شناسایی موتاسیون در اگزونهای ۱۳ و ۲۳ و بخشی از اینترون ۱۲ از ژن jhdm2a در انسان و ارتباط آن با ناباروری مردان

الهه سلیمانپور[۱]، زهره حجتی[۱*] و محمد حسین نصر اصفهانی[۲]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

[۲] اصفهان، موسسه رویان، گروه آندرولوژی

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۴

چکیده

JHDM2A (هیستون دمتیلاز حاوی دمین JmjC) یک تنظیم کننده کلیدی تغییرات اپی ژنتیکی است که در بیضه بیان می شود، برای اسپرم زایی ضروری است و به طور اختصاصی لیزین ۹ هیستون۳ را در حالت مونو و دی متیله، دِمتیله می کند. JHDM2A به طور مستقیم یا غیر مستقیم روی مناطق مرکزی پروموتر پروتئینهای گذرای هسته ای و پروتامینها ، که محصول آنها برای فشرده سازی کروماتین اسپرم نیاز است، اثر می‌گذارد. در این مطالعه ۱۵۰ مرد نابارور که در آزمایش اسپرموگرام ثابت شده آزوسپرم و اولیگوسپرم هستند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی و با استفاده از نرم افزار Clustal میزان مشابهت ژن jhdm2a بین انسان و موش ۹۱ درصد تخمین زده شد. اگزون ۱۳ ، بخشی از اینترون ۱۲ و اگزون ۲۳ انتخاب شدند و برای شناسایی موتاسیون توسط PCR تکثیر شدند. محصول PCR آنها با استفاده از تکنیک SSCP مورد بررسی قرار گرفت. در اگزون ۲۳ هیچ تغییری در الگوی باند ها مشاهده نشد اما در دو فرد بیمار در اگزون ۱۳ الگوهای باندی متفاوتی در SSCP در مقایسه با افراد کنترل و سایر افراد نابارور دیده شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که در این دو فرد بیمار یک موتاسیون از نوع جانشینی C۳۳۸۳۸→A وجود دارد. این جهش که در دمین انگشت روی (Zink finger) رخ داده نیز ممکن است توانایی اتصال پروتئین به DNA را کاهش داده و منجر به ناباروری شده است.

واژه های کلیدی: هیستون دمتیلاز حاوی دمین(JHDM2A(JmjC) ، ناباروری مردان، SSCP، بیوانفورماتیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۴۵۵، پست الکترونیکی: z.hojati@sci.ui.ac.ir

مقدمه

براساس تعریفی از سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ناباروری شکست در تلاش یک زوج برای باروری بدون پیشگیری، پس از دو سال است. حدود ۱۰-۱۵ درصد از زوجها نابارورند. علل ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به فاکتور های مردانه است که در این بین ۳۰ درصد مربوط به فاکتورهای اختصاصی مردانه و ۲۰ درصد مربوط به فاکتورهای اختصاصی هر دو جنس است(۱۰). از آنجا که در بسیاری از موارد تعیین علت و درمان ناباروری می تواند موجب تداوم یک زندگی مشترک و آرامش روحی خانواده ها گردد، بررسی علل ناباروری می تواند سبب برنامه ریزی کلان در موارد قابل درمان گردد. در وهله اول ناباروری مردان با آنالیز مایع سمینال بررسی می شود که این آنالیز شامل ارزیابی تعداد اسپرم، تحرک، مورفولوژی و ناهنجاریهای آن می باشد که اطلاعات ارزنده ای از وضعیت باروری فرد در اختیار قرار می دهد. این ارزیابیها بسیاری از ناهنجاریها از قبیل آزوسپرمی، اولیگوسپرمی، تراتوزوسپرمی و ... را آشکار می کند.

عوامل دخیل در ناباروری متعدد هستند که در این مطالعه عوامل اپی ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته است. عوامل اپی ژنتیکی می تواند با تأثیر بر روی مراحل تکامل اسپرم در روند باروری نقش داشته باشند. اسپرم زایی پستانداران یک فرآیند منحصر به فرد و پیچیده است که در طی آن اسپرماتوگونیای دیپلوئید گرد، با تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به اسپرماتوزوآی هاپلوئید کاملاً تمایز یافته با یک هسته فشرده، آکروزوم و فلاژلوزوم(دم) تبدیل می‌شود(۳). در مراحل آخر اسپرم زایی، هیستونهای اختصاصی بیضه از قبیل: H3.3B, H3.3A, TH2B, H2A.X, HILS1, H1t2, H1t، جایگزین هیستونهای سوماتیکی می شوند. سپس ساختار نوکلئوزومی به طور پیشرونده ای متلاشی می شود ونهایتاً به وسیله پروتئینهای گذرای هسته ای (Tnp_s) و در نهایت پروتامینها (Prm_s) جایگزین می شوند(۹). میانکنش پروتامینها با DNA اسپرم به صورت خاصی است که منجر به مارپیچی شدن DNA اسپرم به زیر واحد های حلقوی (که معمولاً لوپهای دونات شکل نامیده می شود) می‌گردد که هر زیر واحد از 50,000 جفت باز تشکیل شده است. در انتهای Spermiogenesis بیش از ۵۰۰۰۰ ساختار حلقوی فشرده شده در هسته اسپرم مشاهده می شود (۵). اهمیت پروتامینها ونقش آنها برای باروری بیشتر در لاین موشهای دارای حذف ژنی برای jhdm2a بررسی و مشاهده شده است (۱۶).

