

ریبو نوکلئیک اسیدها (RNAs) در اسپرم بالغ

*دکتر محمد حسین مدرسی: دانشیار ژنتیک انسانی و بیوتکنولوژی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (نویسنده مسئول).
modaresi@sina.tums.ac.ir

مریم اقبالی: کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. eghbalim@razi.tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۷

چکیده

هسته اسپرم بالغ علی رغم عدم رونویسی، دارای جمعیت پیچیده ای از ریبونوکلئیک اسید (RNA=RiboNucleic Acid) از قبیل mRNAs mature RNAs و miRNAs micro RNAs می باشد که در طی مسیر اسپرماتوزن (Spermatogenesis) رونویسی و تجمع یافته اند. اسپرم بالغ فاقد ریبوزوم های سیتوپلاسمی و سیستم ترجمه می باشد، در حالی که mRNAs سیتوپلاسمیک توسط پلی زوم های میتوکندریایی ترجمه می شوند. رونوشت های اسپرمی نقش مهمی در سازماندهی کروماتین، نقش گذاری ژنومیک Genomic پدری و خاموش کردن ژن ها دارند. اخیراً انتقال RNA اسپرمی به سلول های اووسیت در هنگام لقاح و نقش اپی ژنتیکی و فراژنومیکی رونوشت های اسپرمی در اوایل رشد رویان نیز گزارش شده است. علاوه بر نقش زیستی RNA اسپرمی در اسپرم بالغ و رشد تخمک بارور شده، تفاوت پروفایل RNA در اسپرم بالغ مردان بارور و نابارور، پتانسیل بالقوه ای را به عنوان مارک های اسپرمی در ارزیابی باروری و ناباروری مردان فراهم می کند. در این مقاله مروری به حضور RNA در اسپرم بالغ، انواع و نقش های بالقوه آن ها در باروری مردان و رشد تخمک بارور شده پرداخته می شود.

کلیدواژه ها: اسپرم، رونوشت های (RNAs) کدکننده و غیر کدکننده اسپرمی، عملکرد رونوشت های اسپرمی.

مقدمه

در ابتدا تصور می شد که اسپرم بالغ تنها ژنوم پدری را به سلول تخمک منتقل می کند اما مطالعات زیادی در طی ۵۰ سال گذشته حضور انواع مختلف RNA را در اسپرم بالغ نشان می دهد، به طوری که وجود رونوشت ها در اسپرم و انتقال آنها به سلول تخمک حین لقاح، نقشی فراتر از ژنومیک اسپرم در فرآیند تکامل جنین را نشان می دهد. اسپرم بالغ، سلولی کاملاً تمایز یافته است که در فرآیند اسپرماتوزن ایجاد می شود. تولید اسپرم در پستانداران شامل سه مرحله تمایزی می باشد. ۱. میتوز در سلول های اسپرماتوگونی (سلول های بنیادی بالغ) ۲. میوز یا اسپرماتوزن و ۳. اسپرمیوزن (فرآیند گلیکوزیله شدن بعضی از پروتیین های سطحی و متراکم شدن هسته اسپرم، تبدیل اسپرماتید طویل شده به اسپرم بالغ در طی مسیر اپیدیدیم) (شکل ۱). کروماتین اسپرم در ابتدا توسط پروتئین های هیستونی (Histone) بسته بندی می شود اما در مسیراسپرمیوزن برای

متراکم شدن کروماتین هاپلوئیدی (Haploid) در اسپرم بالغ، پروتامین ها جایگزین اکثر هیستون ها می شوند (۱).

اسپرم بالغ در مسیر اسپرماتوزن بیشتر محتوای سیتوپلاسم خود را از دست می دهد و مقدار کمی سیتوپلاسم در اطراف هسته باقی می ماند که به همراه کروماتین متراکم هسته اسپرم بالغ وارد سلول تخم می شود. اسپرم بالغ به علت داشتن کروماتین متراکم از نظر رونویسی خاموش و غیرفعال است و نیز با از دست دادن بیشتر محتوای سیتوپلاسمی، فاقد مولفه های اصلی ریبوزوم های سیتوپلاسمی (RRNA 18s, rRNA 28s) و همچنین دستگاه ترجمه می باشد (۲). همچنین میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) Transmission Electron Microscope ساختارهای ریبوزومی متراکمی را در سیتوپلاسم نشان می دهد که ساختارهای مونوزومی و پراکنده ای دارند (۲). این دو یافته اخیر نشان دهنده عدم وجود ریبوزوم های فعال در

انسان شناسایی شد C-myc بود و پس از آن با روش‌های RT-PCR و هیبریداسیون درجا in situ hybridization (ISH) تعدادی رونوشت‌های اختصاصی اسپرم در انسان شناسایی شدند، از جمله پروتامین‌ها، گیرنده‌های پروژسترون، گیرنده‌های استروژن، CYCLINBI، STAT4، DAZL و SRY و نیویز SYCP3 و TSGA10 هستند (۱۴-۱۶). تعدادی از مطالعات هیبریداسیون درجا موقعیت رونوشت‌های اسپرم را در هسته و یا اطراف و نزدیک به پوشش هسته نشان دادند (۱-۳) و در مطالعاتی دیگر وجود RNA را در دم اسپرم گزارش کردند که متفاوت بودن مکان نگهداشت رونوشت‌ها، عملکردهای متفاوتی را برای RNA اسپرم پیشنهاد می‌کند (۵، ۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۱۷).

