

Mikro RNA'ların erkek infertilitesindeki rolü

Dr. Bilge Özsait Selçuk, Bio. Müh. Selva Türkölmez

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik AD

İnfertilite, dünyadaki çiftlerin %10–15'inde gözlenen bir durumdur ve bu çiftlerin yaklaşık %50'sinde anormal semen parametrelerinin eşlik ettiği erkek infertilitesi gözlenmektedir (1). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde semen analizi büyük yer tutmaktadır. Bu analizde, semen hacmi, pH, spermatozoa konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi gibi geleneksel semen parametreleri incelenmektedir (2). Diğer yandan, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde bu analizlerin yeterliliği hakkında tartışmalar sürmekte (3) ve yeni fertilité belirteçlerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır (4). Fertil ve infertil bireyler arasında karşılaştırmalı olarak araştırılan spermatozoal RNA'lar önerilen biyobelirteçler arasında yer almaktadır (5–7).

Organizmaların genetik yapısında, protein kodlayan RNA'ların yanı sıra, protein kodlamayan RNA'lar da bulunmaktadır. Kısa interferans RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) ve piwi-etkileşimli RNA (piRNA) olarak isimlendirilen kısa RNA molekülleri, transkripsiyon sonrası ve translasyonel evrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önem taşımaktadırlar. Bu küçük moleküllerin seviyesinde artış ya da azalış yönünde olan değişimler veya gen dizilerinde meydana gelebilecek olan başkalaşımalar kontrol mekanizmalarında farklılaşmaya neden olmaktadır (8). Bu farklılıklar normal fizyolojik süreçlerde, örneğin spermatojenezde, başkalaşmaya yol açmakta ve çeşitli klinik tabloların gelişmesine, örneğin infertiliteye, neden olabilmektedir. Diğer yandan, yakın zamanda yapılan çalışmalarda vücut sıvılarında serbest olarak ya da ekzosomlar içerisinde paketlenmiş olarak dolaşan RNA'ların hücre-hücre haberleşmesindeki düzenleyici rolleri de ön plana çıkmaktadır (9) ve miRNA'ların hormonlar gibi etki gösterebildikleri belirtilmektedir (10). Bununla birlikte, erkek üreme sitesinde yer alan çeşitli miRNA'ların ekspresyonundaki değişimlerin infertilite ile ilişkili olduğu yönündeki çalışmalar giderek çoğalmaktadır (11,12). Bu derleme kapsamında

testiküler, epididimal, seminal ve spermatozoal miRNA'ların erkek infertilitesindeki rolü incelenmiştir.

MikroRNA'ların yapısı ve özellikleri

MikroRNA'lar (miRNA), 22–24 nükleotit uzunluğunda, kısa ve tek zincirli RNA'lardır. MiRNA'ları kodlayan genlerin birçok farklı türler arasında korunmuş olduğu tespit edilmiştir (13). Bu özellikleri, bu küçük moleküllerin fizyolojik süreçlerdeki rollerinin önemini vurgulamaktadır. İnsanlarda yaklaşık 1800'ün üzerinde mikroRNA'nın olduğu saptanmıştır (14) ve insan genlerinin yaklaşık %30-60'ının bu miRNA'lar tarafından düzenlendiği ön görülmektedir (15,16). MiRNA'ların, mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak post-transkripsiyonel seviyede (13), genlerin başlangıç bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel seviyede (17) ya da epigenetik süreçlerde (18) etki ederek işlev gösterdiği öne sürülmektedir. Bu düzenleyici moleküller, hedef geninin mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlandığında, gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel seviyede baskılanması veya engellenmesine neden olmaktadır (13). Tek bir miRNA'nın birden çok hedef geni olabileceği gibi tek bir gen de birden çok miRNA tarafından aynı anda düzenlenebilmektedir (19). Olgunlaşmış miRNA'lar, hücre döngüsü, hücre farklılaşması (20), büyüme ve apoptoz (21) gibi önemli fizyolojik süreçlerin kontrolünde rol oynamaktadır. Bunların yanı sıra, embriyo gelişimi (22), kadın (ovülasyon ve korpus luteum gelişimi (23) gibi) ve erkek (spermatojenez (24) ve spermiogenez (25) gibi) üreme sisteminde gamet gelişimi ile ilgili süreçlerde yer aldıkları gösterilmiştir. Diğer yandan, miRNA dizilerinde meydana gelebilecek olan bir mutasyon, biyogenezlerdeki bir kusur (26) veya gen dizilerindeki polimorfizmlerin infertiliteye yol açabileceği yönünde bilgiler bulunmaktadır (8). Bu nedenle, erkek faktörüne bağlı infertilitenin araştırılmasında spermatozoal ve seminal miRNA'ların da incelenmesinin, tanı ve tedavi sürecine önemli derecede ışık tutacağı düşünülmektedir.

