

Original Article



Identification of Likely Novel piRNA Sequences in Human Testis Tissue and Bioinformatics Analysis

Fahimeh Piryaeei^{1,2*} 

- 1- Research Center for Molecular Medicine, Institute of Cancer, Avicenna Health Research Institute, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Article history:

Received: 06 April 2025

Revised: 25 April 2025

Accepted: 25 April 2025

***Corresponding author:** Fahimeh Piryaeei, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email: f.piryaeei@umsha.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Small non-coding RNAs (sncRNAs) have been studied in the male reproductive system. One of the most important small RNAs (sRNAs) investigated in spermatogenesis is piRNA. This study performed a comprehensive analysis and comparison of the expression profiles of novel sRNA sequences, which are predicted to be piRNAs, in male testicular tissue.

Materials and Methods: The GSE248576 dataset in NCBI-GEO was used to discover novel sequences. Subsequently, potential target genes of the discovered sequences were predicted using the Miranda tool. Finally, regulatory pathways related to spermatogenesis were obtained using bioinformatics tools.

Results: In this study, 208 novel sRNA sequences were identified as piRNAs in male testicular tissue that have not been reported in small sequence databases so far. KEGG and Reactome pathways, protein-protein interaction analysis, significant terms related to the regulatory processes of mitosis and meiosis, and cell growth in gametogenesis were identified in the gene ontology analysis.

Conclusion: The newly found sRNA sequences and their predicted target genes in this study could be promising candidates for investigating their role in impaired spermatogenesis as an infertility phenotype in men.

Keywords: Infertility, piRNA, Small Non-Coding RNA, Spermatogenesis

Please cite this article as follows: Piryaeei F. Identification of Likely Novel piRNA Sequences in Human Testis Tissue and Bioinformatics Analysis. J Res Urol 2024; 8(1):---. DOI: 10.32592/jru.8.1.--



شناسایی توالی‌های جدید piRNA احتمالی در بافت بیضی انسان و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

فهمیه پیریائی*
ID ۲۰۱

۱. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشگاه سرطان، پژوهشگاه تحقیقات سلامت ابن‌سینا، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: RNAهای کوچک غیرکدکننده (sncRNAها) در سیستم تولیدمثلی مردان مطالعه شده‌اند. یکی از مهم‌ترین RNAهای کوچک (sRNA) مورد مطالعه در اسپرم‌زایی، piRNAها هستند. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل جامع و مقایسه‌ی پروفایل بیان توالی‌های sRNA جدید، که حدس زده می‌شود piRNA باشند، در بافت بیضی مردان جهت شناسایی توالی‌های sRNA جدید انجام شده است.

مواد و روش‌ها: جهت کشف توالی‌های جدید، از مجموعه‌ی داده‌ی GSE248576 در NCBI-GEO استفاده شد. سپس، با ابزار میراندا (Miranda) ژن‌های هدف بالقوه برای توالی‌های کشف‌شده پیشگویی شد. درنهایت، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مسیرهای تنظیمی مرتبط با اسپرماتوژنز به دست آمد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۲۰۸ عدد توالی sRNA جدید به‌مثابه‌ی piRNA که تاکنون در پایگاه داده‌های مربوط به توالی‌های کوچک گزارش نشده‌اند در بافت بیضی مردان شناسایی شد؛ در تجزیه و تحلیل آنتولوژی ژن، مسیرهای KEGG و Reactome و تجزیه و تحلیل برهمکنش پروتئین - پروتئین، ترم‌های (terms) مرتبط با فرایندهای تنظیمی میتوز و میوز و رشد سلولی در گامتوژنز مشخص شد.

نتیجه‌گیری: توالی‌های sRNA جدید یافته‌شده و ژن‌های پیشگویی‌شده‌ی هدف آن‌ها، در این مطالعه می‌توانند کاندیدهای امیدبخشی جهت بررسی نقش آن‌ها در اسپرماتوژنز اختلال‌یافته به‌مثابه‌ی یک فنوتیپ ناباروری در مردان باشند.

واژگان کلیدی: RNA کوچک غیرکدکننده، piRNA، اسپرماتوژنز، ناباروری

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۷

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۰۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۰۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

* نویسنده مسئول: فهمیه پیریائی، پژوهشگاه سرطان، پژوهشگاه تحقیقات سلامت ابن‌سینا، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

ایمیل: f.piryaee@umsha.ac.ir

استناد: پیریائی، فهمیه. شناسایی توالی‌های جدید piRNA احتمالی در بافت بیضی انسان و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی. تحقیقات در ارولوژی، بهار و تابستان ۱۴۰۳: ۸ (۱): ---

مقدمه

اسپرم‌زایی، باروری اسپرم و تکوین اولیه پس از لقاح ایجاد کرده است [۱]. یکی از مهم‌ترین RNAهای کوچک (sRNA: Small RNA) مورد مطالعه در اسپرم‌زایی، piRNAها (PIWI-interacting RNAs) هستند [۲]. این دسته از RNAهای کوچک غیرکدکننده (به طول ۲۵ - ۳۲ نوکلئوتید) با پروتئین‌های PIWI (P-element-Induced Wimpy testis) با

RNAهای کوچک غیرکدکننده (Small non-coding RNAs)، که تنظیم‌کننده‌های اصلی بیان ژن هستند [۱]، به‌طور کامل در سیستم‌های بیولوژیکی مختلف از جمله سیستم تولیدمثلی مردان مطالعه شده‌اند [۲]. تحقیقات در دهه‌ی گذشته، شواهد قابل‌توجهی در حمایت از نقش حیاتی sncRNAها در تولیدمثل مردان، به‌ویژه در نگهداری سلول‌های زایای اولیه، میوز،

ساختاری مولکولی شبیه piRNA دارند از مجموعه‌ی داده‌ی GSE248576 در NCBI-GEO استفاده شد. بدین منظور با استفاده از Bowtie2 [۱۶] و cmsearch [۱۷]، خوانش‌های فیلترشده به پایگاه داده‌های ژنوم مرجع و sRNA نگاشت (mapping) شدند. پس از آن، بیان افتراقی توالی‌های جدید piRNA احتمالی شناسایی شده با استفاده از الگوریتم DEseq2 در نرم‌افزار R با cutoff برای $\text{Log}_2\text{foldchange} > 1$ تجزیه و تحلیل شد.

