



بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن CPEB1 با ناباروری در مردان ایرانی

عاطفه یداللهی خالص^{۱*}، ناصر کلهر^۲، گلناز عطری روزبهانی^۳

چکیده

مقدمه: اسپرماتوژنز یک فرآیند بسیار کنترل شده برای تولید اسپرم بالغ است. برای تولید اسپرم بالغ از گامت، نیاز به تنظیمات رونویسی و پس از رونویسی است. پروتئین CPEB1 پلی آدنیلیشن سیتوپلاسمی mRNA را در اژنز و اسپرماتوژنز کنترل می کند. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2303846 که در موقعیت 3'UTR ژن CPEB قرار گرفته است با ناباروری در مردان ایرانی می باشد.

روش بررسی: در این تحقیق مورد-شاهدی تعداد ۱۴۰ نمونه خون از جمعیت های مختلف ایرانی (۷۰ سالم و ۷۰ نابارور) تهیه شد. ژنوتیپ های rs2303846 توسط روش PCR-RFLP تعیین و با روش توالی یابی تایید گردید. سرانجام اطلاعات حاصله از طریق نرم افزار آنلاین SNPSTAT و SPSS مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. ارتباط این پلی مورفیسم با miRNA ها نیز بررسی شد.

نتایج: نتایج بدین صورت بود که ژنوتیپ TT تنها در ۵ نفر از ۷۰ نمونه افراد نابارور مشاهده گردید، در صورتی که همه افراد کنترل دارای ژنوتیپ CC بودند؛ اختلاف معناداری دیده می شود ($P=0/023$). پلی مورفیسم rs 2303846 در ناحیه seed سه miRNA (hsa-miR-143-5p, hsa-miR- 6511b-5p, hsa-miR-3944-5p) قرار دارد و آلل T سبب از بین رفتن seed می شود. همچنین آلل T منجر به سست شدن اتصال همه miRNA های انتخابی می شود.

نتیجه گیری: پلی مورفیسم (rs C/T 2303846) واقع در ژن CPEB1 می تواند با خطر ابتلا به ناباروری در مردان ایرانی مرتبط باشد. همچنین بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که با تغییر آلل T به جای C در rs 2303846 اتصال mRNA ژن CPEB1 به miRNA های تنظیم کننده آن کاهش می یابد، در نتیجه ژن پایدار و بیان آن ادامه می یابد.

واژه های کلیدی: ناباروری مردان، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ژن CPEB1

۱،۳- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۲- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی، قم

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۲۴۲۶۴۸، پست الکترونیکی: atefeyadollahy@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰

مقدمه

ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات بهداشتی در جهان است. متأسفانه آمار ناباروری در ایران بیشتر از میانگین آمار جهانی (۱۵٪) است. در حدود نیمی از موارد ناباروری یک عامل مردانه دخیل است. حضور عامل مردانه اغلب بر اساس پارامترهای اسپرم غیرطبیعی (آزواسپرمی تا الیگواسپرمی) صورت می‌گیرد. با وجود تلاش‌های صورت گرفته در یافتن دقیق طبیعت ناباروری، بیشتر مردان مبتلا به ناباروری با منشأ ناشناخته هستند. پیشنهاد شده است که این نوع از ناباروری می‌تواند حاصل جهش‌ها و یا تغییرات دیگر در ژن‌های درگیر در اسپرماتوژنز باشد (۱). در طول اسپرمیوژنز، جایگزینی پروتامین به جای هیستون‌ها منجر به خاموش شدن رونویسی در هسته می‌شود؛ بنابراین منشأ رونوشت‌های موجود در اسپرم بالغ مربوط به مراحل پیشین اسپرماتوژنز است (۲). در این زمان عملکرد مولکول‌های تنظیم‌کننده بیان رونوشت‌ها، در بلوغ اولیه اسپرماتوسیت اهمیت زیادی دارد. بیان ژن به طرق مختلف تحت کنترل قرار می‌گیرد. بیان بسیاری از mRNAها در ناحیه غیر ترجمه‌ای یا (UTR) untranslated region کنترل می‌شود (۳).

