

CORRELACIÓ ENTRE LA RELACIÓ DE PROTAMINES I LA PRESENCIA DE POLIMORFISMES A LA REGIÓ PROMOTORA DEL GEN DE LA PROTAMINA 1

Judit Castillo,¹ Sara de Mateo,¹ Meritzell Jodar,¹ Josep Oriola,¹ José Luís Ballecà²
i Rafael Oliva¹

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

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

Resum

Existeix evidència que en una proporció important dels pacients infèrtils es troben presents alteracions en els nivells de protamines. El nostre grup ha identificat recentment en la nostra població un polimorfisme a la regió promotora del gen de la protamina 1 (c.-190C>A), amb el genotip AA com el més freqüent en pacients teratozoospermics. Amb l'objectiu de contribuir a identificar el mecanisme responsable d'aquesta associació, hem iniciat un projecte per determinar la relació de protamines P1/P2 i protamines/DNA en relació amb el polimorfisme detectat, així com la morfologia i mobilitat dels espermatozoides, en un grup d'11 pacients c.-190AA, 34 pacients c.-190AC, 44 pacients c.-190CC i 10 controls de fertilitat provada. Les protamines s'extreuen a partir de 10 milions d'espermatozoides i s'analitzen en gels àcids de poliacrilamida. El DNA es quantifica després de la hidròlisi en àcid perclòric. Els resultats indiquen un increment en la relació P1/P2 en el grup de pacients amb el genotip AA en comparació de la resta de pacients i controls, i també una relació significativa entre el quocient protamina/DNA i la morfologia dels espermatozoides. Una possible interpretació és que el polimorfisme c.-190C>A incrementa l'expressió del gen de la protamina 1, que resulta en un augment de la relació P1/P2 i en una morfologia alterada en pacients infèrtils.

Paraules clau: protamines, infertilitat, espermatozoides, factor de risc.

Abstract

An abnormal expression of protamines has been described in some infertile patients. Recently, our group has identified a protamine 1 promoter gene polymorphism (c.-190C>A) in our population, and the AA genotype is more frequent in teratozoospermic patients. With the aim to help to identify the mechanism responsible for this association, we have begun the present study to determine the protamine P1/P2 ratio and the protamines/DNA ratios, and to relate this information with the studied polymorphism and the sperm morphology and mobility, in a group constituted by 11 c.-190AA patients, 34 c.-190AC patients, 44 c.-190CC patients and 10 controls. The protamines have been extracted from 10 millions sperm cells and have been analysed in acidic polyacrylamide gels. The DNA has been quantified after its 0.5 N perchloric acid hydrolysis at 90 °C. The results show an increased P1/P2 ratio in the AA patient group compared with the CA or CC groups and controls, and a significantly relation between protamine/DNA ratio and the sperm cell morphology has been detected. A possible interpretation for the results is that the c.-190C>A polymorphism increases the protamine 1 gene expression resulting in a high P1/P2 ratio and an abnormal sperm cell morphology in infertile patients.

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

INTRODUCCIÓ

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants presents en les cèl·lules espermàtiques de moltes espècies diferents (Oliva i Dixon, 1991). En l'home es coneixen dos tipus de protamines, la protamina 1 (P1) i la protamina 2 (P2). Molts estudis

han demostrat que es troben alteracions en els seus nivells en una proporció important de pacients infèrtils (Balhorn *et al.*, 1988; Yebra *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 2005; Oliva, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006). Tan aviat com es van observar diferències en el contingut de protamines, es va postular que hi podia haver mutacions en els gens corresponents (Yebra *et al.*,

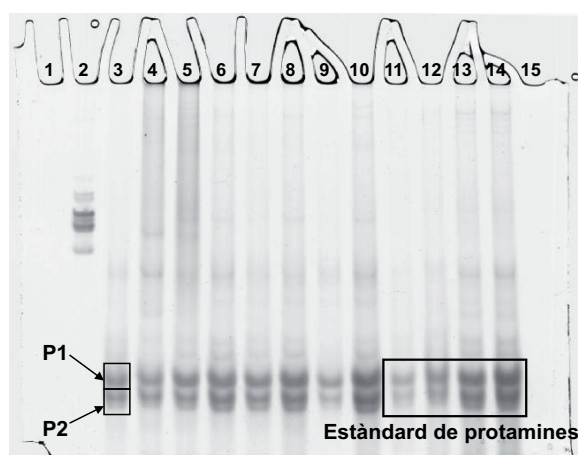


Figura 1. Exemple de gel àcid de poliacrilamida per a l'anàlisi de protamines per electroforesi. Carril 2, estàndard d'histones; carrils 3-10, mostres de pacients infèrtils; carrils 11-14, estàndard de protamines, necessari per determinar la quantitat de protamines en μg . La banda superior correspon a la protamina 1 (P1) i la inferior a la protamina 2 (P2).

