Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 45-50 (2022)

ESTUDI DEL PAPER DE LA PROTEÏNA SRPK1 EN LA REMODELACIÓ DE LA CROMATINA ESPERMÀTICA MITJANÇANT L'ANÀLISI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

Alberto de la Iglesia[1], Mélina Blanco[2], Meritxell Jodar[1,3], Julie Cocquet[2,*], Judit Castillo[1,*], Rafael Oliva[1,3*]

[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] Institut Cochin-Inserm U1016-CNRS UMR8104-Université de Paris, París, França.

[3] Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Espanya.

*Autors corresponents: roliva@ub.edu, juditcastillo@ub.edu, julie.cocquet@inserm.fr

Resum

El balanç de fosforilació de les protamines és essencial per a la transició nuclihistona-nucliprotamina (NH-NP) durant la espermiogènesi i la generació d'espermatozoides funcionals. Una proteina clau en aquest procés és la serina/arginina proteïna quinasa 1 (SRPK1), que fosforila la protamina 1 al testicle. La seva desregulació s'ha relacionat prèviament amb una estructura de la cromatina de l'espermatozoide defectuosa i infertilitat. L'objectiu del present estudi és desxifrar si la SRPK1 interactua amb altres proteïnes involucrades en la remodelació de la cromatina espermàtica, per tal d'ajudar a caracteritzar millor aquest complex procés. Amb aquest objectiu s'ha realitzat una immunoprecipitació (IP) contra SRPK1 en lisats proteics testiculars de ratolí, seguit d'una caracterització del material seleccionat per LC-MS/MS. Mitjançant l'anàlisi de les dades proteòmiques amb el ReproGenomics Viewer (https://rgv.genouest.org/), el STRING (https://string-db.org/) i el Gene Ontology (http://geneontology.org/), es van identificar les proteïnes més expressades en cèl·lules post-meiòtiques, així com les xarxes proteiques i funcionals implicades. Hem identificat que SRPK1 és troba implicada en una xarxa de 41 proteïnes involucrades en la regulació del *splicing*, així com en el transport, metabolisme i estabilitat dels mRNAs. De forma remarcable, també es van trobar altament expressades proteïnes d'unió a RNA (RBPs) associades als mRNAs de la protamina 2 i de les proteïnes de transició, fonamentals pel reemplaçament NH-NP. En conclusió, SRPK1 interactua amb proteïnes reguladores de mRNAs involucrats en la compactació de la cromatina espermàtica, suggerint funcions reguladores addicionals d'aquesta proteïna durant l'espermiogènesi.

Abstract

A proper balance of protamine phosphorylation is essential for the nucleohistone–nucleoprotamine (NH-NP) transition during the spermiogenesis and the generation of functional spermatozoa. The serine/arginine protein kinase 1 (SRPK1) is a key protein for this process, which phosphorylates protamine 1 in the testicle. Its deregulation has previously been linked to a defective chromatin structure and male infertility. The aim of this study is to decipher whether SRPK1 interacts with other proteins involved in sperm chromatin remodeling, towards a better characterization of this complex epigenetic process. With this objective, we performed immunoprecipitation (IP) against SRPK1 in testicular protein lysates, followed by identification of the selected proteins by LC-MS/MS. The results allowed us to identify the most expressed candidates in post-meiotic cells, by analyzing single-cell gene expression data from the Repro Genomics Viewer (https://rgv.genouest.org/), and to determine protein and functional networks using STRING (https://string-db.org/) and Gene Ontology (http://geneontology.org/), respectively. We identified that SRPK1 interacts with a network of 41 proteins involved in splicing regulation, as well as in the transport, metabolism, and stability of mRNAs. Remarkably, RNA binding proteins (RBPs) associated with protamine 2 mRNAs and transition proteins, essential for the histone replacement, have also been found highly expressed. In conclusion, SRPK1 interacts with mRNA regulatory proteins involved in sperm chromatin compaction, suggesting additional regulatory functions for this protein during the spermiogenesis.

INTRODUCCIÓ

La cèl·lula germinal masculina duu a terme una remodelació molt marcada de la cromatina durant la seva diferenciació espermatogènica formant part del procés de generació d' espermatozoides funcionals (Oliva and Mezquita, 1985; Oliva, 2006; Castillo *et al.*, 2013, 2015). Durant l'espermiogènesi, que correspon a la última etapa de l'espermatogènesi, les histones són reemplaçades gradualment per proteïnes de transició i, últimament, per les protamines, unes proteïnes petites i amb una elevada càrrega positiva deguda a una gran proporció de residus arginina en la seva seqüència (50-70%).