یکی از تنظیم‌کننده‌های بیان ژن در سطح بعد از رونویسی، میکرو RNAها (miRNA) هستند. آن‌ها RNAهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که حدود ۲۱-۳۰ نوکلئوتید طول دارند و معمولاً با اتصال به ناحیه 3'UTR mRNA مانع از فرآیند ترجمه mRNA هدف می‌شوند. ایجاد تعداد کمی جفت باز مکمل برای برهم‌کنش عملکردی بین miRNA و توالی مولکولی هدف ضروری است. در اغلب موارد، ایجاد جفت باز مکمل در ۶-۷ نوکلئوتید صورت می‌گیرد که معمولاً شامل نوکلئوتیدهای ۲ تا ۹ از انتهای 5' میکرو RNA هستند و به این ناحیه «seed» می‌گویند. miRNAهای متعددی به صورت اختصاصی در بیضه موش بیان می‌شوند (۴).

Cheng Wang و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی میزان miRNA در مردان بارور و نابارور، هفت miRNA شامل miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p و miR-513a-5p را مشخص کردند که

می‌تواند به عنوان مارکر تشخیص ناباروری در مردان استفاده شود (۵).

همچنین پلی‌مورفیسم موجود در hsa-miR-196a-2 هم با ناباروری مردان در ارتباط است (۶)؛ بنابراین جهش‌ها و پلی-مورفیسم‌های موجود در miRNAها و یا در محل اثر آن‌ها، با اختلالات مختلفی مثل ناباروری در ارتباط است و می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد. نرم‌افزارهای آنلاین مختلفی مثل mirwalk, mirmap, miRanda, targetscan و miRNA برای بررسی‌های بیوانفورماتیکی miRNAها به کار می‌روند (۷،۸).

یکی دیگر از روش‌های کنترل بیان ژن در سطح بعد از رونویسی، تنظیم طول دم پلی A در mRNA است. بیشتر mRNAهای یوکاریوتی در انتهای 3' خود دارای یک ردیف با بیش از ۲۵۰ آدنین به نام دم پلی A می‌باشند. طول دم پلی A به عواملی مانند گونه جاندار، نوع mRNA، مراحل زیست سلولی و سن mRNA وابسته است (۹). همچنین طول این دم عامل تعیین‌کننده پایداری mRNA است؛ زیرا به تدریج این دم به وسیله 3'-اگزونوکلازها تجزیه و به ناحیه رمز کننده نزدیک می‌شود و عمر mRNA نیز کاهش می‌یابد. به همین دلیل هر چه طول دم پلی A بیشتر باشد، عمر mRNA نیز بیشتر خواهد بود (۱۰). با توجه به بررسی‌های انجام شده پلی آدنیلایسیون در دو سطح در جانداران رخ می‌دهد. یکی پلی آدنیلایسیون در هسته که در تمام سلول‌های سوماتیکی عاملی برای خروج mRNA از کمپلکس منافذ هسته‌ای به سیتوپلاسم است و دیگری پلی آدنیلایسیون در سیتوپلاسم است که در گامت‌های جنسی هر دو جنس نر و ماده و همچنین در برخی از سلول‌های سوماتیکی مثل سیناپس عصبی شناسایی شده است. پلی آدنیلایسیون سیتوپلاسمی نقش مهمی در پدیده‌هایی همچون بلوغ اووسیت و اسپرماتوسیت، پیشرفت میتوزی چرخه سلولی، پیری سلولی و انعطاف‌پذیری سیناپسی دارد. پلی آدنیلایسیون نیازمند حضور توالی‌های نشانه در pre-mRNA است. پروتئین CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding) با

۱۴ اگزون تشکیل شده که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۵ (15q25.2) واقع شده است و پروتئین شدیداً حفاظت شده‌ای به نام CPEB1 را کد می‌کند. Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۱ متوجه شدند که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی موجود در ناحیه 3'UTR ژن CPEB1 با ناباروری ناشناخته مردان در جمعیت چین ارتباط دارد. با کمک نرم‌افزارهای مختلف مثل، miRanda و Targetscan و RNAhybrid دریافتند که این اسنپ در کیفیت اتصال به میکرو RNAهای has-miR-663 و has-miR-668 نقش دارد (۱۶).

