

L'EXPRESSION AL TESTICLE DE LA PROTEÏNA TRANSPORTADORA D'ESTEROIDES SEXUALS HUMANA (SHBG) TÉ LLOC A LES CÈL·LULES GERMINALS I NO A LES CÈL·LULES DE SERTOLI

D. M. SELVA I G. L. HAMMOND

*Department of Obstetrics and Gynaecology, University of British Columbia
i Child and Family Research Institute.*

Adreça per a la correspondència: D. M. Selva. Department of Obstetrics and Gynaecology, University of British Columbia i Child and Family Research Institute. Vancouver, Canada. Adreça electrònica: selva@interchange.ubc.ca.

RESUM

El gen de la proteïna transportadora d'esteroides sexuals humana (hSHBG) conté dues unitats de transcripció diferents. Una d'aquestes unitats de transcripció fa aproximadament 4,3 kb, i codifica un precursor polipeptídic que és processat i secretat pels hepatòcits, i que donarà lloc a la SHBG plasmàtica. La seqüència promotora humana d'aquesta unitat de transcripció és diferent de la seqüència dels promotors dels altres mamífers que expressen el gen de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli. Concretament, el promotor humà de la SHBG conté un lloc d'unió per a uns factors de transcripció anomenats USF, que s'uneixen al promotor i inhibeixen la seva expressió a les cèl·lules de Sertoli. Tot i que el gen de la SHBG humana no s'expressa a les cèl·lules de Sertoli, es poden detectar transcrits per a la SHBG al testicle humà. Aquests transcrits contenen un exó 1 alternatiu, es troben a les cèl·lules germinals i són producte d'una altra unitat de transcripció que conté una regió promotora que es troba a unes 2 kb de la primera regió promotora. Els transcrits d'aquesta segona regió promotora codifiquen una isoforma de la SHBG que és uns 5 kDa més petita que la SHBG plasmàtica. Aquesta isoforma de la SHBG s'acumula als espermatozoides entre la membrana exterior de l'acrosoma i la membrana plasmàtica, i s'allibera al medi durant la reacció de capacitació. Aquestes diferències tan importants en l'expressió del gen de la SHBG al testicle entre l'humà i els altres mamífers ens obliguen a reconsiderar la funció de la SHBG en el testicle en relació a la reproducció masculina.

Paraules clau: SHBG, cèl·lules de Sertoli, cèl·lules germinals, USF.

SUMMARY

The human sex hormone binding globulin (SHBG) gene contains at least two transcription

units. A 4.3 kb human SHBG transcription unit encodes the precursor polypeptide, which is processed and secreted by hepatocytes as plasma SHBG. The proximal promoter of this transcription unit differs from the corresponding sequence in other mammals, in which it is also expressed in Sertoli cells. In particular, its proximal promoter sequence contains a binding-site for USF transcription factors that represses its activity in Sertoli cells. Although human SHBG is not expressed in Sertoli cells, human SHBG transcripts containing an alternative exon 1 sequence are present in testicular germ cells. These are the products of an ~8 kb human SHBG transcription unit, and they appear to encode an SHBG isoform that is 4-5 kDa smaller than plasma SHBG. This sperm SHBG isoform accumulates between the outer acrosomal membrane and the sperm plasma membrane, and it is released during the capacitation reaction. These remarkable differences in the expression of human SHBG in the testis, when compared to other mammals, force us to reconsider the functional significance of SHBG expression in the testis in relation to male reproduction.

Keywords: SHBG, Sertoli cell, germinal cell, USF.

INTRODUCCIÓ

La proteïna transportadora d'esteroides sexuals (SHBG) és produïda pels hepatòcits al fetge i secretada a la sang, on transporta els esteroides sexuals i regula el seu accés als teixits diana (Hammond, 1995). A l'epidídim de rates i conills es va detectar una proteïna de característiques fisicoquímiques similars a les de la SHBG plasmàtica (French i Ritzen, 1973; Danzo *et al.*, 2004). Aquesta proteïna es coneix generalment amb el nom de *proteïna transportadora d'andrògens* (ABP), i és el producte de la mateixa unitat de transcripció que codifica la SHBG plasmàtica (Joseph, 1994; Hammond *et al.*, 1989). A la rata, l'expressió de la SHBG al testicle té lloc a les cèl·lules de Sertoli, i és regulada per FSH i retinoides, però no per testosterona (Westphal, 1986; Skinner *et al.*, 1989). La proteïna homòloga de la SHBG plasmàtica en rates és produïda per les cèl·lules de Sertoli i secretada als túbuls seminífers (Gunsalus *et al.*, 1980), des d'on migra fins a l'epidídim i on és internalitzada per les cèl·lules epitelials (Pelliniemi *et al.*, 1981). Es creu que la seva funció és la de regular l'accés dels andrògens a les cèl·lules diana al llarg del tracte reproductor masculí, i influir els mecanismes de maduració de l'esperma que són dependents d'androgen (Joseph, 1994).