Aquest procés gradual de remodelació cromatínica es coneix com a transició nuclihistona a nucliprotamina (NH-NP), la qual resulta en un 85%-95% del DNA espermàtic altament compactat (Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Oliva and Castillo, 2011). Modificacions post-traduccionals (MPTs) de les proteïnes de la cromatina de les cèl·lules espermatogèniques juguen un paper essencial en la regulació orquestrada d'aquest procés (Oliva, 2006; Bao and Bedford, 2016; de la Iglesia *et al.*, 2017; Jauregui *et al.*, 2019). D'entre elles, les fosforilacions de les protamines han sigut identificades com les MPTs principals a l'espermatozoide (Brunner *et al.*, 2014; Soler-Ventura *et al.*, 2020), i es coneix que la seva dinàmica és essencial per una adequada protaminització del DNA durant l'espermatogènesi. De fet, la unió de proteoformes fosforilades de les protamines al DNA no és tan forta com la unió de proteoformes no modificades. Això suggereix un paper important de la fosforilació de les protamines moderant el procés de la seva incorporació al DNA durant els primers estadis de la espermiogènesi, i una onada de desfosforilació subseqüent ajudaria a aconseguir una conformació de la cromatina més compactada (Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006; Carrell *et al.*, 2007; Soler-Ventura *et al.*, 2020).

Dins la dinàmica de fosforilacions i desfosforilacions, és molt important la funció dels efectors de la fosforilació. Al testicle, la serina/arginina proteïna quinasa 1 (SRPK1) s'encarrega de fosforilar la protamina 1 (P1) (Papoutsopoulou *et al.*, 1999), i la seva desregulació s'ha relacionat amb una estructura de la cromatina alterada i infertilitat masculina (Azpiazu *et al.*, 2014). Degut a això, i tenint en compte la regulació tan complexa de la remodelació de la cromatina que té lloc durant la espermatogènesi, la nostra hipòtesi és que el diàleg entre la SRPK1 i altres proteïnes reguladores de la estructura de la cromatina podrien estar orquestrant aquest procés epigenètic. Per tant, l'objectiu del nostre estudi és definir la xarxa proteica interactiva de la SRPK1 per identificar candidats amb potencial de desenvolupar biomarcadors i dianes moleculars dirigits a solucionar problemes de salut reproductiva masculina.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques. Es van utilitzar tres ratolins adults, amb 2 mesos d'edat, pertanyents a la soca C57BL/6. Tots els procediments van estar subjectes a revisió ètica local (*Comité d'Ethique pour l'Experimentation Animale, Université Paris Descartes*).

Extracció de proteïnes testiculars. Es van extreure els testicles de ratolí i la túnica albugínia es va eliminar per minimitzar al màxim la contaminació somàtica. La massa testicular es va sotmetre a disgregació mecànica i es va homogeneïtzar en solució de lisi (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 % NP40, 5 mM EDTA) i inhibidors de proteases. La lisi es va dur a terme incubant 1 hora a 4 ºC en agitació i les proteïnes solubles es van recuperar amb el sobrenedant després de centrifugar 10.000 *g* per 10 minuts a 4ºC. L'extracte proteic va ser utilitzat immediatament pels experiments d'immunoprecipitació.

Immunoprecipitació de proteïnes. La immunoprecipitació es va realitzar tal com es va descriure en Moretti *et al.*, 2017, amb modificacions menors. Breument, per cada experiment d'immunoprecipitació, es va fer la unió (o *crosslink*) de 5 µg d'anticòs primari contra SRPK1 (#AP-14073-1-AP, Proteintech), i d'IgG de conill com a control negatiu, amb 50 µl de boles magnètiques recobertes de proteïna A/G (#4630, Ademtech). Per a la unió o *crosslink*, les boles magnètiques es van rentar tres vegades amb PBS amb 0,65% Tween-20, abans d'incubar amb l'anticòs primari durant 30 minuts a temperatura ambient en

agitació. Seguidament, es va incubar durant 30 minuts amb *dimetil-pimelimidate* 200 mM a pH 9.0. La reacció de unió o *crosslink* es va aturar amb Tris-HCl 50 mM a pH 7.5. A les hores, les boles unides a l'anticòs es van incubar amb el lisat testicular tota la nit a 4 ºC. L'elució de les proteïnes del lisat retingudes es va fer amb PAG Elution Buffer (#10701, Ademtech) incubant 5 minuts a temperatura ambient. El pH es va neutralitzar amb trietilamoni bicarbonat a pH 8.4. El material eluït es va destinar a la identificació per proteòmica *bottom up* de les proteïnes candidates, i a la validació de la immunoprecipitació per western blot.