پیشگویی ژن‌های هدف piRNA جدید احتمالی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

با توجه به در دسترس نبودن ابزار خاصی برای پیشگویی ژن‌های هدف piRNA در پستانداران، قوانین کلی توالی‌های sRNA و جفت‌سازی با ژن هدف در نظر گرفته شد و در همین باره مکمل شدن توالی seed برای شناسایی هدف مهم است [۱۸]؛ بنابراین، قانون ۱۰۰ درصد مکمل بودن ناحیه‌ی seed (نوکلئوتید دوم تا هشتم) با ژن هدف در ابزار پیشگویی هدف میراندا (Miranda) اعمال شد. افزون بر این، برای تعریف جفت‌های هدف piRNA و mRNA، مقدار cutoff امتیاز هم‌ترازی ۱۵۰ و حداقل انرژی آزاد ۲۰- کیلوکالری بر مول (kcal/mol) اعمال شد. آن‌تولوژی ژن (Gene Ontology: GO) و تجزیه و تحلیل Reactome و Enrichr با در نظر گرفتن مقدار P و FDR (False Discovery Rate) برای تفسیر و درک ارتباط توالی‌های piRNA احتمالی بیان‌شده‌ی افتراقی با اصطلاحات GO (GO terms) خاص و مسیرهای سیگنالینگ انجام شد. همچنین با استفاده از String و Cytoscape به بررسی شبکه‌ی پروتئین - پروتئین در ژن‌های هدف ۲۰ توالی اول لیست (به دلیل محدودیت نرم‌افزاری) که دارای بالاترین میزان تفاوت بیان بین دو گروه بودند، پرداخته شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS Inc., SPSS 21.0 (Chicago, IL) انجام شد. میانگین سطوح بیان توالی‌های انتخاب‌شده بین گروه‌های NOA و OA با استفاده از آزمون t- student با آستانه‌ی معناداری P کمتر از ۰.۰۱ مقایسه شد. اهمیت مسیرهای Reactome و KEGG با آزمایش دقیق فیشر (Fisher's exact test) محاسبه شد.

یافته‌ها

توالی‌های جدید کشف‌شده که احتمالاً piRNA هستند.

در این مطالعه، ۲۰۸ عدد توالی sRNA جدید که تاکنون در پایگاه داده‌های مربوط به توالی‌های کوچک گزارش نشده‌اند، در بافت بیضه‌ی مردان شناسایی شد. از آنجاکه این توالی‌ها در نواحی خاصی از ژنوم که خوشه‌های piRNA قرار دارند، شناسایی شده‌اند

برهمکنش دارند و ترانسپوزون‌ها را در سلول‌های زایا به صورت اپی‌ژنتیکی و پس از رونویسی خاموش می‌کند [۵، ۶]. پروتئین‌های PIWI در مگس سرکه نقش مهمی در حفظ سلول‌های بنیادی رده‌ی زایا با تنظیم تقسیم سلول‌های زاینده دارند [۷]. در سلول‌های زایای نر، piRNA در دو موج مجزا ظاهر می‌شوند: یکی در سلول‌های زایای اولیه (Primordial Germ Cells: PGCs) که piRNAهای پیش‌پاکی‌تن نامیده می‌شوند و دیگری در طول پروفاز میوز، به نام piRNA پاک‌تن [۸]. piRNAهای پیش‌پاکی‌تن به دلیل ماهیت مشتق‌شده‌ی تکراری خود، به تنظیم متیلاسیون و بیان عناصر قابل انتقال (ترانسپوزون‌ها) در طول مرحله‌ی بازنویسی متیلاسیون در رشد جنینی معروف هستند [۹]، درحالی‌که piRNAهای پاک‌تن نقشی فراتر از خاموش کردن عناصر قابل انتقال دارند. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که piRNAهای پاک‌تن، mRNAها و lncRNAها (Long non-coding RNA) را از طریق مکانیسم خاموشی ژن پس از رونویسی هدف قرار می‌دهند [۱۰]. بیان تغییریافته‌ی piRNAهای اسپرم با غلظت اسپرم و نرخ لقاح پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI) مرتبط است که نشان می‌دهد piRNAهای اسپرم برای لقاح مهم هستند.

اختلالات بیان piRNA در ناباروری مردان به روش با توان عملیاتی بالا (high-throughput) تنها در ۵ مطالعه بررسی شده است [۱۱-۱۵]. در مطالعه‌ای که اخیراً پیربائی و همکاران انجام داده‌اند، برای اولین بار با به‌کارگیری روش تعیین توالی sRNA بر روی بافت بیضه‌ی مردان آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی، تنظیم اختلال‌یافته‌ی بیان توالی‌های piRNA قبلاً شناخته‌شده و نقش حیاتی piRNAهای بیان‌شده‌ی افتراقی بین دو گروه که در مسیر اسپرماتوژنز حائز اهمیت هستند، بررسی شد [۱۵]. باوجوداین، توالی‌های جدید زیادی خوانش شدند که در آن زمان گزارش نشد.

در مطالعه‌ی حاضر، نویسنده با هدف تجزیه و تحلیل جامع و مقایسه‌ی پروفایل بیان توالی‌های sRNA جدید، که حدس زده می‌شود piRNA باشند، در بافت بیضه‌ی بیماران مبتلا به سندرم تنها سلول سرتولی (Sertoli Cell Only Syndrome: SCOS) که شدیدترین نوع آزواسپرمی غیرانسدادی (Non-obstructive Azoospermia: NOA) است و افراد آزواسپرمی انسدادی (OA: Obstructive Azoospermia) با اسپرم‌زایی طبیعی به‌مثابه‌ی کنترل، به شناسایی توالی‌های sRNA جدید برای اولین بار می‌پردازد. همچنین، به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی، ژن‌های هدف این توالی‌ها و مسیرهای تنظیمی آن‌ها در اسپرماتوژنز پیشگویی می‌شود.