Hi ha altres espècies de mamífers, a part de les rates, que produeixen i secreten una proteïna homòloga a la SHBG als túbuls seminífers (Westphal, 1986). Aquest fet, juntament amb la detecció de transcrits per a la SHBG al testicle humà (Hammond *et al.*, 1989), va fer assumir que al testicle humà també existia un homòleg de la SHBG plasmàtica que tenia la mateixa funció. Ara sabem que els transcrits de SHBG detectats al testicle humà no contenen la seqüència que codifica el pèptid senyal de secreció de la SHBG plasmàtica (Selva *et al.*, 2005a). Només hi ha una publicació en la qual es descriu que les cèl·lules de Sertoli humanes secreten una proteïna semblant a la SHBG, però genera molts dubtes pel fet que la constant d'afinitat per als esteroides d'aquesta proteïna és com a mínim un ordre de magnitud més petit que el de la SHBG plasmàtica (Santemma *et al.*, 1992). Per tant, posem en dubte l'assumpció que l'expressió del gen de la SHBG al testicle humà és igual que la dels altres mamífers; de fet, en els nostres estudis més recents hem demostrat que al testicle humà l'expressió del gen de la SHBG té lloc a les cèl·lules germinals i no a les cèl·lules de Sertoli. Aquest descobriment canvia completament el coneixement que es tenia fins ara de l'expressió de la SHBG al testicle humà, i obliga a reconsiderar la funció de

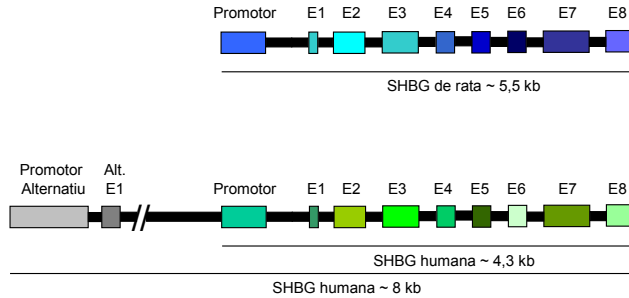


FIGURA 1. Organització estructural dels gens de la SHBG humana i de rata. El gen de la SHBG humana conté una unitat de transcripció d'uns 4,3 kb, que inclou un promotor que regula la seva expressió al fetge i que dona lloc a un RNA missatger de la SHBG que inclou els exons 1 al 8 (E1-E8). Existeix una segona unitat de transcripció d'unes 8 kb que està sota el control d'un promotor alternatiu, i és responsable de la producció de transcrits que contenen un exó 1 alternatiu (Alt E1) seguit dels exons 2 al 8. En la rata, la unitat de transcripció de la SHBG és de 5,5 kb i conté i utilitza les mateixes seqüències exòniques (E1-E8) que la unitat de transcripció humana de 4,3 kb.

la SHBG en relació a la reproducció masculina.

DIFERÈNCIES INTERESPECÍFIQUES EN L'EXPRESSION DE LES REGIONS PROMOTORES DE LA SHBG AL TESTICLE

L'aïllament d'una sèrie de cDNA per a l'ABP d'una biblioteca de testicle de rata va permetre confirmar que codifiquen una proteïna de secreció amb les mateixes característiques que l'ABP aïllada de l'epidídim de les rates, i va demostrar que l'ABP de rata és un ortòleg de la SHBG humana (Joseph *et al.*, 1987). També es va demostrar que l'RNA missatger de l'ABP de rata està present a les cèl·lules de Sertoli i és regulat per hormones, com ja s'havia vist en estudis anteriors fets en cèl·lules de Sertoli de rata (Joseph *et al.*, 1988; Raventos *et al.*, 1988). A més a més, quan el gen que codifica l'ABP de rata (5,5 kb) (vegeu la figura 1) va ser introduït en el genoma de ratolí, es va expressar correctament a les cèl·lules de Sertoli dels ratolins transgènics durant les últimes etapes de la pubertat i en la vida adulta

(Reventos *et al.*, 1993). En canvi, quan la mateixa unitat genòmica humana (4,3 kb) (vegeu la figura 1) es va introduir en el genoma del ratolí, no es va expressar al testicle en cap etapa del desenvolupament, tot i que es va expressar correctament al fetge i va donar lloc a la SHBG plasmàtica (Jänne *et al.*, 1998). Aquests estudis van ser la primera indicació de les diferències interespecífiques en l'expressió de la SHBG al testicle.