هر یک از پروتئینهای هیستونی حاوی یک هسته مرکزی هستند که توسط DNA احاطه میشود (نوکلئوزوم) و دمهای N-terminal که به سمت خارج برآمدگی دارند و در معرض تغییرات پس ترجمه ای مثل متیلاسیون، استیلاسیون، ساموئیله و یوبی کوئیتینه شدن هستند. اثر ترکیبی این تغییرات پس ترجمه ای کلید تنظیمات DNA از قبیل همانند سازی، ترمیم و فعال یا مهار سازی DNA است (۱). اغلب جایگاههای متیلاسیون در طول دم هیستون است که زنجیره ای از اسید آمینه های لیزین و آرژنین است. لیزینهای درون هیستونها روی ϵ- nitrogen مونو ، دی و تری متیله می شوند و آرژنینها روی گوانیدیوم مونو یا دی متیله می شوند. تا مدتهای زیادی تصور می‌شد که متیلاسیون هیستونها ثابت و دائمی است. اما مطالعات بیشتر مشخص کرد که متیلاسیون هیستونها نیز به صورت پویا تنظیم می شود.(۱۱) بنابر این احتمال وجود مکانیسمی برای برداشتن گروه متیل از روی ریشه هیستونی مطرح شد.

در سال ۲۰۰۴، Shi و همکارانش اولین دمتیلاز هیستونی به نام LSD1 را شناسایی کردند که یک دمتیلاز مونو و دی متیل لیزین اختصاصی H3K4 وابسته به ریبو فلاوین است و قادر به دمتیلاسیون H3K4 تری متیله نمی باشد (۱و۱۲). به دنبال شناسایی LSD1 امکان وجود دمتیلازهای دیگری که توانایی دمتیلاسیون لیزینهای دیگر و یا لیزینهای تری متیله را داشته باشند، محتمل شد(۱۴). در سال ۲۰۰۶، Yamane و همکارانش کلاس جدیدی از هیستون دمتیلازها به نام JHDM (هیستون دمتیلاز حاوی دمین JmjC) را گزارش دادند که از نظر تکاملی از مخمر تا انسانها به صورت حفاظت شده، باقی مانده اند (۱۵). یک تفاوت مهم بین خانواده JHDM و LSD1 این است که خانواده JHDM توانایی دمتیلاسیون زیرواحد های لیزین تری متیله را دارد چون برای فعالیتش به نیتروژن پروتونه نیاز ندارد (۱).

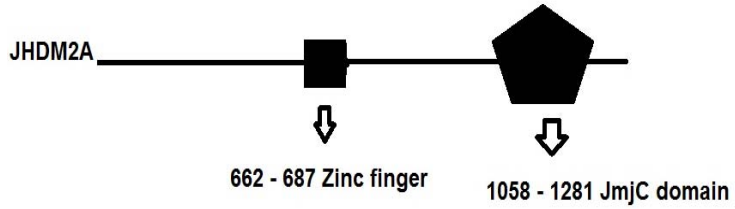
پروتئینهای حاوی دمین Jmj-C بر اساس تشابه توالی در دمین jmjC و وجود دمینهای دیگر در تمام طول پروتئین به ۷ زیر خانواده تبدیل می شوند (۶) که JHDM2 یکی از اعضای این خانواده است و JHDM2A در این زیر خانواده قرار می گیرد.

JHDM2A ، هیستون دمتیلازی است که در بیضه بیان می شود و به طور اختصاصی لیزین ۹ مونو و دی متیله هیستون ۳ را دمتیله می کند اما روی لیزین۹ تری متیله هیستون ۳ اثری ندارد . JHDM2A همچنین با رسپتور

