

ESTUDI MUTACIONAL DELS GENS DE LA PROTAMINA 1 I 2 EN PACIENTS INFÈRTILS I CONTROLS

Meritxell Jodar,¹ Gemma Mestre,¹ Josep Oriola,¹ Manel Gené,² José Luís Balleascà³ i Rafael Oliva¹

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona; Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona.

roliva@ub.es.

² Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

³ Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial.

Resum

Les protamines són les proteïnes més abundants en espermatozoides i actuen empaquetant el genoma patern. S'ha observat que animals genoanul·lats per a la protamina 1 (PRM1) i per a la protamina 2 (PRM2) presenten una infertilitat severa. En humans s'ha demostrat que en alguns pacients infèrtils hi ha alteració en l'expressió d'aquestes protamines. L'objectiu del present treball és l'estudi mutacional de *PRM1* i *PRM2* en pacients amb un fenotip ben definit, teratozoospermics (formes normals (FN) $\leq 9\%$), així com corroborar la possible associació de l'SNP c.-190C>A en *PRM1* en pacients amb morfologia espermàtica alterada descrita prèviament per Gázquez *et al.* (2008). Com a controls per a aquest estudi hem escollit individus amb paternitat provada i pacients amb FN $> 9\%$. Descriuim diferents variants trobades en els dos gens i confirmem l'associació entre el genotip AA (c.-190C>A) i la morfologia espermàtica alterada. A més, hem establert els haplotips més comuns en la nostra població.

Paraules clau: infertilitat, espermatozoide, protamines, factor de risc, haplotips.

Abstract

Protamines are the major nuclear sperm proteins and they are important for the correct packaging of the DNA in the sperm nucleus. Protamine haploinsufficiency in mice results in infertility. Studies in humans have demonstrated the presence of an altered expression of protamines in some infertile patients. Our goals in the present study have been the screening of protamine 1 (*PRM1*) and protamine 2 genes (*PRM2*) in order to look for mutations in patients with abnormal sperm morphology (Normal Forms (NF) $\leq 9\%$) and corroborate the association previously described by Gázquez *et al.* (2008) between the c.-190C>A SNP present in the *PRM1* gene and altered sperm morphology. We have selected fertile men and patients with NF $> 9\%$ as controls. We describe different variants in both genes. Our results show association between the AA genotype in the c.-190C>A polymorphism and the altered sperm morphology. In addition, we have established the most common haplotypes in our population.

Key words: infertility, sperm, protamines, risk factor, haplotypes.

INTRODUCCIÓ

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants en espermatozoides i actuen empaquetant el genoma patern (Oliva i Dixon, 1991). En humans hi ha una còpia del gen de *PRM1* i una còpia del gen de *PRM2* per genoma haploide. Mentre que la *PRM1* és sintetitzada com una proteïna madura, els components de la família de *PRM2* es generen per la proteòlisi d'un precursor comú, que es transcriu d'un únic gen (Oliva, 2006). La importància de les protamines durant l'espermatogènesi va ser emfatitzada per la

creació d'un model animal genoanul·lat en què una haploinsuficiència de *PRM1* i *PRM2* causava en ratolins una infertilitat severa (Cho *et al.*, 2001). En el nucli espermàtic humà el contingut de protamina 1 és molt similar al de la protamina 2 (la relació P1/P2 és aproximadament 1), però diferents estudis han demostrat que en alguns pacients infèrtils hi ha una alteració en l'expressió de protamines (Yebra *et al.*, 1998; Oliva, 2006).

Tan aviat com es va veure que aquestes diferències en el contingut de protamines implicaven infertilitat en la majoria de pacients, es van succeir diferents

estudis d'aquests gens a la recerca de mutacions que poguessin explicar aquesta reducció de l'expressió de protamines en pacients infèrtils. No obstant això, l'anàlisi mutacional inicial en els gens de les protamines suggereix que les mutacions patogèniques en aquests són una causa rara d'infertilitat masculina. Aquesta baixa incidència de variacions en els gens de la protamina que causin substitucions d'aminoàcids en homes fèrtils indica la gran importància que té la conservació d'aquests al llarg de l'evolució per garantir una bona espermatogènesi i, així, la continuïtat de l'espècie. Però en estudis més recents s'han trobat certes variants que podrien estar implicades en la infertilitat. Per tant, les mutacions en els gens de les protamines són una causa infreqüent d'infertilitat, però no tan rara com es pensava en un principi.

Ja que s'ha vist aquesta baixa variabilitat en la zona codificant del gens, els nous estudis s'han enfocat envers les regions no codificants 5' i 3' (les mutacions en aquestes regions dels gens poden provocar variacions en la seva expressió). En tots els camps de la medicina hi ha un gran interès per l'estudi dels marcadors genètics, com són els polimorfismes, ja que una variant genètica pot ser la responsable directa d'alterar la funció o l'expressió de la proteïna, o bé pot estar en desequilibri de lligament amb una mutació rellevant que formi part del mateix gen o del mateix haplotip. Per tant, actualment els estudis genètics d'infertilitat es fan amb una selecció acurada de pacients infèrtils segons les característiques del seminograma, per detectar possibles variants. En el nostre grup s'ha publicat recentment un polimorfisme en el promotor de la *PRMI* que es correlaciona amb espermatozoides amb morfologia alterada. (Gázquez *et al.*, 2008). El present estudi suposa la continuació lògica d'aquest treball previ.

OBJECTIUS

Confirmar l'associació entre l'homozigositat AA del polimorfisme c.-190C >A de *PRMI* i la morfologia alterada descrita anteriorment en el nostre grup en un grup independent de pacients i controls.

