DOI: 10.22122/jims.v36i473.9240 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۷۳/هفته‌ی اول خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۵ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۳/۱

همراهی تغییر سطح نشان‌های هیستونی H3K9ac و H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین با نقص اسپرماتوژنز

رها فوایدی[۱]، نیلوفر سدیفی[۲]، محمدعلی صدیقی گیلانی[۳]، مریم شاه‌حسینی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اسپرماتوژنز موفق نیازمند مجموعه‌ای از وقایع اپی‌ژنتیکی بسیار کنترل شده است که به فشردگی کروماتین اسپرم ختم می‌شود. طی این وقایع اپی‌ژنتیکی، بیان ترانزیشن پروتئین‌ها (Transition nuclear proteins یا TNPs) و پروتامین‌ها (Protamines یا PRMs) افزایش می‌یابد تا جانشین هیستون‌ها شوند. بسیاری از عوامل اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان این ژن‌ها مؤثرند. بنابراین، بررسی تغییرات هیستونی مثل H3K9ac و H3K9me2 به عنوان یک ابزار قدرتمند در تنظیم ژن‌های یاد شده می‌تواند درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی ناباروری فراهم کند.

روش‌ها: به این منظور، پس از تأیید کمیته‌ی اخلاق در پژوهش پژوهشگاه رویان، از ۶۰ بیمار آزواسپرم مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان رضایت‌نامه گرفته شد. سپس، بر اساس نتایج اسپرموگرام و داده‌های پاتولوژی، بیماران به سه گروه توقف کامل بلوغ اسپرم، سلول سرتولی تنها و اسپرماتوژنز کم به عنوان شاهد مثبت تقسیم شدند. بیان ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین با استفاده از روش Quantitative reverse transcription-Polymerase chain reaction (qRT-PCR) بررسی شد. همچنین، Chromatin immunopercipitation (ChIP) همراه با Real-time PCR برای بررسی میزان حضور H3K9ac و H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های پیش‌گفته انجام شد.

یافته‌ها: نتایج کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین در دو گروه توقف کامل بلوغ اسپرم و سلول سرتولی تنها در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. این داده‌ها، با نتایج ChIP هم‌خوانی داشت؛ به طوری که در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های پیش‌گفته در دو گروه دارای نقص اسپرماتوژنز در مقایسه با شاهد، کاهش حضور H3K9ac (نشان فعال کننده) و افزایش حضور H3K9me2 (نشان سرکوبگر) دیده شد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها به ارتباط معنی‌دار تغییرات هیستونی با تغییر بیان ژن‌های دخیل در فشرده‌سازی کروماتین اسپرم و نقص اسپرماتوژنز در ناباروری مردان اشاره دارد.

واژگان کلیدی: ناباروری، مردان، اسپرماتوژنز، اپی‌ژنتیک، کروماتین

ارجاع: فوایدی رها، سدیفی نیلوفر، صدیقی گیلانی محمدعلی، شاه حسینی مریم. **همراهی تغییر سطح نشان‌های هیستونی H3K9ac و H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین با نقص اسپرماتوژنز.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۳): ۲۸۳-۲۷۷

مقدمه

اسپرماتوژنز موفق، نیازمند مجموعه‌ای از رویدادهای اپی‌ژنتیکی دقیق است که سبب برداشته شدن هیستون‌ها از روی کروماتین و جانشینی ترانزیشن پروتئین‌ها (Transition nuclear proteins یا TNPs) و پروتامین‌ها (Protamines یا PRMs) و در نهایت، تراکم کروماتین اسپرم می‌شود (۲-۱). بیان کافی و به جای ترانزیشن پروتئین‌ها و پروتامین‌ها در فشرده‌سازی موفق هسته‌ی اسپرم و باروری جنس نر، اهمیت به‌سزایی دارد. آزمایش‌ها بر روی موش‌هایی که بیان دو ژن ترانزیشن پروتئین ۱ (Tnp1) و ترانزیشن پروتئین ۲ (Tnp2) در آن‌ها سرکوب شده است، نشان داد که اگر چه برداشت هیستون‌ها انجام شد، اما میزان فشردگی کروماتین ناچیز بود و میزان شکست‌های زنجیره‌ی DNA افزایش یافت و بیش از ۸۰ درصد اسپرم‌های موجود

۱- گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۳- استاد، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران و بخش اورولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مریم شاه‌حسینی

Email: m.shahhoseini@royaninstitute.org

در بخش اپیدیدیم بیضه از بین رفتند (۳).

