POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 39 2012 NR 3 (371–394)

MOLEKULARNE MARKERY NIEPŁODNOŚCI MĘSKIEJ: ZABURZENIA TRANSKRYPCJI I TRANSLACJI PROTAMIN CHROMATYNY PLEMNIKA* – CZĘŚĆ II

MOLECULAR MARKERS OF MALE INFERTILITY: ALTERNATIONS OF SPERM CHROMATIN TRANSCRIPTION AND TRANSLATION – PART II

Anna KAZIENKO[1,2], Małgorzata PIASECKA[1], Anna RYMASZEWSKA[3], Dariusz GĄCZARZEWICZ[4], Rafał KURZAWA[2], Monika FRĄCZEK[5], Maciej KURPISZ[5], Maria LASZCZYŃSKA[1]

[1]Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, [2]Klinika Medycyny Rozrodu i Ginekologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie,
[3]Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński,
[4]Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny,
[5]Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, Polska Akademia Nauk

Streszczenie: Niepłodność męska może być powiązana z zaburzeniami kondensacji chromatyny plemników wynikającymi między innymi z nieprawidłowości struktury i ilości protamin. Podłożem tych zmian są nie tylko nieprawidłowe sekwencje nukleotydowe genów tych białek, ale także zaburzenie ich ekspresji i translacji. Stąd też badania dotyczące regulacji tych procesów są przedmiotem wielu badań doświadczalnych, które starają się ujawnić molekularne podłoże męskiej sterylności, szczególnie idiopatycznej. W mejotycznych spermatocytach i w okrągłych spermatydach zachodzi proces transkrypcji genów protamin, natomiast w wydłużających się spermatydach – proces translacji. Regulacja transkrypcji kontrolowana jest za pomocą metylacji DNA oraz wiązania się czynników transkrypcyjnych do sekwencji promotorowych (TFIID, TFIIA) i polimerazy II RNA (TAFIIτ, ang. *testis specific isoform* ALF). W komórkach germinalnych zawartość i rodzaj czynników transkrypcyjnych jest zdecydowanie inna w porównaniu do komórek somatycznych. Zwraca się uwagę na istotną rolę czynnika transkrypcyjnego CREM, który może aktywować i hamować ekspresję wielu ważnych podczas spermatogenezy genów, w tym genów protamin. CREM jest aktywowany przez cAMP i alternatywnie przez ACT (ang. *LIM-domain family proteins, LIM-only protein*). Ponadto istotną rolę w ekspresji omawianych genów odgrywa macierz jądrowa, wiążąca się z obszarami DNA (MAR, ang. *specific-haploid Matrix Attachment Regions*) ograniczającymi z dwóch stron wielogenową domenę *PRM1→PRM2→TNP2,* zawierającą odpowiednio locus dla genu protaminy 1 i 2 oraz białka przejściowego 2. Jądrowa adenylacja

*****Praca częściowo finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt badawczy służący rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich: MB-322-34/11

pierwotnych transkryptów protamin, wraz z białkami regulatorowymi (PABP, ang. *Polyadenylate Binding Protein*, białka z rodziny Y-box), powoduje ich stabilizację i uniemożliwia translację. Z kolei cytoplazmatyczna deadenylacja tych transkryptów i oddysocjowanie czynników transkrypcyjnych/translacyjnych znosi represję translacji. Na szczególną uwagę zasługują miRNA, które wiążąc się z mRNA powodują jego cięcie lub też inhibicję translacji. Wkrótce po syntezie protamin ale przed ich inkorporacją do DNA, odbywa się fosforylacja tych białek, która umożliwia im związanie się ze zidentyfikowanym receptorem LBR (ang. *Lamin B Receptor)* w obrębie lamin jądrowych. Z kolei, uwolnienie protamin z receptora wymaga ich defosforylacji i w dalszym etapie umożliwia wymianę białek przejściowych na protaminy.

Słowa kluczowe: plemnik, chromatyna, DNA, protaminy, transkrypcja, translacja

Summary: Male infertility can be associated with sperm chromatin abnormalities resulting from aberrant structure and amount of protamines. The changes concern not only abnormal nucleotide sequence in the protamine genes but also expression and translation of the proteins. Therefore the regulation of these processes is a target of many experimental studies which try to reveal molecular background of male sterility particularly that of idiopathic origin. The protamine genes appear to be transcribed in the meiotic spermatocytes as well as round spermatids and to be translated in elongating spermatids. Transcription is regulated via methylation of DNA and transcriptional factors that bind to the promoter region (TFIID, TFIIA) and to the polymerase II RNA (testis specific isoform ALF, TAFIIτ). The amount and forms of transcriptional factors are different in germinal cells compare to somatic cells. Transcriptional factor – CREM is known to activate and suppress expression of major genes of spermatogenesis including genes for protamines. The factor is activated by cAMP or by ACT (*LIM-domain family proteins, LIM-only protein*) alternatively. Moreover nuclear matrix proteins play an essential role in the expression of described genes. The nuclear matrix bind to specific-haploid matrix attachment regions (MAR) flanking at both sides of multigenic *PRM1→PRM2→TNP2* protamine domain that contain protamine 1, 2 and transition protein 2 loci, respectively. Nuclear adenylation of the protamine primary transcripts and regulatory proteins (PABP – Polyadenylate Binding Protein, family Y-box proteins) result in the stabilization of transcripts and inhibition of the translation. On the other hand, transcript deadenylation and removal of transcription/translation factors promote translation. Furthermore, the miRNAs binding to mRNA causes its cleavage or translation inhibition. Phosphorylated protamines are bound to specific lamine binding receptor (LBR) identified in nuclear fibrous lamina shortly after protamine synthesis and before binding to the DNA. In turn, the dephosphorylated protamines are liberated from LBR and progressively replace the transition proteins.

Key word: spermatozoa, chromatin, DNA, protamin, transcription, translation

WSTĘP

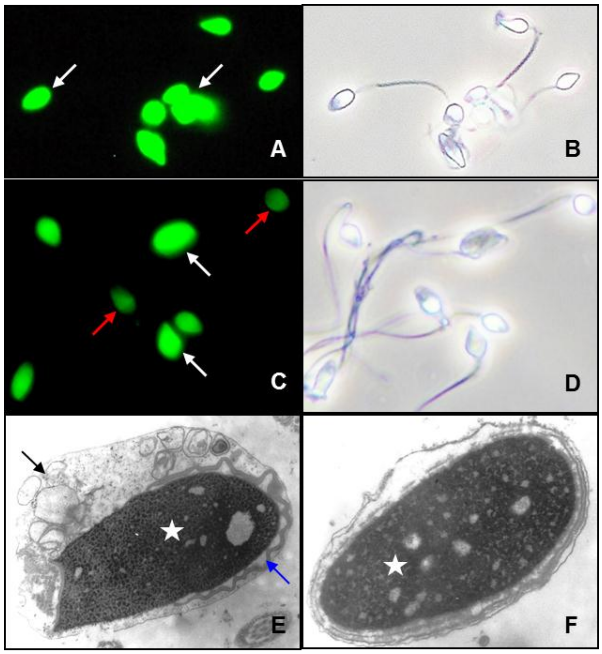
Defekty genów kodujących protaminę 1 (*PRM1*) i 2 (*PRM2*), upośledzony proces regulacji transkrypcji tych genów i translacji białek protaminowych (P1, P2) stają się przyczynami zaburzeń przebiegu spermatogenezy [21, 22, 24, 26, 50, 77]. W efekcie tych zmian może dochodzić do nieprawidłowej ilości i stosunku transkryptów obu protamin, dalej do deprotaminacji, nieprawidłowej kondensacji chromatyny i obniżenia integralności genomu plemników [11, 21, 36, 39]. W następstwie czego może mieć miejsce upośledzenie różnicowania się i dojrzewania spermatyd, szczególnie materiału genetycznego, co będzie prowadziło do zaburzeń zapłodnienia i rozwoju zarodka a niekiedy do

spontanicznych, często nieuzasadnionych poronień [4, 6, 13, 32, 66, 72, 76, 84]. Stąd też zmiany w obrębie genów, transkryptów i białek protaminowych postrzegane są jako molekularne markery niepłodności męskiej, będące czynnikami predykcyjnymi [1, 10, 14, 45, 56, 80, 85].

Pojedyncze zmiany nukleotydów w genie protaminy 1 i 2 wykryto u pacjentów płodnych i niepłodnych, z prawidłowymi lub nieprawidłowymi parametrami plemników [2, 5, 24, 27, 28, 86, 87]. Z kolei różnice w zawartości, a w efekcie inne wartości stosunku transkryptów P1 i P2, zarówno w ejakulowanych plemnikach, jak i w spermatydach pochodzących z biopsji, stwierdzono pomiędzy mężczyznami z prawidłową i nieprawidłową spermatogenezą oraz pomiędzy płodnymi i niepłodnymi pacjentami [3, 4, 14, 45, 56, 80]. Ponadto, różną ekspresję genów protamin identyfikowano w ruchliwej i nieruchliwej frakcji plemników [37]. Zmiana zawartości transkryptów protamin dotyczy przeważnie protaminy 1. Zwiększoną zawartość mRNA dla tego białka wykryto u pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną (brak plemników w ejakulacie niezwiązane z przyczynami anatomicznymi) i z prawidłową spermatogenezą, w przeciwieństwie do mężczyzn z azoospermią obstrukcyjną (brak plemników w ejakulacie związane z przyczynami anatomicznymi) i z prawidłową spermatogenezą, którzy stanowili grupę kontrolną [77]. Wyższy stosunek transkryptów obu protamin (1:4) identyfikowano u niepłodnych pacjentów z azoospermią obstrukcyjną, u których stwierdzono zaburzoną spermatogenezę oraz u mężczyzn z oligozoospermią (zaburzeniem liczby plemników; 1:1,7), w porównaniu do mężczyzn odpowiednio z azoospermią obstrukcyjną, ale z prawidłową spermatogenezą (1:3,2), bądź mężczyzn z normozoospermią (1:1) [80]. Efektem wymienionych zmian może być nieprawidłowy stosunek białek P1/P2. U pacjentów, u których stwierdza się obniżoną zawartość białka P1 i P2 identyfikuje się także wzrost mRNA dla obu protamin, np. u badanych ze stosunkiem P1/P2 <0,8 obserwowano wzrost zawartości transkryptów dla protaminy 1, co mogło sugerować zaburzenia regulacji translacji protaminy 1 [3].

