مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۴/ ۱۴۳-۱۲۸

مقاله مروری

نقش پروتئین فسفولیپاز C زتا در باروری مردان به عنوان یک فاکتور فعال کننده تخمکی

سمانه آقاجان‌پور[۱،۲،۳]، مرضیه تولایی[۱،۲*]، لیلا آزادی[۱،۲]، محمد حسین نصر اصفهان[۱،۲،۴]

[۱] مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران؛ [۲] پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران؛

[۳] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان، تهران، ایران؛

[۴] مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت:۹۲/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: **در پستانداران، اسپرم پس از ورود به تخمک به هنگام لقاح، یک آبشار سیگنالی را که شامل نوسانات در غلظت کلیسم آزاد سیتوپلاسمی تخمک است، ایجاد می‌کند. هدف از انجام این مطالعه مروری، بررسی نقش پروتئین PLCζ به عنوان یک فاکتور فعال کننده تخمکی و سپس نقش آن در نمونه اسپرم مردان بارور و نابارور می‌باشد.**

روش بررسی: **در این مقاله مروری، ۵۱ مقاله مرتبط با پروتئین PLCζ با استفاده از کلمات کلیدی اسپرم، فعال‌سازی تخمک، فسفولیپاز C زتا، ناباروری و شکست لقاح در فاصله سال های ۲۰۱۳-۲۰۰۲، از طریق پایگاه اینترنتی PubMed جمع آوری گردید.**

یافته ها: **از سال ۲۰۰۲ که پروتئین فسفولیپاز C زتا شناسایی شد، پیشرفت های زیادی در دانش محققین در زمینه این پروتئین در هر دو سطح علمی و کلینیکی به وجود آمده است. به طور قابل توجهی، در برخی از بیماران القای فعال‌سازی تخمک پس از انجام ICSI با شکست مواجه شده و نابارور باقی می‌مانند؛ بنابراین، مشخص شده است که پروتئین فسفولیپاز C زتا نقش مهمی در فعال سازی تخمک انسان دارد و در نتیجه هر گونه اختلال ژنتیکی، مولکولی یا بیوشیمیایی این پروتئین موجب نقص در فعال سازی تخمک می گردد.**

نتیجه گیری: **فاکتور فسفولیپاز C زتا می تواند در تکنیک های ART به عنوان یک عامل درمانی جدید در تخمک های دچار نقص در فعال سازی یا به عنوان یک بیومارکر پیشگویی کننده یا تشخیصی در توانایی فعال سازی تخمک نمونه ها، مورد استفاده قرار گیرد.**

واژه های کلیدی: **اسپرم، فعال‌سازی تخمک، فسفولیپاز C زتا، ناباروری، شکست لقاح.**

مقدمه:

در طی لقاح طبیعی، پس از عبور اسپرم از منطقه شفاف (Zona pellucida= ZP)، غشای اسپرم با غشای تخمک یکی می شود. پس از ادغام غشای اسپرم با غشای تخمک، تخمک تحت یکسری از تغییرات بیوشیمیایی و ریخت‌زایی از جمله خارج شدن تخمک از متافاز میوز ۲ و تکمیل دومین تقسیم میوزی قرار می‌گیرد که به عنوان فرآیند بسیار پیچیده فعال‌سازی تخمک شناخته می‌شود و در اثر افزایش غلظت یون Ca^{2+} داخل سیتوپلاسمی تخمک حاصل می‌گردد. مشخص شده است که این عوامل فعال کننده تخمک (Sperm associated oocyte activation factor= SOAFs) توسط اسپرم آزاد می شوند (۲،۱). در اکثر مواقع شکست در لقاح به علت عدم فعال‌سازی تخمک توسط اسپرم می باشد. بر اساس گزارش‌های متفاوت،

نویسنده مسئول: اصفهان- مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل- گروه زیست فناوری تولید مثل- تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۳۴۳۱، E-mail:tavalaee.m@gmail.com

در طی استفاده از روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به درون تخمک (ICSI= Intracytoplasmic injection)، شکست در لقاح ممکن است در ۳۰٪ از تخمک‌ها صورت گیرد که در این میان ۳-۲٪ موارد، شکست در لقاح ممکن است در تمامی تخمک‌ها صورت گیرد (۳). فسفولیپاز C زتا (PLCζ) یک پروتئین ویژه اسپرمی با وزن مولکولی 70-75kDa است (۴، ۵) که به نظر می‌رسد به عنوان یک جز اصلی SOAFs عمل نماید (۶). جایگاه این پروتئین به طور غالب، در ناحیه استوایی سر اسپرم پستانداران است و مشاهده شده که در تخمک لقاح یافته سبب افزایش سطح کلسیم داخل سلولی و به دنبال آن فعال‌سازی تخمک از طریق مسیر پیام رسانی توسط اینوزیتول ۴،۱ و۵ تری فسفات می‌گردد (۷). از طرفی در افراد نابارور که دارای اسپرم هایی با سر گرد (Globozospermic) می باشند، کمبود و یا عدم حضور پروتئین فسفولیپاز C زتا گزارش شده است (۸)؛ لذا با توجه به اهمیت حضور این پروتئین در هنگام لقاح، هدف از این مطالعه مروری بررسی نقش پروتئین فسفولیپاز C زتا به عنوان یک فاکتور فعال کننده تخمک می باشد؛ لذا بدین منظور، به بررسی مسیر و نحوه فعال سازی تخمک در طی لقاح، ساختار پروتئین فسفولیپاز C زتا، جایگاه قرارگیری آن در سر اسپرم افراد بارور، نحوه بیان آن و به نقش ضروری این پروتئین در اسپرم افراد بارور به عنوان یک فاکتور پیشگویی کننده و تشخیصی و معضلات عدم وجود آن در افراد نابارور پرداخته می شود.

روش بررسی:

در این مقاله مروری، ۵۱ مقاله مرتبط با پروتئین سفولیپاز C زتا در فاصله سال های ۲۰۱۳-۲۰۰۲، از طریق پایگاه اینترنتی PubMed جمع آوری گردید. از کلمات کلیدی اسپرم، فعال‌سازی تخمک، فسفولیپاز C زتا، ناباروری و شکست لقاح جهت جستجو مقالات استفاده شد.

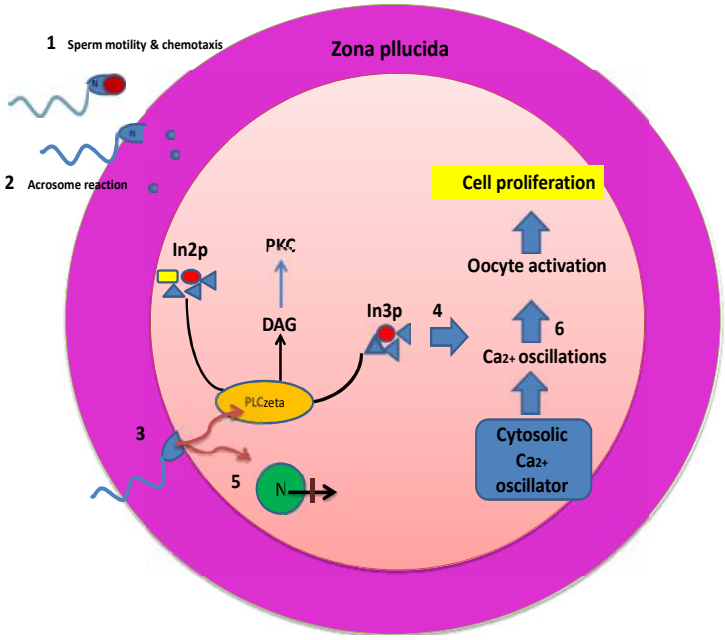
یافته ها:

در طی سالیان متمادی محققان بر این گمان بودند که پس از ادغام غشای سر اسپرم با غشای تخمک، پروتئین فسفولیپاز بتا یا گاما موجود در تخمک، از طریق افزایش در غلظت یون کلسیم، سبب فعال شدن تخمک می‌شوند. به دنبال این فرضیه، امروزه دریافته‌اند که تحریک ایزوفرم‌های بتا یا گاما موجود در تخمک توسط رسپتورهای تیروزین کیناز یا G- پروتئین سبب افزایش در غلظت یون Ca^{2+} می‌شود، اما این افزایش در غلظت یون Ca^{2+} درون سیتوپلاسمی برای فعال شدن تخمک کافی نیست (۹).

