Review Article

The role and effect of HSPA2 in male infertility

Motiei M., M.Sc., Tavalaee M.,M.Sc.*, Nasr-Esfahani M. H., Ph.D.

**P.O.Box: 8158968433, Royan Institute for Reproductive Biomedicine Center and Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran*

Received: Dec 2011 Accepted: Jan 2012

Abstract

The heat shock proteins (HSPs) are a group of homologous proteins encoded with a multigene family. They can be divided into five groups based on both size and function; including HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 and HSP100. Expression of HSPs can be constitutive and can increased when cells undergo metabolic and/or heat stress. HSPA2/Hsp70-2 is a kind of HSP70 and constitutively expressed in testis. This protein is essential for sperm maturation and is associated with infertility. HSPA2 expression has been shown to occur in two phases in human testis; 1) meiosis as an element of the synaptonemal complex and 2) spermiogenesis durinat sperm maturation and is considesered as an index for matured sperm. Several functions have been proposed for HSPA2 protein in human testis including; protein folding, formation and desynapsis of synaptonemal complex, repair of DNA strand breaks, plasma membrane remodeling, and the removal of excess cytoplasm. Background literature suggests that HSPA2 play a key role in spermatogenesis. Therefore, the aim of this biological- medicine study was the evaluation of the role and effect of HSPA2 in male infertility.

Key words: HSPA2, Spermatogenesis, Sperm maturation, Infertility

مقاله مروری

نقش و تأثیر پروتئین شوک حرارتی A2 درناباروری مردان

مرجان مطیعی .M.Sc*، **، ✉ مرضیه تولائی .M.Sc*، محمدحسین نصر اصفهانی .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 جنین شناسی 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 متابولیکی 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) اسپرمیوژنز 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 تاثیر پروتئین شوک حرارتی A2 درناباروری مردان است.

کلید واژه‌ها: HSPA2، اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم، ناباروری

مقدمه

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 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

✉ **آدرس مکاتبه:** اصفهان، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، گروه زیست‌شناسی سلول جنسی، صندوق‌پستی: ۸۱۵۸۹۶۸۴۳۳

Email: Tavalaee.royan@gmail.com

تمام ارگانیسم‌ها وجود دارد [۳ و٤]. بسیاری از پروتئین‌های شوک حرارتی به‌طور مداوم بیان می‌شود و برخی با افزایش استرس، افزایش می‌یابد، به عبارتی قابل القا با استرس است. القای پروتئین‌های شوک حرارتی در دو مرحله نسخه برداری 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 پروموتر ژن پروتئین شوک حرارتی یعنی عناصر پاسخ دهنده شوک حرارتی (HSE: Heat Shock Elements) متصل می‌شود؛ با این اتصال نسخه‌برداری آغاز شده و در نهایت ترجمه در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد [٦- ٤]. 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 پلی پپتیدهای تازه ساخته شده، مانع پیچش قبل 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 [٤]. در مجموع پروتئین‌های شوک حرارتی در تسهیل سنتز و تاخوردگی پروتئین‌ها، تراکم ساختارهای مولتی پروتئین، ترشح، نقل و انتقال و جابه‌جایی پروتئین‌ها در عرض غشاء، تجزیه پروتئین و تنظیم فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین کینازها 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 و۱۰]. استرس‌های محیطی و متابولیکی عبارتست از شوک حرارتی [۱۱و ۱۲]، عوامل شیمی‌تراپی، کمبود مواد غذایی [۱۳]، اشعه ماورای بنفش [١٤]، افزایش تکرار پلی گلوتامین [۱۵]، فاکتور نکروز توموری (TNF: Tumor Necrosis Factor) [۱۶و 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 [٤و ۸]. استرس‌های فیزیولوژیکی نیز عبارتست از رشد سلولی، تمایز، تکامل و پیری [۱۸و 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 تومووری با منشاء اپی‌تلیال این پروتئین‌های استرس را بیان می‌کند [۲۲-۲۰]. این پروتئین‌ها به پیچش مجدد پروتئین‌های دناتوره شده کمک می‌کند یا بعد از استرس یا صدمه سبب تجزیه آن‌ها می‌شود. بنابراین از آثار متابولیکی حاصل از پیچش نادرست پروتئین‌ها و مرگ سلولی ناشی از پروتئوتوکسیک جلوگیری می‌کند [٤ و۱۰].