Cromatografia líquida – Espectrometria de Masses en tàndem (LC-MS/MS) i identificació de proteïnes. Es van analitzar tres replicats biològics de forma independent. Les mostres immunoprecipitades es van sotmetre a proteòmica *bottom-up* a la plataforma 3P5 de la *Université de Paris*. Després de reduir les cisteïnes amb ditiotreitol i alquilar amb cloroacetamida, les proteïnes es van digerir amb tripsina i van ser analitzades per LC-MS/MS com es va fer a Moretti *et al.*, 2017. Pel processament dels espectres i la identificació dels pèptids, es va utilitzar el software ProteomeDiscoverer 1.3 i MASCOT versió 2.5. Les proteïnes es van considerar vàlides seguint criteris de mínim un pèptid únic identificat amb 1% FDR, considerant la oxidació de metionines i la carbamidometilació de les cisteïnes com modificacions variables.

Western Blot. Per a la validació de la immunoprecipitació, una quantitat corresponent al 50% del total del material eluït es va desnaturalitzar amb *4X NuPage buffer LDS sample buffer* (Life Technologies) suplementat amb 10% β–mercaptoetanol, incubant 5 minuts a 95ºC. Les proteïnes desnaturalitzades es van carregar en un gel de SDS i poliacrilamida al 12% per dur a terme la electroforesi i, posteriorment, es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Per la detecció de SRPK1, l'anticòs primari contra SRPK1 (#AP-14073-1-AP, Proteintech) es va diluir 1:750 en solució de bloqueig.

Anàlisi de les dades. Per identificar les proteïnes immunoprecipitades, els valors corresponents a proteïnes amb al menys tres valors proteòmics vàlids en el immunoprecipitat contra SRPK1 i IgG es van comparar mitjançant el test estadístic t-student (p-valor < 0.01). El llistat de proteïnes identificades es va analitzar amb l'eina Gene Ontology (http://www.geneontology.org/) per determinar els Processos Biològics enriquits. També es va utilitzar l'eina STRING (https://string-db.org/) per identificar xarxes proteiques i connexions entre les proteïnes identificades. Les vies metabòliques enriquides es van determinar mitjançant Reactome (https://reactome.org). A més, es van utilitzar dades del Repro Genomics Viewer (https://rgv.genouest.org/) extretes de l'article de Green *et al.*, 2018 per analitzar dades d'expressió gènica de cèl·lula única (scRNA-Seq) corresponent als diferents tipus cel·lulars testiculars de ratolí adult. Aquest anàlisi ens va permetre descartar proteïnes exclusivament expressades en les cèl·lules de Sertoli, i identificar aquelles més expressades en cèl·lules post-meiòtiques, que és quan es produeix la transició NH-NP.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

L'anàlisi per western blot va confirmar que la immunoprecipitació contra SRPK1 es va realitzar amb èxit en els tres replicats (Figura 1A), i un total de 41 proteïnes es van identificar per LC-MS/MS. Cal destacar que degut a que cap de les proteïnes identificades es va trobar expressada exclusivament a les cèl·lules somàtiques testiculars, la totalitat del llistat es va incloure per les anàlisis consegüents. Es va observar que aquestes proteïnes es trobaven principalment implicades en la regulació de processos de *splicing*, així com en el transport, metabolisme i estabilitat dels mRNAs. De forma interessant, vies metabòliques relacionades amb el *splicing* de mRNAs (Reactome) es van trobar enriquides, en coherència amb el paper ja descrit per SRPK1 com una de les proteïnes més importants per la regulació de proteïnes implicades en *splicing* de mRNAs (Gui *et al.*, 1994; Tronchre *et al.*, 1997; Hagopian *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008).

Aquesta associació reforça els nostres resultats. L'anàlisi d'interaccions per STRING va demostrar que la gran majoria de les proteïnes identificades no havien estat descrites prèviament com "interactors"

proteics directes de SRPK1 (Figura 1B), el que dona rellevància als nostres resultats, ja que seria la primera vegada que s'identifiquen aquestes interaccions.