مطالعات بسیاری جهت شناسایی فاکتور اسپرمی فعال‌کننده تخمک صورت گرفته است. این فرضیه که اسپرم پستانداران به هنگام لقاح یک فاکتور محلول (Soluble factor) به داخل تخمک می‌فرستد و این فاکتور اسپرمی سبب رهایی Ca^{2+} می شود توسط تعدادی مطالعه حمایت می‌گردد (۲،۱). در تلاش‌های اولیه جهت شناسایی این فاکتور اسپرمی با استفاده از عصاره محلول اسپرم هامستر یک کاندید پروتئینی kDa ۳۳ معرفی شد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که پروتئین kDa ۳۳ نمی‌تواند فاکتور اسپرمی فعال‌کننده تخمک باشد، زیرا حذف آن از عصاره اسپرمی هامستر مانع از فعال‌سازی تخمک نشد (۱۱،۱۰).

پروتئین دیگری که به نظر می‌رسید به عنوان فاکتور اسپرمی فعال‌کننده تخمک باشد یک شکل کوتاه شده از گیرنده c-kit (Truncated kit) بود که به آن tr-kit نیز می‌گویند، اما همانند کاندیدای قبلی حذف آن از عصاره اسپرمی مانع از فعال‌سازی تخمک نشد (۱۲). در طی مطالعات بیشتر مشخص گردید که این فاکتور اسپرمی، پروتئینی است که در داخل سلول به صورت محلول می‌باشد و از طریق Inosytol 1,4,5-triphosphate (IP3) سبب ایجاد نوسانات Ca^{2+} و به دنبال آن، فعال‌سازی تخمک و تکوین جنین می‌گردد، اما مکانیسم مولکولی که اسپرم با وساطت IP3 فعال می‌کند تاکنون شناسایی نشده

است (۱۳). با توجه به این یافته‌ها که این پروتئین محلول، در داخل سلول اسپرم قرار دارد، نه تخمک و از طریق IP3 پس از لقاح سبب افزایش در غلظت یون کلسیم داخل تخمک می شود و دارای فعالیت فسفولیپازی است، مشخص گردید که این فاکتور باید جزء خانواده فسفو لیپاز C (PLC) باشد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: مسیر پیام‌رسانی پروتئین فسفولیپاز C زتا اسپرم در داخل تخمک بعد از تماس غشای اسپرم با تخمک و نحوه فعال شدن تخمک (۱۳)

بنابراین تلاش‌ها در جهت شناسایی این فاکتور اسپرمی ادامه یافت تا جایی‌که مشخص شد ریز تزریق هیچ یک از ایزوفرم‌های خانواده PLC (بتا، گاما، اپسیلون و دلتا) سبب افزایش سطح کلسیم داخل سلولی کافی جهت فعال‌سازی تخمک نمی‌گردد (۱۴، ۱۵). بنابراین یک ایزوفرم جدید از خانواده PLC به نام PLCζ (Phospholipase Czeta) شناسایی شد که ویژه سلول اسپرمی می‌باشد.

امروزه پروتئین فسفولیپاز C زتا به عنوان محتمل‌ترین نامزد فعال‌کننده تخمک محسوب می‌شود. از آنجا که ریز تزریق cRNA PLCζ (Complementary RNA) گونه‌های مختلفی از پستانداران به درون تخمک موش منجر به افزایش غلظت یون Ca^{2+} درون سیتوپلاسمی تخمک و متعاقب آن فعال‌سازی تخمک گردید، فرضیه فاکتور اسپرمی پذیرفته و فرضیه فاکتور تخمکی رد شد (۱۶).

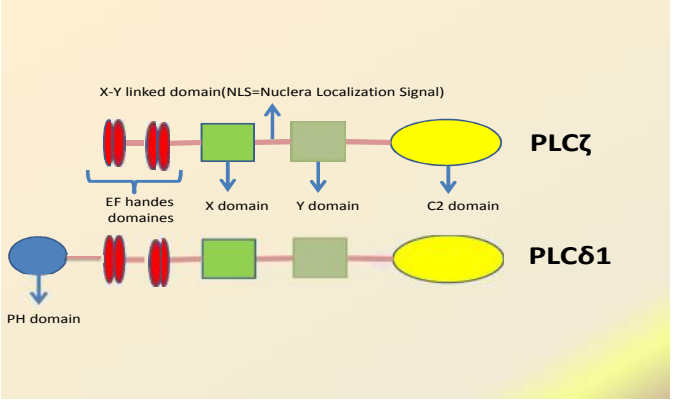
در طی یک مطالعه ژنتیکی، پس از آنکه مشخص گردید فاکتور اسپرمی دارای فعالیت فسفولیپازی است و از سایر ایزوفرم‌های شناخته شده خانواده PLC متفاوت می‌باشد، بررسی و شناسایی آن آغاز گردید. با توجه به آن‌که در بررسی‌های قبلی توالی پروتئین‌های این خانواده شناسایی شده بود با استفاده از به کارگیری توالی (Expression sequence tag= EST) در کتابخانه cDNA بیضه موش و انسان، ایزوفرم جدیدی از خانواده PLC به نام فسفولیپاز C زتا شناسایی شد (۱۶).

پروتئین فسفولیپاز C زتا (PLCζ) یک عامل فیزیولوژیکی است که سبب افزایش در غلظت یون Ca^{2+} درون سیتوپلاسمی و فعال‌سازی تخمک می‌گردد که شواهد مبنی بر تأیید این موضوع عبارتند از: ۱- تزریق cRNA و پروتئین نوترکیب (Recombinant protein)

پروتئین فسفولیپاز C زتا موش، انسان، میمون، خوک و سایر پستانداران به درون تخمک موش سبب ایجاد نوسانات Ca^{2+} مشابه با آنچه که در لقاح دیده می‌شد، گردید (۱۶، ۱۷). بر اساس مطالعه صورت گرفته، تخمین زده شده است که تزریق حدود fg۱۰-۵ از cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا به درون هر تخمک، سبب افزایش در غلظت یون Ca^{2+} گذرا در درون سیتوپلاسم می شود. از طرفی تزریق حدود fg ۵۰ از cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا به درون هر تخمک سبب ایجاد یکسری از نوسانات Ca^{2+} به صورت ممتد تا قبل از زمان تشکیل پیش هسته (Pronucleus) ماده در سیتوپلاسم تخمک می‌گردد (۱۶). همچنین مشاهده شد که در مقایسه با تزریق حدود fg ۵۰ از cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا جهت ایجاد نوسانات کلسیمی، به مقدار بیشتری از پروتئین نوترکیب پروتئین فسفولیپاز C زتا در حدو fg ۳۰۰ نیاز است. این پروتئین‌های نوترکیب که در شرایط آزمایشگاهی ساخته شدند، شامل پروتئین PLCζ به همراه یک پروتئین فلورسنت بودند. احتمالاً افزایش در میزان مقدار تزریق پروتئین نوترکیب به درون هر تخمک موش به دلیل ناپایدار بودن پروتئین نوترکیب و از بین رفتن سریع آن در داخل تخمک و یا فعال نبودن نسبت چشمگیری از پروتئین نوترکیب پروتئین فسفولیپاز C زتا بعد از تزریق به داخل تخمک می‌باشد (۱۶).

در دو مطالعه مجزا که از آنتی‌بادی‌های مختلف علیه پروتئین پروتئین فسفولیپاز C زتا استفاده شده بود، مشخص گردید میزان این پروتئین در سر هر اسپرم ممکن است بین fg ۵۰-۲۰ و یا fg ۵۰-۴۰ باشد. این داده‌ها نشان می‌دهد که غلظت پروتئین پروتئین فسفولیپاز C زتا موجود در یک اسپرم، همان غلظت مؤثر جهت فعال‌سازی تخمک به هنگام لقاح می‌باشد (۱۶، ۱۸). ۲- رسوب‌دهی پروتئین پروتئین فسفولیپاز C زتا از عصاره اسپرمی با استفاده از روش Immunoprecipitate. در این روش با استفاده از آنتی بادی علیه پروتئین فسفولیپاز C زتا، این پروتئین از عصاره اسپرم جدا می شود. در نتیجه آن، عصاره اسپرمی توانایی ایجاد نوسانات Ca^{2+} را در داخل سیتوپلاسم تخمک موش نخواهد داشت. ۳- حذف پروتئین فسفولیپاز C زتا از عصاره اسپرمی با استفاده از روش Immunodepletion منجر به عدم فعال شدن تخمک شده است (۱۶). ۴- کاهش میزان بیان پروتئین پروتئین فسفولیپاز C زتا در درون بیضه موش‌های کایمری با استفاده از تزریق RNA های کوتاه سنجاق سری (Short hairpin RNA) (۱۹). در این روش نیز نشان داده شد که این RNA های کوتاه سنجاق سری از طریق اتصال به mRNA های این پروتئین، مانع از ترجمه آن ها به پروتئین فسفولیپاز C زتا می شود؛ بنابراین میزان این پروتئین و متعاقب آن میزان آزاد سازی یون کلسیم و فعال سازی تخمک کاهش یافت.