۲-۱- 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 [٤ و٨]. پروتئین های شوک حرارتی مهم پستانداران بر اساس اندازه و عملکرد به پنج گروه (جدول ۱) تقسیم می‌شوند که عبارتند از [۲۳]: HSP100 (HSPH)، HSP90 (HSPC)، HSP70 (HSPA) ، HSP60 (HSPD)، HSP27 (HSPB)

جدول ۱. HSP مهم سلول‌های پستانداران

وزن مولکولی (KD)	عملکرد	جایگیری سلولی
۲۸-۲۷	پایداری میکروفیلامنت‌ها، انتقال پیام سیتوکین	سیتوزول و هسته
٦۰	اجتماع پروتئین	میتوکندری
۷۳-۷۰	جابه‌جایی و پیچش پروتئین	سیتوزول، هسته، شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری
۹۰	جابه‌جایی پروتئین، تنظیم گیرنده	سیتوزول، هسته، شبکه اندوپلاسمی
۱۰٤-۱۰۰	پیچش پروتئین	سیتوزول

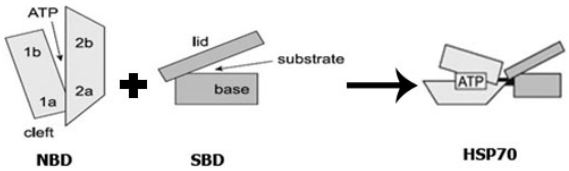
۲- خانواده پروتئین های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی (HSP70)

خانواده HSP70 حاوی ایزوفرم‌های ٦٦ تا ۷۸ کیلو دالتونی است که به صورت HSP70 نشان داده می‌شود و ژن کدکننده آن HSP70 است [٢٤]. نیمه عمر HSP70 القا شده با افزایش دما در سلول‌های پستانداران تحت شرایط آزمایشگاهی حدود ٤٨ ساعت است [۲۵]. برخی از اعضای خانواده HSP70 به طور مداوم بیان می‌شود و برخی با استرس به شدت القا می‌شود [٤]. همه این پروتئین‌ها به نظر می‌رسد که با اتصال و هیدرولیز ATP، با پروتئین‌های دیگر واکنش داده و سبب تاخوردگی و بلوغ آن‌ها می‌شود. برای مثال اعضای خانواده HSP70 به پلی پپتیدهایی که به تازگی از ریبوزوم 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 پلی پپتیدهای 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 [٨].

۲-۱- ساختار و عملکرد خانواده پروتئین های 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 پلی پپتیدی است [٢٦و ٢٧]. 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

اتصالی 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 β با شیار هیدروفوبی برای اتصال سوبسترای پلی پپتید و یک در (lid) با ساختار α-هلیکس روی جایگاه اتصالی سوبسترای پلی پپتیدی [۲۸]. چهار اسیدآمینه 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]. زمانی‌که ATP به HSP70 متصل باشد، میل ترکیبی کمتری برای سوبسترا دارد، درحالی‌که با اتصال ADP، HSP70 با میل ترکیبی بیشتری به سوبسترا متصل می‌شود [۳۳-۳۱].



شکل ۱. ساختار دنباله‌های HSP70. ATP به قسمت باز دنباله اتصالی نوکلئوتیدی HSP70 (NBD) متصل می شود [۲۶].دنباله اتصالی 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 چاپرونی کارآمد با اتصال کو-چاپرون‌ها یا کو-فاکتورهایی تنظیم می‌شود که این تبدیل داخلی بین مراحل ADP و ATP را کاتالیز می‌کند. سه پروتئین BAG-1، HSP40 و DnaJ چاپرون مولکولی وتنظیم کننده HSP70 در هسته و سیتوزول پستانداران است [۳۶- ۳٤]. کوچاپرون های HSP40 به نظر می‌رسد که سبب تسهیل اتصال سوبسترا و تحریک هیدرولیز ATP می‌شود. پروتئین BAG-1 واکنش تبادل 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 [۳٦]. MSJ-1 عضو جدید خانواده DnaJ است که در اسپرمیوژنز نقش مهمی دارد و شریک چاپرونی HSP70 ویژه سلول اسپرماتوژنیک یعنی HSPA2/Hsp70-2 و Hsc70t است. MSJ-1 می‌تواند در طول اسپرمیوژنز و در پیشبرد اتفاقات سیتومورفوژنیک 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 *HSPAx* 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 [٤۰] 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 [٤۱]. برخلاف بافت‌های طبیعی، بیان قابل توجهی از پروتئین HSPA2 در انواعی از سلول‌های سرطانی وجود داشته [٤۲] و در حیات این نوع سلول‌ها مؤثر است [٤۳].

حداقل پنج نوع HSP70 مختلف از نظر ساختمانی در بیضه بیان می‌شود که دارای PH ایزوالکتریک ۵ تا ٦ بوده و از درجه بالایی از هومولوگی برخوردارند [٤٤]. اشکال HSP70 ویژه بیضه (Hsp70-2 و Hsc70t) ابتدا در موش شناسایی شد

[٤٥]؛ آن‌ها به‌طور گسترده‌ای تنظیم شده و به‌ویژه در سلول های اسپرماتوژنزی بیان می‌شود [٤٦]. هومولوگ های آن‌ها بعداً در بیضه رت و انسان نیز کشف شد [٤١، ٤٦]. هومولوگ انسانی آن HSPA2 نامیده می‌شود که HSP70 غالب در اسپرم و سلول‌های اسپرماتوژنزی است [٤٧] و در چهار آمینواسید با Hsp70-2 موش و پنج آمینواسید با Hst70 رت متفاوت است. علاوه براین؛ HSPA2 حاوی شش آمینواسید نزدیک به انتهای کربوکسی است که در موش و رت وجود ندارد [۳۹].

