

ESTUDI PRELIMINAR D'ANOMALIES EPIGENÈTIQUES EN ESPERMATOZOIDES D'INDIVIDUS QUE CONSULTEN PER PROBLEMES DE FERTILITAT

Marta Pladevall,¹ Joan Blanco,¹ Mark Grossmann,² M. Carme Pons,² Cristina Camprubi^{1*}

¹ Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. cristina.camprubi@uab.cat.

² Unitat de Reproducció Assistida, Centro Médico Teknon
Vilana, 12. 08022 Barcelona. Tel. 932 906 296. Fax. 932 906 297. ura@cmteknon.com.

Resum

Recentment han estat publicades dades epidemiològiques que suggereixen una relació entre la manipulació *in vitro* de gàmetes i embrions i un increment d'anomalies epigenètiques en la descendència. Per tal de determinar la incidència d'errors de metilació en espermatozoides d'individus que consulten per problemes de fertilitat, s'han analitzat dos gens regulats per impressió genètica, *H19* i *SNRPN*. El patró de metilació d'aquests loci s'ha analitzat a partir de l'amplificació del DNA espermàtic tractat amb bisulfit sòdic i la seqüenciació posterior. Cap de les 27 mostres analitzades ha presentat errors de metilació. D'acord amb aquestes dades, els pacients analitzats no presentarien un risc incrementat de transmetre errors epigenètics d'aquests loci a la descendència.

Paraules clau impressió genètica, espermatozoides, errors de metilació, tècniques de reproducció assistida.

Abstract

Recently, it has been published epidemiologic data suggesting a link between *in vitro* manipulation of gametes and embryos and an increase risk of epigenetic errors in the offspring. To evaluate the account of epigenetic errors in gametes from infertile patients we have assessed the methylation pattern of two imprinted regulated genes, *H19* and *SNRPN*. Methylation profiles of the selected loci were determined by amplification of treated DNA with sodium bisulphite, PCR and automatic DNA sequencing. None of the 27 samples showed an abnormal methylation profile. In accordance with our data, there are no risk of transmitting epigenetic errors of these loci in our population.

INTRODUCCIÓ

La impressió genètica és una marca epigenètica heretable i reversible que implica la desactivació específica de determinats gens en funció del seu origen parental. S'estableix mitjançant metilació de dinucleòtids 5'-CG-3' (illes CpG) i canvis conformacionals de la cromatina que bloquegen l'expressió de l'allel matern o patern (expressió monoal·lèlica). El caràcter heretable i reversible es manifesta en la línia germinal, en què la impressió s'esborra i es torna a establir durant la gametogènesi en funció del sexe de l'individu. Durant l'espermatogènesi l'adquisició de la metilació es completa en espermatogonis abans d'entrar en meiosi (Kerjean *et al.*, 2000). Pel que fa a l'oogènesi, alguns estudis proposen que la metila-

ció esta establerta al voltant de la fecundació (El-Maari *et al.*, 2001), mentre que d'altres assenyalen que la impressió ja és completa en oòcits madurs (Geuns *et al.*, 2003). Després de la fecundació la impressió genètica es manté en les cèl·lules somàtiques de l'embrió i de l'individu adult i s'esborra de nou en cèl·lules germinals primordials (figura 1).

Els gens regulats per impressió genètica són importants per al correcte desenvolupament de l'embrió i de la placenta (McGrath i Solter, 1984). Recentment s'han descrit gens relacionats amb el desenvolupament neurològic, el comportament i la regulació de la fisiologia i metabolisme, tant en l'etapa embrionària com adulta (Isles i Wilkinson, 2000; Polychronakos i Kukuvtitis, 2002; Davis *et al.*, 2005; Kishino, 2006). Errors en l'establiment o man-

teniment de la impressió genètica impliquen la no expressió o sobreexpressió d'aquests gens. L'efecte dels errors epigenètics en l'individu portador dependrà dels gens afectats. A mode d'exemple, anomalies epigenètiques de gens continguts en la regió 11p15.5 comporten el desenvolupament de la síndrome de Beckwith-Wiedeman (SBW), i anomalies epigenètiques de gens continguts en la regió 15q11q13 comporten el desenvolupament de la síndrome de Prader-Willi (SPW) i d'Angelman (SA). També s'han relacionat errors de impressió amb diversos tipus de càncer (Feinberg, 2004) i desordres del neurocomportament, com l'autisme (Schanen, 2006).