Estudi de les regions codificants i no codificants del gens de *PRMI* i *PRM2* a la recerca de variants.

A causa de la proximitat dels dos gens en estudi *PRMI* i *PRM2* (estan separats únicament per 5.000 parells de bases), cal establir els haplotips més comuns en la nostra població.

MATERIALS I MÈTODES

Per a l'estudi del gen *PRMI* hem utilitzat 125 pacients infèrtils (77 pacients amb una morfologia espermàtica amb formes normals (FN) \leq 9 % i 48 pacients amb FN > 9 %). També hem inclòs 102 controls de paternitat provada. El polimorfisme c.-190C>A es va estudiar amb anterioritat en 194 pacients (51 amb FN \leq 9 % i 143 amb FN > 9 %) i en 101 controls procedents de donants de sang (Gázquez *et al.*, 2008, vegeu la taula 1). Per a l'estudi del gen de la *PRM2* hem utilitzat 88 pacients infèrtils (61 pacients amb FN \leq 9 % i 27 pacients amb FN > 9 %), i s'han inclòs també 39 controls de paternitat provada. Les mostres dels pacients provenen de l'ejaculació i, per tant, s'han de separar els espermatozoides del fluid seminal i d'altres cèl·lules presents en el semen, i un cop es tenen els espermatozoides purs s'aïlla el DNA. El protocol que s'utilitza en l'aïllament de DNA d'espermatozoides és el que apareix a Hoissan *et al.* (1997), amb certes modificacions. Els dos gens s'amplifiquen mitjançant la tècnica de PCR i se seqüencien mitjançant seqüenciació directa, tant la regió codificant com la no codificant.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En l'estudi del gen *PRMI* hem confirmat en una població independent que el polimorfisme del promotor (c.-190C>A) en homozigosi es comporta com a factor de risc per a la teratozoospermia. (Gázquez *et al.*, 2008, vegeu la taula 1). Addicionalment es van trobar diferents variants en *PRMI* i *PRM2* (vegeu la figura 1), encara que cap d'aquestes no mostra diferències significatives entre pacients i controls. Tot i això, cal destacar certes variants:

— En el gen *PRMI* s'ha trobat en heterozigosi la mutació p.Arg34Ser (c.102G>T). Aquesta mutació va ser descrita per Iguchi *et al.* (2006) en tres pacients de 30 amb un fenotip similar al del ratolí genoanulat (comptatge espermàtic normal, fragmentació de DNA i morfologia alterada). En el nostre estudi hem trobat aquesta variant en un pacient normozoospermic i, encara que no tenim dades de fragmentació, aquest resultat concorda amb el que descriuen Kichine *et al.* (2008).

— En el gen *PRM2* s'ha trobat en heterozigosi la variant c.309*61G>C. Aquesta variant va ser descrita per Hammound *et al.* (2007) en pacients amb una relació P1/P2 alterada, i en el nostre estudi la trobem en un control de paternitat provada en dos pacients amb una relació P1/P2 normal.

gen *PRM2* que presenten una freqüència elevada. A causa de la proximitat dels dos gens és probable que el nombre de combinacions d'aquestes variants estigui restringit a uns determinats haplotips. En el nostre estudi veiem que cinc haplotips estan presents en més del 95 % de la població estudiada (vegeu la taula 2). Si comparem la freqüència d'aquests haplotips entre controls i pacients no observem diferències significatives; no obstant això, hi ha certs haplotips que no s'inclouen en la classificació anterior. Un de 78 allels, en controls, 8 de 122, en pacients teratozoospermics, i 2 de 54, en normozoospermics, presentaven altres haplotips (5 %). Per tant, observem que, dels onze haplotips diferents, únicament un correspon als controls. Sembla que en pacients amb morfologia alterada hi ha més haplotips menys freqüents, tot i que no observem diferències significatives, probablement a causa del nombre escàs de mostres estudiades.

AGRAÏMENTS

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

BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; CHRISTENSEN, G. L.; ATKINS, J. F.; CARRELL, D. T. (2006). «Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility». *Fertil. Steril.*, 86: 1416-1422.
- CHO, C.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; JUNG-HA, H.; CHOI, Y. C.; HECHT, N. B.; EDDY, E. M. (2001). «Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice». *Nat. Genet.*, 28: 82-86.
- GÁZQUEZ, C.; ORIOLA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2008). «A common protamine 1 promotor polymorphism (-190C→A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients». *J. Androl.*, 29: 540-548.
- HAMMOUD, S.; EMERY, B. R.; AOKI, V. W.; CARRELL, D. T. (2007). «Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation». *Androl.*, 53: 267-274.
- HOSSAIN, A. M.; RIZK, B.; BEHZADIAN, A.; THORNEYCROFT, I. H. (1997). «Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation». *Mol. Hum. Reprod.*, 3: 953-956.
- IGUCHI, N.; YANG, S.; LAMB, D. J.; HECHT, N. B. (2006). «An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility?». *J. Med. Genet.*, 43: 382-384.
- KICHINE, E.; MSAIDIE, S.; BOKILO, A. D.; DUCOURNEAU, A.; NAVARRO, A.; LEVY, N.; TERRIOU, P.; COLLIGNON, P.; BOETSCH, G.; CHIARONI, J.; MITCHELL, M. J. (2008). «Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G->T and c.-107G->C do not correlate with male infertility». *J. Med. Genet.*, 45: 255-256.
- OLIVA, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, 12: 417-435.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- YEBRA, L. DE; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69: 755-759.