ریبو نوکلئیک اسیدها (RNAs) در اسپرم بالغ

*دکترمحمد 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 دریافت: ۹۱/۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۶

چکیده

هسته اسپرم بالغ علی رغم عدم رونویسی، دارای جمعیت پیچیده ای از ریبونوکلئیک اسید (RNA=RiboNucleic Acid) از قبیل mRNAs mature RNAs وmiRNAs micro RNAs می باشد که درطی مسیر اسپرماتوژنز (Spermatogenesis) رونویسی و تجمع یافته‌اند. اسپرم بالغ فاقد ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی و سیستم ترجمه می باشد، در حالی که mRNAs سیتوپلاسمیک توسط پلی زوم‌های میتوکندریایی ترجمه می شوند. رونوشت‌های اسپرمی نقش مهمی در سازماندهی کروماتین، نقش گذاری ژنومیک Genomic پدری و خاموش کردن ژن‌ها دارند. اخیراً انتقال RNA اسپرمی به سلول‌های 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 بالقوه‌ای را به عنوان مارکرهای اسپرمی در ارزیابی باروری و ناباروری مردان فراهم می کند. در این مقاله مروری به حضور RNA در اسپرم بالغ، انواع و نقش‌های بالقوه آن‌ها در باروری مردان و رشد تخمک بارور شده پرداخته می شود.

کلیدواژه‌ها: 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 می‌دهد، 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 می‌دهد. اسپرم بالغ، سلولی کاملا تمایز یافته است که در فرایند اسپرماتوژنز ایجاد می شود. تولید اسپرم در پستانداران شامل سه مرحله تمایزی می‌باشد. ۱. میتوز در سلول های اسپرماتوگونی (سلول های بنیادی بالغ) ۲. میوز یا اسپرماتوژنزو ۳. اسپرمیوژنز (فرایند 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 می‌شود اما در مسیراسپرمیوژنز برای متراکم شدن کروماتین هاپلوئیدی (Haploid) در اسپرم بالغ، پروتامین ها جایگزین اکثرهیستون‌ها می‌شوند (۱).

اسپرم بالغ درمسیر اسپرماتوژنز 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 بیشترمحتوای سیتوپلاسمی، فاقد مولفه های اصلی ریبوزوم های سیتوپلاسمی (RRNA 18s،rRNA 28s) و 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 پراکنده‌ای دارند (۲). این دو یافته اخیر نشان‌دهنده عدم وجود ریبوزوم های فعال در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

اسپرم است و از طرفی دیگر، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سنتز پروتئین در اسپرم بالغ منحصر به میتوکندری می باشد (۳). همانطور که گفته شد اسپرم از نظر رونویسی و ترجمه غیر فعال است، اما منشا رونوشت های موجود در هسته اسپرم بالغ مربوط به مراحل مختلف اسپرماتوژنز و قبل از آن می باشد و این رونوشت‌های انباشته شده در اسپرم برگرفته از مراحل پیشین اسپرماتوژنز می باشند. 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 می باشد (۴). رونوشت های موجود درهسته اسپرم بالغ شامل دو نوع اصلی کدکننده و غیر کدکننده پروتئین هستند که در این مقاله مروری به اهمیت حضور این رونوشت ها در اسپرم بالغ و عملکرد آن‌ها پرداخته می شود.

رونوشت های اسپرمی

رونوشت های کدکننده دراسپرم بالغ(Coding RNAs در اسپرم بالغ):

تعداد رونوشت های موجود در اسپرم بالغ نسبت به اووسیت به طور قابل ملاحظه ای پایین تر است. کل محتوای رونوشت ها در اسپرم موش صحرایی ۱۰۰fg femtogram و در انسان ۴۰۰-۱۰ fg می‌باشد (۵-۷). برای جداسازی و خالص سازی اسپرم، با استفاده از روش های شناورسازی اسپرم یا سانتریفیوژ شیب چگالی، سلول های جنسی حلقوی و سلول های سوماتیک حذف می شوند تا از اختصاصی بودن رونوشت های اسپرم اطمینان حاصل شود (۸). همچنین با بیان ژن های ویژه سلول های سوماتیک مانند CD45 و E-Cadherin اختصاصی بودن رونوشت های اسپرم را تایید کرده‌اند (۹). با استفاده از تکنیک های آنالیز سریالی بیان ژن serial gene expression analysis of (SAGE) و آنالیز ریزآرایه (Microarray) نشان داده اند 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 انسان شناسایی شد C-myc بود و پس از آن با روش‌های RT-PCR و هیبریداسیون درجا inSitu hybridization (ISH) تعدادی رونوشت‌های اختصاصی اسپرم در انسان شناسایی شدند، از جمله پروتامین ها، گیرنده‌های پروژسترون، گیرنده های استروژن، CYCLINBI، STAT4، DAZL و SRY ونیز SYCP3 و TSGA10 هستند (۱۴-۱۶). تعدادی از مطالعات هیبریداسیون درجا موقعیت رونوشت های 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 رونوشت ها، عملکردهای متفاوتی را برای RNA اسپرم پیشنهاد می‌کند (۵،۱۰،۱۱،۱۴و۱۷).

