بررسی حضور رونوشتهای اختصاصی بیضه در اسپرم بالغ انسان

فریال اصلانی (M.Sc.)[۱]، محمدمهدی آخوندی (Ph.D.)[۲]، محمدحسین مدرسی (M.D., Ph.D.)[۳]، اشرف شبانی (Ph.D.)[۱]، محمود اعرابی (M.D.)[۲]، محمدرضا صادقی (Ph.D.)[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

۳- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انجام صحیح و کامل روند اسپرماتوژنز مستلزم بیان تعداد بسیار زیادی ژن به صورت همزمان و یا با توالی خاص خود می‌باشد؛ به‌طوری که توقف یا اختلال در بیان هر یک از آنها ممکن است منجر به توقف یا اختلال در روند اسپرماتوژنز گردد. شناسایی این قبیل ژنها و ارزیابی عملکرد آنها اطلاعات ارزشمندی درباره نقش این ژنها در اسپرم بالغ، روند اسپرماتوژنز و نیز عملکرد بعدی آنها در فرآیند لقاح و تکوین جنین و نیز درک اساس مولکولی فرآیند لقاح و یافتن علل بسیاری از انواع ناباروری بدون علت، فراهم می‌کند. جهت بررسی مراحل مختلف روند اسپرماتوژنز می‌توان از ژن‌هایی استفاده کرد که در مرحله و ردهٔ سلولی خاصی از این روند بیان می‌شود. در مطالعه حاضر بیان ژن‌های PRM1، TSGA10، AKAP4 PRM2، DAZ SYCP3 در اسپرم طبیعی انسان بررسی شد.

روش بررسی: نمونه مایع منی افراد دارای پارامترهای اسپرمی طبیعی (مطابق استانداردهای WHO) مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، جمع‌آوری شد. اسپرم‌های متحرک با مرفولوژی طبیعی طی مراحل سانتریفوژ شیب غلظت با استفاده از گرادیان Pure Sperm® از نمونه‌های مایع منی افراد نرمواسپرم جدا گردید. بیان ژن SYCP3 با روش Nested RT-PCR و بیان ژن‌های DAZ، TSGA10 و PRM2، PRM1 و AKAP4 با روش RT-PCR بررسی و با توجه به بیان ژن‌های فوق در بیضه طبیعی از بافت بیضه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

نتایج: مطالعه روی cDNA حاصل از اسپرم‌های طبیعی نشان داد که ژن‌های TSGA10، DAZ، PRM2 و PRM1 در نمونه طبیعی بیضه (به‌عنوان کنترل) و در تمام نمونه‌های اسپرم تحت بررسی بیان می‌شوند. همچنین نتایج نشان داد که ژن‌های AKAP4 و SYCP3 در اسپرم بالغ بیان نمی‌شوند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که رونوشت ژن‌های TSGA10، PRM2، DAZ و PRM1 در اسپرم بالغ انسان حضور دارند. علت نگهداری انتخابی رونوشتها و عدم حضور رونوشت‌هایی مانند AKAP4 و SYCP3 در اسپرم بالغ نمایانگر انتقال گروهی از رونوشت‌های پدری به تخمک و نقش احتمالی آنها در مراحل بعدی عملکرد اسپرم می‌باشد. مطالعه و ردیابی این ژنها در مراحل اولیه تکوین جنین نتایج تازه‌ای از عملکرد این ژنها در فرآیند لقاح و تکوین جنین در اختیار قرار خواهد داد.

کلید واژگان: بیان ژن، ژنهای اختصاصی بیضه، اسپرماتوژنز، اسپرماتوزوآ.

مسئول مکاتبه: دکتر محمدرضا صادقی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۱۹۶۱۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Sadeghi@avicenna.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

زمینه و هدف

اسپرم بالغ سلولی کاملاً تخصصی و تمایز یافته است که تاکنون تصور بر این بود که تنها نقش انتقال ژنوم پدری به تخمک را بر عهده دارد. در واقع با جایگزینی هیستونها با پروتامین‌های کوچک غنی از اسیدهای آمینه آرژینین، لیزین و سیستئین بیان ژن در هسته اسپرم به تدریج در طول اسپرمیوژنز خاموش می‌شود و در نتیجه متراکم شدن ژنوم هاپلوئید تسهیل می‌گردد (۱).

امروزه با پیشرفت‌های شگرفی که در حوزه پزشکی مولکولی صورت گرفته است بررسی محتوای RNA اسپرماتیدهای در حال رشد با استفاده از تکنیک‌هایی که بیان تعداد زیادی از ژنها را به‌طور همزمان بررسی می‌کنند مانند Northern Blot و Microarray امکان‌پذیر شده است. بسیاری از این ژنها، ژن‌های اختصاصی بیضه هستند (SYCP3، DAZ، AKAP4، PRM2، PRM1، TSGA10)؛ ولی برخی از این رونوشتها، اختصاصی بافت بیضه نمی‌باشند و در سایر بافتها و سلولها نیز بیان می‌شوند (مانند β-actin)، علاوه بر این تعدادی از رونوشت‌های غیر اختصاصی بیضه با اندازه‌های غیرمعمول از سایر بافتها و یا واریانت‌هایی با طول و عملکرد متفاوت[1] از ژن‌های سوماتیکی در بافت بیضه یافت می‌شوند (۲). مطالعه این رونوشتها در شناسایی مولکولی مراحل اسپرماتوژنز، لقاح تخمک و مراحل اولیه تکوین جنین و نیز ارتباط ژنها با فنوتیپ ناباروری مردان و نیز استفاده از آن در روش‌های تشخیصی، اهمیت دارد (۳).