مطالعه‌ی مدل‌های موشی برای پروتامین ۱ (Prm1) و پروتامین ۲ (Prm2) نیز نشان داد که موتاسیون در یکی از آلل‌های پروتامین ۱ و یا ۲، باعث جلوگیری از تولید اسپرم‌های دارای عملکرد در موش می‌گردد (۴). همچنین، نسبت نابه‌جای پروتامین ۱ به پروتامین ۲ در سطح پروتئینی، اثرات عمیقی را بر لقاح و نمو جنین ایجاد می‌کند (۵) و با افزایش سطح آسیب DNA در اسپرم مرتبط است (۶).

از طرفی، یکی از مکانیسم‌های کلیدی اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌ها، تغییرات پسا ترجمه‌ای (Post translational modifications) هیستون‌ها می‌باشد (۷). تغییرات پسا ترجمه‌ای مختلف با اثر بر ثبات اکتامر هیستونی و تعامل بین DNA و هیستون، تأثیر قابل توجهی در ترکیب‌بندی کروماتین دارد. به عنوان مثال، لیزین استیله، موجب افزایش سیالیت نوکلئوزومی می‌شود. از سوی دیگر، تغییرات پسا ترجمه‌ای هیستونی مشخص، همراه با عوامل مؤثر خاص اسپرمیوژنز، یک ابزار قدرتمند برای تسهیل بازآرایی کروماتین و جایگزینی پروتامین به جای هیستون، فراهم می‌کنند (۷).

یکی دیگر از تغییرات پسا ترجمه‌ای هیستون‌ها، متیلاسیون است که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است (۷). بخش قابل توجهی از هیستون‌های خالص شده از اسپرم انسان، در باقی مانده‌های آمینو اسیدی لیزین و آرژنین هایپرمتیله هستند (۸). از این نشان‌ها، می‌توان به H3K9me3 که مشخصه‌ی هتروکروماتین سرکوبگر است و H3K27me3 که در پروموتر ژن‌های تکوینی آماده برای بیان در مراحل اولیه‌ی جنینی غنی شده است، اشاره نمود (۹). شواهد نشان می‌دهند که ساختار ژنومی خاص هسته‌ی اسپرم، ضامن باروری موفق موجود زنده است و ادامه‌ی حیات جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما ساز و کارهای مولکولی این فرایند هنوز به خوبی شناخته نشده است (۱۰). در این مطالعه، سعی شده است نقش فرایندهای اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در فشرده‌سازی هسته‌ی اسپرم در ناباروری مردان مورد بررسی قرار گیرد.

روش‌ها

هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اپی‌ژنتیکی ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین در نمونه‌های بافتی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان بود.

برای این منظور، میزان بیان ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 در بافت بیضه‌ی مردان نابارور با استفاده از روش کمی Quantitative reverse transcription-Polymerase chain reaction (qRT-PCR) بررسی شد. از طرف دیگر، ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 از نظر میزان حضور نشان‌های اپی‌ژنتیکی H3K9ac و H3K9me2 با استفاده از تکنیک Chromatin immunopercipitation (ChIP)، ارزیابی شد.

بیماران: این مطالعه‌ی مورد- شاهدی پس از تأیید کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی و کسب رضایت‌نامه‌ی آگاهانه از بیماران مراجعه کننده به این پژوهشگاه در سال ۱۳۹۲ انجام شد.

نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۶۰ نمونه‌ی بافت بیضه‌ی موجود در بانک بافت گروه آندرولوژی پژوهشگاه رویان بود. این بافت‌ها، متعلق به مردان آزوسپرمیای مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان بودند که برای ادامه‌ی روند درمان، تحت جراحی استخراج اسپرم از بیضه (Testicular sperm extraction یا TESE) قرار گرفتند. بخشی از نمونه‌ی بافت، پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن- ائوزین تحت بررسی‌های پاتولوژی قرار گرفت و پس از برآورده شدن مقاصد درمانی، نمونه‌های بافتی مازاد، در بانک بافت گروه آندرولوژی پژوهشگاه رویان ذخیره شد. نمونه‌ها بر اساس بررسی‌های پاتولوژی در ۳ گروه اسپرماتوژنز کم (شاهد مثبت)، سندرم سلول سرتولی تنها (شاهد منفی) و گروه توقف کامل در بلوغ اسپرم در مرحله‌ی اسپرماتید (تعداد ۲۰ نمونه در هر گروه) قرار گرفتند. تمام افراد مورد مطالعه دارای کاریوتایپ طبیعی (46,xy) و فاقد حذف AZF بودند. معیارهای عدم ورود نیز شامل ابتلا به سندرم کلاین فلتر، سیستیک فیبروزیس و ناهنجاری‌های کروموزوم Y بود.

استخراج RNA و بررسی کمی میزان بیان ژن‌های هدف:

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی با استفاده از Trizol (Invitrogen Inc, USA) انجام شد و ساخت complementary DNA (cDNA) با استفاده از کیت مربوط (H minus First strand cDNA synthesis kit, Thermoscientific, USA) بر طبق دستورالعمل سازندگان، انجام شد. سپس، جهت بررسی کیفیت cDNA واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی برای ژن GAPDH (۱۰) (جدول ۱) به عنوان یک ژن House keeping انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت مناسب cDNA و عدم وجود آلودگی به DNA ژنومی، این cDNA به عنوان الگو جهت Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت تا تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌های حاصل از گروه‌های مختلف بیماران به صورت کمی ارزیابی گردد.

واکنش qRT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 (۱۰) (جدول ۱) و مخلوط واکنش Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, UK) با استفاده از دستگاه Real-time PCR system step one plus

(Applied Biosystems, UK) طی برنامه‌ای شامل دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. داده‌های حاصل، با روش $2^{\Delta\Delta CT}$ آنالیز شد و با استفاده از آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج کروماتین و Chromatin immunoprecipitation

پس از بررسی بیان ژن‌های مورد نظر، برای بررسی اپی‌ژنتیکی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین میزان نشست نشانه‌های هیستونی H3K9ac و H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های پیش‌گفته با استفاده از روش Chromatin immunoprecipitation (ChIP) و کیت ChIP KIT (Diagenode, Belgium) بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (۱۰). کروماتین استخراج شده از هر بافت، در دستگاه سونیکاتور UCD200 (Diagenode, Belgium) خرد شد. به ویال حاوی کروماتین خرد شده، آنتی‌بادی علیه H3K9ac (Abcam, UK) و H3K9me2 (Abcam, UK) اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مخلوط شدند. در مرحله‌ی بعد، به هر ویال Sepharose bead (GE-Healthcare, Switzerland) افزوده شد. سپس، DNA توسط ستون استخراج (Expincombo kit, GeneAll, Korea) تخلیص شد. پس از اتمام مراحل روش ChIP برای بررسی حضور کمی نشانه‌های اپی‌ژنتیکی H3K9ac و H3K9me2 از روش Real-time PCR کمی استفاده شد. بدین منظور، از پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه‌ی پروموتری ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 (۱۰) (جدول ۱) استفاده شد.