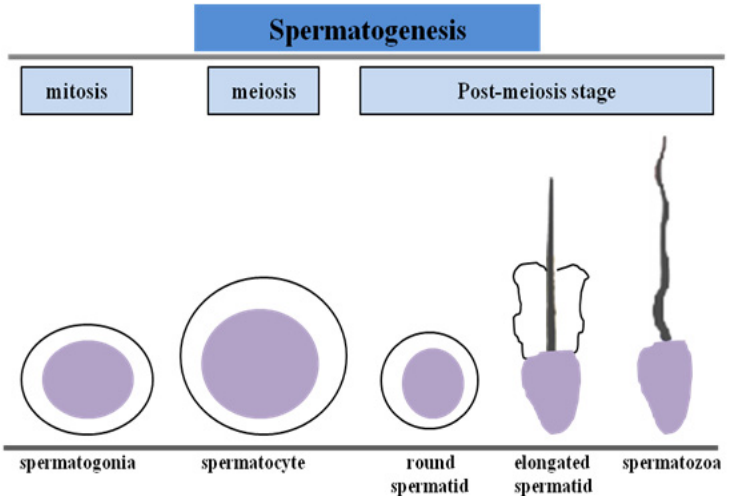
رونوشت های غیرکدکننده در اسپرم بالغ (Non-coding RNAs در اسپرم بالغ):

علاوه بر mRNA یا RNAs coding، رونوشت‌های دیگری به نام رونوشت های کوچک (miRNA) نیز در اسپرم شناسایی شده است که کد کننده پروتئین نمی‌باشند و با اتصال به mRNA مانع فرآیند ترجمه و باعث تنظیم بیان ژن در سطح بعد از رونویسی (Post-transcription) می شوند. miRNAs در مراحل مختلف اسپرماتوژنز حضور دارند و بیشترین بیان را در سلول‌های پاکیتن اسپرماتوسیت و همچنین اسپرماتید دارند (۱۸و۱۹). 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

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 (Tripsin x3) and GGT1 (gamma-glutamyltransferase 1	در اسپرم افراد نابارور، ۱۳۶ و ۳ ژن به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند	گاریدو۲۰۰۹
کاهش بیان	PRM2 (Protamin2) DDX4 (DEAD- box polypeptide) TSGA10 (Testis specific, 10)	کاهش بیان ژن های اختصاصی اسپرماتوژنز 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 تراتوزوسپرمیک در مقایسه با افراد نرمال برخی از رونوشت ها رابیان 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 ، اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز را نشان می دهد. در طی مراحل اسپرماتوژنز مخصوصاً قبل از میوز و اوایل میوز بیشترین مقداربیان ژن وجود دارد و رونوشت های حاصل در اسپرم بالغ تجمعی از این رونوشت ها می باشد.

استفاده از تکنیک ریزآرایه 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 اخیرا در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ انجام شده است، نشان داده‌اند که miRNAs نقش مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز مناسب سلول‌های جنسی در مسیر اسپرماتوژنز دارند (۲۲-۲۴).

از دیگر رونوشت های غیر کدکننده در مسیر اسپرماتوژنز PIWI intracting 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). رونوشت‌های piRNA به صورت اختصاصی در اسپرماتوسیت و اسپرماتید حلقوی بیان می شوند و نقش مهمی در مهار رتروترنسپوزون‌ها در اسپرماتوژنز و تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی درهنگام میوز و بعد از میوز دارند (۱۲و۲۲-۲۸).

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 اسپرمیوژنز 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 اسپرماتوژنز، استفاده از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

مهارکننده های آنها باعث اختلال مسیر اسپرماتوژنز و جلوگیری از بارداری (contraception) می‌شود (۳۰و۳۱). مطالعات اخیر نشان داده اند که تعدادی از miRNAs به ویژه Mirn322 و Mirn323 نقش آنکوژنی در تومورهای بافت بیضه دارندکه 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 (۳۲و۳۳). 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 روش‌های جدید جلوگیری از بارداری و روش‌های ژن درمانی در مردان نابارور و سرطان سلول‌های ژرمینال کمک می کند.

