Review Article

The role of Musashi protein in spermatogenesis and male infertility

Talebi-Yazdabadi Z[1], Dormiani K[2], Forouzanfar M[3], Lachinani L[3], Tavalaee M[4], Nasr-Esfahani MH[4*]

1- Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran.
2- Department of Molecular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran.
3- Department of Molecular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran.
4- Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 2018/12/16 | Accepted: 2019/05/7

Abstract:

Background: Inactivation of transcription occurs during two phases of spermatogenesis. First, in spermatocytes entering the primary meiosis and the second in round and elongating spermatids. These stages of inactivated transcription demand extensive regulation of translation. Therefore, presence of the control on gene expression during spermatogenesis seems essential. In the cases that post-transcription controlling mechanisms show an abnormal function, spermatogenesis will be impaired. RNA-binding proteins have an important effect in this phenomenon. One group of these proteins is Musashi family that plays a critical role during spermatogenesis and this study aimed to examine the role of this protein family during spermatogenesis**.**

Materials and Methods: This study was a review article and the selection of the papers was done using Google scholar, PubMed and Scopus databases and special key words. Then, all related English-language papers between 1994 and 2018 were considered**.**

Results: Several studies showed that Musashi 1 had an important role in the early stage of spermatogenesis in which spermatogonia and gonocytes proliferate, while Musashi 2 had a central role during the late stage of spermatogenesis for differentiation of spermatocytes and spermatids.

Conclusion: Musashi proteins have a critical role during spermatogenesis. Severe pathological defects were detected in transgenic models with knockdown or knockout Musashi, including sperm abnormal morphology, DNA fragmentation and low fertilization potential.

Keywords: Spermatogenesis, Sperm parameters, RNA binding proteins, Musashi, Male Infertility

***Corresponding Author:**
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org
Tel: 0098 319 501 5680
Fax: 0098 319 501 5687

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 3, Pages 308-317

Please cite this article as: Talebi-Yazdabadi Z, Dormiani K, Forouzanfar M, Lachinani L, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. The role of Musashi protein in spermatogenesis and male infertility. ***Feyz*** 2019; 23(3): 308-17.

نقش پروتئین Musashi در اسپرماتوژنز و ناباروری مردها

زهره طالبی یزدآبادی [۱و۲]، کیانوش درمیانی [۳]، محبوبه فروزانفر [۴]، لیانا لاچینانی [۵]، مرضیه تولائی [۶]، محمّدحسین نصراصفهانی [۷*]

خلاصه:

سابقه و هدف: توقف رونویسی در طی دو مرحله از فرآیند اسپرماتوژنز اتفاق می‌افتد: بار نخست در اسپرماتوسیت‌هایی که وارد میوز اوّلیه می‌شوند و دیگری در اسپرماتیدهای کروی در حال طویل‌شدن. این مراحل متوقف‌شدن رونویسی نیازمند تنظیمات گسترده‌ی ترجمه هستند. بنابراین وجود کنترل بعد از رونویسی برای تنظیم بیان ژن ضروری به‌نظر می‌رسد. در مواردی که مکانیسم‌های کنترل پس از رونویسی عملکرد غیرطبیعی داشته باشند، فرآیند اسپرماتوژنز مختل می‌شود. پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA نقش مهمّی در این مکانیسم‌ها دارند. یک گروه از این پروتئین‌ها متعلق به خانواده Musashi هستند که نقش مهمّی در اسپرماتوژنز دارند و هدف این مطالعه‌ی مروری، بررسی اهمیت این خانواده از پروتئین‌ها در طی فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک مطالعه مروری است و انتخاب مقالات از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی Google scholar، PubMed و Scopus بر اساس واژگان کلیدی صورت گرفت. سپس تمام مقالات انگلیسی‌زبان مرتبط بین سال‌های ۲۰۱۸-۱۹۹۴ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: مطالعات متعددی نشان داده‌اند که Musashi 1 در ابتدای اسپرماتوژنز نقش مهمّی در تکثیر اسپرماتوگونی‌ها و گنوسایت‌ها دارد، در حالی‌که در اواخر اسپرماتوژنز، این Musashi 2 است که در تمایز اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نقشی حیاتی ایفا می‌نماید.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های Musashi در فرآیند اسپرماتوژنز نقش حیاتی دارند. در مدل‌های تراریخت که بیان پروتئین‌های Musashi در آن‌ها کاهش یافته یا متوقف شده است، نقایص پاتولوژیکی شدیدی از جمله غیرطبیعی‌بودن مورفولوژی اسپرم، آسیب DNA و کاهش قدرت باروری مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اسپرماتوژنز، پارامترهای اسپرمی، پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA، Musashi، ناباروری مردها

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸، صفحات ۳۱۷-۳۰۸

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی، ناباروری را ناتوانی در باروری بعد از ۱۲ ماه نزدیکی منظم زوجین بدون استفاده از روش پیشگیری تعریف می‌کند. ناباروری یک مشکل روبه‌رشد در کشورهای توسعه‌یافته در سراسر جهان است [۱].

محققان گزارش کرده‌اند که در نیمی از ناباروری‌های زوجین، فاکتورهای مردانه مطرح می‌شود که ۳۰ درصد از آن‌ها خاصّ مردان و ۲۰ درصد آن به‌طور مشترک بین زوجین است [۲]. بلوغ گامت‌ها در جنس نر طی فرآیند «اسپرماتوژنز» صورت می‌گیرد و یکی از پیچیده‌ترین وقایع تمایزی است که در بیولوژی تکوین رخ می‌دهد و نیاز به کنترل تنظیم بیان ژن دارد. فرآیند اسپرماتوژنز، با تمایز سلول‌های جنسی پیش‌ساز اسپرماتوگونیایی به سلول‌های اسپرماتوگونی درون لوله‌های منی‌ساز بیضه آغاز می‌شود. اسپرماتوگونی‌ها، جمعیتی از سلول‌های بنیادی لازم برای تولید مداوم اسپرم در طول زندگی فرد را تشکیل می‌دهند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیایی به‌منظور تولید اسپرماتوسیت‌های اوّلیه، تقسیمات میتوزی انجام می‌دهند، سپس اسپرماتوسیت‌ها با انجام دو تقسیم میوزی تشکیل اسپرماتیدهای کروی هاپلوئید را می‌دهند. تمایز این اسپرماتیدهای کروی به اسپرماتوزوآی نابالغ نیز طی فرآیند «اسپرمیوژنز» انجام می‌شود [۳]. به‌دنبال تکمیل تمایز سلولی، اسپرماتوزوآی نابالغ از لوله‌های منی‌ساز رها شده و به سمت اپیدیدیم پیش می‌رود. فرآیند اسپرماتوژنز وابسته به هورمون‌های مردانه (آندروژن‌ها) است و در تمامی مراحل آن به منظور حمایت و تغذیه، به ارتباط فیزیکی بین سلول‌های جنسی در حال تکوین با سلول‌های سرتولی نیاز است [۴]. در اواخر

