

The role of Musashi protein in spermatogenesis and male infertility

Talebi-Yazdabadi Z¹, Dormiani K², Forouzanfar M³, Lachinani L³, Tavalaee M⁴, 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 اسپرماتوژن و ناباروری مردها

زهره طالبی بزادآبادی^۱، کیانوش درمیانی^۲، محبوبه فروزانفر^۳، لیانا لچینانی^۴، مرضیه توکلی^۵، محمدحسین نصراصفهانی^۶

خلاصه:

سابقه و هدف: توقف رونویسی در طی دو مرحله از فرآیند اسپرماتوژن اتفاق می‌افتد: بار نخست در اسپرماتوسیت‌هایی که وارد میوز اولیه می‌شوند و دیگری در اسپرماتیدهای کروی در حال طوبیل شدن. این مراحل متوقف شدن رونویسی نیازمند تنظیمات گسترده‌ی ترجمه استند. بنابراین وجود کنترل بعد از رونویسی برای تنظیم بیان ژن ضروری به نظر می‌رسد. در مواردی که مکانیسم‌های کنترل پس از رونویسی عملکرد غیرطبیعی داشته باشد، فرآیند اسپرماتوژن مختلف می‌شود. پروتئین‌های متصل شونده به RNA نقش مهمی در این مکانیسم‌ها دارند. یک گروه از این پروتئین‌ها متعلق به خانواده Musashi هستند که نقش مهمی در اسپرماتوژن دارند و هدف این مطالعه‌ی مروری، بررسی اهمیت این خانواده از پروتئین‌ها در طی فرآیند اسپرماتوژن می‌باشد.

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

نتایج: مطالعات متعددی نشان داده‌اند که Musashi ۱ در ابتدای اسپرماتوژن نقش مهمی در تکثیر اسپرماتوگونی‌ها و گنوسایت‌ها دارد، در حالی که در اوخر اسپرماتوژن، این ۲ است که در تمایز اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نقشی حیاتی ایفا می‌نماید.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های Musashi در فرآیند اسپرماتوژن نقش حیاتی دارند. در مدل‌های تاریخیخت که بیان پروتئین‌های Musashi در آن‌ها کاهش یافته یا متوقف شده است، نفایض پاتولوژیکی شدیدی از جمله غیرطبیعی بودن مورفولوژی اسperm، آسیب DNA و کاهش قدرت باروری مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اسپرماتوژن، پارامترهای اسpermی، پروتئین‌های متصل شونده به RNA. ناباروری مردها
دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸، صفحات ۳۱۷-۳۰۸

محققان گزارش کرده‌اند که در نیمی از ناباروری‌های زوجین، فاکتورهای مردانه مطرح می‌شود که ۳۰ درصد از آن‌ها خاص مردان و ۲۰ درصد آن به طور مشترک بین زوجین است [۲]. بلوغ گامت‌ها در جنس نر طی فرآیند «اسپرماتوژن» صورت می‌گیرد و یکی از پیچیده‌ترین و قایع تمایزی است که در بیولوژی تکوین رخ می‌دهد و نیاز به کنترل تنظیم بیان ژن دارد. فرآیند اسپرماتوژن، با تمایز سلول‌های جنسی پیش‌ساز اسپرماتوگونیابی به سلول‌های اسپرماتوگونی درون لوله‌ای منی‌ساز بیضه آغاز می‌شود. اسپرماتوگونی‌ها، جمعیتی از سلول‌های بنیادی لازم برای تولید مدامون اسperm در طول زندگی فرد را تشکیل می‌دهند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیابی به منظور تولید اسپرماتوسیت‌های اولیه، تقسیمات میتوزی انجام می‌دهند، سپس اسپرماتوسیت‌ها با انجام دو تقسیم میوزی تشکیل اسپرماتیدهای کروی هاپلوفید را می‌دهند. تمایز این اسپرماتیدهای کروی به اسپرماتوزوآی نابلغ نیز طی فرآیند «اسپرمیوژن» انجام می‌شود [۳]. به دنبال تکمیل تمایز سلولی، اسپرماتوزوآی نابلغ از لوله‌های منی‌ساز رها شده و به سمت اپیدیدیم پیش می‌رود. فرآیند اسپرماتوژن وابسته به هورمون‌های مردانه (آنдрوروژن‌ها) 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