Recentment han estat publicades dades epidemiològiques que suggereixen una relació entre la manipulació *in vitro* de gàmetes i embrions i un increment del risc d'errors epigenètics en la descendència (Cox *et al.*, 2002; DeBaun *et al.*, 2002; Orstavik *et al.*, 2003; Niemitz *et al.*, 2004; Halliday *et al.*, 2004). En aquest sentit és important remarcar que la impressió genètica s'estableix en el període de formació dels gàmetes i ha de mantenir-se durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari,

període en el qual aquestes cèl·lules es manipulen en els laboratoris de reproducció assistida. Diferents hipòtesis no excloents entre si i basades en el coneixement dels mecanismes responsables de l'establiment i manteniment de la impressió genètica han estat formulades per diferents investigadors que intenten explicar aquestes dades epidemiològiques:

— Els problemes d'infertilitat poden estar relacionats amb errors epigenètics en els gàmetes. Marques *et al.* (2004) van presentar dades experimentals que avalaven una relació entre recomptes espermàtics baixos i deficiències en el patró de metilació del gen regulat per impressió genètica *H19* implicat en el desenvolupament de la SBW.

— Els protocols d'estimulació ovàrica i maduració *in vitro* dels oòcits poden afectar l'establiment i el manteniment de la impressió genètica. Recentment han aparegut treballs en els quals es relacionen anomalies epigenètiques amb la superovulació o la maduració *in vitro* d'oòcits (Ludwig *et al.*, 2005; Borghol *et al.*, 2006).

— La tècnica d'ICSI per si mateixa també podria alterar els mecanismes d'establiment com a conse-

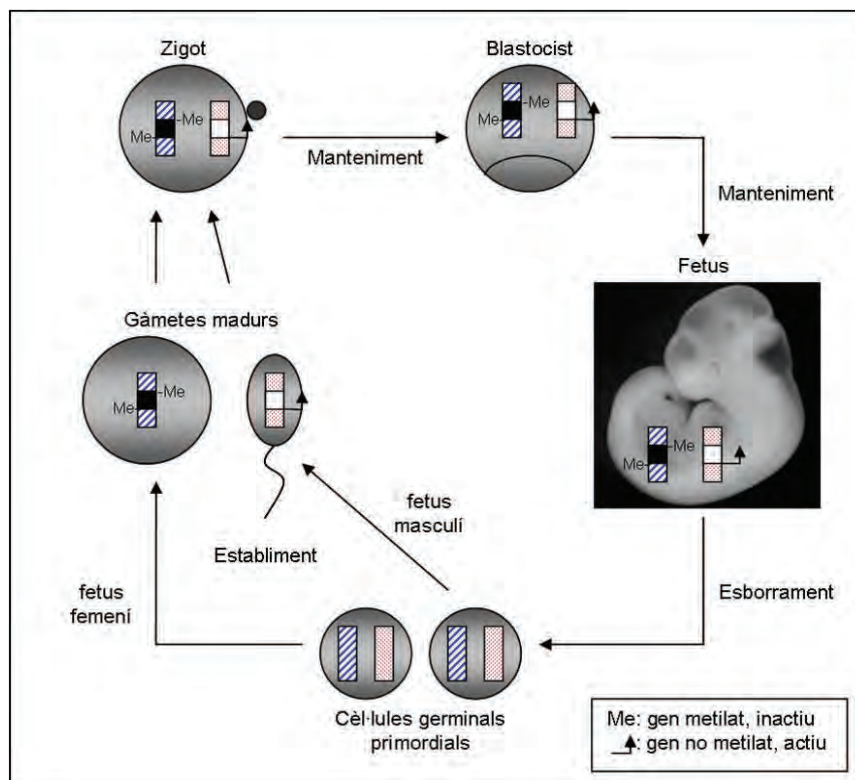


Figura 1 Cicle de la impressió genètica. Per simplificar l'esquema es representa una parella de cromosomes homòlegs que contenen un gen amb impressió materna. Els cromosomes ratllat i puntejat representen els cromosomes d'origen matern i patern, respectivament. En cèl·lules primordials germinals la impressió genètica s'esborra i, segons el sexe del fetus, s'estableix la impressió paterna en tots els espermatozoides, o bé la materna en tots els oòcits. Després de la fecundació la metilació diferencial es manté durant el desenvolupament i l'etapa adulta per a tornar-se a esborrar en cèl·lules germinals primordials (Reik i Walter, 2001).