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مؤسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی، استان اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولیدمثل، اصفهان، ایران

۳. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری مولکولی، اصفهان، ایران

۴. دانشجوی دکتری، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری مولکولی ، اصفهان، ایران

۵. کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری مولکولی، اصفهان، ایران

۶. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

۷. استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشکده زیست فناوری

تلفن: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۰ **دورنویس:** ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۷

پست الکترونیک: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۲/۱۷

اسپرماتوژنز، کروماتین اسپرم توسط یک‌سری از پروتئین‌های هسته‌ای متراکم می‌شود [۵]، به این منظور در ابتدا پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم، تحت‌عنوان «پروتئین‌های انتقالی» جایگزین هیستون-های سوماتیک در اسپرماتیدهای کروی می‌شوند. سپس درون اسپرماتیدهای در حال طویل‌شدن، پروتامین‌ها جایگزین پروتئین‌های انتقالی می‌شوند، به‌طوری که DNAی اسپرم حاوی ۱۵ درصد هیستون و ۸۵ درصد پروتامین می‌شود. این جایگزینی هیستون توسط پروتامین‌ها سبب تراکم بالای DNA در سلول اسپرم شده و همچنین آن را در برابر انواع دناتوره شدن‌های فیزیکی و شیمیایی حفظ می‌کند. بدیهی است که این روند طبیعی متراکم‌شدن کروماتین اسپرم در مردها بسیار حائز اهمیت بوده، هرگونه نقص در این جایگزینی، سبب کاهش پایداری DNA و افزایش حساسیت در برابر انواع استرس‌ها شده و درنهایت بر قدرت باروری و نیز رشد و نمو اوّلیه جنین تأثیر می‌گذارد [۱۰-۶]. بنابراین به‌علت تراکم بالای کروماتین و در دسترس نبودن آن برای سنتز RNA، فرآیند رونویسی در سلول اسپرم خاموش می‌شود. غیرفعال‌شدن رونویسی در دو مرحله از فرآیند اسپرماتوژنز مشاهده می‌شود، یک‌بار، در طی میوز اوّلیه زمانی‌که سلول، DNAی خود را به‌منظور انجام نوترکیبی هومولوگ در کروموزوم ترمیم می‌کند و دوم، هنگامی‌که اسپرماتیدهای کروی در حال طویل‌شدن هستند و به سمت بلوغ اسپرماتوزوآ پیش می‌روند که در این زمان پروتامین‌ها به‌منظور بسته-بندی کروماتین در ناحیه‌ی سر اسپرم جایگزین هیستون‌ها می‌شوند [۱۱]. اگرچه در این مراحل رونویسی کاملاً متوقف شده‌است، ولی هنوز به بیان پیوسته‌ی گروهی از ژن‌ها به‌منظور تضمین ادامه‌ی تکوین سلول‌های جنسی نیاز است. این سلول‌ها از طریق استفاده از پروتئین‌های متصل‌شونده به RNAی دارای توالی‌های اختصاصی، فرآیند رونویسی را از ترجمه جدا کرده، تا حدّی بر این شرایط به-وجودآمده درون سلول غلبه می‌کنند. این پروتئین‌ها درون سلول به مقدار زیاد و یا به‌صورت ویژه بیان می‌شوند. با استفاده از این پروتئین‌ها، سلول قادر است mRNAهای ترجمه‌نشده را تا زمان شروع مجدد رونویسی ذخیره کرده، به اجزای ریبونوکلئوپروتئینی (RNPs) تبدیل کند، این رونوشت‌ها تا زمانی که نیاز به پیرایش و ترجمه‌ی آن‌ها باشد، باقی می‌مانند [۱۲]. بنابراین در فرآیند اسپرماتوژنز کنترل پس از رونویسی، مهم‌ترین جنبه‌ی تنظیم بیان ژن است و در مواردی که مکانیسم‌های کنترل پس از رونویسی عملکرد غیرطبیعی داشته باشند اسپرماتوژنز مختل شده، در نتیجه گامت‌های غیرطبیعی تولید می‌شود [۱۳]. در اسپرماتوژنز عمدتاً کنترل پس از رونویسی به‌وسیله‌ی پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA (RNA binding proteins; RBPs) انجام می‌گیرد [۳]. RBPs گروه بزرگی از پروتئین‌ها هستند که با اتصال به توالی‌های خاصّی از RNAی هدف، بیان آن را با استفاده از یک‌سری مکانیسم‌های مولکولی تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌ها حداقل دارای یک جایگاه شناسایی RNA هستند که مسؤول شناسایی موتیف خاصّی از توالی RNA هدف است. حضور RBPs در تنظیمات پس از رونویسی ضروری است و به عنوان یک میانجی‌گر رایج برای کنترل بیان ژن در سلول عمل می‌کند. نقش ضروری آن‌ها در اسپرماتوژنز در فرآیند تکوین گامت‌ها درون بیضه به خوبی اثبات شده‌است [۱۳]. این پیشنهاد مطرح شده‌است که در تکثیر و تمایز سلول‌های جنسی نر، RBPs مسؤول اصلاحات بعد از رونویسی در طی دوره‌های توقف رونویسی هستند [۱۴]. اخیراً در مطالعه‌ای به خانواده‌ی (Msi) Musashi از دسته RBPs اشاره شده‌است که اوّلین‌بار در دروزوفیلا به عنوان تنظیم‌کننده‌ی اصلی نمو سلول‌های زایای بیضه و میوز شناخته شده و همچنین گزارش شده است که برای نمو سلول اسپرم و حفظ پتانسیل باروری موش نقش حیاتی دارد [۳]. در اوایل دهه ۱۹۹۰، گروهی از دانشمندان متخصص نوروبیولوژی، ژن جدیدی را کشف کردند که جهش در این ژن، در تعیین سرنوشت سلول‌های پیش‌ساز اندام حسّی دروزوفیلا تغییراتی ایجاد می‌کرد. در حالت عادی، در تکوین اندام حسّی خارجی دروزوفیلا دو نوع سلول پیش‌ساز عصبی (IIb) و غیرعصبی (IIa) شکل می‌گیرد. با موتاسیون در این ژن، دو سلول غیرعصبی به وجود آمده که منجر به ایجاد زایده‌های حسّی دوشاخه می‌شود. بنابراین به دلیل شباهت این فنوتایپ به سبک مبارزه با دو شمشیر توسط قهرمان ملی ژاپن (میاموتو موساشی) این ژن را "Musashi" نامیدند [۱۵]. از زمان کشف آن، ارتولوگ‌های پروتئین Msi در تعدادی از گونه‌های یوکاریوتی از جمله: زنوپوس، موش و انسان شناسایی شده‌است [۱۱]. پروتئین Msi، دارای ۳۶۲ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون است [۱۶]. اعضای این خانواده‌ی پروتئینی دارای دو توالی پشت‌سر هم شناسایی‌کننده‌ی RNA (RNA recognition motifs; RRMs) هستند که توسط یک لینکر کوتاه از یکدیگر جدا شده‌اند [۱۷]. این دو توالی در ناحیه‌ی N -ترمینال پروتئین واقع شده، در میان گونه‌ها بسیار حفاظت‌شده هستند (شکل شماره ۱)؛ به-طوری‌که در گونه‌های موش و انسان کاملاً شبیه به یکدیگرند [۱۸] و در گونه‌هایی مانند سینورابدیتیس الگانس ۷۶-۷۴ درصد از اسیدهای آمینه این توالی‌ها با توالی RRM انسانی شباهت دارند [۱۹]. بر اساس مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی، RRM1 به‌طورمستقیم و به صورت اختصاصی به توالی موردنظر در RNAی هدف متصل می-شود، در حالی‌که RRM2 بیشتر نقش حمایتی دارد و باعث افزایش کارایی این اتصال تا حدود ۱۰۰ برابر می‌شود [۱۷]. این توالی‌های