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 روبرشد در کشورهای توسعه‌یافته در سراسر جهان است [۱].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مؤسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی، استان اصفهان، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پژوهشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، 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 تولید مثل، اصفهان، ایران
۷. استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پژوهشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

* لشان نویسنده مسئول

اصفهان، خوارسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشکده زیست فناوری
تلفن: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۰ - ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۷ دمونیس:

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

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

بزرگی از پروتئین‌ها هستند که با اتصال به توالی‌های خاصی از RNA می‌هدف، بیان آن را با استفاده از یکسری مکانیسم‌های مولکولی تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌ها حداقل دارای یک جایگاه شناسایی RNA هستند که مسؤول شناسایی موتف خاصی از توالی RNA هدف است. حضور RBPs در تنظیمات پس از رونویسی ضروری است و به عنوان یک میانجی گر رایج برای کنترل بیان ژن در سلول عمل می‌کند. نقش ضروری آن‌ها در اسپرماتوزن در فرآیند تکوین گامت‌ها درون بیضه به خوبی اثبات شده است [۱۳]. این پیشنهاد مطرح شده است که در تکثیر و تمایز سلول‌های جنسی نر، RBPs مسؤول اصلاحات بعد از رونویسی در طی دوره‌های توافق (Msi) رونویسی هستند [۱۴]. اخیراً در مطالعه‌ای به خانواده‌ی (Musashi) از دسته RBPs اشاره شده است که اوئین‌بار 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 فوتایپ به سبک مبارزه با دو شمشیر توسط قهرمان ملی ژاپن (یاماتو موساشی) این ژن را "Musashi" نامیدند [۱۵]. از زمان کشف آن، ارتوЛОگ‌های پروتئین Msi در تعدادی از گونه‌های یوکاریوتی از جمله: زنپوس، موش و انسان شناسایی شده است [۱۶]. پروتئین Msi، دارای ۳۶۲ اسید‌آمینه و وزن مولکولی ۳۹ کیلو Dalton است [۱۷]. اعضای این خانواده‌ی پروتئینی دارای دو RNA recognition motif (RRMs) هستند که توسط یک لینکر کوتاه از یکدیگر جدا شده‌اند [۱۸]. این دو توالی در ناحیه N-ترمینال پروتئین واقع شده، در میان گونه‌ها بسیار حافظت شده هستند (شکل شماره ۱): به طوری که در گونه‌های موش و انسان کاملاً شبیه به یکدیگرند [۱۸] و در گونه‌هایی مانند سینورابدیتیس الکانس ۷۴–۷۶ درصد از اسیدهای آئینه این توالی‌ها با توالی RRM انسانی شباهت دارند [۱۹]. بر اساس مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی RRM1 به‌طور مستقیم و به صورت اختصاصی به توالی موردنظر در RNA هدف متصل می‌شود، در حالی که RRM2 بیشتر نقش حمایتی دارد و باعث افزایش کارایی این اتصال تا حدود ۱۰۰ برابر می‌شود [۱۷]. این توالی‌های