Spermatogenez ve testiküler miRNA'ların rolü

Spermatogenez, mayoz ve mitoz hücre bölünmesi ve spermatogonial kök hücrelerin olgun spermatozoaya farklılaşmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Testis dokusu, tüm dokular arasında en karmaşık transkript havuzuna sahiptir ve bu özelliği temel olarak spermatozoid ve round spermatidlerden kaynaklanmaktadır. Bu hücreler, protein kodlayan mRNA'ların yanı sıra çok sayıda kısa kodlamayan RNA'ların da ekspresyonunu yapmaktadır (27). Memeli testisinde işlev gören miRNA'ların tanımlanması amacı ile yapılan çeşitli miRNA profillemeye çalışmalarında (28,29) testis dokusu ve germ hücrelerinde (spermatogonia, pakiten spermatozoidler, spermatozoidler, ve spermatozoada) farklı ekspresyonu olan (29) ve özellikle insan spermatozoasına özgü olduğu tespit edilen çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır (30). Ek olarak, Sertoli hücrelerine miRNA biyogenezini ile ilişkili basamaklarda kusur olduğunda olgun miRNA'ların ortamda olmaması ve bu nedenle de Sertoli hücrelerinin mayozu ve spermiyogenezini destekleyememesinden dolayı spermatogenezde blok olduğu gözlenmiştir (31). Bu bulgular, spermatogenezin mitotik, mayotik ve mayoz sonrası kontrol süreçlerinde miRNA'ların rol oynayabileceğini işaret etmektedir (32). Özellikle, miR-34 ailesinden bazı miRNA'ların ve miR-429, miR-122'in histopatolojik ve spermatogenezik düzensizliklere eşlik ettiği gözlenmiştir (33). Bu miRNA'lardan miR-34'ün zona pellusidaya bağlanan spermatozoada var olduğu tespit edilmiştir ve fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimde bir rolü olabileceği düşünülmektedir (34). Yapılan fonksiyonel çalışmalarda, diğer bir miRNA olan miR-122a'nın ise geç evre erkek fare gametlerinde spermatozoon DNA'sının sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynayan tp2 mRNA'sının baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir (35).

Azoospermide miRNA'lar

Yapılan çalışmalar sonucunda, azoospermi gözlenen bireylerde bazı miRNA'ların ekspresyonunda farklılaşma olduğu ortaya konulmuştur (33,36,37). Özellikle, non-obstrüktif azoospermi (NOA) gözlenen bireylerin testis dokularında miR-34 ve miR-449'in ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığı, miR-34b*, miR-34b, miR-34c-5p ve miR-122 ekspresyonlarının ise azaldığı belirlenmiştir (33,36). Ayrıca, NOA varlığında seminal plazmada miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p,