El clonatge de cDNA per a la SHBG humana amb biblioteques de fetge va revelar que les seqüències dels precursors polipeptídics de l'ABP de rata i la SHBG humana compartien una gran homologia (Joseph *et al.*, 1987). Quan aquestes seqüències de cDNA es van comparar amb l'organització dels gens de la SHBG en aquestes espècies, va ser evident que l'exó 1 contenia l'inici de traducció i que codificava el pèptid senyal de secreció (Hammond *et al.*, 1989; Joseph *et al.*, 1988). Per la mateixa època, utilitzant una biblioteca de testicle humà es van aïllar una sèrie de cDNA per a la SHBG, però cap contenia la seqüència corresponent a l'exó 1 (Hammond *et al.*, 1989). En lloc seu, les regions 5' d'aquests cDNA contenien una seqüència que corresponia a un exó 1 alternatiu

```

Humà      CCCAGAGGGGTGATAGCTGAGTCTTGTGACTGGGCCCTGGGCAGGGGTCA-AGGGTCAGTGCCC -57
Humà Mod. CCCAGAGGGGTGA-----GCCCCTGGGCAGGGGTCA-AGGGTCAGTGCCC
Conill    CCGGAGAGG-----GGCCATAGGGTCAGTGCC
Ratolí    CTTCAGAGGGGCCGCAC-----GGTCA--GGGTCAGTGTC
Rata      CTTCAGAGGGGCCGCAT-----GGTCA--GGGTCAGTGTC
*   *****                               ** ** ***** **
                                FP4                               FP3

Humà      CTGTTTCCTTTACCCCTCCTCCCC--GGGCAACCTTTAACCTCCACCGCCACACGCA--AGGCTG +1
Humà Mod. CTGTTTCCTTTACCCCTCCTCCCC--GGGCAACCTTTAACCTCCACCGCCACACGCA--AGGCTG
Conill    CTGTC-----CCTCTTCCCGCCAGGGCAACCTTTAGCCTTCCACCAACCCTTTGGCA--AAGCTG
Ratolí    CTATCTCTGCCCCCTTCTTCCCGGAGCAACCTTTAACCTCCACCAACCCTATGTGCGCCAGGTTA
Rata      CTATCTCTGCCCCCTTCTTCCCGGAGCAACCTTTAACCTCCACCAACCCTATGTGAG--AGGCTA
** *           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                FP2                               FP1

```

FIGURA 2. Alineament de les seqüències promotores de la SHBG de diferents espècies. La unitat de transcripció de la SHBG humana de 4,3 kb s'expressa al fetge sota el control d'un promotor proximal que conté quatre regions ben definides per *DNase I footprinting* (FP1-FP5). La regió d'FP4 conté un lloc d'unió per als factors de transcripció USF. Aquest *cis-element* només està present al promotor de la SHBG humana, i no està present als promotors dels altres mamífers que expressen el gen de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli (per exemple: el conill, la rata o el ratolí). Quan aquesta regió d'FP4 és eliminada de la unitat de transcripció de la SHBG de 4,3 kb, aquest promotor modificat és actiu a les cèl·lules de Sertoli i al fetge.

localitzat a 2 kb de l'exó 1 que conté l'inici de traducció de la SHBG (Hammond, 1989). Això explica que la unitat de transcripció de la SHBG humana d'11 kb introduïda en el genoma de ratolí s'expressi al testicle, mentre que la unitat de transcripció de la SHBG humana de 4,3 kb, i responsable de la SHBG plasmàtica, no s'expressi al testicle (Jänne *et al.*, 1998). Aquests experiments ens van suggerir que la unitat de transcripció que conté els vuit exons i que codifica la SHBG plasmàtica i l'ABP que es troba al testicle de la rata (vegeu la figura 1) no s'expressen de la mateixa manera a les cèl·lules de Sertoli en les diferents espècies.

Seguint amb aquesta línia d'investigació, els nostres estudis inicials amb els ratolins transgènics per a la unitat de transcripció de la SHBG d'11 kb demostren que transcrits per a la SHBG humana s'acumulen de manera dependent d'estadiatge en els túbuls seminífers (Jänne *et al.*, 1998). Des de llavors sabem

que els transcrits per a la SHBG en aquests ratolins transgènics es troben a les cèl·lules germinals al testicle, i que una isoforma de la SHBG s'acumula a l'acrosoma de les espermatides durant l'espermiogènesi i en l'esperma immadur (Selva *et al.*, 2002). A més a més, tot i que la isoforma de la SHBG humana present a les cèl·lules germinals és 5 kDa més petita que la SHBG present a la sang, aquesta isoforma uneix els esteroides sexuals amb la mateixa afinitat que la SHBG plasmàtica (Selva *et al.*, 2002).

ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ USF INHIBEIXEN L'EXPRESSIÓ DEL GEN DE LA SHBG A LES CÈL·LULES DE SERTOLI

El fet que la unitat de transcripció de la SHBG humana de 4,3 kb s'expressi com a

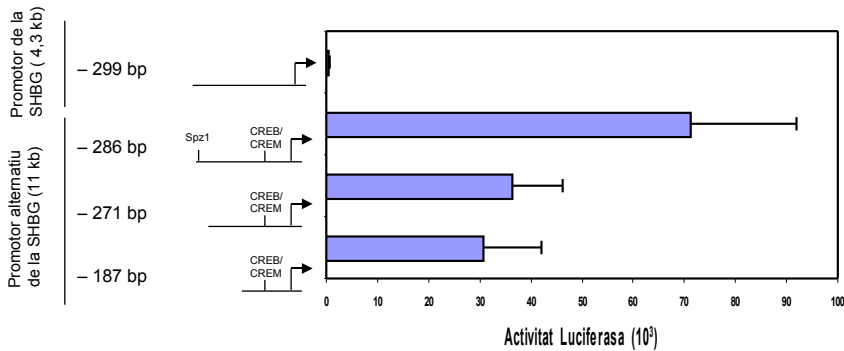


FIGURA 3. Anàlisi de l'activitat del promotor alternatiu de la SHBG en la línia cel·lular de cèl·lules germinals GC2. El promotor alternatiu de la SHBG és molt més actiu que el promotor que dirigeix l'expressió de la unitat de transcripció de 4,3 kb en estudis d'expressió de luciferasa. En aquests experiments, l'eficiència de la transfecció va ser monitoritzada amb la cotransfecció d'un vector d'expressió de β -galactosidasa, que va ser utilitzat per definir les unitats d'activitat luciferasa. L'anàlisi de delecions en el 5' del promotor va determinar que la màxima expressió és obtinguda amb un fragment de 286 bp. És interessant destacar que l'eliminació del lloc potencial d'unió al factor de transcripció Spz1 redueix l'activitat del promotor de manera important. També cal dir que hi ha un possible lloc d'unió als factors de transcripció CREB/CREM dins del promotor mínim (187 bp).

transgèn al fetge i no al testicle dels ratolins, ens va fer estudiar la possibilitat que existís alguna diferència entre el promotor humà i les seqüències promotores d'altres mamífers que expressen la proteïna homòloga de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli. Una comparació filogenètica de les seqüències promotores de la SHBG de diferents mamífers va demostrar que el promotor de la SHBG conté una regió única (*footprint 4*) que uneix extractes nuclears de fetge (Jänne i Hammond, 1998), i que no està present als altres mamífers que expressen el gen de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli (vegeu la figura 2). Per tal de comprovar-ne la funció, es va eliminar la seqüència de *footprint 4* de la unitat de transcripció de la SHBG de 4,3 kb, la qual s'expressa normalment als hepatòcits (Jänne *et al.*, 1998). La introducció d'aquesta nova unitat de transcripció en embrions de ratolí va permetre demostrar que aquesta seqüència no influència l'expressió del transgèn al fetge (vegeu la figura 2), però que la seva eliminació del promotor allibera la repressió de l'expressió del gen de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli dels ratolins transgènics (Selva

et al., 2005b). A més a més, l'expressió d'aquest transgèn modificat respon a les hormones de la mateixa manera que el gen de la SHBG de rata a les cèl·lules de Sertoli (Selva *et al.*, 2005b).

Estudis en cultius primaris de cèl·lules de Sertoli i línies cel·lulars de Sertoli ens van permetre demostrar que els factors de transcripció USF-1 i USF-2 s'uneixen a la regió de *footprint 4* del promotor de la SHBG i inhibeixen la seva expressió a les cèl·lules de Sertoli (Selva *et al.*, 2005b). Només el promotor de la SHBG del ximpanzé conté aquesta regió de *footprint 4* (Selva *et al.*, 2005b); per tant, estudis de funcionalitat de la SHBG al testicle d'espècies inferiors als primats no són representatius en el context de l'humà. L'única possible excepció seria la utilització dels ratolins transgènics «humanitzats» que hem creat al nostre laboratori, en els quals el gen de la SHBG és expressat en el tipus cel·lular adequat.