شواهد جدید وجود ترجمه برخی از این رونوشت‌های موجود در اسپرم را به تناسب نیاز اسپرم بالغ تأیید می‌کنند (٤). با این وجود اسپرم بالغ حاوی مقادیر کافی RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S (و بنابراین کمپلکس ریبوزومی ۸۰S) نمی‌باشد تا فرآیند ترجمه را مشابه سایر سلولها انجام دهد. به نظر می‌رسد محتوای RNA ریبوزومی در طول بالغ شدن اسپرم شکسته و حذف می‌شود و مقادیری از mRNA به‌صورت انتخابی نگهداری می‌شود (۵).

Hecht و Williams برای اولین بار حضور قطعی سنتز RNA در هسته اسپرم را نشان دادند (٦). حضور RNA در داخل هسته اسپرم بالغ با روش هیبریداسیون در محل[2] توسط Pessot مجدداً گزارش شد (۷). Kumar و همکاران حضور mRNA ژن C-MYC را در اسپرم انسان در ناحیه میانی و دم اسپرم نشان دادند (۸). Miller و همکاران شواهدی مبنی بر حضور چندین mRNA شامل HSP90، B-actin، HSP70 در اسپرم خالص (عاری از هرگونه آلودگی با سایر سلولها از جمله لوکوسیتها و سلول‌های اپیتلیال) را گزارش کردند (۹). Wykes و همکاران با استفاده از روش هیبریداسیون در محل حضور RNA در اطراف هسته سلول را مشخص کردند (۱۰).

ارزیابی اطلاعات با استفاده از Microarray نشان داده است که اسپرم بالغ انسان حدود ۵۰۰۰ نوع mRNA دارد که این تعداد در بین نمونه‌های مختلف ۱۰٪ تفاوت دارد (۱۱). بسیاری از شواهد بر این نکته تاکید دارد که شاید انتقال این محتوای RNA به اووسیت به اندازه انتقال ژنوم هاپلوئید اهمیت داشته باشد و امروزه شواهدی مبنی بر انتقال برخی صفات پدری به فرزند از طریق همین رونوشت‌های موجود در اسپرم وجود دارد (۱۲). چنانچه این رونوشتها که قبلاً تصور می‌شد تنها بقایای روند اسپرماتوژنز هستند، در تمایز اولیه جنین نقش داشته باشند، این یافته‌ها می‌تواند در پیشبرد تکنولوژی انتقال هسته سلول سوماتیکی در کلونینگ و همچنین شناسایی عوامل موثر در ایجاد ناباروری مفید باشند (۱۳).

1- Alternative splicing

2- In Situ Hybridization

Archive of SID
www.SID.ir

حضور RNA در اسپرم و در حقیقت وجود بیان ژن در این سلولها از بیش از ۳۰ سال قبل موضوع بحث بوده است. علاقه به این موضوع در ۵ سال اخیر به‌دلیل گسترش فن‌آوری‌های مولکولی مدرن و نیاز به ابداع روش‌های غیرتهاجمی برای مطالعه و بررسی عملکرد بیضه، مجدداً افزایش یافته است (۱٤). چنانچه اسپرم بتواند اطلاعات ارزنده‌ای از رویدادهای مولکولی داخل بیضه در اختیار بگذارد، در آن صورت نمونه مایع منی حاصل از یک روش غیرتهاجمی برای ارزیابی روند اسپرماتوژنز در بیضه انتخابی بهتر و قابل قبول‌تر از بیوپسی خواهد بود. در واقع یکی از موارد اولیه استفاده RNA اسپرماتوزومی استفاده از آن به‌عنوان یک مارکر مولکولی حساس و کاربردی جهت تعیین موفقیت وازکتومی در انسان بوده است. برای تعیین عدم وجود اسپرم در مایع منی، حضور مارکر مولکولی اختصاصی اسپرم مانند PRM-2 توصیه شده است (۱۵).

نظریه‌های متعددی درباره علت نگهداری برخی رونوشتها در گامت نر وجود دارد. در طی روند اسپرماتوژنز پلهای سیتوپلاسمی که اسپرماتیدهای در حال تمایز را به یکدیگر متصل می‌کند، امکان تبادل محصولات ژنی در این سلولها را فراهم می‌کند. برخی از اسپرماتوسیتها و اسپرماتیدها ممکن است فاقد رونوشت‌های ضروری مورد نیاز برای تکمیل فرآیندهای اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز باشند. این سلولها می‌توانند رونوشت‌های مورد نیاز را از طریق سلول‌های مجاور تأمین کنند و روند اسپرماتوژنز را تکمیل نمایند. می‌توان گفت که این تبادل ژنی تولید اسپرم طبیعی را افزایش می‌دهد (۱٦). سایر نظریه‌ها بر خلاف این فرضیه هستند و نقش RNA برای خود اسپرم (احتمالاً نقش ساختاری) که متفاوت از نقش عملکردی RNA در سنتز پروتئین است و یا نقش ناشناخته RNA پس از انتقال به تخمک را عنوان می‌کنند. شواهد موجود تأییدکننده آن است که علاوه بر سانتروزوم تعدادی از رونوشت‌های اسپرم در زمان لقاح به تخمک منتقل می‌شوند. زیرا بعد از لقاح تعدادی از این رونوشتها را در تخمک‌های بارور شده شناسایی کرده‌اند (۱۳،۱۱). گزارش Rassoulzadegan و همکاران نشان داد که انتقال RNA اسپرم به تخمک، در نتیجه یک رویداد مستقل از منشاء سانتروزومی، صورت می‌گیرد (۱۷).