آندروژن در ارتباط است و به محض برخورد هورمون با رسپتور آندروژن، با کاهش میزان متیلاسیون H3K9، باعث بیان ژنهای هدف آن می شود (۱۵). فعالیت آنزیمی JHDM2A وابسته به دمین کامل jmjC است و به فاکتورهای (Fe(Ⅱ و αکتو گلوتارات نیاز دارد (۱). هیستون دمتیلاز های حاوی دمین jmjC با مکانیسمی شبیه به AlkB که DNA آسیب دیده را دمتیله میکند، عمل میکنند (۷). JHDM2A در دمتیلاسیون H3K9me1/H3K9me2 مناطق پروموتری پروتئینهای گذرای هسته ای و پروتامین در اسپرماتید های گرد نقش دارد . مطالعات مختلف عملکرد jhdm2a را به دو صورت بیان کرده اند. در مطالعات Okada که روی موش صورت گرفته است، دیده شده که jhdm2a مستقیماً به پروموتر Tnp1 و Prm1 متصل می‌شود و به طور مستقیم رونویسی آنها را فعال می‌کند (۸). اما مطالعات اخیر توسط Liu نشان دادند که jhdm2a، بیان Tnp1 ، Tnp2 ، Prm1 و Prm2 را به وسیله بیان Crem/Act، یعنی به طور غیر مستقیم، تنظیم می‌کند (۷) . فقدان jhdm2a سبب هایپرمتیلاسیون، خاموشی ژن، عدم بیان مناسب پروتئینهای گذرای هسته ای و پروتامینها و در نهایت ناباروری می‌شود (۸).

در مطالعات مختلف فشردگی غیر طبیعی کروماتین در موشهای فاقد یکی از پروتئینهای گذرای هسته ای(Tnp1یا Tnp2) مشاهده شد ولی شمارش اسپرم این موشها نرمال و بارور نیز بودند (۱۸). اما موشهای فاقد هر دوی این ژنها حاوی فشردگی نامنظم کروماتینی در تمام اسپرماتید ها هستند و به مقدار زیاد شکستگی DNA دارند که منجر به ناباروری می شود (۱۷). در مورد پروتامینها هم در ابتدا به نظر می رسید که در گونه های حاوی هر دو پروتامین نوع ۱ و نوع ۲، تنها پروتامین ۲ برای باروری مردان لازم است چون در برخی از مردان نابارور تنها پروتامین ۲ به طور کامل حذف شده بود (۴). با این حال بیشتر مطالعات اخیر نشان داد که وجود طبیعی هر دو پروتامین ۱ و۲ جهت باروری موش لازم است به طوری که وجود موتاسیون در یک آلل ازپروتامین ۱ یا ۲ و کاهش میزان پروتامین از تولید اسپرم طبیعی ممانعت می کند(۲). بنابراین نقص در عملکرد JHDM2A با تأثیر بر روی بیان پروتئین گذرای هسته ای و پروتامینها می تواند منجر به ناباروری شود.

در مورد تأثیر JHDM2A در ناباروری انسان هنوز هیچگونه مطالعه ای صورت نگرفته است . این ژن در انسان ۲۷ اگزون دارد که از ۵۱۵۶۹ جفت باز تشکیل شده است و از روی آن یک mRNA به طول ۴۹۲۸ رونویسی می شود. محصول ترجمه این رونوشت، پروتئینی با ۱۳۲۱ آمینو اسید است . بررسیهای بیو انفورماتیکی انجام شده بر روی ژن jhdm2a بر اساس داده های موجود در پایگاه NCBI مشخص کرد که در اسید آمینه شماره ۶۳۲، در محدوده اگزون ۱۳، مستعد موتاسیونی از نوع فریم شیفت است. ازآنجایی که این نوع موتاسیون الگوی خواندن را عوض می کند می تواند بسیار تأثیر گذار باشد. همچنین بررسیهای بیشتر بیو انفورماتیکی، مشخص کرد که محدوده بین اگزون ۱۷ تا نیمی از اگزون ۲۷ مربوط به دومین jmjC است (شکل ۱). به همین منظور در این مطالعه اگزونهای ۱۳ و ۲۳ و بخشی از اینترون ۱۲ انتخاب و به منظور شناسایی جهش و تعیین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی وارتباط آن با ناباروری مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱- محدوده دمین های ضروری JHDM2A

مواد و روشها

در این مطالعه، ۱۵۰ مرد نابارور که به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کردند، مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۵۰ فرد سالم داوطلب (پدر های دارای فرزند) نیز در این مطالعه به عنوان افراد کنترل یا شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. افراد بیمار در دو دسته آزوسپرم (۶۰) و اولیگوسپرم (۹۰) قرار گرفتند. در افراد اولیگوسپرم علاوه بر تعداد کم اسپرم، میزان تحرک و ناهنجاری سر اسپرم نیز مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مهم ترین عواملی که در انتخاب افراد بیمار در نظر گرفته شد، سطح بالای ناهنجاری سر اسپرم در این افراد بود . نمونه خون این افراد با کسب رضایت کامل برای آزمایش و تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات بیو انفورماتیکی: به منظور بررسی میزان مشابهت گونه های همولوگ این پروتئین در پستانداران مختلف از نرم افزار Clustal W1.83 استفاده شد . نتایج این بررسی نشان داد که بین موش و انسان ۹۱ درصد شباهت در این پروتئین وجود دارد(جدول ۱). بر اساس داده های موجود در پایگاههای اطلاعاتی NCBI و EMBL دیده شد که در محدوده دمین اگزون ۱۳ ژن jhdm2a مستعد موتاسیونی از نوع تغییر قالب خواندن در موقعیت آمینو اسید ۶۳۲ است و محدوده بین اسید آمینه ۱۰۵۸ تا ۱۲۸۱ مربوط به دمین jmjC است که از اگزون۲۲ تا حدود نیمی از اگزون ۲۷، این منطقه را پوشش می‌دهند. از آنجایی که jmjC از اصلی ترین دمین این پروتئین است، به نظر می‌رسد که وجود هرگونه موتاسیون در این دمین به غیر فعال شدن JHDM2A منتهی شده و منجر به ایجاد ناهنجاریهایی در اسپرم و بروز ناباروری در مردان می‌گردد. بررسیهای بیو انفورماتیکی بر روی dbSNP ویژه ژن jhdm2a موجود در پایگاه NCBI مشخص کرد که محدوده اگزون ۲۳، مستعد موتاسیونهای متعدد به ویژه موتاسیونهای ایجاد کننده کدان ختم است. به همین منظور اگزونهای ۱۳و ۲۳ و بخشی از اینترون ۱۲ انتخاب شدند و با استفاده از نرم افزار 5 oligo® طراحی پرایمر برای این اگزونها و تعدادی نوکلئوتید نواحی اینترونی طرفین آنها، صورت گرفت.