یافته‌ها

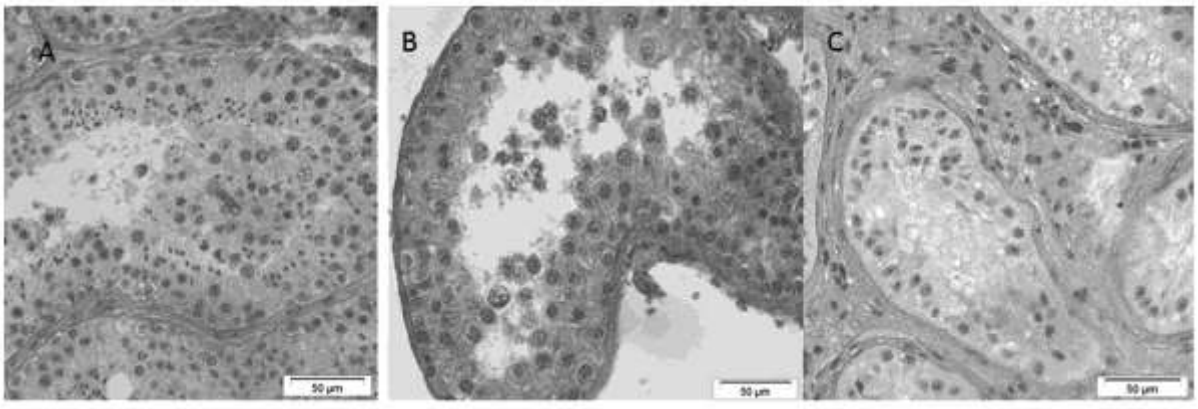
پس از مشاهده‌ی نتایج پاتولوژی (شکل ۱)، نتایج حاصل از بیان ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 کاهش معنی‌داری در هر دو گروه از بیماران مورد مطالعه شامل گروه سندرم سلول سرتولی تنها (Sertoli cell-only یا SCO) و گروه توقف کامل در بلوغ اسپرم در مقایسه با گروه شاهد یعنی اسپرماتوژنز کم نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۲).

با توجه به این کاهش بیان، در مرحله‌ی بعد میزان حضور نشانه‌های اپی‌ژنتیکی فعال کننده‌ی بیان ژن H3K9ac و همچنین، سرکوب کننده‌ی بیان ژن H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 با روش ChIP-real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

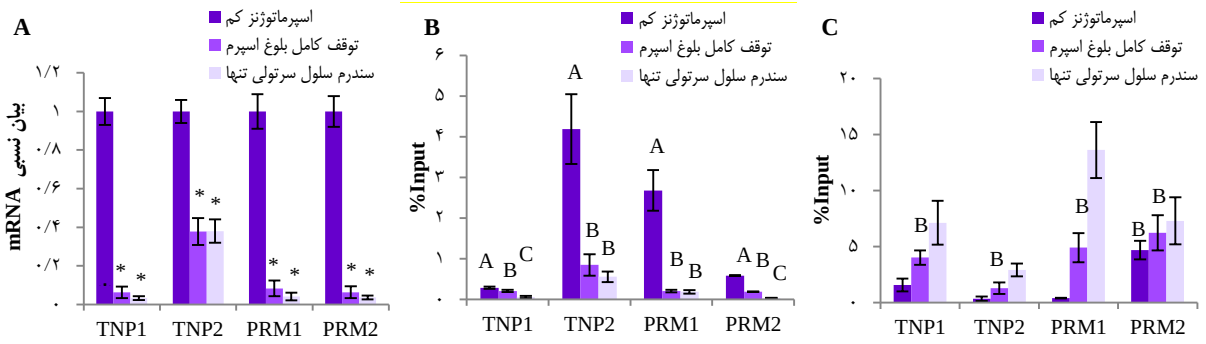
جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR	
توالی پرایمرها(′۳ ′۵)	نام ژن
F: ctcatttcctggtatgacaacga R: cttcctcttgtgctcttgct	GAPDH
F: gacctgatgttagatcaaagcc R: attcctcatttcgtcacaactg	TNP 1
F: ggaaatccaactaatgagaccg R: tagtgttgcgtagaaatcacca	TNP 2
F:aatagcacatccaccaaactc R: caacatttattgacaggcgg	PRM 1
F: gctggaagttaagagaaagtcac R: ggcttgagcatttgatgtagg	PRM 2
پرایمرهای مورد استفاده در ChIP-real-time PCR	
توالی پرایمرها(′۳ ′۵)	نام ژن
F: gtc tct tgt act cat cca atg cc R: tac tgt gct gtc act cac ct	TNP1
F: ttc ttc taa tgt ccg aat gag g R: ctg aac aag tcc cag ttt cc	TNP2
F: gga gga gtc atc ttg tat cg R: tca ttg tga ggg caa agg	PRM1
F: ctt cca aat gac aat gtg cg R: ttg cct tgc ctg taa agc	PRM2

qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-Polymerase chain reaction; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TNP: Transition nuclear proteins; PRM: Protamines; ChIP: Chromatin immunopercipitation



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری از رنگ‌آمیزی بافت بیضه در سه گروه A: اسپرماتوژنز کم، B: توقف کامل در بلوغ اسپرم و C: سندرم سلول سرتولی تنها



شکل ۲. (A) مقایسه‌ی میزان بیان ژن‌های ترانزیشن پروتئین (TNP1 و TNP2) و پروتامین (شامل PRM1 و PRM2) در گروه‌های سندرم سلول سرتولی تنها و گروه توقف کامل در بلوغ اسپرم در قیاس با گروه شاهد اسپرماتوژنز کم (سطح معنی‌داری به صورت $P < ۰/۰۵۰$* تعریف شده است.)، (B) مقایسه‌ی میزان حضور نشان اپی‌ژنتیکی فعال کننده‌ی بیان ژن H3K9ac و (C) سرکوب کننده‌ی بیان ژن H3K9me2. در ناحیه‌ی پروموتری ژن‌های پیش‌گفته در سه گروه مورد مطالعه (حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۵۰$ است.)

نتایج حاصل از ChIP-real time PCR نشان داد که میزان حضور نشان اپی‌ژنتیکی فعال کننده‌ی بیان ژن H3K9ac در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین در گروه سندرم سلول سرتولی تنها و گروه توقف کامل در بلوغ اسپرم به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد یا همان اسپرماتوژنز کم بود (شکل ۲). در حالی که میزان حضور نشان اپی‌ژنتیکی سرکوب کننده‌ی بیان ژن H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین در این دو گروه، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (شکل ۲).

بحث

در اسپرماتوژنز ساختار کروماتین سلول‌های زایای مردانه تحت تأثیر یک سازمان‌دهی مجدد و بسیار منحصر به فرد قرار می‌گیرد تا آسیب به DNA پدری به حداقل برسد؛ به طوری که طی اسپرمیوژنز، اسپرم دچار تراکم هسته‌ای، کاهش سیتوپلاسم و تشکیل آکروزوم می‌شود. در این مرحله، استیلاسیون نوکلئوزوم در اسپرماتید گرد و در حال طویل شدن افزایش می‌یابد که سبب شل شدن کروماتین و افزایش دسترسی به آن برای تسهیل اخراج هیستون‌ها می‌شود (۱۱). سپس ابتدا هیستون‌ها با ترانزیشن پروتئین‌ها و سپس با پروتامین‌ها جایگزین می‌شوند (۱۱).

در فرایند بازآرایی کروماتین، ترانزیشن پروتئین ۱ و ترانزیشن پروتئین ۲ به DNA متصل می‌شوند و باعث تسهیل جابه‌جایی هیستون‌ها می‌شوند و حضور آن‌ها برای مراحل بعدی بازآرایی کروماتین ضروری است (۱۲). پس از جایگزینی ترانزیشن پروتئین‌ها به جای هیستون‌ها، پروتامین‌ها به طور کامل جایگزین ترانزیشن پروتئین‌ها می‌شوند. در انسان دو نوع پروتامین وجود دارد که شامل پروتامین ۱ و پروتامین ۲ می‌باشد. پروتامین‌ها، باعث فشردگی شدید کروماتین اسپرم و محافظت ژنوم در برابر استرس‌هایی که در طی انتقال آن به جنس مؤنث وجود دارد، می‌شود (۱۳).