از طرف دیگر با توجه به طیف گسترده علل ناباروری در مردان انجام تحقیقات سیستماتیک در مورد شناسایی علل آن بسیار دشوار است. با فرض اینکه RNA اسپرم تصویری کلی از پتانسیل اسپرماتوژنیک بیضه را مشخص می‌کند، می‌توان از این منبع برای تحقیقات ناباروری مردان استفاده کرد (۱۸).

در مطالعه حاضر بیان ژن‌های PRM2، PRM1، TSGA10، DAZ (۱۹) AKAP4، SYCP3 برای اولین بار در اسپرم بالغ انسان بررسی شد که هر یک از این ژنها دارای نقش‌های اختصاصی در روند اسپرماتوژنز و بیضه می‌باشند؛ زیرا روند طبیعی اسپرماتوژنز ناشی از بیان متناسب گروهی از ژن‌های اختصاصی در سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌باشد که برخی از آنها در تمامی مراحل و برخی در مراحل خاصی از روند اسپرماتوژنز بیان می‌شوند. نتیجه فعالیت گروهی از این ژنها جفت شدن کروموزوم‌های هومولوگ، سیناپس و نوترکیبی و به‌دنبال آن جدا شدن کروماتیدهای خواهری ضروری می‌باشد که انجام صحیح این فرآیندها به کمک ساختارهای ویژه پروتئینی به نام پروتئین کمپلکس سیناپتونمال (SC)[1] تنظیم می‌شود (۲۰).

در پستانداران پروتئین‌های SC شامل سه گروه SCP1، SCP2 و SCP3 هستند که به نام SYCP3 خوانده می‌شوند. بیان SYCP3 منحصراً در رده بلوغی سلول‌های ژرمینال بیضه (در مرحله اسپرماتوسیت)

1- Synaptonemal Complex

Archive of SID
www.SID.ir

انجام می‌گیرد. فقدان این ژن سبب اختلال در اسپرماتوژنز و باروری فرد می‌شود (۲۱). ژن‌های DAZ گروهی از ژن‌های مستقر روی کروموزوم Y را تشکیل می‌دهند که در افراد مبتلا به آزواسپرمی حذف‌های متعددی در این نواحی دیده می‌شود. حداکثر تجمع رونوشت‌های ژن DAZ در اسپرماتوسیت‌های اولیه گزارش شده که بیانگر آغاز رونویسی در مرحله اسپرماتوگونی می‌باشد (۲۲،۲۳). A-Kinase Anchor Protein-4 (AKP4) فراوانترین پروتئین موجود در Fibrous sheat (ساختار اسکلت سلولی موجود در ناحیه ابتدایی تاژک اسپرم) می‌باشد و تنها در مراحل بعد از میوز بیان می‌شود. در غیاب AKAP4 انتقال پیام و فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک ارتباط خود را با Fibrous sheat از دست داده و در نتیجه حرکت اسپرم مختل می‌شود (۲٤). Testis Specific Gene Antigen (TSGA10) در رویان، بیضه و بسیاری از انواع تومورهای سرطانی بیان می‌شود. شواهدی مبنی بر دخالت TSGA10 در تقسیم سلولی وجود دارد (۲۵). پروتئین TSGA10 در ناحیه Fibrous sheat دم اسپرم شناسایی شده است. علاوه بر این بیان این ژن در مراحل تمایز در جنین موش گزارش شده است (۲٦). با توجه به نقش گسترده این ژنها در روند اسپرماتوژنز، ارزیابی وجود یا عدم وجود آنها در اسپرم بالغ اطلاعات ارزشمندی از عملکرد اسپرم و نقش mRNA آن در انجام این عملکرد در اختیار قرار خواهد داد.

روش بررسی

افرادی که جهت انجام اسپرموگرام و درمان ناباروری به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا مراجعه کرده بودند و علت ناباروری در آنها ناشی از عامل زنانه بود، پس از اعلام رضایت برای شرکت در مطالعه، انتخاب شدند. نمونه اضافی مایع منی ۵ فرد دارای پارامترهای اسپرمی طبیعی (مطابق استانداردهای WHO)، پس از انجام اسپرموگرام تشخیصی آنها جمع‌آوری شد. اسپرم‌های متحرک دارای مورفولوژی طبیعی با استفاده از Pure Sperm® (Nidacon, Sweden) طی مراحل سانتریفوژ شیب غلظت به‌صورت خالص از نمونه‌های مایع منی جدا سازی گردید. برای این منظور با افزودن محیط کشت Ham's F-10 (Sigma, USA) غلظت‌های ٤۰٪ و ۸۰٪ Pure Sperm تهیه گردید. سپس در یک لوله سانتریفوژ ابتدا ۲ *ml* از غلظت ۸۰٪ و روی آن ۲*ml* از غلظت ٤۰٪ Pure Sperm اضافه شد. افزودن لایه‌ها به گونه‌ای انجام شد که دو لایه با هم مخلوط نشود. سپس روی آن ۲*ml* مایع منی اضافه و به مدت ۲۰*min* با دور ۳۰۰*g* سانتریفوژ شد. پس از آن اسپرم‌های رسوب کرده از لایه ۸۰٪ با دقت و بدون مخلوط شدن با سایر لایه‌ها جدا گردید. پس از شستشوی اسپرمها با محیط کشت به آن حدود ۰/۷*ml* از محلول RNA-Bee (Tel-Test Inc., USA) اضافه و برای استخراج RNA در ازت مایع (۱۹٦ ℃-) به آزمایشگاه مولکولی منتقل گردید. نمونه بیوپسی بیضه طبیعی حاوی تمام رده‌های اسپرماتوژنی به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج RNA: RNA نمونه‌های اسپرم و بیضه با استفاده از RNA-Bee (Tel-Test Inc., USA) و طبق روش فنول- کلروفرم استخراج گردید (۲۷). نمونه‌های RNA تا زمان انجام آزمایش در ۷۰ ℃- نگهداری شد. کیفیت RNA استخراج شده با تعیین نسبت A_{260}/A_{280} ارزیابی گردید (۲> >۱/۷).