1993). Recentment, el nostre grup ha identificat en la nostra població un polimorfisme en la regió promotora del gen de la P1 (c.-190C>A). Aquest canvi de nucleòtid s'ha detectat amb més freqüència en pacients teratozoospèrmics, és a dir, amb una morfologia alterada en els seus espermatozoides. Els paci-

ents amb genotip AA presentaven una relació P1/P2 incrementada en comparació de pacients amb genotips A/C o C/C (Gázquez *et al.*, 2008).

El present estudi pretén contribuir a identificar el mecanisme responsable d'aquesta associació mitjançant la determinació de la relació P1/P2 en un nombre superior de pacients, així com la relació protamines/DNA, relacionant les dades obtingudes amb el polimorfisme detectat i la morfologia dels espermatozoides. D'altra banda, es pretén comprovar la relació que existeix entre la morfologia de les cèl·lules espermàtiques i la seva mobilitat.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi consta d'un total de 89 pacients infèrtils, dels quals 23 són normozoospèrmics i 66 teratozoospèrmics, tots ells procedents del laboratori d'andrologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Onze pacients presenten el genotip de risc c.-190AA, 34 pacients són heterozigots c.-190AC i 44 homozigots c.-190CC. Addicionalment, s'han inclòs deu controls de fertilitat provada.

Les protamines s'han extret a partir de 10 milions d'espermatozoides mitjançant precipitació amb etanol i tractament amb HCl 0,5 M. Finalment, s'han analitzat per electroforesi en gels àcids de poliacrila-

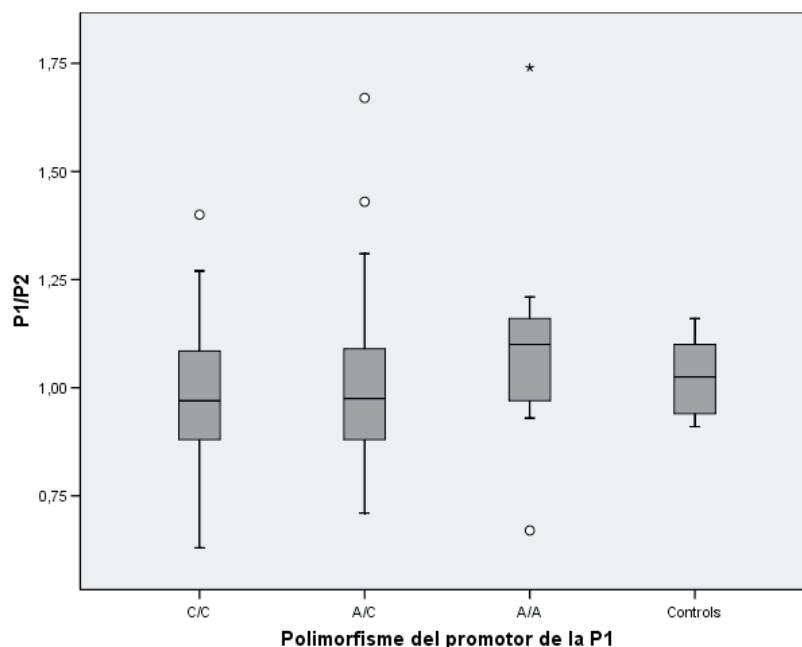


Figura 2. Distribució del quocient entre protamina 1 i protamina 2 (P1/P2) a cada grup de pacients, d'acord amb el polimorfisme de la regió promotora del gen de la protamina 1 (*PRM1* c.-190C>A), i controls.

Taula 1. Representació de la mitjana \pm desviació estàndard de les relacions P1/P2, P/DNA, P1/DNA i P2/DNA per al grup de pacients que no presenta genotip de risc i per al grup de pacients amb el polimorfisme *PRMI* c.-190AA per un costat, i per al conjunt de pacients amb un percentatge de formes normals (FN) al semen inferior o igual al 9 % i per als que presenten una proporció major a 9 %

	P1/P2	P/DNA	P1/DNA	P2/DNA
C/C	0,987 \pm 0,156*	0,488 \pm 0,090	0,241 \pm 0,050	0,247 \pm 0,047
A/A	1,103 \pm 0,260*	0,447 \pm 0,119	0,231 \pm 0,064	0,216 \pm 0,062
FN \leq 9 %	1,011 \pm 0,211	0,459 \pm 0,102**	0,228 \pm 0,054**	0,231 \pm 0,056**
FN > 9 %	1,001 \pm 0,129	0,521 \pm 0,108**	0,260 \pm 0,057**	0,261 \pm 0,055**

* $P = 0,058$, Mann-Whitney, entre pacients C/C i A/A.