رونوشت‌های غیرکدکننده در اسپرم بالغ (Non-coding RNAs در اسپرم بالغ):

علاوه بر mRNA یا coding RNAs، رونوشت‌های دیگری به نام رونوشت‌های کوچک (miRNA) نیز در اسپرم شناسایی شده است که کدکننده پروتئین نمی‌باشند و با اتصال به mRNA مانع فرآیند ترجمه و باعث تنظیم بیان ژن در سطح بعد از رونویسی (Post-transcription) می‌شوند. miRNAs در مراحل مختلف اسپرماتوژنز حضور دارند و بیشترین بیان در سلول‌های پاکیتن اسپرماتوسیت و همچنین اسپرماتید دارند (۱۸ و ۱۹). توسط مطالعاتی که به صورت کمی qRT-PCR انجام گرفته است، miRNA در ۲۸ بافت بیضه موش (در جمعیت‌های مختلف سلولی جداسازی و خالص شده که شامل سلول‌های سرتولی (sertoli)، اسپرماتوگونیا (spermatogonia)، پاکیتن (pachyten)، اسپرماتوسیت (spermatocytes)، اسپرماتید (spermatid) و اسپرم بالغ (mature spermatozoa) بودند) شناسایی شد (۱۸). برای بررسی و شناسایی miRNA در سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت و اسپرماتید جدا شده از بیضه تکنیک ریز آرایه (microarray) نیز مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). در تحقیقی نیز با

اسپرم است و از طرفی دیگر، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سنتز پروتئین در اسپرم بالغ منحصر به میتوکندری می‌باشد (۳). همانطور که گفته شد اسپرم از نظر رونویسی و ترجمه غیر فعال است، اما منشا رونوشت‌های موجود در هسته اسپرم بالغ مربوط به مراحل مختلف اسپرماتوژنز و قبل از آن می‌باشد و این رونوشت‌های انباشته شده در اسپرم برگرفته از مراحل پیشین اسپرماتوژنز می‌باشند. توقف و خاتمه رونویسی در اواسط اسپرمیوژنز، قبل از متراکم شدن هسته، رخ می‌دهد و نیز بیشترین سنتز RNA در اوایل مرحله پاکیتن سلول‌های اسپرماتوسیت می‌باشد (۴). رونوشت‌های موجود در هسته اسپرم بالغ شامل دو نوع اصلی کدکننده و غیر کدکننده پروتئین هستند که در این مقاله مروری به اهمیت حضور این رونوشت‌ها در اسپرم بالغ و عملکرد آن‌ها پرداخته می‌شود.

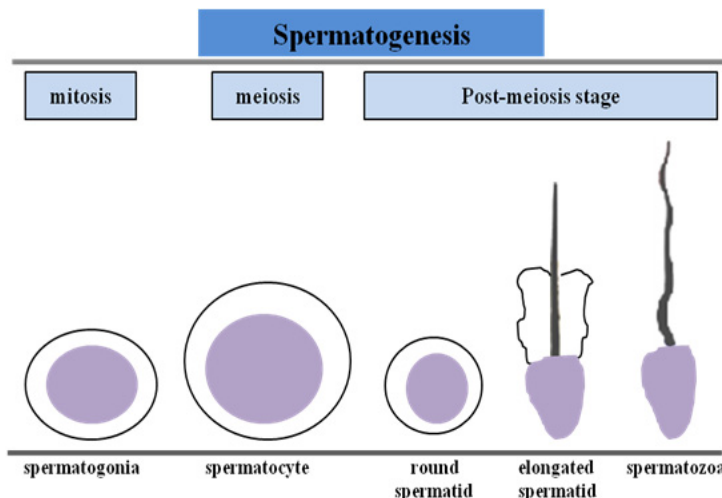
رونوشت‌های اسپرمی

رونوشت‌های کدکننده در اسپرم بالغ (Coding RNAs در اسپرم بالغ):

تعداد رونوشت‌های موجود در اسپرم بالغ نسبت به اووسیت به طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر است. کل محتوای رونوشت‌ها در اسپرم موش صحرایی femtogram ۱۰۰ fg و در انسان ۴۰۰-۱۰۰۰ fg می‌باشد (۵-۷). برای جداسازی و خالص‌سازی اسپرم، با استفاده از روش‌های شناورسازی اسپرم یا سانتریفیوژ شیب چگالی، سلول‌های جنسی حلقوی و سلول‌های سوماتیک حذف می‌شوند تا از اختصاصی بودن رونوشت‌های اسپرم اطمینان حاصل شود (۸). همچنین با بیان ژن‌های ویژه سلول‌های سوماتیک مانند CD45 و E-Cadherin اختصاصی بودن رونوشت‌های اسپرم را تایید کرده‌اند (۹). با استفاده از تکنیک‌های آنالیز سریالی بیان ژن serial gene expression analysis of (SAGE) و آنالیز ریزآرایه (Microarray) نشان داده‌اند که نیمی از رونوشت‌های اسپرم بالغ در هر فرد مشترک است، اما نیمی دیگر مختص و ویژه هر فرد می‌باشد (۱۰-۱۳). اولین mRNA اختصاصی اسپرم که در

جدول ۱- نتایج مطالعات ریز آرایه ی (Microarray) رونوشت های اسپرم در افراد بارور و نابارور

تغییر بیان	اسامی تعدادی از ژن های اختصاصی	مروری بر نتیجه مطالعه	نویسندگان
کاهش بیان	TRY1 (Trypsin x3) and GGT1 (gamma-glutamyltransferase 1)	در اسپرم افراد نابارور، ۱۲۶ و ۳ ژن به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند	گاریدو ۲۰۰۹
کاهش بیان	PRM2 (Protamin2) DDX4 (DEAD- box polypeptide) TSGA10 (Testis specific, 10)	کاهش بیان ژن های اختصاصی اسپرماتوزن و دخیل در حرکت اسپرم در افراد الیگواسپرم	مونتجین ۲۰۱۲
بیشترین سطح بیان کمترین سطح بیان	SALF ; germ cell specific transcription factor TRIM26 ; the zinc finger encoding gene	۷۸۱ ژن بیان متفاوتی در اسپرم مردان سیگاری و غیر سیگاری داشتند	لینسچوتن ۲۰۰۹
کاهش بیان	ODF 1-4 of the non-tubulin components of sperm tails and acrosomal proteins (ACRV1, SPAM1)	گروه ترانزوسپرمیک در مقایسه با افراد نرمال برخی از رونوشت ها را بیان نکردند.	پلتس ۲۰۰۷
کاهش بیان افزایش بیان	CUL3, PRM1, HSPCD35 (transcriptional factors) and TPX-1 (a testis-specific cell-adhesion gene) TNFAIP3 (tumor necrosis factor-a (TNF-a)-induced protein3)	۴۳ ژن بیان متفاوتی داشتند در افراد کریپتوکیدیسم نسبت به افراد نرمال	انگاین ۲۰۰۹



شکل ۱- مراحل مختلف تولید اسپرم شامل میتوز، اسپرماتوزن و اسپرمیوژن را نشان می دهد. در طی مراحل اسپرماتوزن مخصوصاً قبل از میوز و اوایل میوز بیشترین مقادیر بیان ژن وجود دارد و رونوشت های حاصل در اسپرم بالغ تجمعی از این رونوشت ها می باشد.