انجام RT-PCR: ابتدا ۱*µl* از Total RNA حاوی ۱۵۰*µg* RNA به مدت ۷ دقیقه در دمای ٦۵ ℃ قرار گرفت تا اتصالات دو رشته‌ای RNA شکسته شوند. سپس به همراه 5X Reaction Buffer، ۲*µl* (Fermentase, EU) (10*mM*)dNTP ۲*µl*، (Roche, Germany) Random hexamer (20*M*) (Roche, Germany) و ۱*µl* از آنزیم M-MuLV RT (200*U/µl*)

Archive of SID
www.SID.ir

(Fermentase, EU)[1] به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ ℃ جهت سنتز cDNA و ۱۰ دقیقه در ۹۵ ℃ جهت غیر فعال شدن آنزیم قرار داده شد.

برای کنترل کیفیت مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA از ژن house keeping بتا اکتین[2] استفاده شد. سپس نمونه‌های حاوی رونوشت بتا اکتین به عنوان نمونه‌های مثبت برای انجام مراحل بعدی انتخاب شدند.

برای انجام کنترل و صحت شناسایی رونوشتها از هر جفت پرایمر یک عدد به گونه‌ای طراحی شد که بر روی دو اگزون مجاور قرار گیرد، در این حالت باند مورد انتظار برای RNA کوچکتر از باند احتمالی DNA ژنومیک خواهد بود (۲۸).

انجام PCR: نمونه cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شد (جدول۱)، با استفاده از بانک ژنی و BLAST (جدول ۱)، مربوط به ژن SYCP3 در واکنش PCR تکثیر شده و سپس متعاقب آن واکنش دوم PCR با استفاده از محصول PCR اول و پرایمرهای اختصاصی Nested انجام گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های PRM1، PRM2، TSGA10، AKAP4 و DAZ و واکنش PCR یک مرحله‌ای انجام گرفت.

واکنش PCR با استفاده از cDNA نمونه‌های اسپرم طبیعی به‌صورت جداگانه، ۲/۵μl 10X PCR buffer (Roche Germany)، ۱/۵μl ($MgCl_2$ (۲۵mM/l)، ۱μl dNTP (۱۰mM)، ۱μl پرایمر (۱۰pM)، ۰/۲ آنزیم Taq polymerase (Roche, Germany) (۵$U/\mu l$) و ۱۶/۸μl DDW[3]، انجام گرفت. نمونه‌های cDNA ابتدا در ۹۴ ℃ به مدت ۵ دقیقه به‌صورت تک رشته در آمد و پرایمرها در مدت ۳۰ ثانیه در دمای T_a به DNA متصل شدند و به مدت ۳۰ ثانیه در هر سیکل و ۷ دقیقه در سیکل نهایی طویل سازی[4] انجام گرفت.

انجام PCR در روی ژل آگارز (Agarose LE, Roche, Germany) ۲٪ به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۹۵ تحت الکتروفورز قرار گرفت و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و سپس تحت تابش اشعه UV محل باندهای جداسازی شده آشکار شد.

جهت کنترل کیفی باندهای به‌دست آمده، پس از استخراج از ژل و انتقال به پلاسمید PGM5ZF در باکتری JM109، کلون و پس از تخلیص پلاسمید تعیین توالی باند انجام و با توالی موجود در بانک ژنی تطبیق

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR نمونه‌های cDNA مایع منی افراد مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا

Target	Primer sequences	Band size	T_a(˚C)*
β-actin	F:5'-cgcgagaagatgacccagatcatg-3' R:5'-cacccacactgtgcccatctacgt-3'	155bp	62
DAZ	F:5'-gggtgttaccagaaggcaaa-3' R:5'-gctgctttggtagatacggttc-3'	106bp	60
AKAP4	F1:5'-agatgtctgatgatattgactgg-3' R1:5'-tgctgtcatttctagacgtagg-3'	542bp	57
SYCP3	F1:5'-tgcggtgtgtttcagtcagg-3' R1:5'-catattacttaggttcaagttc-3' F2:5'-aaatatggtgtcctccgga-3' R2:5'-tcttcaaagagtcatcag-3'	842bp	52
PRM1	F1: 5'-atggccaggtacagatgctgtcgcag-3' R1:5'-gtacctggggcggcagcacctcatgg-3'	132bp	62
PRM2	F1:5'-aggggtcacctagggactctctgc-3' R1:5'-gctgagcccggagcacgtcgaggtc-3'	184bp	62
TSGA10	F1:5'-gggtgttaccagaaggcaaa-3' R1:5'-gctgctttggtagatacggttc-3'	100bp	59