U mężczyzn z prawidłowymi parametrami nasienia stosunek P1/P2 może występować w zakresie 0,54–1,43 [50]. Z licznych doniesień wynika jednak, że u płodnych mężczyzn stosunek P1/P2 mieści się z reguły w granicach jedności i niewiele powyżej/poniżej (np. 0,98 ± 0,12; 1,01 ± 0,15; 1,06 ± 0,01; 0,8–1,2), natomiast u niepłodnych i/lub z obniżonymi parametrami plemników zdecydowanie wzrasta (np. 1,23 ± 0,65; 1,58 ± 0,24; 1,50 ± 0,05; 3,00 ± 2,84), jak również może ulegać znaczącemu obniżeniu (<0,8) [11, 12, 24, 56]. Z kolei u palaczy stosunek obu protamin istotnie się zwiększa (1,34 ± 0,46) w porównaniu do mężczyzn niepalących (1,11 ± 0,20). Ponadto w grupie palących wzrasta w nasieniu odsetek form niedojrzałych plemników (70,8 ± 12,52) z zaburzoną między innymi kondensacją chromatyny (ocena w mikroskopie elektronowym transmisyjnym) w stosunku do mężczyzn stanowiących grupę kontrolną (48,83 ± 13,93) [16, 23]. W przypadku mężczyzn niepłodnych lub z obniżoną płodnością

zarażonych *Chlamydia trachomatis* i *Mycoplasma* identyfikuje się także zmiany ultrastrukturalne chromatyny plemników [20].



RYCINA 1**.** Ocena chromatyny ejakulowanych plemników ludzkich. **A, C** – plemniki barwione chromomycyną A3 – CMA3 (stężenie końcowe 0,25 mg/mL), fluorochrom CMA3 wiążący się specyficznie z sekwencjami bogatymi w GC pozwala na ocenę stopnia protaminacji DNA plemników; komórki z obniżoną ilością protamin emitują jaskrawozieloną fluorescencję (CMA3-pozytywne, strzałki białe), natomiast z prawidłową protaminacją wykazują tylko słabą, zieloną fluorescencję (CMA3-negatywne, strzałki czerwone); kontrola pozytywna (**A**) z wykorzystaniem DTT (ditiotreitol, stężenie końcowe 5 mmol/L), próba badana (**C**) [32, 55, 65, 71]; **E**, **F** – przekrój przez główki plemników z nieprawidłową ultrastrukturą chromatyny; ziarnista, o niskiej gęstości elektronowej chromatyna z widocznymi jasnymi obszarami (gwiazdka); nieprawidłowy, pofałdowany i odseparowany od jądra plemnika akrosom (strzałka niebieska), resztkowa cytoplazma otaczająca główkę plemnika (strzałka czarna). **A**, **C** – mikroskop fluorescencyjny, **B**, **D** – mikroskop kontrastowo-fazowy (BX 41; Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japonia); **E**, **F** – mikroskop elektronowy transmisyjny (JEM-1200 EX; JEOL, Ltd, Tokio, Japonia)

FIGURE 1**.** Assessment of ejaculated human sperm chromatin. **A, C** – chromomycin A3 – CMA3-stained spermatozoa, CMA3 fluorochrome specific for GC-rich sequence is known to reveal the deficiency of sperm DNA protamination (terminal concentration 0,25 mg/mL); protamine deficient cells emit bright green fluorescence (CMA3-positive, white arrows), protamine rich cells emit only dull green fluorescence (CMA3-negative, red arrow); positive control (**A**) with DTT (dithiothreitol, terminal concentration 5 mmol/L), examined sample (**C**) [32, 55, 65, 71]; **E**, **F** – section through the sperm head with abnormal chromatin ultrastructure; granular chromatin with low electron density and pale areas (asterisk); abnormal, folded and separated from sperm nucleus acrosome (blue arrow), residual cytoplasm surrounding sperm head (black arrow). **A**, **C** – fluorescent microscope, **B**, **D** – contrast-phase microscope (BX 41; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan); **E**, **F** – transmission electron microscope (JEM-1200 EX; JEOL, Ltd, Tokyo, Japan)

Ocenę protaminacji chromatyny plemników, za pomocą fluorochromu chromomycyny A3 (CMA3, Ex/Em – długość fali wzbudzenia/długość fali emisji – 450/570 nm; ryc. 1), przeprowadzono u mężczyzn niepłodnych [14, 39], pacjentów z obstrukcyjną azoospermią, oligoastenoteratozoospermią (jednoczesne zaburzenie liczby, ruchliwości i morfologii plemników), oligozoospermią (zaburzenie liczby plemników), astenozoospermią (zaburzenie ruchliwości plemników) lub oligoastenozoospermią (jednoczesne zaburzenie liczby i ruchliwości plemników) [40, 54, 60, 63, 65]. Często wykazuje się ujemne korelacje pomiędzy zaburzeniami kondensacji chromatyny plemników, a wynikami standardowej oceny seminologicznej. Podkreśla się także, iż omawiane nieprawidłowości struktury materiału genetycznego mogą być powiązane z chorobą nowotworową (np. choroba Hodgkina – ziarnica złośliwa), leczeniem nowotworów gonady męskiej (np. stosowanie chemioterapii), występowaniem żylaków powrózka nasiennego, stylem życia oraz z wiekiem mężczyzn [23, 52, 53, 55, 60, 73]. Ponadto, w badaniach doświadczalnych wykazano nieprawidłowości struktury chromatyny plemników szczurów z eksperymentalnym uszkodzeniem rdzenia kręgowego [83].

Tym wszystkim zmianom mogą towarzyszyć przetrwałe nacięcia materiału genetycznego, jako pozostałość po zaburzeniach związanych z wbudowywaniem protamin do DNA [21, 23, 39, 40, 64, 72]. Upośledzona protaminacja i dalej kondensacja chromatyny manifestuje się na poziomie ultrastrukturalnym. W takich przypadkach niska gęstość elektronowa, ziarnista substruktura i jasne wakuole na terenie chromatyny widoczne są w jądrze plemników ocenianych w mikroskopie elektronowym transmisyjnym (ryc. 1) [59]. Takie zmiany są wyrazem niedojrzałości materiału genetycznego i świadczą o wyraźnym defekcie różnicowania okrągłej spermatydy w spermatydę wydłużoną [11, 56].

REGULACJA TRANSKRYPCJI I TRANSLACJI PROTAMIN

Ekspresja nukleoprotein – białek przejściowych i protamin – regulowana jest na etapie transkrypcji oraz translacji. Procesy transkrypcji i translacji są ściśle skorelowane z różnicowaniem się okrągłej spermatydy w wydłużoną. Transkrypcja genów protaminy 1 i 2 ma miejsce podczas mejozy w spermatocytach i jest kontynuowana podczas spermiogenezy w okrągłych spermatydach. Zanim dojdzie do syntezy protamin niezbędne jest stabilizacja ich transkryptów, gdyż zapobiega to ich przedwczesnej degradacji. W okrągłych spermatydach stopień kondensacji chromatyny i rodzaj białek w niej występujących (histony jądrowe), nie sprzyja wbudowywaniu białek protaminowych. Unikalna kondensacja chromatyny wymaga odpowiedniej sekwencji zdarzeń molekularnych. Proces translacji protamin ma miejsce dopiero w wydłużających się spermatydach, w których intensywny proces przebudowywania chromatyny związany jest z wymianą

specyficznych histonów jądrowych na białka przejściowe, a te ostatnie z kolei wymieniane są na protaminy [11, 30, 53, 79, 88, 92].

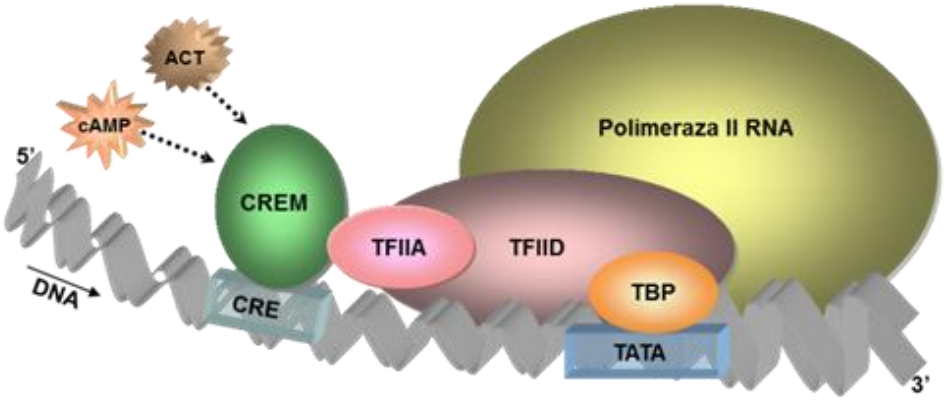
Metylacja DNA i wiązanie czynników transkrypcyjnych regulują transkrypcję genu *PRM1* i *PRM2*

Transkrypcja jest regulowana poprzez metylację DNA oraz wiązanie czynników transkrypcyjnych (ang. *trans-acting factors*) do specyficznych sekwencji promotorowych – kasety TATA, sekwencji CRE (ang. *cAMP-Response Element*) oraz innych sekwencji DNA [7, 30, 57, 62, 78, 90]. Gen białka przejściowego 2 (TP2) oraz geny protamin są położone w obrębie DNA podlegającego silnej metylacji. Proces ten i związana z nim aktywność transkrypcyjna wspomnianych genów, wydaje się być dużo bardziej skomplikowany w komórkach haploidalnych w porównaniu do komórek somatycznych. Metylacja dotyczy końca 5' genów obu protamin, a jego demetylacja jest ściśle powiązana z działaniem czynników transkrypcyjnych. Wzmożona demetylacja sekwencji promotorowych genów plemnikowych nukleoprotein powoduje podwyższenie ich transkrypcji. Stąd też, w okrągłych spermatydach stwierdza się podwyższoną zawartość metylowanej cytozyny na końcu 5' w porównaniu do wydłużonych spermatyd, co wskazuje na zwiększającą się ekspresję omawianych genów podczas spermiogenezy. Niewątpliwie jest to powiązane z procesem protaminacji i silnej kondensacji chromatyny dojrzewających spermatyd [74].