با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای ژنی CPEB1 در ایران انجام نشده است و اختلال در این ژن با اختلالات مختلفی در ارتباط است، این مطالعه انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌گیری و استخراج DNA: در این مطالعه مورد-شاهدی، از نمونه‌های خون مربوط به ۷۰ مرد نابارور (الیگواسپرمی و آزواسپرمی) که برای درمان ناباروری به مرکز ناباروری قم مراجعه کرده بودند و ۷۰ نمونه مربوط به گروه کنترل استفاده گردید. بیماران و افراد کنترل در محدوده سنی ۵۰-۲۵ سال و از قومیت‌های مختلف ایرانی بودند. پس از کسب رضایت نامه کتبی از همه افراد شرکت کننده در این مطالعه، به منظور استخراج DNA، مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از خون محیطی این افراد را که در لوله حاوی EDTA بود جدا شد. DNA از سلول‌های لوکوسیت خون به روش کلروفورم استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه نانودراپ و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. سرانجام نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

PCR-RFLP: تکنیک PCR جهت تکثیر ژن مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی که با کمک بانک‌های اطلاعاتی و نرم‌افزار oligo5 طراحی شده بود صورت گرفت. توالی پرایمرهای اختصاصی ژن CPEB1 طبق جدول ۱ است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی برای PCR ژن CPEB

Type of Prymer	Sequence(5'-3')	length	Tm	GC%
Forward	CTCCAAACAGAACAAAGCAGC	20	57.59	50.00
Reverse	TCAGTTTGCCGTTTCAGGT	20	57.15	45.00

اتصال به توالی نشانه CPE (UUUUA₁₋₃U) موجود در mRNA ها، طول دم پلی A آنها را تنظیم می‌کنند (۱۱).

در سال ۲۰۰۱ مشاهده شد که موش‌های نر و ماده‌ای که در ژن CPEB ناک اوت شده‌اند، وزن غدد جنسی و مقدار گامت کمتری نسبت به موش‌های سالم دارند. پیشنهاد می‌شود، در این دسته از موش‌ها بلوغ گامت‌ها در مرحله پاکیتن متوقف می‌شود، چون تنظیم طول دم پلی A و میزان ترجمه از mRNA های پروتئین‌های مؤثر در تشکیل کمپلکس سیناپتونمال (Synaptonemal complex) وابسته به پروتئین CPEB1 است (۱۲). پروتئین CPEB1 در پایداری و میزان بیان بسیاری از mRNA های مرتبط با گامتوژنز نقش دارد (۱۳). خانواده پروتئین CPEB از چهار عضو تشکیل شده‌اند: CPEB1-4. هر چهار پارالوگ در انتهای کربن (C-terminal) دارای دو موتیف شناسایی کننده (RRMs) (RNA recognition motifs) و RNA RRM یک دومین متصل شونده به روی (zinc-binding domain) ZZ domain است. این پروتئین با دومین متصل شونده به RNA ی خود به طور مستقیم با توالی CPE و از طریق انتهای آمین خود با پروتئین‌های دیگر در ارتباط است. توالی موتیف RRM در سه پارالوگ CPEB2-4 ۹۷٪ شبیه هم است در صورتی که CPEB1 ۴۸٪ با آنها شباهت دارند. بدین گونه بر اساس الگوی تکاملی، CPEB ها را به دو گروه اصلی تقسیم می‌کنند: CPEB1 و CPEB2-4. عملکرد متفاوت این دو گروه هنوز شناخته نشده است اما تنظیم یک جمعیت mRNA توسط هر دو گروه دیده شده است (۱۴).