qüència d'alteracions en les oscil·lacions de Ca^{2+} després de la fecundació, per interrupció de la producció de factors materns necessaris per a l'establiment de la impressió a causa de l'estrès mecànic que pateix l'òocit, entre altres (Cox *et al.*, 2002).

— Finalment s'ha assenyalat el cultiu *in vitro* dels embrions com a possible causa d'interferència en el manteniment de la impressió genètica (Khosla *et al.*, 2001).

Els estudis epidemiològics han estat i seran de gran importància; ara bé, atès que les incidències de les síndromes originades per anomalies epigenètiques són baixes i els increments són discrets, la informació disponible encara és escassa. Una aproximació experimental prometedora que permetrà analitzar grans poblacions (cellulars i individuals) consisteix en l'anàlisi d'errors epigenètics en espermatozoides i òocits.

OBJECTIU

Determinar la incidència d'errors de metilació en illes CpG contingudes en el gens regulats per impressió genètica *H19* (regió 11p15.5) i *SNRPN* (regió 15q11q13) en espermatozoides humans provinents de mostres de semen d'individus que consulten per problemes de fertilitat.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques

Individus amb problemes de fertilitat: En col·laboració amb la Unitat de Reproducció Assistida del Centre Mèdic Teknon s'han analitzat 27 mostres de semen. De la població masculina que consulta en centres de reproducció es desconeix sota quines indicacions poden aparèixer errors epigenètics. Per aquest motiu no s'ha utilitzat cap criteri de selecció dels candidats. Per tal de garantir l'objectivitat de l'anàlisi, l'estudi s'està realitzant a cegues: l'equip responsable de l'anàlisi epigenètica desconeix l'etiologia de la infertilitat i les característiques del semiograma.

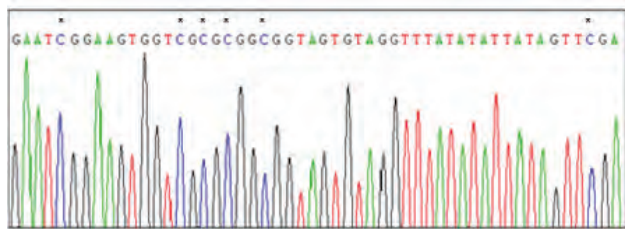


Figura 2 Fragment del cromatograma del loci *H19* obtingut amb l'encebador BH19F. L'asterisc indica les citosines metilades de la illa CpG.

logia de la infertilitat i les característiques del semiograma.

Extracció del DNA espermàtic: L'extracció de DNA genòmic s'ha realitzat amb el *kit* d'extracció comercial PUREGEN® (Gentra Systems). Atès que les mostres recollides presenten, en general, un nombre d'espermatozoides inferior al rang d'actuació descrit per la casa comercial (mínim de 3 milions d'espermatozoides), s'ha adaptat el protocol a concentracions cel·lulars més baixes (fins a un mínim de 3.000 espermatozoides).

Tractament amb bisulfit sòdic (test de metilació): Sota determinades condicions de pH i temperatura, el bisulfit sòdic converteix les citosines no metilades en uracils. Quan el DNA modificat és amplificat per PCR, els residus de citosina que es troben metilats s'amplifiquen com a citosines i presenten guanines com a base complementària. Les citosines no metilades convertides a uracils, s'amplifiquen com a timines i presenten com a base complementària adenines. En l'anàlisi de la seqüència del producte d'amplificació es poden distingir les citosines metilades de les no metilades en funció de si a la seqüència hi ha presents citosines i guanines, o bé adenines i timines. Prèviament a l'amplificació per PCR les mostres de DNA espermàtic han estat tractades amb aquest compost segons el protocol descrit per Clark *et al.* (1994).