نقش مهمی در مهار رتروترانسپوزون ها در اسپرماتوزن و تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی در هنگام میوز و بعد از میوز دارند (۱۲-۲۲ و ۲۸). علاوه بر miRNA و piRNA نوع جدیدی از رونوشت های کوچک شناسایی شده است که اختصاصاً در سلول های جنسی بیان می شوند و به همین دلیل رونوشت های کوچک جنسی (germline small RNAs) نامیده می شوند. رونوشت های کوچک جنسی منحصراً در پاکیتن اسپرماتوسیت و اسپرماتید حلقوی بیان می شوند و بیان ویژه این رونوشت ها نشان دهنده نقش ویژه آنها در میوز و اسپرمیوژن می باشد، هر چند مکانیزم های تکثیر و عملکردی آنها به خوبی شناسایی نشده است (۲۹). همچنین نشان داده شده است که با توجه به نقش miRNA و piRNA در مسیر اسپرماتوزن، استفاده از

استفاده از تکنیک ریز آرایه در ۶ نمونه اسپرم انسانی ۶۸ miRNA شناسایی شدند (۲۱) که با توجه به مقدار ناچیز رونوشت های کوچک در اسپرم، عملکرد بسیار کمی را برای miRNAs در نظر گرفتند، اما در مطالعاتی که اخیراً در سال های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ انجام شده است، نشان داده اند که miRNAs نقش مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز مناسب سلول های جنسی در مسیر اسپرماتوزن دارند (۲۲-۲۴).

از دیگر رونوشت های غیر کدکننده در مسیر اسپرماتوزن PIWI interacting RNAs (piRNA) است که ۲۴-۳۰ نوکلئوتید دارد و بیان اختصاصی در بافت بیضه و سلول های جنسی دارد، اما در اسپرم بالغ شناسایی نشده است (۲۵). رونوشت های piRNA به صورت اختصاصی در اسپرماتوسیت و اسپرماتید حلقوی بیان می شوند و

IGF-2R بیان می شود، در حالی که در انسان هر دو آلل آن بیان می شود (۳۷). متناسب بودن مقدار لیگاند IGF-2 نسبت به گیرنده اش (IGF-2R) در رشد مناسب رویان موثر است، در صورتی که آنتی سنس رونوشت ژن IGF-2R با تداخل در بیان آن، عملکرد ژن IGF-2 را کاهش می دهد (۳۸). miRNA دیگری که در اسپرم انسانی شناسایی شده است آنتی سنس ژن DKK2 است که این ژن مسیر پیام رسانی WNT را مهار می کند (۳۹). آنتی سنس DKK2 با اتصال به ژن DKK2 منجر به خاموش شدن آن و فعال شدن مسیر WNT می شود (۲۱). مسیر WNT در مشخص شدن جنسیت و الگوسازی شکل بدن (Morphogenesis) نقش دارد و از این رو، این مطالعات نقش بالقوه miRNA که در اسپرم بالغ وجود دارد و به اووسیت در مرحله لقاح منتقل می گردد را در اوایل رشد رویان پیشنهاد می کند.

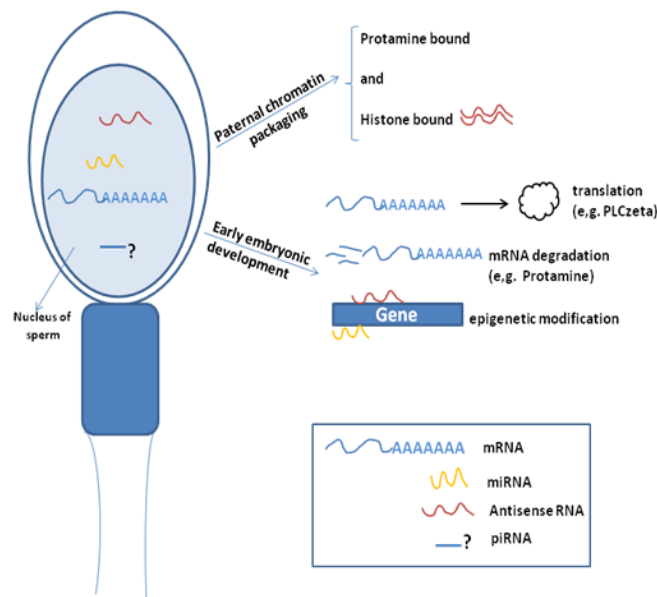
نقش و عملکرد رونوشت های اسپرم انتقال و نقش رونوشت های اسپرمی در رشد تخمک بارور شده

مطالعات نشان داده اند که رونوشت های موجود در هسته و سیتوپلاسم اطراف اسپرم مجموعه ای از رونوشت های بافت بیضه می باشند که در مسیر اسپرماتوژنز رونویسی شده اند (۴۰ و ۴۱). مجموع رونوشت های اسپرم حاصل رونویسی ژن ها از ابتدای اسپرماتوژنز تا اواسط اسپرمیوژنز قبل از توقف رونویسی می باشد مانند ژن TSPY که فقط در سلول های اسپرماتوگونیای بافت بیضه بیان می شود و رونوشت TSPY در اسپرم بالغ هم یافت شده است، در حالی که رونوشت های ریبوزومی به همراه ریبوزوم های سیتوپلاسمی حذف شده اند یا از بین رفته اند (۴۲). از این رو اهمیت عملکرد رونوشت های اسپرم موضوعی قابل بحث است و اطلاعاتی که در دسترس است هم به عملکرد رونوشت ها در اسپرم بالغ و هم به نقش آنها در سلول زیگوت (zygote) اشاره می کنند. شکل ۲ عملکرد های پیشنهادی رونوشت ها در اسپرم بالغ را نشان می دهد. تمام محتوای هسته اسپرم حین لقاح وارد اووسیت می شوند و بعد از لقاح دم