روش کار

پیشگویی توالی‌های جدید که احتمالاً piRNA هستند.

جهت پیشگویی و کشف توالی‌های جدید که حدس زده می‌شود

بافت بیضه‌ی گروه NOA در مقایسه با گروه کنترل (OA) نشان دادند. بیان افتراقی این توالی‌ها بین دو گروه OA و NOA در جدول ۲ قابل مشاهده است.

احتمال زیادی دارد که piRNA باشند. اطلاعات ژنومی ۲۰ عدد از این توالی‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده است. بیان افتراقی این توالی‌ها بین دو گروه OA و NOA مقدار P کمتر از ۰.۰۱ داشتند. از این تعداد، ۱۰ توالی افزایش بیان و ۱۹۸ توالی کاهش بیان در

جدول ۱. توالی‌های sRNA جدید شناسایی شده با در نظر گرفتن جایگاه کروموزومی، رشته DNA و نقاط آغاز و پایان توالی بر روی کروموزوم

piRNA id	کروموزوم	خانواده‌ی تکرار	رشته	آغاز	پایان	توالی
novel_pir20	chr10	LTR/ERV1-MaLR	+	۳۳۵۵۵۹۸۶	۳۳۵۵۶۲۱۰	CCTTTGCCTTCTGCCATGA
novel_pir24	chr10	LTR/ERV1	-	۳۳۰۹۱۴۶۱	۳۳۰۹۱۹۷۴	CCTGGGTGTGTCTGTGAGG
novel_pir47	chr10	LTR/ERV1-MaLR	+	۱۸۷۶۸۴۴۶	۱۸۷۶۸۸۱۸	TTTGGCTCTGTGTCCCCAC
novel_pir57	chr10	LTR/ERV1	+	۴۶۰۶۶۶۲۲	۴۶۰۶۷۰۱۶	CACACAAAGCCTGTTTGGT
novel_pir91	chr10	LINE/L1	+	۲۵۶۶۰۳۰۸	۲۵۶۶۱۷۹۱	CAATCCTAAGCCAAAAGAA
novel_pir195	chr10	LTR/ERV1	-	۶۸۶۶۱۴۱	۶۸۶۷۱۰۸	AGGGTCTGTGCTGAGGAGG
novel_pir213	chr10	DNA/hAT-Charlie	+	۱۰۴۲۴۵۸۱۶	۱۰۴۲۴۶۱۴۱	TAGGAACCAGGCTGCACAG
novel_pir225	chr10	DNA/PiggyBac	-	۱۶۶۰۴۰۹۱	۱۶۶۰۴۳۳۳	TTCACCATGTTGGCCAGGC
novel_pir229	chr10	LTR/ERV1	+	۸۸۲۹۸۵۱۴	۸۸۲۹۸۶۷۵	CTCATGCCTGTAATCCAG
novel_pir253	chr10	LTR/ERV1-MaLR	-	۱۰۲۵۹۱۰	۱۰۲۷۳۴۸	CTGGATGTGAGACATGGAG
novel_pir290	chr10	LINE/L1	-	۹۶۲۱۹۸۱۱	۹۶۲۲۱۶۶۲	GCCCAGCTAATTTTGTAT
novel_pir309	chr10	DNA/TcMar-Mariner	+	۱۱۵۲۶۹۲۴۱	۱۱۵۲۶۹۸۶۹	TGGTGGTCTGCTGCTGGTC
novel_pir313	chr10	LTR/ERV1	+	۱۲۹۸۴۳۲۵	۱۲۹۸۴۹۵۸	TTACTGTACATGTGGTTGAC
novel_pir376	chr10	LTR/ERV1	-	۷۹۵۳۲۵۷۵	۷۹۵۳۳۵۳۳	TTGCTTCACCTTGTCATC
novel_pir384	chr10	LTR/ERV1-MaLR	+	۸۷۹۹۸۴۴۸	۸۷۹۹۹۲۷۱	TGGACTGTGGACTTTTGAG
novel_pir386	chr10	LTR/ERV1	+	۱۰۴۱۵۱۲۰۲	۱۰۴۱۵۲۱۵۳	AGATTGTTACTGTGTCTGT
novel_pir388	chr10	LTR/ERV1	+	۱۰۴۱۵۱۲۰۲	۱۰۴۱۵۲۱۵۳	CATAGGAGACTCCATTTTG
novel_pir413	chr10	LINE/L1	-	۵۲۴۵۰۰۳۱	۵۲۴۵۰۷۳۷	GATCACTTGAGGCCAGGAG