۱-۳- بیان و عملکرد پروتئین شوک حرارتی A2

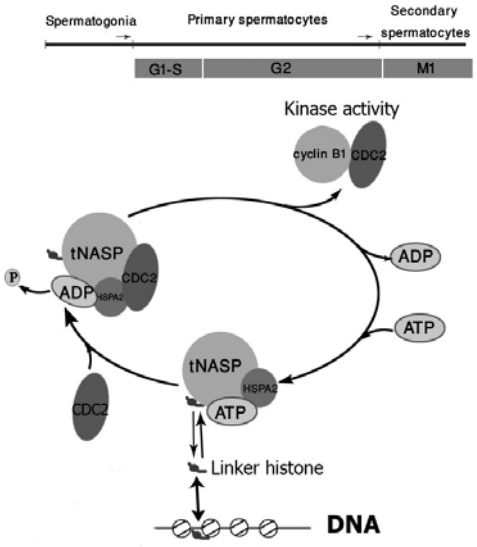
اسپرماتوژنز که از زمان بلوغ به بعد اتفاق می‌افتد به فرایندی اطلاق می‌شود که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که در قاعدهٔ لوله‌های منی ساز قرار دارد یک سری تقسیمات متوالی انجام داده و در نهایت به‌صورت اسپرماتوزویید بالغ در سطح مجرایی لوله‌های منی ساز بیضه آزاد می‌شود. این فرایند که تقریباً بین ٦٤ تا ٧٢ روز طول می‌کشد، شامل سه مرحلهٔ اصلی اسپرماتوسیتوژنز، تقسیم میوز و اسپرمیوژنز است. بیان HSPA2/Hsp70-2 در مرحلهٔ اسپرماتوسیتوژنز رخ نمی دهد بنابراین بیان این پروتئین در اسپرماتوگونی‌ها مشاهده نشده است [٤٤] در صورتی که HSPA2به میزان بالا در بیضه در دو فاز اسپرماتوژنز که شامل میوز و اسپرمیوژنز است، رخ می دهد [٤١].

۱-۱-۳- بیان اولیه پروتئین شوک حرارتی A2 در مرحله میوز اسپرماتوژنز

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 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 [٥٠- ٤٨]. نسخه‌برداری ژن *HSPA2/Hsp70-2* موش در اسپرماتوسیت‌های مرحله لپتوتن آغاز می‌شود و این پروتئین محتوای عناصر جانبی کمپلکس سیناپتونمال اسپرماتوسیت های 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، ۴۷و 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 اسپرماتوسیت های اواخر پاکی‌تن توسط آپوپتوز حذف شده و سبب ناباروری کامل مردانه و دچارآزواسپرمیا (Azospermia) می‌شوند[٤٧و٥١]. اخیراً سا (Sá)و همکاران نشان دادند که mRNA به میزان زیادی در اسپرماتوگونیای A ،اسپرماتوسیت‌های اولیه وهمچنین اسپرماتوسیت‌های ثانویه بیان می شود؛ بنابراین این ژن می تواند علاوه بر جدایی هومولوگ‌ها (دسیناپس)، در تقسیم سلولی نیز مؤثر باشد [۵۲].

در اسپرماتوسیت‌های پستاندارن CDC2/cyclin B1 و چاپرون HSPA2 برای انتقال G2→M ضروری است. در اسپرماتوسیت اولیه tNASP (چاپرون هیستون لینکر H1) به HSPA2 واقع در کمپلکس سیناپتونمال اسپرماتوسیت ها 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 HSPA2 ATPase 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