پروتئین فسفولیپاز C زتا برای اولین بار در موش و سپس در میمون، انسان، خوک و رت شناسایی شد (۱۷). این پروتئین یکی از ایزوفرم‌های خانواده PLC است که از نظر اندازه در تمامی گونه‌های پستانداران تقریباً مشابه بوده و وزن مولکولی آن حدود kDa ۷۵-۷۰ می‌باشد (۲۱،۲۰). با توجه به بررسی ترادف ایزوفرم‌های موجود در خانواده PLC مشخص گردید که پروتئین فسفولیپاز C زتا بیشترین همولوژی را با ایزوفرم فسفولیپاز دلتا ۱ (PLCδ1) دارد (۴۷٪ مشابهت و ۳۳٪ همانندی) (۱۶). این پروتئین دارای ۲ دومین کاتالیتیکی X و Y است که در ساختار تمامی ایزوفرم‌های خانواده PLC مشاهده می‌گردد. بین ۲ دومین کاتالیتیکی X و Y یک بخشی به نام ناحیه اتصال دهنده X-Y وجود دارد. در انتهای N- ترمینال این پروتئین ۴ دومین به نام $EF_{(1-4)}$ hands و در انتهای C- ترمینال آن دومین C2 واقع شده است. یک اختلاف مهم بین پروتئین فسفولیپاز C زتا و فسفولیپاز دلتا ۱ عدم حضور دومین Pleckstrin homology= (PH) در پروتئین فسفولیپاز C زتا می‌باشد. به همین علت، پروتئین فسفولیپاز C زتا از نظر سایز، کوچکترین PLC شناخته شده در پستانداران است (۲۱،۲۰) (تصویر شماره ۲).

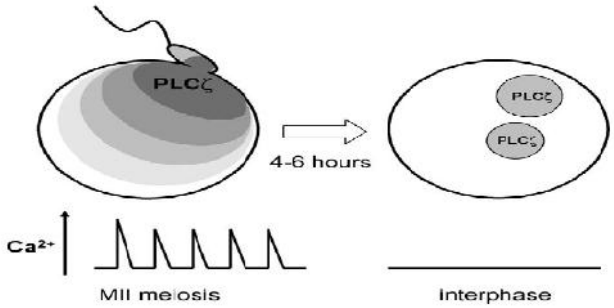


تصویر شماره ۲: شکل شماتیک از ساختار پروتئین فسفولیپاز C زتا و فسفولیپاز دلتا (۲۱)

دومین‌های کاتالیتیکی X و Y سوبسترای اینوزیتول ۴ و ۵ دی فسفات غشایی را تجزیه نموده و آن را به اینوزیتول ۱، ۴ و ۵ تری فسفات و دی آسیل گلیسرول تبدیل می‌کنند. زیر واحدهای سازنده این جایگاه‌های فعال در میان گونه‌های پستانداران به شدت حفاظت شده‌اند و اگر جایگزینی در این نقاط ایجاد شده باشد به صورت حفاظت شده می‌باشد. از نظر ترادف، دومین‌های کاتالیتیکی X و Y همولوژی نزدیکی با بخش متناظر در پروتئین فسفولیپاز دلتا ۱ دارند (۱۶).

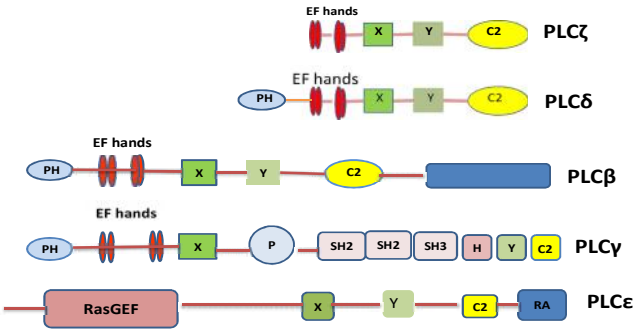
ناحیه اتصال دهنده X-Y (X-Y linker region) دارای دو نقش اصلی در فعالیت پروتئین فسفولیپاز C زتا می‌باشد: ۱- جابه‌جایی به درون پیش هسته‌ها (در زمان اینترفاز چرخه سلولی) (۲۴-۲۲). ۲- اتصال پروتئین فسفولیپاز C زتا به سوبسترای موجود در غشای تخمک (۲۵).

زمان آغاز نوسانات Ca^{2+} اولیه در گونه‌های مختلف پستانداران متفاوت می‌باشد (۲۶، ۲۷). در یک مطالعه نوسانات Ca^{2+} حاصل از ریز تزریق cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا انسانی به داخل تخمک موش توسط رنگ Fura-2 اندازه‌گیری شد (۱۶) و نشان داد که نوسانات Ca^{2+} در سیتوپلاسم تخمک تا ساعاتی بعد از لقاح همچنان ادامه دارد تا زمانی که اندازه‌گیری نوسانات Ca^{2+} با استفاده از رنگ Fura-2 به یک سطح ثابتی برسد و این نشان دهنده توقف در نوسانات کلسیمی بود. بررسی‌ها نشان داده است که این زمان توقف نوسانات Ca^{2+} چند ساعت بعد از لقاح، همزمان با آغاز زمان تشکیل پیش هسته‌های نر و ماده است (۲۴). بررسی ترادف ناحیه اتصال دهنده مشخص کرد که غنی از اسیدهای آمینه بازی با بار مثبت می‌باشد که احتمالاً به دلیل بار منفی موجود در پیش هسته‌ها، پروتئین فسفولیپاز C زتا به درون آنها کشیده می‌شود (تصویر شماره ۳) (۲۲). در یک مطالعه جهت تأیید این مسئله، یک cRNA پروتئین نوترکیب فسفولیپاز C زتا را که در بخش C- ترمینال خود دارای یک پروتئین فلورسنت به نام ونوس (Venus) بود، تولید کردند. پروتئین ونوس یک مولکول زیستی فلورسنت است که پس از اتصال آن با پروتئین فسفولیپاز C زتا از طریق ردیابی نور فلورسنت حاصل از آن می‌توان پروتئین مورد نظر را ردیابی نمود؛ بنابراین با بررسی شدت نور فلورسنت پس از تزریق این پروتئین نوترکیب، مشاهده نمودند که حدود ۶ ساعت بعد از لقاح، حداکثر نور فلورسنت در درون پیش هسته مشاهده می‌گردد. این مسئله نشان دهنده این موضوع بود که پروتئین فسفولیپاز C زتا پس از فعال‌سازی تخمک، با توجه به بار منفی خود در ناحیه اتصال دهنده وارد پیش هسته‌ها می‌شود. به همین علت، به توالی ناحیه اتصال دهنده، ترادف جایگیری درون هسته‌ای (Nuclear localization sequence= NLS) نیز گفته می‌شود (۲۲).