مهارکننده های آنها باعث اختلال مسیر اسپرماتوژنز و جلوگیری از بارداری (contraception) می شود (۳۰ و ۳۱). مطالعات اخیر نشان داده اند که تعدادی از miRNAs به ویژه Mirn322 و Mirn323 نقش آنکوژنی در تومورهای بافت بیضه دارند که می توان با مقایسه پروفایل بیانی miRNA در بافت سرطانی و نرمال به شناخت مارکرهای مولکولی جدید جهت تشخیص، پیشگیری و حتی ژن درمانی سرطان بافت بیضه پرداخت (۳۲ و ۳۳). از جمله مطالعه سال ۲۰۱۲ برای شناسایی مارکرهای مولکولی مناسب بررسی بیان رونوشت های miRNA در بافت سرطانی سینه انجام شده است (۳۴). بنابراین small RNAs در سلول های ژرمینال منجر به شناخت بهتری از روند مولکولی تقسیم سلولی در اسپرماتوژنز می شوند و نیز به پیشرفت روش های جدید جلوگیری از بارداری و روش های ژن درمانی در مردان نابارور و سرطان سلول های ژرمینال کمک می کند.

نقش miRNAs در اوایل رشد رویان

Small RNAs در توالی های همولوگ خود می توانند تغییرات اپی ژنتیکی و methylation متیله شدن DNA را هدایت (Direct) کنند و از این طریق مانع رونویسی (Transcription) و منجر به خاموش شدن ژن ها (gene silencing) شوند که فرایندی شناخته شده از نقش گذاری (imprinting) ژن ها می باشد (۳۵ و ۳۶). شناسایی miRNAs در اسپرم و انتقال آنها به اووسیت ها، باعث شناخت نقش احتمالی آنها در نقش گذاری (imprinting) ژن ها در اوایل رشد رویان می شود (۲۱). همانطور که گفته شد محل اصلی رونوشت های اسپرم از جمله miRNAs اغلب در هسته سلول اسپرم است که با انتقال به سلول تخم می توان به نقش احتمالی آنها در رشد رویان اشاره کرد. ردیابی miRNAs در اسپرم دیدگاه جدیدی را برای مطالعه ژن های نقش گذاری شده در اوایل رشد رویان فراهم کرده است. از جمله این رونوشت ها، آنتی سنس رونوشت ژن IGF-2R در اسپرم انسان می باشد (۲۱). در موش ژن مادری



شکل ۲- این شکل از روی شکل اصلی ساخته شده است. عملکردهای پیشنهادی رونوشتها در اسپرم بالغ: جمعیت رونوشت های اسپرمی شامل رونوشت های کدکننده و غیر کدکننده پروتئین می باشند و به نظر می رسد دارای عملکردهای احتمالی زیر می باشند. بسته بندی کروماتین پدری: بخش اعظم کروماتین هسته اسپرم توسط پروتامین ها و بخش کوچکی از ژنوم نیز توسط نوکلئوزوم های هیستونی بسته بندی می شوند، این بخشها توسط رونوشت های پدری علامتگذاری می شوند. رونوشت های منتقل شده به اووسیت یا ترجمه و یا تخریب می شوند. شواهدی نیز وجود دارد که antisense RNAs و miRNAs از طریق اثرات اپی ژنتیک نقش مهمی در تشکیل دومین های غیر فعال کروماتین و بیان ژن ها بازی می کنند (imprinting) (۷۰).

بعد از ۳ ساعت از لقاح در سلول زیگوت حضور داشته ولی در اووسیت های هامستر شناسایی نشدند (۴۸). کلاسترین در نفوذ اسپرم به تخمک موثر می باشد و پیشنهاد شده که در رشد زیگوت نقش دارد، هر چند که رونوشت های پروتامین ۲ در اوایل جنینی (مرحله دو سلولی) تخریب می شوند (۵۰ و ۵۱). پروتئین AKAP4 یکی از پروتئین های موثر در حرکت اسپرم است که رونوشت های آن در اسپرم بالغ یافت شده است (۵۲ و ۵۳). بنابراین این یافته ها نقش مهمی را برای رونوشت های اسپرمی در باروری موثر تخمک و رشد تخمک بارور شده پیشنهاد می کنند.

نقش ساختاری رونوشت های اسپرم در سازماندهی مجدد کروماتین

رونوشت های اسپرمی نقش دینامیکی در سازماندهی مجدد کروماتین اسپرم دارند (شکل ۲) (۵۴). somatic histones هیستون های سوماتیکی در مرحله اسپرمیوژنز با پروتئین های انتقالی (Transition) و سپس با پروتامین ها جایگزین می شوند، هر چند که قسمتی از ژنوم اسپرم انسان

اسپرم و میتوکندریها در تخمک تخریب می شوند (۴۳ و ۴۴). علاوه بر ژنوم قسمت هایی از اسپرم حفظ می شوند که برای رشد سلول تخم مورد نیاز می باشند از جمله رونوشت های اسپرم، سانتیریول، فاکتورهای رونویسی و مولکول های پیام رسان مانند STAT4 (۴۵-۴۷).

