نقش آکروزین در تولید مثل

کریم نیرنیا (Ph.D)[1]،ابراهیم ادهم (Ph.D)[2]،رحمان شمس الدین(Ph.D)[3]،ولفگانگ انگل (Ph.D) [4]
۱- دانشیار گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا، تهران، ایران
۲- دانشیار انستیتو ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گوتینگن، گوتینگن، آلمان
۳- استادیار انستیتو ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گوتینگن، گوتینگن، آلمان
۴- استاد انستیتوژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گوتینگن، گوتینگن، آلمان

چکیده

آکروزین پروتئازی است که بصورت غیر فعال پروآکروزین در آکروزوم اسپرم واقع می باشد. وظیفه این آنزیم شناسایی و هضم زونا پلوسیدا می باشد. اخیراً نیز وظیفه دیگری برای آکروزین در واکنش آکروزومی در نظر گرفته شده است. جهت بررسی وظیفه این پروتئین در باروری بوسیله تکنیک هدفگیری ژنی، موشهایی تولید شدند که فاقد این پروتئین می باشند. ابتدا در سلولهای بنیادی جنینی (ESC) یکی از آلل های آکروزین از کار انداخته شد. بوسیله این سلولها موشهای کایمر تولید شدند و بعد از جفت گیری این موشها با موشهای معمولی سلولهای جنسی که ژن آکروزین در آنها مختل شده بود را به نسل بعد انتقال دادند. از جفتگیری موشهای هتروزیگوت موشهای هموزیگوت تولید گشتند ومطالعات بعدی روی این موشها انجام پذیرفت. موشهایی که در اسپرمشان فاقد آکروزین بودند بطور طبیعی بارور بوده و هیچگونه تفاوتی با موشهای طبیعی نشان نمی دادند اما در لقاح خارج رحمی (IVF) اسپرمهایی که فاقد آکروزین بودند تخمک را با تاخیر بارور می نمودند. این معرف نقش اکروزین در سرعت لقاح تخمک بود. سوال طرح شده بعدی این که آیا این تاخیر می تواند نقشی در باروری و ناباروی داشته باشد. با سخت نمودن زوناپلوسیدا بوسیله DMSO مشاهده شد اسپرمهایی که فاقد آکروزین هستند درصد کمتری از تخمکها را بارور می نمایند. همچنین افزایش نگهداری در محیط آزمایشگاه، میزان باروری کمتری بوسیله اسپرمهایی که فاقد اکروزین انجام می شود را موجب می شود. این نتایج نشان می دهد که نبود آکروزین همراه با عواملی دیگر می تواند نقشی در ناباروری مرکب که عوامل زنانه و مردانه در آن دخیل هستند را داشته باشد.

گل واژگان: آکروزین، هدفگیری ژنی، باروری و ناباروری، واکنش آکروزومی
آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، انتهای بلوار ، پژوهشکده ابن‌سینا، ص- پ۱۷۷-۱۹۸۳۵

www.SID.ir

مقدمه

در آکروزوم اسپرم پروتئین های متعددی وجود دارد که برای برخورد اسپرم با تخمک و ورود اسپرم به داخل تخمک‌حائزاهمیت‌می باشند.اکثراین پروتئین ها آنزیم های هیدرولیتیک بوده که خاصیت هضم کنندگی دارند. یکی از این آنزیم ها سرین پروتئازی است که آکروزین (EC 3.4.21.10) نام گرفته است. در تمامی پستانداران آکروزین شامل سه قسمت زیموژن، قسمت کاتالیتیک و قسمت انتهایی می باشد (۱). قسمت انتهای آمینی (زیموژن) و قسمت کاتالیتیک در پستانداران مختلف دارای شباهت نسبی بوده و دارای توالی های اختصاصی خانواده سرین پروتئازها می باشند. قسمت انتهای کربوکسیلی (قسمت انتهایی) از لحاظ پرولین غنی بوده و دارای شباهت چندانی در پستانداران مختلف نمی باشد. این قسمت مختص آکروزین بوده و در پروتئازهای دیگر یافت نمی گردد.