نقش miRNAs در اوایل رشد رویان

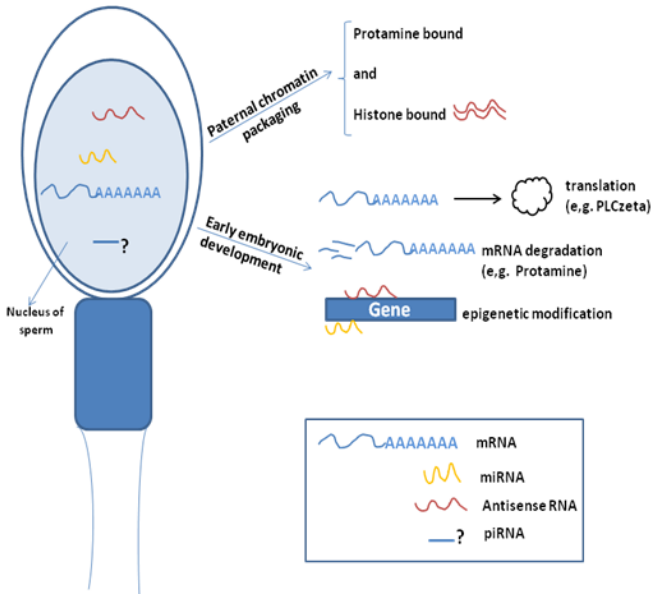
Small RNAs در توالی های همولوگ خود می‌توانند تغییرات اپی ژنتیکی و methylation متیله شدن DNA را هدایت (Direct) کنند و از این طریق مانع رونویسی (Transcription) و منجر به خاموش شدن ژن ها (gene silencing) شوند که فرایندی شناخته شده از نقش‌گذاری (imprinting) ژن ها می باشد (۳۵و۳۶). شناسایی miRNAs در اسپرم 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 می‌توان 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 رونوشت‌ها، آنتی سنس رونوشت ژن IGF-2R در اسپرم انسان می باشد (۲۱). در موش ژن مادری 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 می‌دهد (۳۸). miRNA دیگری که در اسپرم انسانی شناسایی شده است آنتی سنس ژن DKK2 است که این ژن مسیر پیام رسانی WNT را مهار می‌کند (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 می‌گردد 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 رونوشت‌های 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 می‌شود 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]



شکل ۲- این شکل از روی شکل اصلی ساخته شده است. عملکرد های پیشنهادی رونوشت ها در اسپرم بالغ: جمعیت رونوشت های اسپرمی شامل رونوشت‌های کدکننده و غیر کدکننده پروتئین می باشند و به نظر می رسد دارای عملکرد های احتمالی زیر می باشند. بسته بندی کروماتین پدری: بخش اعظم کروماتین هسته اسپرم توسط پروتامین‌ها و بخش کوچکی از ژنوم نیز توسط نوکلئوزوم های هیستونی بسته بندی می‌شوند، این بخش‌ها توسط رونوشت‌های پدری علامتگذاری می‌شوند. 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 می‌کنند (imprinting) (۷۰).

اسپرم و میتوکندری‌ها در تخمک تخریب می‌شوند (۴۳و۴۴). علاوه بر ژنوم قسمت هایی از اسپرم حفظ می شوند که برای رشد سلول تخم مورد نیاز می باشند از جمله رونوشت های اسپرم، سانتریول، فاکتورهای رونویسی و مولکول های پیام رسان مانند STAT4 (۴۵-۴۷).

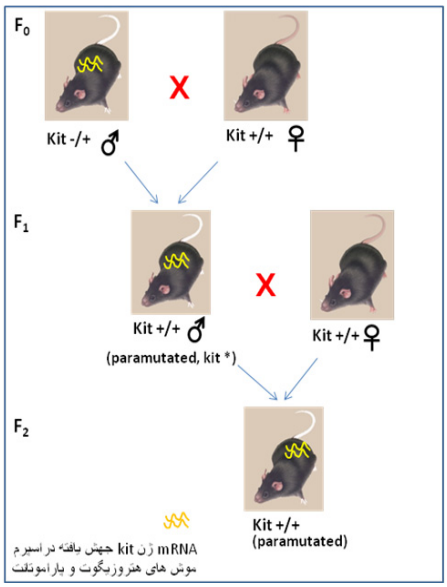
انتقال رونوشت های موجود در هسته و سیتوپلاسم اطراف اسپرم به اووسیت در ایجاد تخمک بارور شده موثر می باشند (۴۸). در یک مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR وجود ۶ رونوشت را در اسپرم بالغ انسانی نشان داده در حالی که در اووسیت شناسایی نشده اند (۸ و ۴۹). این رونوشت ها شامل Clusterin، AKAP4 (A-kinase anchoring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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

(۱۵ - ۵٪) توسط هیستون ها بسته بندی می‌شوند (۵۵). نوکلئو هیستون ها ی 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 نوکلئوهیستون ها پیشنهاد می کند. رونوشت های آنتی سنس اسپرم با نقش گذاری ژنوم، مانع بسته بندی DNA توسط پروتامین‌ها و سپس بسته بندی آن توسط هیستون‌ها می شوند. گفته شده است که هیستون‌ها 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 ازimge google 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 اسپرماتوگونیا 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 پا ها 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.