جدول۱- درصد تشابه پروتئین JHDM2A در گونه های پستانداران در مقایسه با نوع انسانی این پروتئین

درصد تشابه	گونه
٪۹۴	انسان در مقایسه با سگ
٪۹۱	انسان در مقایسه با موش
٪۹۰	انسان در مقایسه با رات
٪۹۹	انسان در مقایسه با شمپانزه

توالیهای طراحی شده برای پرایمر پیشرو اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ (F–۱۳)-5' GCTTCCCCTAGGTTACAATTCAACAAACAT-3' ، پرایمر معکوس اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ (R-13)-5' GTGTGGCTCAATAGTTGACATAGCTTCCTT-3' ، پرایمر پیشرو اگزون ۲۳ (F-23)-5' GGCAGCCTTTGTTGTCTTTTGTAAAACT-3' و برای پرایمر معکوس اگزون ۲۳ (R-23)-5' ACCCTACCTTCTTCTTGCTCACACTGTC-3' هستند. از آنجایی که در SSCP طول قطعه مورد بررسی از اهمیت خاصی برخوردار است ، پرایمر ها به گونه ای طراحی شدند که طول قطعه تکثیر شده برای اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲، ۲۲۵جفت باز و برای اگزون ۲۳، ۱۷۶ جفت باز باشد.

PCR: پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمر های اختصاصی واکنش PCR انجام شد. شرایط بهینه PCR این اگزونها پس از گرادیانتهای دما، پرایمر، غلظت DNA و $MgCl_2$ مشخص شد و PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت:

یک میکرولیتر MgCl2 (۵۰ mM)،۰/۵ میکرو لیتر dNTP (۱۰ mM) ، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمر ها(۲۰ pM)، ۱ تا ۲میکرولیتر DNA (۵۰۰ng/µl تا ۱۰۰) و ۰/۳

واحد آنزیم Taq polymerase (۵ u/µl). ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس ۳۲ سیکل PCR با شرایط زیر ادامه پیدا کرد. دما و زمان مناسب برای واسرشتی DNA، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، برای اتصال پرایمر اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ دمای ۶۲ درجه سانتی گراد و برای اگزون ۲۳ دمای ۶۸/۸ به مدت ۱ دقیقه و برای تکثیر آنها هم ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه می باشد. پس از PCR، به منظور اطمینان از صحت تکثیر اگزون مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت

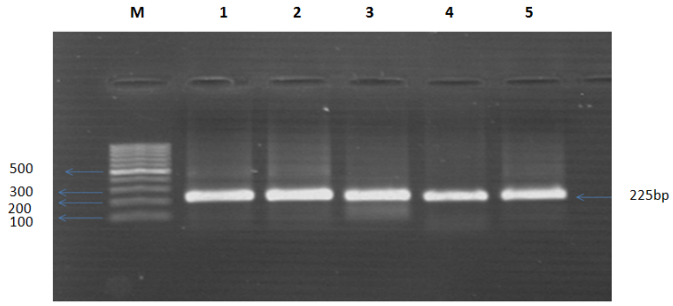
SSCP: پس از تکثیر قطعات مورد نظر، به منظور شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی در DNA ژنومی، از روش SSCP استفاده گردید. SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) یک روش ساده، سریع و حساس برای تعیین جهش در قطعات DNA ژنوم است. تحت شرایط بهینه این تکنیک می تواند تفاوتهای تک بازی را شناسایی کند. این روش مبتنی بر حرکت متفاوت تک رشته های DNA روی ژل پلی آکریلامید است. بعد از دناتوره کردن دو رشته DNA حاصل از PCR، تک رشته های DNA مجدداً از طریق جفت شدن بازهای داخل رشته ای رناتوره (ساختار چند بعدی) می شوند و بر اساس توالی خود قالبهای سه بعدی را تشکیل می دهند. قالبهای سه بعدی جدید الگوی باندی خاصی را برای گونه یا فرد خاص فراهم می کنند. پس به کمک این روش می توان تفاوتهای تک نوکلئوتیدی (SNP) در رشته های DNA را نیز شناسایی کرد. قدرت تعیین جهشها به تغییرات شکلی مولکولهای تک رشته ای ایجاد شده به وسیله جهش و حساسیت به محیط فیزیکی در ژل (دما، غلظت یونها و حلالها) بستگی دارد.(۱۳)