Morgan و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند که دو میکرو RNA به نام‌های miR-92 و miR-26 با اتصال به ناحیه 3'-UTR هر سه پارالوگ CPEB2-4 به عنوان مولکول تنظیم‌کننده عمل می‌کند. آنها پیشنهاد کردند در هر 3'-UTR یک الگوی حفاظت شده از موتیف miRNA-binding وجود دارد (۱۵). ژن CPEB₁ از

گرفت. فراوانی ژنوتیپی و آلی در دو گروه بیمار و کنترل محاسبه گردید. برای ارتباط بین ژنوتیپها و ناباروری مردان از آزمون‌های آماری χ^2 (Chi-Square) و OR (Odd Ratio) استفاده شد. $P < 0.05$ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف نتایج بین دو گروه است.

همچنین پس از تخمین فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی داده‌ها وجود تعادل هاردی واینبرگ (Hardy-Weinberg Equilibrium) HWE مورد بررسی قرار گرفت. با نرم‌افزار SNPSTAT بر اساس آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل هاردی واینبرگ پرداختیم.

آنالیزهای بیوانفورماتیک: ابتدا با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین targetscan, miRanda و mirwalk چندین miRNA که به نحوی، اسنیپ rs2303846 در اتصال با آن دخالت می‌کند را مشخص نمودیم. سپس اختلاف انرژی پایداری که آل T و C در اتصال با miRNAها ایجاد می‌کند را با نرم‌افزار RNAhibrid به دست آوردیم. هر چه انرژی اتصال آنها منفی‌تر باشد یعنی miRNA بهتر به mRNA ژن CPEB1 متصل می‌شود و می‌تواند نقش خود را ایفا کند. واضح است که miRNAهایی که اسنیپ مورد نظر در جایگاه seed آنها واقع شده است اثر بیشتری نسبت به سایرین دارد.

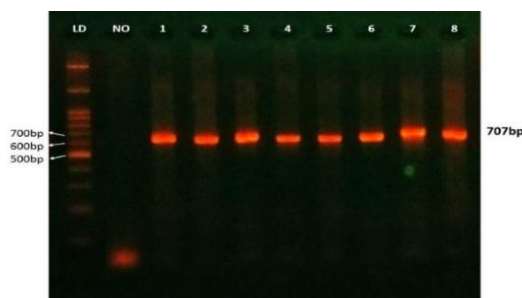
نتایج

غلظت DNA استخراج شده با روش کلروفورم از نمونه‌های خون ۷۰-۱۰۰ ng/μl برآورد گردید که غلظتی مناسب برای انجام کارهای مولکولی مثل PCR است. انجام PCR با دو پرایمر اختصاصی رفت و برگشت برای تکثیر قطعه ۷۰۷ bp از ژن CPEB1 نتایج مطلوبی ارائه داد که نمونه‌ای از آن در شکل ۱ به نمایش گذاشته شده است.

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems Thermo Cycler, Singapore) و در حجم ۲۵ μl انجام گرفت. مواد مصرف شده در واکنش PCR ژن CPEB1 شامل ۳ μl نمونه DNA، ۵ pmol پرایمر F و R (شرکت سینا ژن، تهران، ایران)، ۲ μl بافر $\times 10$ ، ۱ mM از Mgcl2، ۰/۴ mM از dNTP-Mix و ۱ U آنزیم پلیمرز (شرکت کوثر، تهران) بود. برنامه PCR با واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای 94°C ، ۴۰ سیکل با برنامه 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای 57°C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای 72°C به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای 72°C در دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید. پس از انجام الکتروفورز محصولات PCR، آشکارسازی باندها بررسی شد و سپس محصول PCR ژن CPEB1 توسط آنزیم محدودکننده RsaI (Fermentas, Germany) که توسط سایت NEBcutter انتخاب گردیده بود، مورد برش آنزیمی قرار گرفت. جایگاه شناسایی و برش آنزیم به صورت 3'...CATG...5' است.

