–555.

Jodar, M., Sendler, E., Krawetz, SA. 2016. The protein and transcript profiles of human semen. Cell Tissue Res 363,85–96.

Jodar, M., Soler-Ventura, A., Oliva, R. 2017. Semen proteomics and male infertility. J Proteomics 162, 125–134.

Jodar, M. 2019. Sperm and Seminal Plasma RNAs: What Roles Do They Play Beyond Fertilization?. Reproduction 158, R113–R123.

Owen, DH. & Katz, D.F. 2005. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. J Androl 26, 459–469.

Winiewski, JR. *et al.*, 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nature Methods 6, 359 – 362.

World Health Organization 2010. Examination and processing of human semen. WHO Lab Man Exam Process Hum Semen.