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 توالی‌ها با mRNA جداشده 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 می‌تواند 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 فرضیه‌ای رونوشت های اسپرم، بیان تعدادی از ژن‌ها 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 اپی‌ژنتیکی رونوشت های اسپرم در ژنوم زیگوت اشاره می کند، به این ترتیب که رونوشت‌های 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 موش‌های هتروزیگوت دارای موتاسیون ژن Kit، پروتئین kit را تولید نمی‌کنند 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 رونوشت‌های RNA non- polyadenylated غیر پلی آدنیله در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

موش‌های هتروزیگوت می باشد. 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 می برند(۶۲). این آزمایشات تغییرات اپی ژنتیکی وابسته به RNA را شرح می دهد و از طرفی فرضیه انتقال RNA اسپرمی به اووسیت و نقش آن ها دراوایل رشد رویان از طریق تغییرات اپی ژنتیکی را حمایت می‌کند (۱۵).

رونوشت های اسپرمی به عنوان بیو مارکرهای باروری ونابارووری مردان

اسپرم بالغ حاوی رونوشت های مراحل قبلی اسپرماتوژنز می باشد که این رونوشت ها تصویری از اسپرماتوژنز در بیضه را نشان می دهند و زمینه‌های جدیدی در تحقیق باروری و ناباروری مردان ایجاد می کنند (۴۰و۴۱). 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 می باشد (۶۳). به علاوه این مواردمی توانند به عنوان بیومارکرهای پیش بینی کننده 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(۴۱و۶۴). پروتامین ها 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 و۶۶). در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است نسبت رونوشت های پروتامین ۱ به 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 بیمارانی با اسپرم‌هایی که اختلال در حرکت (Asthenozoo-spermia) دارند، نسبت به مردان بارور کاهش یافته است (۶۸). بنابراین رونوشت های پروتامین ۱و ۲ در شکل گیری اسپرمی فعال نقشی مهم دارند و احتمالا 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 ژن هایی که در افراد الیگواسپرم کاهش بیان داشته اند، ژن TSGA10 می‌باشد (۷۳). ژن TSGA10 بیان ویژه ای در بافت بیضه دارد و از اجزای ساختاری دم اسپرم می باشد و علاوه بر این از روزهای اول دوره رویانی در رویان نیز بیان می شود. لذا علاوه بر نقش این ژن در ساختار اسپرم، به دلیل وجود بیان در دوره رویانی و کاهش بیان در افراد الیگواسپرم می توان به نقش این ژن در ناباروری ها 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 داشته اند. ژن‌هایی که بیان کاهش یافته ای داشتند در اسپرماتوژنز، حرکت اسپرم و فرایندهای ضد آپوپتوز (PRM2, SPZ-1, SPATA-4,MEA-1, CREM) نقش دارند. علاوه بر این رونوشت ژن هایی که در مسیر تعمیر DNA (NIPBL) و استرس اکسیداتیو (PARK7) فعال هستند، مقدار کاهش یافته ای را نشان دادند (۷۳).

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

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 ژن‌ها تعدادی از پروتئین های ریبوزومی و فاکتورهای دخیل در اسپرماتوژنز را تولید می‌کنند.

در مطالعه‌ای 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(۳۱و۷۴).

