

## نقش و تأثیر پروتئین شوک حرارتی A2 در ناباروری مردان

مرجان مطیعی <sup>\*\*\*</sup>، M.Sc.، مرضیه تولائی <sup>\*\*</sup>، M.Sc.، محمدحسین نصر اصفهانی <sup>\*\*\*</sup>، Ph.D.

\* مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی و

گروه زیست‌شناسی سلول جنسی، اصفهان، ایران

\*\* دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور تهران، ایران

\*\*\* گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده علوم تولید مثل پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

و مرکز باروری و ناباروری اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: آبان ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: دی ماه ۹۰

### چکیده

پروتئین‌های شوک حرارتی گروهی از پروتئین‌های هومولوگ است که توسط یک خانواده مولتی ژن کد می‌شود و براساس اندازه و عملکرد به پنج گروه تقسیم می‌شود که عبارتند از: HSP27، HSP60، HSP70، HSP90 و HSP100. پروتئین‌های شوک حرارتی می‌تواند از نظر ساختمانی بیان شده و بیان آن‌ها در اثر استرس حرارتی یا متابولیسمی افزایش یابد. HSPA2/Hsp70-2 یک پروتئین ۷۰ کیلودالتونی است که از نظر ساختمانی در بیضه بیان می‌شود. این پروتئین برای بلوغ اسپرم ضروری است و با ناباروری ارتباط دارد. نشان داده شده است که HSPA2 در بیضه انسان در دو فاز بیان می‌شود. (۱) میوز به عنوان محتوای کمپلکس سیناپتونمال و (۲) اسپرمیورنز در هنگام بلوغ و به عنوان شاخص بلوغ اسپرم معرفی می‌شود. چندین عملکرد پروتئین HSPA2 در بیضه انسان عبارتند از: پیچش پروتئین، تشکیل و دسیناپس کمپلکس سیناپتونمال، ترمیم شکست‌های رشته DNA، بازسازی غشای پلاسمایی و زدودن سیتوپلاسم اضافی. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که HSPA2 نقش کلیدی در اسپرماتوژنز دارد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه زیستی - بالینی، بررسی نقش و تأثیر پروتئین شوک حرارتی A2 در ناباروری مردان است.

کلید واژه‌ها: HSPA2، اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم، ناباروری

### مقدمه

شده و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP: Heat Shock Proteins) نام گرفت [۲]. پروتئین‌های شوک حرارتی پستانداران، پروتئین‌های یوبیکوئیتینه بسیار حفاظت شده‌ای است که از اجداد پروکاریوتی نشأت گرفته و در سیتوزول، میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی و هسته سلول‌های

برای نخستین بار واکنش سلول نسبت به شوک حرارتی در سال ۱۹۶۲ در کروموزوم‌های غده بزاقی مگس میوه (*Drosophila melanogaster*) گزارش شد. کروموزوم‌ها بعد از قرار گرفتن در معرض حرارت، حالت متورمی را نشان دادند [۱]. ۱۲ سال بعد محصولات ژنی مسئول این فرآیند شناسایی

آدرس مکاتبه: پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی

تولید مثل جهاد دانشگاهی، گروه زیست‌شناسی سلول جنسی، صندوق پستی: ۸۱۵۸۹۶۸۴۳۳

Email: Tavalaae.royan@gmail.com

پروتئین‌ها، تراکم ساختارهای مولتی پروتئین، ترشح، نقل و انتقال و جابه‌جایی پروتئین‌ها در عرض غشاء، تجزیه پروتئین و تنظیم فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین‌کینازها مشارکت دارد [۸ و ۹].

ب) در شرایط استرس: پروتئین‌های شوک حرارتی در پاسخ به بسیاری از استرس‌های محیطی، متابولیکی و فیزیولوژیکی القا می‌شود. این پروتئین‌ها به فضای خارج سلولی آزاد شده و با سلول‌های مجاور واکنش می‌دهد یا وارد جریان خون می‌شود و از طریق حفظ هوموستازی پروتئین و توقف آپوپتوز وابسته به کاسپاز از سلول‌ها محافظت می‌کند [۵ و ۱۰]. استرس‌های محیطی و متابولیکی عبارتست از شوک حرارتی [۱۱ و ۱۲]، عوامل شیمی‌تراپی، کمبود مواد غذایی [۱۳]، اشعه ماورای بنفش [۱۴]، افزایش تکرار پلی‌گلوتامین [۱۵]، فاکتور نکروز توموری (TNF: Tumor Necrosis Factor) [۱۶ و ۱۷]، آنوکسیا (anoxia)، هیپوکسی (hypoxia)، ایسکمی (ischemia)، یون‌های فلزی سنگین، اتانل، نیکوتین، استرس جراحی و عوامل ویروسی، آنالوگ‌های آمینواسیدی و بسیاری از عوامل و درمان بیماری‌هایی که با کاهش ATP همراه است [۸ و ۹]. استرس‌های فیزیولوژیکی نیز عبارتست از رشد سلولی، تمایز، تکامل و پیری [۱۸ و ۱۹]. بنابراین اصطلاح "پروتئین شوک حرارتی" نام صحیحی نیست زیرا ممکن است عوامل زیادی به جز حرارت، بیان این پروتئین‌ها را القا کنند. در نتیجه «پروتئین استرس» اصطلاح بهتری است. انواعی از سلول‌ها مانند سلول‌های عصبی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های B، سلول‌های توموری با منشاء اپی‌تلیال این پروتئین‌های استرس را بیان می‌کند [۲۰-۲۲]. این پروتئین‌ها به پیش‌مجدد پروتئین‌های دناتوره شده کمک می‌کند یا بعد از استرس یا صدمه سبب تجزیه آن‌ها می‌شود. بنابراین از آثار متابولیکی حاصل از پیش‌نادرست پروتئین‌ها و مرگ سلولی ناشی از پروتئوتوکسیک جلوگیری می‌کند [۴ و ۱۰].

تمام ارگانسیم‌ها وجود دارد [۳ و ۴]. بسیاری از پروتئین‌های شوک حرارتی به‌طور مداوم بیان می‌شود و برخی با افزایش استرس، افزایش می‌یابد، به عبارتی قابل‌القا با استرس است. القای پروتئین‌های شوک حرارتی در دو مرحله نسخه‌برداری و ترجمه انجام می‌شود. نسخه‌برداری توسط فاکتورهای نسخه‌برداری شوک حرارتی (HSF: Heat Shock Factor) کنترل می‌شود. این فاکتورهای نسخه‌برداری توسط استرس‌های ویژه‌ای فعال می‌شود. فاکتورهای غیرفعال به صورت مونومر است و در زمان فعالیت به صورت تریمر در آمده و به جایگاه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی یعنی عناصر پاسخ‌دهنده شوک حرارتی (HSE: Heat Shock Elements) متصل می‌شود؛ با این اتصال نسخه‌برداری آغاز شده و در نهایت ترجمه در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد [۶-۸]. بنابراین با توجه به اهمیت پروتئین‌های شوک حرارتی، در این مطالعه سعی بر آن شد تا یکی از پروتئین‌های عملکردی دخیل در باروری مردان تحت عنوان HSPA2 بررسی شود.

## ۱- پروتئین‌های شوک حرارتی

### ۱-۱- بیان پروتئین‌های شوک حرارتی

پروتئین‌های شوک حرارتی در دو شرایط متفاوت بیان می‌شود که عبارتند از:

الف) شرایط فیزیولوژیکی: این پروتئین‌ها نقش ساختمانی داشته و به القای شوک حرارتی حساسیت کمتری دارد. این پروتئین‌ها می‌تواند با اتصال به پلی‌پپتیدهای تازه ساخته شده، مانع پیش‌قبل از بلوغ آن‌ها شود و آن‌ها را به ارگانل‌ها منتقل کند [۷]. پروتئین‌های شوک حرارتی به دلیل این نوع عملکرد، «چاپرون‌های مولکولی» نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها به نظر می‌رسد برای تاخوردگی سه بعدی تعدادی از پروتئین‌هایی که به تازگی ساخته شده ضروری است و به آن‌ها یک شکل عملکردی می‌دهد [۴]. در مجموع پروتئین‌های شوک حرارتی در تسهیل سنتز و تاخوردگی

## ۱-۲- انواع پروتئین‌های شوک حرارتی

پروتئین‌های شوک حرارتی متعلق به یک خانواده چندژنی بوده و دارای وزن مولکولی ۸-۱۵۰ کیلودالتون است. نام‌گذاری پروتئین‌های شوک حرارتی براساس وزن مولکولی آن‌ها است و فهرست متفاوتی از این پروتئین‌ها گزارش شده است و می‌تواند نقش مهمی در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها ایفا کند [۴ و ۸]. پروتئین‌های شوک حرارتی مهم پستانداران بر اساس اندازه و عملکرد به پنج گروه (جدول ۱) تقسیم می‌شوند که عبارتند از [۲۳]: HSP90, HSP100 (HSPH), HSP27 (HSPB), HSP60 (HSPD), HSP70 (HSPA), (HSPC)

جدول ۱. HSP مهم سلول‌های پستانداران

وزن مولکولی (KD)	عملکرد	جایگیری سلولی
۲۷-۲۸	پایداری میکروفیل‌ها، انتقال پیام سیگنال	سیتوزول و هسته
۶۰	اجتماع پروتئین	میتوکندری
۷۰-۷۳	جابه‌جایی و پیچش	سیتوزول، هسته، شبکه
۹۰	جابه‌جایی پروتئین، تنظیم گیرنده	اندوپلاسمی، میتوکندری
۱۰۰-۱۰۴	پیچش پروتئین	سیتوزول

HSP70 به پلی‌پپتیدهایی که به تازگی از ریپوزوم خارج شده و در عرض غشا به شبکه اندوپلاسمی یا میتوکندری منتقل می‌شود، متصل شده و آن‌ها را پایدار می‌کند. در زمان استرس، سلول در شرایط نامطلوب از نظر تاخوردگی پروتئینی قرار گرفته و اعضای خانواده HSP70 به مقدار زیادی تولید می‌شود. بیان زیاد چاپرون‌ها در ترمیم پروتئین‌های تخریب شده در اثر استرس و همچنین سنتز پلی‌پپتیدهای جدید برای جایگزینی با پروتئین‌های غیرقابل ترمیم نقش دارد. در پستانداران یک عضو ویژه خانواده HSP70 (مانند Hsp72) تنها در صورت استرس بیان می‌شود و بنابراین یک شناساگر مهم در سلول، بافت یا ارگان تحت یک پاسخ استرسی است. سطوح بالای پروتئین‌های HSP70 با مهار آپوپتوز و همچنین مقاومت سلول‌ها به عوامل گوناگون شیمی درمانی ارتباط دارد. علاوه بر این؛ مطالعاتی نشان داده است که تغییر میزان اعضای متفاوت خانواده HSP70 ممکن است از نظر بالینی برای تشخیص بیماری‌های انسانی مهم باشد [۸].

