

# Association of *PON1-L55M* Genetic Variation with Male Infertility: *In silico* Analysis

## Abstract

According to the World Health Organization (WHO) infertility is one of the most social problems which known as a disease . male infertility associated factor accounts for half of all cases. Oxidative Stress (OS) is one of the most damaging factors that affects fertility status. Reactive Oxygen Species(ROS) include oxygen ions, free radicals and peroxides. However, low levels of ROS have been shown to be necessary for fertilization, motility, capacitation and acrosome reaction, but high levels of ROS may cause male infertility.ROS damage the sperm, morphology and membrane and DNA. The human body has several antioxidant enzymes such as: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPX), catalase (CAT), and paraoxonase (PON) to protects itself against ROS damage. PON1, PON2 and PON3 are members of paraoxonase gene family which are located on the long arm of chromosome7 between q21.3 and q22.1. There is about 60% of similarity in amino acid sequences and about 70% of similarity in nucleotide sequences between the members of this multi-gene cluster. PON1 is the newest member of this gene family. PON3 shows high lactonase, low arylesterase, and nearly no paraoxonase activity. PON2 displays lactonase and very low arylesterase activity. PON1 is a 43 kDa glycoprotein with 355 amino acid residues is an antioxidant calcium-dependent enzyme that appears to play an important role in the development of a large variety of diseases. The two calcium ions have different functions, one of these calcium ions is the catalytic calcium-ion which interacts with the amino acids and the other one is structural calcium ion. This enzyme possesses three enzymatic activities: lactonase, arylesterase, and paraoxonase activity. PON1 is mainly synthesized in the liver, then transported from the liver to several tissues and released into the blood circulation in which it binds to cell membranes and protects lipids against peroxidation. PON1 was detected in different developmental stages of the spermatozoa. The information about SNPs of PON1 was obtained from the db-SNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) for insilico analysis. L55M and Q192R are important functional genetic polymorphisms which are identified in PON1 gene which in coding region. The substitution of leucine(TTG) at position 55 by methionine(ATG) at third exon (L55M) reduces paraoxonase activity and protein stability and can cause male infertility. L55M polymorphism(rs854560-T163A) displays three phenotypes (LL,LM,MM) which paraoxonase activity in MM form is lower than LL and LM. In current study, we used different bioinformatics tools such as., I-Mutant 2.0, PolyPhen, SNP & GO, SIFT,MutPred and PhD-SNP databases(tools) in order to study L55M polymorphism. According to SIFT server which predicts whether amino acid substitution affects protein function, we found L55M polymorphism as deleterious and disease causing( damaging). MutPred which is based on SIFT, indicates L55M as disease-associated polymorphism in human. According to I-Mutant 2.0 which is predictor of protein stability changes upon mutation, negative  $\Delta\Delta G$  value ( $\Delta\Delta G=-0.64$ ) deduces that the

protein being mutated is of lower stability. SNP & GO server was also used in the present study which predicts L55M based on reliability index( RI=7, probability=0.170) as neutral. In PHD SNP algorithm , the results are also given in the form of neutral or disease causing mutations. This server predicts L55M polymorphism as neutral. L55M polymorphism was submitted to the PolyPhen database which used To search the possible effect of an amino acid substitution. According to this server L55M was considered a benign polymorphism. Bioinformatics studies have shown that L55M polymorphism maybe associated with the risk of male infertility. However, this SNP should be analyzed more in detail to find its association with disease causal potentialities.