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 هستندو بنابراین بررسی رونوشت‌های اسپرم با استفاده از تکنیک میکروآری (Microarray) به جستجوی مارکرهای ناباروری مردان کمک می کند(۳۱). برای حصول این امر علاوه بر صحت و تکرار پذیری داده‌های 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 ماکرهای اسپرم توسط میکروآری شناسایی می شوند، نقش و عملکرد آنها در پاتوژنز مردان نابارور مشخص شود، می‌توان از تکنیک ریزآرایه به عنوان ابزار تشخیصی و کلینیکال استفاده کرد. استفاده از رونوشت‌های اسپرم در آنالیز مولکولی وضعیت اسپرماتوژنز و درمان ناباروری نیز با اهمیت می باشد و مورد مطالعه قرار گرفته است، بخصوص در مورد بیماران آزوسپرمی غیر انسدادی که یکی از علت های ناباروری مردان می باشد و به دلیل اختلال در مسیر اسپرماتوژنز ایجاد می‌شود (۷۸). مطالعات نشان داده اند که در این بیماران بیان ژن ها در مسیر تولید اسپرم نیز دچار تغییر می‌شوند (۷۹-۸۲). امروزه معمول ترین روش برای ارزیابی وضعیت اسپرماتوژنز در این افراد انجام جراحی بیوپسی بیضه است که عملی تهاجمی می‌باشد و به عنوان ابزار مطالعه ناباروری در مرحله آخر توصیه می شود. اما به علت اسپرماتوژنز ناحیه‌ای 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 می‌تواند 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 سلول‌های 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 ژن‌هایی که بیان اختصاصی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز دارند ، در بافت بیضه انجام شد (۸۵و۸۶). 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 آزوسپرمی غیر انسدادی استفاده شده است (۸۷). در این مطالعه بیان ژن های ویژه سلول‌های جنسی DAZ، PRM2 و AKAP4 توسط RT-PCR انجام شد، سپس به این نتیجه رسیدند که وجود رونوشت ژن‌های DAZ و پروتامین ۲ در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

مـایع سـمینال افـراد آزوسـپرمی غیـر انسـدادی می‌تواند به عنوان یک مارکر مولکولی غیر تهاجمی جهت پیش بینی وجود یـا عـدم وجـود اسـپرم یـا اسپرماتید بالغ استفاده شود. در مطالعاتی که اخیراً انجـام شـده اسـت از miRNAs موجـود در مـایع سـمینال جهـت بررسـی وضـعیت اسـپرماتوژنز در مردان آزوسپرمی غیر انسدادی و بررسـی پروفایـل این رونوشت هـا در مـردان نابـارور اسـتفاده شـده است (۴۹، ۸۸ و ۸۹).

بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که گفته شد هرچند که اسـپرم بـالغ از نظر رونویسی خاموش است ولی حاوی مجموعه‌ای از رونوشـــت هـــا mRNAs و RNAs non-coding می‌باشد که نقش ویژه ای در اوایل رشد رویـان بـه صورت فراژنومیکی و اثرات اپی ژنتیکی دارند (پـارا موتاسیون). نتایج جدید حاصل از تکنیک ریزآرایه بـه شـناخت رونوشـت هـای جدیـد در اسـپرم و مارکرهای بالینی ناباروری مردان منجر شده اسـت و نیز به نظر می رسد بررسی پروفایل بیـانی RNA در اسپرم به شناسایی فاکتورهـای اسـپرمی مـورد نیاز در رشد اولیه رویان کمک می کنـد. اگـر چـه مقدار RNA اسپرمی نـاچیز اسـت ولـی پتانسـیل بالقوه ای در تحقیق و تشخیص کلینیکال ناباروری مردان دارد و از جمله رونوشت هایی کـه بـه طـور اختصاصی در سلول های ژرمینال بیان می شوند و در اسپرم بالغ حضور دارند، مـارکر هـای مولکـولی مناسـبی بـرای تشـخیص رده هـای سـلولی در مسیراسپرماتوژنز هستند که می توانند نمایی کلـی از وضعیت اسپرماتوژنز در بیضه فرد نابارور به جای عمل تهاجمی بیوپسی بیضه ارائه نماینـد. از دیگـر مطالعات آینـده نگـر، تبـدیل کـردن سـلول هـای بنیادی جنینی Embryonic stem cells (ES) و یا بـالغین (Adult Stem Cells) و یـا سـلول‌هـای بنیادی پرتوان القایی Induced pluripotent stem cell (IPS) به سلول های ژرمینال می‌تواند سرآغاز بسیار بـا ارزشـی بـرای حـل مشـکل نابـاروری در افرادی باشد که نقـص در آن‌هـا مربـوط بـه عـدم وجود سلول های بنیادی در بیضه است. استفاده از مدل های حیوانی و همچنین بررسی مشابهت ها و تفاوت های اسپرم تمایز یافته از سلول‌های بنیادی و اسپرم طبیعی ضروری به نظر می رسد. بررسـی حضـور RNAs در اسـپرم‌هـای تمـایز یافتـه از سلول‌های بنیادی و اسپرم طبیعی و نقش آنهـا در اســپرماتوژنز Invitro مـــی‌توانـــد از مطالعـــات 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

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. Ziyyat 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.

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 oligo-zoospermia. 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, Soltanghoraee 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]

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 imprintingand 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-20]