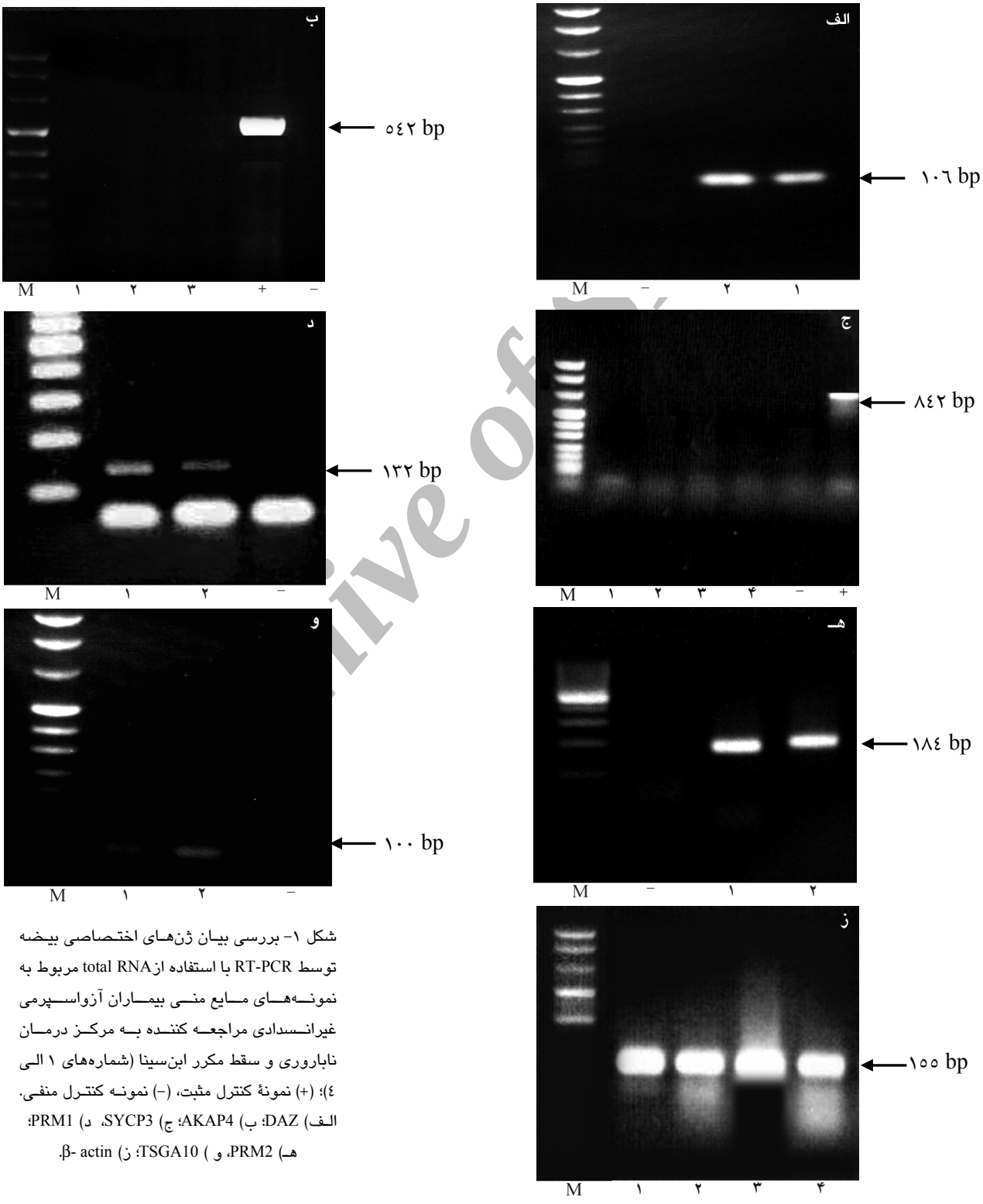
1- Mouse Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
2- β-actin
3- Double Distilled Water
4- Extension

Archive of SID
www.SID.ir

داده شد (۲۹،۳۰).

نتایج

نتـایج واکـنش PCR در نمونـه بافـت بیـضه طبیعـی بـه عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های فوق‌الذکر یـک بانـد در ناحیه ۱۵۵ نوکلئوتیدی مربوط به ژن β-actin، یـک بانـد در ناحیه ۸۴۲ نوکلئوتیدی مربوط بـه ژن SYCP3، یـک باند در ناحیه ۱۰۶ نوکلئوتیـدی مربـوط بـه ژن DAZ و



شکل ۱- بررسی بیـان ژن‌هـای اختـصاصی بیـضه توسط RT-PCR با استفاده ازtotal RNA مربوط به نمونـه‌هـای مـایع منـی بیمـاران آزواسـپرمی غیرانـسدادی مراجعـه کننـده بـه مرکـز درمـان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا (شماره‌های ۱ الـی ۴)؛ (+) نمونهٔ کنترل مثبت، (–) نمونـه کنتـرل منفـی. الـف) DAZ؛ ب) AKAP4؛ ج) SYCP3، د) PRM1؛ هـ) PRM2، و) TSGA10؛ ز) β- actin.

www.SID.ir

یک باند در ناحیه ۵۰۰ نوکلئوتیدی مربوط به ژن AKAP4 را نشان داد. باند مربوط به ژنPRM1 در ناحیه ۱۳۲bp و باند PRM2 در ناحیه ۱۸٤bp مشاهده شد. باند مربوط به ژن TSGA10 در ناحیه ۱۰۰bp مشاهده گردید.

