

The role of Musashi protein in spermatogenesis and male infertility

Talebi-Yazdabadi Z¹, Dormiani K², Forouzanfar M³, Lachinani L³, Tavalae 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*

Fez, 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, Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. The role of Musashi protein in spermatogenesis and male infertility. *Fez* 2019; 23(3): 308-17.

نقش پروتئین Musashi در اسپرماتوژنز و ناباروری مردها

زهره طالبی یزدآبادی^۱، کیانوش درمیانی^۲، محبوبه فروزانفر^۳، لیانا لاجپانی^۴، مرضیه تولاغی^۵، محمدحسین نصرافهانی^۶، *^۷

خلاصه:

سابقه و هدف: توقف رونویسی در طی دو مرحله از فرآیند اسپرماتوژنز اتفاق می‌افتد: بار نخست در اسپرماتوسیت‌هایی که وارد میوز اولیه می‌شوند و دیگری در اسپرماتیدهای کروی در حال تولید شدن. این مراحل متوقف‌شدن رونویسی نیازمند تنظیمات گسترده‌ی ترجمه هستند. 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 باشند، فرآیند اسپرماتوژنز مختل می‌شود. پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA نقش مهمی در این مکانیسم‌ها دارند. یک گروه از این پروتئین‌ها متعلق به خانواده Musashi هستند که نقش مهمی 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 PubMed، Google scholar 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 مهمی در تکثیر اسپرماتوگونی‌ها و گنوسایت‌ها دارد، در حالی که 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 تراخیخت 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 Musashi، RNA، ناباروری مردها

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

مقدمه

محققان گزارش کرده‌اند که در نیمی از ناباروری‌های زوجین، فاکتورهای مردانه مطرح می‌شود که ۳۰ درصد از آن‌ها خاص 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 اولیه، تقسیمات میتوزی انجام می‌دهند، سپس اسپرماتوسیت‌ها با انجام دو تقسیم میوزی تشکیل اسپرماتیدهای کروی هاپلوئید را می‌دهند. تمایز این اسپرماتیدهای کروی به اسپرماتوزوای نابالغ نیز طی فرآیند «اسپرمیوژنز» انجام می‌شود [۳]. به‌دنبال تکمیل تمایز سلولی، اسپرماتوزوای 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

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].

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

اسپرماتوزون، کروماتین اسپرم توسط یک‌سری از پروتئین‌های هسته‌ای متراکم می‌شود [۵]، به این منظور در ابتدا پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم، تحت‌عنوان «پروتئین‌های انتقالی» جایگزین هیستون‌های سوماتیک در اسپرماتیدهای کروی می‌شوند. سپس درون اسپرماتیدهای در حال طویل‌شدن، پروتامین‌ها جایگزین پروتئین‌های انتقالی می‌شوند، به‌طوری که DNA 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 دنا توره 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 در نهایت بر قدرت باروری و نیز رشد و نمو اولیه جنین تأثیر می‌گذارد [۶-۱۰]. 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 اسپرماتوزون مشاهده می‌شود، یک‌بار، در طی میوز اولیه زمانی که سلول، DNA خود را به‌منظور انجام نوترکیبی همولوگ در کروموزوم ترمیم می‌کند و دوم، هنگامی که اسپرماتیدهای کروی در حال طویل‌شدن هستند و به سمت بلوغ اسپرماتوزوآ پیش می‌روند که در این زمان پروتامین‌ها به‌منظور بسته‌بندی 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 RNA دارای توالی‌های اختصاصی، فرآیند رونویسی را از ترجمه جدا کرده، تا حلی‌ی بر این شرایط به‌وجودآمده 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 اسپرماتوزون کنترل پس از رونویسی، مهم‌ترین جنبه‌ی تنظیم بیان ژن است و در مواردی که مکانیسم‌های کنترل پس از رونویسی عملکرد غیرطبیعی داشته باشند اسپرماتوزون مختل شده، در نتیجه گامت‌های غیرطبیعی تولید می‌شود [۱۳]. در اسپرماتوزون عمدتاً کنترل پس از رونویسی به‌وسیله‌ی پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA (RNA binding proteins; RBPs) انجام می‌گیرد [۳].