Key words: Male Infertility, ROS, PON1, Polymorphism, Bioinformatics

### چکیده

ناباروری یکی از مشکلات اصلی سلامت در جهان است که به عنوان یک بیماری تلقی می‌شود. قابل ملاحظه است که تقریباً نیمی از مشکلات ناباروری در ارتباط با مردان است. از جمله مهم‌ترین عواملی که در اکثر ناباروری های مردان دیده می‌شود، افزایش سطح استرس اکسیداتیو است. اگرچه مقادیر اندک گونه های فعال اکسیژن، که شامل یون های اکسیژن، رادیکال های آزاد و پراکسیدها می‌باشد، در حرکت اسپرم، باروری، ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی ضروری است، اما مقادیر بالای آن با آسیب به DNA اسپرم، غشا و مورفولوژی آن، می‌تواند منجر به ناباروری در مردان شود. بدن انسان برای مقابله با رادیکال های آزاد دارای یک سیستم دفاعی موسوم به سیستم آنتی اکسیدان است که به دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود. سیستم های آنتی اکسیدانی آنزیمی شامل سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) و پاراکسوناز (PON) می‌باشد. خانواده ی ژنی پاراکسوناز شامل 3 ژن *PON1*, *PON2*, *PON3* می‌باشد که *PON1* جدیدترین عضو این خانواده است. این سه ژن روی بازوی بلند کروموزوم هفت در یک کلاستر ژنی به موقعیت 7q21.3 قرار گرفته‌اند. که از لحاظ توالی نوکلئوتیدی 70% و از لحاظ توالی آمینواسیدی 60% مشابه همدیگر هستند. با توجه به این شباهت ها، هرکدام دارای وظیفه‌ی خاص خود هستند. *PON3* دارای فعالیت بالای لاکتونازی و فعالیت پایین آریل استرازی می‌باشد و تقریباً هیچ‌گونه فعالیت پاراکسونازی ندارد. *PON2* دارای فعالیت لاکتونازی و فعالیت بسیار پایین آریل استرازی است. گلیکوپروتئین *PON1* که شامل 355 اسید آمینه و وزن مولکولی 43 kDa است، دارای دو جایگاه اتصال برای یون کلسیم می‌باشد. هرکدام از یون های کلسیم دارای نقش های متفاوتی هستند بطوریکه یکی یون کلسیم کاتالیتیکی نامیده می‌شود که در تماس با اسید آمینه هاست و دیگری یون کلسیم ساختاری می‌باشد. آنزیم *PON1* دارای فعالیت لاکتونازی، آریل استرازی و پاراکسونازی است. *PON1* یک آنزیم گلیکوپروتئینی است که به طور عمده توسط کبد ساخته می‌شود و سپس توسط جریان خون به بافت های مختلف منتقل می‌شود. *PON1* به غشا سلول ها متصل می‌شود و از لیپدهای غشایی در برابر پراکسیداسیون محافظت می‌کند. مطالعات حاکی از آن است که این پروتئین در مراحل مختلف اسپرماتوژنز و به صورت طبیعی در مایع منی وجود دارد. اطلاعات مربوط به پلی- مورفیسم های ژن *PON1* توسط پایگاه داده db-SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) دریافت و مورد بررسی قرار گرفت. از بین پلی-مورفیسم های این ژن، دو پلی-مورفیسم شناخته شده L55M و Q192R در ناحیه کد شونده وجود دارد که بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم اثر می‌گذارند. پلی-مورفیسم L55M، که به صورت T163A و با کد rs854560 نیز نشان داده می‌شود، از نوع missense است، که سبب تبدیل TTTG (کد لوسین) به ATG (کد متیونین) می‌شود. این پلی مورفیسم در آگزون سه قرار دارد. L55M فعالیت پاراکسونازی پروتئین *PON1* و پایداری آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و می‌تواند موجب ابتلا به ناباروری گردد. L55M به سه ژنوتیپ LL-LM-MM وجود دارد که ژنوتیپ MM موجب کاهش تعداد رونوشت های *PON1* و کاهش فعالیت آن و در نهایت می‌تواند منجر به ناباروری شود.