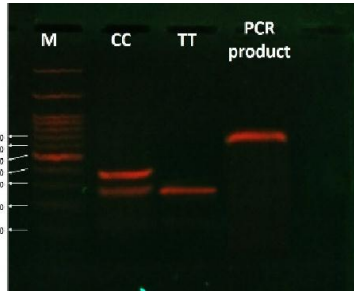
واکنش RFLP شامل مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱ واحد آنزیم RsaI، ۲ میکرولیتر بافر و حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. انکوباسیون نمونه در دمای 37°C به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت. در پایان به منظور بررسی نحوه عمل آنزیم از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ استفاده گردید. تعیین توالی: بعد از بررسی محصولات هضم آنزیمی، نمونه‌های مشکوک به هموزیگوت طبیعی (دارای دو باند) و نمونه‌های مشکوک به جهش هموزیگوت غیرطبیعی (دارای سه باند) توسط شرکت تکاپوزیست تعیین توالی شد.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (19) صورت

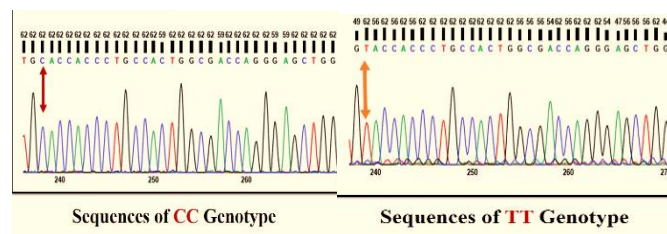


شکل ۱: محصولات PCR ژن CPEB1 بر روی ژل آگارز ۲٪ با مارکر 100bp. ردیف ۸-۱ نمایانگر قطعه ۷۰۷ bp تکثیر شده می‌باشند.

دارای سه باند (300bp و 263bp و 144bp) می‌باشند. در نمونه‌های TT، انطباق دو باند 300bp و 263bp مشاهده گردید. الگوی حاصل از RFLP توسط آنزیم RsaI بر روی ژل آگارز ۲٪ و مارکر 100bp و مقایسه آن با محصول PCR در شکل ۲ به نمایش گذاشته شده است.



شکل ۲: محصولات RFLP ژن CPEB1 بر روی ژل آگارز ۲٪ با مارکر 100bp. قطعه حاصل از انطباق دو قطعه 300bp و 263bp نشانۀ ژنوتیپ CC است. نشانۀ ژنوتیپ TT و سه قطعه 300bp و 263bp و 144bp نشانۀ ژنوتیپ CC است.



شکل ۳: نتایج توالی یابی پلی مورفیسم rs2303846 در دو ژنوتیپ CC (سمت چپ) و ژنوتیپ TT (سمت راست)

جدول ۲ نمایش داده شده است. در بین گروه نابارور و کنترل $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود و به معنای آن است که انحراف مشاهده شده از فرضیه صفر معنادار است. با توجه به جدول ۲، نتیجه آزمون Pearson Chi-Square $P = 0.023$ اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در واقع تغییر نوکلئوتیدی مورد بررسی با ناباروری مردان در ارتباط است.

تمامی نمونه‌های تکثیرشده با استفاده از PCR توسط آنزیم محدودکننده RsaI هضم شدند. نمونه‌های حاوی نوکلئوتید C در هر دو آلل (هموزیگوت‌های طبیعی) در محل SNP مورد بررسی (rs2303846) دارای دو باند (407 bp و 300bp) می‌باشند و نمونه‌های دارای جهش هموزیگوت غیرطبیعی

با توجه به اطلاعات به دست آمده از این پلی مورفیسم، دو ژنوتیپ TT و CC در جمعیت مردان ایرانی مشاهده شد. تنها ۵ نفر از ۷۰ نمونه (۷٪) نابارور مورد بررسی دارای ژنوتیپ TT بودند و همه افراد کنترل دارای ژنوتیپ CC بودند. هیچ ژنوتیپ هتروزیگوت CT در جمعیت مورد بررسی مشاهده نشد. نتایج آنالیزهای آماری Chi-Squared و odd Ratio در

جدول ۲: توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی rs2303846 در جمعیت بیمار و سالم

CPEB1 (rs2303846)	Genotypes	Fertile n (%)	Infertile n (%)	Total	Pearson Chi-Square			OR (p-Value)
					χ^2	df	p-Value	
CC	70 (100%)	65 (93%)	135 (96%)	5.185	1	0.023	0.0076	
TT	0 (0%)	5 (7%)	5 (4%)					
Alleles	C	140 (100%)	130 (93%)	270 (96%)	5.185	1	0.023	0.0076
	T	0 (0%)	10 (7%)	10 (4%)				

کردها با ۱۲٪ دیده شد.