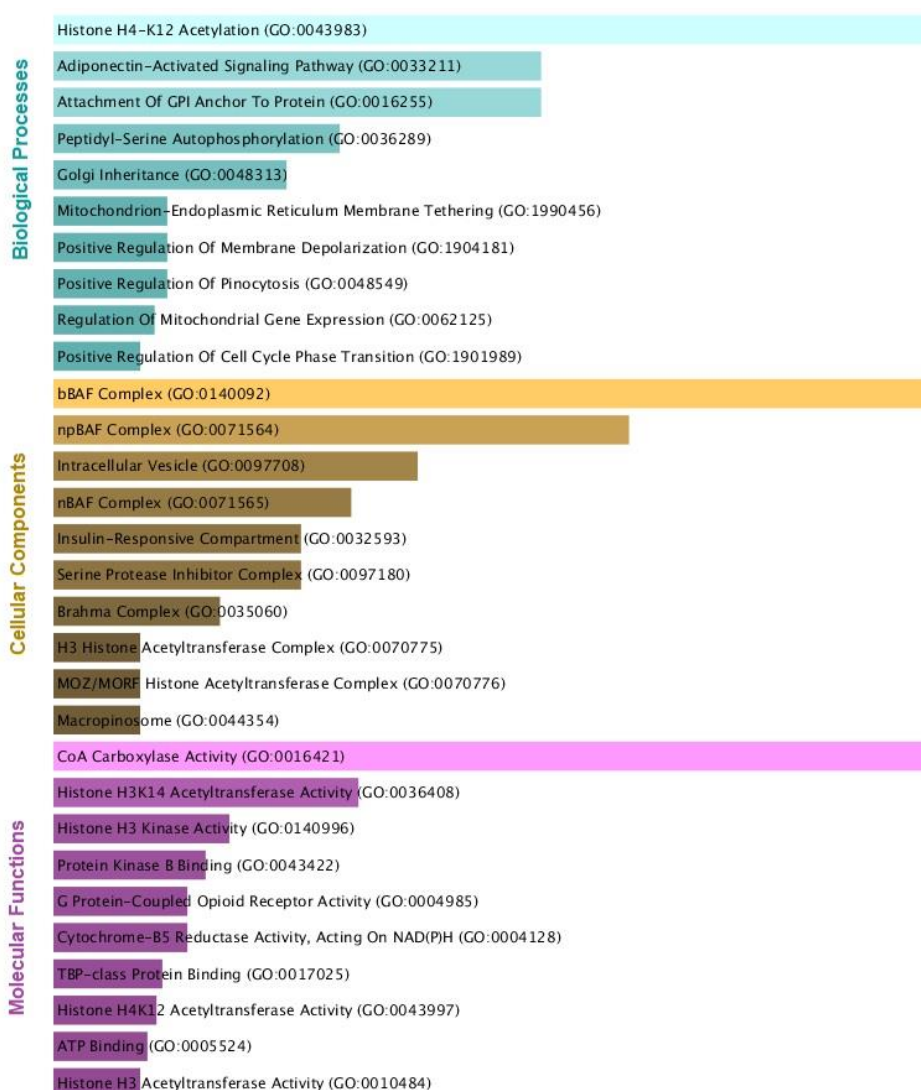
جدول ۲. داده‌های بیان افتراقی معنادار توالی‌های sRNA جدید بین دو گروه آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی

piRNA id	بیان (کنترل)	بیان (بیمار)	log2FoldChange (بیمار/کنترل)	Pvalue	Padj	تنظیم بیان کاهشی/افزایشی
novel_pir3222	۶۵۷.۲۶۹۹	۰.۱۴۶۴۸۳	- ۱۲.۱۳۱۵	7.36E-10	1.35E-07	کاهش
novel_pir3159	۵۳۰.۹۱۱۹	۰.۱۴۲۰۱۱	- ۱۱.۸۶۸۳	2.16E-09	3.49E-07	کاهش
novel_pir2272	۳۳۰.۴۱۰۳	۳۵۴.۸۹۵۶	۳.۴۲۵۰۶۴	2.92E-09	4.66E-07	افزایش
novel_pir1393	۴۰۶.۵۷۲۲	۰.۱۳۷۲۹۸	- ۱۱.۵۳۲	8.50E-09	1.23E-06	کاهش
novel_pir1625	۲۹۳.۷۳۶	۰.۱۳۶۹۸۵	- ۱۱.۰۶۶۳	6.88E-08	8.40E-06	کاهش
novel_pir1264	۲۵۳.۳۴۳	۰.۱۳۳۲۳۶	- ۱۰.۸۹۲۹	1.21E-07	1.36E-05	کاهش
novel_pir3111	۲۳۷.۳۴۱۷	۰.۱۳۳۳۷۴	- ۱۰.۸۰۸۱	1.66E-07	1.80E-05	کاهش
novel_pir388	۲۱۵.۵۴۱۱	۰.۱۳۰۵۳۱	- ۱۰.۶۸۹۳	2.51E-07	2.56E-05	کاهش
novel_pir1222	۲۱۷.۳۹۶۵	۰.۱۳۴۰۰۹	- ۱۰.۶۶۳۸	3.23E-07	3.22E-05	کاهش
novel_pir1744	۲۱۰.۹۶۹۹	۰.۱۳۲۹۶۲	- ۱۰.۶۳۱۸	3.52E-07	3.48E-05	کاهش
novel_pir1782	۱۹۲.۰۲۳۲	۰.۱۲۷۰۷۹	- ۱۰.۵۶۱۳	3.60E-07	3.51E-05	کاهش
novel_pir945	۱۷۴.۳۲۹۸	۰.۱۲۴۹۵۵	- ۱۰.۴۴۶۲	5.19E-07	4.76E-05	کاهش
novel_pir673	۱۵۲.۳۲۹۵	۰.۱۲۳۰۹۷	- ۱۰.۲۷۳۲	9.41E-07	7.88E-05	کاهش
novel_pir1265	۱۶۹.۰۶۰۵	۰.۱۲۹۹۸۶	- ۱۰.۳۴۵	9.48E-07	7.88E-05	کاهش
novel_pir961	۱۵۶.۴۰۱۴	۰.۱۲۵۶۱۹	- ۱۰.۲۸۲	1.01E-06	8.24E-05	کاهش
novel_pir2159	۱۵۶.۷۲۲۴	۰.۱۲۷۰۶۲	- ۱۰.۲۶۸۵	1.13E-06	9.00E-05	کاهش
novel_pir473	۱۴۴.۱۵۴۷	۰.۱۲۳۰۴۷	- ۱۰.۱۹۴۲	1.27E-06	0.0001	کاهش
novel_pir376	۲۰۰.۰۱۵۷	۰.۱۴۷۳۲۴	- ۱۰.۴۰۶۹	1.40E-06	0.000108	کاهش