Właściwemu łączeniu się czynników transkrypcyjnych do sekwencji promotorowych towarzyszy tworzenie kompleksu transkrypcyjnego polimerazy RNA II. Pierwszym etapem składania tego kompleksu jest przyłączenie się podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIID do sekwencji TATA. Czynnik ten zawiera białko TBP (ang. *TATA-Binding Protein*) wiążące się z sekwencją TATA oraz białka typu TAF (ang. *TBP-associated proteins* – $TAF_{II}s$, m.in. TFIIA, TFIIB), które mogą regulować transkrypcję, wpływać na modyfikację chromatyny oraz uczestniczyć w naprawie DNA (ryc. 2). Czynnik transkrypcyjny TFIIA wpływa na regulację ekspresji genów poprzez promowanie wiązania TBP i indukcję zmian konformacyjnych kompleksu inicjującego transkrypcję. Ilość TBP we wczesnych haploidalnych komórkach germinalnych jest większa niż w komórkach somatycznych. Czynniki wiążące się z polimerazą II RNA mogą występować w postaci różnych specyficznych izoform (ang. *testis specific isoform*), np. izoforma TFIIA jako ALF lub TFIIAτ. Należy zwrócić uwagę, że w przypadku komórek germinalnych, zarówno zawartość czynników transkrypcyjnych, jak i ich izoformy są zdecydowanie różne w porównaniu do komórek somatycznych [41, 42, 67, 74].

Czynnik TFIIA oraz niektóre TAF z kompleksu TFIID wchodzą w interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym CREM (ang. *cAMP-Response Element Modulator*

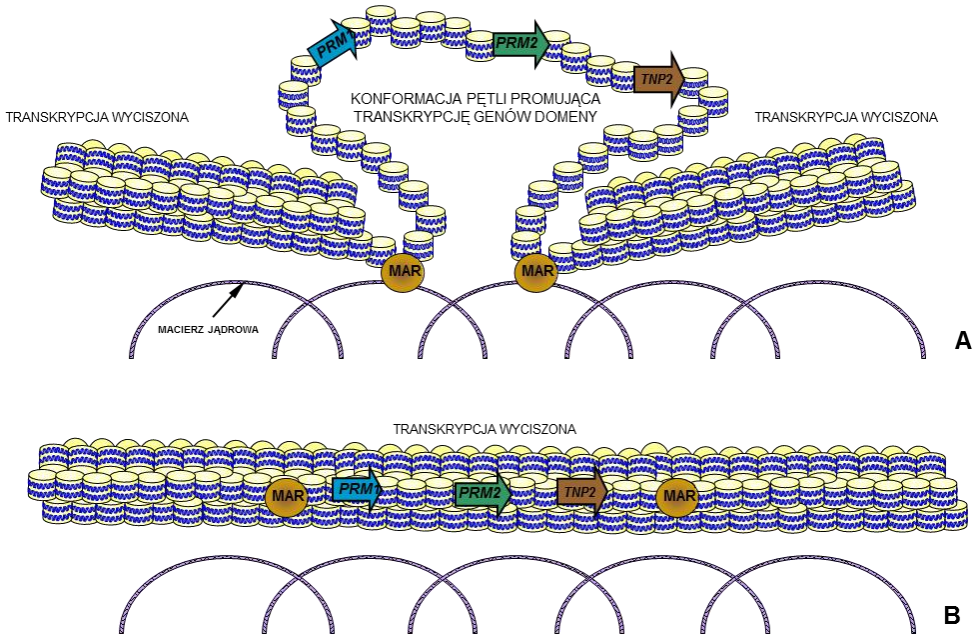
protein) odgrywającym istotną rolę w różnicowaniu się okrągłej spermatydy w wydłużoną, a zatem wpływającym zdecydowanie na męską płodność. Czynnik ten wiąże się do sekwencji CRE, stanowiącej część promotorową licznych genów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg spermatogenezy. Należy podkreślić, że sekwencja ta rozpoznawana jest przez specyficzne czynniki transkrypcyjne regulujące prawidłową ekspresję genów [8, 15, 26, 46, 62, 78, 90]. Dodatkowo, Nanassy i Carrell [49] wykazali istnienie silnej zależności pomiędzy metylacją sekwencji promotorowej wiążącej CREM, a nieprawidłową protaminacją chromatyny oraz oligozoospermią.



RYCINA 2. Tworzenie się kompleksu transkrypcyjnego w męskich komórkach rozrodczych. Sekwencja CRE (ang. *cAMP-response element*) i sekwencja TATA – część promotorowa genów. TFIID – podstawowy czynnik transkrypcyjny zawierający TBP (ang. *TATA-Binding Protein*) oraz TFIIA (ang. *TBP-associated protein*). Czynnik CREM (ang. *cAMP-Response Element Modulator protein*) rozpoznaje sekwencję CRE i wchodzi w interakcje z TFIIA. Aktywatory CREM: cAMP i ACT. Polimeraza II RNA – właściwy enzym dokonujący transkrypcji genu; wg Sassone-Corsi [67] – zmodyfikowane, (szczegóły w tekście).
FIGURE 2. Formation of transcriptional complex in the male germ cells. CRE sequence (cAMP-response element) and TATA sequence – part of gene promoter. TFIID – basic transcriptional factor containing TBP (TATA-binding protein) and TFIIA (TBP-associated protein). CREM factor (cAMP-response element modulator protein) recognizes CRE sequence and interacts with TFIIA. Activators of CREM: cAMP and ACT. RNA polimerase II – proper transcriptional enzyme; according to Sassone-Corsi [67] – modified, (for details see text)

Aktywacja CREM w obecności cAMP powoduje jego fosforylację. Alternatywnie jest on aktywowany przez tkankowo-specyficzny koaktywator ACT (ang. *LIM-domain family proteins, LIM-only protein*), występujący jedynie w męskich komórkach rozrodczych. Czynnik CREM może występować w różnych izoformach, aktywujących lub hamujących ekspresję genów podczas spermatogenezy [7, 8, 15, 29, 47, 57]. U mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy, przejawiających się zatrzymaniem dojrzewania okrągłych spermatyd, stwierdza się obniżony lub całkowity brak jednej z izoform CREM

(CREM-τ), co może być przyczyną idiopatycznej niepłodności [38, 78, 89]. Z kolei w badaniach doświadczalnych przeprowadzonych na transgenicznych, pozbawionych białka CREM myszach, wykazano całkowity brak dojrzałych form plemników w ejakulacie [93]. Ponadto u myszy z nokautem ACT (*act*$^{-}$/$^{-}$) zaobserwowano zdecydowane obniżenie funkcjonalnych i morfologicznych parametrów plemników najądrzowych. Stwierdzono zmniejszoną koncentrację, ruchliwość oraz drastyczne zmiany morfologiczne plemników, prezentujących wyraźne cechy niedojrzałości (nadmiar resztkowej cytoplazmy zawierającej zawinięte wstawki i witki, deformacje jądra i akrosomu) [34]. Z kolei u mężczyzn ze zidentyfikowaną azoospermią lub ciężką oligozoospermią wykazano liczne zmiany polimorficzne w genie *ACT*.



RYCINA 3. Model regulacji transkrypcji wielogenowej domeny *PRM1→PRM2→TNP2* zawierającej odpowiednio locus dla genu protaminy 1 i 2 oraz białka przejściowego 2 w spermatocytach pachytenowych. **A** – związanie obszarów MAR (ang. *specific-haploid Matrix Attachment Regions*), zlokalizowanych po obu stronach domeny, do macierzy jądrowej promuje konformację pętli domeny sprzyjającej transkrypcji genów; **B** – brak wiązania MAR z macierzą jądrową skutkuje zmianą konformacyjną wyciszającą ekspresję genów domeny; wg Matrins i wsp. [43] – zmodyfikowane, (szczegóły w tekście)

FIGURE 3. Model of transcriptional regulation of multigenic *PRM1→PRM2→TNP2* domain containing protamine 1, 2 and transition protein 2 loci respectively, in pachytene spermatocytes. **A** – attachment of MARs (specific-haploid matrix attachment regions) flanking at both sides of the domain to the nuclear martrix propagate trascriptionally potentiated state of the loop domain; **B** – the absence of the attachment of MARs to the nuclear matrix result in transcriptionally silenced state of the domain; according to Matrins et al. [43] – modified, (for details see text)

Białka macierzy jądrowej mogą regulować ekspresję genów protamin

Istotną rolę w konformacji materiału genetycznego plemnika odgrywa macierz jądrowa. Trójwymiarowa organizacja chromatyny męskiej komórki rozrodczej określa jej potencjalne możliwości do zapłodnienia komórki jajowej, jak również wpływa na prawidłowy rozwój zarodka [17, 61, 68, 69, 88, 92]. Ustalono, że macierz jądrowa obok funkcji strukturalnej pełni także rolę funkcjonalną, bowiem bierze udział w ekspresji genów, w tym protamin. Okazało się, że ludzka domena, obejmująca geny *PRM1→PRM2→TNP2*, na końcu 5' i 3' ograniczona jest obszarami odpowiedzialnymi za jej wiązanie się do macierzy jądrowej – MAR (ang. *haploid-specific nuclear Matrix Attachment Regions*). Zawierają one powtórzenia alaniny będące miejscami metylacji. Hipometylacja tych obszarów umożliwia wiązanie wielogenowego locus nukleoprotein do macierzy jądrowej. Zmienia to korzystnie konformację domeny *PRM1→PRM2→TNP2*, która rozwijając się przyjmuje kształt małej pętli, co umożliwia wiązanie się czynników transkrypcyjnych i promuje ekspresję genów domeny (ryc. 3A). Zmiany te dokonują się na etapie spermatocytów pachytenowych. W przypadku braku wiązania MAR do macierzy jądrowej powyższa domena staje się transkrypcyjnie nieaktywna (ryc. 3B) [1, 31, 35, 43, 91]. Zatem obszar MAR odgrywa istotną rolę w transkrypcji protamin, a mutacje, które się w nim pojawiają mogą prowadzić do niepłodności. Zmiany takie zidentyfikowano u niepłodnych pacjentów z oligozoospermią [35]. Badania doświadczalne potwierdziły niezaprzeczalny udział MAR w ekspresji genów protamin. Obniżona transkrypcja protamin miała miejsce u transgenicznych myszy pozbawionych MAR na końcu 5' domeny *PRM1→PRM2→TNP2*. Mutacja ta nie spowodowała jednak całkowitego zahamowania transkrypcji, co z kolei sugerowało istotną rolę MAR na końcu 3' domeny [43].