اسپرماتوزن، کروماتین اسپرم توسط یکسری از پروتئین‌های هسته‌ای متراکم می‌شود [۵]، به این منظور در ابتدا پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم، تحت عنوان «پروتئین‌های انتقالی» جایگزین هیستون-های سوماتیک در اسپرماتیدهای کروی می‌شوند. سپس درون اسپرماتیدهای در حال طویل شدن، پروتامین‌ها جایگزین پروتئین‌های انتقالی می‌شوند، بدطوری که 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 متراکم شدن 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 اوئیله جنین تأثیر می‌گذارد [۶–۱۰]. بنابراین به علت تراکم بالای کروماتین و در دسترس نبودن آن برای ستر RNA، فرآیند رونویسی در سلول اسپرم خاموش می‌شود. غیرفعال شدن رونویسی در دو مرحله از فرآیند اسپرماتوزن مشاهده می‌شود، یکبار، در طی میوز اوئیله زمانی که سلول، DNA خود را به‌منظور انجام نوترکیبی همولوگ در کروموزوم ترمیم می‌کند و دوم، هنگامی که اسپرماتیدهای کروی در حال طویل شدن هستند و به سمت بلوغ اسپرماتوزوا پیش می‌روند که در این زمان پروتامین‌ها به‌منظور بسته-بندی کروماتین در ناحیه سر اسپرم جایگزین هیستون‌ها می‌شوند [۱۱]. اگرچه در این مراحل رونویسی کاملاً متوقف شده است، 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 RNA دارای توالی‌های اختصاصی، فرآیند رونویسی را از ترجمه جدا کرده، تا حدی بر این شرایط به وجود آمده درون سلول غلبه می‌کنند. این پروتئین‌ها درون سلول به مقدار زیاد و یا به صورت ویژه بیان می‌شوند. با استفاده از این پروتئین‌ها، سلول قادر است mRNA را تا زمان شروع مجدد رونویسی ذخیره کرده، به اجزای ریبونوکلئوپروتئینی (RNPs) تبدیل کند، این رونویسی‌ها تا زمانی که نیاز به پیرایش و ترجمه‌ی آن‌ها باشد، باقی می‌مانند [۱۲]. بنابراین در فرآیند اسپرماتوزن کنترل پس از رونویسی، مهم‌ترین جنبه‌ی تنظیم بیان ژن است و در مواردی که مکانیسم‌های کنترل پس از رونویسی عملکرد غیرطبیعی داشته باشند اسپرماتوزن مختلط شده، در نتیجه گامت‌های غیرطبیعی تولید می‌شود [۱۳]. در اسپرماتوزن عمدتاً کنترل پس از رونویسی به‌وسیله‌ی پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA (binding proteins; RBPs) انجام می‌گیرد [۳].

پانکراس، کولون، ریه، تخدمان و مثانه گزارش کرده‌اند. همچنین، افزایش بیان این پروتئین‌ها در انواع سرطان‌های خونی CML و 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، متأساز به غدد لنفاوی در تومورها بر جسته و همچنین افزایش بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مشاهده شده است [۲۳]. Msi-1 به مقدار زیاد در سیستم اعصاب مرکزی جنبین‌ها 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 چاره هیدروسفالی انسدادی و مرگ زودهنگام بعد از تولد می‌شوند [۲۴]. کمبود Msi-2 نیز در موش‌ها باعث مرگ ۵۰ درصد از آن‌ها در دوران جنبینی شده، زمانی که این موش‌ها با یکدیگر آمیزش داده شدند، کاهش باروری در آن‌ها مشاهده شد [۲۵]. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بیان ژنومی نشان داده است که پروتئین‌های Msi به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بیان بسیاری از ژن‌ها را کترول می‌کنند و بنابراین نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند [۲۶]. اخیراً با کمک روش‌هایی از RIP-PCR، برخی از ژن‌های هدف مستقیم پروتئین-2 Msi-2 جمله در تنظیمات پس از رونویسی، بهویژه در فرآیند اسپرماتوژن RBPs در انجام گرفته است، این مطالعه در نظر دارد که با مروری بر مطالعات گذشته، اهمیت بیان پروتئین Msi را به عنوان یکی از RBPs در سلول‌های جنسی نر بررسی کرده، نقش آن را در باروری جنس نر بیان کند.

شناسایی کننده به یک توالی مورد توافق اختصاصی غنی از پلی-یوریدین درون ناحیه‌ی غیرقابل ترجمه‌ی 3'-UTR از رونوشت‌های mRNA هدف متصل می‌شوند و عملکرد تنظیمی خود را انجام می‌دهند [۲۰]. برخلاف سایر hhnRNP‌ها که عمدتاً در نوکلئوپلاسم قرار گرفته‌اند، پروتئین Msi معمولاً در سیتوپلاسم یافت شده، با توجه به عملکرد آن در تنظیم ترجمه، درون قطعات پلی‌زومی تجمع می‌یابد. 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 و Msi-2 Musashi-1 و Musashi-2 (Msi-2) می‌باشند [۲۱]. توالی‌های Msi-1 و Msi-2 شباهت بسیار زیادی با یکدیگر دارند و به نظر می‌رسد که از یک ژن اجدادی مشترک به وجود آمده‌اند [۲۲]. با توجه به مطالعاتی که تاکنون در زمینه‌ی بیان نقش ضروری RBPs در تنظیمات پس از رونویسی، بهویژه در فرآیند اسپرماتوژن انجام گرفته است، این مطالعه در نظر دارد که با مروری بر مطالعات گذشته، اهمیت بیان پروتئین Msi را به عنوان یکی از RBPs در سلول‌های جنسی نر بررسی کرده، نقش آن را در باروری جنس نر بیان کند.