تصویر شماره ۳: شکل شماتیک جایگیری درون هسته‌ای پروتئین فسفولیپاز C زتا موش بعد از لقاح اسپرم با تخمک

این پروتئین بعد از رهاسازی از سر اسپرم و ورود به داخل سیتوپلاسم تخمک شروع به آزاد سازی Ca^{2+} می‌کند. و حدود ۶-۴ ساعت بعد، با شکل‌گیری پیش هسته‌های نر و ماده که همان زمان اینترفاز می‌باشد در درون این پیش هسته‌ها تجمع می‌یابد (۲۸). ۴ ایزوفرم شناخته شده از خانواده PLC (اپسیلون، دلتا، گاما و بتا) از طریق مکانیسم‌های متفاوتی با غشای پلاسمایی واکنش می‌دهند (۲۱، ۲۹) (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: شکل شماتیک از ساختار ۵ ایزوفرم مختلف خانواده فسفو لیپاز C (۱۶)

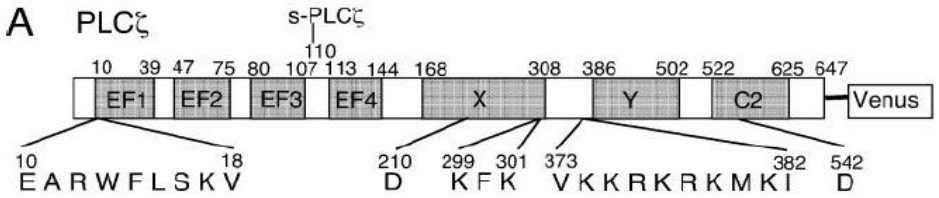
PLC های بتا، گاما و اپسیلون به پروتئین‌های ویژه موجود در غشا متصل می‌شوند. در حالی که فسفولیپاز دلتا ۱ از طریق دومین PH خود با تمایل بالایی به لیپید InsP2 متصل می‌گردد (۲۵).

با توجه به همولوژی پروتئین فسفولیپاز C زتا با فسفولیپاز دلتا ۱، این سوال مطرح می شود که چگونه پروتئین فسفولیپاز C زتا سوبسترای خود را در غشاء شناسایی می‌کند؟

بررسی ترادف پروتئین‌های فسفولیپاز C زتا و فسفولیپاز دلتا ۱ نشان داد که ظاهراً یکسری تفاوت‌هایی در ناحیه اتصال دهنده دومین‌های کاتالیتیکی X-Y (X-Y linker region) وجود دارد. در پروتئین‌های فسفولیپاز C زتا این ناحیه حاوی خوشه‌ای از اسیدهای آمینه بازی با بار مثبت است که در ناحیه همولوگ آن در پروتئین فسفولیپاز دلتا ۱ دیده نمی‌شود (۳۱،۳۰). در ناحیه اتصال دهنده پروتئین فسفولیپاز C زتا موش ۷ اسیدآمینه بازی وجود دارد که در کل، بار الکتریکی این ناحیه ۷+ می‌باشد. این در حالی است که در پروتئین فسفولیپاز دلتا ۱ بار الکتریکی این ناحیه ۱+ است. احتمالاً بار

الکتریکی مثبت حاصل از اسیدهای آمینه بازی در ناحیه اتصال دهنده، به پروتئین فسفولیپاز C زتا کمک می‌کند تا همانند پروتئین‌های لنگری (Anchor protein) از قبیل Src و k-Ras 4B از طریق واکنش الکتروستاتیکی به لیپیدهای اسیدی موجود در غشا (Inositol 4,5 diphosphate= Ins2p)، متصل گردند (۲۵).

در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که هر گونه حذف در ساختار دومین‌های EF hands سبب کاهش در فعالیت پروتئین فسفولیپاز C زتا می‌گردد. از این رو پیشنهاد می‌شود که دومین‌های EF hands دارای یک نقش ساختاری مهم در حفظ فعالیت پروتئین فسفولیپاز C زتا هستند (۳۲). در یک مطالعه با بررسی جهش‌زایی در پروتئین فسفولیپاز C زتا مشخص گردید که در ناحیه N- ترمینال دومین EF1 hand، ترادف اسیدآمینه ۱۸-۱۰، همانند ترادف ۳۰۱-۲۱۰ موجود در بخش C- ترمینال دومین کاتالیتیکی X، جایگاه تنظیمی انتقال به درون پیش هسته که توسط NLS انجام می شود، وجود دارد (تصویر شماره ۵)؛ بنابراین هر گونه حذف و یا جهش در این دو بخش، انتهای C- ترمینال دومین کاتالیتیکی X و ناحیه N- ترمینال دومین EF1 hand، علاوه بر عدم ایجاد نوسانات Ca^{2+}، سبب عدم انتقال به درون پیش هسته‌ها نیز می‌گردد. این نواحی جزء ناحیه NLS محسوب نمی‌شود، اما احتمالاً برای شکل‌گیری مناسب جهت جابه‌جایی هسته‌ای لازم می‌باشند (۲۲). ۴ دومین $EF_{(1-4)}$ hands به صورت ۲ جفت در قسمت N- ترمینال پروتئین PLCζ وجود دارند. در جفت اول دومین EF hands هر گونه جهش در زیر واحدهایی که جایگاه اتصال به یون Ca^{2+} را تشکیل می‌دهند، سبب کاهش اتصال یون Ca^{2+} به پروتئین فسفولیپاز C زتا می‌شود. همانند سایر ایزوفرم‌های خانواده PLC، پروتئین فسفولیپاز C زتا جهت آغاز فعالیت خود به یون Ca^{2+} احتیاج دارد (۳۲).



تصویر شماره ۵: شکل شماتیک از پروتئین فسفولیپاز C زتا نوترکیب موش به همراه پروتئین ونوس و دومین‌های تشکیل دهنده و ترادف اسیدآمینه ۱۸-۱۰ موجود در ناحیه N- ترمینال دومین EF1 hand و ترادف ۳۰۱-۲۱۰ موجود در بخش C- ترمینال دومین کاتالیتیکی X (۲۲)

در دومین C2 نیز جایگاه اتصال به یون Ca^{2+} وجود دارد که برای فعالیت آنزیمی پروتئین فسفولیپاز C زتا مورد نیاز است. هنگامی که دومین C2 از پروتئین فسفولیپاز C زتا حذف گردد و cRNA کد کننده آن به درون تخمک موش تزریق گردد هیچ‌گونه نوسانات Ca^{+2} حاصل نمی‌شود. این یافته پیشنهاد می‌کند که دومین C2 نقش مهمی در عملکرد پروتئین فسفولیپاز C زتا دارد، اما چگونگی عملکرد این دومین در پروتئین فسفولیپاز C زتا هنوز به خوبی مشخص نشده است (۳۲).

ژن کد کننده پروتئین فسفولیپاز C زتا در انسان بر روی کروموزوم ۱۲ جایگاه p.۱۲,۳ ۱۲ قرار دارد. این ژن دارای ۱۵ اگزون است و رونوشت این ژن حاوی ۲۰۷۵ نوکلئوتید می‌باشد و پروتئین بیانی آن ۶۰۸ اسید آمینه دارد (۱۷).

به منظور بررسی تغییرات پس از ترجمه‌ای (Post-translational modification) پروتئین فسفولیپاز C زتا، آزمایشی به شرح زیر ترتیب داده شد: با استفاده از روش Sonication/Freeze-Thawing اسپرم خوک،

دو بخش اسپرمی (Sperm fractions= SF) شامل: بخش سیتوزولیک (SF^C) و بخش محلول با PH بالا (SFPH) را تهیه نمودند. در مرحله بعدی هر کدام از این بخش‌های اسپرمی را به درون تخمک موش تزریق کرده و نوسانات Ca^{2+} حاصله را ثبت نمودند. مشاهده شد که هر دوی این بخش‌های اسپرمی(SF^C و SF^{PH}) توانایی راه اندازی نوسانات Ca^{2+} و فعال‌سازی تخمک موش را داشتند. شواهد نشان داد که فعالیت پروتئین PLCζ در شرایط آزمایشگاهی در SF^C و SF^{PH} مشابه با پروتئین فسفولیپاز C زتا در شرایط درونی بدن (In vivo) می‌باشد. در مطالعات immonudepletion هر کدام از SF ها نشان داد که پروتئین فسفولیپاز C زتا با طول کامل و وزن مولکولی ۷۲ kDa فقط در بخش SF^C مشاهده می‌شود (۳۳).

سوالی که مطرح می شود، این است که چگونه SF^{PH} بعد از تزریق به درون تخمک موش سبب ایجاد نوسانات کلسیمی می شود؟

دو احتمال را می‌توان در نظر گرفت: ۱- یک ایزوفرم PLC ناشناخته دیگر اسپرمی به جز پروتئین فسفولیپاز C زتا، در بخش SF^{PH} سبب ایجاد نوسانات Ca^{+2} می‌شود. ۲- پروتئین فسفولیپاز C زتا تحت برخی از تغییرات پس از ترجمه‌ای از جمله برش پروتئولیتیکی (Proteolytic cleavage) قرار می گیرد و به همین علت در بررسی ایمونولوژیکی شناسایی نمی‌شود. این در حالی است که بعد از برش پروتئولیتیکی، پروتئین فسفولیپاز C زتا همچنان فعالیت آنزیمی خود را حفظ می‌نماید (۳۳).