Amplificació per PCR dels loci H19 i SNRPN: Els encebadors utilitzats per a la PCR han estat dissenyats per a ser complementaris al DNA desaminat i lliures de dinucleòtids CG.

Per a generar el producte del locus *H19*, després d'una primera ronda d'amplificació amb els encebadors H19F i H19R descrits per Kerjean *et al.* (2000), s'ha realitzat una PCR *hemi-nested* amb l'encebador BH19F. La seqüència corresponent als tres encebadors utilitzats és la següent: H19F: 5'-AGGTGTTT-TAGTTTTATGGATGATGG-3' (nucleòtids 5'-6006-6032-3', número d'accés al GenBank: AF087017), *H19 R*: 5'-TCCTATAAATATCC-TATCCCAAATAACC-3' (nucleòtids 3'-6299-6328-5', número d'accés al GenBank: AF087017),

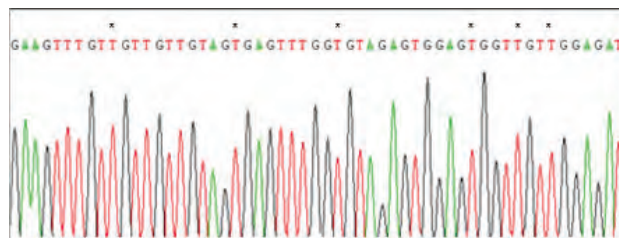


Figura 3 Fragment del cromatograma del loci *SNRPN* obtingut amb l'encebador M13F). L'asterisc indica les citosines no metilades de l'illa CpG que han estat modificades a timines.

BH19F: 5'-TTGTAGGGTTTTTGGTAGGTATA-GAG-3' (nucleòtids 5'-6060-6085-3', número d'accés al GenBank: AF087017). El fragment que s'obté després de les dues rondes d'amplificació correspon a 269 pb i conté 18 illes CpG diferencialment metilades.

Les dues rondes d'amplificació del locus *H19* s'han realitzat amb 10 mM de *PCR buffer II*, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de cada un dels encebadors i 1,25 U d'*AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. Les condicions d'amplificació utilitzades corresponen a: *Hot start* de 94° C durant 10 minuts seguits de 40 cicles de desnaturalització a 94° C durant 45 segons, *annealing* de 61° C durant 45 segons, extensió a 72° C durant 1 minut i 10 minuts d'extensió final a 72° C.

Per a generar el producte del locus *SNRPN*, després d'una primera ronda d'amplificació amb els encebadors SNRPNF-SNRPNR, s'ha realitzat una PCR *hemi-nested* amb un encebador amb cua de M13 (SN-M13F). La seqüència corresponent als tres encebadors utilitzats és la següent: SNRPNF: 5'-ATATAGGAAGATTTGAGGGTGAGTGTAAT-3' (nucleòtids 5'-130983-131013-3', número d'accés al GenBank: NC000015), SNRPNR: 5'-CCCAAAA CAAAAACTTTAAAACCCAAATTCC-3' (nucleòtids 3'-131518-131551-5', número d'accés al GenBank: NC000015), SN-M13F: 5'-GTGAGGGGAGG-GAGTT-3' (nucleòtids 5'-131213-131228-3', núm. d'accés al GenBank: NC000015). El fragment que s'obté després de les dues rondes d'amplificació correspon a 338 pb i conté 22 illes CpG diferencialment metilades.

Les dues rondes d'amplificació del locus *SNRPN* s'ha realitzat amb 10 mM de *PCR buffer II*, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 0,5 µM de cada un dels encebadors i 1,25 U d'*AmpliTaq Gold DNA Polymera-*

se. Les condicions d'amplificació utilitzades corresponen a: *Hot start* de 95° C durant 12 minuts seguits de 45 cicles de desnaturalització a 94° C durant 45 segons, *annealing* de 60° C durant 45 segons, extensió a 72° C durant 1 minut i 10 minuts d'extensió final a 72° C.