آکروزین در ابتدا بصورت غیر فعال پروآکروزین تولید گردیده و در هنگام واکنش آکروزمی و آزاد شدن این آنزیم، با شکسته شدن قسمت ابتدایی آن به شکل فعال خود، آکروزین تبدیل می گردد.

برای آکروزین تا بحال چند نقش در رابطه با لقاح فرض گردیده است. از آنجا که آکروزین یک آنزیم است. یکی از نقشهای آکروزین هضم زوناپلوسیدا می باشد (۲). از دیگر نقشهای اکروزین اتصال اختصاصی اسپرم به زوناپلوسیدا می باشد (۲).

تا کنون چند سیستم آزمایشگاهی جهت بررسی نقش آکروزین در فرآیند لقاح راه اندازی شده است (۳) یکی از این سیستم ها ایجاد موش هایی است که فاقد آکروزین باشند. در این موشها که بوسیله تکنیک هدف گیری ژنی یا نوترکیبی همگون تولید می شود ژن خاصی را بطور اختصاصی از کار انداخته (٤) و با از کار انداختن آن از سنتز پروتئین مربوطه جلوگیری می نمایند. سپس با انجام آزمایشهایی در روی موشهای فاقد پروتئین فوق نقش آن پروتئین مورد بررسی قرار میگیرد.

در تحقیقات ارائه شده در این مقاله ژن آکروزین موش بوسیله هدف گیری ژنی از کار انداخته شده و نقش آکروزین در باروری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

۱- ساخت ژن نوترکیب

قطعه ای از cDNA آکروزین موش جهت جداسازی قطعات ژنومیکی مورد استفاده قرار گرفت. کلون کاسمیدی حاوی ژن آکروزین موش انتخاب و پس از هضم بوسیله آنزیمهای EcoRI/KpnI قطعه ای از ژن در وکتور بلواسکریپت کلون گردید. با استفاده از این، ژن نوترکیبی حاوی نئومایسین و تیمیدین کیناز ساخته شد (شکل۱A) . در این ژن نوترکیب قسمتهایی از اکسون ٥ ژن آکروزین با ژن نئومایسین مورد تعویض قرار گرفته است. این ژن نوترکیب بوسیله آنزیم NotI خطی شده و برای وارد کردن در سلولهای بنیادی[1] مورد استفاده قرار گرفت.

۲- کشت سلولهای بنیادی جنینی (ES) و تولید موشهای کایمر (Chimer)

دودمان سلولهای بنیادی جنینیR1 بعد از کشت برای وارد نمودن ژن نوترکیب PA مورد استفاده قرار گرفت (٤). مقداری از این سلولها پس از تریپسینه کردن با ٥٠ میکروگرم از ژن نوترکیب PA مخلوط شده و بوسیله الکتروپوراسیون در شرایط ۲٥٠V و٥٠٠F به داخل سلولهای ES وارد گردید. سلولها در یک محیط غیر انتخابی بر روی لایه ای از سلولها فیبروبلاست مقاوم در برابر G418 کشت داده شدند. بعد از کشت محلول حاوی G418 به مقدار ۳٥٠µg/ml و گانسی کلویر به مقدار ۲µg/ml به سلولها اضافه شده و سلولهایی مقاوم که در