## ۱-۲- ساختار و عملکرد خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی

پروتئین HSP70 دارای دو دنباله عملکردی است (شکل ۱): دنباله بسیار حفاظت شده انتهای N یادنباله اتصالی نوکلئوتیدی (NBD: nucleotide-binding domain) با فعالیت ATPase و دنباله انتهایی C یادنباله اتصال سوبسترا (SBD: substrate binding domain) که حاوی جایگاه اتصال به سوبسترای پلی‌پپتیدی است [۲۶ و ۲۷]. دنباله اتصالی نوکلئوتیدی یا NBD دارای دو لوب با یک فضای باز عمیق در میان دو لوب است و نوکلئوتید به انتهای فضای باز متصل می‌شود. هر لوب دارای دو دنباله است که عبارتست از 1a و 1b در یک لوب و 2a و 2b در لوب دیگر. 1a و 2a به هم متصل شده و انتهای جایگاه اتصالی نوکلئوتید را تشکیل می‌دهد. شیار سطحی بین 1a و 2a در سمت دیگر جایگاه

## ۲- خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی (HSP70)

خانواده HSP70 حاوی ایزوفرم‌های ۶۶ تا ۷۸ کیلودالتونی است که به صورت HSP70 نشان داده می‌شود و ژن کدکننده آن HSP70 است [۲۴]. نیمه عمر HSP70 القا شده با افزایش دما در سلول‌های پستانداران تحت شرایط آزمایشگاهی حدود ۴۸ ساعت است [۲۵]. برخی از اعضای خانواده HSP70 به طور مداوم بیان می‌شود و برخی با استرس به شدت القا می‌شود [۴]. همه این پروتئین‌ها به نظر می‌رسد که با اتصال هیدرولیز ATP، با پروتئین‌های دیگر واکنش داده و سبب تاخوردگی و بلوغ آن‌ها می‌شود. برای مثال اعضای خانواده

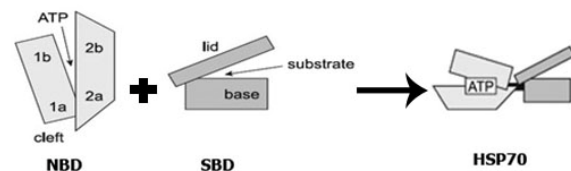
نوکلئوتیدی را تسهیل کرده و برای شروع یک چرخه جدید نیاز است. پروتئین‌های DnaJ دارای دنباله J بسیار حفاظت شده‌ای است که برای تحریک فعالیت ATPase در HSP70 ضرورت دارد [۳۶]. MSJ-1 عضو جدید خانواده DnaJ است که در اسپرمیوزن نقش مهمی دارد و شریک چارپرونی HSP70 ویژه سلول اسپرماتوزنیک یعنی HSPA2/Hsp70-2 و Hsc70t است. MSJ-1 می‌تواند در طول اسپرمیوزن و در پیشبرد اتفاقات سیتومورفوزنیک با HSPA2/Hsp70-2 میان‌کنش داشته باشد؛ این پروتئین ویژه می‌تواند از طریق میان‌کنش با سایر پروتئین‌های HSP70 موجود در سلول‌های اسپرم، نقش دیگری مانند دخالت در لقاح داشته باشد [۳۷].

### ۳- پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2)

ایزوفرم‌های گوناگونی از HSP70 در تمایز سلول ژرمینال مؤثر است و توسط یک خانواده مولتی ژن حاوی حداقل ۱۱ ژن متفاوت کد می‌شود. ژن‌های HSP70 انسانی را با  $HSPA_x$  نشان می‌دهند، A به معنای اعضای خانواده HSP70 و x لوکوس ویژه را بیان می‌کند [۳۸]. یکی از ژن‌های ویژه بیضه، ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی به نام HSPA2 در انسان است. در یک مطالعه موقعیت ژن HSPA2 به صورت 14q24.1 [۳۹] و در بررسی دیگری به صورت 14q22 [۴۰] نشان داده شده است. mRNA این پروتئین در بیضه انسان فراوان است و در ماهیچه اسکلتی، تخمدان، روده و مغز نیز شناسایی شده است [۳۹] اما پروتئین معادل آن شناسایی نشد [۴۱]. برخلاف بافت‌های طبیعی، بیان قابل توجهی از پروتئین HSPA2 در انواعی از سلول‌های سرطانی وجود داشته [۴۲] و در حیات این نوع سلول‌ها مؤثر است [۴۳].

حداقل پنج نوع HSP70 مختلف از نظر ساختمانی در بیضه بیان می‌شود که دارای PH ایزوالکتریک ۵ تا ۶ بوده و از درجه بالایی از همولوژی برخوردارند [۴۴]. اشکال HSP70 ویژه بیضه (Hsp70-2 و Hsc70t) ابتدا در موش شناسایی شد

اتصال نوکلئوتید، ممکن است جایگاه میانکنش تنظیمی باشد. انعطاف پذیری میان دنباله‌ها سبب تغییر شکل نوکلئوتیدها از مراحل ATP به ADP یا بدون نوکلئوتید می‌شود [۲۶]. دنباله انتهایی C یا SBD هم از دو دنباله تشکیل شده است که عبارتست از یک پایه (base) متشکل از صفحات  $\beta$  با شیرا هیدروفوبی برای اتصال سوبسترای پلی پپتید و یک در (lid) با ساختار  $\alpha$ -هلیکس روی جایگاه اتصال سوبسترای پلی پپتیدی [۲۸]. چهار اسیدآمینو انتهایی C، EEVD، ارتباط میان دنباله و سوبسترا را میانجیگری می‌کند [۲۹] و برای تنظیم حفاظت در برابر استرس حرارتی ضروری است [۳۰]. اتصال ATP به NBD سبب انعطاف پذیری در و پایه SBD شده و جایگاه اتصال سوبسترا باز می‌شود. برعکس، اتصال سوبسترا به SBD با افزایش میزان هیدرولیز ATP سبب القای تغییراتی در NBD می‌شود [۹]. زمانی که ATP به HSP70 متصل باشد، میل ترکیبی کمتری برای سوبسترا دارد، درحالی‌که با اتصال ADP، HSP70 با میل ترکیبی بیشتری به سوبسترا متصل می‌شود [۳۱-۳۳].



شکل ۱. ساختار دنباله‌های HSP70. ATP به قسمت باز دنباله اتصال نوکلئوتیدی HSP70 (NBD) متصل می‌شود [۲۶]. دنباله اتصال به سوبسترای HSP70 (SBD) یک پایه و یک در مارپیچی دارد که سوبسترای پلی پپتیدی بین آن‌ها در حفره ای در پایه قرار می‌گیرد [۲۸].

فعالیت چارپرونی کارآمد با اتصال کو-چارپرون‌ها یا کو-فاکتورهای تنظیم می‌شود که این تبدیل داخلی بین مراحل ADP و ATP را کاتالیز می‌کند. سه پروتئین BAG-1، HSP40 و DnaJ چارپرون مولکولی و تنظیم کننده HSP70 در هسته و سیتوزول پستانداران است [۳۶-۳۴]. کوچارپرون‌های HSP40 به نظر می‌رسد که سبب تسهیل اتصال سوبسترا و تحریک هیدرولیز ATP می‌شود. پروتئین BAG-1 واکنش تبادل

بخشی است، جفت می‌شود. ساختار سه بخشی کمپلکس سیناپتونمال حاوی عنصر مرکزی (Central element)، عنصر محوری/جانبی (Axial/lateral element) و فیلامنت‌های متقاطع (Transverse filaments) است [۵۰-۴۸]. نسخه‌برداری ژن *HSPA2/Hsp70-2* موش در اسپرماتوسیت‌های مرحله لپتوتن آغاز می‌شود و این پروتئین محتوای عناصر جانبی کمپلکس سیناپتونمال اسپرماتوسیت‌های مراحل زیگوتن تا دیپلوتن است، بنابراین می‌تواند در تمایز اسپرماتوسیتی؛ تشکیل کمپلکس سیناپتونمال، کراسینگ آور و نوترکیبی کروموزومی، دسیناپس کمپلکس سیناپتونمال که برای پیشرفت به متافاز I نیاز است و همچنین ترمیم DNA مؤثر باشد [۴۶، ۴۷ و ۵۱]. دسیناپس اولین مرحله کلیدی خروج از پروفاز است که به *HSPA2* نیاز دارد و تکامل اسپرم در موش‌هایی با نقص *HSPA2/Hsp70-2* در پروفاز میوز I متوقف شده و بیشتر اسپرماتوسیت‌های اواخر پاکتی تن توسط آپوپتوز حذف شده و سبب ناباروری کامل مردانه و دچار آواسپرمیا (Azospermia) می‌شوند [۴۷ و ۵۱]. اخیراً سا (Sá) و همکاران نشان دادند که mRNA به میزان زیادی در اسپرماتوگونیای A، اسپرماتوسیت‌های اولیه و همچنین اسپرماتوسیت‌های ثانویه بیان می‌شود؛ بنابراین این ژن می‌تواند علاوه بر جدایی هومولوگ‌ها (دسیناپس)، در تقسیم سلولی نیز مؤثر باشد [۵۲]. در اسپرماتوسیت‌های پستانداران *CDC2/cyclin B1* و چاپرون *HSPA2* برای انتقال  $G2 \rightarrow M$  ضروری است. در اسپرماتوسیت اولیه tNASP (چاپرون هیستون لینکر H1) به *HSPA2* واقع در کمپلکس سیناپتونمال اسپرماتوسیت‌ها متصل می‌شود (شکل ۲). tNASP-*HSPA2* به هیستون لینکرها و *CDC2* متصل می‌شود تا کمپلکس بزرگتری را تشکیل دهد. اتصال هیستون لینکرها به tNASP فعالیت *ATPase HSPA2* و ظرفیت اتصال tNASP به *HSPA2* و *CDC2* را افزایش داده و مانع تشکیل کمپلکس *CDC2/cyclin B1* شده و فعالیت کینازی *CDC2/cyclin B1* را کاهش می‌دهد. لینکر هیستون متصل به

[۴۵]؛ آن‌ها به‌طور گسترده‌ای تنظیم شده و به‌ویژه در سلول‌های اسپرماتوژنزی بیان می‌شود [۴۶]. هومولوگ‌های آن‌ها بعداً در بیضه رت و انسان نیز کشف شد [۴۶، ۴۷]. هومولوگ انسانی آن *HSPA2* نامیده می‌شود که *HSP70* غالب در اسپرم و سلول‌های اسپرماتوژنزی است [۴۷] و در چهار آمینواسید با *Hsp70-2* موش و پنج آمینواسید با *Hst70* رت متفاوت است. علاوه بر این؛ *HSPA2* حاوی شش آمینواسید نزدیک به انتهای کربوکسی است که در موش و رت وجود ندارد [۳۹].