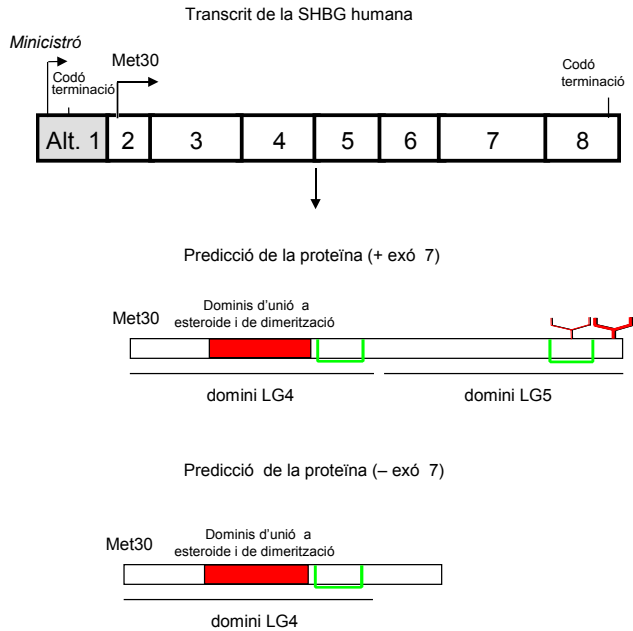


FIGURA 4. Transcrits alternatius de la SHBG humana i les seves prediccions proteiques. El testicle humà conté dos transcrits alternatius per a la SHBG humana: un conté l'exó 1 alternatiu seguit de les seqüències dels exons 2 al 8, i l'altre transcrit és idèntic però li falta l'exó 7. Els dos contenen un minicistron a la regió 5' però seguit per un codó de terminació. L'única pauta de lectura possible que codificaria la isoforma de la SHBG començaria a la Met30 del polipèptid madur de la SHBG. En el cas del primer transcrit això codificaria una proteïna que conté els dos dominis laminina (LG) de la SHBG humana. L'LG de l'aminoterminal és el domini LG4 que conté els llocs d'unió a esteroides i els llocs de dimerització (Grishkovskaya *et al.*, 2000), mentre que el segon LG, conegut com a LG5, conté els dos llocs de *N*-glicosilació (Hammond, 1995). El transcrit que no conté l'exó 7 donaria lloc a una proteïna truncada, ja que hi ha un canvi en la pauta de lectura que dona lloc a l'aparició d'un codó de terminació prematur. El resultat d'això seria una SHBG que no tindria el domini LG5 i que seria degradada ràpidament perquè no es podria plegar correctament (Hogeveen *et al.*, 2002).

L'EXPRESSIÓ DE LA SHBG HUMANA A LES CÈL·LULES GERMINALS ÉS CONTROLADA PER UN PROMOTOR ALTERNATIU

L'expressió de la SHBG humana al testicle dels ratolins transgènics té lloc a les cèl·lules germinals, i dona lloc a transcrits que contenen un exó 1 alternatiu idèntic al que està present als diferents cDNA aïllats d'una biblioteca de testicle (Hammond *et al.*, 1989). El canvi en el tipus celular de l'expressió del gen

de la SHBG en humans és degut a l'existència i utilització d'una unitat de transcripció diferent que està sota el control d'una regió promotora diferent. En les cèl·lules germinals, el gen de la SHBG està sota el control d'un promotor que flanqueja la seqüència de l'exó 1 alternatiu. El transgèn de 4,3 kb per a la SHBG humana no s'expressa al testicle dels ratolins transgènics perquè li falta aquesta regió promotora i l'exó 1 (Jänne *et al.*, 1998).

La seqüència del promotor alternatiu (655 bp) és transcripcionalment molt activa

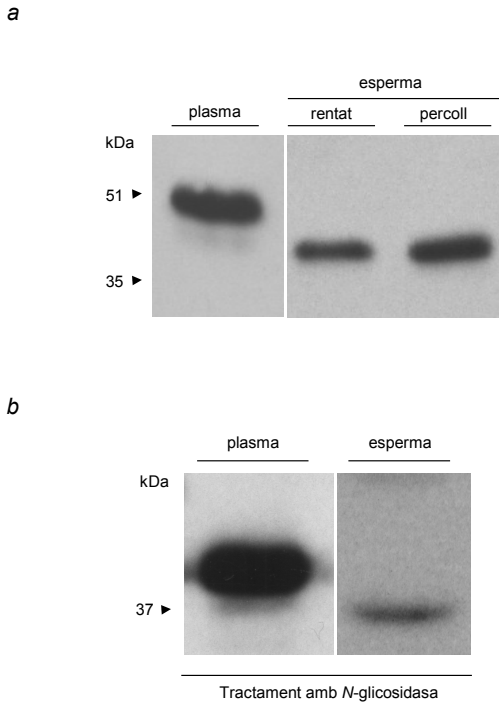


FIGURA 5. La proteïna SHBG es pot detectar per transferència Western al plasma i l'esperma humà. *a*) La SHBG plasmàtica té una mida aproximada de 50 kDa, i és uns 5 kDa més gran que la SHBG present a l'esperma rentat o de percoll. *b*) Tant la SHBG plasmàtica com la de l'esperma tenen *N*-glicosilacions. Un cop tractades amb l'enzim *N*-glicosidasa, la diferència de mida entre les dues proteïnes es redueix.