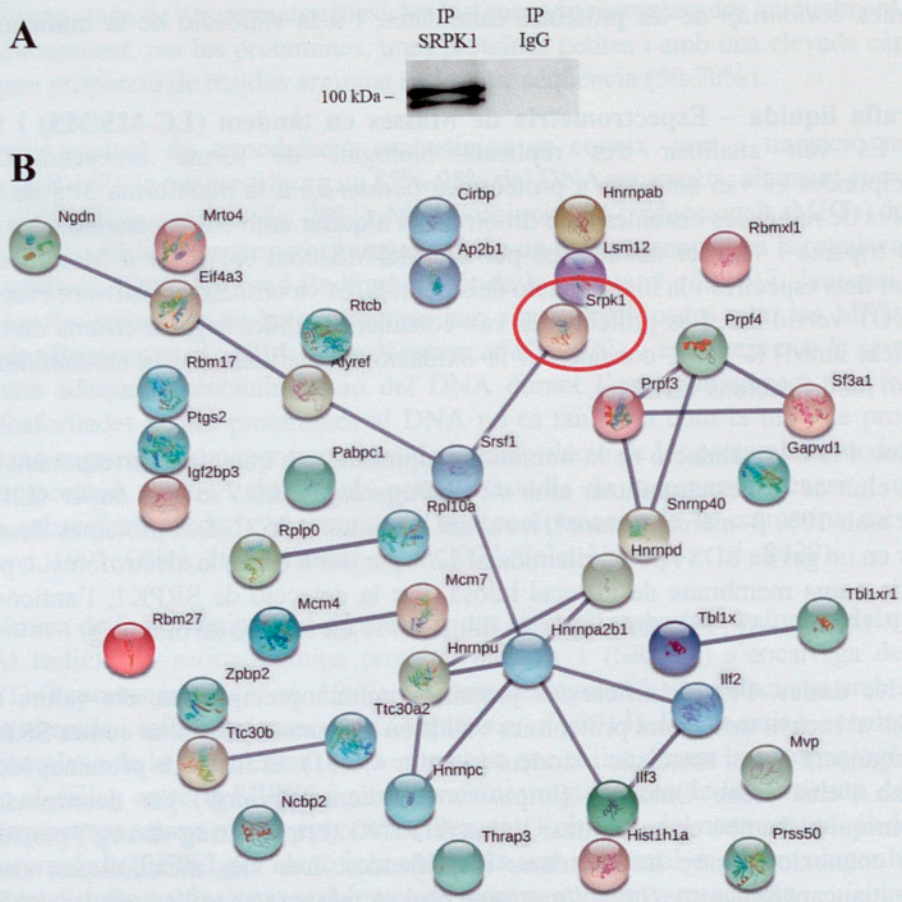

Figura 1. Immunoprecipitació d'SRPK1 i identificació de les proteïnes associades per LC-MS/MS. Validació de la immunoprecipitació de SRPK1 per western blot (**A**). Determinació mitjançant anàlisis de STRING de les interaccions proteïna-proteïna entre la xarxa proteica associada a SRPK1 (marcada amb un cercle vermell) determinada per LC-MS/MS.

Gràcies als resultats recopilats del Repro Genomics Viewer, vam poder caracteritzar les proteïnes identificades segons el seu perfil d'expressió gènica durant l'espermatogènesi (en fases mitòtica, meiòtica, i de diferenciació o espermiogènesi), identificant un total de 20 proteïnes expressades en cèl·lules post-meiòtiques. De forma remarcable, proteïnes d'unió a RNA (RBPs) associades als mRNAs de la protamina 2 i de les proteïnes de transició, fonamentals pel reemplaçament NH-NP, es van trobar altament expressades. Són exemples la *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein* (hnRNP) A/B, la qual s'associa al mRNA de la protamina 2 contribuint a la seva regulació temporal a nivell traduccional durant l'espermatogènesi (Idler and Yan, 2012), i la *Polyadenylate-binding protein 1* (PABPC1), que s'uneix a mRNAs específics de l'espermatozoide corresponents a proteïnes que es sintetitzen durant els estadis d'elongació espermàtica, com la protamina 2 i les proteïnes de transició 1 y 2 (Xu *et al.*, 2014).