miR-181a, miR-374b, miR-509-5p ve miR-513a-5p'nin ekspresyonunun, kontrol bireylerine göre önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (37). Öte yandan, NOA vakalarında Sertoli cell only (SCO), karışık atrofi ve germ hücre aresti gibi histopatolojik özelliklerin varlığında miRNA ekspresyonunun normal dokulara göre farklılaştığı belirlenmiştir (36,38). Yapılan fare çalışmalarında, mir-17-92 kümesinin delesyonu sonucunda testiküler hacimde azalma ve epididimal spermatozoa sayısında düşüş olduğu tespit edilmiştir (39). Ayrıca mir-17-92 ve miR-372/miR-373'ün apoptozu inhibe eden genleri düzenlediği, bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyonunun azalmasının apoptoz gelişimine ve non-obstrüktif azoospermiye sebep olduğu düşünülmektedir (40,41).

Epididimal miRNA profili

Yakın zaman öncesine kadar RNA'ların sadece hücre içerisinde işlev gördüğü düşünülmekteydi. Ancak, son zamanda yapılan çalışmalar kodlamayan düzenleyici RNA moleküllerinin hücre-hücre haberleşmesinde de rol oynadığı belirlenmiştir. Bu etkilerini, doğrudan serbest olarak ya da ekstrasellüler vesiküller içerisinde paketlenmiş şekilde vücut sıvılarına salınarak göstermektedirler. Epididimal sıvı içerisinde miRNA içeren ve "epididimozom" ismi verilen ekstrasellüler vesiküllerin, olgunlaşmakta olan spermatozoa membranı ve epididim epitelyal hücreleri ile etkileşime girdikleri gösterilmiştir (42). Epididim boyunca yer alan somatik hücreler, oldukça kontrollü olarak düzenlenmiş gen ekspresyonuna sahiptir ve bu düzenlenme luminal ekzokrin faktörler, steroid hormonlar ve miRNA'lar gibi çok çeşitli faktörler tarafından kontrol edilmektedir (43). Yapılan çalışmalarda, epididimin farklı anatomik bölgelerinde (kaput, korpus ve kauda) farklı miRNA'ların yoğunlaştığı gözlenmiştir (43,44). Bu farklılık, olgunlaşan spermatozoanın uygun şekilde gelişmesini sağlayabileceği, ardışık ancak, farklı mikroçevrelerin oluşturulması açısından önem taşımaktadır. Ek olarak, epididime özgü miRNA'ların sayısının ilerleyen yaş ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir (45). Diğer yandan, spermatozoonun motilite kazanması, olgunlaşması ve saklanması açısından epididimal miRNA'ların sağlıklı bir şekilde ekspresyonunun olmasının büyük önem taşıdığı gözlenmiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada sıçan epididiminde bulunan Hon-gESr2 miRNA'sının normalden daha çok ekspresyonunun olmasının sonucunda, motilite ve kapasitasyon oranlarının

Tablo 1. Çeşitli araştırmacılar tarafından klinik kondüsyonlarla ilişkilendirilmiş olan bazı seminal ve spermatozoal miRNA'lar

Klinik kondüsyon	Ekspresyon artışı	Ekspresyon azalışı	Referanslar
Astenozoospermi	miR-27b, miR-151a-5p	miR-101-3p, let-7b-5p	52
	miR-141, miR-200a	miR-122, miR-34b	11
	hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, miR-513a-5p		37
Oligoastenozoospermi	miR-141, miR-200a	hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p,	11
	hsa-miR-429	hsa-miR-122, miR-16	33
	miR-23a		53
Oligozoospermi	mir-21, mir-22		54
	miR-335-5p, miR-885-5p, miR-152-3p		51
Teratozoospermi	miR-101-5p, miR-1305, miR-32-3p miR-16-1-3p, miR-198	miR-151-5p, miR-935	51
Non-obstrüktif azoospermi	hsa-miR-429	hsa-miR-34b*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-122	33
	miR-19b, let-7a		55
		mir-146b-5p, mir-181a, mir-374b, mir-509-5p, mir-513a-5p	37

da azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (46). Özet olarak, epididimal miRNA'ların ekspresyonundaki herhangi bir değişim infertiliteye eşlik edebilmektedir (43). Bu nedenle, infertilite olgularında epididimal miRNA'ların da potansiyel biyobelirteç olarak araştırmalara dahil edilmesi tartışılan konular arasındadır.