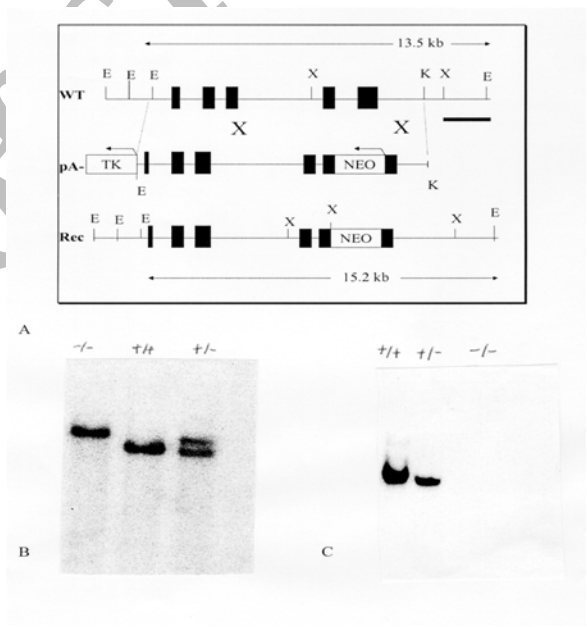
1- Embryonic Stem Cell:ES

Archive of SID
www.SID.ir

برابـر G418 و حـاوی ژن نوترکیـب بطـور همگـون مورد انتخاب قرار گرفتند.

بـرای بررسـی بهتر این سلولها، بعد از تخلیص DNA، این DNA با آنزیم EcoRI مورد هضم قرار گرفت و پس از الکتروفورز بـر روی غشای نیتروسلولز منتقل شدند. ایـن بلات با قطعه ای از DNA آکروزین نشاندار بوسیله 32P (شـکل ۱A) جفت (hybrid) شدند و پس از گذاشتن فـیلم بـر روی این غشاء و ظاهر نمودن آن سلولهایی که دارای ژن نوترکیـب بصورت همگون بودند دارای دوباند و بقیه دارای یک باند بودند (شکل ۱B).

از ایـن سـلولها پس از تزریق به بلاستوسیست جهت



شکل ۱- ساخت ژن همجوش نوترکیب (A) برای وارد نمودن در بلاستوسیسـت هـا.در شـکل (B) سـاترن بـلات DNA موشـهای طبیعـی (+/+)، هـتروزیگوت (-/+) و هموزیگوت (-/-) نشـان داده شده است. شکل (C) نشانگر این مطلب اسـت کـه ترانسـکرپیت آکروزیـن در بیضـه موشـهای هموزیگـوت (-/-) وجود ندارد و این ترانسکرپیت در بیضه موشهای هتروزیگوت (-/+) تقلیل یافته است.

تولید موشهای کایمر استفاده شد. موشهای کایمر بعد از جفـت گـیری بـا موشـهای معمولـی برای تولید موشهای هـتروزیگوت و موشـهای هـتروزیگوت بـرای تولـید موشهای هموزیگوت مورد استفاده قرار گرفتند موشهای فاقد آکروزین در هر دو آلل -/-PRR نام گرفتند.

۳- آنالیز RNA(Northern Blot)

بـرای تخلـیص RNA از کیـت RNA NOW (ITC Biotechnology) استفاده شد. RNA تخلـیص شـده از بیضـه موشـهای هموزیگـوت پـس از جداسـازی در ژل آگـارز حاوی فرمالدئید بر روی غشاء نـایلون منتقل شدند. این غشا برای هیبریدیزاسیون بایک قطعه cDNA نشاندار شده آکروزین مورد استفاده قرار گرفت.

٤- تست باروری

پـنج مـوش مذکـر که فاقد آکروزین بودند با ٥ موش مـاده معمولـی جفت زده شـدند بعـد از حاملگـی و تولد نـوزادان، تعـداد موشها مورد شمارش قرارگرفتند. برای لقـاح خـارج رحمـی (IVF) از موشـهای فـاقد آکروزیـن اسـتفاده شـد پـس از جداسـازی اسـپرم از ناحـیه دم (cauda) اپی دیدیـم اسـپرمها در محیط آزمایشگاهی در تخمکهـای معمولـی قرارگرفتـند. لقـاح پـس از زمانهـای مشـخص با شستن تخمکها در محلول M16 متوقف شده و حضـور پـیش هسـته هـای پـدری و مـادری (PN) ٦ ساعت بعد از توقف لقاح مورد بررسی قرار میگرفت روز بعد نیز تعداد دوسلولی ها مورد شمارش قرار می گرفت.