en la línia de cèl·lules germinals GC2, especialment si es compara amb l'activitat transcripcional del promotor que normalment és actiu als hepatòcits (vegeu la figura 3). L'anàlisi de diferents delecions d'aquest promotor alternatiu permet detectar una regió entre -271 i -286 bp que quan s'elimina del promotor redueix considerablement la seva activitat transcripcional (vegeu la figura 3). És interessant destacar que aquesta regió conté un element d'unió al factor de transcripció Spz1, els nivells d'expressió del qual són molt elevats a les cèl·lules germinals (Hsu *et al.*, 2004). A més a més, l'anàlisi computacional d'aquest promotor alternatiu ha revelat l'existència d'un lloc potencial d'unió al factor de transcripció

ció CREB/CREM dins de la mínima (187 bp) regió promotora (vegeu la figura 3). Això és important perquè els nivells de la proteïna CREM s'incrementen després de l'estadiatge del paquet, i són molt alts durant tota l'espermioïgenesis (Don i Stelzer, 2002), i això coincideix amb l'aparició de la isoforma de la SHBG a l'acrosoma de les cèl·lules germinals (Selva *et al.*, 2002).

CARACTERITZACIÓ DE LA ISOFORMA DE LA SHBG PRESENT A L'ESPERMA HUMÀ

L'anàlisi per RT-PCR dels transcrits de SHBG presents a les cèl·lules germinals dels ratolins transgènics indica que tots contenen l'exó 1 alternatiu, i a alguns els falta l'exó 7 (Selva *et al.*, 2002). Els transcrits més abundants contenen l'exó 1 alternatiu seguit de l'exó 2 i l'exó 8 de la SHBG humana (vegeu la figura 4). Tot i que l'extrem 5' d'aquests no ha estat clarament identificat, l'anàlisi per *primer extension* i la comparació de les seqüències de SHBG publicades prèviament (Hammond *et al.*, 1989) indiquen que l'exó 1 alternatiu té un *mini-cistron* seguit d'un codó de terminació (vegeu la figura 4). Així, el primer codó AUG en pauta del polipèptid immadur de la SHBG humana és el codó Met-30 (vegeu la figura 4), que es troba a l'exó 2 (Hammond *et al.*, 1989).

A l'altre transcrit alternatiu de la SHBG humana present a les cèl·lules germinals del ratolí transgènic li falten les seqüències corresponents a l'exó 7 (Selva *et al.*, 2002). La manca de l'exó 7 dona lloc a una proteïna de la SHBG truncada a causa de l'aparició d'un codó de terminació en la pauta de lectura (vegeu la figura 4). Aquesta proteïna truncada tindria un plegament erroni i seria probablement degradada ràpidament, com s'ha demostrat recentment per a una variant de la SHBG codificada per un allel anormal que conté un codó de terminació prematur a l'exó 8 (Hogeveen *et al.*, 2002). I encara que no fos degradat, aquest

polipèptid donaria lloc a una proteïna amb l'extrem carboxiterminal truncat, que no tindria els llocs de *N*-glicosilació. Això és important perquè la isoforma de la SHBG present a les cèl·lules germinals dels ratolins transgènics conté *N*-glicosilacions (vegeu la figura 5) (Selva *et al.*, 2002) i, per tant, podem concloure que la isoforma de la SHBG present a les cèl·lules germinals no pot ser producte dels transcrits que no contenen l'exó 7.

Hem demostrat recentment que tots els transcrits de SHBG presents al testicle humà contenen l'exó 1 alternatiu, tal i com succeeix amb els ratolins transgènics. Al contrari del que passa als ratolins transgènics, el transcrit de la SHBG més abundant en el testicle humà és el que no té l'exó 7 i, tot i així, la isoforma de la SHBG que hem identificat a l'esperma humà conté *N*-glicosilacions: per tant, ha de ser codificada per transcrits que continguin les seqüències corresponents als exons 7 i 8. El fet que aquesta isoforma de la SHBG present a l'esperma humà sigui 5 kDa més petita que la SHBG plasmàtica (vegeu la figura 5) i que l'exó 1 alternatiu no tingui un inici de traducció (Selva *et al.*, 2005a), implica que la traducció de l'RNA missatger s'iniciarà al primer codó ATG en pauta, que està localitzat a l'exó 2 (vegeu la figura 4).