شناسایی‌کننده به یک توالی مورد توافق اختصاصی غنی از پلی-یوریدین درون ناحیه‌ی غیرقابل ترجمه‌ی 3'-UTR از رونوشت‌های mRNAی هدف متصل می‌شوند و عملکرد تنظیمی خود را انجام می‌دهند [۲۰]. برخلاف سایر hnRNPها که عمدتاً در نوکلئوپلاسم قرار گرفته‌اند، پروتئین Msi معمولاً در سیتوپلاسم یافت‌شده، باتوجه به عملکرد آن در تنظیم ترجمه، درون قطعات پلی‌زومی تجمع می-یابد. همچنین این پروتئین را در هسته نیز می‌توان مشاهده کرد. دو سیگنال خروج از هسته در هریک از نواحی RRM1 و RRM2 به ترتیب به نام‌های cNLS و pNLS قرار گرفته‌اند (شکل شماره ۱). در مهره‌داران، دو همولوگ پروتئین Msi به نام‌های Msi-1) Musashi-1 و (Msi-2) Musashi-2 شناسایی شده‌اند [۲۱]. توالی‌های Msi-1 و Msi-2 شباهت بسیار زیادی با یکدیگر دارند و به‌نظر می‌رسد که از یک ژن اجدادی مشترک به‌وجود آمده‌اند [۲۲]. با توجه به مطالعاتی که تاکنون در زمینه‌ی بیان نقش ضروری RBPs در تنظیمات پس از رونویسی، به‌ویژه در فرآیند اسپرماتوژنز انجام گرفته است، این مطالعه در نظر دارد که با مروری بر مطالعات گذشته، اهمیت بیان پروتئین Msi را به‌عنوان یکی از RBPs، در سلول‌های جنسی نر بررسی کرده، نقش آن را در باروری جنس نر بیان کند.

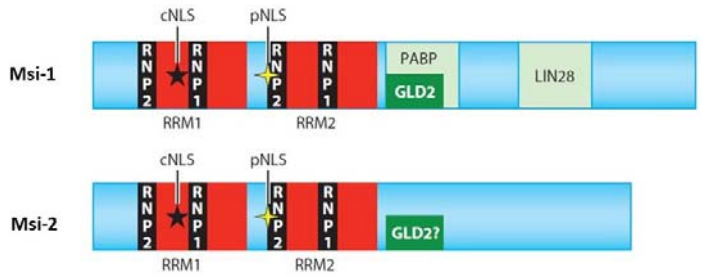
مواد و روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه مروری بوده و انتخاب مقالات از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed, Google scholar, Scopus با استفاده از کلمات کلیدی انجام گرفت. در ابتدا از واژگان کلیدی Musashi, RNA binding proteins استفاده شد که نتیجه ۲۸۰ یافته بود. با توجه به این‌که هدف اصلی مقاله بررسی عملکرد پروتئین Musashi در فرآیند اسپرماتوژنز است، به‌منظور نگارش قسمت نتایج این مقاله، از کلیدواژه‌های Sperm, Spermatogenesis, Male infertility نیز استفاده شد. در پایان، یافته‌های مشترک بین پایگاه‌های اطلاعاتی، مقالات غیر زبان انگلیسی و مقالات غیر مرتبط با پژوهش کنار گذاشته شد و ۴۳ مقاله مرتبط از سال ۲۰۱۸-۱۹۹۴ انتخاب و وارد مطالعه شدند.