٥- سخت نمودن لایه زوناپلوسیدا

بـرای سـخت نمودن زوناپلوسیدا، سلولهای تخمک به مـدت ۳۰ دقـیقه در معـرض DMSO[1] بـه غلظـت هـای ۰/٦، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ مـولار قرار گرفتند. این تخمکها سپس برای لقاح خارج رحمی مورد استفاده قرار گرفتند. برخی از تخمکهـا نـیز بـه مدتهـای متفاوت بعد از تزریق HCG

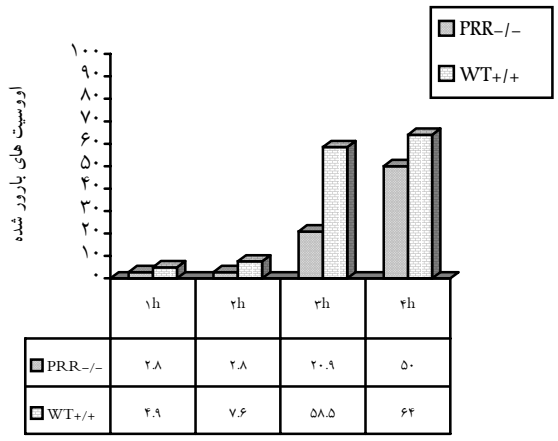
1- Dimethyl Sulfoxide

Archive of SID
www.SID.ir

کشت داده شدند و سپس برای لقاح خارج رحمی مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

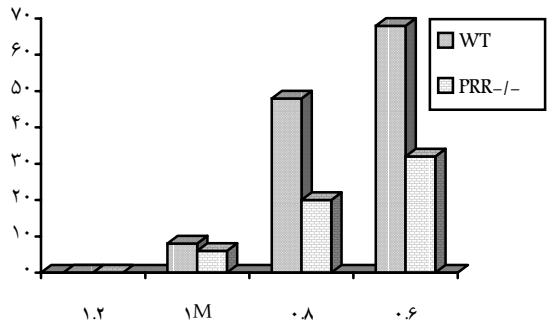
در تحقیق حاضر ژن آکروزین موش بوسیله روش هدفگیری ژنی از کار انداخته شد و وظیفه آکروزین در باروری در این موشها مورد مطالعه قرار گرفت. DNA تخلیص شده از یک بانک ژنومیک موش 129/Sv جهت



	۱h	۲h	۳h	۴h
PRR-/-	۲.۸	۲.۸	۲۰.۹	۵۰
WT+/+	۴.۹	۷.۶	۵۸.۵	۶۴

شکل ۲- تاخیر اسپرمهایی که فاقد آکروزین می باشند (PRR-/-) در باروری تخمکها نسبت به اسپرمهای طبیعی (WT +/+).