برای مشخص کردن ارتباط فراوانی ژنوتیپی با جمعیت‌های مختلف ایرانی (کرد، لر، عرب، گیلکی، فارس و ترک) از آزمون Chi-Squared استفاده گردید. نتایج در جدول ۳ مشاهده می‌شود. طبق نتیجه آزمون Pearson Chi-Square ($P=0/192$) اختلاف معنی‌دار نیست؛ یعنی ژنوتیپ‌های مربوط به rs2303846 به صورت یکنواخت در جمعیت‌های مختلف قرار گرفته است و جمعیت همگن است.

جدول ۳: توزیع فراوانی ژنوتیپی rs2303846 در قومیت‌های مختلف جمعیت مردان ایرانی

CPEB1 (rs2303846)	Turk	Fars	Lor	Gilaki	Arab	Kurd	χ^2	df	p-Value
CC	13	24	7	9	9	3	7.405	5	0.192
TT	0	2	2	0	0	1			
Total	13	26	9	9	9	4			

محسوب می‌گردد، بر آن شدیم تا با بررسی‌های مولکولی، گامی در تشخیص دقیق‌تر یکی از شایع‌ترین مشکلات جامعه پزشکی ایران، ناباروری، برداریم.

برای تشخیص بهتر ناباروری ناشناخته مردان، به بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، واقع در ناحیه 3'UTR ژن CPEB1 که یکی از ژن‌های مؤثر در تنظیم گامتوژنز است، پرداخته شد.

ناحیه 3'UTR ژن‌ها، محل اثر تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی مثل miRNAها هستند. هر چه miRNAها با اتصالات پایدارتری به mRNA متصل شوند، بیشتر می‌توانند اثر مهار خود را بر بیان ژن اعمال کنند.

Zhang Hao و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مطالعه چندین پلی‌مورفیسم از جمله rs ۲۳۰۳۸۴۶ در ناحیه 3'UTR ژن CPEB1 پرداختند و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف آن را با ناباروری در جمعیت مردان چینی اثبات نمودند (۱۶). برای تعمیم‌پذیری تأثیر این پلی‌مورفیسم در ناباروری مردان در کشور ایران، این ارتباط در جمعیت مردان ایرانی بررسی می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مورد-شاهدی میزان پلی‌مورفیسم

در این افراد odd Ratio به علت عدم حضور آلل T در نمونه‌های کنترل قابل محاسبه نیست. فراوانی ژنوتیپ در دو گروه نابارور و کنترل ($p=0/0076$) در سطح معنی‌داری $P<0/05$ است که به معنای اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ CC و TT می‌باشد.

در جمعیت ایران از مردان قومیت‌های مختلفی از جمله ترک، کرد، لر، گیلکی، فارس و عرب نمونه‌گیری شد. ژنوتیپ TT بیشتر در جمعیت لرها با ۱۴٪ و بعد از آن در جمعیت

نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی با نرم‌افزار mirwalk مشخص کرد که این پلی‌مورفیسم در ناحیه seed سه miRNA (hsa-miR-3944-5p, hsa-miR-143-5p, miR-6511b-5p)، قرار دارد و آلل T سبب از بین رفتن seed می‌شود؛ بنابراین اسنیپ می‌تواند سبب کاهش تمایل miRNA به ژن شود. بیان این سه miRNA در بافت بیضه و اپیدیدیم هنوز مشخص نشده است.