با توجه به شکل ۱، میزان بیان ژن‌های TNP1، TNP2، PRM1 و PRM2 در بافت بیضه‌ی مردان نابارووری که دارای نقص‌های اسپرماتوژنیکی هستند، نسبت به مردان گروه شاهد که اسپرماتوژنز هر چند اندک دارند، به شدت کاهش یافته است. در این مطالعه، افراد دارای اسپرماتوژنز کم، به عنوان افراد شاهد مثبت در نظر گرفته شده‌اند؛ چرا که فرایند اسپرماتوژنز در این افراد به طور صحیح و تا آخرین مرحله انجام می‌شود. بنابراین، میزان بیان ترانزیشن پروتئین‌ها و پروتامین‌ها در بافت این افراد به عنوان مبنا در نظر گرفته شد.

کاهش معنی‌داری که در بیان ژن‌های ترانزیشن پروتئین ۱ و ۲ در افراد گروه‌های سندرم سلول سرتولی تنها و گروه توقف کامل در بلوغ اسپرم دیده می‌شود، می‌تواند بر فرایند فشرده‌سازی کروماتین اسپرم تأثیر منفی داشته باشد. در مطالعاتی که بر روی موش‌های موتانت از نظر ژن‌های Tnp1 و Tnp2 انجام شد، مشخص گردید که فرایند متراکم شدن هسته‌ی اسپرماتید به صورت غیر طبیعی در این موش‌ها رخ می‌دهد؛ به طوری که هسته‌ی اسپرم این موش‌ها به اندازه‌ی اسپرم مربوط به موش‌های وحشی متراکم نشده است. همچنین، میزان بالایی از شکست‌های زنجیره‌ی DNA و نواقص شکلی در اسپرم‌های مربوط به این موش‌ها مشاهده شد. به علاوه، یکی از نقش‌های ترانزیشن پروتئین ۲، حفظ پردازش طبیعی Messenger RNA (mRNA) پروتامین ۲ برای تکمیل فشردگی کروماتین است. بنابراین، تغییر میزان mRNA این ژن از این طریق بر فشردگی کافی کروماتین اسپرم مؤثر است. سطوح تغییر یافته‌ی mRNA به سطوح تغییر یافته‌ی پروتئین اشاره دارد. پس می‌توان این

گونه نتیجه گرفت که بیماران نابارور دارای سطوح پایینی از پروتئین‌های پروتامین ۱ و ۲ هستند. چون پروتامین‌ها برای بسته‌بندی و فشرده‌سازی با نظم بالای کروماتین، حیاتی هستند و فشردگی کروماتین نیز برای عملکرد طبیعی اسپرم ضروری است (۴)، احتمال می‌رود در این بیماران اختلال در بیان ژن‌های پروتامین ۱ و ۲ و نیز به هم خوردن نسبت این دو، سبب ایجاد فشردگی ناقص در کروماتین اسپرم و عدم تولید اسپرم‌های دارای عملکرد شده است.

همچنین، مشخص شده است که تغییرات در بیان پروتامین ۱ و ۲ با ناباروری مردان مرتبط می‌باشد. در برخی از مردان نابارور، موتاسیون‌هایی در ژن کد کننده‌ی پروتامین دیده شده است. تحقیقات انجام شده بر روی موش‌هایی که از نظر بیان ژن پروتامین دچار نقص می‌باشند، نشان داد که این موش‌ها، دارای نواقص ساختاری متعددی در هسته‌ی خود می‌باشند و درجات متغیری از ناباروری در آن‌ها دیده شده است (۶، ۴).