ژن‌های TSGA10، PRM1، PRM2 و DAZ در نمونه‌های اسپرم بالغ و بافت بیضه بیان شدند. بیان ژن‌های AKAP4، SYCP3 در نمونه اسپرم بالغ دیده نشد؛ در حالیکه نمونه کنترل مثبت (بافت بیضه طبیعی) بیان ژن را نشان می‌دهد (شکل ۱).

نتایج کلونینگ و تعیین توالی نیز صحت توالی باند مشاهده شده را تایید کرد.

بحث

در گذشته تصور بر این بود که اسپرم بالغ از نظر رونویسی خاموش است؛ شواهد اخیر نشان می‌دهد که هسته اسپرم از آنچه تصور می‌شد عضو فعال‌تری می‌باشد. تحقیقات، حضور رونویسی فعال mRNA در اسپرم را تأیید می‌کنند (۱۹،۳۱). مطالعات نشان داده که هسته اسپرم حاوی بخش‌های نوکلئوپروتامینی و نوکلئوهیستونی می‌باشد. قسمت‌های نوکلئوهیستونی فشردگی کمتری داشته و حساس به نوکلئاز می‌باشند و احتمالاً در بیان ژن‌های مورد نیاز برای عملکرد اسپرم نقش ایفا می‌کنند (۳۲). امروزه می‌دانیم که بخشی از محتوای mRNA موجود در اسپرم بقایای ذخایر mRNA سنتز شده در مراحل انتهایی اسپرماتوژنز است که به اسپرم منتقل شده و بخش دیگر mRNA سنتز شده توسط سلول اسپرم می‌باشد (۱۰،۱۹،۳۳). سنتز mRNA اختصاصی در اسپرم بالغ با کروماتین متراکم شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی مکانیسم رونویسی در اسپرم و نحوه عملکرد این رونوشتها در این سلول و در مراحل لقاح و تکوین اولیه جنین نیازمند تحقیقات مولکولی دقیق می‌باشد. سلول اسپرم با وجود پروتامینه شدن DNA و متراکم شدن هسته جهت آماده‌سازی برای انتقال به تخمک، سنتز mRNA را به‌صورت فعال انجام می‌دهد. همچنین با توجه به اینکه در برخی تحقیقات اسپرم انسان به مدت بیش از ۱۷ روز در محیط مناسب خارج از بدن زنده نگهداری شده است (۳٤) و با توجه به نیمه عمر کوتاه mRNA و پروتئین‌های مورد نیاز جهت فعالیت‌های سلول، اسپرم بالغ باید توانایی تولید mRNA جدید و ترجمه این رونوشتها به پروتئین را داشته باشد.

Gur در سال ۲۰۰٦ ترجمه mRNA اسپرم توسط ریبوزوم‌های میتوکندریایی را گزارش کرد (٤). در سال ۲۰۰۸ توسط همین شخص نشان داده شد که اسپرم بالغ در مراحل پایانی بلوغ و قبل از انتقال به تخمک با استفاده از ذخایر mRNA خود پروتئین سنتز می‌کند. وی نشان داد که سنتز پروتئین با بکارگیری ریبوزوم‌های میتوکندریایی و بدون دخالت سیستم رونویسی سیتوپلاسمی، صورت می‌گیرد. این پروتئینها یا جایگزینی برای پروتئین‌های تجزیه شده هستند و یا پروتئینهایی هستند که در فرآیندهای لازم برای قدرت باروری اسپرم شامل ظرفیت پذیری، افزایش شدید حرکت و واکنش آکروزومی اسپرم مورد نیاز می‌باشند (۳۵).

اخیراً نشان داده شده که مقادیری از mRNA اسپرم در زمان لقاح به تخمک منتقل شده تا در فاصله زمانی قبل از فعال شدن ژنوم جنینی با استفاده از سیستم تولید پروتئین سلول تخم بتواند به پروتئین تبدیل شود (۳٦). به نظر می‌رسد که رونوشت‌های موجود در اسپرم که زمانی تصور می‌شد بقایای حاصل از مراحل انتهایی اسپرماتوژنز هستند به طور فعال توسط اسپرم بالغ تولید شده و برای رشد جنین در مراحل اولیه نقش حیاتی داشته باشند. این یافته‌ها در زمینه انتقال هسته سوماتیکی در تکنولوژی کلونینگ اهمیت زیادی دارند (۱۳).

Archive of SID
www.SID.ir

برخی گزارشها RNA اسپرم را به‌عنوان منبع مولکولی تحقیقات ناباروری معرفی کرده‌اند. طی سالیان گذشته RNA اسپرم به عنوان روش تشخیصی مناسب جهت ارزیابی موفقیت وازکتومی معرفی شده است.

حضور انواع رونوشتها در مراحل مشخصی از اسپرماتوژنز نمایانگر فعالیت خاص این رونوشتها و یا پروتئین حاصل از آنها در مقطع زمانی خاص می‌باشد. حضور رونوشت ژن‌های DAZ، PRM2، PRM1 و TSGA10 در اسپرم بالغ نمایانگر نقش فعال این رونوشتها یا پروتئین آنها در عملکرد طبیعی اسپرم و احتمالاً در فعالیت‌های بعدی اسپرم طی مراحل لقاح و تکوین جنین می‌باشد. در حالیکه برخی ژنها مانند AKAP4، SYCP3 که در مراحل ابتدایی اسپرماتوژنز، تقسیم میوز و شکل‌گیری فرم طبیعی اسپرم بالغ نقش دارند و بقایای رونوشت‌های آنها تجزیه شده و در اسپرم بالغ نیز بیان این ژنها وجود ندارد.