Les reaccions d'amplificació tant per a *H19* com per a *SNRPN* s'han realitzat en un volum final de 25 µl en un termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient* (Eppendorf). Els productes d'amplificació han estat visualitzats en un gel d'agarosa preparat al 2 % tenyit amb bromur d'etidi.

Seqüenciació

La PCR de seqüenciació s'ha realitzat amb el *kit BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) segons les recomanacions de la casa comercial. La seqüència del locus *H19* s'ha obtingut amb els encebadors BH19F i H19R, i la del locus *SNRPN* amb l'encebador universal M13 i amb l'encebador SNRPNR. La lectura dels resultats es realitza en un seqüenciador automàtic ABI 3100 en el Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la Universitat Autònoma de Barcelona.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

El gen *H19* presenta metilació en l'allel patern. Les citosines metilades d'aquest locus no han estat modificades en el tractament amb bisulfit sòdic i es considera que la impressió correcta es correspon amb l'observació de citosines a la seva seqüència (figura 2).

Per contra, el gen *SNRPN* presenta metilació en l'allel matern. Així doncs, les citosines en aquest lo-

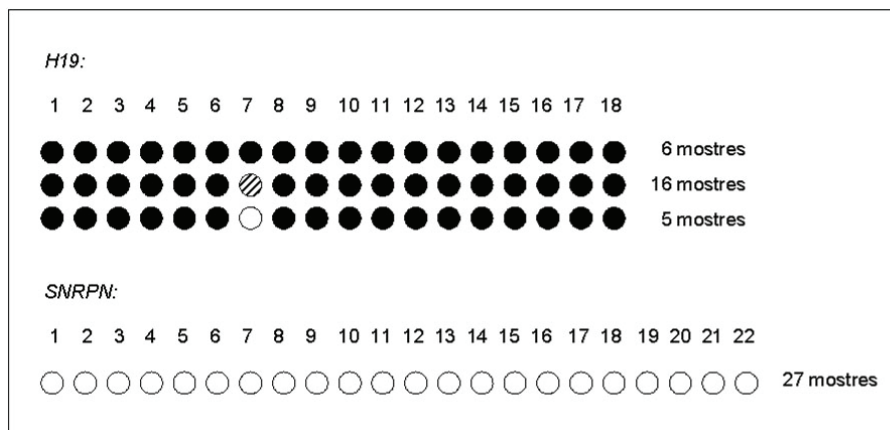


Figura 4 Estat de metilació de les 18 i 22 illes CpG analitzades en els loci *H19* i *SNRPN*, respectivament. Cada cercle indica una illa CpG i els xifres la seva posició. Els cercles negres indiquen citosines metilades i els blancs no metilades. El cercle ratllat indica citosines metilades i timines en heterozigosi corresponents al polimorfisme.

cus han estat modificades en el tractament amb bisulfit sòdic i es considera que la impressió correcta es correspon amb l'observació de timines a la seva seqüència (figura 3).

Els resultats de l'anàlisi de les 27 mostres no indiquen errors de metilació en cap de les 18 illes CpG estudiades en el locus *H19*, ni tampoc en cap de les 22 illes CpG estudiades en el locus *SNRPN* (figura 4). En el locus *H19* la citosina de la illa CpG en posició 7 correspon al polimorfisme C/T, el qual presenta una heterozigositat en la població del 50 % (rs10732516), similar a l'observada en les nostres mostres (16/27).

L'absència d'errors epigenètics en les mostres analitzades no dona suport a treballs previs publicats en què se suggeria una associació entre recomptes espermàtics baixos i un increments d'errors de metilació en el locus *H19* (Marques *et al.*, 2004). Caldrà veure com evolucionen els nostres resultats a mesura que s'incrementi la població analitzada ($n = 107$) i es relacionin els resultats obtinguts amb les característiques del seminograma.