مواد و روش‌ها

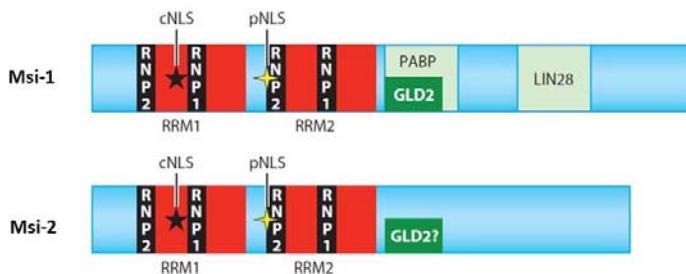
این مطالعه، یک مطالعه مروری بوده و انتخاب مقالات از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، Google scholar، Scopus با استفاده از کلمات کلیدی انجام گرفت. در ابتدا از واژگان کلیدی Musashi, RNA binding proteins مطالعات متعددی شد که نتیجه ۲۸۰ یافته بود. با توجه به این که هدف اصلی مقاله بررسی عملکرد پروتئین Msi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

نتایج

اعضای خانواده‌ی پروتئینی Msi در انواع بافت‌ها و سلول‌های 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،

به دست آمده نشان داده شد که حیوانات با ترانس‌ژن *Msi-1* بارور بوده، تنها دارای اسپرم‌های 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 مهم دیگری دست یافتند. آن‌ها نشان دادند که در ناحیه‌ی ۳'-UTR *Msi-2* سه ناحیه‌ی اتصالی برای پروتئین *Msi-1* وجود دارد. آنان برای اثبات ادعای خود از موش‌های تاریخت اختصاصی بیضه استفاده کردند تا در آن‌ها ژن *Msi-1* در تمام مراحل اسپرم‌توژن افزایش بیان داشته باشد. آنالیز qPCR اسپرم‌اتوسیت‌های مرحله‌ی پاکی‌تن در این موش‌ها نشان داد که میزان بیان mRNA *Msi-2* نسبت به نمونه‌های وحشی حدود ۲/۵ برابر کاهش یافته‌است. همچنین تمايز 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) در دامنه XY-body در هسته‌ی اسپرم‌اتوسیت‌ها اثبات کردند و از طریق دنبال کردن 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 قابل توجهی افزایش می‌یابند (شکل شماره ۳) [۳۳]. در جدول شماره ۱، مجموعه‌ای از مطالعات انجام گرفته بر روی خانواده‌ی پروتئینی *Msi* جمع‌آوری شده است.

اساس مشاهدات این گروه در اسپرم‌اتیدهای کروی اوئیه در نمونه‌های وحشی، هسته و همچنین میتوکندری‌های حاصل از تقسیم تقریباً قطر مشابهی دارند، اما در نمونه‌های جهش‌یافته‌ی d*Msi* عموماً اسپرم‌اتیدهای کروی اوئیه 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 کل بافت بیضه موش ارزیابی و گزارش شد. *Msi-1* mRNA زمانی که 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 mRNA *Msi-2* در ابتدا و انتهای اسپرم‌توژن (روز ۲ و ۶۰ پس از تولد) افزایش داشته است. با توجه به این موضوع که بیضه مشکل 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 داده شد ژن *Msi-1* در سیتوپلاسم اسپرم‌اتوگونی‌ها و اسپرم‌اتیدهای گرد بیشترین بیان را دارد؛ در حالی که در اسپرم‌اتیدهای گرد ژن *Msi-2* افزایش بیان را دارد. این گروه به منظور بررسی اثر افزایش *Msi* بر روی اسپرم‌اتوسیت و نیز عملکرد اسپرم، موش‌های تاریختی طراحی کردند که در آن‌ها بیان *Msi-1* و *Msi-2* بسیار بالا بود. اندازه‌ی بافت بیضه در موش‌های ترانس‌ژن *Msi-1* حدود ۴۲ درصد کاهش یافته ۱۷ درصد و در ترانس‌ژن‌های *Msi-2* حدود ۴۲ درصد کاهش یافته بود. علاوه بر این، میزان آسیب DNA، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌بریزی شده سلولی و در کل غیرطبیعی بودن پارامترهای اسپرمی و درنهاست میزان ناباروری در ترانس‌ژن‌های *Msi-2* نسبت به موش‌های ترانس‌ژن *Msi-1* بیشتر مشاهده شد. در یکی دیگر از نتایج بسیار جالب