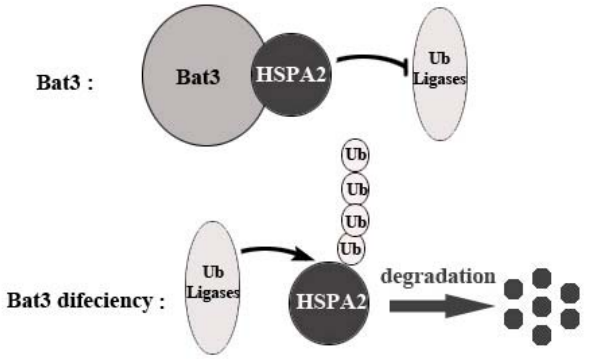
NASP توانـایی HSPA2 در فعـال‌سـازی CDC2 و تـشکیل کمپلکس CDC2/cyclin B1 را کنترل می‌کنـد؛ بنـابراین tNASP یک ارتباط عملکردی بین هیستون لینکرها و پیشرفت سـیکل سلولی در میوز فراهم مـی‌کنـد [۵۳]. فعالیـت کینـازی CDC2 منجر به فسفریلاسیون محتوای پروتئینی عمده فیلامنـت‌هـای متقـاطع کمـپلکس سـیناپتونمال و جداسـازی ایـن کمـپلکس پروتئینی می‌شود و عدم فعالیـت کینـازی CDC2 دسـیناپس و جداشدن کمپلکس سیناپتونمال را مختل می‌کند [٥٤]. تـشکیل دوظرفیتی‌های بسیار متراکم متافازI و جـدایی کمـپلکس‌هـای سیناپتونمال توسط کینازهای وابسته به سـیکلین و کینـازهـای aurora تنظیم مـی‌شـود[۵۵]. HSPA2 چـاپرون CDC2 بـوده و برای فعال‌سـازی کینـاز CDC2 و اجتمـاع CDC2/cyclin B1 در اسپرماتوسیت‌های پاکی‌تن ضروری است[٥٦].



شـکل ۲. تنظـیم دینـامیکی چرخـه چـاپرون HSPA2 توسـط tNASP–هیستون لینکر. تنظیم این چرخه با ارتباط هیستون لینکـرهـا و tNASP و تشکیل کمپلکس هیستون لینکر–HSPA2–tNASP آغاز می‌شود[۵۳].

Bat3 یک پروتئین تنظیم کننـده آپوپتـوز اسـت[۵۹– ۵۷]. دنباله‌های خاصی از Bat3 با پـروتئین‌هـای خـانواده BAG کـه عملکرد HSP70 را تنظیم می‌کند، ارتباط دارد [٦٠]. Bat3 برای جفت شدن، نوترکیبی و دسیناپس کروموزومی ضروری است.

اکثر سلول‌های ژرمینال با کمبود Bat3 در پروفاز میوزI به دلیل آپوپتوز می‌میرند. جالب اینکه پروتئین HSPA2/Hsp70-2 ویـژه بیضه در سلول‌هایی با نقص Bat3، شناسایی نشد ولـی میـزان نسخه های HSPA2/Hsp70-2 طبیعی بود. ساسـاکی (Sasaki) و همکاران اذعان داشتند که غیرفعال سـازی Bat3 سـبب القـای پلـی یوبیکوئیتینـه و در نهایـت تجزیـه HSPA2/Hsp70-2 می‌شود(شکل۳). با غیرفعال‌سازی فعالیـت پروتئـوزوم میـزان پروتئین HSPA2/Hsp70-2 به حالت اول برمـی‌گـردد. بنـابراین Bat3 به عنوان یک تنظیم کننـده بحرانـی HSPA2/Hsp70-2 در اسپرماتوژنز عمل می‌کند [٦١].

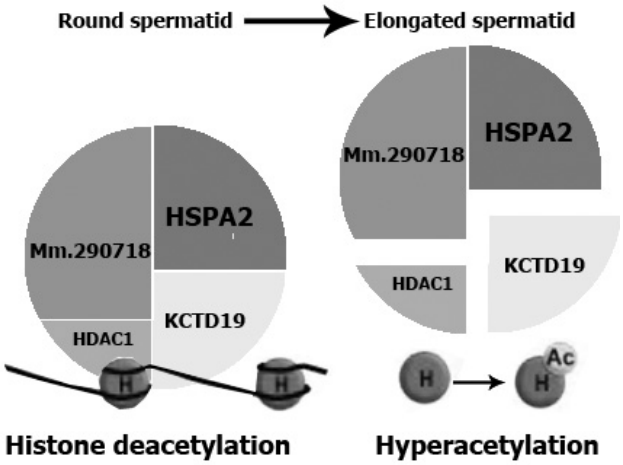


شکل۳. مدل تنظیم HSPA2توسط Bat3. Bat3 به HSPA2 متصل شـده و از آن در مقابل یوبی کوئیتین لیگازها (Ub-Ligases) محافظت می‌کند. کمبود Bat3 سبب یوبیکوئیتینه شدن HSPA2 و تجزیه آن می‌شود [٦١].