IMPORTÀNCIA FUNCIONAL DE LA ISOFORMA DE LA SHBG HUMANA PRESENT A L'ESPERMA

Les diferències d'expressió del gen de la SHBG al testicle entre les diferents espècies generen una sèrie de preguntes molt interessants sobre el paper biològic de la SHBG. Aquest paper és clarament diferent en humans si el comparem amb el que pot tenir als mamífers estudiats fins ara. Per tal d'intentar contestar aquesta pregunta, hem desenvolupat un assaig immunofluoromètric *time-resolved* molt sensible per poder mesurar les concentracions de la isoforma de la SHBG a

l'esperma humà (Selva *et al.*, 2005a). Això ens ha permès demostrar que la SHBG a l'esperma es troba entre la membrana externa de l'acrosoma i la membrana plasmàtica de l'esperma, i que la SHBG és alliberada durant la reacció de capacitació. El fet que en els ratolins transgènics la isoforma de la SHBG que hem identificat a l'esperma humà aparegui durant els primers estadiatges de l'espermio-gènesi (Selva *et al.*, 2002) fa pensar que podria influir el procés de maduració de l'esperma. Fins ara, l'única informació relacionada amb la possible funció de la SHBG present a l'esperma és que uneix esteroides sexuals amb la mateixa afinitat que la SHBG plasmàtica (Selva *et al.*, 2002). Per tant, podria influir les accions fisiològiques de l'estradiol sobre l'esperma i alterar-ne l'accés als receptors d'estrògens presents a la membrana plasmàtica, que són els encarregats de desencadenar mecanismes no genòmics que influeixen en la capacitació i la reacció acrosòmica (Luconi *et al.*, 1999, 2004).

Un estudi pilot en el qual s'han mesurat els nivells de SHBG a l'esperma presents en donants d'esperma i homes que demanen consulta en una clínica d'infertilitat ha revelat que els nivells de SHBG a l'esperma humà són força variables. Els donants d'esperma i homes teòricament fèrtils tenen uns nivells baixos, mentre que els homes que són diagnosticats amb varicocele presenten uns nivells més elevats (Selva *et al.*, 2005a). És important destacar que els nivells de SHBG a l'esperma es correlacionen significativament amb l'edat i la mobilitat de l'esperma. Per tant, es necessiten més estudis per tal de conèixer la influència de la SHBG sobre la funció espermàtica en relació amb la fertilitat masculina.

CONCLUSIÓ

L'expressió del gen de la SHBG al testicle humà és diferent si la comparem amb la dels altres mamífers, en què una proteïna semblant

a la SHBG ha estat identificada en el tracte reproductor masculí. La presència d'un lloc d'unió per als factors de transcripció USF en el promotor de la SHBG humana és un dels factors determinants. Les unitats de transcripció de la SHBG humana i del ximpanzé comparteixen una homologia superior al 98 %, i és bastant probable que la presència del lloc d'unió a USF sigui característic dels primats superiors. Falta saber si l'expressió del gen de la SHBG al testicle dels diferents primats s'assembla a la dels humans, en què els transcrits contenen un exó 1 alternatiu, i si aquest fet es correlaciona amb l'aparició durant l'evolució de l'espermatogènesi amb múltiples estadiatges que es pot observar als túbuls seminífers d'humans, primats i micos del nou món (Smithwick i Young, 1995). Aquests tipus d'estudis d'endocrinologia comparativa, juntament amb estudis dels nivells de SHBG a l'esperma en humans infèrtils, podran aclarir quina és la funció de la SHBG en la reproducció masculina.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat mitjançant una beca del Canadian Institute of Health Research. El GLH manté una Canada Research Chair en Salut Reproductiva. Agraïm Tracie Galbraith per l'assistència com a secretària.