Oddysocjowanie czynników transkrypcyjnych/translacyjnych i deadenylacja transkryptów protamin regulują ich translację

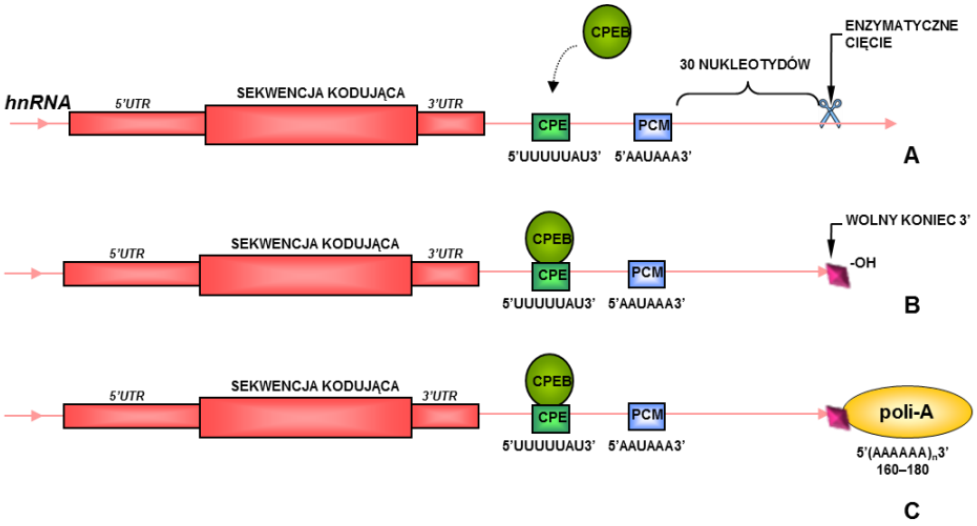
Powstające na etapie okrągłych spermatyd pierwotne transkrypty (hnRNA) podlegają enzymatycznemu cięciu w okolicy 30 nukleotydu poniżej sygnału poliadenylowego (PCM, ang. *Polyadenylation Consensus Motif*, 5'AAUAAA3'), zlokalizowanego w 3'UTR (ang. *Untranslated Region*). Umożliwia to przyłączenie do wolnego końca 3' sekwencji poli-A (ang. *poly-A tail*). Dodatkowo związanie się fosfoproteiny o masie 62 kDa (CPEB, ang. *CPE-Binding phosphoprotein*) do sekwencji CPE (ang. *Cytoplasmic Polyadenylation Element*) promuje poliadenylację. Fosfoproteina zawiera dwa regiony rozpoznające sekwencje cząsteczki RNA (*RRMs*, ang. *RNA Recognition Motifs*) oraz dwa motywy palców cynkowych, umożliwiające wiązanie fosfoproteiny do RNA (ryc. 4) [74, 75]. Do funkcji ogona poli-A zalicza się nie tylko ochronę mRNA przed przedwczesną

transkrypcją, ale także stabilizację powstałych transkryptów zapobiegającą przed ich degradacją. Takie mRNA są z reguły nieaktywne translacyjnie i muszą podlegać deadenylacji. Okazuje się, że długość ogona poli-A w przypadku mRNA dla białek przejściowych i protamin koreluje z ich aktywnością translacyjną. Opisano, że 85–95% cząsteczek mRNA dla protaminy 1 i 2, posiadających ogon poli-A zawierający 160–180 nukleotydów adeninowych, jest translacyjnie nieaktywnych. Podczas, gdy 80–95% transkryptów z krótszą sekwencją poli-A, zbudowaną tylko z około 30 nukleotydów, jest translacyjnie aktywnych [33, 79]. Poliadenylowane transkrypty mRNA protamin wraz z czynnikami transkrypcyjnymi/translacyjnymi i kinezynami zlokalizowane są w strukturach rybonukleoproteinowych – RNP (ang. *Ribonucleoptotein Particles*), i są cząsteczkami translacyjnie nieaktywnymi. Transport RNP z jądra do cytoplazmy oraz ich dojrzewanie (usuwanie czynników transkrypcyjnych) są wydarzeniami niezbędnymi i umożliwiającymi translację (ryc. 5). Zatem, zanim dojdzie do właściwego procesu syntezy białka w wydłużających się spermatydach, transkrypty przez kilka dni (blisko tydzień) są obecne w cytoplazmie [1, 11, 12, 33, 74, 75]. Przed i w czasie translacji mRNA obu protamin podlega skracaniu (deadenylacji). Transkrypty protaminy 1 z 0,62 kpz przycinane są do 0,45 kpz, natomiast protaminy 2 z 0,9 kpz do 0,7 kpz. Deadenylacja umożliwia kowalencyjną modyfikację RNP, prowadzącą do uwolnienia z nich cząsteczek mRNA, które mogą podlegać właściwej translacji [11, 79].

Za regulację translacji odpowiadają białka wiążące się z ogonem poli-A oraz białka regulatorowe oddziałujące z sekwencją 3'UTR mRNA [1, 19, 75]. Białka wiążące się z poli-A, występujące w różnych izoformach (PABP, ang. *Polyadenylate Binding Protein*: PABP1, PABP2, PABPt), w istotny sposób regulują translację. Chronią transkrypty mRNA przed degradacją (deadenylacją) do momentu usunięcia represji translacji oraz same stanowią czynnik hamujący translację (ryc. 5). Zatem, przyłączenie PABP do końca sekwencji poli-A stanowi ochronę cząsteczki przed skracaniem ogona poliadenylowego [11]. Jednym z najlepiej poznanych białek wiążących się do sekwencji poli-A jest białko o masie 70kD – PABP1. Liczba cząsteczek PABP1-mRNA wzrasta w komórkach germinalnych wchodzących w mejozę i jest dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu do komórek somatycznych. Ich duża liczba, podobnie jak wysoka zawartość cząsteczek RNP, obserwowana jest w okrągłych spermatydach, co związane jest z gromadzeniem niezbędnych czynników do procesu translacji (ryc. 5). Białko wiążące się z poli-A ma zdolność migracji wzdłuż ogona poli-A, w kierunku sekwencji 3'UTR bogatej w adeninę i uracyl, przez co odsłonięty zostaje ogon poli-A i możliwe staje się jego skracanie [1, 12, 19, 75].

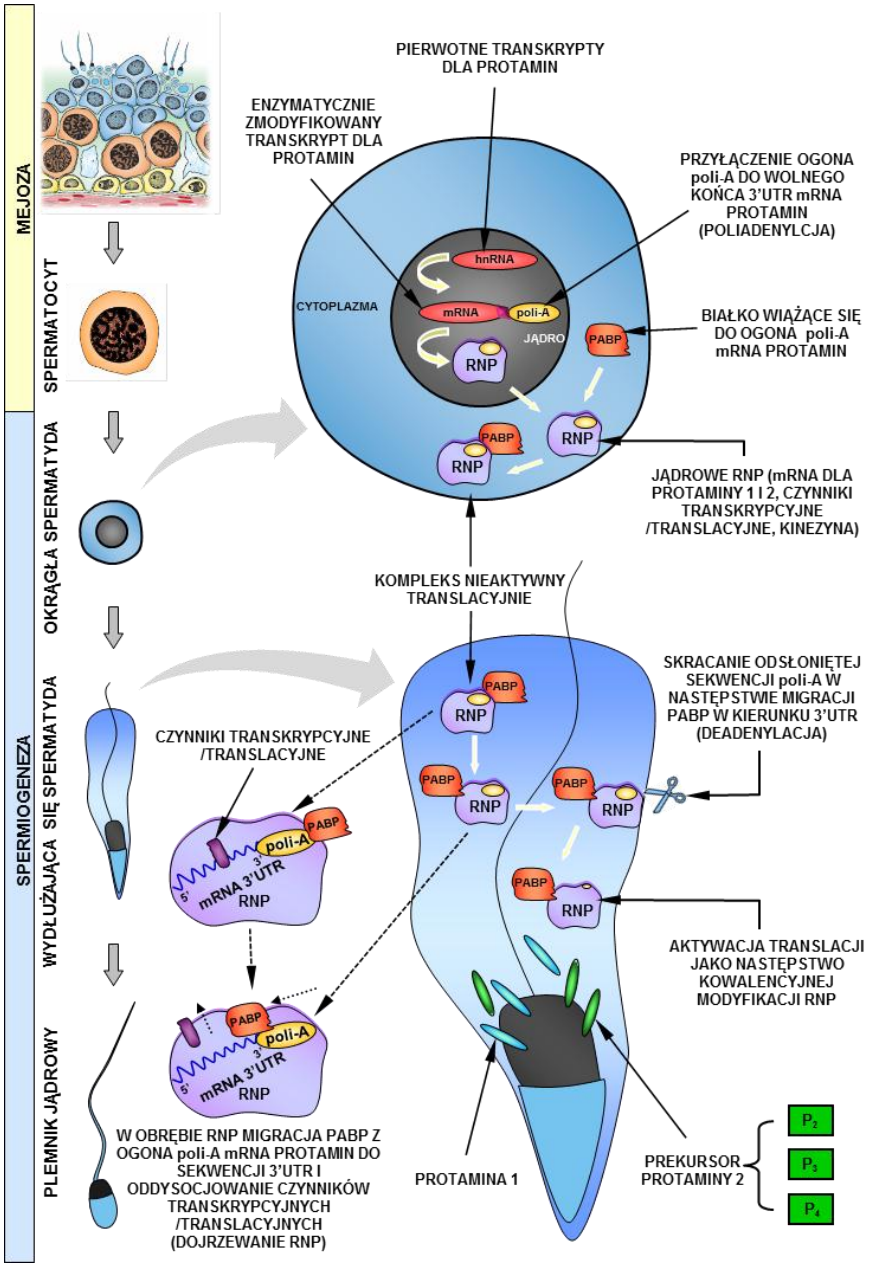
Specyficzna interakcja cytoplazmatycznych białek represorowych mających zdolność wiązania się do sekwencji 3'UTR mRNA pełni istotną rolę w regulacji translacji, degradacji oraz poliadenylacji w spermatydach. Ponadto, białka te mają zdolność regulacji ekspresji genów pełniąc rolę czynników transkrypcyjnych. Wśród białek oddziałujących z regionem 3'UTR najlepiej poznanymi są białka