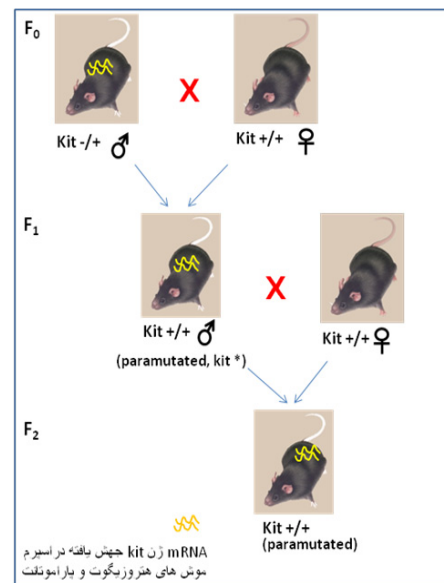
انتقال رونوشت های موجود در هسته و سیتوپلاسم اطراف اسپرم به اووسیت در ایجاد تخمک بارور شده موثر می باشند (۴۸). در یک مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR وجود ۶ رونوشت را در اسپرم بالغ انسانی نشان داده در حالی که در اووسیت شناسایی نشده اند (۸ و ۴۹). این رونوشت ها شامل AKAP4، Clusterin، A-، Protamine2، (kinase anchoring protein 4)، HSBP1 (heat shock binding protein 1)، FOXG1B (forkhead box G1B) و WNT5 (wingless-type MMTV integration site) member 5 A family می باشند. همچنین، محققان با استفاده از روش سنجش نفوذ اسپرم به داخل تخمک هامستر نشان دادند که رونوشت های کلاسترین و پروتامین به ترتیب بعد از ۳۰ دقیقه و

کرد که توسط هیستون ها بسته بندی کرده و نسبت به نوکلئاز ها هم حساس می باشند (۶۰ و ۶۱). مطالعه توالی های DNA بسته بندی شده با هیستون ها و بررسی ارتباط این توالی ها با mRNA جدا شده از اسپرم می تواند جالب باشد. بنابراین نقش ساختاری رونوشت های اسپرم در نقش گذاری ژن های پدری و سازماندهی مجدد کروماتین امری ضروری است و اثر اپی ژنتیکی RNA (RNA – mediated epigenetic effects) اسپرم را در رشد سلول تخم نشان می دهد. قابل توجه است که فقدان اثرات اپی ژنتیکی پدری می تواند باعث اختلال در اوایل رشد رویان شود (۵۴).

پاراموتاسیون

Paramutation پاراموتاسیون، خاموش شدن وراثتی یک آلل به وسیله آلل دیگر همان ژن و یا انتقال اپی ژنتیکی اطلاعات از آلل یک ژن به آلل دیگر است که منجر به تغییرات وراثتی می گردد است. شکل ۳ پاراموتاسیون در موش و نقش RNAs اسپرمی را در آن نشان می دهد. انتقال رونوشت های اسپرمی به اووسیت در هنگام لقاح و نقش این رونوشت ها در رشد رویان، از دیگر ویژگی های RNA اسپرمی می باشد. طبق فرضیه ای رونوشت های اسپرم، بیان تعدادی از ژن ها را در رویان تحت تاثیر قرار می دهند که توسط مطالعه رسول زادگان به صورت قابل توجهی مورد تایید قرار می گیرد (۶۲). این مطالعه به نقش اپی ژنتیکی رونوشت های اسپرم در ژنوم زیگوت اشاره می کند، به این ترتیب که رونوشت های اسپرم منتقل شده به اووسیت فنوتیپ موش را بدون تغییر ژنوتیپی، تحت تاثیر قرار می دهند که مثالی از وراثت غیر مندلی (پاراموتاسیون) است. به عنوان مثال موش های هتروزیگوت دارای موتاسیون ژن *Kit*، پروتئین *kit* را تولید نمی کنند و از نظر فنوتیپی پاها و دم سفید دارند. فنوتیپ به ارث رسیده می تواند از طرف پدر یا مادر باشد که نتیجه ای از کاهش mRNA ژن *kit* و افزایش رونوشت های RNA non-polyadenylated غیر پلی آدنیله در

(۱۵ - ۰.۵٪) توسط هیستون ها بسته بندی می شوند (۵۵). نوکلئو هیستون های اسپرم در پوشش هسته قرار گرفته اند [۴ - ۵] و نیز موقعیت رونوشت های اسپرم هم در سر اسپرم و پوشش هسته می باشد (۵۶ - ۵۸) [۶]. این موقعیت مکانی مشابه، ارتباطی عملکردی را بین رونوشت های اسپرم و نوکلئو هیستون ها پیشنهاد می کند. رونوشت های آنتی سنس اسپرم با نقش گذاری ژنوم، مانع بسته بندی DNA توسط پروتامین ها و سپس بسته بندی آن توسط هیستون ها می شوند. گفته شده است که هیستون ها بیشترین حضور را در پروموتورهای ژن های miRNAs و ژن های نقش گذاری شده دارد (۵۹). از جمله ژن های نقش گذاری شده می توان به IGF-2 (توسط ژن پدری بیان می شود) اشاره



شکل ۳- این شکل نیز از روی شکل اصلی مقاله ساخته شده است، موش های ان از google image گرفته شده است. پاراموتاسیون ژن *Kit* در موش: پاها و دم سفید رنگ فنوتیپ موش های هتروزیگوت جهش یافته می باشد. اگر چه بیان ژن *Kit* محدود به سلول های اسپرماتوگونی می باشد و mRNA آن در اسپرم مشاهده نشده است ولی mRNA غیر نرمال *Kit* (رونوشت های بدون دم پلی آدنیله و با اندازه های غیر نرمال) در مغز و اسپرم موش های هتروزیگوت انباشته شده است. موش های هموزیگوت *Kit+/+* متولد شده از موش های هتروزیگوت *Kit-/+* فنوتیپ پاها و دم سفید رنگ را حفظ کرده اند و از طریق اسپرم حاوی mRNA غیر نرمال ژن *Kit* فنوتیپ مذکور را به فرزندان خود انتقال می دهند. مقاله استفاده شده: Vicki L. Paramutation: From Maize to Mice. Chandler, Cell 128, 2007

پروتامین ۲ در سلول های اسپرماتید و اسپرم بالغ مردان بارور و نابارور تفاوت زیادی داشته است (۶۷). همچنین نشان داده شده است که سطح mRNA پروتامین ۱ و پروتامین ۲ در بیماران با اسپرم‌هایی که اختلال در حرکت (Asthenozoospermia) دارند، نسبت به مردان بارور کاهش یافته است (۶۸). بنابراین رونوشت های پروتامین ۱ و ۲ در شکل گیری اسپرمی فعال نقشی مهم دارند و احتمالاً می توانند به عنوان ابزار تشخیصی ناباروری مردان مورد استفاده قرار گیرند.