### ۳-۱- بیان و عملکرد پروتئین شوک حرارتی A2

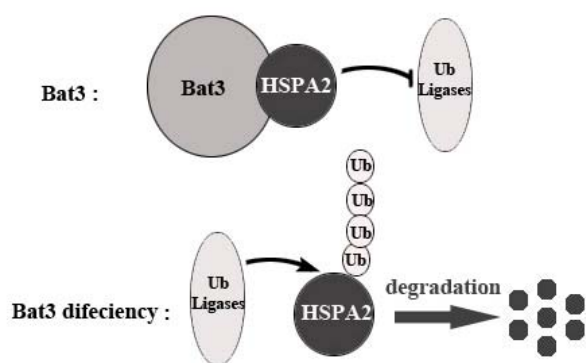
اسپرماتوژن که از زمان بلوغ به بعد اتفاق می‌افتد به فرایندی اطلاق می‌شود که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که در قاعده لوله‌های منی ساز قرار دارد یک سری تقسیمات متوالی انجام داده و در نهایت به‌صورت اسپرماتوزوئید بالغ در سطح مجرای لوله‌های منی ساز بیضه آزاد می‌شود. این فرایند که تقریباً بین ۶۴ تا ۷۲ روز طول می‌کشد، شامل سه مرحله اصلی اسپرماتوسیتوژنزی، تقسیم میوز و اسپرمیوژن است. بیان *HSPA2/Hsp70-2* در مرحله اسپرماتوسیتوژنزی رخ نمی‌دهد بنابراین بیان این پروتئین در اسپرماتوگونی‌ها مشاهده نشده است [۴۴] در صورتی که *HSPA2* به میزان بالا در بیضه در دو فاز اسپرماتوژنزی که شامل میوز و اسپرمیوژن است، رخ می‌دهد [۴۱].

### ۳-۱-۱ بیان اولیه پروتئین شوک حرارتی A2 در مرحله

#### میوز اسپرماتوژن

میوز یک فرایند مهم در تبادل ژنتیکی ژنوم پدری و مادری در یوکاریوت‌ها است. در پروفاز میوز اول، کروموزوم‌های هومولوگ تحت سیناپس، تبادل ژنتیکی و تغییر ژن قرار می‌گیرد. ابتدا کروموزوم‌های هومولوگ به‌واسطه کمپلکس سیناپتونمال (SC) که ساختار مولتی پروتئین سه

اکثر سلول‌های ژرمینال با کمبود Bat3 در پروفاز میوز I به دلیل آپوپتوز می‌میرند. جالب اینکه پروتئین HSPA2/Hsp70-2 ویژه بیضه در سلول‌هایی با نقص Bat3، شناسایی نشد ولی میزان نسخه‌های HSPA2/Hsp70-2 طبیعی بود. ساساکی (Sasaki) و همکاران ادعان داشتند که غیرفعال سازی Bat3 سبب القای پلی یوبیکوئیتینه و در نهایت تجزیه HSPA2/Hsp70-2 می‌شود (شکل ۳). با غیرفعال‌سازی فعالیت پروتئوزوم میزان پروتئین HSPA2/Hsp70-2 به حالت اول برمی‌گردد. بنابراین Bat3 به عنوان یک تنظیم کننده بحرانی HSPA2/Hsp70-2 در اسپرماتوژنز عمل می‌کند [۶۱].



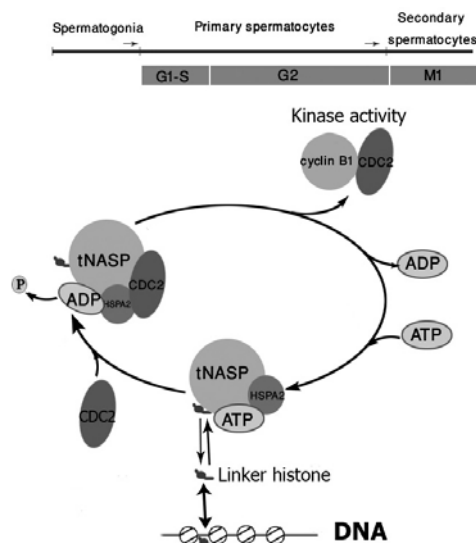
شکل ۳. مدل تنظیم HSPA2 توسط Bat3. Bat3 به HSPA2 متصل شده و از آن در مقابل یوبی کوئیتین لیگازها (Ub-Ligases) محافظت می‌کند. کمبود Bat3 سبب یوبیکوئیتینه شدن HSPA2 و تجزیه آن می‌شود [۶۱].

### ۲-۱-۳- بیان ثانویه پروتئین شوک حرارتی A2 در

#### مرحله اسپرمیوژنز فاز اسپرماتوژنز

اسپرمیوژنز یک تمایز پیچیده بعد از میوز در سلول ژرمینال مردان است و فرایندهای هسته‌ای و سیتوپلاسمی در راستای تکامل سلول ژرمینال اتفاق می‌افتد که عبارتست از تغییراتی در ساختار و عملکرد کروماتین (تراکم کروماتین، مهار نسخه‌برداری و جایگزینی هیستون‌ها با پروتئین‌های انتقالی و پروتامین‌ها)، حذف سیتوپلاسم، تغییر غشای پلاسمایی و تشکیل آکروزوم و دم [۶۴-۶۲]. در اسپرماتیدهای گرد، چهار پروتئین به نام پروتئین ویژه سلول‌های ژرمینال (Mm.290718/ZFP541)، هیستون داستیلاز ۱ (HDAC1: Histone Deacetylase 1)، HSPA2 و دنباله ۱۹

NASP توانایی HSPA2 در فعال‌سازی CDC2 و تشکیل کمپلکس CDC2/cyclin B1 را کنترل می‌کند؛ بنابراین tNASP یک ارتباط عملکردی بین هیستون لینکرها و پیشرفت سیکل سلولی در میوز فراهم می‌کند [۵۳]. فعالیت کینازی CDC2 منجر به فسفریلاسیون محتوای پروتئینی عمده فیلامنت‌های متقاطع کمپلکس سیناپتونمال و جداسازی این کمپلکس پروتئینی می‌شود و عدم فعالیت کینازی CDC2 دسیناپس و جداسدن کمپلکس سیناپتونمال را مختل می‌کند [۵۴]. تشکیل دوظرفیتی‌های بسیار متراکم متافاز I و جدایی کمپلکس‌های سیناپتونمال توسط کینازهای وابسته به سیکلین و کینازهای aurora تنظیم می‌شود [۵۵]. HSPA2 چاپرون CDC2 بوده و برای فعال‌سازی کیناز CDC2 و اجتماع CDC2/cyclin B1 در اسپرماتوسیت‌های پکی تن ضروری است [۵۶].



شکل ۲. تنظیم دینامیکی چرخه چاپرون HSPA2 توسط tNASP-هیستون لینکر. تنظیم این چرخه با ارتباط هیستون لینکرها و tNASP و تشکیل کمپلکس هیستون لینکر-tNASP-HSPA2 آغاز می‌شود [۵۳].

Bat3 یک پروتئین تنظیم کننده آپوپتوز است [۵۹-۵۷].

دنباله‌های خاصی از Bat3 با پروتئین‌های خانواده BAG که عملکرد HSP70 را تنظیم می‌کند، ارتباط دارد [۶۰]. Bat3 برای جفت شدن، نوترکیبی و دسیناپس کروموزومی ضروری است.

پلیمراز ۲ (ParP2) می‌شود. ParP1 یا ParP2 از اسپرماتید گرد تا طویل و همزمان با HSPA2 بیان شده و سبب کاتالیز پلی-ADP-ریبوزیلاسیون می‌شود. ParP2 با تمایل زیادی به TP2 و HSPA2 متصل می‌شود ولی ParP1 ارتباط ضعیفی را با HSPA2 ایجاد می‌کند و سبب پلی-ADP-ریبوزیلاسیون HSPA2 می‌شود. با توجه به اینکه HSPA2 چاپرون TP2 است، احتمالاً پلی-ADP-ریبوزیلاسیون HSPA2 توسط ParP1 فعالیت این چاپرون را در اسپرمیوزن تنظیم می‌کند و ParP2 برای برداشتن اولین نوکلئوپروتئین TP2 از طریق اتصال مستقیم به TP2 یا از طریق ParP1 و HSPA2 عمل می‌کند. این نتایج ParP1 و ParP2 را به‌عنوان بخش‌هایی از کمپلکس پروتئینی ویژه اسپرماتیدی معرفی می‌کند که ممکن است در سازماندهی گسترده ژنوم در اسپرمیوزن مشارکت داشته باشد [۶۷].