اگزونها پس از PCR توسط این تکنیک مورد بررسی قرار گرفتند. محصول PCR با بافر SSCP (فرمامید ۹۵ درصد، ۱۰۰میلی مولار NaOH، بروموفنل ۲۵ درصد و زایلن سیانول ۳۵ درصد) با نسبت ۲:۱ مخلوط شده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته شد.

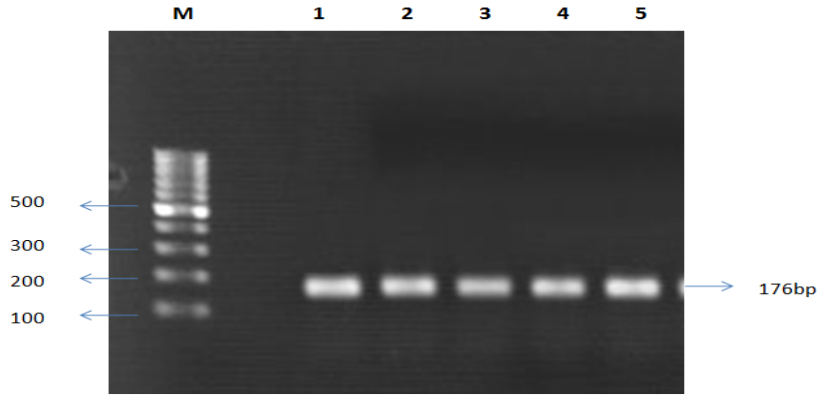
اما با توجه به طول کوچک قطعه مورد نظر و شباهت ساختاری بین تک رشته ایهای ایجاد شده، بهینه سازیهای متعددی صورت گرفت تا نتایج قابل تشخیص و تفکیک باشند. به منظور بهینه سازی، ژلهایی به غلظتهای ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد با زمانهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت شرایط بهینه برای اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ ، ژل آکریل آمید با غلظت ۱۰٪، با ولتاژ ۲۰۰ و به مدت ۲۲ ساعت و برای اگزون ۲۳، ژل آکریل آمید ۱۰ درصد ، با ولتاژ ۲۰۰ و به مدت ۱۷ ساعت گزارش شد. ژل آکریل آمید سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد و الگوی باندهای افراد بیمار با افراد کنترل مقایسه و تفسیر شد. از آنجایی که SSCP فوق العاده حساس به تغییر دما و شرایط محیطی است، نمونه هایی که الگوی باند متفاوتی داشتند مجدداً PCR و متعاقباً SSCP برای آنها انجام شد. با مشاهده نمونه هایی که الگوی باند متفاوتی داشتند، احتمال وجود موتاسیون می رفت، بنابر این برای بررسی وجود هرگونه موتاسیون، نمونه های با الگوی باندی متفاوت به شرکت سینا کلون برای تعیین توالی ارسال شدند.

نتایج

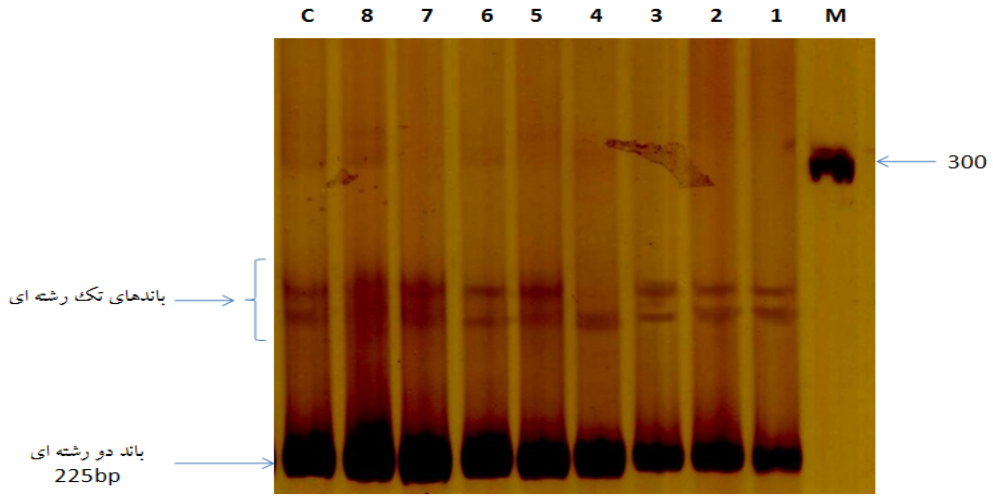
در این مطالعه، اگزونهای ۱۳ و ۲۳ از ژن jhdm2a در ۱۵۰ مرد نابارور(اولیگوسپرم و آزوسپرم) مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا توسط PCR یک قطعه ۲۲۵ جفت بازی حاوی اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ و یک قطعه ۱۷۶ جفت بازی حاوی اگزون ۲۳ از ژن jhdm2a با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و DNA ژنومی به دست آمده از این بیماران تکثیر گردید (شکلهای ۲ و ۳)