** $P < 0,05$, Mann-Whitney, entre pacients amb FN \leq 9 i FN > 9.

mida (vegeu la figura 1), tal i com s'explica en l'article de Gázquez *et al.* (2008), però amb els següents canvis: la preelectroforesi s'ha dut a terme durant 1 h i 20 min i l'electroforesi durant 1 h; en cadascun dels gels s'han inclòs quatre mostres estàndard amb concentració coneguda de protamines per a la quantificació posterior de les mostres; els gels han estat tenyits amb EZBlue™ Gel Staining Reagent, solució preparada que conté Coomassie Brilliant Blue G-250, segons el protocol comercial (SIGMA).

El DNA s'ha quantificat després de la hidròlisi en àcid perclòric 0,5 N a 90 °C durant 20 min i la deter-

minació posterior de l'absorbància a 260 nm mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

La proporció de formes normals (FN) i la mobilitat progressiva ràpida s'han mesurat com a percentatge d'espermatozoides en el semen mitjançant el criteri estricte de Kruger i el sistema CASA (*computer assisted semen analysis*), respectivament.

Les anàlisis estadístiques s'han dut a terme amb el programari informàtic SPSS (versió 14.0) i el test no paramètric Mann-Whitney.

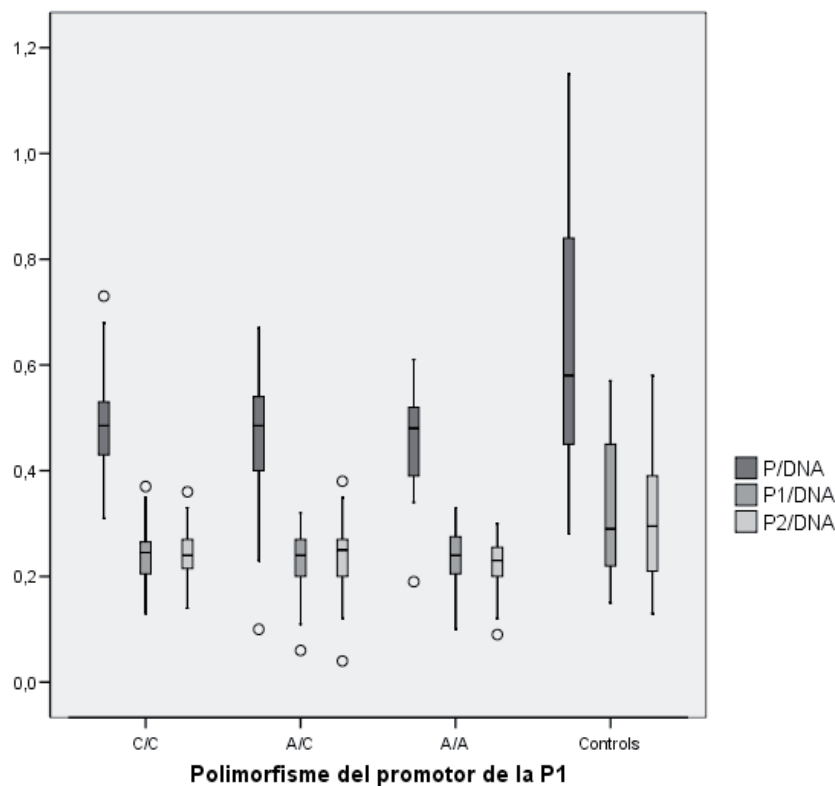


Figura 3. Distribució del quocient entre protamina 1 + protamina 2 i DNA (P/DNA), protamina 1 i DNA (P1/DNA) i protamina 2 i DNA (P2/DNA) per a cada grup de pacients, d'acord amb el polimorfisme de la regió promotora del gen de la protamina 1 (*PRMI* c.-190C>A), i controls.