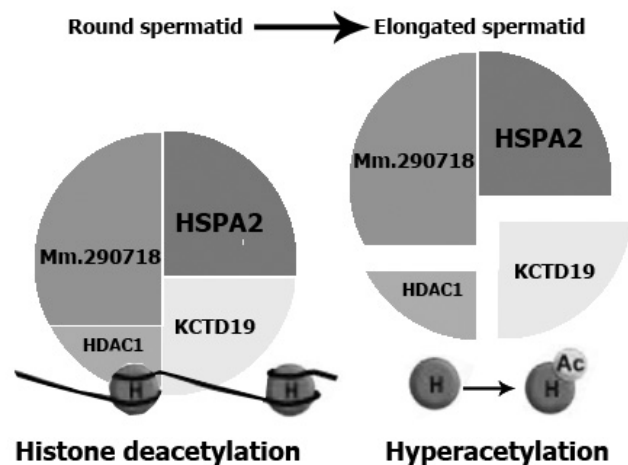
با وجودی که موش‌هایی با نقص Bat3 در پروفاز میوزا متوقف شده و می‌میرند، ساساکی و همکاران تعداد کمی اسپرماتید و سلول‌های اسپرم با سرهای ناهنجار و جایگیری نامناسب TP-1 را نیز مشاهده کردند. بنابراین Bat3 ممکن است تنظیم‌کننده جایگزینی هیستون در سلول‌های ژرمینال پس از میوز باشد [۶۸]. با توجه به اینکه Hsp70-2/HSPA2 فعالیت TP-1 و TP-2 را تنظیم می‌کند [۶۶] و Bat3 با کمک دنباله BAG به Hsp70/Hsc70 متصل شده و پیش‌مجدد پروتئین با واسطه HSP70 را در آزمایشگاه مهار می‌کند [۶۰]، ساساکی و همکاران نتیجه گرفتند که یک میان‌کنش میان Bat3 و Hsp70-2/HSPA2 وجود دارد [۶۱].

## ۲-۳- ارتباط HSPA2 و پارامترهای اسپرمی

### ۱-۲-۳- جایگیری پروتئین شوک حرارتی A2

پروتئین‌های شوک حرارتی روی سطح اسپرم موش، رت، گاو، گراز و انسان شناسایی شده است و به نظر می‌رسد که اعضای خانواده HSP70 ترکیبات فراوان سطح اسپرم باشد [۶۸، ۶۹]. دو عضو خانواده HSP70 (HSPA2 و HSPA1L) در آنتی ژن‌های غشای اسپرم انسان توسط آنتی‌بادی‌های آنتی اسپرم

تترامریزه کانال پتاسیم (KCTD19: Potassium Channel Tetramerization Domain 19)، تشکیل کمپلکس پایداری را داده که منجر به داستیلاسیون هیستون‌ها می‌شود (شکل ۴). در هنگام تبدیل اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای طویل، بیان پروتئین ویژه سلول‌های ژرمینال و دنباله ۱۹ تترامریزه کانال پتاسیم خاتمه می‌یابد. بنابراین هیستون داستیلاز ۱ تجزیه و غیرفعال شده و هیستون‌ها شدیداً استیله می‌شود. استیلاسیون هیستون‌ها، علامتی برای پروتئین‌های انتقالی بوده تا توسط HSPA2 چاپرون شده و جایگزین هیستون‌های استیله شده شود [۶۵].



شکل ۴. مدل بازسازی کروماتین در اسپرماتوژن. کمپلکس پایداری حاوی HSPA2، HDAC1، Mm.290718/ZFP541 و KCTD19 در اسپرماتیدهای گرد با هیستون‌های استیله وجود دارد. زمانی که اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای طویل تبدیل می‌شوند، بیان KCTD19 و Mm.290718/ZFP541 انجام نمی‌شود و HDAC1 تجزیه و غیرفعال می‌شود و بنابراین هیستون‌ها شدیداً استیله می‌شود که می‌تواند علامتی برای پروتئین‌های انتقالی باشد (توسط HSPA2 چاپرون می‌شوند) تا جایگزین هیستون‌های شدیداً استیله شود [۶۵].

HSPA2 چاپرون پروتئین‌های انتقالی TP1 و TP2 است [۶۶].

می‌توان فرض کرد که در حین جابه‌جایی هیستون‌ها با پروتئین‌های انتقالی در سلول‌های ژرمینال هاپلوئیدی، شکست‌هایی در رشته DNA ایجاد می‌شود که فعالیت توپوایزومراز II $\beta$  را القا کرده و با وساطت HSPA2 سبب تحریک فعالیت پلی-ADP-ریبوز پلیمراز ۱ (ParP1) و پلی-ADP-ریبوز

پلاسمایی، تشکیل جایگاه‌ها و گیرنده‌های اتصال زونا [۷۷] و اسیدهیالورونیک [۷۸] در اسپرماتوزوای بالغ است. در صورتی که انتخاب اسپرم بر اساس اتصال به اسید هیالورونیک باشد، مشخص شده به دلیل سلامت بیان HSPA2 و حضور رسپتورهای اسید هیالورونیک، این اسپرم‌ها دارای ناهنجاری‌های مورفولوژیکی کمتری هستند [۷۹]. بنابراین طبیعی بودن مورفولوژی اسپرم ارتباط بسیار نزدیکی با بلوغ دارد. اسپرم با بلوغ کم، به دلیل عدم حذف سیتوپلاسمی دارای سرهای بی‌شکل‌تر، گردتر، بزرگتر و دم کوتاهتری است [۸۰]. در دو مطالعه نسبت طول دم به محور بلند سر به‌عنوان یک نشانگر بسیار حساس برای بلوغ اسپرم معرفی شده است [۸۱ و ۸۲]. مشخص شده اسپرم بالغی که قادر به اتصال به هیالورونیک اسید است، به‌طور معنی‌داری از نظر پارامترهای نسبی طول دم به سر، سر و دم متفاوت است [۸۳]. به دلیل اینکه بیان عمده پروتئین‌های چاپرون ویژه بیضه طی فاز نهایی اسپرمیوزس و همزمان با حذف سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد [۶ و ۷۰] و احتمالاً HSPA2 تسهیل کننده حذف سیتوپلاسمی است. اگر این فرایند ناقص صورت گیرد، می‌تواند روی مورفولوژی اسپرم اثر گذار باشد [۸۲].

### ۳-۲-۳- پروتئین‌های شوک حرارتی A2 و آپوپتوز

آسیب سلول‌ها دو پیامد را می‌تواند به دنبال داشته باشد: الف) آپوپتوز، نوعی مرگ سلولی که سلول‌های آسیب دیده را زدوده و از التهاب جلوگیری می‌کند. ب) پاسخ استرس یا شوک حرارتی، مانع آسیب و سبب بهبودی سلول شده و سلول را زنده نگه می‌دارد، به عبارتی پروتئین‌های شوک حرارتی توانایی مهار آپوپتوز را دارد. میان‌کنش بین این دو مسیر سرنوشت سلول را تعیین می‌کند [۴].

آپوپتوز با کاهش تقارن فسفولیپیدی در غشای پلاسمایی، تراکم کروماتین، آسیب DNA نوکلئوزومی، جدایی هسته به صورت توده‌های مجزا و حباب زدن غشای پلاسمایی همراه

نمونه‌های پلاسمای مایع منی در مردان نابارور شناسایی شد [۶۸]. هوزر (Huszar) و همکاران در اسپرم زنده و با روش ایمونوسیتوشیمی نشان دادند که HSPA2 در غشای پلاسمایی سراسر دم اسپرم انسان از قطعه میانی تا قطعه پایانی وجود دارد [۷۰]. همچنین وجود HSPA2 را در سیتوپلاسم اسپرماتیدهای طویل و اسپرماتوزوای بالغ تأکید می‌کنند [۷۱]. نابی هانسن (Naaby-Hansen) و همکاران نیز با کمک طیف سنجی جرمی همزمان (Tandem Mass Spectrometry) نشان دادند که HSPA2 در سطح اسپرم انسان وجود دارد [۷۲]. ایمونوفلوئورسنت پروتئین‌های چاپرون HSP70 در اسپرم موش نشان داده است که این پروتئین‌ها در قطعه میانی اسپرم وجود دارد و برخلاف HSPA2 انسان، این HSPها در قطعات پایانی و اصلی دم وجود ندارد [۷۳]. مطالعات نشان داده‌است که HSPA2/Hsp70-2 و هومولوگ آن در سطح اسپرماتوزوای موش و رت وجود دارد [۷۴].

### ۲-۲-۳- پروتئین شوک حرارتی A2 و مورفولوژی

بلوغ اسپرم با عبور از بیضه به سر آیدیدیم که با کاهش فعالیت CK-B و افزایش بیان HSPA2 همراه است، صورت می‌گیرد. میزان CK و بیان HSPA2 به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی عملکرد و بلوغ اسپرم معرفی شده و این مقادیر شناساگر قابل اعتمادتری برای باروری نسبت به حرکت و غلظت اسپرم است و در بررسی و ارزیابی باروری مردان استفاده می‌شود [۷۱].

بنابراین در نمونه‌های منی، غلظت‌های نسبی این پروتئین چاپرون و ایزوفرم CK-B، یا نسبت چاپرون که به صورت  $[HSPA2/(HSPA2+CK-B)]\%$  بیان می‌شود، نسبت اسپرم‌های بالغ و نابالغ را نشان می‌دهد [۷۰ و ۷۵]. مطالعات نشان داده‌است که اسپرم‌های بالغ و نابالغ دارای نسبت HSPA2، خصوصیات مورفولوژیکی و مورفومتریکی متفاوتی هستند [۷۵ و ۷۶]. HSPA2 تسهیل کننده تغییر وضعیت غشای



انسان، احتمالاً مهارکننده‌های فرایند آپوپتوزی هستند [۹۷ و ۹۸]. HSP70 می‌تواند با ممانعت از الیگومریزه شدن Apaf-1، از تشکیل یک آپوپتوزوم عملکردی جلوگیری کرده و مانع فعال‌سازی مهارکننده کاسپاز پروکاسپاز-۹ شود [۹۹ و ۱۰۰]. همکاری BAG-1 با Bcl-2 منجر به تنظیم عملکرد چاپرون‌های HSP70 می‌شود [۳۴ و ۳۵]. BAG-1 احتمالاً به‌عنوان ارتباطی بین HSP70 و سیستم یوبیکوئیتین/پروتئوزوم عمل می‌کند [۱۰۱]. BAG-1 از طریق انتهای کربوکسیلی خود به چاپرون‌های مولکولی متصل شده و از طریق انتهای آمینی خود که یک دنباله شبه یوبیکوئیتین است با پروتئوزوم مرتبط است [۱۰۲ و ۱۰۳]. BAG-1 با کمک ATP با پروتئوزوم ارتباط برقرار می‌کند و سبب اتصال HSP70 به کمپلکس پروتئولیتیک و انتقال پلی‌پپتیدهای غیرطبیعی از چاپرون مولکولی به کمپلکس پروتئولیتیک می‌شود [۱۰۴].