بخش‌های SF^C و SF^{PH} هر دو به ترتیب شامل بخش‌های C- ترمینال و N- ترمینال پروتئین فسفولیپاز C زتا هستند که با یکدیگر مجموعه‌های عملکردی را تشکیل می‌دهند. به طوری که حذف این قطعات سبب از بین رفتن فعالیت ایجاد نوسانات Ca^{2+} می‌شود. پروتئین فسفولیپاز C زتا با طول کامل در اسپرم تازه و بخش SF^C مشاهده می‌شود، اما در بخش SF^{PH} وجود ندارد. علی‌رغم حضور پروتئین فسفولیپاز C زتا با طول کامل، این بخش اسپرمی حاوی محصولات کوتاه تر است. این محصولات شامل یک قطعه ۲۷ kDa است که احتمال دارد نماینده بخشC- ترمینال بوده و یک قطعه ۳۷ kDa یا ۳۳ kDa که گمان می‌رود نماینده بخش N- ترمینال پروتئین فسفولیپاز C زتا باشد (۳۳).

با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که این قطعات حاصل برش پروتئولیتیکی یک پروتئاز در ناحیه اتصال دهنده دومین‌های کاتالیتیکی X-Y می‌باشند. در حقیقت هر دوی این قطعات C- ترمینال و N- ترمینال به صورت کمپلکس‌های پایدار در هر دو بخش اسپرمی وجود دارند (۳۳).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ناحیه اتصال دهنده دومین‌های کاتالیتیکی X-Y یا همان NLS در پروتئین فسفولیپاز C زتا مستعد پروتئولیز می‌باشد (۳۷-۳۴). این یافته به همراه سایز قطعات N- ترمینال و C- ترمینال موجود در بخش‌های اسپرمی این تصور را ایجاد می کند که ناحیه NLS جایگاه برش باشد. در مطالعه‌ای که توسط Kurokawa و همکارانش انجام شد، قطعات C و N- ترمینال با طول‌های متفاوت که در مجموع پروتئین فسفولیپاز C زتا با طول کامل را بازسازی می کردند و در نقاط دیگری برش خورده بودند به صورت آزمایشگاهی سنتز شدند (۳۳). بررسی‌ها نشان داد که بیان همزمان cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا که شامل قطعات (۳۶۱-۱) و (۶۴۷-۳۶۲) می‌باشد در درون تخمک موشی سبب راه اندازی نوسانات Ca^{2+} می‌شود. این دو قطعه در اثر برش پروتئولیتیکی به دست آمده بودند.

مدارک اخیر مبنی بر این است که قطعات پروتئین فسفولیپاز C زتا در اسپرم و SF ها دارای فعالیت افزایش سطح کلسیم داخل سلولی کلسیمی هستند، شواهدی هستند که نشان می‌دهند برش پروتئولیتیکی خود به خودی (Spontaneous proteolysis) پروتئین فسفولیپاز C زتا ممکن است دارای نقش فیزیولوژیکی در عملکرد سلول باشد. همچنین در این مطالعه یافت شد که دو قطعه حاصل از برش در ارتباط با یکدیگر باقی مانده و یک هترودایمر عملکردی را تشکیل می‌دهند

که در مقایسه با پروتئین فسفولیپاز C زتا برش نیافته (Holoenzyme) عملکرد بیشتری دارند (۳۳).

فرضیاتی که در این مطالعه پیشنهاد شده‌اند عبارتند از: ۱- برش در ناحیه اتصال دهنده سبب ایجاد تغییر شکل در شکل سه بعدی در دومین‌های کاتالیتیکی X و Y می‌شود که موجب تسهیل در بر هم کنش با سوبسترای لیپیدی و هیدرولیز آن می‌شود. ۲- ممکن است با حذف بخشی از ناحیه اتصال دهنده، دسترسی InsP2 به جایگاه کاتالیتیکی تسهیل یابد (۳۸).

با توجه به این موضوع که در برخی از ناباروری ها با علت مردانه، روش ICSI کار آمد است، اما هنوز در ۵-۱٪ از کل ICSI ها عدم موفقیت مشاهده می شود. شکست در فعال سازی تخمک به صورت یک علت غالب عدم موفقیت در این روش، ممکن است مرتبط با فاکتورهای مربوط به تخمک از جمله کامل نشدن بلوغ تخمک و یا نقص در پروتئین فسفولیپاز C زتا اسپرم آن باشد (۳۹). به منظور مشخص نمودن نقش پروتئین فسفولسپاز C زتا در ناباروری مردان، در درجه اول بررسی بیان مکانی این پروتئین مهم در نمونه های اسپرم انسان لازم به نظر می رسد (۴۰). Grasa و همکارانش در همین راستا با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی، مکان جایگیری پروتئین فسفولسپاز C زتا را در سر اسپرم انسان مشخص کردند و نشان دادند که جمعیت های جداگانه از این پروتئین در مناطق آکروزومی، خلف آکروزوم و استوایی وجود دارد. از طرفی مشخص شده است که الگوی قرارگیری این پروتئین در افراد بارور بین اهداکننده ها و انزال های مختلف یک فرد نیز متغیر است. در نتیجه این جمعیت های مختلف از پروتئین فسفولسپاز C زتا ممکن است، مسئول نقش عملکردی جداگانه که تنها محدود به فعال نمودن تخمک نیست، باشند (۷).

Yoon و همکارانش اولین ارتباط کلینیکی بین این پروتئین فسفولیپاز **C** زتا و ناباروری مردان را گزارش نموده اند که مرتبط با کاهش سطح یا به طور کل نبود، آن یا الگوهای نادرست جایگیری این پروتئین بود. در این مطالعه اسپرم افرادی را که چندین بار شکست مکرر فعال سازی تخمک در روش ICSI داشته اند به تخمک موش تزریق نموده و سپس نوسانات کلسیم حاصل را ثبت نمودند. مشاهده شد که چنین اسپرم هایی قادر به ایجاد آزاد سازی کلسیم نیستند، اما در صورت تزریق همزمان mRNA این پروتئین به داخل تخمک موش موجب فعال سازی آن می شوند. در نتیجه نشان داده شد که علت ناباروری آن ها به نقص در پروتئین فسفولیپاز **C** زتا مربوط است. این مطالعه اولین شواهد استفاده از این پروتئین به عنوان یک هدف درمانی جدید برای درمان بالینی تخمک دچار نقص در فعال سازی (Oocyte activation deficient= OAD) را ارائه داد (۳۹).

در مطالعه‌ای که توسط Heytens و همکارانش در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، در DNA ژنومیک، ترادف اگزون و اینترون ژن کد کننده پروتئین فسفولیپاز C زتا مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی از بزاق مردان بارور و نابارور تهیه شد و محصولات PCR برای هر اگزون ژن کد کننده پروتئین فسفولیپاز C زتا تعیین توالی شد. به منظور ساده نمودن آنالیزها، این مطالعه بر پایه شناسایی تغییرات در قالب بازخوانی (Open reading frame= ORF) انجام شد (۷). این مطالعه اولین ارتباط ژنتیکی بین این پروتئین و عامل ناباروری مردان را از طریق حضور یک ایزوفرم جهش یافته از پروتئین فسفولیپاز C زتا در اسپرم یک مرد نابارور بدون گلوبوزواسپرمیا را نشان داد (۸).