۲-۱-۳- بیان ثانویه پـروتئین شـوک حرارتـی A2 در مرحله اسپرمیوژنز فاز اسپرماتوژنز

اسپرمیوژنز یک تمایز پیچیده بعد از میـوز در سـلول ژرمینـال مردان است و فراینـدهـای هـسته‌ای و سیتوپلاسـمی در راسـتای تکامل سلول ژرمینال اتفاق می‌افتد کـه عبارتـست از تغییراتـی در ساختار و عملکرد کروماتین (تراکم کروماتین، مهار نسخه‌بـرداری و جایگزینی هیستون‌ها با پـروتئین‌هـای انتقـالی و پروتـامین‌هـا)، حذف سیتوپلاسم، تغییر غشای پلاسمایی و تـشکیل آکـروزوم و دم[٦٤– ٦٢]. در اسپرماتیدهای گرد، چهار پروتئین به‌نـام پـروتئین ویـژه سـلول‌هـای ژرمینـال (Mm.290718/ZFP541)، هیـستون داستیلاز۱(HDAC1: Histone Deacetylase 1) ، HSPA2 و دنباله ۱۹

ترامریزه کانال پتاسیم (KCTD19: Potassium Channel Tetramerization Domain 19)، تشکیل کمپلکس پایداری را داده که منجر به داستیلاسیون هیستون‌ها می‌شود (شکل ٤). در هنگام تبدیل اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای طویل، بیان پروتئین ویژه سلول‌های ژرمینال و دنباله ۱۹ تترامریزه کانال پتاسیم خاتمه می‌یابد. بنابراین هیستون داستیلاز۱ 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 [٦٥].



شکل ٤. مدل بازسازی کروماتین در اسپرماتوژنز. کمپلکس پایداری حاوی Mm.290718/ZFP541، HDAC1، HSPA2 و KCTD19 در اسپرماتیدهای گرد با هیستون‌های استیله وجود دارد. زمانی‌که 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 [٦٥].

HSPA2 چاپرون پروتئین‌های انتقالی TP1 و TP2 است [٦٦]. می‌توان فرض کرد که در حین جابه‌جایی هیستون‌ها با پروتئین‌های انتقالی در سلول‌های ژرمینال هاپلوییدی، شکست‌هایی در رشته DNA ایجاد می‌شود که فعالیت توپوایزومراز IIβ را القا کرده و با وساطت HSPA2 سبب تحریک فعالیت پلی ADP ریبوز پلیمراز۱ (ParP1) و پلی ADP ریبوز پلیمراز۲ (ParP2) می‌شود. ParP1 یا ParP2 از اسپرماتید گرد تا طویل و همزمان با HSPA2 بیان شده و سبب کاتالیز پلی‌ADP-ریبوزیلاسیون می‌شود. ParP2 با تمایل زیادی به TP2 و HSPA2 متصل می‌شود ولی ParP1 ارتباط ضعیفی را با HSPA2 ایجاد می‌کند وسبب پلی‌ADP- ریبوزیلاسیون HSPA2 می‌شود. با توجه به اینکه HSPA2 چاپرون TP2 است، احتمالا پلی‌ADP-ریبوزیلاسیون HSPA2 توسط ParP1 فعالیت این چاپرون را در اسپرمیوژنز 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 اسپرمیوژنز مشارکت داشته باشد [٦٧].

با وجودی‌که موش‌هایی با نقص Bat3 در پروفاز میوزI 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 تنظیم کننده جایگزینی هیستون در سلول‌های ژرمینال پس از میوز باشد [٦١]. با توجه به اینکه Hsp70-2/HSPA2 فعالیت TP-1 و TP-2 را تنظیم می‌کند [٦٦] و Bat3 با کمک دنباله BAG به Hsp70/Hsc70 متصل شده و پیچش مجدد پروتئین با واسطه HSP70 را در آزمایشگاه مهار می‌کند [٦٠] ، ساساکی و همکاران نتیجه گرفتند که یک میان‌کنش میان Bat3 و Hsp70-2/HSPA2 وجود دارد [٦١].

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 [٦٨،٦٩] دو عضو خانواده HSP70 (HSPA2 و HSPA1L) در آنتی ژن‌های غشای اسپرم انسان توسط آنتی‌بادی‌های آنتی اسپرم

نمونه‌های پلاسمای مایع منی در مردان نابارور شناسایی شد [٦٨]. 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 اسپرماتوزوآی 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 اسپرماتوزوآی موش و رت وجود دارد [٧٤].

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

بلوغ اسپرم با عبور از بیضه به سر اپیدیدیم که با کاهش فعالیت CK-B و افزایش بیانHSPA2 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 و۷۵]. مطالعات نشان داده‌است که اسپرم‌های بالغ و نابالغ دارای نسبت HSPA2، خصوصیات مورفولوژیکی و مورفومتریکی متفاوتی هستند[۷۵و۷٦]. HSPA2 تسهیل کننده تغییر وضعیت غشای پلاسمایی، تشکیل جایگاه‌ها و گیرنده‌های اتصالی زونا [۷۷] و اسیدهیالورونیک [۷۸] در اسپرماتوزوآی 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 و۸۲]. 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 اسپرمیوژنز و همزمان با حذف سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد [٤٦و۷۰] و احتمالاً HSPA2 تسهیل کننده حذف سیتوپلاسمی‌است. 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 دوپیامد را می‌تواند به‌دنبال 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 [٤].