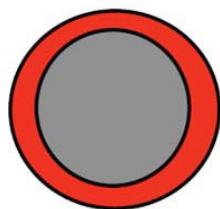
شکل شماره ۱- شکل شماتیک دومین‌های شناخته‌شده‌ی پروتئین‌های *Msi-1* و *Msi-2*

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 پیتید شبیه به سیگنال هسته‌ای (ستاره زردرنگ: pNLS) وجود دارد. در نیمه‌ی C-ترمینال از *Msi-1* در مجاور RRM-2 میتوکندریک (GLD2) وجود دارد. در نیمه‌ی C-ترمینال از *Msi-2* یک توالی برای اتصال LIN-28 وجود دارد. همچنین در پروتئین *Msi-1* اتصال PABP و یک توالی دیگر برای اتصال LIN-28 وجود دارد. همچنین در پروتئین *Msi-2* دیده می‌شود که ممکن است در پروتئین *Msi-2* نیز وجود داشته باشد [۲۱].

جدول شماره ۱- مجموعه‌ای از مطالعات انجام گرفته بر روی پروتئین *Msi*

نام نویسنده مطالعه	سال انجام مطالعه	خلاصه نتایج
Richter K	۱۹۹۰	کشف یک ژن اختصاصی سیستم عصبی همولوگ <i>Msi</i> -۱ در زنپوس
Nakamura M	۱۹۹۴	کشف و نام‌گذاری ژن <i>Msi</i> در سلول‌های پیش‌ساز اندام حسی دروزوفلا
Imai T	۲۰۰۱	کشف ژن NUMB به عنوان یکی از ژن‌های هدف <i>Msi</i> -۱
Sakakibara S	۲۰۰۲	شاخنه شدن نقش ضروری ژن <i>Msi</i> -۱ در سیستم اعصاب مرکزی موش
Siddall NA	۲۰۰۶	کشف ژن <i>dMsi</i> در سلول‌های اسپرماتوسیت دروزوفلا که برای جداشدن صحیح کروموزوم‌های میوزی و سیتوکینز نیاز است.
Kong DS	۲۰۰۸	افزایش بیان ژن <i>Msi</i> -۱ در تومورهای مغزی گلیوما
Gotte M	۲۰۰۸	افزایش بیان ژن <i>Msi</i> -۱ در سلطان کارسینوما
Rezza A	۲۰۱۰	فعال‌سازی بیان <i>Msi</i> -۱ توسط مسیر پیام‌رسانی <i>Wnt</i>
Wang XY	۲۰۱۰	تنظیم متاباز سلول‌های توموری در سلطان سینه موش توسعه پروتئین <i>Msi</i> -۱
Kharas MG	۲۰۱۰	افزایش بیان ژن <i>Msi</i> -۲ در سلطان خون AML در موش
de Andres Aguayo L	۲۰۱۱	تشخیص ضرورت بیان ژن <i>Msi</i> -۲ در سلول‌های پیش‌ساز هماتوپوئیک با استفاده از مدل‌های موشی
Arumugam K	۲۰۱۲	شاخنه شدن فعالیت خودتنظیمی پروتئین‌های <i>Msi</i> در زنپوس بر روی <i>xMsi</i> -۱ در طی بلوغ تحملک
Rosenfeldt MT	۲۰۱۳	افزایش بیان ژن <i>Msi</i> -۱ در لایه سلول‌های سوطانی ریبوی در انسان
Sutherland JM	۲۰۱۴	شاخنه شدن نقش ژن <i>Msi</i> -۱ در تکوین ابتدایی سلول‌های درگیر در اسپرماتوزن موش، تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیابی و ورود به مرحله میوز، و کشف عملکرد ژن <i>Msi</i> -۲ در اوآخر اسپرماتوزن در تمایز و تکوین اسپرماتوسیتها و اسپرماتیدها
Sutherland JM	۲۰۱۵	معرفی ژن <i>Msi</i> -۲ به عنوان یکی از اهداف پروتئین <i>Msi</i> -۱ برای مهار ترجمه در طی تکوین سلول‌های جنسی اویله موش نر
ErLin S	۲۰۱۵	ضرورت بیان ژن <i>Msi</i> -۱ برای تشکیل گرانولهای استرسی در سلول‌های سرتولی موش و تشکیل سدّ خونی - بیشه‌ای