بزرگی از پروتئین‌ها هستند که با اتصال به توالی‌های خاصی از RNA 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 خاصی 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 اسپرماتوزون 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 اولین بار 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 نورویولوژی، ژن جدیدی را کشف کردند که جهش در این ژن، در تعیین سرنوشت سلول‌های پیش‌ساز اندام حسی دروزوفیلا تغییری ایجاد می‌کرد. در حالت عادی، در تکوین اندام حسی 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 زاید‌های حسی 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: زنبوپوس، 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 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): به‌طوری که 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 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

پانکراس، کولون، ریه، تخمدان و مثانه گزارش کرده‌اند. همچنین، افزایش بیان این پروتئین‌ها در انواع سرطان‌های خونی CML، ALL و AML 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 شده است [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 زود هنگام بعد از تولد می‌شوند [۲۴]. کمبود Msi-2 نیز در موش‌ها باعث مرگ ۵۰ درصد از آن‌ها در دوران جنینی 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 یا غیرمستقیم بیان بسیاری از ژن‌ها را کنترل می‌کنند و بنابراین نقش مهمی 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 تنظیم‌کننده ترجمه RNA، عملکرد سلول‌های بنیادی و نیز مسیر پیام‌رسانی TGF- β درگیر هستند [۲۷]. همچنین بر اساس مطالعات انجام شده بر روی رده‌های سلولی مختلف، ژن‌هایی که به‌طور مستقیم مورد هدف Msi قرار می‌گیرند، در ارتباط با تکثیر، تمایز و چرخه 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 NUMB یکی از شناخته‌شده‌ترین ژن‌های هدف Msi-1 است و مهارکننده‌ی مسیر پیام‌رسانی Notch محسوب می‌شود. Msi-1 با اتصال به ناحیه 3'-UTR ژن NUMB، بیان آن را در سطح ترجمه کاهش داده، از این طریق سبب افزایش فعالیت مسیر Notch می‌شود [۲۸]. همچنین در مطالعه‌ی 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 مطالعه‌ی بر روی بیضه‌ی دروزوفیلا گزارش شد که dMsi در اسپرماتوسیت‌ها برای جدا شدن صحیح کروموزوم‌های میوزی و نیز سیتوکینز نیاز است. بر

شناسایی‌کننده 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 hnRNPها 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 (Musashi-1) و Msi-2 (Musashi-2) شناسایی شده‌اند [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 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