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

است تا اجسام آپوپتوزی برای فرایند فاگوسیتوز تشکیل و در نهایت بدون تخریب سلول‌های اطراف دفع شود[۸٤]. فرایند آپوپتوز با میانجی‌گری کاسپازها انجام می‌شود [۸۵]. کاسپازها آبشاری از واکنش‌ها را تشکیل می‌دهد که در ابتدا کاسپازهای آغازگر با مولکول‌های آداپتور ویژه‌ای واکنش داده و فرایند اتوکاتالیتیک آغاز شود [۸۸- ۸٦]. سپس کاسپازهای اجراکننده فعال می‌شود تا فرایند پروتئولیتیک سلول آغاز شود. رخدادهایی که منجر به فعال‌سازی کاسپازها می‌شود در دو مسیر خلاصه می‌شود:

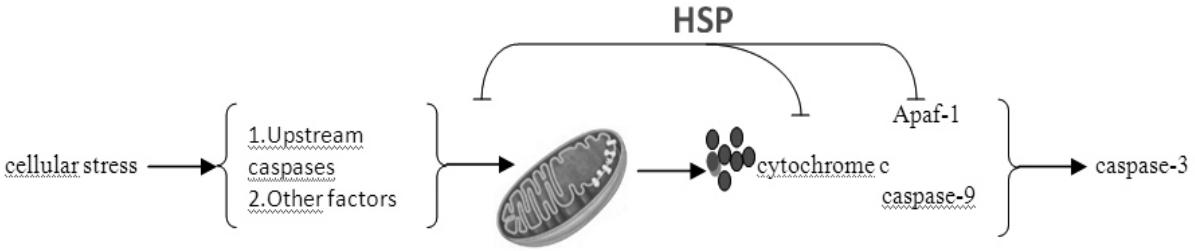
۱) مسیر خارجی: با اتصال لیگاند مناسب به یکی از چندین گیرنده سطحی مرگ سلولی آغاز می‌شود [۸۹و۹۰].

۲) مسیر داخلی: با نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و آزادی چندین فاکتور پرو-آپوپتوزی مانند سیتوکروم c همراه است (شکل۵) [۹۱و ۹۲]. مکانیسم آزادی سیتوکروم c با فعالیت خانواده Bcl-2 تنظیم [۹۳و۹٤] و پس از آزاد شدن به سیتوزول، به پروتئین Apaf-1 متصل شده تا کمپلکس آپوپتوزوم را تشکیل دهد [۹۵و۹٦].

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 سیتوکروم‌c 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 انسان، احتمالاً مهارکننده‌های فرایند آپوپتوزی هستند[۹۷و۹۸]. 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 و۱۰۰]. همکاری BAG-1 با Bcl-2 منجر به تنظیم عملکرد چاپرون‌های HSP70 می‌شود [۳٤و 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 ازطریق انتهای آمینی خود که یک دنباله شبه یوبیکوئیتین است با پروتئوزوم مرتبط است [۱۰۲و۱۰۳]. 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 [۱۰٤].

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.



شکل۵ .جایگاه‌های احتمالی که HSP می‌تواند اثر آنتی آپوپتوزی خود را اعمال کندعبارتند از: ۱) القای سریع HSP یا بیان بالای آن ممکن است اثر فاکتورهای القا کننده آزادی سیتوکروم‌c 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 پیچش صحیح Apaf-1 بعد از اتصال به سیتوکروم c شده و در اتصال به پروکاسپاز-۹ تداخل ایجاد کند [۷].

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.