Seminal plazmadaki miRNA'lar

Seminal plazma, erkek üreme sisteminden kaynaklanan farklı sekresyonların bir karışımı olarak meydana gelmekte, dolayısı ile bu dokulara özgü mRNA ve miRNA'ları içermektedir (47). Bununla beraber, seminal plazmada serbest olarak bulunan miRNA'ların büyük çoğunluğunun testis ve epididimden kaynaklandığı (48) ve diğer vücut sıvıları ile karşılaştırıldığında seminal plazmada çok daha yüksek oranda miRNA yer aldıkları belirtilmektedir (47).

Spermatozoal miRNA'lar

Olgun spermatozoonun yaklaşık 3000 adet karmaşık yapıda transkript içerdiği tespit edilmiştir. Aktif translasyonu olmayan bu gametlerdeki RNA'ların testisteki spermatozoa gelişim süreçlerinin bir yansıması/kalıntısı olan artık ürünler olduğu düşünülmekteydi. Ancak, son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçları, spermatozoal RNA'ların farklı işlevlerinin olabileceğini ve fertilizasyon sürecine ve gelişen embriyoya katkılarının bulunabileceğini düşündür-

mektedir (49). Spermatozoal RNA'lar arasında yer alan miRNA'larının profillenmesi için yapılan çeşitli çalışmalarda bu RNA moleküllerinin hücre farklılaşması, hücre gelişimi, morfogenez ve embriyogenez (12) ile ilgili genlerin düzenleme mekanizması ile potansiyel olarak ilişkili olabilecekleri gösterilmiştir.

On adet normozoospermik fertil bireyin analiz edildiği bir çalışmada her bir bireyin örneğinde 221 ortak miRNA'nın ekspresyonunun olduğu, bunlardan 18 tanesinin doğrudan spermatogenez ile ilişkili olduğu, dördünün epididimal maturasyonunda, bir tanesinin de spermatogonial kök hücre yenilenmesinde yer aldığı gösterilmiştir. Dört miRNA'nın ise embriyonik gelişim ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (12). Spermatozoal miRNA'lar arasında yüksek ekspresyonu olan hsa-miR-191-5p, spermatozoonun morfolojik olarak farklılaşması ile ilişkilendirilmiştir ve testislerde de yüksek seviyede ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan ve idiopatik erkek infertilitesi olan normozoospermik bireylerin ART sonuçlarının karşılaştırıldığı bir başka araştırmada, spermatozoal miR-34b ve miR-34c'nin normal semen parametrelerinin olduğu grupta daha yüksek oranda ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, bu miRNA'lar in vitro embriyo gelişiminin 3. gününde (D3) yüksek kaliteli embriyo yüzdesi ve yüksek gebelik oranları ile ilişkilendirilmiştir (50).

Diğer yandan, oligozoospermik, astenozoospermik ve

teratozoospermik bireylerden elde edilen spermatozoal miRNA'ları karşılaştırıldığında, bu üç grup arasında ve de kontrol grubu arasında farklı miRNA'ların ön plana çıktığı gözlenmiştir (50,51). Bu bulgular, miRNA'ların spermatogenezde önemli rol oynadıklarının ve fertilité ile ilişkili mekanizmalara katıldıklarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda alt gruplar kendi içerisinde miRNA kümeleri açısından homojenite gösterse de en heterojen grubun oligozoospermik bireylerden elde edilen spermatozoal miRNA kümelerinde olduğu gözlenmiştir (51). Çeşitli klinik durumlar ile ilişkilendirilmiş ve valide edilmiş olan bazı miRNA'lar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Sonuç olarak, son zamanlarda miRNA'ların insan metabolizmasındaki önemi tartışılmaz hale gelmiştir. Hedef mRNA'ların analizleri ve ART çıktıları beraber değerlendirildiğinde, spermatozoal miRNA yükünün fertilizasyondan sonraki gelişim sürecindeki kontrol mekanizmalarına dahil olabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir. Fertil bireylerin spermatozoal miRNA'larının daha zenginleştirilmiş bir halde hücre farklılaşması, gelişim, morfogenez ve