طی فرایند تولید و تمایز اسپرم (اسپرماتوژنز)، امکان سه رخداد متفاوت در رابطه با عملکرد آپوپتوز پیشنهاد شده است:

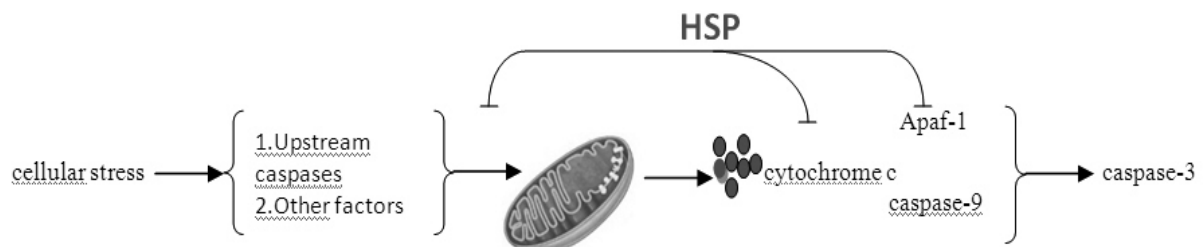
(۱) آپوپتوز اولیه در سلول‌های ژرمینال در ناحیه مجاری لومن انجام شود. این اسپرم‌ها حذف شده و در انزال وجود ندارند.

است تا اجسام آپوپتوزی برای فرایند فاگوسیتوز تشکیل و در نهایت بدون تخریب سلول‌های اطراف دفع شود [۸۴]. فرایند آپوپتوز با میانجی‌گری کاسپازها انجام می‌شود [۸۵]. کاسپازها آبخاری از واکنش‌ها را تشکیل می‌دهد که در ابتدا کاسپازهای آغازگر با مولکول‌های آداپتور ویژه‌ای واکنش داده و فرایند اتوکاتالیتیک آغاز شود [۸۸-۸۶]. سپس کاسپازهای اجراکننده فعال می‌شود تا فرایند پروتئولیتیک سلول آغاز شود. رخدادهایی که منجر به فعال‌سازی کاسپازها می‌شود در دو مسیر خلاصه می‌شود:

(۱) **مسیر خارجی:** با اتصال لیگاند مناسب به یکی از چندین گیرنده سطحی مرگ سلولی آغاز می‌شود [۸۹ و ۹۰].

(۲) **مسیر داخلی:** با نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و آزادی چندین فاکتور پرو-آپوپتوزی مانند سیتوکروم c همراه است (شکل ۵) [۹۱ و ۹۲]. مکانیسم آزادی سیتوکروم c با فعالیت خانواده Bcl-2 تنظیم [۹۳ و ۹۴] و پس از آزاد شدن به سیتوزول، به پروتئین Apaf-1 متصل شده تا کمپلکس آپوپتوزوم را تشکیل دهد [۹۵ و ۹۶].

مکانیسم عمل HSP70 در آپوپتوز با آنزیم‌های آپوپتوزی کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ ارتباط دارد. کاسپاز-۹ با سیتوکروم c آزاد شده از میتوکندری‌ها مرتبط است. به راه افتادن آپوپتوز از بالادست سیتوکروم c و همچنین جریان کاسپاز-۹ در آپوپتوزی که کمپلکس پایین دست را فعال می‌کند، توسط ناحیه انتهایی C در HSP70 مهار می‌شود. بنابراین چاپرون‌های HSP70 مانند هومولوگ‌های Hsp70-2 و همچنین HSPA2



شکل ۵. جایگاه‌های احتمالی که HSP می‌تواند اثر آنتی آپوپتوزی خود را اعمال کند عبارتند از: (۱) القای سریع HSP یا بیان بالای آن ممکن است اثر فاکتورهای القاکننده آزادی سیتوکروم c از میتوکندری‌ها را بلوکه کنند. (۲) HSP ممکن است به سیتوکروم c آزاد شده از میتوکندری و متصل به Apaf-1 متصل و آن را مهار کند. (۳) HSP ممکن است در سیتوزول مانع پیش‌صحیح Apaf-1 بعد از اتصال به سیتوکروم c شده و در اتصال به پروکاسپاز-۹ تداخل ایجاد کند [۷].

یافته و سبب آسیب DNA بیشتر اسپرم می‌شود [۱۱۲ و ۱۱۳] و گزارش شده آسیب DNA اسپرم با نقص در جایگزینی هیستون-پروتئین طی فرایند اسپرمیوزن ارتباط دارد [۱۱۴-۱۱۶]. نصر اصفهانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که بیان HSPA2 در افراد مبتلا به واریکوسل که با استرس حرارتی بیضه مواجه هستند، کاهش یافته و با حذف این استرس از طریق عمل واریکوسلکتومی، بیان آن افزایش یافته و سبب پیش‌صحیح پروتئین‌های درگیر در اسپرماتوزن (هیستون-پروتئین)، کاهش آسیب DNA و همچنین بهبود مورفولوژی و حرکت اسپرم می‌شود [۱۱۷].

### ۳-۳- پروتئین شوک حرارتی A2 و ظرفیت

#### یابی اسپرم

ظرفیت یابی تغییرات فیزیولوژیکی است که در مجرای تناسلی زن اتفاق می‌افتد و اسپرم را قادر به لقاح می‌سازد. برخی از این تغییرات در زمان انزال اسپرم اتفاق می‌افتد و برخی دیگر پس از طی مدت زمان بیشتری در مجرای تناسلی زن یا در محیط آزمایشگاهی صورت می‌گیرد که هر دو به فعالیت پروتئین کیناز A (PKA) نیاز دارد (شکل ۶) [۱۱۸]. ظرفیت یابی سریع؛ با فعال‌سازی حرکت اسپرم همراه است. حرکت شدید فلاژلوم به محض اینکه اسپرم از اپیدیدیم آزاد می‌شود و در تماس با غلظت‌های  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  موجود در مایع سمینال قرار می‌گیرد، شروع می‌شود.  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  توسط یک کو-ترانسپورتر  $\text{NBC Na}^+/\text{HCO}_3^-$  و یک کانال  $\text{Ca}^{2+}$  ویژه اسپرم (CatSper) به داخل سلول منتقل می‌شود. حرکت غشاگذر (transmembrane)  $\text{HCO}_3^-$  با افزایش PH داخل سلولی همراه است. همچنین  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  در اسپرم، از طریق تحریک نوع ویژه‌ای آدنیلیل سیکلاز (SACY) سبب تنظیم متابولیسم cAMP می‌شود. با فعال‌سازی آدنیلیل سیکلاز میزان cAMP داخل سلولی افزایش یافته و پروتئین کیناز A فعال می‌شود.

۲) در برخی سلول‌های نابالغ که در مرحله اسپرماتید گرد هستند، کاسپاز-۳ فعال می‌شود و Bcl-XL بیان می‌شود تا جایگزین اثر حفاظتی HSPA2 شود. سایر اسپرم‌های نابالغ ممکن است به دلیل وجود HSPA2 زنده بمانند.

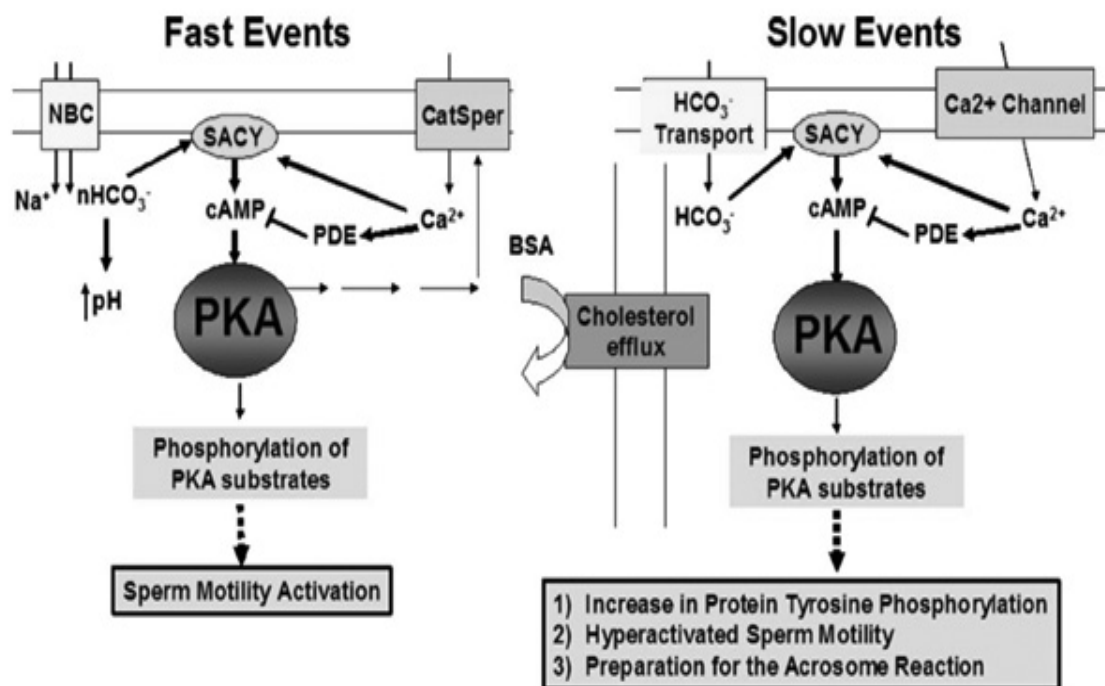
۳) در برخی اسپرم‌ها با بلوغ کم که تا مرحله اسپرماتیدهای طویل پیش می‌رود و همزمان با کاهش اثر فعالیت چاپرون HSPA2 مانند عدم حذف سیتوپلاسمی، سرهای بی‌شکل و بزرگتر، تغییر وضعیت ناقص غشای اسپرم و تأخیر در جوانه زدن دم مواجه هستند. این اسپرم‌ها دارای میزان بالایی از Bcl-XL و کاسپاز-۳ هستند.