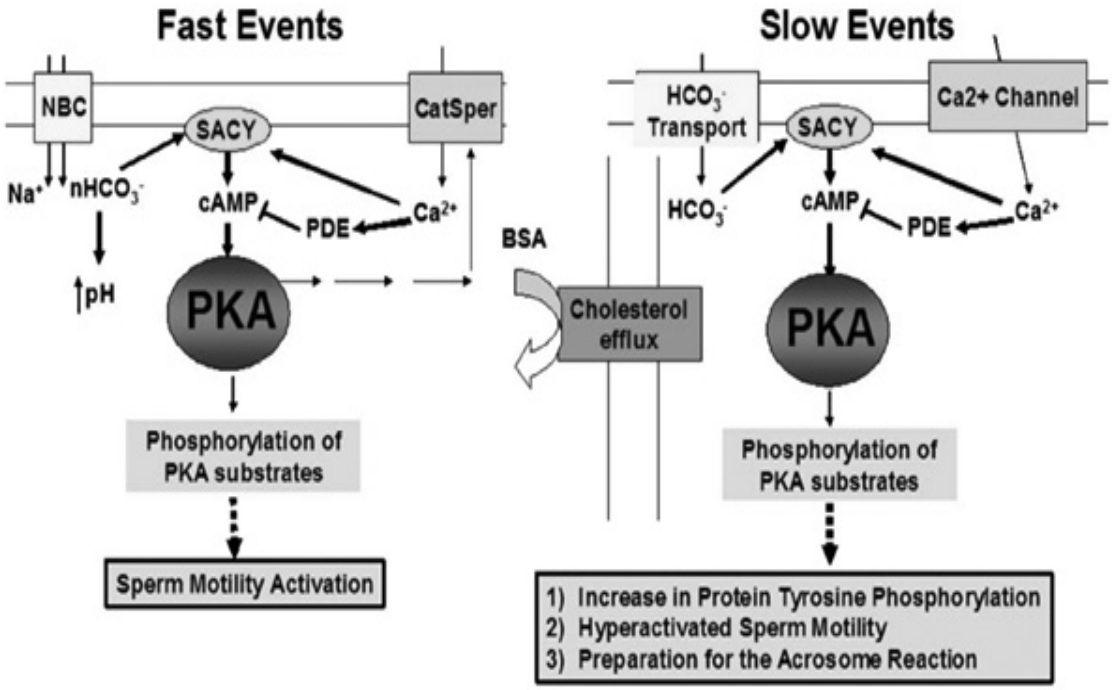
اغلب واضح نیست که چه نسبتی از اسپرم تکامل یافته در میان اسپرم‌های انزال، نابالغ و آپوپتوزی هستند و چه نسبتی از کل جمعیت سلول ژرمینال توسط آپوپتوز قبل از انزال حذف می‌شوند [۱۰۵].

۳-۲-۴- 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 انوپلوییدی (اغلب دیزومی‌ها) می‌شود [۱۱۱]. در فاز دوم که بیان HSPA2 در مرحله اسپرمیوژنز است، هر گونه نقص در بیان این پروتئین منجر به آسیب DNA می‌شود. مطالعات نشان داده که در صورت عدم حذف سیتوپلاسمی‌که با غلظت‌های زیاد کراتین کیناز اسپرم شناسایی می‌شود، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) افزایش یافته و سبب آسیب DNA بیشتر اسپرم می‌شود [۱۱۲ و ۱۱۳] و گزارش شده آسیب DNA اسپرم با نقص در جایگزینی هیستون-پروتامین طی فرایند اسپرمیوژنز ارتباط دارد [۱۱٤-۱۱٦] . 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 پیچش صحیح پروتئین‌های درگیر در اسپرماتوژنز (هیستون-پروتامین)، کاهش آسیبDNA و همچنین بهبود مورفولوژی و حرکت اسپرم می‌شود[۱۱۷].

۳-۳- پروتئین شوک حرارتی A2 و ظرفیت یابی اسپرم

ظرفیت‌یابی 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 ٦) [۱۱۸] . ظرفیت‌یابی سریع؛ با فعال‌سازی حرکت اسپرم همراه است. حرکت شدید فلاژلوم به محض اینکه اسپرم از اپیدیدیم آزاد می‌شود و در تماس با غلظت‌های HCO_3^- و Ca^{2+} موجود در مایع سمینال قرار می‌گیرد، شروع می‌شود. HCO_3^- و Ca^{2+} توسط یک کو-ترانسپورتر Na^+/HCO_3^- (NBC) و یک کانالCa^{2+} ویژه اسپرم (CatSper) به داخل سلول منتقل می‌شود. حرکت غشاگذر (transmembrane) HCO_3^- با افزایش PH داخل سلولی همراه است. همچنین HCO_3^- و 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.



شکل ٦. اساس مولکولی رخدادهای سریع و کند در ظرفیت‌یابی اسپرم. (رخداد سریع) زمانیکه اسپرم در تماس با محلول ایزوتونیک حاوی HCO_3^- و 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].

پروتئین کیناز A پروتئین‌های هدف گوناگونی را فسفریله کرده و چندین مسیر سیگنالی آغاز می‌شود. ظرفیت‌یابی کند (Slow capacitation) به‌مدت 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 HCO_3^- و Ca^{2+} انجام می‌شود. سرم آلبومین گاو سبب حذف کلسترول غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود و این کلسترول با سایر ترکیبات اتصالی کلسترول مانند β- سیکلودکسترین‌ها جایگزین شده و ظرفیت‌یابی را القا می‌کند. همانند ظرفیت‌یابی سریع، HCO_3^- و 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].

HSPA2پروتئین اتصالی کلسیم است و سه چاپرون اتصالی کلسیم HSP70؛ HYOU1، HSPA2 و HSPA5 در سطح اسپرم متحرک انسان وجود دارد [۱۲۰].

کانال CatSper از چهار زیرواحد تشکیل شده(CatSpers1-4) 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 می‌کند. لیو(Liu) و همکاران نشان دادند که کمپلکس CatSper1 حاوی پروتئین شوک حرارتی HSPA2/Hsp70-2 و یک پروتئین غشاگذر (transmambrane) جدیدی به نام CatSperβ است. CatSperβ 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

اسپرم یعنی کانال‌ها نقش مؤثری خواهند داشت [۱۲۱].