BIBLIOGRAFIA

- DANZO, B. J.; ELLER, B. C.; ORGBIN-CRIST, M.-C. (2004). «Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits». *Steroids*, 24: 107-122.
- DON, J.; STELZER, G. (2002). «The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 115-124.
- FRENCH, F. S.; RITZEN, E. M. (1973). «A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: Evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis». *Endocrinology*, 93: 88-95.
- GRISHKOVSKAYA, I.; AVVAKUMOV, G. V.; SKLENAR, G.; DALES, D.; HAMMOND, G. L.; MULLER, Y. A. (2000). «Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: Steroid transport by a laminin G-like domain». *EMBO J.*, 19: 504-512.
- GUNSALUS, G. L.; MUSTO, N. A.; BARDIN, C. W. (1980). «Bidirectional release of a Sertoli cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule». A: STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. [ed.]. *Testicular Development, Structure, and Function*. Nova York: Raven Press, p. 291-297.
- HAMMOND, G. L. (1995). «Potential functions of plasma steroid-binding proteins». *Trends Endocrinol. Metab.*, 6: 298-304.
- HAMMOND, G. L.; UNDERHILL, D. A.; RYKSE, H. M.; SMITH, C. L. (1989). «The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNA». *Mol. Endocrinol.*, 3: 1869-1876.
- HOGVEEN, K. N.; COUSIN, P.; PUGÉAT, M.; DEWAILLY, D.; SOUDAN, B.; HAMMOND, G. L. (2002). «Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction». *J. Clin. Invest.*, 109: 973-981.
- HSU, S. H.; HSIEH-LI, H. M.; LI, H. (2004). «Dysfunctional spermatogenesis in transgenic mice overexpressing bHLH-Zip transcription factor, Spz1». *Experimental Cell. Research*. 294: 185-198.
- JÄNNE, M.; DEOL, H. K.; POWER, S. G. A.; YEE, S.-P.; HAMMOND, G. L. (1998). «Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice». *Mol. Endocrinol.*, 12: 123-136.
- JÄNNE, M.; HAMMOND, G. L. (1998). «Hepatocyte nuclear factor-4 controls transcription from a TATA-less human sex hormone-binding globulin gene promoter». *J. Biol. Chem.*, 273: 34105-34114.
- JOSEPH, D. R. (1994). «Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin». *Vit. Horm.*, 49: 197-280.
- JOSEPH, D. R.; HALL, S. H.; CONTI, M.; FRENCH, F. S. (1988). «The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein». *Mol. Endocrinol.*, 2: 3-13.
- JOSEPH, D. R.; HALL, S. H.; FRENCH, F. S. (1987). «Rat androgen-binding protein: Evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 339-343.
- LUCONI, M.; FRANCAVILLA, F.; PORAZZI, I.; MACEROLA, B.; FORTI, G.; BALDI, E. (2004). «Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens». *Steroids*, 69: 553-559.
- LUCONI, M.; MURATORI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. (1999). «Identification and characterization of a novel functional

- estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 1670-1678.
- PELLINIEMI, L. J.; DYM, M.; GUNSALUS, G. L.; MUSTO, N. A.; BARDIN, C. W.; FAWCETT, D. W. (1981). «Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract». *Endocrinology*, 108: 925-931.
- REVENTOS, J.; HAMMOND, G. L.; CROZAT, A.; BROOKS, D. E.; GUNSALUS, G. L.; BARDIN, C. W.; MUSTO, N. A. (1988). «Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol-binding globulin and ABP complementary deoxyribonucleic acids». *Mol. Endocrinol.*, 2: 125-132.
- REVENTOS, J.; SULLIVAN, P. M.; JOSEPH, D. R.; GORDON, J. W. (1993). «Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 96: 69-73.
- SANTIEMMA, V.; ROSATI, P.; GUERZONI, C.; MARIANI, S.; BELIGOTTI, F.; MAGNANTI, M.; GARUFI, G.; GALONI, T.; FABBRINI, A. (1992). «Human Sertoli cells *in vitro*: morphological features and androgen-binding protein secretion». *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43: 423-429.
- SELVA, D. M.; BASSAS, L.; MUNELL, F.; MATA, A.; TEKPETEY, F.; LEWIS, J. G.; HAMMOND, G. L. (2005a). «Human sperm sex hormone-binding globulin isoform: characterization and measurement by time-resolved fluorescence immunoassay». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. [En prensa]
- SELVA, D. M.; HOGEVEEN, K. N.; HAMMOND, G. L. (2005b). «Repression of the human sex hormone-binding globulin gene in Sertoli cells by USF transcription factors». *J. Biol. Chem.*, 280: 4462-4468.
- SELVA, D. M.; HOGEVEEN, K. N.; SEGUCHI, K.; TEKPETEY, F.; HAMMOND, G. L. (2002). «A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis». *J. Biol. Chem.*, 277: 45291-45298.
- SKINNER, M. K.; SCHLITZ, S. M.; ANTHONY, C. T. (1989). «Regulation of Sertoli cell differentiated function: Testicular transferrin and androgen-binding protein expression». *Endocrinology*, 124: 3024.
- SMITHWICK, E. B.; YOUNG, R. A. (1996). «Germ cell maturation and cellular associations in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee». *Tissue Cell*, 28: 137-148.
- WESTPHAL, U. (1986). *Steroid-Protein Interactions I. I. Monographs on Endocrinology*. 27a ed. Heidelberg, p. 1-603.