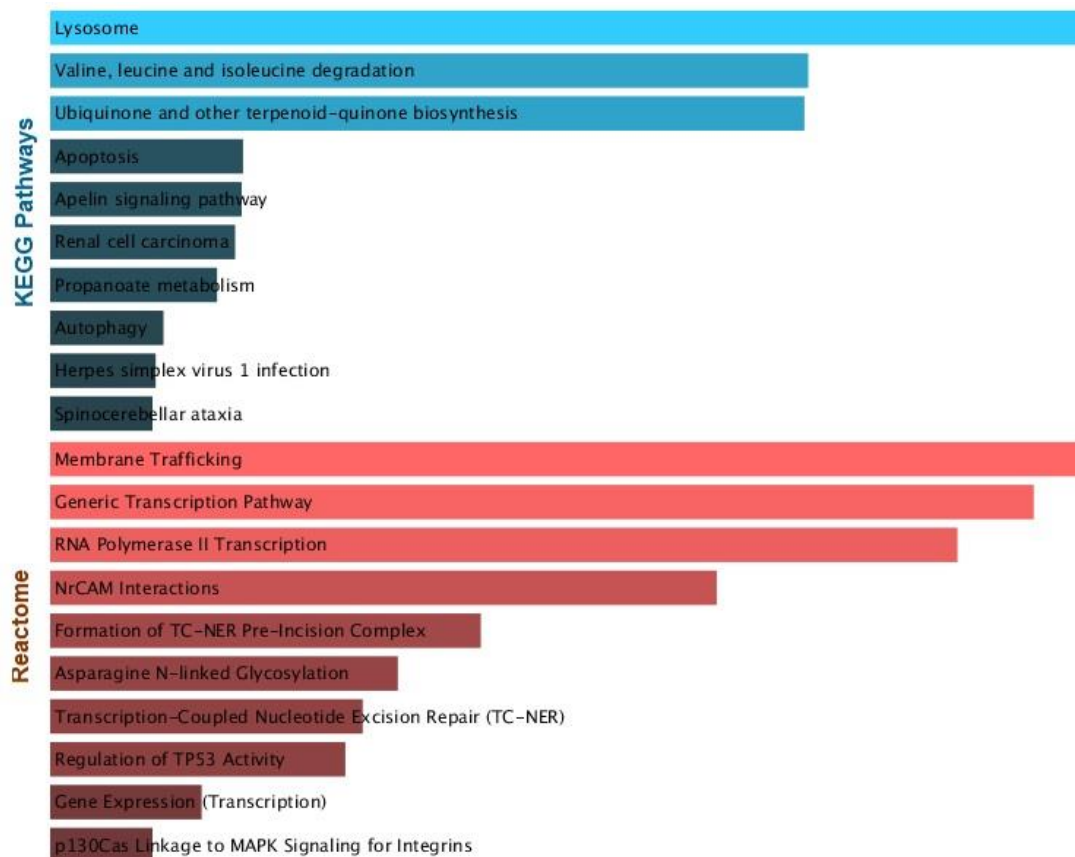
GO و تحلیل مسیرهای ژن‌های هدف توالی‌های با بیان افتراقی

به‌منظور کشف عملکردهای ژن‌ها و مسیرهای تنظیمی توسط توالی‌های sRNA جدید (که احتمالاً piRNA هستند)، در بافت بیضه با بیان افتراقی بین دو گروه NOA و OA، اهداف ژنی برای کشف ترم‌های آنتولوژی ژن (GO) با استفاده از مسیرهای Enrichr تجزیه و تحلیل شد. تجزیه و تحلیل GO، غنی‌سازی معناداری از ژن‌های هدف را از نظر ۸۰ فرایند بیولوژیکی (Biological Processes: BP)، ۲۲ جزء سلولی (Cellular Components: CC)، و ۱۸ عملکرد مولکولی (Molecular Functions: MF) برای piRNA‌های با بیان افتراقی نشان داد. بسیاری از این ترم‌ها ارتباط نزدیکی با اسپرماتوژنز و مسیرهای با واسطه‌ی piRNA دارند. تعدادی از ترم‌های GO برتر برای piRNA‌های با بیان تغییر یافته‌ی معنادار در شکل ۱ ارائه شده است. افزون بر این، ۳۲ مسیر Reactome و ۲۴ مسیر KEGG

معنادار در ژن‌های هدف توالی‌های sRNA با بیان تغییر یافته‌ی معنادار غنی شدند. تعدادی از این مسیرها در شکل ۲ مشاهده می‌شود. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی آن است که روش اتخاذ شده برای پیشگویی ژن‌های هدف به‌درستی اعمال شده است. در فرایندهای بیولوژیکی، ترم‌های Regulation of Programmed Cell Death (GO:0043067)، DNA Damage Response (GO:0006974)، Regulation of Apoptotic Process (GO:0042981)، Regulation of Cell Growth (GO:0001558) و snRNA Metabolic Process (GO:0016073) که مرتبط با فرایندهای تنظیمی میتوز و میوز و رشد سلولی در گامتوژنز است، در اجزای سلولی، nBAF Complex (GO:0071565) و در عملکردهای مولکولی، General Transcription Initiation Factor Binding (GO:0019905) و Binding (GO:0005524) و ATP Binding (GO:0005524) از جمله ترم‌های GO معنادار به دست آمده است.



شکل ۱. ترم‌های GO برتر برای ژن‌های پیشگویی‌شده‌ی مورد هدف توالی‌های sRNA جدید با بیان متفاوت معنادار