۴-۳- پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی و فرایند لقاح

اسپرماتوزوآ با آکروزوم سالم از طریق اتصال به زوناپلوسیدا، القای واکنش آکروزومی، اگزوسیتوز 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 [۱۲٤- ۱۲۷]. ماتیو (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 ماتیو و همکاران در سال ۲۰۰۱ اذعان داشتند که آنتی بادی‌های ضد HSP70 میان کنش اسپرم-زوناپلوسیدا را در گاو [۱۲۸] و گراز [۱۲۹] مهار می‌کند و فرض شده که HSPهای سطح اسپرم به عنوان اتصالاتی عمل شناسایی سولفوگلیکولیپیدی را در اتصال سلولی میانجیگری می‌کند. بنابراین از نظر این نویسندگان پیشنهاد اول (اتصال محکم اسپرم به زوناپلوسیدا) قابل قبول است. در صورتی‌که 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 می‌نمابد 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 تسهیل کننده 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 [٦٨]. علاوه براین؛ 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 نمی‌توان با اطمینان ادعا کرد که HSPA2 یا پروتئین دیگری از HSP70 شناسایی شده است. همچنین ادی(Eddy) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان داده‌اند 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 [٤٦]. 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.

۵-۳- پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی و تکامل جنین

مطالعات متعددی بیان کرده اند که HSP70، علاوه بر لقاح در تکامل جنین انسان [۱۳۱و۱۳۲]، جوندگان [۱۲۶و۱۳۳] و احشام[۱۲۸] نقش دارد. نئور و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان داده‌اند که حضور آنتی بادی‌های HSP70 به‌طور قابل ملاحظه‌ای پیشرفت جنین موش را به مرحله بلاستوسیت کاهش می‌دهد [۱۲٦]. به‌علاوه؛ الیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس (antisense oligonucleotide) مکمل با RNA پیامبر HSP70 هم اثر مشابهی روی تکامل جنین دارد [۱۲۵]. با توجه به اینکه مطالعات متعدد پیشنهاد می‌کند که HSP70 مهارکننده آپوپتوز در تکامل اولیه جنین است [۱۲٦،۱۳٤ و۱۳۵] 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.

۶-۳- 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).

جدول ۲. بررسی پاتوژنز ناباروری مردان و HSPA2

نویسندگان (سال)	بیماران	نتایج
هوزر و ویگو(Vigue) [۱۳٦] (۱۹۹۰)	ناباروران الیگوزواسپرمیا	بیان کم HSPA2 با درصد بیشتر سلول‌ها با زایده سیتوپلاسمی همراه بوده و اسپرماتوزوآ با بلوغ ناقص در ناباروران الیگوزواسپرمیا بیشتر است.
هوزر و همکاران [۷۵] (۱۹۹۲)	زوج‌های تحت IVF	HSPA2 برای اسپرماتوژنز طبیعی ضروری است و نسبت‌های کم HSPA2/CK با میزان کم باروری در IVF همراه خواهد بود.
سان(Son) و همکاران [٤۱] (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 آزواسپرمیا تحت بیوپسی بیضه	بیان ژن *HSPA2* در بیضه افرادی با اسپرماتوژنز غیرطبیعی کم است و احتمالا این ژن در میوز بیضه انسان نقش مهمی دارد.
هوزر و همکاران [۷۰] (۲۰۰۰)	مایع 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 اسپرمیوژنز انسان معرفی کردند
کوانکی(Kovanci) و همکاران [۱۱۱](۲۰۰۱)	ناباروران الیگوزواسپرمیا	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 انوپلوییدی 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 [۷٦] (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 [۱٤۰] (۲۰۰٦)	ناباروران واریکوسل با درجه II و III	ژن *HSPA2* در افراد بالغ با واریکوسل و الیگوزواسپرمیا در مقایسه با گروه کنترل بیان کمتری دارد.
کدنهو(Cedenho) و همکاران [۱٤۱] (۲۰۰٦)	ناباروران الیگوزواسپرمیا	ژن *HSPA2* در اسپرم مردان نابارور با الیگوتراتوزواسپرمیا 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 اسپرماتوژنز 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 انوپلوییدی (اغلب دیزومی‌ها)، الیگوزواسپرمیا و آزواسپرمیا همراه خواهد بود. هر گونه نقص در بیان این پروتئین در فاز نهایی اسپرمیوژنز، 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/flier-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, Pigłowski W, Mazurek A, Małusecka 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 identifiedas 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 Reprod1999; 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, Tavalaee 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 (49th 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 TNFreceptor 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, Frien 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 Steril1994; 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. **Dadoune 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 Ambrogi 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, Tavalaee 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, Clussmann 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, Açikgöz S, Altan K, et al.** Effect of varicocelectomy 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.