rodziny Y-box (m.in. ang. *contrin, translin, kinesin KIF 17B*). Są one niezbędne nie tylko do opóźnienia translacji, ale również mają swój udział w transporcie RNP do cytoplazmy [11]. Wiązanie się tych białek do sekwencji mRNA w dużej mierze zależy od ich właściwej fosforylacji, co warunkuje odpowiednią ich interakcję z kwasem nukleinowym. Jest to możliwe dzięki centralnej domenie CSD (ang. *Central cold Shock Domain*) tych białek. W wydłużających się spermatydach defosforylacja białek represorowych stanowi najbardziej prawdopodobną przyczynę ich oddysocjowania od cząsteczek mRNA, które w ten sposób stają się podatne na translację [19, 75]. Istnieją przesłanki, że proces translacji może podlegać regulacji hormonalnej przez hormon przysadkowy – somatotropinę (hGH, ang. *human Growth Hormone*) [74].



RYCINA 4. Post-transkrypcyjne modyfikacje pierwotnych transkryptów protamin (hnRNA) przebiegające w okrągłych spermatydach. Poliadenylacja transkryptów protamin poprzedzona jest modyfikacjami w obrębie 3'UTR (ang. *Untranslated Region*): **A** – enzymatyczne cięcie poniżej sygnału poliadenylowego PCM (ang. *polyadenylation consensus motif*), **B** – związanie fosfoproteiny CPEB (ang. *CPE-Binding phosphoprotein*) do sekwencji CPE (ang. *Cytoplasmic Polyadenylation Element*); **C** – przyłączenie ogona poli-A stabilizuje powstały transkrypt i zapobiega przed jego degradacją oraz uniemożliwia translację; wg Steger [75] – zmodyfikowane, (szczegóły w tekście)

FIGURE 4. Post-transcriptional modyfication of the protamine primary transcripts (hnRNA) undergoes in round spermatids. Polyadenylation of the protamine transcript requires the changes in the 3'UTR (untranslated region): **A** – enzymatic cleavage downstream of the polyadenylation signal PCM (polyadenylation consensus motif), **B** – the binding of phosphoproteine CPEB (CPE-binding phosphoprotein) to CPE sequence (cytoplasmic polyadenylation element); **C** – the binding of poly-A tail stabilizes and protects the transcripts before degradation and also represses translation; according to Steger [75] – modified, (for details see text)



RYCINA 5. Sekwencje zdarzeń prowadzące do translacji protamin podczas różnicowania się okrągłej spermatydy w wydłużoną. W okrągłych spermatydach pierwotne transkrypty protamin podlegają post-transkrypcyjnym, enzymatycznym modyfikacjom. W dalszym etapie następuje formowanie się cząsteczek rybonukleoproteinowych (RNP) zawierających obok czynników transkrypcyjnych/translacyjnych, stabilne transkrypty protamin z ogonem poli-A, które następnie

wiązane są z białkiem PABP (ang. *Polyadenylate Binding Protein*), wykazującym powinowactwo do sekwencji poli-A będącej integralną częścią końca 3'UTR mRNA. W wydłużających się spermatydach migracja tego białka wzdłuż ogona poli-A powoduje jego odsłonięcie i w konsekwencji deadenylację transkryptów, a także oddysocjowanie od mRNA czynników transkrypcyjnych/translacyjnych, co umożliwia aktywację translacji [11, 19, 33, 75, 78], (szczegóły w tekście)

FIGURE 5. The cellular changes leading to protamine translation during differeniation of round spermatid to elongated. Primary protamine transcripts are subjected to post-transcriptional enzymatic modification at the level of round spermatid. In the next step ribonucleoprotein (RNP) particles composed of the transcriptional/translational factors and stabilized protamine transcripts with poly-A tail are formed. PABP (Polyadenylate Binding Protein) protein binds to poly-A tail localized in 3'UTR mRNA. In elongating spermatids migration of the protein along poli-A tail results in unmasking of the tail and finally deadenylation of the transcripts as well as removal of the transcriptional/translational factors from mRNA that promote activation of translation [11, 19, 33, 75, 78], (for details see text)

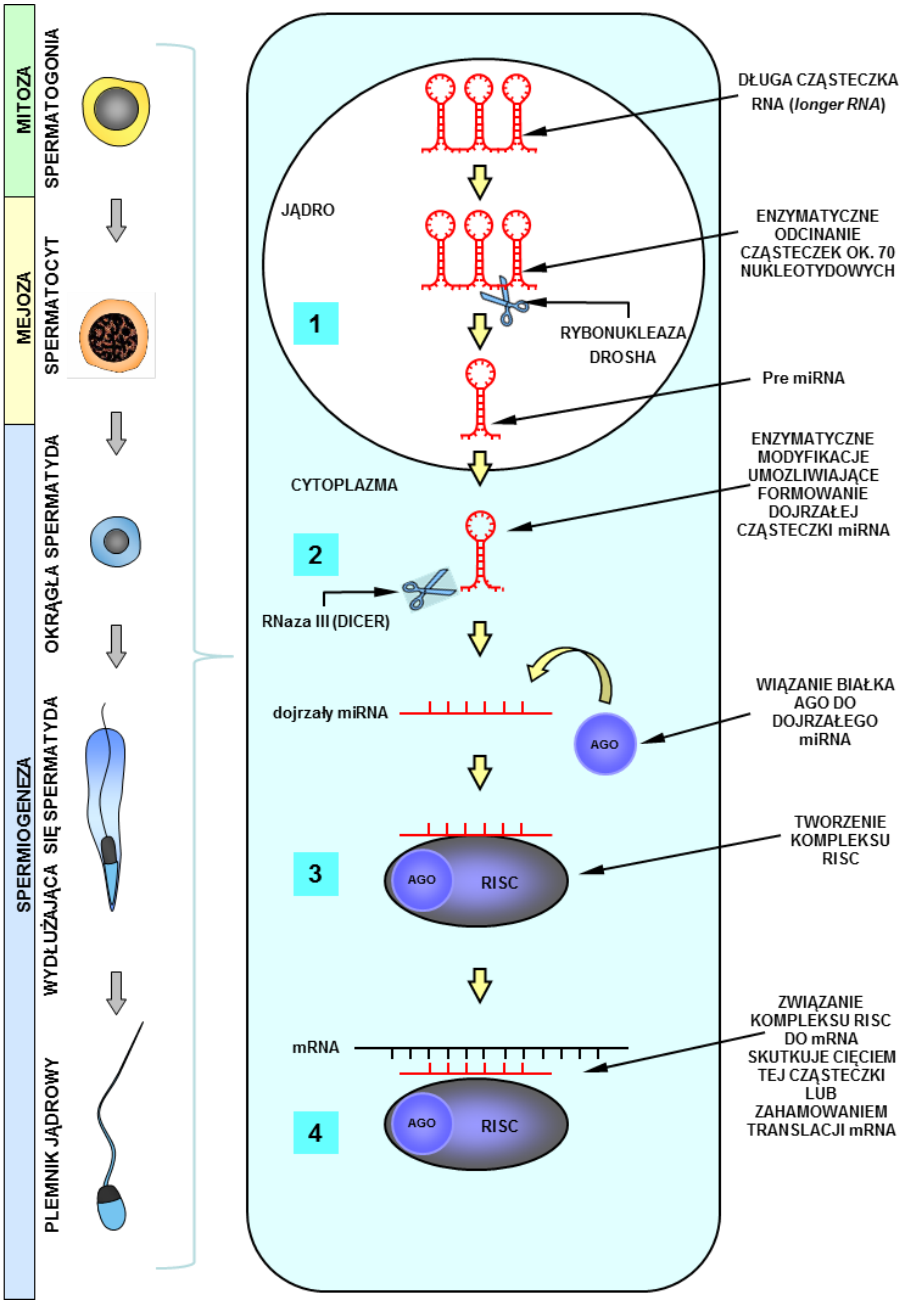
miRNA mogą regulować translację w męskich komórkach rozrodczych

Istotną rolę w spermatogenezie odgrywają małe cząsteczki RNA, o długości 21–30 nukleotydów, wśród których wyróżnia się trzy typy cząsteczek: siRNA (ang. *interfering RNA*), miRNA (ang. *microRNA*) oraz piRNA (ang. *piwi-interacting RNA*). Rola tych cząstek polega na silnej regulacji ekspresji genów zarówno na poziomie post-transkrypcyjnym, jak i translacyjnym, dodatkowo mają one znaczenie w regulacji stabilności cząsteczek RNA [25]. Egzogenne siRNA (długość ok. 21 nukleotydów), które zawierają w swojej konformacji podwójną nić RNA nie podlegają ekspresji w tkankach i komórkach, mają jedynie zdolność oddziaływania z mRNA powodując jego degradację i/lub post-transkrypcyjne wyciszenie genów. Z kolei piRNA (pojedyncza, endogenna nić RNA zbudowana z ok. 24–30 nukleotydów) powoduje represję retrotranspozonów i reguluje procesy post-transkrypcyjne. Obecność tych cząsteczek identyfikuje się w żeńskiej i męskiej linii komórek rozrodczych, szczególnie w spermatocytach pachytenowych i okrągłych spermatydach [25].