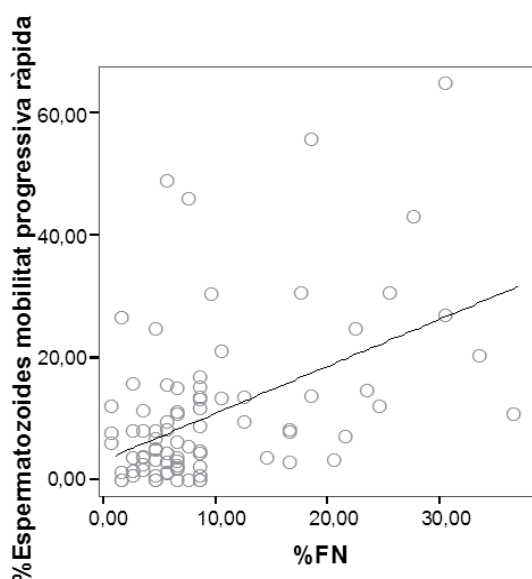


Figura 4. Correlació entre el percentatge de formes normals (FN) presents en el semen de cada pacient i la proporció d'espermatozoides amb una mobilitat progressiva ràpida.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En coherència amb els resultats de l'estudi anterior que es va dur a terme en el nostre grup (Gázquez *et al.*, 2008), el genotip c.-190AA està lligat a un augment de la relació P1/P2, en comparació de la resta de pacients i el grup control (vegeu la figura 2). Una possible interpretació d'aquest resultat és que aquest polimorfisme potencia l'expressió del gen de la protamina 1 i això suposa un augment del quocient P1/P2. Tot i això, en el present estudi s'observa una clara tendència (vegeu la figura 2), però no diferències significatives entre els pacients amb genotip AA i el grup que no el presenta ($P = 0,058$) (vegeu la taula 1).

Pel que fa a les relacions entre protamines i DNA, ambdues en μg , tant en protamines totals (P/DNA) com en cadascuna per separat (P1/DNA i P2/DNA), no s'observen diferències significatives entre el grup de pacients amb genotip AA i el grup que no el presenta (vegeu la figura 3). Aquest fet es pot donar, ja que en aquesta determinació es produeixen dues fonts d'error: durant l'anàlisi de les protamines, d'una banda, i en l'anàlisi del DNA, de l'altra. Això resulta en una major dispersió dels resultats del quocient protamina/DNA. És interessant destacar que dins del grup amb el genotip c.-190CC el pacient que presenta els valors més elevats de P/DNA, P1/DNA i P2/DNA presenta un polimorfisme diferent en la re-

gió promotora del gen de la P1 (c.-247C>A), descrit prèviament per Hammoud *et al.* (2007).

D'altra banda, el quocient protamina/DNA es veu afectat de manera significativa amb la proporció de FN presents al semen dels pacients estudiats, tant en el cas de P/DNA, amb $P = 0,036$, com en P1/DNA i P2/DNA, amb $P = 0,046$ i $P = 0,043$, respectivament (vegeu la taula 1). Tal i com s'ha vist en el nostre grup (Jodar *et al.*, 2009), el genotip AA està lligat a una morfologia alterada ($\text{FN} \leq 9\%$), si es compara aquest grup amb el conjunt de pacients amb genotips C/C i A/C ($P < 0,05$). Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts, permet hipotetitzar que la presència del polimorfisme c.-190AA a la regió promotora és un factor de risc relacionat amb una morfologia alterada dels espermatozoides, però segurament existeixen altres causes que afectarien el percentatge de FN presents sense alterar el quocient P1/P2.

Per acabar, tal i com es va veure anteriorment en el nostre grup (Torregrosa *et al.*, 2006), en el present estudi s'ha observat una relació significativa entre la morfologia i la mobilitat progressiva ràpida dels espermatozoides dels pacients estudiats, amb $P = 1,049 \times 10^{-5}$, amb una correlació positiva entre els seus valors (vegeu la figura 4).

Futurs experiments de quantificació de l'expressió dels gens de P1 i P2 mitjançant PCR a temps real i experiments d'expressió *in vitro* de construccions del promotor, que contenen el canvi amb un gen reporter, ens ajudaran a aclarir les associacions detectades.

AGRAÏMENTS

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

BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.*, 20: 1298-1306.
- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberrant protamine1/protamine2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44: 52-55.
- GÁZQUEZ, C.; ORIOLA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2008). «A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C→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.
- JODAR, M.; ORIOLA, J.; GENE, M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2009). «Sequencing of the protamine 1 gene confirms the c.-190C>A promoter polymorphism as a risk factor for altered sperm morphology and identifies new genetic variants» *Supplement J. Androl.*, 30: 120.
- OLIVA, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, 12: 417-435.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamines and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- TORREGROSA, N.; DOMINGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M. I.; SHIRLEY, C. R.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients». *Hum. Reprod.*, 21(8): 2084-2089.
- YEBRA, L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.