L'aplicació del protocol utilitzat permet realitzar amb èxit l'estudi del patró de metilació de regions regulades per impressió genètica a un elevat nombre de mostres i a diferents tipus cel·lulars. L'optimització d'aquest protocol al nostre laboratori permetrà ampliar l'estudi a altres loci amb impressió genètica, i també analitzar l'estat de metilació del mateixos loci en oòcits immadurs o madurats *in vitro* descartats de programes de donació o de cicles de FIV/ICSI. L'estudi d'un elevat nombre de mostres i de diferents tipus cel·lulars és imprescindible per a determinar si existeix relació entre errors epigenètics i tècniques de reproducció assistida.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament d'un projecte de recerca per a grups emergents de la Universitat Autònoma de Barcelona (EME2005-38). Marta Pladevall gaudeix d'una beca de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB2006-00213).

BIBLIOGRAFIA

- BORGHOL, N.; LORNAGE, J.; BLACHERE, T.; SOPHIE GARRET, A.; LEFEVRE, A. (2006). «Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation». *Genomics*, 87: 417-426.
- COX, G. F.; BÜRGER, J.; LIP, V.; ULRIKE, A. M.; SEPRLING, D.; WU, B.; HORSTHEMKE, B. (2002). «Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects». *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 162-164.
- CLARK, S. J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. (1994). «High sensitivity mapping of methylated cytosines». *Nuc. Ac. Res.*, 22: 2990-2997.
- DAVIS, W.; ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. (2005). «Imprinted gene expression in the brain». *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 421-430.
- DEBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. (2002). «Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19». *Am. J. Hum. Genet.*, 72:156-160.
- EL-MAARRI, O.; BUITING, K.; PEERY, E. G.; KROISEL, P. M.; BALABAN, B.; WAGNER, K.; URMAN, B.; HEYD, J.; LICH, C.; BRANNAN, C. I.; WALTER, J.; HORSTHEMKE, B. (2001). «Maternal methylation imprints of human chromosome 15 are established during or after fertilization». *Nat. Genet.*, 27: 341-344.
- FEINBERG, A. P. (2004). «The epigenetics of cancer etiology». *Semin Cancer Biol.*, 14: 427-432.
- GEUNS, E.; DE RYCKE, M.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I. (2003). «Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos». *Hum. Mol. Genet.*, 12: 2873-2879.
- HALLIDAY, J.; OKE, K.; BREHENY, S.; ALGAR, E. J.; AMOR, D. (2004). «Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study». *Am. J. Hum. Genet.*, 75:526-528.
- ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. (2000). «Imprinted genes, cognition and behavior». *Trends Cogn. Sci.*, 4: 309-318.
- KERJEAN, A.; DUPONT, J. M.; VASSEUR, C.; LE TESSIER, D.; CUISSET, L.; PÁLDI, A.; JOUANNET, P.; JEANPIERRE, M. (2000). «Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis». *Hum. Molec. Genet.*, 9: 2183-2187.
- KISHINO, T. (2006). «Imprinting in neurons». *Cytogenet. Genome Res.*, 113: 209-214.
- KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. (2001). «Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes». *Biol. Reprod.*, 64: 918-926.
- LUDWIG, M.; KATALINIC, A.; GROSS, S.; SUTCLIFFE, A.; VARON, R.; HORSTHEMKE, B. (2005). «Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples». *J. Med. Genet.*, 42: 289-291.
- MARQUES, C. J.; CARVALHO, F.; SOUSA, M.; BARROS, A. (2004). «Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis». *The Lancet*, 363: 1700-1702.
- MCGRATH, J.; SOLTER, D. (1984). «Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and parental genomes». *Cell*, 37: 179-183.
- NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. (2004). «Epigenetics

- and assisted reproductive technology: a call for investigation». *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 599-609.
- ORSTAVIK, K. H.; EIKLID, K.; VAN DER HAGEN, C. B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. (2003). «Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection». *Am. J. Hum. Genet.*, 72: 218-219.
- POLYCHRONAKOS, C.; KUKUVITIS, A. (2002). «Parental genomic imprinting in endocrinopathies». *Eur. J. Endocrinol.*, 147: 561-569.
- REIK, W.; WALTER, J. (2001). «Genomic imprinting: parental influence on the genome». *Nat. Genet.*, 2: 21-32.
- SCHANEN, N. C. (2006). «Epigenetics of autism spectrum disorders». *Hum. Mol. Genet.*, 15: 138-150.