نتایج

اعضای خانواده‌ی پروتئینی Msi در انواع بافت‌ها و سلول-های مختلف از جمله: فولیکول‌های مو، سلول‌های روده‌ای، اپیتلیالی و نیز در سلول‌های بنیادی کبد، مغز، سیستم اعصاب مرکزی و رحم بیان شده‌اند [۱۱]. در طی چندین سال گذشته، مطالعات زیادی، افزایش بیان پروتئین‌های Msi را در انواع تومورهای مغزی، سینه، پانکراس، کولون، ریه، تخمدان و مثانه گزارش کرده‌اند. همچنین، افزایش بیان این پروتئین‌ها در انواع سرطان‌های خونی CML، AMLو ALL نیز گزارش شده است. میزان بیان پروتئین Msi در سلول‌های توموری در مقایسه با سلول‌های طبیعی بالاتر بوده، در این سلول‌ها میزان تمایز کمتر، تهاجم بیشتر، متاستاز به غدد لنفاوی در تومورها برجسته و همچنین افزایش بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مشاهده شده‌است [۲۳]. Msi-1 به مقدار زیاد در سیستم اعصاب مرکزی جنین‌ها و بزرگسالان بیان می‌شود و در حفظ ویژگی بنیادی سلول‌ها، تمایز و ایجاد تومور نقش کلیدی دارد [۳]. نشان داده شده-است موش‌های بدون Msi-1 دچار هیدروسفالی انسدادی و مرگ زودهنگام بعد از تولد می‌شوند [۲۴]، کمبود Msi-2 نیز در موش‌ها باعث مرگ ۵۰ درصد از آن‌ها در دوران جنینی شده، زمانی‌که این موش‌ها با یکدیگر آمیزش داده شدند، کاهش باروری در آن‌ها مشاهده شد [۲۵]. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بیان ژنومی نشان داده‌است که پروتئین‌های Msi به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بیان بسیاری از ژن‌ها را کنترل می‌کنند و بنابراین نقش مهمّی در تنظیم بیان ژن دارند [۲۶]. اخیراً با کمک روش‌هایی از جمله RIP-PCR، برخی از ژن‌های هدف مستقیم پروتئین Msi-2 شناسایی و گزارش شده است که mRNAهای رونویسی شده از این ژن‌های هدف این پروتئین در مسیرهای تنظیم‌کننده‌ی ترجمه RNA، عملکرد سلول‌های بنیادی و نیز مسیر پیام‌رسانی TGF-β درگیر هستند [۲۷]. همچنین بر اساس مطالعات انجام‌شده بر روی رده‌های سلولی مختلف، ژن‌هایی که به‌طورمستقیم مورد هدف Msi-1 قرار می‌گیرند، در ارتباط با تکثیر، تمایز و چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و ترمیم DNA هستند [۲۱]. مطالعات متعددی که بر روی سلول‌های بنیادی و توموری، انجام شده‌اند؛ عملکرد Msi-1 را از طریق مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی مشخص کرده‌اند. ژن NUMBیکی از شناخته‌شده‌ترین ژن‌های هدف Msi-1 است و مهارکننده‌ی مسیر پیام‌رسانی Notch محسوب می‌شود. Msi-1 با اتصال به ناحیه‌ی 3'-UTR ژن NUMB، بیان آن را در سطح ترجمه کاهش داده، از این طریق سبب افزایش فعالیت مسیر Notch می‌شود [۲۸]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۰، گزارش شد که مسیر پیام‌رسانی Wnt می‌تواند سبب فعال‌سازی بیان Msi-1 شود [۲۹]. با توجه به این‌که هدف اصلی این مقاله، بیان نقش و عملکرد پروتئین‌های Msi در اسپرماتوژنز است، بنابراین در ادامه به نقش و اهمیت این پروتئین‌ها در اسپرماتوژنز و اثر آن‌ها در باروری جنس نر پرداخته می‌شود. در سال ۲۰۰۶ با انجام مطالعه‌ای بر روی بیضه‌ی دروزوفیلا گزارش شد که dMsi در اسپرماتوسیت‌ها برای جداشدن صحیح کروموزوم‌های میوزی و نیز سیتوکینز نیاز است. بر

اساس مشاهدات این گروه در اسپرماتیدهای کروی اوّلیه در نمونه‌های وحشی، هسته و همچنین میتوکندری‌های حاصل از تقسیم تقریباً قطر مشابهی دارند، اما در نمونه‌های جهش‌یافته‌ی dMsi عموماً اسپرماتیدهای کروی اوّلیه دارای دو یا چهار هسته بود و تعداد زیادی میتوکندری حاصل از تقسیم در آن‌ها مشاهده شد [۳۰]. در سال ۲۰۱۴، در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) میزان بیان ژن‌های *Msi*-1 و *Msi*-2 در کلّ بافت بیضه‌ی موش ارزیابی و گزارش شد. mRNAی *Msi*-1 زمانی‌که سلول‌های اسپرماتوسیت I به اسپرماتوسیت II تمایز می‌یابند (روز ۱۱ پس از تولد) و نیز هنگام تمایز اسپرماتوسیت II به سلول اسپرماتید (روز ۲۲ پس از تولد) بیشترین بیان را داشته‌اند. در مقابل، بیان mRNAی *Msi*-2 در ابتدا و انتهای اسپرماتوژنز (روز ۲ و ۶۰ پس از تولد) افزایش داشته است. با توجه به این موضوع که بیضه متشکل از سلول‌های جنسی و سوماتیک است، به منظور دستیابی به بیان این ژن‌ها در سلول‌های جنسی، تکنیک qPCR بر روی جمعیت‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های پاکی‌تن و اسپرماتیدهای گرد انجام گرفت و نشان داده‌شد ژن *Msi*-1 در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتیدهای گرد بیشترین بیان را دارد؛ در حالی‌که در اسپرماتیدهای گرد ژن *Msi*-2 افزایش بیان را دارد. این گروه به‌منظور بررسی اثر افزایش بیان *Msi* بر روی اسپرماتوژنز و نیز عملکرد اسپرم، موش‌های تراریختی طراحی کردند که در آن‌ها بیان *Msi*-1 و *Msi*-2 بسیار بالا بود. اندازه‌ی بافت بیضه در موش‌های ترانس‌ژن *Msi*-1 تقریباً ۱۷ درصد و در ترانس‌ژن‌های *Msi*-2 حدود ۴۲ درصد کاهش یافته بود. علاوه بر این، میزان آسیب DNA، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و در کل غیرطبیعی بودن پارامترهای اسپرمی و درنهایت میزان ناباروری در ترانس‌ژن‌های *Msi*-2 نسبت به موش‌های ترانس‌ژن *Msi*-1 بیشتر مشاهده شد. در یکی دیگر از نتایج بسیار جالب به‌دست‌آمده نشان داده‌شد که حیوانات با ترانس‌ژن *Msi*-1 بارور بوده، تنها دارای اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی و همچنین قابلیت اتصال پایین به لایه‌ی زوناپلوسیدای تخمک در شرایط آزمایشگاه بودند [۳۱]. این گروه در همان سال با انجام پژوهشی دیگر به نتایج مهمّ دیگری دست یافتند. آن‌ها نشان دادند که در ناحیه‌ی 3'-UTR ژن *Msi*-2، سه ناحیه‌ی اتصالی برای پروتئین Msi-1 وجود دارد. آنان برای اثبات ادعای خود از موش‌های تراریخت اختصاصی بیضه استفاده کردند تا در آن‌ها ژن *Msi*-1 در تمام مراحل اسپرماتوژنز افزایش بیان داشته باشد. آنالیز qPCR اسپرماتوسیت‌های مرحله‌ی پاکی‌تن در این موش‌ها نشان داد که میزان بیان mRNAی *Msi*-2 نسبت به نمونه‌های وحشی حدود ۲/۵ برابر کاهش یافته‌است. همچنین تمایز سلول‌های جنسی در این موش‌ها با تأخیر همراه بود و شواهدی از حضور آپوپتوز مشاهده شد که این موضوع می‌تواند سبب افزایش شکل‌گیری اسپرم‌های غیرطبیعی و در نهایت کاهش پتانسیل باروری شود. این محققان به منظور تشخیص جایگاه قرارگیری Msi-1 در اسپرماتوسیت‌های مرحله‌ی پاکی‌تن با استفاده از تکنیک IP (Immunoprecipitation) هم‌مکانی Msi-1 با Importin 5 را در دامنه XY-body در هسته‌ی اسپرماتوسیت‌ها اثبات کردند و از طریق دنبال‌کردن تعدادی مارکر هسته‌ای از جمله γ-H2AFX نشان دادند که Msi-1 در هسته‌ی اسپرماتوسیت‌ها در دامنه XY-body که در آن رونویسی محدود شده است، قرار دارد [۳۲]. در سال ۲۰۱۵ نیز، در مطالعه‌ای گزارش شد که در شرایط استرس حرارتی، درون سلول‌های سرتولی موش‌های جهش‌یافته‌ی فاقد *Msi*-1 مارکرهای پیش آپوپتوزی به صورت قابل‌توجهی افزایش می‌یابند (شکل شماره ۳) [۳۳]. در جدول شماره ۱، مجموعه‌ای از مطالعات انجام‌گرفته بر روی خانواده‌ی پروتئینی Msi جمع‌آوری شده است.