در مطالعات جدید، پروفایل بیانی رونوشت‌های اسپرم توسط تکنیک ریز آرایه (Microarray) مورد بررسی قرار گرفته است که ترکیب mRNA در اسپرم بالغ و ارتباط الگوی خاص این رونوشت‌ها با باروری و ناباروری در مردان، تراتوزوسپرمی (teratozoospermia)، سیگار کشیدن و کریپتوکیدیسم (cryptorchidism) را آشکار می‌کند که در جدول ۱ به مختصر توضیح داده شده است (۶۹-۷۶). از جمله ژن‌هایی که در افراد الیگواسپرم کاهش بیان داشته‌اند، ژن TSGA10 می‌باشد (۷۳). ژن TSGA10 بیان ویژه‌ای در بافت بیضه دارد و از اجزای ساختاری دم اسپرم می‌باشد و علاوه بر این از روزهای اول دوره رویانی در رویان نیز بیان می‌شود. لذا علاوه بر نقش این ژن در ساختار اسپرم، به دلیل وجود بیان در دوره رویانی و کاهش بیان در افراد الیگواسپرم می‌توان به نقش این ژن در ناباروری‌ها به ختم با علل ناشناخته دوره رویانی نیز اشاره کرد (۷۷). یکی از مطالعات ریزآرایه، ۱۵۷ رونوشت را در اسپرم مردان الیگواسپرم نشان داد که نسبت به افراد نرمال افزایش یا کاهش بیان داشته‌اند. ژن‌هایی که بیان کاهش یافته‌ای داشتند در اسپرماتوژنز، حرکت اسپرم و فرایندهای ضد آپوپتوز (PRM2, SPZ-1, SPATA-4, MEA-1, CREM) نقش دارند. علاوه بر این رونوشت ژن‌هایی که در مسیر تعمیر DNA (NIPBL) و استرس اکسیداتیو (PARK7) فعال هستند، مقدار کاهش یافته‌ای را نشان دادند (۷۳).

در مطالعه‌ای دیگر رونوشت های اسپرم بالغ مردان بارور و ناباروری که از نظر آنالیز مایع

موش‌های هتروزیگوت می‌باشد. بیشتر زاده‌های حاصل از لقاح موش های هتروزیگوت با موش‌های سالم (Wild Type)، از نظر ژنوتیپی Kit+/+ بودند ولی فنوتیپی مشابه موش های دارای موتاسیونبا دم و پاهای سفید رنگ بودندو نیز سطح mRNA ژن kit مشابه موش های دارای موتاسیون، کاهش یافته بود. دراین تحقیق نشان دادندکه اگر به اووسیت های لقاح یافته، RNA اسپرم یا RNA مغز موش های هتروزیگوت و یا miRNA ژن Kit را تزریق کنند، زاده های حاصل فنوتیپ جهش یافته را به ارث می‌برند(۶۲). این آزمایشات تغییرات اپی ژنتیکی وابسته به RNA را شرح می‌دهد و از طرفی فرضیه انتقال RNA اسپرمی به اووسیت و نقش آن‌ها در اوایل رشد رویان از طریق تغییرات اپی ژنتیکی را حمایت می‌کند (۱۵).

رونوشت های اسپرمی به عنوان بیومارکرهای باروری و ناباروری مردان

اسپرم بالغ حاوی رونوشت های مراحل قبلی اسپرماتوژنز می‌باشد که این رونوشت‌ها تصویری از اسپرماتوژنز در بیضه را نشان می‌دهند و زمینه‌های جدیدی در تحقیق باروری و ناباروری مردان ایجاد می‌کنند (۴۰ و ۴۱). تاکید اصلی برای ارزیابی مولکولی و استفاده از RNA اسپرم، طیف وسیع فاکتورهای مردانه در ناباروری است که علت واضحی ندارند و همچنین بیوپسی بیضه که از مشکلات مطالعه مردان نابارور می‌باشد (۶۳). به علاوه این موارد می‌توانند به عنوان بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده ناباروری مردان مفید باشند. در اوایل سال ۱۹۹۴ به منظور تشخیص موفقیت آمیز بودن وازکتومی، ارزیابی بیان پروتامین (Prm) در مایع سمینال (Seminal)، به عنوان مارکری در اسپرم بالغ استفاده شد (۴۱ و ۶۴). پروتامین‌ها نقش مهمی در تراکم کروماتین اسپرم و حفظ ژنوم پدری در مقابل آسیب DNA دارند. ناکافی بودن هاپلوئیدی پروتامین ۱ و ۲ باعث تراکم نامناسب کروماتینی در اسپرم و مرگ زاده های موش می‌شود (۸، ۶۵ و ۶۶). در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است نسبت رونوشت های پروتامین ۱ به

اسپرم در آنالیز مولکولی وضعیت اسپرماتوژنز و درمان ناباروری نیز با اهمیت می باشد و مورد مطالعه قرار گرفته است، بخصوص در مورد بیماران آروسپرمی غیر انسدادی که یکی از علت های ناباروری مردان می باشد و به دلیل اختلال در مسیر اسپرماتوژنز ایجاد می شود (۷۸). مطالعات نشان داده اند که در این بیماران بیان ژن ها در مسیر تولید اسپرم نیز دچار تغییر می شوند (۷۹-۸۲). امروزه معمول ترین روش برای ارزیابی وضعیت اسپرماتوژنز در این افراد انجام جراحی بیوپسی بیضه است که عملی تهاجمی می باشد و به عنوان ابزار مطالعه ناباروری در مرحله آخر توصیه می شود. اما به علت اسپرماتوژنز ناحیه ای در بافت بیضه که بیوپسی از آن گرفته شده است، ممکن است اسپرمی یافت نشود و نیاز به چندین بار گرفتن بیوپسی از بیمار جهت پیدا کردن اسپرم و استخراج آن باشد که این امر خود می تواند باعث آتروفی بافت یا عفونت شود، بنابراین با استفاده از محتوای RNA اسپرم و همچنین سلول های جنسی پیش ساز اسپرم، می توان حوادث مولکولی اسپرماتوژنز را ارزیابی کرد (۷، ۷۴، ۷۹، ۸۱، ۸۳ - ۸۵).