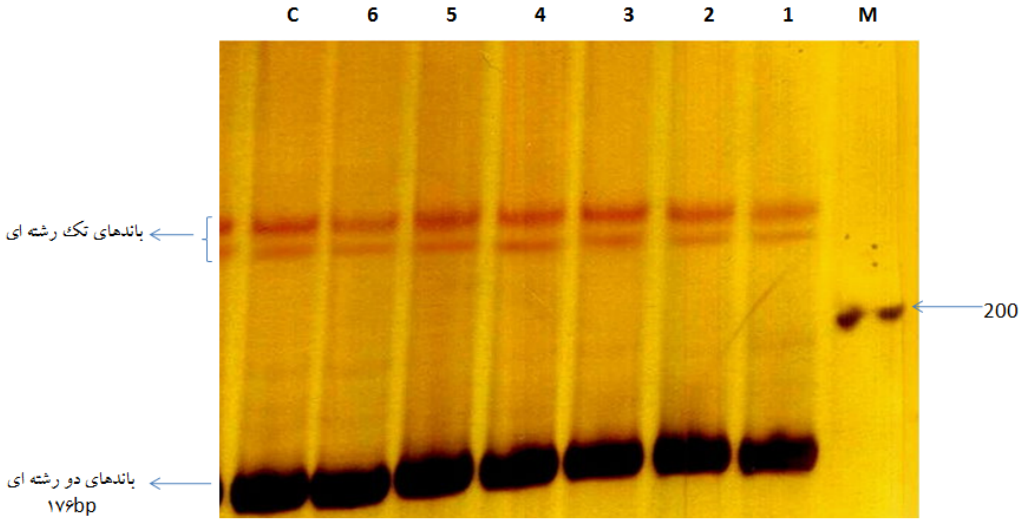
شکل۲- تکثیر اگزون ۱۳ و ناحیه ابتدایی اینترون ۱۲ ژن jhdm2a توسط واکنش PCR واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمر های اختصاصی (13F,13R) صورت گرفت. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. لاین ۱-۵: محصولات PCR افراد نابارور



شکل۳-تکثیر اگزون ۲۳ و ناحیه اینترونی اطراف آن از ژن jhdm2a ،توسط واکنش PCR. واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمر های اختصاصی (23F,23R) صورت گرفت. M :مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.لاین ۱-۵: محصولات PCR افراد نابارور



شکل۴- باند های ایجاد شده توسط اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲ ژن jhdm2a بر روی ژل پلی اکریل آمید غیر واسرشت محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل امید ۱۰٪ به مدت ۲۲ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ الکتروفورز شدند. M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، C فرد کنترل، نمونه شماره ۴ فرد نابارور دارای جهش،سایرین افراد نابارور فاقد جهش. قطعه ی ۲۲۵ جفت بازی مربوط به دو رشته ای های تفکیک نشده است.



شکل۵- باند های ایجاد شده توسط اگزون ۲۳ ژن jhdm2a بر روی ژل پلی اکریل آمید غیر واسرشت

محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل امید ۱۰٪، به مدت ۱۷ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ الکتروفورز شدند. M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، C فرد کنترل، لاین ۱- ۶ افراد نابارور فاقد جهش. قطعه ی ۱۷۶ جفت بازی مربوط به دو رشته ای های تفکیک نشده است