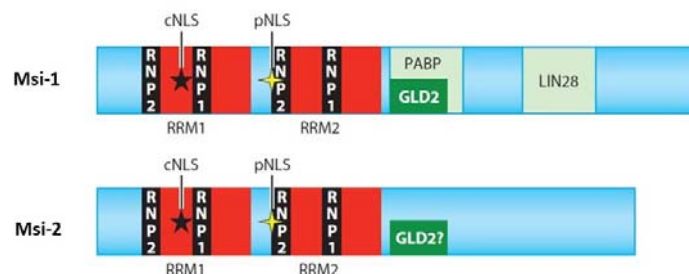
این مطالعه، یک مطالعه مروری بوده و انتخاب مقالات از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed, Google scholar, Scopus با استفاده از کلمات کلیدی انجام گرفت. در ابتدا از واژگان کلیدی Musashi, RNA binding proteins استفاده شد که نتیجه ۲۸۰ یافته بود. با توجه به این‌که هدف اصلی مقاله بررسی عملکرد پروتئین Musashi در 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 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 ترانس ژن *Msi-1* بارور بوده، تنها دارای اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی و همچنین قابلیت اتصال پایین به لایه‌ی زونا پلوسیدای 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 3'-UTR ژن *Msi-2* سه ناحیه‌ی اتصال 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 اسپرماتوزن افزایش بیان داشته باشد. آنالیز qPCR اسپرماتوسیت‌های مرحله‌ی پاک‌تن در این موش‌ها نشان داد که میزان بیان mRNA *Msi-2* نسبت به نمونه‌های وحشی حدود ۲/۵ برابر کاهش یافته است. همچنین تمایز سلول‌های جنسی در این موش‌ها با تأخیر همراه بود و شواهدی از حضور آپوتوز 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 پاک‌تن 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 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 مطالعه‌ی گزارش شد که در شرایط استرس حرارتی، درون سلول‌های سرتولی موش‌های جهش‌یافته فاقد *Msi-1* مارکرهای پیش آپوتوزی 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 اولیه در نمونه‌های وحشی، هسته و همچنین میتوکندری‌های حاصل از تقسیم تقریباً قطر مشابهی دارند، اما در نمونه‌های جهش‌یافته *dMsi* عموماً اسپرماتیدهای کروی اولیه 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 بیضه‌ی موش ارزیابی و گزارش شد. mRNA *Msi-1* 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 اسپرماتوزن (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 پاک‌تن 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 بیان *Msi* بر روی اسپرماتوزن 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 ترانس ژن *Msi-1* تقریباً ۱۷ درصد و در ترانس ژن‌های *Msi-2* حدود ۴۲ درصد کاهش یافته بود. علاوه بر این، میزان آسیب DNA، آپوتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و در کل غیرطبیعی بودن پارامترهای اسپرمی و در نهایت میزان ناباروری در ترانس ژن‌های *Msi-2* نسبت به موش‌های ترانس-ژن *Msi-1* بیشتر مشاهده شد. در یکی دیگر از نتایج بسیار جالب

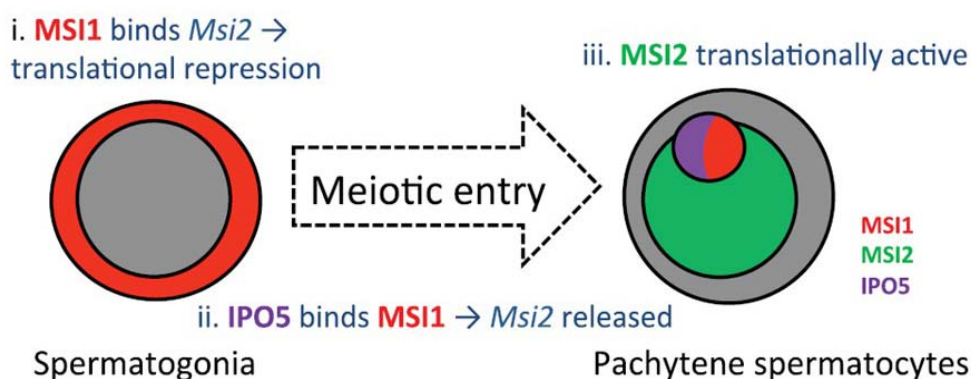


شکل شماره ۱- شکل شماتیک دومین‌های شناخته‌شده‌ی پروتئین‌های *Msi-1* و *Msi-2*

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 RRM2 یک پپتید شبیه به سیگنال هسته‌ای (ستاره زردرنگ: pNLS) وجود دارد. در نیمه‌ی C-ترمینال از *Msi-1* در مجاور RRM2 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].

