

ESTUDI MUTACIONAL DEL GEN *HSPA2* EN PACIENTS INFÈRTILS I EN CONTROLS

Rubén Azpiazu,¹ Meritxell Jodar,¹ Jordi Cámara,¹ Josep Oriola,¹ José Luís Ballecà²
i Rafael Oliva¹

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona; Hospital Clínic. Casanova, 143. 08036 Barcelona. roliva@ub.edu.

² Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial.

Resum

Les proteïnes de xoc tèrmic HSP són xaperones moleculars que assisteixen altres proteïnes en el seu plegament i transport. Les proteïnes HSPA2 són un tipus específic que s'expressa especialment en les cèl·lules espermatogèniques. Tenen diverses funcions conegudes: són essencials per al procés meiótic, s'associen al complex sinaptonemal, es relacionen amb la inhibició apoptòtica i amb la transició nucli-histona nucli-protamina. D'acord amb les troballes descrites en ratolins genoanul·lats per a HSPA2 (Zhu *et al.*, 1997), en què s'observava que ratolins masculins eren infèrtils amb parada madurativa en l'estadi d'espermatòcits primaris, i dels resultats proteòmics previs del nostre grup, que van trobar un augment significatiu de la HSPA2 en pacients amb major lesió germinal determinada per TUNEL i en pacients astenozoospermics (Mateo *et al.*, 2007), hem iniciat un estudi mutacional del gen corresponent en pacients infèrtils. S'han inclòs 10 pacients azoospermics amb aturada madurativa, 10 pacients oligoastenoteratozoospermics severes, 10 pacients teratozoospermics i 10 controls d'individus amb fertilitat provada. Mitjançant el disseny de primers específics hem aconseguit amplificar i seqüenciar de manera específica el gen de la HSPA2, discriminant pseudogens i gens homòlegs de la família de la HSP. Fins avui hem trobat dues SNP i cap mutació patogènica.

Paraules clau: HSPA2, aturada madurativa, azoospermia, oligoastenoteratozoospermia severa, teratozoospermia, polimorfisme, mutació.

Abstract

The heat shock proteins HSP are molecular chaperones that assist other proteins in their folding and transport. HSPA2 proteins are a specific type that are specifically expressed in spermatogenic cells. They have several known functions: they are essential for the meiotic process, are associated with the synaptonemal complex, and are related to the apoptotic inhibition and with the nucleus-histone to nucleus-protamine transition. Based on the findings described in knock-out mice for HSPA2, where it was observed that male mice were infertile with maturation arrest in the primary spermatocyte stage, the previous proteomic results of our group where it was detected a significant increase of the HSPA2 in patients with lower DNA integrity as determined by TUNEL and in asthenozoospermic patients (Mateo *et al.*, 2007, *Proteomics*, 7: 4264-4277), we have initiated a mutational study of the corresponding gene in infertile patients. We have included 10 azoospermic patients with maturation arrest, 10 severe oligoasthenoteratozoospermic patients, 10 teratozoospermic patients, and 10 controls with proven fertility. Through the design of specific primers we have amplified and sequenced the *HSPA2* gene specifically, distinguishing from pseudogenes and homologous genes of the HSP family. So far we have found two SNPs but no pathogenic mutation.

Key words: HSPA2, maturation stop, azoospermia, teratozoospermia, severe oligoasthenoteratozoospermia, polymorphism, mutation.

INTRODUCCIÓ

S'estima que al voltant d'un 15 % de parelles presenten una fertilitat reduïda i la infertilitat masculina és responsable de la meitat dels casos (OMS, 1999). Tanmateix, la majoria de causes d'infertilitat mascu-

lina encara es desconeixen. D'aquí la importància de conèixer el proteoma de l'espermatozoide i, en conseqüència, els gens candidats a analitzar. Un d'aquests gens és el de la proteïna HSPA2, que s'expressa i té un paper important en l'espermatogènesi (Govin *et al.*, 2006). Aquesta proteïna també ha estat