با استفاده از نرم‌افزارهای mirWalk، targetscan و mirbase و مطالعات قبلی چندین miRNA که به نحوی می‌توانست مرتبط با این اسنیپ باشد (خارج از توالی seed) را انتخاب و با نرم‌افزار RNAhibrid، میزان حداقل انرژی آزاد Minimum Free Energy (mfe) اتصال miRNA به mRNA را مشخص نمودیم. هر چه انرژی اتصال آن‌ها منفی‌تر باشد یعنی miRNA بهتر به mRNA ژن CPEB1 متصل می‌شود و می‌تواند آن را غیرفعال کند. با توجه به نحوه اتصال miRNA به mRNA و میزان حداقل انرژی آزاد آن‌ها (mfe) Minimum Free Energy نتیجه گرفتیم که آلل T با سست کردن این اتصال مانع مهار شدن mRNA می‌شود (۱۷).

بحث

با توجه به اینکه تشخیص صحیح بیماری‌ها نیمی از درمان

T با ممانعت از این مهار شدن، منجر به مداومت در بیان ژن و تأثیر منفی در اسپرمزایی می‌گردد. برای اثبات این فرضیه پیشنهاد می‌شود که میزان بیان miRNAهای تنظیم کننده این ژن را در بافت اپیدیدیم و بیضه افراد نابارور سنجیده و با افراد کنترل مقایسه شود، سپس پلی مورفیسم‌های موجود در miR مرتبط با این اسنیپ مورد مطالعه قرار گیرد. با توجه به این که ژن CPEB1 علاوه بر اسپرماتوژنز، در اووژنز هم نقش دارد، پیشنهاد می‌شود که اسنیپ‌های این ژن در ژنوم زنان نابارور نیز بررسی گردد.

سپاسگزاری

این کار پژوهشی با مجوز و حمایت مالی دانشگاه شهید بهشتی تهران و بخش ژنتیک جهاد دانشگاهی قم انجام شد.

rs ۲۳۰۳۸۴۶ در ژن CPEB1 را در ۷۰ مرد بارور و ۷۰ مرد نابارور از قومیت‌های مختلف ایرانی بررسی کردیم. مشخص شد که ژنوتیپ TT در افراد نابارور بیشتر وجود دارد. این نتیجه با نتایج تحقیقات پیشین که در کشورهای مختلف انجام شده بود، مطابقت داشت، ولی برای اطمینان، بهتر است از نمونه‌های بیشتری استفاده شود.

در این مطالعه با بررسی‌های بیوانفورماتیکی مشخص شد که با جایگزین شدن آلل T به جای C در پلی مورفیسم rs2303846، اتصال mRNA ژن CPEB1 به miRNAهای تنظیم کننده آن، کاهش می‌یابد، در نتیجه پایداری ژن بیشتر شده و بیان آن ادامه می‌یابد. به طور طبیعی بیان ژن CPEB1 باید بعد از انجام عملکردش توسط miRNA مهار شود؛ ولی آلل

References:

- 1-Karamzade A, Mirzapour H, Kheirollahi M. *Genetics Aspects of Male Infertility*. Isfahan Medical School 2013; 31(246): 1149-62.
- 2- Modarressi MH, Eghbali M. *RNAs in Mature Spermatozoa*. Razi J Med Sci 2013; 20(109): 1-11.
- 3- De Moor C H, Meijer H, Lissenden S. *Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation*. Semin Cell Dev Biol 2005; 16(1): 49-58.
- 4- Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. *MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis*. PLoS One 2008; 3(3): e1738.
- 5-Cheng Wang, Junjun Wang, Cuihua Yang, Xiaojun Li, Xi Chen, Yong Shao, et al. *Altered Profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility*. Molecular Diagnostics and Genetics 2011; 57(12): 1722-31.
- 6- Lu J, Gu H, Tang Q, Wu W, Yuan B, Guo D, et al. *Common SNP in hsa-miR-196a-2 increases hsa-miR-196a-5p expression and predisposes to idiopathic male infertility in Chinese Han population*. Scientific Reports 2016; 6: 19825.
- 7- Ogorevc J, Dovc P, Kunej T. *Polymorphisms In Microrna Targets: A Source Of New Molecular Markers For Male Reproduction*. Andrology 2011; 13(3): 505-8.
- 8-Chen K, Rajewsky N. *Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data*. NATURE GENETICS 2006; 38(12): 1452-6.
- 9- Bava FA, Elisovich C, Ferreira PG, Minana B, Ben-Dov C, Guigo R, Mendez R. *CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation*. Nature 2013; 495(7439): 121-5.