سپس محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت . از آنجایی که SSCP دقت بالایی دارد و بر اساس تغییر کنفورماسیون حاصل از تغییر در نوع یا توالی نوکلئوتیدها است ، تفاوتهای تک نوکلئوتیدی را نشان می دهد. پس هر گونه تغییر در الگوی باند های مربوط به تک رشته ایها می تواند دلیلی بر تغییر توالی DNA تک رشته ای باشد. در هر بار SSCP از فردی نرمال و بارور به عنوان کنترل مثبت استفاده شده که باندهای حاصله به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد بنابراین در صورت مشاهده تفاوت در الگوی باندها در هر یک از نمونه ها با الگوی کنترل مثبت، نمونه مورد نظر مجدداً PCR شده و بر روی ژل SSCP بررسی گردید تا وجود تفاوت به طور قطعی اثبات شود. از آنجایی که تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر موتاسیون در این ژن در انسان گزارش نشده کنترل منفی در این مطالعه وجود نداشت. نتایج حاصل از بررسی در اگزون ۱۳ و بخشی از اینترون ۱۲، نشان داد که دردو بیمار از کل بیماران الگوی باندها متفاوت از افراد نرمال و سایر افراد نابارور بود (شکل۴)، اما در اگزون۲۳ هیچ گونه تغییری در الگوی باند ها دیده نشد(شکل ۵). از آنجایی که کنترل منفی گزارش نشده بود، محصول PCR افراد مشکوک به طور جداگانه برای تأیید نتیجه حاصل از SSCP، تعیین توالی شد و مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی در هر دو فرد بیمار (اولیگوسپرمی شدید) یک موتاسیون نقطه ای از نوع جانشینی در نوکلئوتید شماره C33838→A که مربوط به آمینواسید شماره ۶۴۵ است را نشان داد. به موجب این موتاسیون، آمینواسید پرولین (CCA) به آمینو اسید گلوتامین (CAA) تبدیل می شود. با بررسی اطلاعات موجود در پرسش نامه این دو نفر مشخص گردید که هر دو آنها اولیگوسپرم و میزان ناهنجاری سر اسپرم در این دو فرد بسیار بالا (بیش از ۹۸ درصد) گزارش شده است.

بحث

عملکرد JHDM2A در انسان ناشناخته بوده و هیچ گزارشی در مورد آن وجود ندارد. بررسیهایی که تاکنون انجام شده بر روی حیوانات آزمایشگاهی چون موش بوده است . نرم افزار Clustal نشان داد که بین موش و انسان،۹۱ درصد مشابهت وجود دارد . در سال ۲۰۰۷ Okada و همکارانش، اگزون ۱۰ به سمت پایین دست ژن را حذف نمودند که این ناحیه بخش اصلی و عملکردی ژن، یعنی دمین jmjC را شامل می‌شود. نتایج حاصل از این حذف نشان داد که jhdm2a در اسپرم زایی به طور مستقیم به کمک تنظیم بیان ژنهای هدف اختصاصی آن از قبیل پروتئینهای گذرای هسته ای و پروتامینها شرکت می کند و نقص در آن منجر به اولیگوسپرمی و در نهایت ناباروری در موشها می شود (۸). بررسیهای دیگری در سال ۲۰۰۹ توسط Liu و همکارانش مجدداً روی موش صورت گرفت که محدوده بین اگزون ۱۷ تا ۲۵ که حاوی دمین دمتیلازی jhdm2a است، حذف شد. Crem یک فاکتور رونویسی مهم در سلولهای جنسی است و به همراه کمک فعال کننده اش، Act، بیان ژنهای لازم برای فشرگی اسپرم را تنظیم می کند. طبق این آزمایش در موشهای دارای حذف دمین عملکردی JHDM2A، بیان Act حدود ۷۰ درصد کاهش می یابد که به دنبال آن بیان ژنهای هدف آنها یعنی Tnp1، Tnp2، Prm1 وPrm2 نیز کاهش می یابد. در نتیجه jhdm2a به طور غیر مستقیم روی بیان پروتامینها اثر می گذارد(۷). در مطالعه حاضر با انجام مطالعات بیوانفورماتیک، شباهت پروتئین JHDM2A انسان با موش تا حد زیادی دیده شد. لذا به نظر می رسد که با وجود این شباهت، این ژن در باروری انسان نیز نقش به سزایی داشته، به طوری که وجود موتاسیون در آن موجب ایجاد ناهنجاری در اسپرم و بروز ناباروری گردد. وجود موتاسیون در افراد نابارور دارای ناهنجاری بالای اسپرم بر اساس باند های ایجاد شده روی ژل آکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. در اگزون ۲۳ موتاسیونی دیده نشد (الگوی باند ها در تمام افراد مورد مطالعه مشابه افراد کنترل و نرمال بود) اما در دو فرد نابارور موتاسیونی از نوع جانشینی در محدوده اگزون ۱۳ در نوکلئوتید شماره ۳۳۸۳۸ مربوط به آمینو اسید شماره ۶۴۵ دیده شد. اگزون ۱۳ در دمین انگشت روی (Zink finger) این آنزیم قرار گرفته و طبق مطالعات مختلف (انجام گرفته در موش) به نظر می رسد jhdm2a توسط این دمین مستقیما به پروموتر Tnp1 و Prm1 متصل می‌شود و به طور مستقیم رونویسی آنها را فعال می‌کند. از آنجایی که هرگونه تغییر در توالی نوکلئوتیدی ممکن است باعث تغییر در عملکرد طبیعی پروتئینها شود، بنابر این، این جهش نیز میتواند توانایی اتصال آن به DNA را کاهش داده و با کاهش بیان پروتئینهای لازم برای بلوغ و فشردگی اسپرم، دلیلی برای افزایش ناهنجاری سر اسپرم در این افراد باشد که به نظر می رسد به ناباروری منجر شده است.