اغلب واضح نیست که چه نسبتی از اسپرم تکامل یافته در میان اسپرم‌های انزال، نابالغ و آپوپتوزی هستند و چه نسبتی از کل جمعیت سلول ژرمینال توسط آپوپتوز قبل از انزال حذف می‌شوند [۱۰۵].

### ۴-۲-۳- پروتئین شوک حرارتی A2 و آسیب ژنوم

#### اسپرم

ژنوم اسپرم انتقال دهنده نیمی از ژنوم نسل بعد بوده که نقش به‌سزایی را در سلامت جنین دارد. محققان در مطالعات متعدد اذعان داشته‌اند که آسیب ژنوم اسپرم می‌تواند بر نتایج لقاح، بارداری و تکوین جنین تأثیر گذار باشد [۱۱۰-۱۰۶]. آسیب ژنوم اسپرم می‌تواند در دو فاز بیان HSPA2 رخ دهد. در فاز اول که بیان HSPA2 همزمان با تشکیل کمپلکس سیناپتونمال است، بیان کم این پروتئین سبب نقص‌های میوزی، مانند انوپلویدی (اغلب دیزومی‌ها) می‌شود [۱۱۱]. در فاز دوم که بیان HSPA2 در مرحله اسپرمیوزن است، هر گونه نقص در بیان این پروتئین منجر به آسیب DNA می‌شود. مطالعات نشان داده که در صورت عدم حذف سیتوپلاسمی که با غلظت‌های زیاد کراتین کیناز اسپرم شناسایی می‌شود، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) افزایش



شکل ۶. اساس مولکولی رخدادهای سریع و کند در ظرفیت‌یابی اسپرم. (رخداد سریع) زمانیکه اسپرم در تماس با محلول ایزوتونیک حاوی  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  قرار گیرد، حرکت شدید دم مشاهده می‌شود. (رخداد کند) بعد از مدتی انکوبه شدن در آزمایشگاه یا بدن، اسپرم توانایی بارور کردن را می‌یابد. ظرفیت لقاح با واکنش آکروزومی و تغییراتی در الگوی حرکت همراه خواهد بود [۱۱۸].

کلسیم HSP70، HYOU1، HSPA2 و HSPA5 در سطح اسپرم متحرک انسان وجود دارد [۱۲۰].

کانال CatSper از چهار زیرواحد تشکیل شده (CatSper1-4) که در فعال‌سازی شدید (hyperactivation) سلول اسپرم در ظرفیت‌یابی و باروری مردانه مؤثر است. این چهار زیرواحد پروتئینی به صورت تترامر به انتقال یون کلسیم کمک می‌کنند. لیو (Liu) و همکاران نشان دادند که کمپلکس CatSper1 حاوی پروتئین شوک حرارتی HSPA2/Hsp70-2 و یک پروتئین غشاگذر (transmembrane) جدیدی به نام CatSper $\beta$  است. CatSper $\beta$  همانند سایر زیرواحدهای کانال یونی CatSper، محدود به بیضه بوده و در قطعه اصلی دم اسپرم وجود دارد. بیان CatSper1 در مردان نابارور با نقص تحرک اسپرم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. به دلیل وجود HSPA2/Hsp70-2 در این کمپلکس پروتئینی، احتمالاً این چاپرون‌ها در جابه‌جایی، پیچش و تجمع صحیح پروتئین‌های غشایی ویژه

پروتئین کیناز A پروتئین‌های هدف گوناگونی را فسفریله کرده و چندین مسیر سیگنالی آغاز می‌شود. ظرفیت‌یابی کند (Slow capacitation) به مدت انکوباسیون بیشتری نیاز دارد. این فرایندهای کندتر در آزمایشگاه با انکوباسیون اسپرم در محیط ویژه‌ای حاوی یک منبع پروتئینی مانند سرم آلبومین گاو (BSA) و یون‌هایی مانند  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  انجام می‌شود. سرم آلبومین گاو سبب حذف کلسترول غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود و این کلسترول با سایر ترکیبات اتصالاتی کلسترول مانند  $\beta$ -سیکلودکسترین‌ها جایگزین شده و ظرفیت‌یابی را القا می‌کند. همانند ظرفیت‌یابی سریع،  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{Ca}^{2+}$  در تنظیم آدنیلیل سیکلاز درگیر است و سبب افزایش میزان cAMP و فعال‌سازی پروتئین کیناز A می‌شود. ظرفیت‌یابی کند اسپرم با افزایش فسفریلاسیون تیروزین ارتباط دارد [۱۱۹].

HSPA2 پروتئین اتصالاتی کلسیم است و سه چاپرون اتصالاتی

اسپریم یعنی کانال‌ها نقش مؤثری خواهند داشت [۱۲۱].

#### ۳-۴- پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی

##### و فرایند لقاح

اسپریماتوزوآ با آکروزوم سالم از طریق اتصال به زوناپلوسیدا، القای واکنش آکروزومی، آگروسیتوز غشای خارجی آکروزوم، نفوذ به زوناپلوسیدا، اتصال و ترکیب با غشای پلاسمائی تخمک سبب فعال‌سازی تخمک و تشکیل زیگوت می‌شود [۱۲۲]. در مجرای تناسلی زن و هنگام تماس با تخمک بسیاری از پروتئین‌های سطحی مؤثر در میان‌کنش اسپرم و تخمک طی فرایند ظرفیت‌یابی، مجدداً جای‌گیری می‌نماید [۱۲۳]. مطالعات اخیر نقش مهم پروتئین‌های شوک حرارتی را در لقاح و تکامل اولیه جنین نشان می‌دهد [۱۲۴-۱۲۷]. ماتئو (Matwee) و همکاران پیشنهاد می‌کنند که HSP70 ممکن است ۱) در اتصال محکم اسپرم به زوناپلوسیدا یا ۲) در آبشار میان‌کنش تخمک و اسپرم یعنی ترکیب غشای اسپرم با غشای تخمک مؤثر باشد [۱۲۸]. اسپیناسی (Spinaci) و همکاران در سال ۲۰۰۵ و همچنین ماتئو و همکاران در سال ۲۰۰۱ اذعان داشتند که آنتی‌بادی‌های ضد HSP70 میان‌کنش اسپرم-زوناپلوسیدا را در گاو [۱۲۸] و گراز [۱۲۹] مهار می‌کند و فرض شده که HSP70 های سطح اسپرم به عنوان اتصالاتی عمل‌شناسایی سولفوگلیکولیپیدی را در اتصال سلولی میان‌گیری می‌کند. بنابراین از نظر این نویسندگان پیشنهاد اول (اتصال محکم اسپرم به زوناپلوسیدا) قابل قبول است. در صورتی که کامارودین (Kamaruddin) و همکاران، در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که HSP70 روی آکروزوم اسپرم انزال یافته گاو وجود دارد و طی القای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی در بخش استوایی جایگیری مجدد می‌نماید و با توجه به این که میان‌کنش اسپرم و تخمک به ترکیب بخش استوایی اسپرم با غشای پلاسمایی تخمک نیاز دارد، پیشنهاد دوم (ترکیب غشای اسپرم و

تخمک) از نظر این نویسنده قابل قبول است [۱۲۹]. افزون بر این، اخیراً نابی هانسن و همکاران پیشنهاد کردند که چاپرون‌های مرتبط با غشای پلاسمایی عملکردهای چندمنظوره‌ای در اسپرم انسان دارد و به نظر می‌رسد تعدادی از آن‌ها برای اتصال اسپرم-زوناپلوسیدا و لقاح ضروری است [۷۲]. با توجه به اینکه HSPA2 تسهیل‌کننده تشکیل جایگاه‌ها و گیرنده‌های اتصالی زونا [۷۷] و اسید هیالورونیک [۷۸] در اسپرماتوزوآی بالغ است، نصر (Nasr) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که میزان لقاح اووسیت با اسپرمی که با روش اتصال به اسید هیالورونیک انتخاب شده نسبت به روش معمول انتخاب اسپرم (روش گرادیان شیب غلظت) به‌طور معنی‌داری بیشتر است [۱۳۰]. آسیب عملکردهای چاپرون HSP70 و HSPA2/Hsp70-2 در هنگام ظرفیت‌یابی، واکنش آکروزومی و اتصال به تخمک توسط آنتی‌بادی آنتی اسپرم (ASA) ممکن است فرایند لقاح را مهار کند [۶۸]. علاوه بر این؛ میلر (Miller) و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند که نوعی پروتئین HSP70 به میزان فراوان روی سطح اسپرم انسان وجود دارد [۱۳۱]. این نویسنده از آنتی‌بادی مونوکلونال (N27) برای شناسایی پروتئین خانواده HSP70 استفاده نمود اما نمی‌تواند با اطمینان ادعا کرد که HSPA2 یا پروتئین دیگری از HSP70 شناسایی شده است. همچنین ادی (Eddy) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که HSPA2 و هومولوگ آن در سطح اسپرماتوزوآی موش و رت وجود دارد، اما در مورد اسپرم انسان واضح نیست. با وجود این به نظر می‌رسد که HSPA2 از طریق میان‌کنش با 3-سولفوگالاکتوزیل سرولیپید (SGG) با غشای پلاسمایی ارتباط داشته و نقش مستقیمی در لقاح ایفا می‌کند [۴۶]. آنچه می‌توان از مطالعات فوق استنباط کرد، این است که احتمالاً HSP70 در اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا و همچنین در میان‌کنش تخمک و اسپرم نقش دارد و هر دو فرضیه قابل قبول است.