Cząsteczki miRNA (pojedyncza, endogenna, niekodująca nić RNA zbudowana z ok. 22 nukleotydów) zachowują wysoki konserwatyzm wewnątrzgatunkowy i stanowią dużą, różnorodną grupę czynników mogących degradować transkrypty mRNA, jak również hamować translację. Ponadto, cząsteczki te mają zdolność wyciszania genów uczestniczących w wielu procesach komórkowych różnych tkanek i narządów związanych z rozwojem, proliferacją, różnicowaniem, apoptozą komórek i nowotworzeniem. Opisano wiele różnych miRNA, 672 u ludzi i 599 u myszy. Około 1000 miRNA obecnych jest w genomie ludzkim i mysim. Wydaje się, że miRNA mogą regulować 30% wszystkich genów występujących w ludzkim genomie [9, 25, 44, 70]. Różne miRNA, będące cząsteczkami zróżnicowanymi tkankowo wykryto także w gonadzie męskiej, np. miRNA–34c podlega silnej ekspresji tylko w komórkach germinalnych. W przeciwieństwie do piRNA, liczba cząsteczek miRNA w męskich komórkach rozrodczych jest znamiennie wysoka.

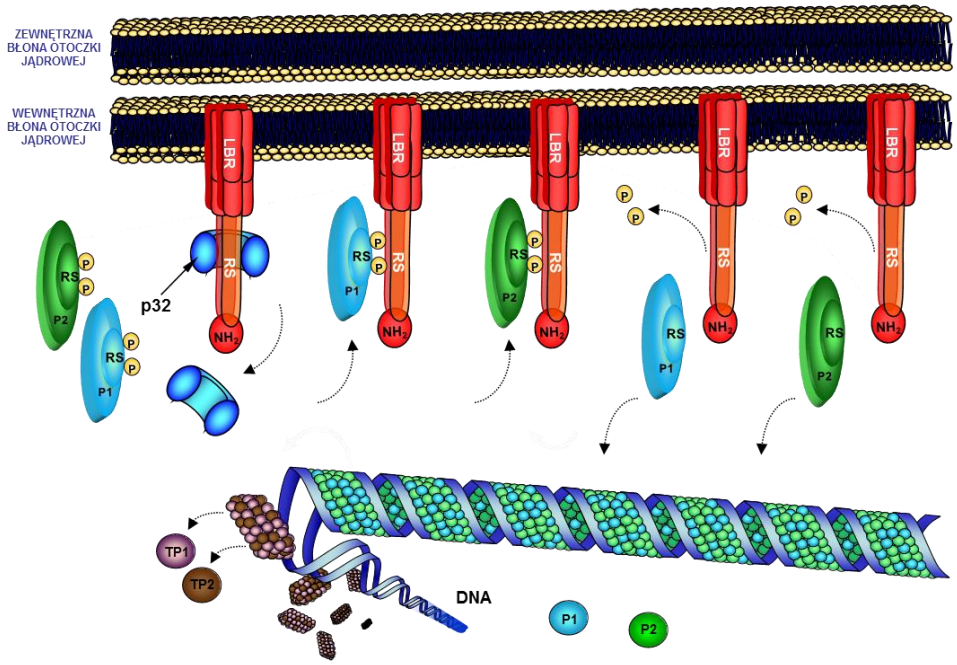
Wykazano je w mysich spermatogoniach, spermatocytach pachytenowych, spermatydach i w plemnikach. Stąd też sugeruje się istotną rolę miRNA w regulacji ekspresji genów w mitozie, mejozie oraz post-mejotycznych etapach spermatogenezy. Należy jednak podkreślić, że rola miRNA w ekspresji genów uczestniczących w spermatogenezie nie została w pełni wyjaśniona. Niektóre z nich identyfikuje się w gonadzie niedojrzałej, inne z kolei w gonadzie dojrzałej. Wśród zidentyfikowanych miRNA, wymienia się grupę miRNA 17–92 oraz Mirn290–295 regulujących proliferację i różnicowanie spermatogonii podczas wczesnych etapów spermatogenezy. Natomiast wyższą ekspresję Minr34b i Mir122a stwierdzono w dojrzałych jądrach, w porównaniu do jąder przed okresem dojrzewania płciowego. Wskazywałoby to na wpływ tych miRNA zwłaszcza na późniejsze etapy spermatogenezy związane z różnicowaniem się spermatyd. Mir122a może powodować represję transkrypcji białka przejściowego 2 chromatyny różnicującej się spermatydy. Dlatego też traktowany jest jako marker okrągłych spermatyd [9, 25, 44].

Tworzenie się miRNA jest procesem złożonym (ryc. 6). W pierwszym etapie, w jądrze komórkowym z długiej cząsteczki RNA (ang. *longer RNA*) formującej strukturę „spinki do włosów" odcinane są cząsteczki o długości ok. 70 nukleotydów, dzięki działaniu rybonuklezy (DROSHA). Stanowią one pre-miRNA. Taki RNA transportowany jest do cytoplazmy, a następnie przekształcany do dojrzałej cząsteczki miRNA za pomocą RNazy III (DICER). Dojrzały miRNA po związaniu z białkiem AGO (białko rodziny *Agronout*) tworzy kompleks RISC (ang. *miRNA-Induced Silencing Complex*) mający zdolność oddziaływania z mRNA. Komplementarne wiązanie miRNA do mRNA, skutkuje cięciem matrycowego RNA. Tylko kompleks RISC zawierający białko AGO ma zdolność cięcia mRNA. W przypadku, gdy miRNA nie jest w pełni komplementarne do sekwencji mRNA, cięcie tego transkryptu nie będzie możliwe, natomiast sam fakt wiązania kompleksu RISC skutkuje zahamowaniem translacji (bezpośrednia inhibicja translacji mRNA). Miejscami docelowymi dla miRNA w obrębie transkryptów mRNA są 3'UTR lub w obrębie 5'UTR 7-metyloguanozyna. W ten sposób miRNA pełni rolę istotnego regulatora post-transkrypcyjnego wyciszenia genów [25, 44, 51, 81]. Sugeruje się, że nieprawidłowości podczas powstawania miRNA mogą także przyczyniać się do upośledzenia spermatogenezy. Doświadczenia wykonane na myszach pozbawionych genu *Dicer* charakteryzowały się nieprawidłową morfologią wydłużających się spermatyd, co wskazywało, że nie tylko miRNA, ale także białko Dicer, odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu gamet [9, 25].



RYCINA 6. Etapy tworzenia i dojrzewanie miRNA podczas spermatogenezy: (1) jądrowe cięcie długiej cząsteczki RNA konformacji „spinki do włosów” (udział DROSHA) i powstanie pre-miRNA, (2) cytoplazmatyczne dojrzewanie miRNA (udział DICER) i tworzenie liniowej czasteczki miRNA,

(3) formowanie kompleksu RISC wraz z miRNA i białkiem AGO, (4) interakcja kompleksu RISC z mRNA; wg He i wsp. [25], Meikar i wsp. [44] – zmodyfikowane, (szczegóły w tekście)
FIGURE 6. Steps of the formation and maturation of miRNA molecules during spermatogenesis: (1) nuclear cleveage of hairpin-loop-folded long RNA molecule (the role of DROSHA) and formation of pre-miRNA, (2) cytoplasmatic maturation of miRNA (the role of DICER) and formation of linear miRNA molecule, (3) creation of RISC complex containing miRNA and AGO protein, (4) interaction of RISC complex with mRNA; according to He et al. [25], Meikar et al. [44] – modified, (for details see text)



RYCINA 7. Procesy molekularne poprzedzające inkorporację protamin do DNA w jądrze wydłużającej się spermatydy. Receptor protaminowy LBR (ang. *Lamin B Receptor*) jest identyfikowany w peryferycznej części wewnętrznej błony otoczki jądrowej powiązanej z *fibrous lamina* zawierającej polipeptydy – laminy. Receptor ma region bogaty w argininę i serynę (ang. *RS domain*), odpowiedzialny za wiązanie protamin. Maskowanie domeny RS odbywa się za pośrednictwem białka p32. Jego oddysocjowanie pozwala na interakcję ufosforylowanych regionów RS występujących również w protaminach. Z kolei defosforylacja protamin umożliwia ich uwolnienie z LBR i w dalszym etapie wymianę powiązanych z DNA białek przejściowych (TP1, TP2) na protaminy (P1, P2); wg Mylonis i wsp. [48] – zmodyfikowane, (szczegóły w tekście)
FIGURE 7. Molecular processes before incorporation of protamines to DNA in the nucleus of elongating spermatid. The protamine receptor LBR (lamin B receptor) is identified at the peripheral part of the nuclear envelope inner membrane associated to the *fibrous lamina* composed of polypeptides – lamins. The LBR contains arginine and serine rich domain (RS domain) as a docking side for the protamines. The masking of the RS domain is mediated by p32 protein. The dissociation of the p32 allows to interact of phosphorylated RS domains occurring also in the protamines. In turn, protamine dephosphorylation facilitates the detachment of the protamines from LBR and the replacement of associated to DNA transition protein (TP1, TP2) by protamines (P1, P2); according to Mylonis et al. [48] – modified, (for details see text)

Fosforylacja i defosforylacja protamin reguluje proces wbudowywania tych białek do DNA plemników

Inkorporacja protamin do DNA poprzedzona jest post-translacyjną modyfikacją tych białek, dzięki której możliwe staje się wytworzenie wysoce skondensowanego kompleksu nukleoproteinowego. Produktem *PRM1* jest dojrzała forma białka P1 zbudowana z 51 aminokwasów, podczas gdy protamina 2 jest syntetyzowana w postaci peptydu prekursorowego (pre-P2) zawierającego 103 aminokwasy. Hydroliza wiązania pomiędzy histydyną (H) i argininą (R), czyli pomiędzy 43 a 44 aminokwasem, umożliwia powstanie dojrzałej formy P2 [7, 11, 18, 56]. Na podstawie modelu mysiego wykazano, że proteoliza pre-P2 zachodzi w późnych spermatydach i może przebiegać przez kilka dni. U gryzoni i większości ssaków (ludzie, małpy wąskonose: małpy człekokształtne i małpy Starego Świata – małpy zwierzokształtne), wyróżniono dwie formy protaminy 2 (P_2 i P_3). Różnica pomiędzy P_2 i P_3 wynika z liczby aminokwasów w białku (P_2 – 57 aminokwasy, P_3 – 54 aminokwasy). U niektórych gatunków (ludzie, makaki) wykazano obecność trzeciej formy P2 (P_4) [7, 56].