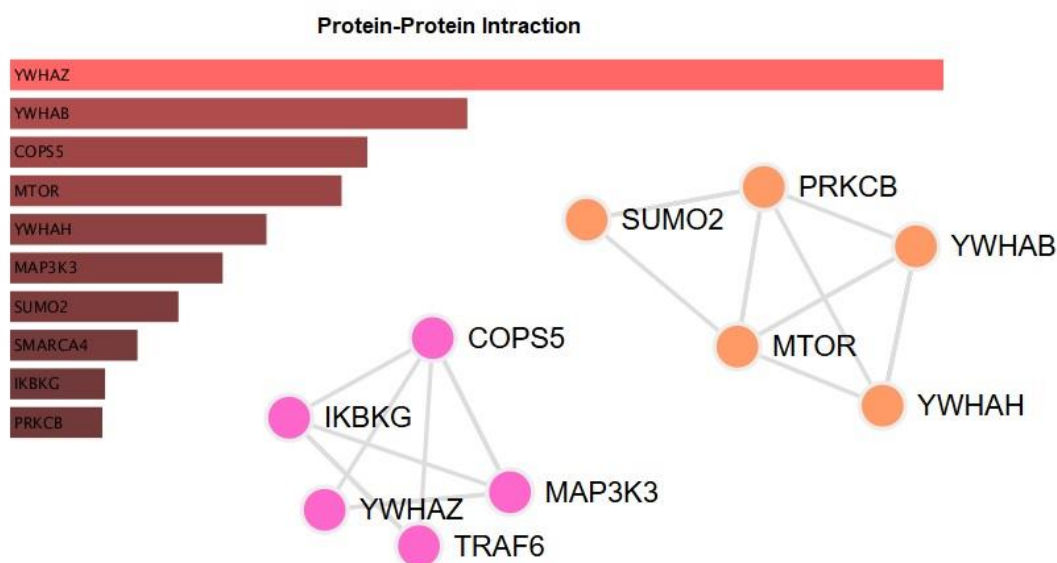


شکل ۲. مسیرهای KEGG و Reactome معنادار برای ژن‌های پیشگویی شده مورد هدف توالی‌های sRNA با بیان تغییر یافته‌ی معنادار

Cytoscape جهت نمایش برهمکنش پروتئینی وارد شد. از ماژول‌هایی که این نرم‌افزار، محاسبه و ارائه کرد ماژول اول که امتیاز ۱۸ (بالای ۱۰) داشت، انتخاب شد. در این ماژول، ۱۹ ژن برهمکنش داشتند که بیشترین معناداری در شکل ۳ برای ۱۰ تا از ۱۹ ژن قابل ملاحظه است. پروتئین‌های MTOR، PRKCB و COPS5، به‌مثابه‌ی هاب مشخص شدند.

برهمکنش پروتئین - پروتئین

به‌منظور بررسی شبکه‌ی پروتئینی و برهمکنش پروتئین - پروتئین ژن‌های هدف توالی‌های sRNA کشف‌شده، ۲۰ توالی sRNA اول که بیشترین تفاوت بیان معنادار را بین دو گروه NOA و OA نشان دادند، انتخاب شدند و ژن‌های هدف آن‌ها در ابزار آنالیز String بررسی شد. فایل خروجی مرحله‌ی قبل، در نرم‌افزار



شکل ۳. ژن‌های هدف پیشگویی شده با بیشترین سطح معناداری برهمکنش پروتئین - پروتئین

نتایج

در مطالعه‌ی حاضر، داده‌های تعیین توالی sRNA بر بافت بیضه‌ی افراد آزواسپرمی OA و NOA موجود در پایگاه داده (Gene Expression Omnibus: GEO) تجزیه و تحلیل شد و برای اولین بار ۲۰۸ توالی sRNA جدید شناسایی شد. این توالی‌ها که به نظر می‌رسد piRNA هستند، تفاوت بیان معنادار را بین دو گروه نیز نشان داده‌اند. به منظور درک نقش این توالی‌ها در اسپرماتوژنز و شناسایی مسیرهای احتمالی مرتبط با تولید اسپرم، ژن‌های هدف این توالی‌ها پیشگویی شد و ترم‌های GO و مسیرهای مولکولی و سلولی که این ژن‌ها در آن‌ها فعالیت دارند، به دست آمد. در پستانداران، گامتوژنز شامل مراحل رشدی بسیار تنظیم شده است. این مراحل با تغییراتی در رونویسی مرتبط هستند که باعث ایجاد الگوهای مشخصه‌ی بیان ژن می‌شوند و در مراحل متمایز تکوین گامت مشاهده می‌شوند که شامل فعالیت‌های خاص با عملکردهای میوزی حیاتی است. یکی از اجزای سلولی به دست آمده در این مطالعه کمپلکس BAF است. در مطالعه‌ای جدید، دی کسترو Castro de و همکاران موش‌های ناکاوت را برای ARID2، که یک زیرواحد تنظیمی ویژه PBAF است، تولید کردند و فنوتیپ آن را با ناکاوت‌های BRG1، که زیرواحد کاتالیزوری کمپلکس‌های PBAF/BAF است، مقایسه کردند. درحالی‌که ناکاوت $Brig1^{\Delta/\Delta}$ در مراحل اولیه‌ی میوز عمل می‌کند و باعث توقف سلولی در پاکینما می‌شود، فعالیت ARID2 ظاهراً در پایان پروفاز I مورد نیاز است. نقص‌های چشمگیر در تشکیل دوک و اتصال کروموزوم به دوک مشاهده شده در موش‌های $Arid2^{\Delta/\Delta}$ به افزایش کیناز aurora B در سنترومر که یک تنظیم‌کننده‌ی اصلی در تفکیک کروموزوم‌ها است، نسبت داده می‌شود. افزون بر این، آنالیزهای ژنتیکی و بیوشیمیایی بعدی تشکیل یک PBAF کانونی و یک کمپلکس مستقل از BRG1 حاوی ARID2 و PBRM1 به عنوان اجزای اصلی را نشان می‌دهد. این یافته‌ها مدلی را تقویت می‌کند که در آن کمپلکس‌های مختلف PBAF مراحل مختلف میوز و گامتوژنز را تنظیم می‌کنند [۱۹].

برهمکنش‌های بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های زاینده برای اسپرم‌زایی و باروری مردان ضروری است. با این حال، مکانیسم عمل زیربنایی این فعل و انفعالات در بیضه‌ها تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. در مطالعه‌ای توسط وو Wu و همکاران، توزیع و عملکرد پروتئین متصل سینتاکسین ۲ (STXBP2) در بیضه‌ی پستانداران بررسی شد. این محققان دریافتند که STXBP2 عمده‌تاً در سلول‌های سرتولی بیان می‌شود. سپس، برای بررسی عملکرد STXBP2 در بیضه‌ها، اثرات کاهش Stxbp2 بر رشد سلول‌های بنیادی بیضه و اسپرماتوگونیا نوزاد ارزیابی شد. نتایج نشان داد که STXBP2 برای مهاجرت سلول‌های سرتولی و بقای سلول‌های زاینده مورد نیاز است. STXBP2 با کانکسین ۴۳ (Cx43) برهمکنش دارد و بیان آن را تنظیم می‌کند. این نتایج یک مکانیسم