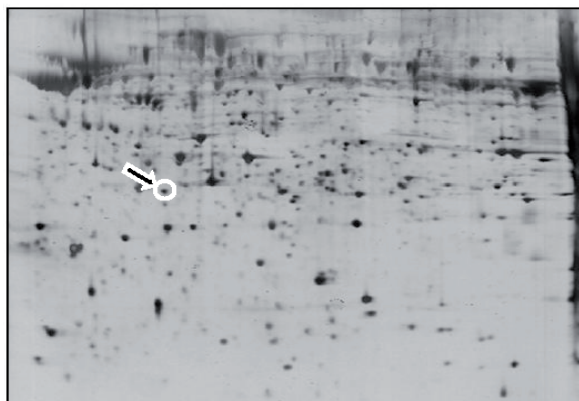


Figura 1. Detecció de la proteïna HSPA2 (noteu la sargeta) en bidimensionals formant part dels estudis proteòmics realitzats en el nostre grup i detectada mitjançant espectrometria de masses.

detectada com a alterada en pacients infèrtils en projectes recents en el nostre grup (Oliva *et al.*, 2008, 2009; Mateo *et al.*, 2007; vegeu la figura 1). Per tant, en aquest treball ens hem plantejat l'estudi mutacional del gen corresponent a la recerca de possibles mutacions o polimorfismes potencialment associats a la infertilitat.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi es van incloure 10 mostres d'individus control (paternitat provada), 10 d'individus azo-

ospermics (amb bloqueig maduratiu determinat en biòpsia testicular), 10 mostres d'individus teratozoospermics i 10 mostres d'oligoastenoteratozoospermics. Partint de mostres d'ejaculació dels pacients teratozoospermics i oligoastenoteratozoospermics severes es van aïllar els espermatozoides mitjançant gradient de Percoll, i a continuació es va aïllar el seu DNA. El DNA de la resta de pacients es va aïllar a partir de mostres de sang perifèrica. Tots els pacients i controls van donar el consentiment informat.

El gen *HSPA2* s'amplifica per PCR mitjançant primers específics de la regió d'interès per seqüenciar-la posteriorment (vegeu la figura 2). Per a un procés correcte és necessari el tractament previ amb EXOSAP-IT, i la reacció de seqüenciació es realitza amb el kit de seqüenciació cíclica BigDye Terminator v3.1. El seqüenciador automàtic és el DNA 3100. Una vegada obtinguda la seqüència s'analitza mitjançant els programes CHROMAS i DNASTAR.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha posat a punt el mètode per a l'amplificació i estandardització de les condicions, així com els primers adequats, per amplificar per complet el gen *HSPA2*. La seqüència codificant està formada per un sol exó de 1920 pb i s'han utilitzat diferents combinacions de primers per poder amplificar-lo (vegeu la figura 2).