در فرد نابارور بدون گلوبوزواسپرمیا، یک تغییر بازی موثر در ترادف ORF، DNA آن شناسایی شد. در این تغییر، اسید آمینه هیستیدین (H) در موقعیت ۳۹۸ که در دومین کاتالیتیکی Y (از اسیدآمینه ۴۶۵-۳۴۸) قرارگرفته با پرولین (P) جایگزین شده بود. اسیدآمینه H ۳۹۸، یک اسیدآمینه کاملاً حفاظت شده در تمامی گونه‌های پستانداران می‌باشد. مدل سازی کامپیوتری نشان داد که این جهش (PLCzH398P) در داخل شکاف دومین کاتالیتیکی Y رخ داده است که ساختار دوم آن را مختل و منجر به عملکرد غیر طبیعی و در

نتیجه ناباروری این فرد شده است (۸). در مطالعه‌ای که توسط kashiar و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام شده است، یک جهش نقطه‌ای دیگر در همان بیمار که دارای جهش در H398P بود شناسایی شد. این جهش نیز در ترادف ORF است که در آن جایگزینی هیستیدین با لوسین در دومین کاتالیتیکی X پروتئین فسفولیپاز C زتا در جایگاه ۲۳۳ (H233P) صورت گرفته است (۴۰). ریز تزریق cRNA PLCζH233L به داخل سیتوپلاسم تخمک موش سبب ایجاد رهاسازی غیرطبیعی کلسیم شد و مشابه PLCζH398P شکست در فعال‌سازی تخمک را نشان داد. در این مطالعه اعلام شد که هر دو جهش PLCζH398P و PLCζH233L به صورت هتروزیگوت بوده و از ریشه‌های مختلف والدینی منشاء می‌گیرند، به گونه‌ای که پروتئین فسفولیپاز C زتا H398P منشاء پدری و پروتئین فسفولیپاز C زتا H233L منشاء مادری دارد (۴۱). Kashiar و همکارانش این فرضیه را اعلام کردند که این جهش های اتوزومی در پروتئین فسفولسپاز C زتا فقط به صورت مغلوب که به هر دو الل والدینی نیازمند است موجب ایجاد نازایی کامل می‌گردد. در این مطالعه همچنین اظهار شد که به دلیل هتروزیگوت بودن، این جهش‌ها می‌تواند منجر به sub-fertility نیز گردد (۴۰).

Pan و همکارانش به بررسی مکانیسم های مولکولی بالقوه دخیل در تنظیم بیان ژن پروتئین فسفولیپاز C زتا پرداخته اند و دو واریانت ژنتیکی در منطقه اصلی پروموتر پروتئین فسفولیپاز C زتا در گاوهای نر هلشتاین چینی شناسایی کرده اند (۴۱).

واریانت ها در جایگاه اتصال فاکتور رونویسی به پروموتر است (-۴۵۶G>A and +65T>C) و گزارش شد که زمینه ساز ایجاد تغییر در صفات کیفی مایع منی است (۴۱).

غربالگری ژنتیکی نمونه های مایع منی انسان برای یافتن جهش در پروتئین فسفولیپاز C زتا هنوز در مراحل اولیه آن باقی مانده است و نیاز مبرم به وجود تعداد نمونه های مورد بررسی بیشتری است. روش های موجود به طور انحصاری به بررسی مناطق اگزونی ژن پروتئین فسفولیپاز C زتا متمرکز شده اند. در مطالعات آینده بهتر است به دنبال بررسی جهش در سایر مناطق، از جمله پروموتر که نقش در تنظیم بیان دارند و اینترون باشد (۴۱).

پروتئین فسفولیپاز C زتا به عنوان یک بیومارکر تشخیصی (Diagnostic) و یا درمانی (Therapeutic) در باروری مردان: آنالیز مایع منی بر اساس غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم جهت تشخیص ناباروری مردان بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) معرفی شده برای پارامترهای طبیعی اسپرم، مدت زمان بسیاری است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۲). از طرفی تعداد قابل توجهی از بیماران که اسپرم آن‌ها دارای پارامترهای طبیعی است با شکست در حاملگی مواجه می شوند (۴۳). این رخداد منعکس کننده یک سری وقایع پیچیده درگیر در عملکرد اسپرم است که نشان می‌دهد آنالیز مایع منی بر اساس غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم یک پارامتر دقیق در پیش گویی پتانسیل لقاح اسپرم نمی‌باشد.

در حال حاضر پیشرفت‌های چشمگیری در تست های تکمیلی آنالیز مایع منی، از جمله بررسی میزان آسیب DNA و نقص در جایگزینی پروتامین با هیستون جهت مقایسه اسپرم افراد نابارور با افراد بارور وجود دارد (۴۵،۴۴). از آنجایی که مشخص شده است پروتئین فسفولیپاز C زتا نقش اساسی در فعال شدن تخمک پستانداران دارد و هرگونه اختلال ژنتیکی، مولکولی و بیوشیمیایی این آنزیم کلیدی، به شدت با ناباروری انسان در ارتباط است و موجب عدم فعال‌سازی تخمک می‌گردد (۴۶)، در مطالعه انجام شده توسط گروه ما در سال ۲۰۱۱ مشخص گردید که میزان بیان mRNA این پروتئین در افرادی که قبلاً دچار شکست در لقاح در طی فرآیند ICSI بوده‌اند، در مقایسه با افراد بارور کمتر است، هرچند که عملکرد دقیق این ذخیره mRNA تاکنون مشخص نشده است. در این مطالعه نشان داده شد که میزان بیان این پروتئین در مردان گلوبوزواسپرمیا و افرادی که دارای میزان لقاح

پایین اند یا دچار عدم لقاح‌اند در مقایسه با مردان بارور به طور معنی داری کمتر است. علاوه بر این، یک اختلاف معنی داری بین گروه‌های نابارور گلوبوزواسپرمیا و افرادی که دارای میزان لقاح پایین اند یا دچار عدم لقاح‌اند با افرادی که دارای میزان لقاح بالایی هستند، مشاهده شد. از طرفی نشان داده شد که ارتباطی بین میزان بیان پروتئین فسفولیپاز C زتا با بلوغ کروماتین اسپرم یا فعالیت آنزیم آکروزین وجود ندارد. هرچند که یک ارتباط معنی داری بین درصد میزان لقاح و بیان نسبی پروتئین فسفولیپاز C زتا وجود داشت. بنابراین بررسی کمی میزان بیان پروتئین PLC اسپرم، بعنوان یک مارکر زیستی می تواند میزان فعال سازی تخمک افراد نابارور را قبل از آنکه وارد سیکل درمانی گردند، پیشگویی کند (۴۷).

همانطور که می دانیم در چندین سال پیش استفاده از (Mouse Oocyte Activation Test= MOAT) به جای بررسی کمی میزان بیان این پروتئین، جهت ارزیابی توانایی فعال‌سازی تخمک توسط اسپرم انسانی مورد استفاده قرار می گرفت. در این روش اسپرم انسان به داخل سیتوپلاسم تخمک موش ریز تزریق می گردید. از آنجائی که پتانسیل فعالیت پروتئین فسفولیپاز C زتا انسانی نسبت به موشی بیشتر است و تخمک گونه‌های مختلف دارای حداکثر قدرت فعال‌سازی اسپرم همان گونه می‌باشد، به نظر می‌رسد که استفاده از این روش تنها در مواقعی که اسپرم انسان کاملاً فاقد پروتئین باشد موثر واقع شود. از طرف دیگر استفاده از آزمون MOAT نیازمند امکانات حیوانی و مهارت‌های ویژه است که ممکن است به شکل روتین استفاده از آن در بیشتر مراکز (Assisted Reproductive Technology= ART) امکان‌پذیر نباشد و بیشتر در مراکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار بگیرد (۴۷). در مطالعه انجام شده توسط Yoon و همکارانش مشخص گردید که ریز تزریق پروتئین نوترکیب فسفولیپاز C زتا انسان به جای استفاده از مواد شیمیایی می تواند یک راه حل بیولوژیکی جهت فعال سازی مصنوعی تخمک باشد. در این مطالعه برای اولین بار پروتئین فسفولیپاز C زتا نوترکیب انسان که در رده سلول های باکتریایی بیان شده بودند خالص سازی شد و فعالیت ایجاد نوسانات Ca^{2+} توسط آن در تخمک‌های موش و انسان مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که در یک روش وابسته به دوز، ریز تزریق آن موجب ایجاد نوسانات کلسیمی کاملاً شبیه به آنچه که اسپرم در هنگام لقاح در هر دو گونه ایجاد می‌کرد، می‌شد هرچند که تکوین جنین در موش کمتر بود (۴۸).

با توجه به مطالعه انجام شده توسط Grasa و همکارانش مشخص گردید که الگوی قرارگیری پروتئین فسفولیپاز C زتا در سر اسپرم افراد نابارور با افراد بارور متفاوت است و اسپرم این دسته از افراد نابارور شکست در لقاح را پس از ICSI نشان دادند (۷)؛ بنابراین احتمالاً بین الگوی قرارگیری غیر طبیعی پروتئین فسفولیپاز C زتا در سر اسپرم و عدم فعال‌سازی تخمک و ناباروری اسپرم رابطه وجود دارد. در نتیجه پیشنهاد شده است که بررسی جایگاه قرارگیری پروتئین فسفولیپاز C زتا و میزان بیان آن احتمالاً می‌تواند یک شاخصی برای ارزیابی میزان فعال‌سازی تخمک برای بیماران کاندید ICSI باشد (۴۶).