تنظیمی جدید را نشان داد که در آن کمپلکس STXBP2/Cx43 برای حفظ برهمکنش‌های سرتولی - رده زایا ضروری است [۲۰]. در مطالعه‌ی حاضر، در شبکه‌ی پروتئین - پروتئین MTOR، PRKCB و COPS5 به مثابه‌ی هاب در نظر گرفته شدند. MTOR یک پروتئین کیناز بسیار حفاظت شده است که در ۲ کمپلکس پروتئینی متمایز از نظر ساختاری و عملکردی یافته می‌شود: TOR (TORC1) و complex-1 (TORC2). TORC1 یک تنظیم‌کننده‌ی کلیدی رشد و تکثیر سلولی و ترجمه‌ی mRNA است [۲۱]، درحالی‌که TORC2 بازآرایی اسکلت سلولی اکتین، بقای سلولی و پیشرفت چرخه‌ی سلولی را ارتقا می‌دهد [۲۲]. PRKCB یک پروتئین کیناز است که در تحرک اسپرم و واکنش آکروزوم نقش دارد [۲۳]. پروتئین COPS5، که به نام Jab1 یا CSN5 نیز شناخته می‌شود، در طیف گسترده‌ای از فرایندهای سلولی و تکاملی نقش دارد. با تجزیه و تحلیل موش‌های دارای نقص COPS5 ویژه سلول‌های زایای نر، نشان داده‌اند که COPS5 حفظ بقای سلول زایای نر و بیوژن آکروزوم ضروری است. برای تعیین بهتر نقش Cops5 در سلول‌های میوئید دور لوله‌ای که دودمان عضله‌ی صاف اطراف لوله‌های اسپرم‌ساز است، هووانگ Huang و همکاران در موش‌های تراریخته Myh11-Cre ژن Cops5 را در سلول‌های عضله‌ی صاف دچار نقص کردند. موش‌های هموزیگوت پس از ۱ هفته شروع به نشان دادن تأخیر در رشد کردند. این موش‌ها همچنین انواع اختلالات رشدی و تولیدمثلی از جمله نارسایی در رشد اندام‌های تولیدمثل در نر و ماده، نقص‌های اسپرم‌زایی و اختلال در رشد اسکلتی و عملکردهای ایمنی را نشان دادند. افزون بر این، موش‌های دارای نقص Cops5، اختلال چشمگیری در سیستم غدد درون‌ریز مرتبط با عملکرد بیضه، از جمله کاهش قابل توجه سطوح سرمی گنادوتروپین‌ها (هورمون محرک فولیکول، هورمون لوتئینیزه)، تستوسترون، فاکتور رشد شبه‌انسولین ۱ و گلوکز، اما نه وازوپرسین، نشان دادند. همه‌ی موش‌های هموزیگوت قبل از سن ۶۷ روزگی در این مطالعه مردند. در مجموع، Cops5 در دودمان عضله صاف نقش اساسی در رشد پس از زایمان و عملکردهای تولیدمثل دارد [۲۴].

در این مطالعه، مسیرهای KEGG و Reactome معناداری به دست آمد که از میان آن‌ها می‌توان به ترتیب به آپوپتوز و تنظیم فعالیت TP53 اشاره کرد. در مطالعات گذشته مشخص شده است TP53 یک عامل رونویسی است که در انواع عملکردهای حیاتی سلولی از جمله توقف چرخه‌ی سلولی، ترمیم DNA و آپوپتوز نقش دارد. با این حال، تعداد فزاینده‌ای از مطالعات نشان می‌دهد که TP53 نقش‌های متعددی در اسپرم‌زایی و همچنین در بروز و توسعه‌ی ناباروری مردان ایفا می‌کند [۲۵]. عملکردهای شاخص TP53 در اسپرم‌زایی شامل تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، تمایز اسپرماتوگونیا، آپوپتوز خودبه‌خود و ترمیم آسیب DNA است [۲۶-۲۸]. یافته‌های این مطالعه با تأکید بر اهمیت نقش sRNA در اسپرماتوژنز اختلال یافته، مانند آنچه در

همدان با کد علمی طرح ۱۴۰۲۰۸۰۲۶۱۵۹ است. نویسنده از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه و کارکنان محترم آزمایشگاه جامع قدردانی می‌کند.

تضاد منافع

نویسنده اعلام می‌کند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارد.

ملاحظات اخلاقی

برای مطالعه‌ی حاضر شناسه‌ی اخلاق IR.UMSHA.REC.1402.488 از کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان دریافت شده است.

سهم نویسندگان

نویسنده‌ی اول: ایده‌پردازی و تدوین چارچوب اصلی طرح، نگارش و ویرایش علمی مقاله، تجزیه و تحلیل داده‌ها

حمایت مالی

طرح حاضر از حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان برخوردار بوده است.

NOA شاهد هستیم، زمینه را برای بررسی و درک دقیق‌تر نقش هریک از این توالی‌های تنظیمی فراهم می‌کند. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به نبود امکان بررسی ژن‌های هدف این توالی‌ها با روش‌های آزمایشگاهی اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده ژن‌های هدف پیشگویی‌شده در این پژوهش با ابزارهای مختلف آزمایشگاهی تأیید شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، توالی‌های sRNA همچنان به‌مثابه‌ی عوامل خط اول تنظیم بیان ژن در فرایند هماهنگ و پیچیده‌ی اسپرماتوژنز حائز اهمیت هستند و روش‌های با توان عملیاتی بالا در کشف این کلیدهای تنظیمی حیاتی به ما کمک می‌کنند. توالی‌های جدید یافته‌شده و ژن‌های پیشگویی‌شده‌ی هدف آن‌ها در این مطالعه کاندیدهای مناسبی جهت بررسی نقش آن‌ها در اسپرماتوژنز اختلال‌یافته در جایگاه یک فنوتیپ ناباروری در مردان هستند. در صورت تکمیل پازل نقش sRNAهای مختلف و یافتن مولکول کلیدی در شبکه‌ی ارتباطی آن‌ها و ژن‌های پایین‌دست تحت تنظیم آن‌ها، می‌توان به این توالی‌ها به‌مثابه‌ی اهداف بالقوه‌ی درمانی امیدوار بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی

REFERENCES

- Yue X, Schwartz JC, Chu Y, Younger ST, Gagnon KT, Elbashir S, et al. Transcriptional regulation by small RNAs at sequences downstream from 3' gene termini. *Nature chemical biology*. 2010;6(8):621-9. PMID: 20581822 DOI: 10.1038/nchembio.400
- Rajender S, Meador C, Agarwal A. Small RNA in spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4(4):1266-74. PMID: 22652870 DOI: 10.2741/s330
- He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*. 2009;137(6):901-11. PMID: 19318589 DOI: 10.1530/REP-08-0494
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006;442(7099):203-7. PMID: 16751777 DOI: 10.1038/nature04916
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006;442(7099):199-202. PMID: 16751776 DOI: 10.1038/nature04917
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007;128(6):1089-103. PMID: 17346786 DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.043
- Zhou R, Hotta I, Denli AM, Hong P, Perrimon N, Hannon GJ. Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2008;32(4):592-9. PMID: 19026789 DOI: 10.1016/j.molcel.2008.10.018
- Meikar O, Da Ros M, Korhonen H, Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction*. 2011;142(2):195-209. PMID: 21652638 DOI: 10.1530/REP-11-0057
- Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*. 2008;31(6):785-99. PMID: 18922463 DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.003
- Watanabe T, Cheng EC, Zhong M, Lin H. Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline. *Genome Res*. 2015;25(3):368-80. PMID: 25480952 DOI: 10.1101/gr.180802.114
- Chen H, Xie Y, Li Y, Zhang C, Lv L, Yao J, et al. Outcome prediction of microdissection testicular sperm extraction based on extracellular vesicles piRNAs. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(6):1429-39. PMID: 33686546 DOI: 10.1007/s10815-021-02101-8
- Hong Y, Wang C, Fu Z, Liang H, Zhang S, Lu M, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci Rep*. 2016;6:24229. PMID: 27068805 DOI: 10.1038/srep24229
- Hong Y, Wu Y, Zhang J, Yu C, Shen L, Chen H, et al. Decreased piRNAs in Infertile Semen Are Related to Downregulation of Sperm MitoPLD Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:696121. PMID: 34326815 DOI: 10.3389/fendo.2021.696121
- He L, Wu X, Wu R, Guo P, He W, Sun W, et al. Seminal plasma piRNA array analysis and identification of possible biomarker piRNAs for the diagnosis of asthenozoospermia. *Exp Ther Med*. 2022;23(5):347. PMID: 35493429 DOI: 10.3892/etm.2022.11275
- Piryaee F, Mehta P, Mozdarani H, Hamzehlooy F, Barati M, Piryaee Z, et al. Testicular piRNA Analysis Identified Dysregulated piRNAs in Non-obstructive Azoospermia. *Reproductive Sciences*. 2024;31(5):1246-55. PMID: 38133767 DOI: 10.1007/s43032-023-01433-3
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25. PMID: 19261174 DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Nawrocki EP, Eddy SR. *Infernal 1.1: 100-fold faster RNA*

- homology searches. *Bioinformatics*. 2013;29(22):2933-5. PMID: 24008419 DOI: 10.1093/bioinformatics/btt509
18. Anzelon TA, Chowdhury S, Hughes SM, Xiao Y, Lander GC, MacRae IJ. Structural basis for piRNA targeting. *Nature*. 2021;597(7875):285-289. PMID: 34471284 DOI: 10.1038/s41586-021-03856-x
 19. De Castro RO, Previato de Almeida L, Carbajal A, Gryniuk I, Pezza RJ. PBAF chromatin remodeler complexes that mediate meiotic transitions in mouse. *Development*. 2022;149(18): dev199967. PMID: 36111709 DOI: 10.1242/dev.199967
 20. Wu Y, Shen C, Wu T, Huang X, Li H, Zheng B. Syntaxin binding protein 2 in sertoli cells regulates spermatogonial stem cell maintenance through directly interacting with connexin 43 in the testes of neonatal mice. *Mol Biol Rep*. 2022;49(8):7557-66. PMID: 35604625 DOI: 10.1007/s11033-022-07564-1
 21. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012;485(7396):109-13. PMID: 22552098 DOI: 10.1038/nature11083
 22. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1122-8. PMID: 15467718 DOI: 10.1038/ncb1183
 23. Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*. 2012;14(6):816-21. PMID: 23001443 DOI: 10.1038/aja.2012.81
 24. Huang Q, Man Y, Li W, Zhou Q, Yuan S, Yap YT, et al. Inactivation of Cops5 in Smooth Muscle Cells Causes Abnormal Reproductive Hormone Homeostasis and Development in Mice. *Endocrinology*. 2023;164(6). PMID: 37067025 DOI: 10.1210/endocr/bgad062
 25. Dai MS, Hall SJ, Vantangoli Policelli MM, Boekelheide K, Spade DJ. Spontaneous testicular atrophy occurs despite normal spermatogonial proliferation in a Tp53 knockout rat. *Andrology*. 2017;5(6):1141-52. PMID: 28834365 DOI: 10.1111/andr.12409
 26. Gao X, Chen H, Liu J, Shen S, Wang Q, Clement TM, et al. The REGy-Proteasome Regulates Spermatogenesis Partially by P53-PLZF Signaling. *Stem Cell Reports*. 2019;13(3):559-71. PMID: 31402338 DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.07.010
 27. Lu C, Zhang D, Zhang J, Li L, Qiu J, Gou K, et al. Casein kinase 1 α regulates murine spermatogenesis via p53-Sox3 signaling. *Development*. 2022;149(13). PMID: 35698877 DOI: 10.1242/dev.200205
 28. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, van Buul PP, Gil-Gomez G, Rutgers DH, et al. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ*. 1998;5(8):669-77. PMID: 10200522 DOI: 10.1038/sj.cdd.4400396