احتمال دیگری که حضور این گونه رونوشتها در اسپرم مطرح شده بیان فعال و انتخابی این ژنها در اسپرم بالغ می‌باشد؛ در حالیکه برخی محققین عقیده دارند که بیان ژن در اسپرم بالغ صورت نمی‌گیرد (۲،۵،۹،۳۷). از طرف دیگر تحقیقات اخیر با استفاده از نمونه‌های بیضه دارای توقف[1] در رده‌های مشخصی از اسپرماتوژنز مرحله بیان ژن‌های اختصاصی بیضه را تعیین کرده‌اند که ژن اختصاصی بافت بیضه از چه مرحله‌ای شروع به بیان کرده و در چه مرحله‌ای از اسپرماتوژنز بیان آن متوقف شده و عملکرد پروتئین حاصل از آن در چه مرحله‌ای بروز می‌کند. به‌عنوان مثال در مطالعه Arabiنشان داده شد که بیان ژن SYCP3 از مرحله اسپرماتوسیت اولیه آغاز و در مرحله اسپرماتید متوقف می‌شود (۲۱). بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه مبنی بر عدم حضور رونوشت‌های SYCP3 در اسپرم نشان‌دهنده عدم انتقال تمامی بقایای mRNA از اسپرماتید به اسپرم بوده و رونوشت‌های موجود در اسپرم بالغ به‌صورت فعال پس از مرحله اسپرمیوژنز تولید شده‌اند. چنانچه رونوشت مواردی در مراحل اولیه اسپرماتوژنز شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه حضور نداشته باشد، اما در اسپرم بالغ حضور آنها تأیید شود می‌توان نتیجه گرفت که این ژن به‌طور فعال در مراحل پایانی اسپرماتوژنز بیان شده است.

از طرف دیگر حضور رونوشت پروتامینها (۲و۱) در اسپرم بالغ که کروماتین آن متراکم شده است این سئوال را مطرح می‌کند که علت حضور آن چیست؟ آیا در مراحل اولیه لقاح نقش دارد؟ از طرفی در جنین نیز باید این پروتامینها از اطراف کروماتین اسپرم جدا شوند تا پیش‌هسته پدری تشکیل شود. دلیلی که می‌توان برای این حضور تصور نمود، تداوم پروتامینه شدن کروماتین اسپرم پس از بلوغ و رها شدن آن در لوله‌های سمینیفروس و مایع منی است؛ زیرا همانطور که قبلاً اشاره شد در اسپرم بالغ علاوه بر نواحی پروتامینه در کروماتین، نواحی هیستون‌دار نیز وجود دارند. احتمالاً این نواحی همان نواحی فعال برای نسخه‌برداری از DNA باشند که در صورت نیاز مکانیسم کنترل داخل سلول در مراحل مختلف این نواحی هیستون‌دار را با پروتامین جایگزین نمایند. تأیید این مطالب نیازمند انجام مطالعات روی کروماتین اسپرم می‌باشد. به‌طوریکه در مطالعه Wykes نشان داده شده که PRM1 و PRM2 در اسپرم به همان نسبتی است که در بیضه وجود دارد (PRM1<PRM2) (۳۸).

بنابراین به نظر می‌رسد که ژن‌های مختلف بر حسب نیاز سلول و به‌صورت انتخابی در مراحل مختلف بیان می‌شود و اسپرم بالغ نیز با بیان ژن‌های دخیل در بسته‌بندی و فشرده‌سازی و در نهایت آماده‌سازی

1- Arrest

Archive of SID
www.SID.ir

سلول جهت انتقال ژنوم پدری بـه تخمـک، نیـاز خـود را مرتفع می‌سازد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر برای اولـین بـار نـشان داده شـد کـه ژن‌های DAZ و TSGA10 نه تنها در بیضه طبیعی بلکه در اسپرم بالغ انسان نیز بیان می‌شوند؛ که این امر آنهـا را به مارکرهای مولکولی مناسب جهـت تعیـین حـضور اسـپرم و بررسـی وضـعیت اسـپرماتوژنز در مـردان نابارور، بـدون نیـاز بـه انجـام عمـل تهـاجمی بیوپـسی بیضه، تبدیل می‌کنـد. همچنـین بیـان ژن‌هـای PRM2 و PRM1 در اسپرم بالغ تأیید شد (۱۶).

بیان ژن‌های AKAP4، SYCP3 نیز برای اولـین بـار در اسپرم بالغ بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده بیان ایـن سـه ژن در نمونه بیوپسی بیضه طبیعی و عدم بیان آنهـا در اسپرم بالغ انسان می‌باشد. مطالعات قبل نشان داده بود که رونوشت ژن SYCP3 در مرحله اسپرماتوسیت اولیه حـضور دارد (۲۱)؛ امـا RNA ایـن ژن در اسـپرم بـالغ وجود نداشت. حذف ایـن رونوشـتها در مراحـل پایـانی احتمالاً به‌دلیل اتمام عملکرد این رونوشتها و عـدم نیـاز اسپرم بالغ به این رونوشـتها بـرای عملکردهـای بعـدی خود می‌باشد.