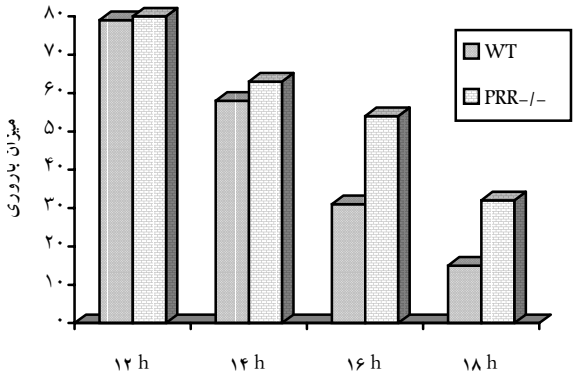
ساخت ژن همجوش مورد استفاده قرار گرفت، ابتدا ژن نئومایسین در اگزون ۵ جاگذاری شده و سپس ژن تیمیدین کیناز (TK) هرپس سیمپلکس در قسمت انتهای ′5 ژن همجوش قرار داده شد. این ژن همجوش (PA) جهت هدفگیری ژنی در سلولهای بنیادی جنینی (R1)بکار گرفته شد. اتصال هدفدار به داخل ژنوم بوسیله DNA قسمت انتهای ′3 در ساترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. در صورت هضم DNA بوسیله آنزیم EcoR1 ، لوکوس طبیعی ۱۳/۵ kb و لوکوس نوترکیب ۱۵/۲ kb می باشند (شکل 1B). سه کلون بطور نوترکیبی همگون، ژن همجوش در آنها متصل گردید. این کلونها برای تزریق در بلاستوسیست مورد استفاده قرار گرفت از این تزریق ۲ موش کایمر بدست آمد که هر دو ژن نوترکیب مورد نظر را به نسل بعد انتقال می دادند. از جفتگیری این دو موش با موشهای طبیعی موشهای هتروزیگوت تولید شدند (1B). از جفتگیری موشهای هتروزیگوت با هم، موشهای هموزیگوت تولید شدند. موشهای هتروزیگوت و هموزیگوت نر و ماده هیچگونه اختلالی را نشان نداده و بطور طبیعی بارور بودند. جهت بررسی بیان ژن آکروزین در بیضه موشهای هتروزیگوت و هموزیگوت ، از بیضه این موشها RNA کل تخلیص گردید و در نورترن بلات مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. در موشهای طبیعی (+/+) آکروزین بصورت عادی و در موشهای هتروزیگوت (+/-) بصورت کاهش یافته بیان می گردید. موشهای هموزیگوت (-/-) که ژن آکروزین در آنها از کار افتاده است، فاقد بیان ژن آکروزین در بیضه می باشند (شکل 1C). جهت بررسی دقیقتر بیان ژن آکروزین نتیجه حاصل از نورترن بلات در RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن آکروزین در موشهای هموزیگوت (-/-) مشاهده نگردید. این نتایج نشان می دهد که موشهای هموزیگوت فاقد mRNA برای آکروزین می باشند.



شکل ۳- اثر DMSO بر روی زوناپلوسیدا بر میزان باروری اسپرمهایی که فاقد آکروزین می باشند (PRR-/-) در مقایسه با اسپرمهای طبیعی (WT)

www.SID.ir

در بررسی قسمت باروری، تمامی این موشها بارور بوده و هیچگونه اختلالی را نشان نمی دادند. بدین جهت برای بررسی دقیق تر اسپرم موشهای حاصل از روش لقاح خارج رحمی (IVF) استفاده گردید. همانطور که شکل (۲) نشان می دهد اسپرم موشهای فاقد آکروزین (PRR-/-) ۳ ساعت پس از افزودن اسپرم بطور معنی داری تعداد کمتری از تخمکها را بارور می کنند.($P<۰/۰۵$) این تغییر پس از ٤ ساعت بسیار کمتر گردید. این نتایج نشان می دهد که اسپرمهای فاقد



شکل ۴- تاثیر کشت تخمکها و زیان شروع IVF بر روی باروری اسپرمهایی که فاقد آکروزین (-/-PRR) می باشند . در کنترل اسپرمهای طبیعی (WT) مورد استفاده قرار گرفته است.

آکروزین بطور آهسته تری تخمک را بارور می نمایند.

علاوه بر این پس از سخت شدن زوناپلوسیدا بوسیله DMSO اسپرمهای فاقد آکروزین تعداد کمتری از تخمکها را بارور می نمایند ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳). تخمکهایی که بیشتر در محیط آزمایشگاهی کشت داده شدند به میزان کمتری توسط اسپرمهای فاقد آکروزین بارور می شوند ($P<۰/۰۵$) (شکل ٤). بررسی بافت شناسی بیضه و مورفولوژیک اسپرم موشهای فاقد آکروزین نشانگر این مطلب است که بیضه و اسپرم این موشها تفاوتی نسبت به موشهای طبیعی نشان نمی دهند. نتایج مذکور نشان میدهد که آکروزین به تنهایی در باروری تخمک دارای نقش اساسی نمی باشد. البته این اسپرمها در لقاح خارج رحمی تاخیر نشان می دهند. اگر اسپرمهای دارای آکروزین با اسپرمهای فاقد آکروزین با یکدیگر مخلوط گردند و در لقاح خارج رحمی (IVF) بکارگرفته شوند، تنها اسپرمهای دارای آکروزین قادرند تخمک را بارور نمایند. این مطلب ناشی از تاخیری است که اسپرمهای فاقد آکروزین از خود نشان میدهند.در این حالت اسپرمهای طبیعی تخمک را بارور نموده و مانع بارور شدن تخمک بوسیله اسپرمهای فاقد آکروزین می گردند.