- 10- Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti AC. *Translational regulation during oogenesis and early development: The cap-poly (A) tail relationship*. C. R 2005; 328(10-11): 863-81.
- 11- Charlesworth A, Meijer HA, de Moor CH. *Specificity Factors In Cytoplasmic Polyadenylation*. Wires RNA 2013; 4(4): 437-61.
- 12- Tay J, Richter JD. *Germ Cell Differentiation and Synaptonemal Complex Formation Are Disrupted in CPEB Knockout Mice*. Developmental Cell 2001; 1(2): 201-13.
- 13- Simon R, Tassan JP, Richter JD. *Translational control by poly(A) elongation during Xenopus development: differential repression and enhancement by a novel cytoplasmic polyadenylation element*. Genes Dev 1992 ; 6(12): 2580-91.
- 14- Mendez R, Richter JD. *Translational Control By Cpeb:A Means To The End*. Molecular Cell Biology 2001; 2(7): 521-9.
- 15- Morgan M, Iaconcig A, Muro AF. *Cpeb2, Cpeb3 And Cpeb4 Are Coordinately Regulated By Mirnas Recognizing Conserved Binding Sites In Paralog Positions Of Their 30-UTRS*. Nucleic Acids Res 2010; 38(21): 7698-710.
- 16- Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, et al. *A Single Nucleotide Polymorphism In A Mir-1302 Binding Site In Cga Increases The Risk Of Idiopathic Male Infertility*. Fertility and Sterility 2011; 96(1): 34-39.
- 17- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. *Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2004; 10(10): 1507-17.

Association between CPEB1 gene polymorphism and Iranian male infertility

Atefe YadollahyKhaless^{*1}, Naser Kalhor², Golnaz Atri Roozbahani³

¹ Department of Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Department of Genetic, Acecer Academic Center for Education and Research, Ghom, Iran

³ Department of Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 29 Jan 2017

Accepted: 27 Jul 2017

Abstract

Introduction: Spermatogenesis is a strictly regulated process in sperm production that is needed for sperm production transcriptional and posttranscriptional regulations. The cytoplasmic polyadenylation element binding (CPEB) protein regulates cytoplasmic polyadenylation of mRNAs in oogenesis and spermatogenesis. The purpose of the present study was examining the association between rs2303846, which is located at 3'UTR of CPEB gene, and Iranian male infertility.

Methods: In this case-control analysis, 140 blood samples were collected (70 fertile men and 70 infertile men). rs2303846 genotypes were determined by PCR-RFLP method and the results were confirmed by sequencing. The differences in genotype distributions between cases and fertile controls were examined using Chi-squared analysis and SNPSTAT software. Correlation between this SNP and miRNAs was examined.

Results: TT genotype was observed in 5 infertile men among 70 case samples, while all control samples showed CC genotype and there was a significant association in this difference ($P= 0.023$). This SNP exist in seed region of three miRNAs (hsa-miR-143-5p, hsa-miR- 6511b-5p, hsa-miR-3944-5p) and T allele causes seed destruction. In addition, T allele leads to the loose binding of all the selected miRNAs.

Conclusion: Our results indicate that rs2303846, which is located on CPEB1 is associated with the risk of infertility in Iranian population. Our bioinformatics analysis showed that changing the T allele of rs2303846, instead of C allele could loose miRNA binding to their target genes in our selected miRNAs. Consequently, the gene is stable and its expression continues.

Keywords: Male Infertility, Single nucleotid polymorphism , CPEB1 gene

This paper should be cited as:

YadollahyKhaless A, Kalhor N, Atri Roozbahani G. Association between CPEB1 gene polymorphism and Iranian male infertility. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(8): 612-20.