embriyogenez ile ilişkili mRNA'ları hedeflemesi bu bulguların destekler niteliktedir (12). Bu nedenle, spermatozoal ve seminal miRNA yükünde meydana gelecek olan başka-laşmaların erken embriyo gelişimine olumsuz etkisinin olabileceği düşünülmektedir ve bu düzenleyici moleküllerin birer biyobelirteç olarak kullanılabilmesi önerilmektedir.

Tespit edilen her bir miRNA'nın ya da miRNA ailelerinin işlevlerinin belirlenmesi için çalışmalar yürütülmekle beraber henüz birçoğunun rolü aydınlatılabilmemiş değildir. Bununla beraber, benzer karakterde örneklerin çalışıldığı çeşitli araştırmalarda ortak miRNA'ların tespit edilmesinin yanı sıra çok farklı miRNA'ların da tanımlandığı gözlenmektedir (Tablo 1) (11,12). Bu durumun nedeni, çalışmalarda yer alan bireyler arasındaki farklılıklar, çalışma yöntemleri ve sonuçların analiz yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Dolayısı ile doğrudan tek bir kondüsyon ile ilişkilendirilen tek bir miRNA bulunmamaktadır. Ancak, yapılan fonksiyonel çalışmaların sayısının artması ve daha hassas tekniklerin kullanılması miRNA'ların hedeflediği genlerin ve ilgili hastalıkların belirlenmesinde büyük rol oynayacaktır.

Kaynaklar

1. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tourayne H. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology, 2015.
2. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. New York: Cambridge University Press; 2010.
3. Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 2007;134:31-40.
4. Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz S. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:735-48.
5. Jodar M, Kalko S, Castillo J, Balleca JL, Oliva R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 2012;27:1431-8.
6. Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Kolanowski T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertil Steril* 2013;100:1686-94.
7. Garrido N, Garcia-Herrero S, Meseguer M. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil Steril* 2013;99:1008-22.
8. Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, Ma Y, Zhang S. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. *Fertil Steril*. 2011 Jul;96(1):34-39
9. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, et al. Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654-659.
10. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8: 467-477.
11. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 2013;99:1249-55.
12. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Mercader JM, Garrido N, Anton E. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2014;102:213-22.
13. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
14. The miRBase Sequence Database -- Release 21, June 2014 www.mirbase.org Son erişim 5 Mayıs 2016.
15. Lewis BP, Burge CB & Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
16. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
17. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1608-1613.
18. Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci*. 2013;33(21):9003-12.
19. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2746-51.
20. Le Bot N. miRNAs and cell cycle control in ESCs. *Nat Cell Bio* 2012;14:658.
21. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:1290-1297.
22. Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M, Kato I. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res*. 2006 Mar 31;34(6):1765-71.
23. Eisenberg I, Kotaja N, Goldman-Wohl D, Imbar T. microRNA in Human Reproduction. *Adv Exp Med Biol*. 2015;888:353-87.
24. Björk JK, Sandqvist A, Elsing AN, Kotaja N, Sistonen L. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development* 2010;137:3177-84.
25. Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe, BD. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod* 2008;79:696-703
26. Khazaie Y, Esfahani MHN. MicroRNA and male infertility: a potential for diagnosis. *Int J Fertil Steril*. 2014;8:113-118.
27. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X, Gu H, Barthès P, Kokkinaki M, Nef S, Gnirke A, Dym M, de Massy B, Mikkelsen TS, Kaessmann H. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep* 2013;3:2179-90.

28. Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W & Ma Y. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* 2007;134:73–79
29. Ro S, Park C, Sanders KM, McCarrey JR & Yan W. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology* 2007;311:592–602.
30. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP & Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *Journal of Andrology* 2005;26:70–74.
31. Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, et al. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 2009; 326: 250–9.
32. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*. 2009;137(6):901–11.
33. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, Keller A, Meese E. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril* 2014;102:989–97.
34. Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, Lee KF, et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:490–4.
35. Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA. Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (*Tnp2*) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biology of Reproduction* 2005;73: 427–433.
36. Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, Meese E. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril* 2014;101:78–86.
37. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, Li L, Wang J, Li X, Shao Y, Liu Y, Ji J, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Zhang C. Altered Profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility. *Clin Chem* 2011;57:1722–31.
38. Yang Q, Hua J, Wang L, Xu B, Zhang H, Ye N, Zhang H, Ye N, Zhang Z, Yu D, Cookie HJ, Zhang Y, Shi Q. MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PLoS One* 2013;8:e66809.
39. Tong M H, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, *Mir-17 92(Mirc1)* and *Mir-106b-25(Mirc3)*, are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod* 2012;86:72.
40. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun F. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:13.
41. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED: Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int Urol Nephrol* 1999, 31(3):361–370.
42. Belleannee C. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian Journal of Andrology* 2015;17:730–736.
43. Belleannee C, Calvo E, Thimon V, Cyr DG, Legare C, Garneau L, Sullivan R. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PLoS One* 2012;7:e34996.
44. Chu C, Zheng G, Hu S, Zhang J, Xie S, Ma W, Ni M, Tang C, Zhou L, Zhou Y, Liu M, Li Y, Zhang Y. Epididymal Region-Specific miRNA expression and DNA methylation and their roles in controlling gene expression in rats. *PLoS ONE* 2015;10(4): e0124450.
45. Zhang J, Liu Q, Zhang W, Li J, Li Z, Tang Z, Li Y, Han C, Hall SH, Zhang Y. Comparative profiling of genes and miRNAs expressed in the newborn, young adult, and aged human epididymides. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42(2):145–153.
46. Zhang YL, Zhang JS, Zhou YC, Zhao Y, Ni MJ. Identification of MicroRNAs and Application of RNA Interference for Gene Targeting In Vivo in the Rat Epididymis. *Journal of Andrology* 2011;32:587–591.
47. Li H, Huang S, Guo C, Guan H, Xiong C. Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms. *PLoS One*. 2012;7(4):e34566
48. Hu L, Wu C, Guo C, Li H, Xiong C. Identification of microRNAs predominantly derived from testis and epididymis in human seminal plasma. *Clin Biochem*. 2014 Jul;47(10-11):967-72.
49. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;429:154.
50. Cui L, Fang L, Shi B, Qiu S, Ye Y. Spermatozoa micro ribonucleic acid-34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril*. 2015;104(2):312–7.
51. Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Godo A, Grossmann M, Pons MC, F-Fernández S, Garrido N, Anton E. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertil Steril*. 2015;104(3):591–601.
52. Zhou JH, Zhou QZ, Lyu XM, Zhu T, Chen ZJ, Chen MK, Xia H, Wang CY, Qi T, Li X, Liu CD. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod*. 2015 Jan;92(1):28.
53. Tang W, Liu DF, Kai H, Zhao LM, Mao JM, Zhuang XJ, Ma LL, Hui J. miRNA-mediated regulation of heat shock proteins in human ejaculated spermatozoa. *Turk J Med Sci*. 2015;45(6):1285–91.
54. Abhari A, Zarghami N, Farzadi L, Nouri M, Shahnazi V. Altered of microRNA expression level in oligospermic patients. *Iran Journal of Reproductive Medicine* 2014;12(10):681–686.
55. Wu W, Hu Z, Qin Y, Dong J, Dai J, Lu C, Zhang W, Shen H, Xia Y, Wang X. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol Hum Reprod*. 2012 Oct;18(10):489–97.