5'
 CTCGGCCTCCCAAGTGTGGGATTACAGCGTTAGCCACTGCGCCCGGCCAGCCAGGCAGTTTAAATCGAGCGCTCACAACTGAGACGCAGTGAAGCACCCACCATAAA
 ATCCCAGGAGGCCAGCCCGGTTACAGACTTTTCTTTTCTTAAATCCCGTCCAAGGATCCGCGCTCACCCCCACCCAGCCACCCCAATTCCCTATTCCCTCCCTTGGA
 CGGCGCCGGGAAAACAGCTGCTCGAGCTTTATTTCTTCCGTTGCAACCACTCAGAATGAATTCCTCCGCCCTGCTGCTCAGTGAGTCCGACCCCTAGCAGTGAAGTGCAT
 TTAACACCTCAGGAATTGAGCGAATCTCCAGTGGCTCTCCTCACCGGATCCCTTCCACGCTCTCTCCCGTCCCGGCTCAGTCCGCACTGCTCATTTGGCCGCTGCC
 TGCCAAATCCGATGCACGTCCGCTAGGGCAAGACCGCGAAAAAGCGCTACACCTGGCTCTGGGAGCGCGCCCTAACGCCAGCCAGCAGCAGGAGGCGCGGAGCCACCGG
 CCTGGCGGCGAGAGTCAAGGAGGAACCTCAATTTACATAACCGCCCGCCCTCTGTCTCTGGCGGGGGCCGAGTCCCGCCCTCGTCCAACCTTGAATCTGTGGTACAGGG
 CCAGTCACTCCGACCTAGGCAAGCTGTGGTGGAGCTGGAAAGATTGTGGAGGGCGGTCGCCGGAGCGGATTTGGGTCTGGGAGTTCCAGAGGCGGCTATAAGAACCGGGAAT
 GGGCGGGGAGCTGAGTTGCTGGTAGTCCCGTGGTCTGGTTCGAGGTTGGCGTTAGTTGACTCCGCGGAGTTTCACTCCCTGGTTTTCCCGTCTCAAGCTCGCTCGCTT
 TCAGTCAGGATGTCTGCGCGTGGCCGGCTATCGGCATCGACCTGGGCACCACCTATTCGTCGCTCGGGTCTTCCAACATGGCAAGTGGAGATCATCGCCAAAGCACAGGGC
 AATCGCACCCAGCCAGCTACGTGGCTTTCAGGCACCCGAGCGCCTCATCCGCGACCCCGCCCAAGAACCCAGTGGCCATGAACCCCAACACCATCTTCGACGCCAAGAGG
 CTGATTTGACGGAAATTCAGGATGCCACAGTGCAGTCCGATATGAACACTTGGCCGTTCCGGTGGTGAAGCAGGAGGGAAGCCAAAGTGAAGTAGAGTCAAGGGGGAG
 ACCAAGACTTCTTCCAGAGGAGATATCTCCATGGTCTCACGAAAGATGAAGGAGATCCCGGAAGCTTACCTGGGGGCAAGTGCACAGCCGCTTCAACCGTCCCGGCC
 TATTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCCAAGGACCGCAGCCATCACGGGCTCAATGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCACGGCGCGGCCATCGCTACCGCTGGAC
 AAGAAAGGCTGCGCGGGCGGAGAAAGACCGCTCACTTTGACCTGGCGGTGGCACTTTCGACGTGTCCATCTGACCATCGAGGATGGCATCTTCGAGGTGAAGTCCAGC
 GCGGGCGATACCCACTGGCGGTGAGGACTTCGACAACCGCATGGTGGCCACTTGGCGGAGGATTCAGCCGCAAGCACAAGAAGGACATTTGGCCCAACAGCGCCCGCTG
 AGCGGCTGCGCACCGCTTGCAGCGCCCAAGCGCACCTTGAGTCTGTCACGACGAGGAGCATCGAGATCGACTCGCTTACGAGGGCGTGGACTTCTATACGTCCTCACG
 CGCGCCGCTTCGAGGAGTCAATCCGACCTTTCGCGGGACCTTGAGCCGCTGGAGAAGCGCTGCGCGACCCAGCTGGACAAGGGCCAGATCCAGGAGATCGTGTCTG
 TGGGGCGGCTCCACTCGTATCCCCAAGATCCAGAAGCTGCTGCGAGGATTTCTTCAACGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCGGTGGCCATTTGGCGCCG
 GTGAGGGGCCATCTCATCGCGCAAAATCAGAGAATGTGACGACCTGCTGCTACTCGACGTGACCCCGTTTCTGCTGGGCATCGACAGCTGGCGGTGTCATGACCCCA
 CTCAATCAGAGGAAACACCGATCCCCACCAAGCAGACGACGACCTTCAACCTTACTCGGACAAACAGCAGCAGCTACTGGTGCAGGTATACGAGGGCGAACGGCCATGACC
 AAGGACATAAACCCTGCTGGCAAGTTTCAGCTGACCGGATTTCCCTCGCCCTCGCGGGTCCCCAAATCGAGGTTACCTTCGAGATTTGACGCCAATGGCATCTTAACTGTT
 ACCCGCGCGCAAGAGCACCCGGTAAGGAAAAAATCAACATCACCAATGACAAGGTCGTCTGAGCAAGGACGACATTTGACCCGATGGTGCAGGAGGCGGAGCGGTACAAA
 TCGGAAGATGAGGGCAATCCGACCCGAGTCCGCGCCAAAAACGCCCTGGAGTCTTATACCTACAAATCAAGCAGACCGTGAAGACGAGAACTGAGGGCAAGATTAGCGAG
 CAGGACAAAACAGATCCTTCGACAAGTGTGAGGAGTGAATCAACTGGCTCGACCGAAACAGATGGCAGAGAAGATGAGTATGAACAAGCAGAAAGAGCTCGAAAGATT
 TGCACCCCATCATCGCAACTTTTACCAAGTGGTCTGCGCGGCGCAGCGCGGCGGCTTCAGGAGCTTCCGGGGACCCACCATCGAAGAAGTGGACTTAAAGCTTGCACCT
 CAAGTCAGCGTAAACCTCTTGGCTTTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTTTGGTTGTTTCTTGAATGTCCTTGTGCCAAGTACGAGATCTATTGTTGGAAGTCTTTGGTATATGCA
 AATGAAAGGAGAGTGAACAACCTTAGTTTAAATATAAAAGTTCCAAAGTTGTTTAAAAACATTTATCGAGTTTCTCTTAAATGATTTTGGCTGTTTGTCTGACTTTGAG
 CATTTTTGATTAGTTCGTGATGGAGATTTGTTGAGATGAGAAACCTTAAGTTTGCACACCTGTTCTGTAGAGCTTGGAAACAGTAAAAATATATAGGAGCTTAAATTTGTTA
 TTTTATGTACTACTTTAAACTAACTGAAATTCAGTAAATGTTAAGGACAGTATACTTTTTGAACAACAAATGCATAAATGCAATGTAAGTAAAGCTGAAATGTATC
 3'