کاربرد کلینیکی RNA اسپرم و سلول های ژرمینال بسیار ارزشمند است زیرا چنانچه RNA اسپرم بتواند اطلاعات مشابهی در اختیار بگذارد، نمونه مایع منی گرفته شده به صورت غیر تهاجمی یک انتخاب بهتر و قابل قبول تر برای بیمار در مقابل بیوپسی می باشد. در ابتدا تعیین وضعیت اسپرماتوژنز به روش مولکولی با استفاده از ژن هایی که بیان اختصاصی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز دارند، در بافت بیضه انجام شد (۸۵ و ۸۶). در مطالعه ای از نویسندگان همین مقاله در سال ۲۰۱۱ گزارش شده که از مارکرهای مولکولی مایع سمینال به عنوان روش تشخیصی غیر تهاجمی جهت ارزیابی وضعیت اسپرماتوژنز در افراد آروسپرمی غیر انسدادی استفاده شده است (۸۷). در این مطالعه بیان ژن های ویژه سلول های جنسی DAZ، PRM2 و AKAP4 توسط RT-PCR انجام شد، سپس به این نتیجه رسیدند که وجود رونوشت ژن های DAZ و پروتامین ۲ در

سمینال نرمال بودند توسط تکنیک ریزآرایه مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه مطالعه تفاوت زیادی را در ترکیب رونوشت های اسپرمی مردان بارور و نابارور نشان داد که اهمیت قابل ملاحظه ای در تشخیص، درمان و مشاوره افراد نابارور دارد (۶۹). در این مطالعه در اسپرم افراد نابارور، ۱۳۶ و ۳ ژن به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند که این ژن ها تعدادی از پروتئین های ریبوزومی و فاکتورهای دخیل در اسپرماتوژنز را تولید می کنند. در مطالعه ای پروفایل رونوشت های اسپرم ۱۳ مرد بارور دارای یک فرزند با پروفایل RNA اسپرم ۸ مرد تراتوزوسپرمیک مقایسه شد. گروه تراتوزوسپرمیک بعضی از رونوشت ها را نداشتند که مربوط به مسیر یابی کوئیتین و اواخر اسپرماتوژنز (PLCZ1)، پروتئین های آکروزوم (SPAM1، ACRV1) و اجزای غیر توبولینی دم اسپرم (ODF1-4) بودند. این تحقیق نشان داد که مردان تراتوزوسپرمیک دارای نقص مراحل آخر اسپرماتوژنز (post - meiotic) هستند (۳۱ و ۷۴). در مطالعه ای نیز پروفایل بیان ژن ها در اسپرم بالغ ۴ مرد سیگاری با ۴ مرد غیر سیگاری مقایسه شد که ۷۸۱ ژن از جمله ژن های مسیر NFκB، بیان متفاوتی در اسپرم مردان سیگاری و غیر سیگاری داشتند (۷۵). از این رو می توان به این نکته اشاره کرد که رونوشت های اسپرمی مارکرهای مفیدی در سلول های ژرمینال مواجه شده با عوامل جهش زا هستند و بنابراین بررسی رونوشت های اسپرم با استفاده از تکنیک میکروآرای (Microarray) به جستجوی مارکرهای ناباروری مردان کمک می کند (۳۱). برای حصول این امر علاوه بر صحت و تکرار پذیری داده های این روش، طراحی مطالعه ای جامع با تعداد زیادی نمونه های بیولوژیکی لازم و ضروری است. همچنین استفاده از سلول های اسپرمی عاری از سلول های حلقوی ژرمینال و سلول های سوماتیک الزامی می باشد. از این رو، اگر ژن هایی که به عنوان مارکرهای اسپرم توسط میکروآرای شناسایی می شوند، نقش و عملکرد آنها در پاتوژنز مردان نابارور مشخص شود، می توان از تکنیک ریزآرایه به عنوان ابزار تشخیصی و کلینیکال استفاده کرد. استفاده از رونوشت های

تفاوت های اسپرم تمایز یافته از سلول های بنیادی و اسپرم طبیعی ضروری به نظر می رسد. بررسی حضور RNAs در اسپرم های تمایز یافته از سلول های بنیادی و اسپرم طبیعی و نقش آنها در اسپرماتوژنز *In vitro* می تواند از مطالعات پیشنهادی در آینده باشد.

منابع

1. Miller D, Brinkworth M, and Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 2010. 139(2): 287-301.
2. Pessot C.A, et al. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 1989. 158(1): 272-278.
3. Lalancette C, et al. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *Journal of molecular medicine*, 2009. 87(7): 735-748.
4. Ostermeier G.C, et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *The Lancet*, 2002. 360(9335): 772-777.
5. Lambard S, et al. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Molecular human reproduction*, 2004. 7(10): 535-541.
6. Dadoune J, et al. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 2005. 11(2): 133-140.
7. Kumar G, Patel D, and Naz R. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cellular & molecular biology research*, 1993. 39(2):111.
8. Aslani F, Modarresi M.H, Akhondi M.M, Shabani A, Arabi M, Sadeghi M R. Assessment of presence of testis specific-transcripts in human mature sperm. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2007. 4: 1-2.
9. Yan N, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 2007. 134(1): 73-79.