Protamina 1 syntetyzowana jest w postaci dojrzałego białka, dlatego też bezpośrednio po pojawieniu się w cytoplazmie jest fosforylowana. Natomiast P2 podlega temu procesowi dopiero po post-translacyjnych modyfikacjach. Polegają one na proteolitycznym usunięciu około 40% końcowych aminokwasów. Regiony podlegające fosforylacji bogate są w argininę i serynę (ang. *RS domain*). Proces ten katalizowany jest przez specyficzne kinazy – SRPK1 (ang. *serine/arginine protein-specyfic kinase-1*) i CAMK4 (ang. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV*) fosforylujące odpowiednio P1 i P2. Wykazano, że wysoka aktywność SRPK1 obserwowana była we wszystkich komórkach germinalnych z wyjątkiem dojrzałych plemników, u których dochodzi do defosforylacji protamin [1, 7, 48, 56, 58]. Istotne jest, że jedynie ufosforylowane protaminy mają zdolność do przejściowego zakotwiczania się w wewnętrznej błonie otoczki jądrowej różnicującej się spermatydy, za pośrednictwem zidentyfikowanego receptora – LBR (ang. *Lamin B Receptor*). Jest on zlokalizowany w obrębie *fibrous lamina* ściśle przylegającej do błony otoczki jądrowej i zbudowanej z białek lamin, w których zakotwiczają się pętle chromatyny. Podobnie jak protaminy, LBR w obszarze nukleoplazmatycznym (ang. *nucleotidplasmic NH_2-terminal domain*) zawiera on podlegające fosforylacji sekwencje bogate w argininę i serynę (ang. *RS domain*) (ryc. 7). Wymienione domeny odpowiedzialne są za interakcje pomiędzy LBR a protaminą. Proces wiązania się protamin z LBR regulowany jest przez komórkowe białko p32, które także ściśle wiąże się z receptorem lamin w regionie RS. W ten sposób zapobiega jego fosforylacji i jednocześnie blokuje miejsce przyłączenia się protamin do receptora [48, 82]. Zatem wiązanie się tych białek do wewnętrznej błony otoczki jądrowej poprzedzone jest oddysocjowaniem p32 od LBR. Najprawdopodobniej jest to niezbędne do związania się ufosforylowanych

protamin ze swoim receptorem. Należy jednak podkreślić, że bezpośrednio przed łączeniem się protamin z DNA zawierającym białka przejściowe, odbywa się defosforylacja protamin, co umożliwia ich oddysocjowanie od receptora LBR (ryc. 7). Sugeruje się zatem że, defosforylacja protamin ułatwia wymianę białek przejściowych na protaminy w wydłużających się spermatydach, a przez to przyczynia się do wzrostu stopnia kondensacji chromatyny dojrzewającej spermatydy [7, 11, 48, 56, 58, 82]. Ze względu na to że fosforylacja wpływa na zakotwiczanie się protamin w jądrze i stopień kondensacji DNA, zaburzenia fosforylacji i defosforylacji tych białek mogą być powiązane z niepłodnością lub zaburzeniami rozrodu o charakterze idiopatycznym, mającym podłoże zmian molekularnych, co potwierdzają wyniki badań eksperymentalnych. Doświadczenia wykonane na modelach mysich, pozbawione genu *Camk4* kodującego kinazę zależną od kalmoduliny i wapnia, charakteryzowały się osłabioną spermatogenezą prowadzącą do sterylności. Wykazano obniżoną zawartość P2 i wzrost TP2, gdyż upośledzona była protaminacja DNA związana z wymianą białka przejściowego 2 na protaminę 2 [7, 48, 56]. Zatem, nieprawidłowa protaminacja może być powiązana nie tylko z zaburzeniami transkrypcji i translacji protamin, ale także z molekularnymi procesami poprzedzającymi ich inkorporację do DNA plemników.

LITERATURA

[1] AOKI VW, CARRELL DT. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 2003; **5**: 315–324.

[2] AOKI VW, CHRISTENSEN GL, ATKINS JF, CARRELL DT. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril* 2006; **86**: 1416–1422.

[3] AOKI VW, LIU L, CARRELL DT. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 2006; **12**: 41–50.

[4] AOKI VW, LIU L, JONES KP, HATASAKA HH, GIBSON M, PETERSON CM, CARRELL DT. Sperm protamine 1/ protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006; **86**: 1408–1415.

[5] ASTON KI, KRAUSZ C, LAFACE I, RUIZ-CASTANÉ E, CARRELL DT. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia of azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod* 2010; **25**: 1383–1397.

[6] ASTON KI, PUNJ V, LIU L, CARRELL DT. Genome-wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril* 2011; **97**: 285 – 292.

[7] BALHORN R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007; **8**: 227.

[8] BLÖCHER S, FINK L, BOHLE RM, BERGMANN M, STEGER K. CREM activator and repressor isoform expression in human male germ cells. *Int J Androl* 2005; **28**: 215–223.

[9] BOUHALLIER F, ALLIOLI N, LAVIAL F, CHALMEL F, PERRARD MH, DURAND P, SAMARUT J, PAIN B, ROUAULT JP. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010; **16**: 720–731.

[10] CARRELL DT, ASTON KI. The search for SNPs, CNVs, and epigenetic variants associated with the complex disease of male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2011; **57**: 17–26.

[11] CARRELL DT, EMERY BR, HAMMOUD S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod* 2007; **13**: 313–327.
[12] CARRELL DT, EMERY BR, HAMMOUD S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int J Androl* 2008; **31**: 537–545.
[13] CARRELL DT, HAMMOUD SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**: 37–47.
[14] CASTILLO J, SIMON L, DE MATEO S, LEWIS S, OLIVA R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J Androl* 2011; **32**: 324–332.
[15] CHRISTENSEN GL, WOODING SP, IVANOV IP, ATKINS JF, CARRELL DT. Sequencing and haplotype analysis of the activator of CREM in the testis (ACT) gene in populations of fertile and infertile males. *Mol Hum Reprod* 2006; **12**: 257–262.
[16] COLLODEL G, CAPITANI S, PAMMOLLI A, GIANNERINI V, GEMINIANI M, MORETTI E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl* 2010; **31**: 108–113.
[17] DE BOER P, RAMOS L, DE VRIES M, GOCHHAIT S. Memoirs of an insult sperm as a possible source of transgenerational epimutations and genetic instability. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**: 48–56.
[18] DE MATEO S, RAMOS L, DE BOER P, MEISTRICH M, OLIVA R. Protamine 2 precursors and processing. *Protein Pept Lett* 2011; **18**: 778–785.
[19] FAJARDO MA, HAUGEN HS, CLEGG CH, BRAUN RE. Separate elements in the 3' untranslated region of the mouse protamine 1 mRNA regulate translational repression and activation during murine spermatogenesis. *Dev Biol* 1997; **1**: 42–52.
[20] GALLEGOS-AVILA G, ORTEGA-MARTÍNEZ M, RAMOS-GONZÁLEZ B, TIJERINA-MENCHACA R, ANCER-RODRÍGUEZ J, JARAMILLO-RANGEL G. Ultrastructural findings in semen samples of infertile men infected with Chlamydia trachomatis and mycoplasmas. *Fertil Steril* 2009; **91**: 915–919.
[21] GARCÍA-PEIRÓ A, MARTÍNEZ-HEREDIA J, OLIVER-BONET M, ABAD C, AMENGUAL MJ, NAVARRO J, JONES C, COWARD K, GOSÁLVEZ J, BENET J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011; **95**: 105–109.
[22] GÁZQUEZ C, ORIOLA J, DE MATEO S, VIDAL-TABOADA JM, BALLESCA JL, OLIVA R. 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* 2008; **29**: 540–548.
[23] HAMMADEH ME, HAMAD MF, MONTENARH M, FISCHER-HAMMADEH C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod* 2010; **25**: 2708–2720.
[24] HAMMOUD S, EMERY B, AOKI V, CARRELL DT. Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Arch Androl* 2007; **53**: 267–274.
[25] HE Z, KOKKINAKI M, PANT D, GALLICANO GI, DYM M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* 2009; **137**: 901–911.
[26] HOGEVEEN KN, SASSONE-CORSI P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Hum Fertil (Camb)* 2006; **9**: 73–79.
[27] IGUCHI N, YANG S, LAMB DJ, HECHT NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 2006; **43**: 382–384.
[28] IMKEN L, ROUBA H, EL HOUATE B, LOUANJLI N, BARAKAT A, CHAFIK A, MCELREAVEY K. Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Mol Hum Reprod* 2009; **15**: 733–738.
[29] JASPERS S, GELLERSEN B, KEMPF R, SAMALECOS A, BERGMANN M, STEGER K. Functional characterization of male germ cell-specific CREM isoforms. *J Androl* 2007; **28**: 59–66.
[30] JENKINS TG, CARRELL DT. The paternal epigenome and embryogenesis: poising mechanisms for development. *Asian J Androl* 2011; **13**: 76–80.
[31] JONHSON GD, LALANCETTE C, LINNEMANN AK, LEDUC F, BOISSONNEAULT G, KRAWETZ SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA and the nuclear matrix. *Reproduction* 2011; **141**: 21–36.