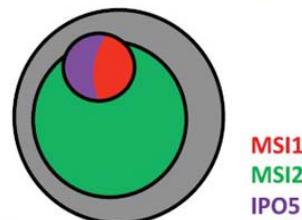
i. *MSI1* binds *Msi2* → translational repression



ii. *IPO5* binds *MSI1* → *Msi2* released

Spermatogonia

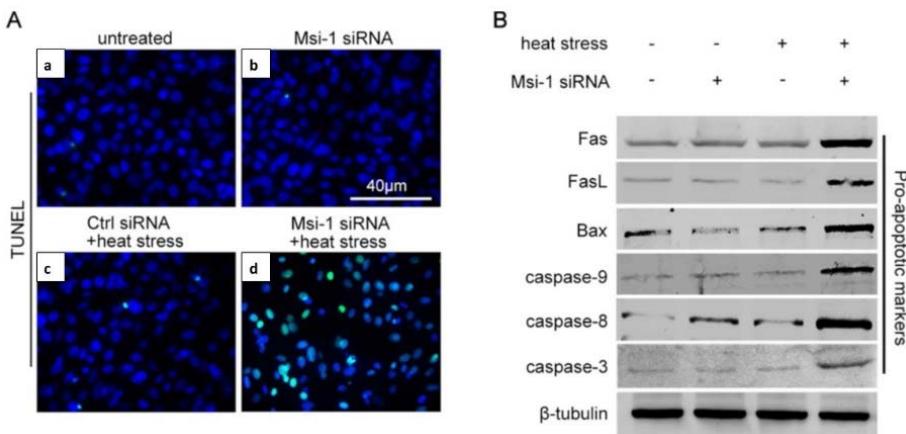
iii. *MSI2* translationally active



Pachytene spermatocytes

شكل شماره ۲- بیان افتراقی ژن‌های *Msi*-۱ و *Msi*-۲ در رده سلول زایا

طبق این مدل *Msi*-۱ در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها قبل از شروع فاز میوزی از بیان *Msi*-۲ *Importin 5 (IPO5)* به پروتئین *Msi*-۱ متصل شده و آن را به هسته اسپرماتوسیت انتقال می‌دهد و در این زمان *Msi*-۲ بیان می‌شود [۳۲]



شکل شماره ۳-۱ 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، تشان داده شده‌اند. استرس حرارتی در تعداد زیادی از سلول‌های سرتولی فاقد ژن *Msi-1* سبب ایجاد آپوپتوز شده‌اند (علامت‌های سبزرنگ) (c).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 (افزایش نیافته و میزان بیان شبیه به گروه سلول‌های سرتولی سرتولی تیمار باشد، میزان پروتئین مارکرهای پیش آپوپتوزی (Fas, FasL, Bax, caspase-9, caspase-8, caspase-3) با خاموش شدن بیان ژن *Msi-1* همراه باشد، این مارکرهای به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابند [۴۳].