البته در انسان در برخی مطالعات در انسان نشان می دهد که کمبود آکروزین باعث ناباروری می گردد (۷-۵). در مواردی نیز کمبود آکروزین ناباروری ایجاد نمی کند. این مطلب نشانگر این است که کمبود آکروزین همراه با فاکتورهای دیگر می تواند ایجاد ناباروری نماید. بر اساس یافته های تحقیق حاضر سخت شدن زوناپلوسیدا همراه با کمبود آکروزین می تواند ایجاد ناباروری نسبی نماید. در انسان نیز برخی تخمکها که دارای زوناپلوسیدای سخت یا قطورتر از زونای معمولی می باشند، در لقاح خارج رحمی دارای میزان باروری کمتری می باشند (۱۰-۸). البته احتمال دارد که در غیاب آکروزین آنزیم های دیگری در آکروزوم نقش آنرا بر عهده گرفته ودرنتیجه تاثیری در باروری دیده نمی شود.

بر اساس این نتایج آکروزین همراه با فاکتورهای دیگر در باروری موثر بوده و کمبود یا اختلال عملکرد آن می تواند ایجاد ناباروری ترکیبی نماید.

تشکر و قدردانی

پروژه حاضر در انستیتو ژنتیک انسانی گوتینگن وابسته به دانشکده پزشکی شهر گوتینگن و با همکاری پژوهشکده ابن سینا انجام گرفته است. مخارج پروژه از طرف سازمان پژوهشهای آلمان بوسیله طرح ویژه شماره ۲۷۱ (SFB271) تامین گشته است.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Klemm U, Muller Esterl W, Engel W. Acrosin. the peculiar sperm-specific protease. Hum-Genet. 1991,87: 635-64.
2. Urch UA. Biochemistry and function of acrosin. In : Wasserman PM (ed.), Elements of Mammalian Fertilization. CRC Press. 1991, 234-48.
3. Bartoov B, Reichart M, Eltes F, Lederman H,Viedem P. Relation of human sperm acrosin activity and fertilization *in vitro*. Andrologia. 1994,26:9-15.
4. Joyner AL. Gene targeting : A practical approach. Oxford, New York, Tokyo. IRL Press.1996, pp:
5. Agarwal A, Loughlin KR. Measurement of acrosin activity in a group of patients with unexplained infertility. Prog Reprod Biol Med. 1992, 15:57-61.
6. Blackwell J, Kaminski JM, Bielfeld P, Mack SR, Zaneveld LJD. Human sperm acrosin: Further studies with clinical assay and activity in a group of presumably fertile men. J Androl. 1992, 13: 571-8.
7. Reichart M, Lederman H, Har-Even D, kedem P, Bartoov B. Human sperm acrosin activity with relation of semen parameters and acrosomal ultrastructure. Andrologia. 1993, 25:59-66.
8. Bertrand E, Van de Bergh M,Englert Y. Does zona pellucida tickness influence the fertilization rahte? Hum Reprod. 1995, 10:1189-93.
9. Familiari G, Nottola SA, Micara G, Aragoua C, Motta PM. Is the sperm binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure ? J i*n vitro* Fert Embryo Transfer. 1988, 5:134-43.
10. Nogues C, Ponsa M, Vidal F, Boala M,Egozcue J. Effects of aging on the zona pellucida surface of oocyte . J *in vitro* Fert Embryo Transfer. 1988, 5:225-9.

Archive of SID

www.SID.ir