بنابر این، این احتمال وجود دارد که این موتاسیون بتواند دلیل ناباروری در این افراد باشد. از طرف دیگر چون این ژن روی کروموزوم ۲ قرارگرفته است، می تواند به فرزندان دختر و پسر منتقل شود. با انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر قسمت های این ژن، امید است بتوان میزان دقیق تأثیر آن را بر روی ناباروری مشخص نمود.

تشکر و قدردانی: با تشکر از همکاری بخش آندرولوژی مرکز باروری- ناباروری اصفهان که در تهیه نمونه همکاری کرده اند.

منابع

1-Anand, R. and Marmorstein, R. 2007. Structure and mechanism of Lysine-specific Demethylase Enzyme. Journal of Biological Chemistry. 282;(49), 35425-35429.

2-Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B. and Eddy, E.M. 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. Nature Genetics. 28, 82-86.

3-D'Occhio, M.J., Hengstberger, K.J. and Johnston, S.D. 2007.Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. Animal Reproduction Science. 101(1-2), 1-17.

4-De Yebra, L., Ballesca, J.L., Vanrell, J.A., Corzett, M., Balhorn, R. and Oliva, R. 1998. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2. Fertility and Sterility. 69(4), 755-759.

5-Kierszenbaum, A.L. 2001. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. Molecular Reproduction and Development**.** 58 (4), 368–375.

6-Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. Nature Reviews Genetics. 7, 715-727.

7-Liu, Z., Zhou, S., Liao, L., Chen, X., Meistrich, M. and Xu, J. 2009. The Jmjd1a Demethylase-Regulated Histone Modification Is Essnetial for Crem-Regulated Gene Expression and Spermatogenesis. Journal of Biological Chemistry.

8-Okada, Y., Scott, G., Ray, M. K., Mishina, Y. and Zhang, Y. 2007. Histone demethylase JHDM2A is critical for *Tnp1* and *Prm1* transcription and spermatogenesis. Nature. 450, 119-123.

9-Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. Human Reproduction. 12(4), 417-435.

10-Poongothai, J., Gopenath, T.S. and Manonayski, S. 2009. Genetics of Human male infertility. Singapore Medicine Journal. 50(4), 336-346.

11-Saccani, S. and Natoli, G. 2002. Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurding at tightly regulated inducible inflammatory genes. Genes and Development. 16, 2219-2214.

12- Shi, Y., Lan,F., Maston, C., Mulligan, P., Whetsyine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell. 119(7), 941-953

13-Sunnucks, P.,Wilson, A.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J. and Taylor, A.C. 2000. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. Molecular Ecology. 9(11), 1699-1710.

14-Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature. 439, 811-816.

15-Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. Cell 125(3), 483-495.

16-Zamudio, N.M., Chong, S., O'Bryan, M.K. 2008. Epigenetic regulation in male germ cells. Society for Reproduction and Fertility. 136, 131-146.

17-Zhao, M., Shirely, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, RR. Boissonneault G, Yanagimachi R and Meistrich ML. 2004. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. Genesis. 38(4), 200-213.

18-Zhao, M., Shirely, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H., Weil, M.M., Russell, L.D., Behringer, R.R. and Meistrich, M. L. 2001. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. Molecular and Cell Biology. 21(21), 7243-7255.

Mutation detection in Exon 13 and 23 and a certain part of intron 12 of jhdm2a gene in human and its association with male's infertility

Soleimanpour E.[1], Hojati Z.[1] and Nasr Esfahani M.H.[2]

[1] **Genetics Division, Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran**

[2] **Andrology Dept., Royan Institute, Isfahan, I.R. of Iran**

Abstract

JHDM2A (JmjC-domain-containing histone demethylase 2A, also known as JMJD1A) is essential for spermatogenesis and is a key epigenetic regulator expressed in the testis. It specifically demethylates lysine 9 of mono- and di-methylated histone H3. JHDM2A directly or indirectly bound to the core promoter regions of transition nuclear protein and protamine genes, the products of which are required for packaging and condensation of sperm chromatin. In this work, 150 infertile men were studied. 150 normal healthy fathers were voluntarily contributed to this study. These men have been proven to be either oligospermia or azoospermia. Bioinformatics analysis has revealed a 91% similarity between jhdm2a gene in human and mouse, as shown by using Clustal software. Exon 13 and 23 and some part of intron 12 were selected and screened for any mutation. SSCP analysis was performed in order to identification of the mutation. No mutation was detected in exon 23. Different SSCP patterns were observed for two infertile men, in comparison with the others (controls and infertile men). A single nucleotide substitution C33838→A was detected in exon 13. A prolin→glutamin exchange in Zink Finger domain of the enzyme that is produced by this mutation may be associated with male infertility.

Key words: JmjC-domain-containing histone demethylase 2A(JHDM2A(JmjC)), men infertility, SSCP, Bioinformatic