اسپرماتوژن نقش مهمی در تمایز و تکوین اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها ایفا می‌کند. به علاوه، این محققان اثر بیان بیش از حد *Msi-1* و *Msi-2* را بر روی بافت بیضه موش در انتهای فرآیند اسپرماتوژن برسی و گزارش کردنده شدت عوارض حاصل از بیان بیش از حد *Msi-2* در بافت بیضه موش‌ها در مقایسه با افزایش بیان *Msi-1* بسیار بیشتر است. بنابراین می‌توان گفت که ژن *Msi-1* نسبت به ژن *Msi-2* 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 کردنده که بر روی توالی ژن *Msi-2* سه ناحیه‌ی اتصالی برای پروتئین *Msi-1* وجود دارد و بدین ترتیب احتمالاً *Msi-2* یکی از اهداف جدید *Msi-1* برای مهار ترجمه در طی تکوین سلول‌های جنسی اویله است. این گروه در مطالعه‌ی قبلی گزارش کردنده که ژن *Msi-1* در سیتوپلاسم اسپرماتوگونی‌ها بیان می‌شود و در تحقیق اخیر به دنبال این موضوع بودند که چگونه ژن *Msi-1* به هسته‌ی اسپرماتوسیت‌ها انتقال می‌یابد؟ برای پاسخ به این سؤال، پس از تعیین جایگاه ژن *Msi-1* در هسته‌ی اسپرماتوسویت‌ها 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 اسپرماتوژن طبیعی به صورت مداوم در کیسه‌ی بیضه یا اسکروتوم در دمایی پایین‌تر از دمای بدن اتفاق می‌افتد [۳۴]. افزایش دمای بیضه، بر روند اسپرماتوژن اثر گذاشته و از طریق

بحث

الگوی بیان گستردگی *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 دروزوفلا، تعداد هسته‌ها و میتوکنندی‌های 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. به علاوه، هسته‌ی هاپلوئیدی دارای سایزهای متفاوت بود که نتیجه خطأ در جداسازی کروموزومها در طی میوز است [۳۰]. Sutherland در سال ۲۰۱۴ با مطالعه بر روی کل بافت بیضه اسپرماتوژن کرد که mRNA *Msi-1* عمده‌تا در سلول‌های اسپرماتوسیت و mRNA *Msi-2* غالباً در ابتداء و انتهای اسپرماتوژن 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 حالی که ژن *Msi-2* در اسپرماتیدهای گرد افزایش 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 ژن *Msi-1* در تکوین ابتدایی سلول‌های درگیر در اسپرماتوژن، تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیابی و ورود به مرحله‌ی میوز دخالت دارد؛ در حالی که ژن *Msi-2* در اواخر

اتصالات سلول‌های سرتولی برای تشکیل این سدَ فیزیولوژیک، از جمله پیامدهای کاهش بیان پروتئین Msi-1 در موش‌های نر گزارش شده است [۳۳]. اگرچه مطالعات متعددی در رابطه با اهمیت و نقش خانواده‌ی Msi در فرآیند اسپرماتوژن انجام شده است، ولی هنوز بسیاری از سوالات در رابطه با نقش این پروتئین‌ها بر فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله: بلوغ، ظرفیت‌بایی و واکنش آکزوزمی اسپرم همچنان مطرح است.

نتیجه‌گیری

خانواده‌ی پروتئینی Msi از پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA هستند که اولین بار براساس نقش آن‌ها در تنظیم کنندگی تقسیم نامتقارن سلول‌های پیش‌ساز اندام حسّی و سپس در سلول‌های 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 اسپرماتوژن 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.

کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و عملکرد اسپرم، خطر ناباروری را در مردها افزایش می‌دهد [۳۵-۳۹]. 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 ساختارهای 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 خاموش کننده ژنی، نشان دادند زمانی که موش‌های ژن Msi-1 در مععرض 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 سلول‌های 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 2/ p-ERK1/2 به‌وسیله‌ی Msi-1 تنظیم می‌شود. 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 نفوذ پذیری سدَ خونی- بیضه‌ای و کاهش بیان پروتئین‌های مرتبه با

- [9] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization after ICSI and spermigenic 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 expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *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, Kallim 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 protein 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, Sabinoff 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, Sabinoff AP, Fraser BA, Redgrave 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 sperm functional 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, Tavalaei 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.