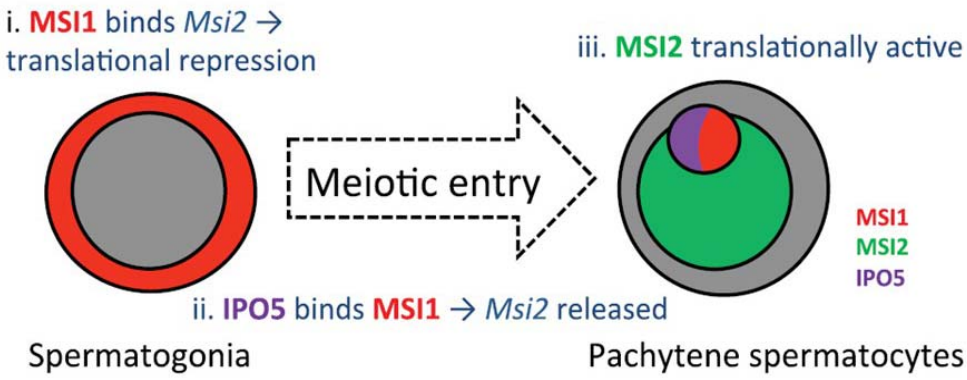


شکل شماره ۱- شکل شماتیک دومین‌های شناخته‌شده‌ی پروتئین‌های **Msi-1** و **Msi-2**.

دو توالی RRM (قرمز) در ناحیه‌ی N-ترمینال پروتئین Msi مشاهده می‌شود که هر کدام حاوی توالی‌های RNP (سیاه) است. درون RRM1 سیگنال خروج از هسته کلاسیک (ستاره سیاه-رنگ: cNLS) و درون ناحیه‌ی RRM-2 یک پپتید شبیه به سیگنال هسته‌ای (ستاره زردرنگ: pNLS) وجود دارد. در نیمه‌ی C-ترمینال از Msi-1 در مجاور RRM-2 یک توالی برای اتصال PABP و یک توالی دیگر برای اتصال LIN-28 وجود دارد. همچنین در پروتئین Msi-1 یک توالی برای اتصال GLD-2 دیده می‌شود که ممکن است در پروتئین Msi-2 نیز وجود داشته باشد [۲۱].

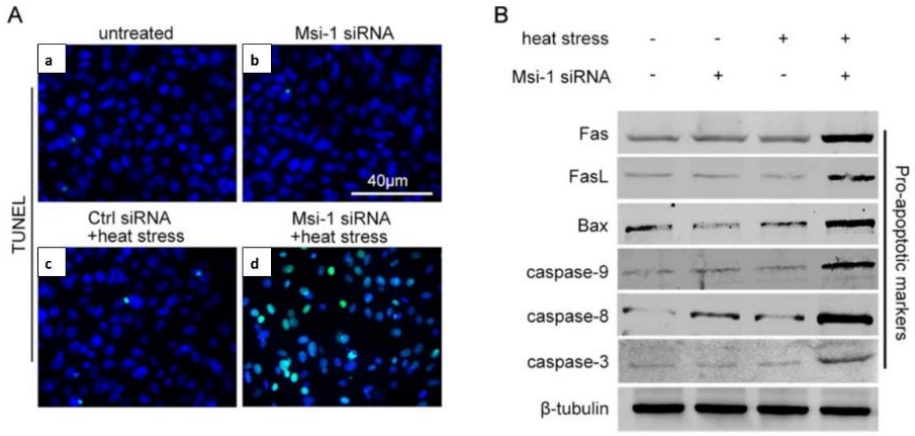
جدول شماره ۱- مجموعه‌ای از مطالعات انجام‌گرفته بر روی پروتئین Msi