به علاوه، سطح دیگری از تنظیم ژن تغییرات هیستونی هستند که هم پتانسیل خاموش کردن ژن‌ها و هم پتانسیل نسخه‌برداری از آن‌ها را دارند. نتایج مطالعه‌ی حاضر در شکل ۲ به خوبی سطح نشان اپی‌ژنتیک H3K9ac (نشان معروف فعالیت و رونویسی ژن) را در سه گروه سندرم سلول سرتولی تنها، توقف کامل در بلوغ اسپرم و اسپرماتوژنز کم نشان داد. همان‌طور که از نتایج بر می‌آید، میزان حضور این نشان اپی‌ژنتیکی مهم در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های مورد بررسی در گروه‌های دارای نقص اسپرماتوژنز یعنی گروه توقف کامل در بلوغ و سندرم سلول سرتولی تنها، در مقایسه با گروه شاهد (اسپرماتوژنز کم)، بسیار کمتر بود.

هایپراستیلاسیون هیستون‌ها، به ساختار بازتر کروماتین منجر می‌شود که نه تنها جایگزینی هیستون‌ها با پروتامین‌ها را تسهیل می‌کند، بلکه همچنین دسترسی آسان‌تر پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی رونویسی را به DNA پسا میوزی فراهم می‌کند (۱۲، ۱۰).

از طرف دیگر، در اواخر اسپرماتوژنز لازم است که سطح متیلاسیون نشان H3K9 کاهش یابد تا ژن‌هایی که باعث بلوغ اسپرم می‌شوند، از جمله ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین بیان شوند. برداشته شدن گروه متیل نشان H3K9me از روی پروموتر این ژن‌ها، باعث فعال شدن بیان این ژن‌ها می‌شود (۱۴).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که حضور نشان اپی‌ژنتیکی سرکوب کننده‌ی بیان ژن H3K9me2 در ناحیه‌ی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین در گروه توقف کامل در بلوغ و سندرم سلول سرتولی تنها بیشتر از گروه شاهد یعنی اسپرماتوژنز کم است (شکل ۲).

با توجه به این که میزان متیلاسیون هیستون‌ها در ناحیه‌ی تنظیمی، بر به کارگیری عوامل رونویسی بر روی کروماتین و در نتیجه، فعال شدن رونویسی اثر می‌گذارد، بنابراین با افزایش سطح متیلاسیون هیستون‌ها در نواحی تنظیمی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین، عوامل رونویسی قادر به قرارگیری بر روی این نواحی نیستند که این امر، با ممانعت از روشن شدن این ژن‌ها باعث کاهش شدید بیان ژن‌های پیش‌گفته در گروه‌های واجد نقایص اسپرماتوژنزی می‌شود. نتایج این تحقیق، به خوبی نشان داد که نشان‌های H3K9me2 و H3K9ac به عنوان عوامل اپی‌ژنتیکی مؤثر بر روی ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین عمل می‌کنند؛ به طوری که کاهش میزان حضور آن‌ها بر روی نواحی تنظیمی این ژن‌ها با گروه‌های دارای نقص اسپرماتوژنز همراهی دارد.

با توجه به این که اسپرماتوژنز فرایندی بنیادی در دستگاه تناسلی مردان است که به حوداث ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی بسیار کنترل شده نیاز دارد، در مجموع، می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که تغییرات پسا ترجمه‌ای هیستون‌ها نقش حیاتی در تمایز و بلوغ اسپرم ایفا می‌نماید؛ به طوری که نقص در عملکرد آن‌ها از طریق تأثیرگذاری بر بیان ژن‌های ترانزیشن پروتئین و پروتامین، منجر به اختلال در فرایند بازآرایی کروماتین و اسپرماتوژنز می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل طرح تحقیقاتی با کد ۹۰۲۲۳۹۰۸ مصوب پژوهشگاه رویان می‌باشد. نویسندگان حاصل این تحقیق را به روح بلند دکتر کاظمی آشتیانی بنیان‌گذار فقید پژوهشگاه رویان تقدیم می‌نمایند.