مطالعات متعدد پیشنهاد می‌کند که HSP70 مهارکننده آپوپتوز در تکامل اولیه جنین است [۱۳۴، ۱۲۶ و ۱۳۵] و مهار HSP70 سبب کاهش تکامل بلاستوسیت شده و ممکن است با افزایش مرگ سلولی همراه شود [۱۲۸]؛ بنابراین پروتئین‌های شوک حرارتی می‌تواند نقش حفاظتی در تکامل جنین داشته باشد.

### ۳-۶- پروتئین شوک حرارتی A2 و ناباروری

مطالعات متعددی نشان داده است که کاهش بیان پروتئین شوک حرارتی HSPA2 با پاتوژنز ناباروری مردان ارتباط دارد (جدول ۲).

### ۳-۵- پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی

#### و تکامل جنین

مطالعات متعددی بیان کرده اند که HSP70، علاوه بر لقاح در تکامل جنین انسان [۱۳۱ و ۱۳۲]، جوندگان [۱۲۶ و ۱۳۳] و احشام [۱۲۸] نقش دارد. نئور و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان داده‌اند که حضور آنتی‌بادی‌های HSP70 به‌طور قابل ملاحظه‌ای پیشرفت جنین موش را به مرحله بلاستوسیت کاهش می‌دهد [۱۲۶]. به‌علاوه؛ الیگونوکلیوتیدهای آنتی سنس (antisense oligonucleotide) مکمل با RNA پیامبر HSP70 هم اثر مشابهی روی تکامل جنین دارد [۱۲۵]. با توجه به اینکه

جدول ۲. بررسی پاتوژنز ناباروری مردان و HSPA2

نویسندگان (سال)	بیماران	نتایج
هوزر و ویگو (Vigue) [۱۳۶] (۱۹۹۰)	ناباروران الیگوزواسپرما	بیان کم HSPA2 با درصد بیشتر سلول‌ها با زیاده سیتوپلاسمی همراه بوده و اسپرماتوزوآ با بلوغ ناقص در ناباروران الیگوزواسپرما بیشتر است.
هوزر و همکاران [۷۵] (۱۹۹۲)	زوج‌های تحت IVF	HSPA2 برای اسپرماتوزنز طبیعی ضروری است و نسبت‌های کم HSPA2/CK با میزان کم باروری در IVF همراه خواهد بود.
سان (Son) و همکاران [۴۱] (۱۹۹۹)	بیماران تحت بررسی آسیب‌شناسی	پروتئین HSPA2 در سلول‌های ژرمینال مردانه انسان به مقدار زیاد و در بیضه افرادی با سندرم سلول‌های سرتولی و سایر بافت‌ها به مقدار اندکی بیان می‌شود، بنابراین این پروتئین ممکن است نقش مهمی را در میوز بیضه انسان بازی کند.
سان و همکاران [۱۳۷] (۲۰۰۰)	ناباروران آزواسپرما تحت بیوپسی بیضه	بیان ژن HSPA2 در بیضه افرادی با اسپرماتوزنز غیرطبیعی کم است و احتمالاً این ژن در میوز بیضه انسان نقش مهمی دارد.
هوزر و همکاران [۷۰] (۲۰۰۰)	مابع منی	HSPA2 در اسپرم انزال انسان وجود دارد و با کمک یک آنتی بادی پلی کلونال، دو فاز بیان خانواده پروتئین HSPA2 را در میوز و اسپرمیوز انسان معرفی کردند.
کوانکی (Kovanci) و همکاران [۱۱۱] (۲۰۰۱)	ناباروران الیگوزواسپرما	به دلیل اینکه HSPA2 نقل و انتقالات پروتئینی را انجام می‌دهد، کاهش بیان این پروتئین با کاهش انتقال پروتئین‌هایی مانند آنزیم ترمیم DNA و همچنین عدم حذف سیتوپلاسمی همراه خواهد بود و بنابراین انوپلویدی با عدم بلوغ اسپرم ارتباط خواهد داشت.
فنگ (Feng) و همکاران [۱۳۸] (۲۰۰۱)	ناباروران تحت بیوپسی بیضه	HSPA2 در اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای بافت‌های طبیعی و نابالغ وجود دارد و هیچ پروتئین HSPA2 در نمونه‌های سرتولی مشاهده نشد اما بیان این پروتئین در موارد نابالغ کاهش می‌یابد.
ارگر (Erger) و همکاران [۷۶] (۲۰۰۲)	ناباروران تحت IVF	از نسبت‌های HSPA2 در پیش بینی شکست در IVF استفاده کردند.
یسیلی (Yeşilli) و همکاران [۱۳۹] (۲۰۰۵)	ناباروران واریکوسل	فعالیت HSPA2 اسپرم در ناباروران واریکوسل کمتر است و واریکوسلکتومی فعالیت HSPA2 را در این افراد افزایش می‌دهد.
لیما (Lima) و همکاران [۱۴۰] (۲۰۰۶)	ناباروران واریکوسل با درجه II و III	ژن HSPA2 در افراد بالغ با واریکوسل و الیگوزواسپرما در مقایسه با گروه کنترل بیان کمتری دارد.
کدنهو (Cedenho) و همکاران [۱۴۱] (۲۰۰۶)	ناباروران الیگوزواسپرما	ژن HSPA2 در اسپرم مردان نابارور با الیگوتراتوزواسپرما با علت ناشناخته بیان کمتری خواهد داشت.
نصر اصفهانی و همکاران [۱۱۷] (۲۰۱۰)	ناباروران واریکوسل	بیان HSPA2 در افراد مبتلا به واریکوسل کاهش یافته و با حذف این استرس از طریق عمل واریکوسلکتومی بیان آن افزایش یافته و سبب پیچش صحیح پروتئین‌های درگیر در اسپرماتوزنز و همچنین بهبود مورفولوژی و حرکت اسپرم می‌شود.

## نتیجه‌گیری

پروتئین چاپرون ۷۰ کیلودالتونی (HSPA2) در بیضه و اسپرم انسان به‌ویژه در سطح غشای پلاسمایی بیان می‌شود. وجود این پروتئین با بلوغ، عملکرد و باروری اسپرم ارتباط دارد. کاهش یا عدم بیان این پروتئین در مرحله میوز با نقص‌های میوزی، مانند انوپلویدی (اغلب دیزومی‌ها)، الیگوزواسپرمیا و آزواسپرمیا همراه خواهد بود. هر گونه نقص در بیان این پروتئین در فاز نهایی اسپرمیوز، منجر به آسیب

DNA شده و به دلیل عدم حذف سیتوپلاسمی، ایجاد مورفولوژی ناهنجار و جایگیری نامناسب این پروتئین، اتصال با تخمک نیز دچار شکست شده و بر لقاح نیز مؤثر خواهد بود. این پروتئین در فرایند ظرفیت یابی نیز به‌عنوان پروتئین اتصالی کلسیم و گردآورنده صحیح پروتئین‌های غشایی ویژه اسپرم یعنی کانال‌ها عمل می‌کند. بنابراین چاپرون شوک حرارتی A2 را می‌توان به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی عملکرد اسپرم و باروری مردان دانست.

## References

1. **Ritossa F.** A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci* 1962; 18: 571-3.
2. **Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U.** Protein synthesis in salivary gland of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosomal puffs. *J Mol Biol* 1974; 84: 389-98.
3. **Mayer MP, Bukau B.** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-84.
4. **Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD.** Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999; 29:748-51.
5. **Lindquist S, Craig EA.** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988 ;22:631-77.
6. **Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ.** The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 1997; 32:17-29.
7. **Samali A, Orrenius S.** Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3: 228-36.
8. [www.seoulin.co.kr/dm/catalogue/assaydesign/hsp/fli-er-heat-shock.pdf](http://www.seoulin.co.kr/dm/catalogue/assaydesign/hsp/fli-er-heat-shock.pdf)
9. **Bukau B, Horwich AL.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998; 92:351-66.
10. **Beere HM.** "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004; 117:2641-51.
11. **Li GC, Hahn GM.** Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization. In: *Stress proteins in Biology and Medicine*, edited by Morimoto RI, Tissieres A, and Georgopoulos C. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1990; 79-100.
12. **Hahn GM, Li GC.** Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat Res* 1982; 92: 452-7.
13. **Mailhos C, Howard MK, Latchman DS.** Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* 1993; 55: 621-7.
14. **Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, et al.** Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 1995; 95: 926-33.
15. **Warrick JM, Chane HYE, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM.** Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 1999; 23: 425-8.
16. **Jaattela M.** Overexpression of major heat shock

- protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993; 151: 4286-94.
17. **Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, Sekikawa K, et al.** HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 2002; 16: 685-95.
  18. **Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr, Theriault JR.** Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 2007; 581: 3689-94.
  19. **Bukau B, Weissman J, Horwich A.** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006; 125:443-51.
  20. **Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, et al.** Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 2005; 25: 9735-45.
  21. **Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z.** Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 2005; 118: 3631-8.
  22. **Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, et al.** Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 183-9.
  23. **Moseley PL.** Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* 1997; 83:1413-7.
  24. **Morimoto RI.** Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259:1409-10.
  25. **Mizzen LA, Welch WJ.** Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J Cell Biol* 1988; 106:1105-16.
  26. **Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB.** Threedimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346: 623-8.
  27. **Wang TF, Chang JH, Wang C.** Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem* 1993; 268: 26049-51.
  28. **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, et al.** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 1996; 272: 1606-14.
  29. **Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI.** Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J* 1995; 14:2281-92.
  30. **Li GC, Li L, Liu RY, Rehman M, Lee WM.** Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2036-40.
  31. **Palleros DR, Welch WJ, Fink AL.** Interaction of hsp70 with unfolded proteins, effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5719-23.
  32. **Palleros DR, Shi L, Reid KL, Fink AL.** hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 13107-14.
  33. **Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P.** Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 1994; 263: 971-3.
  34. **Höhfeld J, Jentsch S.** GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* 1997; 16: 6209-16.
  35. **Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, et al.** BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* 1997; 16:4887-96.
  36. **Kelley WL.** The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 1998; 23:222-7.
  37. **Berruti G, Martegani E.** MSJ-1, a mouse testis-specific DnaJ protein, is highly expressed in