També vam identificar la *Minichromosome maintenance protein 7* (MCM7), una proteïna que es diferencia de la resta dels membres de la seva família al ser la única que s'expressa durant la espermiogènesi (dades extretes de Green *et al.*, 2018 a través del Repro Genomics Viewer). Es necessiten

més estudis per desxifrar el paper d'aquesta proteïna, amb un rol essencial en la replicació de DNA, durant la fase postmeiòtica, en la qual no es necessita replicació del DNA.

CONCLUSIÓ

Hem identificat 41 proteïnes associades a SRPK1 involucrades en la regulació temporal de la expressió de mRNAs que codifiquen proteïnes involucrades en la compactació de la cromatina espermàtica, suggerint funcions reguladores addicionals de SRPK1 durant l'espermiogènesi a través de la seva interacció amb altres proteïnes. Per tant, SRPK1 es veuria involucrada en la regulació de la protaminació del DNA espermàtic no només a través de la fosforilació directa de la protamina 1, essencial per la seva correcta incorporació al DNA, sinó també regulant de forma indirecta proteïnes importants pel correcte desenvolupament de la remodelació de la cromatina al testicle i la correcta formació de espermatozoides funcionals.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Ciencia e Innovación (projectes PI16/00346 i PI20/00936 a RO; beques FI17/00224 i MV20/00026 a AI), i pel programa de l'*Agence Nationale de la Recherche* (ANR CHROMATOZOA) a JCo. JCa és professora Serra Húnter.

BIBLIOGRAFIA

Azpiazu R, *et al.* (2014) High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. Hum Reprod 29,1225–1237.

Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome Biol 8,227.

Bao J, Bedford MT (2016) Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. Reproduction 151,R55–R70.

Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM (2014) Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. Epigenetics Chromatin 7,2.

Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? Hum Reprod Update 13,313–327.

Castillo J, *et al.* (2013) La cromatina espermàtica humana presenta una distribució de proteïnes diferencial. Biol de la Reprod 13,83–87.

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

Green CD, *et al.* (2018) A Comprehensive Roadmap of Murine Spermatogenesis Defined by Single-Cell RNA-Seq. Dev Cell 46,651-667.e10.

Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. Nature 369,678–682.

Hagopian JC, *et al.* (2008) Adaptable Molecular Interactions Guide Phosphorylation of the SR Protein ASF/SF2 by SRPK1. J Mol Biol 382,894–909.

Idler RK, Yan W (2012) Control of Messenger RNA Fate by RNA-Binding Proteins: An Emphasis on Mammalian Spermatogenesis. J Androl 33,309–337.

Jauregui P, *et al.* (2019) Dinámica de las modificaciones postraduccionales del residuo H4K5 en la cromatina del espermatozoide maduro. Biol de la Reprod 16,35–40.

de la Iglesia A, *et al.* (2017) Posible papel de H4K5bu en la transición NH-NP de la espermatogénesis humana y su desregulación en diferentes patologías testiculares. Biol de la Reprod 15,25–30.

Ma CT, *et al.* (2008) Ordered Multi-site Phosphorylation of the Splicing Factor ASF/SF2 By SRPK1. J Mol Biol 376,55–68.

Moretti C, *et al.* (2017) SLY regulates genes involved in chromatin remodeling and interacts with TBL1XR1 during sperm differentiation. Cell Death Differ 24,1029–1044.

Oliva R (2006) Protamines and male infertility. Hum Reprod Update 12,417–435.
Oliva R, Castillo J (2011) Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. Asian J Androl 13,24–30.
Oliva R, Dixon GH (1991) Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 40,25–94.
Oliva R, Mezquita C (1985) La transició nuclihistona - nucliprotamina com a model de diferenciació cel·lular i com model per l'estudi del desensamblatge del nucleosoma. Biol del Desenvol 3,125–136.
Papoutsopoulou S, *et al.* (1999) SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. Nucleic Acids Res 27,2972–2980.
Soler-Ventura A, *et al.* (2020) Characterization of Human Sperm Protamine Proteoforms through a Combination of Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches. J Proteome Res 19,221–237.
Tronchre H, Wang J, Fu XD. (1997) A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. Nature 388,397–400.
Xu K, *et al.* (2014) AKAP3 Synthesis Is Mediated by RNA Binding Proteins and PKA Signaling During Mouse Spermiogenesis. Biol Reprod 90.