[32] KAZEROONI T, ASADI N, JADID L, KAZEROONI M, GHANADI A, GHAFFARPASAND F, KAZEROONI Y, ZOLGHADR J. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 2009; **26**: 591–596.
[33] KLEENE KC. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev*1996; **43**: 268–281.
[34] KOTAJA N, DE CESARE D, MACHO B, MONACO L, BRANCORSINI S, GOOSSENS E, TOURNAYE H, GANSMULLER A, SASSONE-CORSI P. Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10620–10625.
[35] KRAMER JA, ZHANG S, YARON Y, ZHAO Y, KRAWETZ SA. Genetic testing for male infertility: a postulated role for mutations in sperm nuclear matrix attachment regions. *Genet Test* 1997; **1**: 125–129.
[36] LAMB DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian J Androl* 2010; **12**: 64–70.
[37] LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, MARTIN G, LEVY R, CHOCAT A, CARREAU S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**: 535–541.
[38] MACLEAN JA 2ND, WILKINSON MF. Gene regulation in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2005; **71**: 131–197.
[39] MANOCHANTR S, CHIAMCHANYA C, SOBHON P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia* 2011; Jul 6: doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01128.x [Epub ahead of print].
[40] MANTAS D, ANGELOPOULOU R, MSAOUEL P, PLASTIRA K. Evaluation of sperm chromatin quality and screening of Y chromosome microdeletions in Greek males with severe oligozoospermia. *Arch Androl* 2007; **53**: 5–8.
[41] MARTIANOV I, BRANCORSINI S, GANSMULLER A, PARVINEN M, DAVIDSON I, SASSONE-CORSI P. Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* 2002; **129**: 945–955.
[42] MARTIANOV I, VIVILLE S, DAVIDSON I. RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science* 2002; **298**: 1036–1039.
[43] MARTINS RP, OSTERMEIER GC, KRAWETZ SA. Nuclear matrix interactions At the human protamine domain. *J Biol Chem* 2004; **279**: 51862–51868.
[44] MEIKAR O, DA ROS M, KORHONEN H, KOTAJA N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* 2011; **142**: 195–209.
[45] MILLER D, BRINKWORTH M, ILES D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010; **139**: 287–301.
[46] MIYAGAWA Y, NISHIMURA H, TSUJIMURA A, MATSUOKA Y, MATSUMIYA K, OKUYAMA A, NISHIMUNE Y, TANAKA H. Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the *TNP1* and *TNP2* genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl* 2005; **26**: 779–786.
[47] MONACO L, KOTAJA N, FIENGA G, HOGEVEEN K, KOLTHUR US, KIMMINS S, BRANCORSINI S, MACHO B, SASSONE-CORSI P. Specialized rules of gene transcription in male germ cells: the CREM paradigm. *Int J Androl* 2004; **27**: 322–327.
[48] MYLONIS I, DROSOU V, BRANCORSINI S, NIKOLAKAKI E, SASSONE-CORSI P, GIANNAKOUROS T. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem* 2004; **19**: 11626–11631.
[49] NANASSY L, CARRELL DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fetril Steril* 2011; **95**: 2310–2341.
[50] NANASSY L, LIU L, GRIFFIN J, CARRELL DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett* 2011; **18**: 772–777.
[51] NAGAMORI I, SASSONE-CORSI P. The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3503–3508.

[52] NASR-ESFAHANI MH, ABASI H, RAZAVI S, ASHRAFI S, TAVALAEE M. Varicocelectomy: semen parameters and protamine deficiency. *Int J Androl* 2009; **32**: 115–122.
[53] NAVAEIAN-KALAT E, DEEMEH MR, TAVALAEE M, ABASI H, MODARESI M, NASR-ESFAHANI MH. High total acrosin activity in varicocele individuals. *Andrologia* 2011; Nov 2: doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01242.x. [Epub ahead of print].
[54] NILI HA, MOZDARANI H, ALEYASIN A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online* 2009; **18**: 479–485.
[55] O'FLAHERTY C, VAISHEVA F, HALES BF, CHAN P, ROBAIRE B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008; **23**: 1044–1052.
[56] OLIVA R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod* 2006; **12**: 417–435.
[57] OLIVA R, DIXON GH. Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J Mol Evol* 1990; **30**: 333–346.
[58] PAPOUTSOPOULOU S, NIKOLAKAKI E, CHALEPAKIS G, KRUFT V, CHEVAILLIER P, GIANNAKOUROS T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res* 1999; **15**: 2972–2980.
[59] PIASECKA M, GĄCZARZEWICZ D, LASZCZYŃSKA M, STARCZEWSKI A, BRODOWSKA A. Flow cytometry application in the assessment of sperm DNA integrity of men with asthenozoospermia. *Folia Histochem Cyto Biol* 2007; **54**: 127–136.
[60] PLASTIRA K, MSAOUEL P, ANGELOPOULOU R, ZANIOTI K, PLASTIRAS A, POTHOS A, BOLARIS S, PAPARISTEIDIS N, MANTAS D. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007; **24**: 437–443.
[61] PUGLISI R, MACCARI I, PIPOLO S, CONRAD M, MANGIA F, BOITANI C. The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 1420–1427.
[62] QUERALT R, OLIVA R, WINKFEIN RJ, RETIEF JD, DIXON GH. Evolution of protamine P1 genes in mammals. *J Mol Evol* 1995; **40**: 601–607.
[63] RAMOS L, DE BOER P, MEULEMAN EJ, BRAAT DD, WETZELS AM. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 2004; **8**: 392–397.
[64] RAMOS L, VAN DER HEIJDEN GW, DERIJCK A, BERDEN JH, KREMER JA, VAN DER VLAG J, DE BOER P. Incomplete nuclear transformation of human spermatozoa in oligo-asthenoteratospermia: characterization by indirect immunofluorescence of chromatin and thiol status. *Hum Reprod* 2008; **23**: 259–270.
[65] SADEGHI MR, LAKPOUR N, HEIDARI-VALA H, HODJAT M, AMIRJANNATI N, HOSSAINI JADDA H, BINAAFAR S, AKHONDI MM. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol* 2011; **52**: 645–651.
[66] SAID TM, LAND JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011; **17**: 719–733.
[67] SASSONE-CORSI P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Sience* 2002; **296**: 2176–2178.
[68] SHAMAN JA, YAMAUCHI Y, WARD WS. Sperm DNA fragmentation: awakening the sleeping genome. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 626–628.
[69] SHAMAN JA, YAMAUCHI Y, WARD WS. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 680–688.
[70] SHIN JY, GUPTA MK, JUNG YH, UHM SJ, LEE HT. Differential genomic imprinting and expression of imprinted microRNAs in testes-derived male germ-line stem cells in mouse. *PLoS One* 2011; **6**: e22481.
[71] SIMÕES R, FEITOSA WB, MENDES CM, MARQUES MG, NICACIO AC, DE BARROS FR, VISINTIN JA, ASSUMPÇÃO ME. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotech Histochem* 2009; **84**: 79–83.
[72] SIMON L, CASTILLO J, OLIVA R, LEWIS SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011; **23**: 724–734.

[73] SPERMON JR, RAMOS L, WETZELS AM, SWEEP CG, BRAAT DD, KIEMENEY LA, WITJES JA. Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod* 2006; **21**: 1781–1786.
[74] STEGER K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embriol* 1999; **199**: 471–487.
[75] STEGER K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol (Berl)* 2001; **203**: 323–34.
[76] STEGER K, CAVALCANTI MC, SCHUPPE HC. Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. *Int J Androl* 2011; **34**: 513–527.
[77] STEGER K, FINK L, FAILING K, BOHLE RM, KLIESCH S, WEIDNER W, BERGMANN M. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**: 331–336.
[78] STEGER K, KLONISCH T, GAVENIS K, BEHR R, SCHALLER V, DRABENT B, DOENECKE D, NIESCHLAG E, BERGMANN M, WEINBAUER GF. Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl* 1999; **20**: 747–754.
[79] STEGER K, PAULUS K, KLONISCH T, FRANKE FE, BERGMANN M. Expression of protamine 1 and 2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000; **6**: 219–225.
[80] STEGER K, WILHELM J, KONRAD L, STALF T, GREB R, DIEMER T, KLIESCH S, BERGMANN M, WEIDNER W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008; **23**: 11–16.
[81] SUH N, BAEHNER L, MOLTZAHN F, MELTON C, SHENOY A, CHEN J, BLELLOCH R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol*. 2010; **20**: 271–277.
[82] TAKANO M, TAKEUCHI M, ITO H, FURUKAWA K, SUGIMOTO K, OMATA S, HORIGOME T. The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 943–953.
[83] TALEBI AR, KHALILI MA, HOSSAINI A. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *Int J Androl* 2007; **30**: 163–169.
[84] TALEBI AR, VAHIDI S, AFLATOONIAN A, GHASEMI N, GHASEMZADEH J, FIROOZABADI RD, MOEIN MR. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2011; Aug 2: doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01206.x. [Epub ahead of print].
[85] TAMBURRINO L, MARCHIANI S, MONTOYA M, ELIA MARINO F, NATALI I, CAMBI M, FORTI G, BALDI E, MURATORI M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012; **14**: 24–31.
[86] TANAKA H, MIYAGAWA Y, TSUJIMURA A, MATSUMIYA K, OKUYAMA A, NISHIMUNE Y. Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**: 69–73.
[87] TÜTTELMANN F, KRENKOVÁ P, RÖMER S, NESTOROVIC AR, LJUJIC M, STAMBERGOVÁ A, MACEK M JR, MACEK M SR, NIESCHLAG E, GROMOLL J, SIMONI M. A common haplotype of *protamine* 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl* 2010; **33**: e240–e248.
[88] WARD WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**: 30–36.
[89] WEINBAUER GF, BEHR R, BERGMANN M, NIESCHLAG E. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 9–15.
[90] WILAND E, ŻEGAŁO M, KURPISZ M. Topologia chromosomów w jądrze komórkowym, Plemnik, Część 2. *Postępy Hig Med Dośw (online)* 2006; **60**: 343–351.
[91] WYKES SM, KRAWETZ SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29471–29477.

[92] YAMAUCHI Y, SHAMAN JA, WARD WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl* 2011; **13**: 31–35.
[93] YIU GK, HECHT NB. Novel testis-specific protein-DNA interactions activate transcription of the mouse protamine 2 gene during spermatogenesis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26926–26933.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 15.06.2012
Przyjęto: 14.08.2012
Małgorzata Piasecka
Zakład Histologii i Biologii Rozwoju
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
ul. Żołnierska 48, 71-210 Szczecin
tel.: 502 218 140
e.mail: mpiasecka@ipartner.com.pl