- haploid male germ cells and interacts with the testis-specific heat shock protein Hsp70-2. *Biol Reprod* 2001; 65:488-95.
38. **Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL.** A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:23-8
  39. **Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, et al.** Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 1994; 23: 85-93.
  40. **Roux A-F, Nguyen VTT, Squire JA, Cox DW.** A heat shock gene at 14q22: mapping and expression. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1819-22
  41. **Son WY, Hwang SH, Han CT, Lee JH, Kim S, Kim YC.** Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1122-6.
  42. **Scieglińska D, Piglowski W, Mazurek A, Malusecka E, Zebracka J, Filipczak P, et al.** The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. *J Cell Biochem* 2008; 104:2193-206
  43. **Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M.** Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 2005; 19: 570-82.
  44. **Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, et al.** HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996; 104: 414-21.
  45. **Allen RL, O'Brien DA, Jones CC, Rockett DL, Eddy EM.** Expression of heat shock proteins by isolated mouse spermatogenic cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3260-6.
  46. **Eddy EM.** Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999; 4:23-30.
  47. **Dix DJ.** Hsp70 expression and function during gametogenesis. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 73-7.
  48. **FAWCETT DW.** The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2:403-6.
  49. **Moses MJ.** Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2: 215-8
  50. **Zickler D, Kleckner N.** Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet.* 1999; 33: 603-754.
  51. **Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, et al.** Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:3264-8.
  52. **Sá R, Neves R, Fernandes S, Alves C, Carvalho F, Silva J, et al.** Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2008; 79:962-75.
  53. **Alekseev OM, Richardson RT, O'Rand MG.** Linker histones stimulate HSPA2 ATPase activity through NASP binding and inhibit CDC2/Cyclin B1 complex formation during meiosis in the mouse. *Biol Reprod* 2009; 81:739-48.
  54. **Draetta G, Beach D.** Activation of cdc2 protein kinase during meiosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; 54: 17-26
  55. **Sun F, Handel MA.** Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 2008; 117: 471-85.
  56. **Zhu D, Dix DJ, Eddy EM.** HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 1997; 124: 3007-14.
  57. **Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S.** Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator.



- EMBO J 1998; 17: 6135–43.
58. **Thress K, Kornbluth S, Smith JJ.** Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 321–6.
  59. **Desmots F, Russell HR, Lee Y, Boyd K, McKinnon PJ.** The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10329–37.
  60. **Thress K, Song J, Morimoto RI, Kornbluth S.** Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO J* 2001; 20:1033-41.
  61. **Sasaki T, Marcon E, McQuire T, Arai Y, Moens PB, Okada H.** Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol* 2008; 182:449-58.
  62. **Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S.** A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* 2008; 7:3499-502.
  63. **Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al.** Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:462-8.
  64. **Kimmins S, Sassone-Corsi P.** Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005; 434:583-9.
  65. **Choi E, Han C, Park I, Lee B, Jin S, Choi H, et al.** A novel germ cell-specific protein, SHIP1, forms a complex with chromatin remodeling activity during spermatogenesis. *J Biol Chem* 2008; 283:35283-94.
  66. **Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, et al.** Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281:37888-92.
  67. **Quénet D, Mark M, Govin J, van Dorsselear A, Schreiber V, Khochbin S, et al.** Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2. *Exp Cell Res* 2009; 315:2824-34.
  68. **Bohring C, Krause W.** Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:411-9.
  69. **Boulanger J, Faulds D, Eddy EM, Lingwood CA.** Members of the 70 kDa heat shock protein family specifically recognize sulfoglycolipids: role in gamete recognition and mycoplasma-related infertility. *J Cell Physiol* 1995; 165: 7–17.
  70. **Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L.** Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000; 63:925-32.
  71. **Huszar G, Willetts M, Corrales M.** Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril* 1990; 54:1127–34.
  72. **Naaby-Hansen S, Herr JC.** Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol* 2010; 84:32-40
  73. **Maekawa M, O'Brian DA, Allen RL, Eddy EM.** Heat-shock cognate protein and related proteins in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1989; 40:843–52.
  74. **Eddy EM.** Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999; 4:23–30.
  75. **Huszar G, Vigue L, Morshedi M.** Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 57:882-8.
  76. **Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Kovanci E, Huszar G.** Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished

- sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril* 2002; 77:910-8.
77. **Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD.** Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997; 56:1020-4.
  78. **Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L.** Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3:1616-24.
  79. **Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalae M.** Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia* 2010; 42:13-9.
  80. **Huszar G, Vigue L.** Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 292-8.
  81. **Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L, Huszar G.** Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod* 1999; 14:2007-14.
  82. **Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A, Aksu C, Ward D, Bray-Ward P, et al.** Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biol Reprod* 2003; 69:1347-55.
  83. **Celik-Ozenci C, Jakab A, Vigue L, Demir R, Huszar G.** Mature and fertile sperm selectively bind to hyaluronic acid: cytoplasmic content, HspA2 levels, chromatin maturity, shape and ICSI sperm selection. *J Gynecol Invest* 9 (49<sup>th</sup> SGI annual meeting; No. 1, Suppl 849), 2002; 340A.
  84. **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.
  85. **Wolf BB, Green DR.** Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-52.
  86. **Thornberry NA.** The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997; 53: 478-90.
  87. **Thornberry NA.** Caspases, key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998; 5: R97-103.
  88. **Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases, enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
  89. **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies, integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
  90. **Screaton G, Xu XN.** T cell life and death signaling via TNF receptor family members. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 316-22.
  91. **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria, a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
  92. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al.** Prevention of apoptosis by Bcl-2, release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
  93. **Green GR, Balhorn R, Poccia DL, Hecht NB.** Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 1994; 37:255-63.
  94. **Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC.** The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116:4053-6.
  94. **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-13.
  96. **Zou H, Li Y, Liu X, Wang X.** An APAF-1. cytochrome c multimeric complex is a functional

- apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549-56.
97. **Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TM, Kal HB, De Rooij DG.** Apoptosis regulation in the testis: involvement of Bcl-2 family members. *Mol Reprod Dev* 2000; 56:353-9.
  98. **Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS.** Hsp70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 25665-71.
  99. **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, et al.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469-75.
  100. **Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES.** Negative regulation of the apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 476-83.
  101. **Lüders J, Demand J, Schönfelder S, Frie M, Zimmermann R, Höhfeld J.** Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol Chem* 1998; 379:1217-26
  102. **Höhfeld J.** Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol Chem* 1998; 379:269-74.
  103. **Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al.** Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80:279-84.
  104. **Lüders J, Demand J, Höhfeld J.** The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* 2000; 275:4613-7.
  105. **Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G.** Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:365-72.
  106. **Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D.** Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 65-70.
  107. **Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE.** Seeds of concern. *Nature* 2004; 432: 48-52.
  108. **Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al.** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; 21: 2876-81.
  109. **Seli E, Sakkas D.** Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 337-49.
  110. **Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A.** Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:746-57.
  111. **Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, et al.** FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001; 16:1209-17.
  112. **Huszar G, Vigue L, Oehninger S.** Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril* 1994; 61:136-42.
  113. **Aitken J, Krausz C, Buckingham D.** Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 268-79.
  114. **Dadoue JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML.** Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by

- aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988; 20: 211-17.
115. **Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A.** Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330-337.
  116. **Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, et al.** The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996; 11: 2468-71.
  117. **Nasr Esfahani MH, Abbasi H, Mirhosseini Z, Ghasemi N, Razavi Sh, Tavalaei M, et al.** Can altered expression of hspa2 in varicocele patients lead to abnormal spermatogenesis? *IJFS* 2010; 4: 104-113.
  118. **Visconti PE.** Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:667-8.
  119. **Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, et al.** Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:245-59.
  120. **Naaby-Hansen S, Diekman A, Shetty J, Flickinger CJ, Westbrook A, Herr JC.** Identification of calcium-binding proteins associated with the human sperm plasma membrane. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8:6.
  121. **Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D.** CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J Biol Chem* 2007; 282:18945-52
  122. **Yanagimachi R.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2:371-2.
  123. **Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogio M, Tamanini C, Seren E, et al.** Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 534-41.
  124. **Anderson RL.** Stress proteins and apoptosis in prenatal development, cancer and medicine. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3:209-12.
  125. **Dix DJ, Garges JB, Hong RL.** Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:373-80.
  126. **Neuer A, Mele C, Liu HC, Rozenwak Z, Witkin SS.** Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13:987-90.
  127. **Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Jeremias J, Dieterle S, Korneeva I, et al.** Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7:10-6.
  128. **Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur PK, King WA.** The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 829-37.
  129. **Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, King WA.** Heat shock protein 70 in bovine semen. *Biol Reprod* 1996; 54: 112.
  130. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M.** Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 197-203.
  131. **Miller D, Brough S, al-Harbi O.** Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 1992; 7:637-45.
  132. **Eggert-Kruse W, Neuer A, Clusmann C, Boit R, Geissler W, Rohr G, et al.** Seminal antibodies to human 60 kd heat shock protein (HSP 60) in

- male partners of subfertile couples. *Hum Reprod* 2002; 17: 726-35.
133. **Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS.** The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 149-59.
134. **Bloom SE, Muscarella DE, Lee MY, Rachlinski M.** Cell death in the avian blastoderm: resistance to stress-induced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death Differ* 1998; 5:529-38.
135. **Muscarella DE, Rachlinski MK, Bloom SE.** Expression of cell death regulatory genes and limited apoptosis induction in avian blastodermal cells. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:130-42.
136. **Huszar G, Vigue L.** Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 258-62.
137. **Son WY, Han CT, Hwang SH, Lee JH, Kim S, Kim YC.** Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 2000; 73: 1138-44.
138. **Feng HL, Sandlow JI, Sparks AET.** Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril* 2001; 76: 1136-9.
139. **Yeşilli C, Mungan G, Seçkiner I, Akduman B, Açıköz S, Altan K, et al.** Effect of varicocele on sperm creatine kinase, HspA2 chaperone protein (creatine kinase-M type), LDH, LDH-X, and lipid peroxidation product levels in infertile men with varicocele. *Urology* 2005; 66: 610-5.
140. **Lima SB, Cenedeze MA, Bertolla RP, Filho PA, Oehninger S, Cedenho AP.** Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* 2006; 86: 1659-63.
141. **Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S.** Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2006; 21: 1791-4.