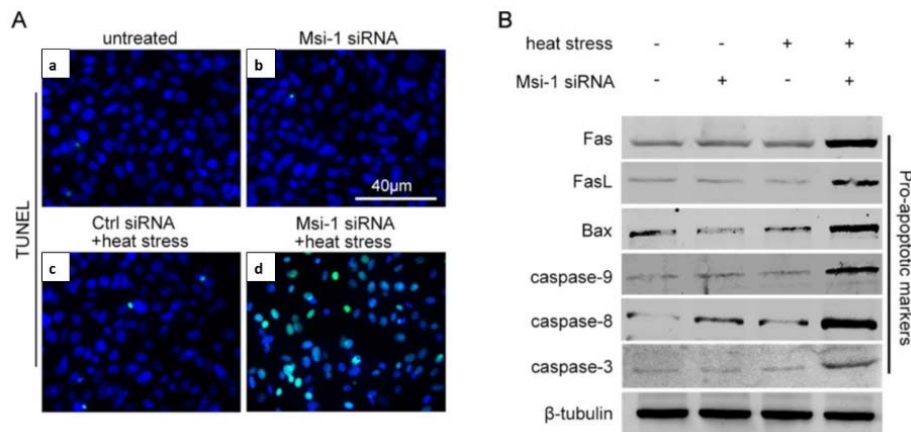
جدول شماره ۱- مجموعه‌ای از مطالعات انجام گرفته بر روی پروتئین Msi

نام نویسنده مطالعه	سال انجام مطالعه	خلاصه نتایج
Richter K	۱۹۹۰	کشف یک ژن اختصاصی سیستم عصبی همولوگ Msi-1 در زنبوس
Nakamura M	۱۹۹۴	کشف و نام‌گذاری ژن Msi در سلول‌های پیش‌ساز اندام حسی دروزوفیلا
Imai T	۲۰۰۱	کشف ژن NUMB به‌عنوان یکی از ژن‌های هدف Msi-1
Sakakibara S	۲۰۰۲	شاخته شدن 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 زنبوس 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	شناخته شدن نقش ژن Msi-1 در تکوین ابتدایی سلول‌های درگیر در اسپرماتوژنز موش، تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونایی و ورود به مرحله 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 اولیه موش نر
ErLin S	۲۰۱۵	ضرورت بیان ژن Msi-1 برای تشکیل گرانول‌های استرسی در سلول‌های سرتولی موش و تشکیل سدّ خونی-بیضه‌ای



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

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 سبز رنگ). 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 خاموش شدن بیان ژن *Msi-1* همراه باشد، این مارکرها به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابند [۴۳].

بحث

اسپرمتوژنز 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 اسپرماتوژنز بررسی و گزارش کردند 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-2* نسبت به ژن *Msi-1* نقش مهم‌تری در سلول‌های جنسی و در نهایت باروری موش‌ها را 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 ناحیه‌ای اتصال 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 اولیه 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

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 میتوکندیه‌های 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 سائزهای متفاوت بود که نتیجه‌ی خطا در جداسازی کروموزوم‌ها در طی میوز است [۳۰]. Sutherland در سال ۲۰۱۴ با مطالعه بر روی کل بافت بیضه‌ی موش گزارش کرد که *Msi-1* mRNA عمدتاً در سلول‌های اسپرماتوسیت و *Msi-2* mRNA غالباً در ابتدا و انتهای اسپرماتوژنز بیان می‌شود. اما با ارزیابی بیان این دو ژن در سلول‌های جنسی اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های پاک‌تن 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 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

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 شده‌است، ولی هنوز بسیاری از سؤالات در رابطه با نقش این پروتئین‌ها 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 اولین بار براساس نقش آن‌ها در تنظیم‌کنندگی تقسیم نامتقارن سلول‌های پیش‌ساز اندام حسی 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 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] Bettgowda A, Wilkinson MF. Transcription and posttranscriptional reegulation of spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365(1546): 1637-51.

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 ساختار-های ناپایدار سیتوپلاسمی هستند که در پاسخ به انواع استرس‌های محیطی شکل می‌گیرند. استرس حرارتی رایج‌ترین محرک شکل‌گیری 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 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 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 نفوذپذیری سدّ خونی - بیضه‌ای و کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با

[5] Tavalae M, Abbasi H, Deemeh MR, Fotohi F, Sadoughi Gilani MA, Nasr Esfahani MH. Semen parameters and chromatin packaging in microsurgical varicocele 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] Tavalae M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Effect of varicocele on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia* 2015; 47(8): 904-9.

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