References

1. Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. Science 2002; 296(5576): 2176-8.
2. Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. J Biol Chem 2003; 278(32): 29471-7.
3. Aoki VW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid: Their structure, function, expression and relationship with male infertility. Asian J Androl 2003; 5(4): 315-24.
4. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. Nat Genet 2001; 28(1): 82-6.
5. Hogarth C, Itman C, Jans DA, Loveland KL. Regulated nucleocytoplasmic transport in

spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? Bioessays 2005; 27(10): 1011-25.
6. Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P, Rousseaux J. P2 protamines from human sperm are zinc -finger proteins with one Cys2His2 motif. Biochem Biophys Res Commun 1992; 182(2): 540-7.
7. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007; 128(4): 693-705.
8. Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. Epigenetics Chromatin 2014; 7(1): 2.
9. Pai CC, Deegan RS, Subramanian L, Gal C, Sarkar S, Blaikley EJ, et al. A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. Nat Commun 2014; 5: 4091.
10. Eelaminejad Z, Favaedi R, Sodeifi N, Sadighi Gilani MA, Shahhoseini M. Deficient expression of JMJD1A histone demethylase in patients with round spermatid maturation arrest. Reprod Biomed Online 2017; 34(1): 82-9.
11. Khalil M, Wahlestedt C. Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis. Epigenetics 2008; 3(1): 21-7.
12. Siffroi JP, Alfonsi MF, Dadoune JP. Co-localization of HP1 and TP1 transcripts in human spermatids by double electron microscopy in situ hybridization. Int J Androl 1999; 22(2): 83-90.
13. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod 2000; 6(3): 219-25.
14. Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. Nature 2005; 438(7066): 374-8.

DOI: 10.22122/jims.v36i473.9240 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 473, 1st Week, June 2018**

Received: 25.11.2017 Accepted: 25.12.2017 Published: 22.05.2018

The Association between the Altered Levels of H3K9ac and H3K9me2 Histone Marks in Transition Protein and Protamine Genes with Impaired Spermatogenesis

Raha Favaedi[1], Niloofar Sodeifi[2], Mohammad Ali Sadighi-Gilani[3], Maryam Shahhoseini[4]

Original Article

Abstract

Background: Successful spermatogenesis requires a series of tightly controlled epigenetic events leads to condensation of sperm chromatin. Through these epigenetic events, expression of transition nuclear proteins (TNPs) and protamines (PRMs) rise to replace with histones. Many epigenetic factors are involved in regulation of these genes. Therefore, evaluation of histone modifications e.g. H3K9ac and H3K9me2, as powerful epigenetic tool in regulation of mentioned genes, can represent better insight into molecular mechanisms of infertility.

Methods: The consent was obtained from 60 azoospermic infertile men referred to Royan Institute, Tehran, Iran, according local ethical approval. Then, based on spermogram and pathological features of patients, testes tissue samples were collected from three groups including complete maturation arrest, sertoli cell only syndrome, and hypospermatogenesis (as positive control). Expression of TNPs and PRMs were evaluated using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Besides, chromatin immunopercipitation (ChIP) coupled with real time- polymerase chain reaction was performed to evaluate the incorporation of H3K9ac and H3K9me2 into regulatory regions of mentioned genes.

Findings: There was a significant decrease in expression of TNP and PRM genes in two groups of spermatogenic failure in comparison to positive control. These findings also confirmed by chromatin immunopercipitation data which revealed decreased incorporation of H3K9ac (activating mark), and increased incorporation of H3K9me2 (repression mark) into regulatory regions of mentioned genes in complete maturation arrest and sertoli cell only syndrome groups vs. positive control.

Conclusion: These finding implies significant association of histone modifications with altered expression of sperm chromatin condensing genes and impairment of spermatogenesis in male infertility.

Keywords: Infertility, Male, Spermatogenesis, Epigenetics, Chromatin

Citation: Favaedi R, Sodeifi N, Sadighi-Gilani MA, Shahhoseini M. **The Association between the Altered Levels of H3K9ac and H3K9me2 Histone Marks in Transition Protein and Protamine Genes with Impaired Spermatogenesis.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(473): 277-83.

1- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Academic Center for Education, Culture and Research AND Department of Urology, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran
Corresponding Author: Maryam Shahhoseini, Email: m.shahhoseini@royaninstitute.org