نام نویسنده مطالعه	سال انجام مطالعه	خلاصه نتایج
Richter K	۱۹۹۰	کشف یک ژن اختصاصی سیستم عصبی همولوگ Msi-1 در زنوپوس
Nakamura M	۱۹۹۴	کشف و نام‌گذاری ژن *Msi* در سلول‌های پیش‌ساز اندام حسّی دروزوفیلا
Imai T	۲۰۰۱	کشف ژن NUMB به‌عنوان یکی از ژن‌های هدف Msi-1
Sakakibara S	۲۰۰۲	شاخته‌شدن نقش ضروری ژن *Msi*-1 در سیستم اعصاب مرکزی موش
Siddall NA	۲۰۰۶	کشف ژن dMsi در سلول‌های اسپرماتوسیت دروزوفیلا که برای جداشدن صحیح کروموزوم‌های میوزی و سیتوکینز نیاز است.
Kong DS	۲۰۰۸	افزایش بیان ژن *Msi*-1 در تومورهای مغزی گلیوما
Gotte M	۲۰۰۸	افزایش بیان ژن *Msi*-1 در سرطان کارسینوما
Rezza A	۲۰۱۰	فعال‌سازی بیان Msi-1 توسط مسیر پیام‌رسانی Wnt
Wang XY	۲۰۱۰	تنظیم متاستاز سلول‌های توموری در سرطان سینه موش توسط پروتئین Msi-1
Kharas MG	۲۰۱۰	افزایش بیان ژن Msi-2 در سرطان خون AML در موش
de Andres□Aguayo L	۲۰۱۱	تشخیص ضرورت بیان ژن *Msi*-2 در سلول‌های پیش‌ساز هماتوپوئیتیک با استفاده از مدل‌های موشی
Arumugam K	۲۰۱۲	شناخته شدن فعالیت خودتنظیمی پروتئین‌های Msi در زنوپوس بر روی ترجمه xMsi-1 در طی بلوغ تخمک
Rosenfeldt MT	۲۰۱۳	افزایش بیان ژن Msi-1 در لایه سلول‌های سرطانی ریوی در انسان
Sutherland JM	۲۰۱۴	شناخته‌شدن نقش ژن Msi-1 در تکوین ابتدایی سلول‌های درگیر در اسپرماتوژنز موش، تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیایی و ورود به مرحله‌ی میوز، و کشف عملکرد ژن Msi-2 در اواخر اسپرماتوژنز در تمایز و تکوین اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها
Sutherland JM	۲۰۱۵	معرفی ژن *Msi*-2 به‌عنوان یکی از اهداف پروتئین Msi-1 برای مهار ترجمه در طی تکوین سلول‌های جنسی اوّلیه موش نر
ErLin S	۲۰۱۵	ضرورت بیان ژن *Msi*-1 برای تشکیل گرانول‌های استرسی در سلول-های سرتولی موش و تشکیل سدّ خونی- بیضه‌ای



شکل شماره ۲- بیان افتراقی ژن‌های *Msi*-1 و 2 در رده سلول زایا

طبق این مدل Msi-1 در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها قبل از شروع فاز میوزی از بیان *Msi*-2 جلوگیری می‌کند. با شروع فاز میوزی Importin 5 (IPO5) به پروتئین Msi-1 متصل شده و آن را به هسته اسپرماتوسیت انتقال می‌دهد و در این زمان Msi-2 بیان می‌شود [۳۲].



شکل شماره ۳- Msi-1 از سلول‌های سرتولی در برابر آپوپتوز ناشی از استرس حرارتی محافظت می‌کند.

(A) در قسمت a گروهی از سلول‌های سرتولی تیمار نشده (دارای ژن *Msi*-1)، و در قسمت (b) نیز گروهی از سلول‌های سرتولی که در آن‌ها ژن *Msi*-1 توسط siRNA خاموش شده، نشان داده شده‌اند. استرس حرارتی در تعداد زیادی از سلول‌های سرتولی فاقد ژن *Msi*-1 سبب ایجاد آپوپتوز شده‌اند (علامت‌های سبزرنگ) (d). اما در گروه کنترل این آپوپتوز دیده نمی‌شود (c). (B) در شرایطی که تنها یک نوع تیمار (استرس حرارتی یا خاموش کردن ژن *Msi*-1 توسط siRNA) برای سلول‌های سرتولی انجام شده باشد، میزان پروتئین مارکرهای پیش آپوپتوزی (Fas, FasL, Bax, caspase-9, caspase-8, caspase-3) افزایش نیافته و میزان بیان شبیه به گروه سلول‌های سرتولی تیمار نشده است. اما اگر در سلول‌های سرتولی استرس حرارتی با خاموش‌شدن بیان ژن *Msi*-1 همراه باشد، این مارکرها به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابند [۴۳].

بحث

الگوی بیان گسترده‌ی Msi در بیضه نشان می‌دهد که احتمالاً Msi اهداف یا عملکردهای بیولوژیکی متعددی در ارتباط با تمایز سلول‌های جنسی دارد. در حمایت از این موضوع، در سال ۲۰۰۶ گزارش شد در جهش یافته‌های dMsi دروزوفیلا، تعداد هسته‌ها و میتوکندری‌های حاصل از تقسیم، در بیضه غیرطبیعی بوده و این موضوع بیانگر آن است که تقسیمات میوزی، فرآیند سیتوکینز و یا هردوی آن‌ها به طور صحیحی انجام نشده است. به‌علاوه، هسته‌ی هاپلوئیدی دارای سایزهای متفاوت بود که نتیجه‌ی خطا در جداسازی کروموزوم‌ها در طی میوز است [۳۰]. Sutherland در سال ۲۰۱۴ با مطالعه بر روی کلّ بافت بیضه‌ی موش گزارش کرد که mRNAی *Msi*-1 عمدتاً در سلول‌های اسپرماتوسیت و mRNAی *Msi*-2 غالباً در ابتدا و انتهای اسپرماتوژنز بیان می‌شود. اما با ارزیابی بیان این دو ژن در سلول‌های جنسی اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های پاکی‌تن و اسپرماتیدهای گرد، نتایج متفاوتی به دست آورد و نشان داد که ژن *Msi*-1 در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتیدهای گرد بیشتر بیان شده، در حالی‌که ژن *Msi*-2 در اسپرماتیدهای گرد افزایش بیان دارد. این تفاوت در نتایج حاصل از بررسی بافت بیضه و نیز سلول‌های جنسی بیضه به حضور سلول‌های سوماتیک بیضه و بیان ژن‌های *Msi* در این سلول‌ها نسبت داده شد و نتایج به این صورت تفسیر شد که Msi-1 در تکوین ابتدایی سلول‌های درگیر در اسپرماتوژنز، تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیایی و ورود به مرحله‌ی میوز دخالت دارد؛ در حالی که Msi-2 در اواخر اسپرماتوژنز نقش مهمّی در تمایز و تکوین اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها ایفا می‌کند. به علاوه، این محققان اثر بیان بیش از حدّ *Msi*-1 و *Msi*-2 را بر روی بافت بیضه موش در انتهای فرآیند اسپرماتوژنز بررسی و گزارش کردند شدت عوارض حاصل از بیان بیش از حدّ *Msi*-2 در بافت بیضه موش‌ها در مقایسه با افزایش بیان *Msi*-1، بسیار بیشتر است. بنابراین می‌توان گفت که ژن *Msi*-2 نسبت به ژن *Msi*-1 نقش مهم‌تری در سلول‌های جنسی و درنهایت باروری موش‌های نر ایفا می‌کند. عدم بیان هم‌زمان این دو پروتئین Msi-1 و Msi-2 نشان می‌دهد که عملکرد این دو همولوگ پروتئینی از یکدیگر مجزا است [۳۱]. Sutherland و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر گزارش کردند که بر روی توالی ژن *Msi*-2، سه ناحیه‌ی اتصالی برای پروتئین Msi-1 وجود دارد و بدین‌ترتیب احتمالاً *Msi*-2 یکی از اهداف جدید Msi-1 برای مهار ترجمه در طی تکوین سلول‌های جنسی اوّلیه است. این گروه در مطالعه‌ی قبلی گزارش کردند که Msi-1 در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها بیان می‌شود و در تحقیق اخیر به دنبال این موضوع بودند که چگونه Msi-1 به هسته‌ی اسپرماتوسیت‌ها انتقال می‌یابد؟! برای پاسخ به این سؤال، پس از تعیین جایگاه Msi-1 در هسته‌ی اسپرماتوسیت‌ها مدلی را که در شکل ۲ نشان داده شده است، پیشنهاد نمودند [۳۲]. جالب توجه است که پروتئین‌های Msi در شرایط استرس حرارتی بیضه نیز دارای اهمیت است. در پستانداران اسپرماتوژنز طبیعی به صورت مداوم در کیسه‌ی بیضه یا اسکروتوم در دمایی پایین‌تر از دمای بدن اتفاق می‌افتد [۳۴]. افزایش دمای بیضه، بر روند اسپرماتوژنز اثر گذاشته و از طریق

کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و عملکرد اسپرم، خطر ناباروری را در مردها افزایش می‌دهد [۳۹-۳۵]. سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت در برابر آسیب ناشی از حرارت مقاوم هستند [۴۰]. سلول‌های سرتولی، سلول‌های جنسی را از نظر ساختاری و نیز تغذیه محافظت کرده، [۴۱] قادرند آن‌ها را در شرایط استرس حرارتی نیز حفظ کنند [۴۲]. حضور Msi-1 برای شکل‌گیری گرانول‌های استرسی ضروری است. گرانول‌های استرسی ساختار-های ناپایدار سیتوپلاسمی هستند که در پاسخ به انواع استرس‌های محیطی شکل می‌گیرند. استرس حرارتی رایج‌ترین محرک شکل-گیری گرانول‌های استرسی است [۴۳]. در همین راستا، Sun Erlin و همکارانش به منظور بررسی بیان پروتئین Msi-1 در سلول‌های سرتولی و ارتباط آن با افزایش دمای بیضه، با استفاده از یک روش خاموش‌کننده ژنی، نشان دادند زمانی که موش‌های فاقد ژن *Msi*-1 در معرض استرس حرارتی قرار گیرند، گرانول‌های استرسی تشکیل نشده و سلول‌های سرتولی دچار آپوپتوز قابل ملاحظه‌ای می‌شوند. بر این اساس، فرض کردند که تشکیل گرانول‌های استرسی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های بقای سلول‌های جنسی بیضه در شرایط استرس حرارتی باشد. ERK1/2 در سیتوپلاسم سلول-های سرتولی در پاسخ به انواع استرس‌ها فسفریله و فعال شده و بقای سلول را در این شرایط تضمین می‌کند. در سلول‌های سرتولی که ژن *Msi*-1 فاقد فعالیت است، مسیر p-ERK1/2 در شرایط استرس حرارتی فعال نمی‌شود. این موضوع نشان‌دهنده این است که مسیر حفاظتی p-ERK1/2 به‌وسیله‌ی Msi-1 تنظیم می-شود. بنابراین، موش‌های نر با نقص در ژن *Msi*-1، در مقایسه با موش‌های نر معمولی در مقابل استرس حرارتی آسیب‌پذیرتر بوده، اختلال در بیان این ژن منجر به ناباروری آن‌ها می‌شود. اختلال در نفوذپذیری سدّ خونی- بیضه‌ای و کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با اتصالات سلول‌های سرتولی برای تشکیل این سدّ فیزیولوژیک، از جمله پیامدهای کاهش بیان پروتئین Msi-1 در موش‌های نر گزارش شده‌است [۳۳]. اگرچه مطالعات متعددی در رابطه با اهمیت و نقش خانواده‌ی Msi در فرآیند اسپرماتوژنز انجام شده-است، ولی هنوز بسیاری از سؤالات در رابطه با نقش این پروتئین-ها بر فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله: بلوغ، ظرفیت‌یابی و واکنش آکوزومی اسپرم همچنان مطرح است.

نتیجه‌گیری

خانواده‌ی پروتئینی Msi از پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA هستند که اوّلین‌بار براساس نقش آن‌ها در تنظیم‌کنندگی تقسیم نامتقارن سلول‌های پیش‌ساز اندام حسّی و سپس در سلول-های جنسی و بیضه‌ی دروزوفیلا شناخته شدند. همچنین در مطالعات اخیر نقش آن‌ها در تکوین اسپرم و قدرت باروری موش نیز گزارش شده است. در موش‌های فاقد پروتئین Msi اختلال در پارامترهای اسپرمی و درنهایت کاهش باروری نیز گزارش شده است. ولی هنوز گزارشی مبنی بر اهمیت این پروتئین‌ها در فرآیند اسپرماتوژنز انسان ارائه نشده است. بنابراین می‌توان با ارزیابی این پروتئین‌ها در سلول‌های اسپرم و بافت بیضه‌ی انسانی به نتایج جدیدی در مورد دخالت احتمالی آن‌ها در حوزه‌ی ناباروری‌های مردها دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه‌ی اساتید و همکاران محترم مرکز تحقیقاتی پژوهشکده زیست فناوری رویان در اصفهان که در نگارش این مقاله ما را راهنمایی کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

[2] Esteves SC. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. ***J Assist Reprod Genet*** 2016; 33(10): 1319-35.

[3] Sutherland JM, Siddall NA, Hime GR, McLaughlin EA. RNA binding proteins in spermatogenesis: an in depth focus on the Musashi family. ***Asian J Androl*** 2015; 17(4): 529-36.

[4] Bettegowda A, Wilkinson MF. Transcription and posttranscriptional reegulation of spermatogenesis. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*** 2010; 365(1546): 1637-51.