Figura 2. Gen de la HSPA2. En negra es mostra la seqüència codificant. Es van realitzar tres amplificacions amb els primers 1F/1R, 2F/2R i 3F/3R (subratllats). En fons gris es mostren les bases en les quals s'han observat polimorfismes.

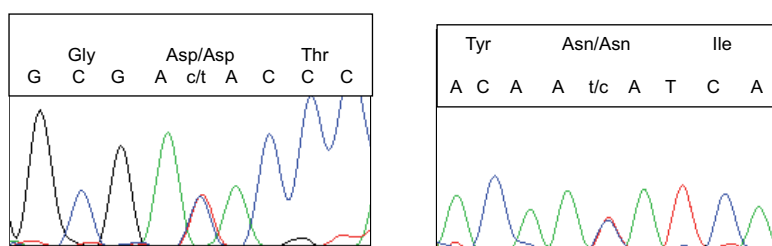


Figura 3. Part de les seqüències on s'observen els dos polimorfismes en forma d'heterozigots, els quals no comporten canvi d'aminoàcid.

S'han detectat 2 SNP, ja descrits prèviament, que no comporten canvi d'aminoàcid (vegeu les figures 2 i 3). La variant c.684 T>C l'hem trobada en tots els tipus d'infertilitat i en controls. La variant c.1653 C>T es presenta en un cas d'oligoastenoteratozoospermia severa. En les mostres estudiades fins ara no s'ha detectat cap mutació patogènica.

Encara que s'observa que es tracta d'un gen bastant conservat, ja que s'expressa en diferents teixits i presenta diverses funcions importants, queda oberta ara la possibilitat d'incrementar el nombre de pacients a analitzar, la qual cosa permetrà determinar la possible existència de mutacions patogèniques en el gen *HSPA2*.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479.

BIBLIOGRAFIA

- GOVIN, J.; CARON, C.; ESCOFFIER, E.; FERRO, M.; KUHN, L.; ROUSSEAU, S.; EDDY, E. M.; GARIN, J.; KHOCHBIN, S. (2006). «Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis». *J. Biol. Chem.*, 281(49): 37888-37892.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA R. (2008). «Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples». *Hum. Reprod.*, 23(4): 783-791.
- MATEO, S. DE; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa». *Proteomics*, 7(23): 4264-4277.
- OLIVA, R.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M. (2008). «Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(1): 23-36. [Revisió]
- OLIVA, R.; MATEO, S. DE; ESTANYOL, J. M. (2009). «Sperm cell proteomics». *Proteomics*, 9(4): 1004-1017.
- ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (1999). *WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press.
- ZHU, D.; DIX, D. J.; EDDY, E. M. (1997). «HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes». *Development*, 124(15): 3007-3014.