در مطالعه حاضر، برای بررسی پلی مورفیسم L55M از پایگاه داده های بیوانفورماتیکی مختلفی نظیر، I-Mutant 2.0, PolyPhen, SNP& GO, SIFT, MutPred و PhD-SNP استفاده شده است که نتایج بررسی ها به شرح زیر است:

مطابق با بررسی های انجام شده توسط پایگاه داده SIFT، که عملکرد پروتئین ها را در صورت جایگزینی اسیدهای آمینه بررسی می کند، L55M به عنوان یک پلی مورفیسم بیماری زا شناخته شده است. سرور MutPred که بر اساس پایگاه داده SIFT بیماری زا یا خوش خیم بودن پلی مورفیسم را نشان می دهد، بیان می دارد که L55M منجر به بیماری زایی در انسان می گردد. I-Mutant پایداری پروتئین را با توجه به تغییر انرژی آزاد آن در اثر تغییر اسید آمینه ها بررسی می کند، نشان می دهد با جایگزینی اسید آمینه متیونین به جای لوسین، تغییر انرژی آزاد منفی می شود که منجر به کاهش پایداری پروتئین PON1 می شود. با توجه به اطلاعات دریافتی از پایگاه داده SNP & GO، L55M با توجه به شاخص reliability (RI) یک پلی مورفیسم خنثی است که سلول با وجود آن می تواند به حیات خود ادامه دهد. در الگوریتم PhD-SNP نیز این پلی مورفیسم به صورت خنثی پیش بینی شده است. PolyPhen دیگر پایگاه داده بیوانفورماتیکی است که تغییرات ناشی از جایگزینی اسیدهای آمینه را بر پروتئین بررسی می کند. این ابزار بیوانفورماتیکی L55M را به عنوان به عنوان یک پلی مورفیسم خوش خیم شناسایی کرده است.

نظر به بررسی های بیوانفورماتیکی انجام شده و اثر بیماری زایی این پلی مورفیسم، این انتظار که L55M مرتبط با ناباروری در مردان است دور از ذهن نمی باشد. هر چند که آنالیزهای بیوانفورماتیکی بیشتری در مورد این پلی مورفیسم و بیماری های مرتبط با آن باید انجام شود.

واژگان کلیدی: ناباروری مردان، گونه های فعال اکسیژن، پاراکسوناز 1، پلی مورفیسم، بیوانفورماتیک

- Grdic Rajkovic, M., Rumora, L., & Barisic, K. (2011). The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochemia medica*, 21(2), 122-130.
- Ioannidou, A., Zachaki, S., Daraki, A., Margariti, I. M., Pantelia, D., Diamantopoulou, P., ... & Manola, K. N. (2019). Paraoxonase 1 (PON1) Q192R and L55M Polymorphisms as Potential Predisposition Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Anticancer research*, 39(6), 2861-2869.
- Mackness, M., & Sozmen, E. Y. (2020). A critical review on human serum Paraoxonase-1 in the literature: truths and misconceptions. *Turkish Journal of Biochemistry*, 1(ahead-of-print).
- Paul, S., Solayman, M., Saha, M., & Hossain, M. S. (2015). In silico analysis of the functional and structural impacts of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human paraoxonase 1 gene. *International Journal Bioautomation*, 19(3), 275.
- Ribas-Maynou, J., & Yeste, M. (2020). Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology*, 9(4), 77.
- Shyamala, K., & Gaauthem, D. (2012). In silico study of the binding parameters of various antioxidants with human Paraoxonase 1. *Journal of Computational Biology and Bioinformatics Research*, 4(1), 8-14.
- Taler-Verčič, A., Goličnik, M., & Bavec, A. (2020). The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and-3. *Molecules*, 25(24), 5980.
- Tanhapour, M., Shahmohamadnejad, S., Vaisi-Raygani, A., Kiani, A., Shakiba, Y., Rahimi, Z., ... & Pourmotabbed, T. (2019). Association between activity and genotypes of paraoxonase1 L 55 M (rs854560) increases the disease activity of rheumatoid arthritis through oxidative stress. *Molecular biology reports*, 46(1), 741-749.
- Türkeş, C., Demir, Y., & Beydemir, Ş. (2020). Some calcium-channel blockers: kinetic and in silico studies on paraoxonase-I. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-9.
- Wills, A. M., Cronin, S., Slowik, A., Kasperaviciute, D., Van Es, M. A., Morahan, J. M., ... & Brown, R. H. (2009). A large-scale international meta-analysis of paraoxonase gene polymorphisms in sporadic ALS. *Neurology*, 73(1), 16-24.