تحقیقات بیشتر روی RNA اسپرم بالغ روند رو به رشد استفاده از ابزارهـای دقیـق مولکـولی جهـت روش‌هـای تشخیصی را تسریع می‌کند. این امر منجر بـه آگـاهی از فرایند مولکولی لقاح در انسان و سایر پستانداران و نیز شناسـایی علـل مولکـولی بـسیاری از مـوارد نابـاروی خواهد گردید که امروزه برای ما ناشـناخته مـی‌باشـد و در رده ناباروریهـا بـا علـت نامـشخص تقـسیم‌بنـدی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه مدیر محتـرم مرکز فوق تخصصی درمـان نابـاروری و سـقط مکـرر ابن‌سینا، جناب آقای دکتر مدبری و کارشناسـان حـوزه پژوهش سرکار خانم سوادی شیرازی و سـرکار خـانم اصغری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. Hum Reprod Update. 2006;12(6):757-67.

2- Miller D. RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. Mol Hum Reprod. 1997;3(8):669-76.

3- Badawy SZ, Shue F, Chohan K, Hearn B. Varicoceles and sperm nuclear fragmentation? Fertil Steril. 2006;86 (4):1031.

4- Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. Genes Dev. 2006;20(4):411-6.

5- Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, et al. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. Gene. 1999;237(2):385-92.

6- Hecht NB, Williams JL. Synthesis of RNA by separated heads and tails from bovine spermatozoa. Biol Reprod. 1978;19(3):573-9.

7- Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha, II, Yanez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. Biochem Biophys Res Commun. 1989;158(1):272-8.

8- Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. Cell Mol Biol Res. 1993;39(2): 111-7.

9- Miller D, Tang PZ, Skinner C, Lilford R. Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. Hum Reprod. 1994;9(5):864-9.

10- Wykes SM, Miller D, Krawetz SA. Mammalian spermatozoal mRNAs: tools for the functional analysis of male gametes. J Submicrosc Cytol Pathol. 2000;32(1): 77-81.

11- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. Lancet. 2002;360(9335):772-7.

Archive of SID
www.SID.ir

the testis-specific gene, TSGA10, in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Leuk Res. 2006;30(7):883-9.

26- Behnam B, Modarressi MH, Conti V, Taylor KE, Puliti A, Wolfe J. Expression of Tsga10 sperm tail protein in embryogenesis and neural development: from cilium to cell division. Biochem Biophys Res Commun. 2006;344(4):1102-10.

27- Jane Christopher-Henningsa, , Matthew Dammena, Eric Nelsona, Raymond Rowlandb and Richard Oberstb Comparison of RNA extraction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from boar semen journal of virological methods. 2006;136(1-2):248-53.

28- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. Journal of andrology. 2005;26(1): 70-4.

29- Joseph Sambrook DWR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual CSHL Press 2001.

30- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids Res. 1991;19(5):1154.

31- Zhang H, Denhard LA, Zhou H, Liu LH, Lan ZJ. 0610009K11Rik, a testis-specific and germ cell nuclear receptor-interacting protein. Biochem Biophys Res Commun. 2008;366(4):898-904.

32- Galeraud-Denis I, Lambard S, Carreau S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. Asian J Androl. 2007;9 (5):587-92.

33- Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu ZY, et al. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. J Mol Med. 2004;82(5):317-24.

34- Akhondi MA, Chapple C, Moore HD. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures .Hum Reprod. 1997;12 (3):514-22.

35- Gur Y, Breitbart H. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. Mol Cell Endocrinol. 2008;282(1-2):45-55.

36- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. Theriogenology. 2007;68 Suppl 1:S147-55.

37- Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. Trends Mol Med. 2005;11(4):156-63.

38- Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 1997;3(1):15-9.

12- Miller D. Ensuring continuity of the paternal genome: potential roles for spermatozoal RNA in mammalian embryogenesis. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;65:373-89.

13- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Nature. 2004;429(6988): 154.

14- Miller D. Spermatozoal RNA as reservoir, marker and carrier of epigenetic information: implications for cloning. Reprod Domest Anim. 2007;42 Suppl 2:2-9.

15- Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? Gynecol Obstet Fertil. 2006;34(9):840-6.

16- Caldwell KA, Handel MA. Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(6):2407-11.

17- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. Nature. 2006;441(7092):469-74.

18- SA OGaK. Spermatozoal RNA as a surrogate marker of paternal exposure. Boca Raton: CRC press 2006.

19- 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(7):535-41.

20- Parra MT, Viera A, Gomez R, Page J, Benavente R, Santos JL, et al. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. J Cell Sci. 2004;117(Pt7): 1221-34.

21- Aarabi M, Modarressi MH, Soltanghoraee H, Behjati R, Amirjannati N, Akhondi MM. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. Fertil Steril. 2006;86(2):325-31.

22- Warchol JB, Augustyniak S, Stecewicz D, Jankowska A. Detection of DAZ mRNA distribution in human testis using reverse transcription in situ PCR technique (RT-ISPCR). Folia Histochem Cytobiol. 2001;39(2): 117-8.

23- Menke DB, Mutter GL, Page DC. Expression of DAZ, an azoospermia factor candidate, in human spermatogonia. Am J Hum Genet. 1997;60(1):237-41.

24- Huang Z, Somanath PR, Chakrabarti R, Eddy EM, Vijayaraghavan S. Changes in intracellular distribution and activity of protein phosphatase PP1gamma2 and its regulating proteins in spermatozoa lacking AKAP4. Biol Reprod. 2005;72(2):384-92.

25- Mobasheri MB, Modarressi MH, Shabani M, Asgarian H, Sharifian RA, Vossough P, et al. Expression of

Archive of SID

www.SID.ir