[5] Tavalaee M, Abbasi H, Deemeh MR, Fotohi F, Sadoughi Gilani MA, Nasr Esfahani MH. Semen parameters and chromatin packaging in microsurgical varicocelectomy patients. ***Int J Fertil Steril*** 2012; 6(3): 165-74.

[6] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. ***Andrologia*** 2004; 36(3): 95-100.

[7] Tavalaee M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Effect of varicocelectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. ***Andrologia*** 2015; 47(8): 904-9.

[8] Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. ***Fertil Steril*** 2009; 91(4): 1119-26.

[9] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. ***Fertil Steril*** 2008; 89(4): 892-8.
[10] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. ***Reprod Biomed Online*** 2007; 14(4): 422-9.
[11] Gunter KM, McLaughlin EA. Translational control in germ cell development: A role for the RNA-binding proteins Musashi-1 and Musashi-2. ***IUBMB Life*** 2011; 63(9): 678-85.
[12] Paronetto MP, Sette C. Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. ***Int J Androl*** 2010; 33(1): 2-12**.**
[13] Idler RK, Yan W. Control of messenger RNA fate by RNA-binding proteins: an emphasis on mammalian spermatogenesis. ***J Androl*** 2012; 33(3): 309-37.
[14] Venables JP, Eperon I. The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. ***Curr Opin Genet Dev*** 1999; 9(3): 346-54.
[15] Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. ***Neuron*** 1994; 13(1): 67-81.
[16] Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. ***Dev Biol*** 1996; 176(2): 230-42.
[17] Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. RNA-binding protein Musashi2: developmentally regulated expressionin neural precurso r cellsand subpopulations of neurons in mammalian CN S. ***J Neurosci*** 2001; 21(20): 8091-107.
[18] Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, et al. The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. ***Genomics*** 1998; 52(3): 382-4.
[19] Yoda A, Sawa H, Okano H. MSI-1, a neural RNA-binding protein, is involved in male mating behaviour in Caenorhabditis elegans. ***Genes Cells*** 2000; 5(11): 885-95.
[20] Okabe M, Imai T, Kurusu M, Hiromi Y, Okano H. Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division. ***Nature*** 2001; 411(6833): 94-8.
[21] Fox RG, Park FD, Koechlein CS, Kritzik M, Reya T. Musashi signaling in stem cells and cancer. ***Annu Rev Cell Dev Biol*** 2015; 31: 249-67.
[22] de Andrés-Aguayo L, Varas F, Kallin EM, Infante JF, Wurst W, Floss T, et al. Musashi 2 is a regulator of the HSC compartment identified by a retroviral insertion screen and knockout mice. ***Blood*** 2011; 118(3): 554-64**.**
[23] Kudinov AE, Karanicolas J, Golemis EA, Boumber Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. ***Clin Cancer Res*** 2017; 23(9): 2143-53.
[24] Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, et al. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2002; 99(23): 15194-9.
[25] Cox JL, Wilder PJ, Gilmore JM, Wuebben EL, Washburn MP, Rizzino A. The SOX2-interactome in brain cancer cells identifies the requirement of MSI-2 and USP9X for the growth of brain tumor cells. ***PLoS One*** 2013; 8(5): e62857.
[26] Kwon HY, Bajaj J, Ito T, Blevins A, Konuma T , Weeks J, et al. Tetraspanin 3 Is Required for the Development and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. ***Cell Stem Cell*** 2015; 17(2): 152-164.
[27] Park SM, Deering RP, Lu Y, Tivnan P, Lianoglou S, Al-Shahrour F, et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF-β signaling in HSCs. ***J Exp Med*** 2014; 211(1): 71-87.
[28] Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, et al. The neural RNA-binding protrotein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. ***Mol Cell Biol*** 2001; 21(12): 3888-900.
[29] Rezza A, Skah S, Roche C, Nadjar J, Samarut J, Plateroti M. The overexpression of the putative gut stem cell marker Musashi-1 induces tumorigenesis through Wnt and Notch activation. ***J Cell Sci*** 2010; 123(19): 3256–65.
[30] Siddall NA, McLaughlin EA, Marriner NL, Hime GR. The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2006; 103(22): 8402-7.
[31] Sutherland JM, Fraser BA, Sobinoff AP, Pye VJ, Davidson TL, Siddall NA, et al. Developmental expression of Musashi-1 and Musashi-2 RNA-binding proteins during spermatogenesis: analysis of the deleterious effects of dysregulated expression. ***Biol Reprod*** 2014; 90(5): 92.
[32] Sutherland JM, Sobinoff AP, Fraser BA, Redgrove KA, Davidson TL, Siddall NA, et al. RNA binding protein Musashi-1 directly targets MSI-2 and Erh during early testis germ cell development and interacts with IPO5 upon translocation to the nucleus. ***FASEB J*** 2015; 29(7): 2759-68.
[33] ErLin S, WenJie W, LiNing W, BingXin L, MingDe L, Yan S, et al. Musashi-1 maintains blood–testis barrier structure during spermatogenesis and regulates stress granule formation upon heat stress. ***Mol Biol Cell*** 2015; 26(10): 1947-56.
[34] Danno S, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. ***Am J Pathol*** 2000; 156(5): 1685-92.
[35] Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. ***J Reprod Biomed Online*** 2015; 30(1): 14-27.
[36] Tavalaee M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Effect of varicocelectomy on spermfunctional characteristics and DNA methylation. ***Andrologia*** 2015; 47(8): 904-9.
[37] Bahreinian M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in

individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61(4): 179-86.
[38] Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. ***Int Urol Nephrol*** 2018; 50(4): 583-603.
[39] Sadeghi N, Tavalaee M, Nasr- Esfahani MH. A Cellular Perspective on the Importance of Oxidative Stress Effects on Sperm. ***J Ardabil Univ Med Sci*** 2018; 18 (1): 7-20.
[40] Paul C, Teng S, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. ***Biol Reprod*** 2009; 80(5): 913-9.
[41] Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. ***J Semin Cell Dev Biol*** 1998; 9(4): 411-6.
[42] Cai H, Ren Y, Li XX, Yang JL, Zhang CP, Chen M, et al. Scrotal heat stress causes a transient alteration in tight junctions and induction of TGF-β expression. ***Int J Androl*** 2011; 34(4): 352-62.
[43] Kiebler MA, Bassell GJ. Neuronal RNA granules: ***Movers Makers Neuron*** 2006; 51(6): 685-90.