با توجه به اینکه با به‌کارگیری روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک می‌توان بر شکست در لقاح پس از ICSI غلبه نمود، اما هنوز نگرانی‌هایی در زمینه استفاده از این مواد شیمیایی وجود دارد (۴۹). Hytens و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از مدل موشی Wobbler که سلول‌های اسپرم آن‌ها از نظر مورفولوژی بسیار شبیه سلول‌های اسپرم سر گرد در افراد نابارور گلوبوزواسپرمیا است، ظرفیت لقاح اسپرم و کارایی (Assisted Oocyte Activation= AOA) را با استفاده از یونومایسین در بازگشت باروری و تکامل جنین مورد را مطالعه قرار دادند. در این مطالعه حضور پروتئین فسفولیپاز C زتا با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهده شد که در اسپرم این مدل موشی اختلال در جایگاه قرارگیری پروتئین فسفولیپاز C زتا وجود دارد، ولی در بیان پروتئین فسفولیپاز C زتا مشکلی وجود ندارد؛ هرچند

که پتانسیل لقاح کاهش یافته‌ای را نشان می‌دادند. این گروه پیشنهاد نمودند که از مدل موشی Wobbler می توان به عنوان یک مدل جهت ارزیابی میزان شکست در لقاح پس از ICSI برای ارزیابی پویایی پروتئین فسفولیپاز C زتا و کمک به بهینه سازی روش‌های AOA استفاده نمود (۵۰).

در مطالعه انجام شده توسط Kashira و همکارانش مشخص گردید که انجماد، یکی از تکنیک‌های رایج در حفظ قدرت باروری اسپرم است که سبب کاهش چشمگیری در میزان پروتئین فسفولیپاز C زتا در مقایسه با اسپرم تازه می‌شود. از طرف دیگر بیان نمودند که در هنگام استفاده از روش شستشوی گرادیان غلظت (Density Gradient Concentration= DGC) جمعیت اسپرم‌های به دست آمده با توجه به روش ایمونوفلورسنت دارای میزان فسفولیپاز C زتا بالایی هستند که با موفقیت در فعال سازی اسپرم در ارتباط خواهد بود (۲۸)؛ بنابراین این پروتئین را می‌توان به عنوان یک بیومارکر پیش گویی و یا تشخیصی توانایی فعال‌سازی تخمک در نمونه‌های اسپرمی در نظر گرفت.

بحث:

آنالیز مایع منی بر اساس غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم در تشخیص ناباروری مردان به تنهایی جهت استفاده از تکنیک‌های ART برای درمان بیماران نابارور با علت مردانه، کافی نمی‌باشد. از طرفی مشخص شده است که پروتئین فسفولیپاز C زتا نقش اساسی را در فرآیند فعال سازی تخمک دارد و هر گونه اختلال ژنتیکی، مولکولی یا بیوشیمیایی این پروتئین به شدت با عدم فعال‌سازی تخمک و ناباروری انسان در ارتباط است. با توجه به آن که یکی از روش های مورد استفاده جهت

فعال سازی تخمک، استفاده از مواد شیمیایی است، نگرانی قابل توجهی از آثار زیان آور بالقوه این مواد شیمیایی بر روی تکوین جنین وجود دارد؛ از جمله یونوفورهای کلسیم که اثر سمی و جهش زا زیادی بر روی تخمک و جنین ها دارد؛ همچنین استفاده از این یونوفورهای کلسیم سبب ایجاد یک نوسان کلسیمی گذرا در مقایسه با الگوی نوسانات طبیعی می گردد، این در حالی است که الگوی نوسانات کلسیم نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن و هماهنگی حوادث فعال سازی تخمک و تکوین موفق جنین را داراست؛ بنابراین استفاده از پروتئین فسفولیپاز C زتا به عنوان یک عامل اندوژن برای فعال سازی تخمک بسیار ایمن تر می باشد. هنگامی که cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا به تخمک تزریق می شود، نوسانات کلسیمی ناشی از آن منجر به تشکیل موفق بلاستوسیست می گردد. با این حال، استفاده از cRNA پروتئین فسفولیپاز C زتا به دو دلیل بالینی توصیه نمی شود. اولاً، فعالیت رونویسی غیر قابل کنترل آن پس از تزریق به داخل تخمک، به احتمال زیاد برای جنین در حال تکامل بسیار مضر خواهد بود. دوماً، به طور بالقوه ممکن است فعالیت ترانس کریپتاز معکوس اندوژن، عمل رونویسی cRNA اگزوژن به cDNA را انجام دهد و در این صورت cDNA با ژنوم جنینی ترکیب گردد. توجه جهانی برای جایگزین کردن عاملی ایمن تر و اندوژن تر، جهت درمان بیماران نابارور مبتلا به کمبود این پروتئین وجود دارد که نیازمند ساخت پروتئین نوترکیب انسانی فسفولیپاز C زتا (hrPLCz) فعال و خالص است. با این حال، نشان داده شده که استخراج و خالص سازی پروتئین نوترکیب فسفولیپاز C زتا انسان بسیار مشکل است.

اولین پروتئین نوترکیب فسفولیپاز C زتا خالص شده توسط Yoon و همکارانش گزارش شد که در رده سلول های باکتریایی بیان شدند. با این حال، پس از ریز تزریق این پروتئین به تخمک موش که سبب ایجاد آزاد سازی کلسیم در آن می شود، نگرانی قابل توجه ای به هنگام ریز تزریق این پروتئین به داخل تخمک انسان در ایجاد الگوی نوسانات غیر طبیعی وجود دارد. در همین راستا، محققین غلظت های بالایی از این پروتئین را به داخل تخمک تزریق کرده اند که از نقطه نظر بالینی نگرانی زیادی را ایجاد می کند (۴۸).

اخیراً، Nomikos و همکاران (۲۰۱۳) پروتئین نوترکیب فسفولیپاز C زتا انسانی فعال و خالص را از طریق یک رده سلول باکتری با استفاده از پروتئین فیوژن A-NUS تولید نمودند که آزاد سازی کلسیم حاصل از آن مشابه با آن چیزی بود که در لقاح طبیعی مشاهده می شد (۵۱). با تمامی این مشاهدات، این پروتئین یک فاکتور برجسته در لقاح است و یک روش جدید در اندازه گیری این پروتئین در اسپرم انسان جهت تشخیص نقص در پروتئین فسفولیپاز C زتا مورد نیاز است؛ بنابراین ممکن است که بررسی کمی میزان بیان پروتئین PLC اسپرم، بعنوان یک مارکر زیستی بتواند میزان فعال سازی تخمک افراد نابارور را قبل از آنکه وارد سیکل درمانی گردند، پیشگویی کند.

نتیجه گیری:

آنالیز مایع منی بر اساس غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم در تشخیص ناباروری مردان به تنهایی جهت استفاده از تکنیک‌های ART برای درمان بیماران نابارور با علت مردانه، کافی نمی‌باشد. فاکتور فسفولیپاز C زتا می تواند در تکنیک های ART به عنوان یک عامل درمانی جدید در تخمک های دچار نقص در فعال سازی یا به عنوان یک بیومارکر پیشگویی کننده یا تشخیصی در توانایی فعال سازی تخمک نمونه ها، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می گردد.

منابع:

1. Swann K. Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. Rev Reprod. 1996; 1(1): 33-9.
2. Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. Dev Biol. 1999; 211(2): 157-76.
3. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1993; 8(7): 1061-6.
4. Katan M. Families of phosphorinositide - specifc phospholipase C: structure and function. Biochim Biophys Acta. 1998; 1436(1-2): 5-17.
5. Rebecchi MJ, Pentyala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specifc phospholipase C. Physiol Rev. 2000; 80(4): 1291-335.
6. Swann K, Homa S, Carroll J. An inside job: the results of injecting whole sperm into eggs supports one view of signal transduction at fertilization. Hum Reprod.1994; 9(6): 978-80.
7. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. Hum Reprod. 2008; 23(11): 2513-22.
8. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCz) in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod. 2009; 24(10): 2417-28.
9. Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg activation at fertilization: where it all begins. Dev Biol. 2002; 245(2): 237-54.
10. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. A soluble sperm protein that triggers calcium oscillations in mammalian oocytes. Nature. 1996; 379 (6563): 364-8.
11. Wolosker H, Kline D, Bain Y, Blackshaw S, Cameron AS, Frahlich TJ, et al. Molecularly cloned mammalian glucosamine 6 phosphate deaminase localizes to the transporting epithelium and lacks oscillin activity. Fed Amer Soci Exp Bio. 1998; 12(1): 91-9.
12. Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R. Partheno-genetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. Development. 1997; 124(11): 2267-74.

13. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCζ (zeta): A sperm protein that triggers Ca oscillations and egg activation in mammals. Sem Cell Dev Biol. 2006; 17(2): 264-73.
14. Wu H, Smyth J, Luzzi V, Fukami K, Takenawa T, Black SL, et al. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. Biol Reprod. 2001; 64(5): 1338-49.
15. Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca^{2+} release in eggs. Reprod. 2002; 123(1): 31-9.
16. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. Development. 2002; 129(15): 3533-44.
17. Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. Reprod. 2002; 124(5): 611-23.
18. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, et al. Mammalian phospholipase Cz induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. Dev Biol. 2004; 274(2): 370-83.
19. Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering Ca^{2+} oscillations during fertilization. Biol Reprod. 2005; 72(4): 992-6.
20. Rebecchi MJ, Pentyala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specifc phospholipase C. Physiol Rev. 2000; 80(4): 1291-335.
21. Szumiło M, Rahden-Staroń I. Phosphoinositide-specific phospholipase C in mammalian cells: structure, properties, and function. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2008; 62:47-54.
22. Kuroda K, Ito M, Shikano T, Awaji T, Yoda A, Takeuchi H, et al. The role of X/Y linker region and N-terminal EF-hand domain in nuclear translocation and Ca^{2+} oscillation-inducing activities of phospholipase Czeta, a mammalian egg-activating factor. J Biol Chem. 2006; 281(38): 27794-805.
23. Larman MG, Saunders CM, Carroll J, Lai FA, Swann K. Cell cycle-dependent Ca^{2+} oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. J Cell Sci. 2004; 117(12): 2513-21.
24. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, et al. Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. Dev Biol. 2004; 268(2): 245-57.
25. Nomikos M, Mulgrew-Nesbitt A, Pallavi P, Mihalyne G, Zaitseva I, Swann K, et al. Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C-zeta (PLC-zeta) to phospholipid membranes: potential role of an unstructured cluster of basic residues. J Biol Chem. 2007; 282(22): 16644-53.
26. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate/Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. Dev Biol. 1993; 58(1): 62-78.
27. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. Sperm-oocyte fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. Development. 1997; 124(1): 223-41.
28. Kashir J, Heynen A, Jones C, Durrans C, Craig J, Gadea J, et al. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2011; 23(2): 263-7.
29. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. Annu Rev Biochem. 2001; 70: 281-312.
30. Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. Biochem Soc Symp. 2007; 74: 23-36.
31. Essen LO, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. Nature. 1996; 380(6575): 595-602.
32. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S. The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. J Biol Chem. 2005; 280(22): 21015-21.

33. Kurokawa M, Yoon SY, Alfandari D, Fukami K, Sato K, Fissore RA. Proteolytic processing of phospholipase Czeta and [Ca^{2+}] oscillations during mammalian fertilization. Dev Biol 2007; 312(1): 407-18.
34. Ellis MV, Carne A, Katan M. Structural requirementsof phosphatidylinositol-specific phospholipase C delta1 for enzyme activity. Eur J Biochem. 1993; 213(1): 339-47.
35. Fernald AW, Jones GA, Carpenter G. Limited proteolysisphospholipase C-gama1 indicates stable association of X and Y domainsenhanced catalytic activity. Biochem J. 1994; 302(2): 503-9.
36. Schnabel P, Camps M. Activation of a phospholipase C beta2 deletion mutant by limited proteolysis. Biochem J. 1998; 330(1): 461-8.
37. Liu B, Wu D. Analysis of G protein-mediated activation of phospholipase C in cultured cells. Methods Mol Biol. 2004; 237: 99-102.
38. Jones GA, Wu Y. Effect of limited proteolysis on phospholipase C-gama1 kinetics. Arch Biochem. Biophys. 2000; 375(2): 229-39.
39. Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development. J Clin Invest 2008; 118: 3671-81.
40. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, Lemmon B, Chang Lee H, Hamer R, et al. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLCζ) leads to male infertility. Hum Reprod. 2012; 27(1): 222-31.
41. Pan Q, Ju Z, Huang J, Zhang Y, Qi C, Gao Q, et al. PLCz functional haplotypes modulating promoter transcriptional activity are associated with semen quality traits in Chinese Holstein bulls. PLoS One 2013; 8: e58795.
42. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organisation reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010; 16(3): 231-45.
43. Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simon C, Pellicer A, Remohi, J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductaseactivity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculatedspermatozoa from fertile and infertile men. Fertil Steril. 2004; 82(3): 1059-66.
44. Lukanov TH, Lichev DI, Konova EI, Emin AI, Ayvazova NP, Velkova AV, et al. Flow cytometric measurement of sperm nuclear DNA fragmentation in infertile men with normal standard sperm parameters. J Mens Health. 2009; 6(1): 50-5.
45. Tavalaee M, Kiani A, Arbabian M, Deemeh MR, Nasr-Esfahani MH. Flow Cytometry: A New Approach for Indirect Assessment of Sperm Protamine Deficiency. Int J Fertil Steril. 2010; 3(4):177-84.
46. Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K. Oocyte activation and phospholipase Czeta (PLCzeta): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. Cell Commun Signal. 2011; 10(1): 12.
47. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as anindex to assess fertilization potential of a semen sample. Hum Reprod. 2011; 26(11): 2950-6.
48. Yoon SY, Eum JH, Lee JE, Lee HC, Kim YS, Han JE, et al. Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. Hum Reprod. 2012; 27(6):1768-80.
49. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2010; 94(2): 520-6.
50. Heytens E, Schmitt-John T, Moser JM, Jensen NM, Soleimani R, Young C, et al. fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse. Reprod Biomed Online. 2010; 21(6):742-9.
51. Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, Theodoridou M, Campbell K, Vassilakopoulou V, et al. Phospholipase Cz rescues failed oocye activation in a prototype of male factor infertility. Fertil Steril 2013; 99: 76-85.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Aug, Sep; 17(3):128-143. **Review article**

The role of phospholipase Czeta in male fertility as an oocyte activation factor

Aghajanpour S[1,2,3], Tavalaee M[1,2*], Azadi L[1,2], Nasr-Esfahani MH[1,2,4]
[1]Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Isfahan, I.R. Iran; [2]Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran; [3]Reproductive Biomedicine Research Center, Endocrinology and Female Infertility Dept. Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I.R. Iran; [4]Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, I.R. Iran.
Received: 20/Aug/2013 Accepted: 20/Oct/2014

Background and aims: In the mammalian, after sperm penetration into the oocyte and pass fertilization process, a set of cascade signals initiate that includes oscillations of calcium concentration in free oocyte cytosolic. The aim of this review article was to evaluate the role of Phospholipase Czeta (PLCz) in human oocyte activation and the role of this protein in sperm samples of fertile and infertile men.
Methods: In this review, fifty- one published articles related to protein phospholipase Czeta, during 2002-2013, were assessed via the PubMed.
Results: Since the discovery of PLCz in 2002, there has been much progress in researcher understanding of this fundamental sperm protein, both at the scientific and clinical level. Despite high fertilization rate after ICSI, some infertile individuals are faced to failed fertilization. Therefore, it is clear that phospholipase Czeta plays a fundamental role in the activation of human oocytes. Thus, genetic, molecular, or biochemical perturbation in this protein causes oocyte activation deficiency.
Conclusion: Phospholipase Czeta can be used either as a novel therapeutic agent which rescue oocyte activation deficiency, or as a prognostic/diagnostic biomarker of oocyte activation ability in target sperm samples.

Keywords: Sperm, Oocyte activation, Phospholipase Czeta, Infertility, Failed fertilization.

Cite this article as: Aghajanpour S, Tavalaee M, Azadi L, Nasr-Esfahani MH. The role of phospholipase Czeta in male fertility as an oocyte activation factor. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3): 128-143.

***Corresponding author:**
Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran, Tel: 00983119515680, E-mail: tavalaee.royan@gmail.com