مایع سمینال افراد آروسپرمی غیر انسدادی می تواند به عنوان یک مارکر مولکولی غیر تهاجمی جهت پیش بینی وجود یا عدم وجود اسپرم یا اسپرماتید بالغ استفاده شود. در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است از miRNAs موجود در مایع سمینال جهت بررسی وضعیت اسپرماتوژنز در مردان آروسپرمی غیر انسدادی و بررسی پروفایل این رونوشت ها در مردان نابارور استفاده شده است (۴۹، ۸۸ و ۸۹).

بحث و نتیجه گیری

همانطور که گفته شد هرچند که اسپرم بالغ از نظر رونویسی خاموش است ولی حاوی مجموعه ای از رونوشت ها mRNA و non-coding RNAs می باشد که نقش ویژه ای در اوایل رشد رویان به صورت فراژنومیکی و اثرات اپی ژنتیکی دارند (پارا موتاسیون). نتایج جدید حاصل از تکنیک ریزآرایه به شناخت رونوشت های جدید در اسپرم و مارکرهای بالینی ناباروری مردان منجر شده است و نیز به نظر می رسد بررسی پروفایل بیانی RNA در اسپرم به شناسایی فاکتورهای اسپرمی مورد نیاز در رشد اولیه رویان کمک می کند. اگر چه مقدار RNA اسپرمی ناچیز است ولی پتانسیل بالقوه ای در تحقیق و تشخیص کلینیکال ناباروری مردان دارد و از جمله رونوشت هایی که به طور اختصاصی در سلول های ژرمینال بیان می شوند و در اسپرم بالغ حضور دارند، مارکر های مولکولی مناسبی برای تشخیص رده های سلولی در مسیر اسپرماتوژنز هستند که می توانند نمایی کلی از وضعیت اسپرماتوژنز در بیضه فرد نابارور به جای عمل تهاجمی بیوپسی بیضه ارائه نمایند. از دیگر مطالعات آینده نگر، تبدیل کردن سلول های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells (ES) و یا بالغین (Adult Stem Cells) و یا سلول های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cell (IPS) به سلول های ژرمینال می تواند سرآغاز بسیار با ارزشی برای حل مشکل ناباروری در افرادی باشد که نقص در آنها مربوط به عدم وجود سلول های بنیادی در بیضه است. استفاده از مدل های حیوانی و همچنین بررسی مشابهت ها و

21. Miller D, and Ostermeier G.C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human reproduction update*, 2006. 12(6): 757.
22. Steger K, et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction*, 2008. 23(1):11-16.
23. Garrido N, et al. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertility and sterility*, 2009. 91(4): 1307-1310.
24. Montjean D, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2012: 1-8.
25. Behnam B, et al. Expression of Tsga10 sperm tail protein in embryogenesis and neural development: from cilium to cell division. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006. 344(4): 1102-1110.
26. Arabi M.S, Soltanghorae H, Akhondi M.M, Modarressi M.H. The expression of Testis Specific Gene 10 (TSGA10) in testicular tissue of Non-obstructive Azoospermic men. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2007. 4: 1-2.
27. Song G.J, et al. Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with nonobstructive azoospermia: usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. *Fertility and sterility*, 2000. 73(6): 1104-1108.
28. Aslani F, et al. Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2011. 1-7.
29. Wang C, et al. Altered Profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility. *Clinical chemistry*, 2011. 57(12):1722-1731.
10. Ostermeier G.C, et al. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *Journal of andrology*, 2005. 26(1): 70.-74.
11. Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertility and Sterility*, 2012. 97(2): 275-281.
12. Savad S, et al. Expression Analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in Breast Cancer in Iran. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 2012. 13(3): 873.
13. Ostermeier, G. and S. Krawetz, Spermatozoal RNA as a surrogate marker of paternal exposure. *Surrogate Tissue Analysis: Genomic Proteomic and Metabolic Profiling of Surrogate Tissues*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2006: 77-90.
14. Sutovsky P, and Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *International review of cytology*, 1999. 195: 1-65.
15. Hackstein J.H.P, Hochstenbach R, and Pearson P.L. Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends in Genetics*, 2000. 16(12): 565-572.
16. Ostermeier G.C, et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 2004. 429(6988):154-154.
17. Ziyat A, and Lefèvre A. Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. *Human Reproduction*, 2001. 16(7):1449-1456.
18. Miller D, Ostermeier G.C, and Krawetz S.A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in molecular medicine*, 2005. 11(4): 156-163.
19. Carrell D.T, and Hammoud S.S. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Molecular human reproduction*, 2010. 16(1): 37-47.
20. Rassoulzadegan M. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006. 441(7092): 469-474.

RNAs in Mature Spermatozoa

***Mohammad Hossein Modarressi**, MD, PhD, Associate Professor of Human Genetics and Biotechnology, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding Author). modaresi@sina.tums.ac.ir

Maryam Eghbali, MSc., Human Genetics, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. eghbalim@razi.tums.ac.ir

Abstract

The nucleus of mature sperm contains a complex population of transcripts such as mRNAs and miRNAs which expressed and accumulated during process of spermatogenesis; however in spermatozoa, transcription is inert. The spermatozoa do not have cytoplasmic ribosomal compounds and translation apparatus. However, spermatozoa can translate cytoplasmic mRNAs de novo, using mitochondrial polysomes. Important roles of spermatozoa RNAs include chromatin repackaging, paternal genomic imprinting and gene silencing. Recent information of transferred spermatozoa RNAs into oocytes during fertilization and RNA-mediated epigenetic effect contribute extra genomically to early embryonic growth.

Furthermore, regardless of the biological roles of spermatozoal RNA and embryonic growth, the differences in profile expression of spermatozoa RNAs from fertile and infertile men, provide potential spermatozoa markers in assessment male fertility and infertility. In this review, presence of RNAs in mature sperm, diversity and functions of gene transcripts in male fertility and embryonic development are discussed.

Keywords: Spermatozoa, Coding and non-coding RNAs, Roles of spermatozoa RNAs.