

Sperm nükleusu ve nüklear matriks: Paternal genomu taşıyan kargodan daha fazlası

Arş. Gör. Ece Ordueri, Doç. Dr. Çiler Çelik-Özenci

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

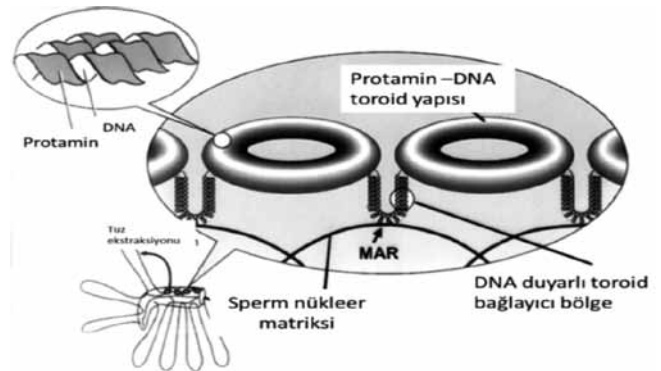
Sperm nükleusunda paternal genom fonksiyonel olarak durağan kalmakta ve DNA'sını protaminlerle pakettikten sonra bu durumunu korumaktadır (1). Bu durum, spermin nüklear hacminde dikkat çekici bir azalma ile fark edilen morfolojisi ile belirgin hale gelir. Bu değişikliklere rağmen, hem insan hem de fare spermatozoası, genomu boyunca tesadüfi olmayan bölgelerinde düşük seviyede nükleozomlarla (histonlar) paketlenmiş olarak kalır (2). Nükleozomlarla paketlenmiş halde kalan bu bölgelerin, sperm nüklear matriksi ile genomik yapı boyunca etkileşimlerini organize etmek için gerekli olabileceği düşünülmektedir (3). Transkripsiyonel olarak sessiz olan sperm genomundaki histonlar tarafından korunan genetik bilginin kalıtım yoluyla alındığı embriyolardaki güçlü kanıtlar ile desteklenmektedir (4). Spermin sitoplazmasında bulunan RNA'lar ile genomdaki histonlarla paketlenmiş bölgeler arasındaki etkileşimler aracılığı ile gerçekleşen transkripsiyonunun, erken embriyonik dönemde düzenleyici bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu özellikler, spermatogenik farklılaşmanın transkripsiyonel hikâyesini yansıtmaktadır (5). Bu derlemede, sperm aracılığı ile oosite gelen histon-protamin değişimine uğramadan kalan histonlarla paketlenmiş genomun epigenetik süreçte kalıtıldığı üzerine öngörülen hipotezler ve sperm genomunda kondenzasyonundan korunarak histonlarla paketlenmiş özellikli bölgelerin önemi tartışılacaktır.

Günümüze kadar, spermin genomu dışında başka bilgiyi oosite taşıması imkânsız görünüyordu. Bu düşüncenin doğru olmadığı ancak son 20 yılda fark edilmiştir. Bu farkındalığın en büyük nedenlerinden biri; spermin bir nüklear çevreye sahip olduğunun keşfedilmesidir. Paternal genomun uzun süre korunabilmesi için nüklear hacmin azalması ve sıkıca paketlenmesi gerekliliği ortaya çıkartılmıştır (6). Bu paketlenme sırasında, histon-protamin değişiminin gerçekleştiği ve protamin bağlı DNA

ilmekleri tamamen paketlenirken, özellikle bazı bölgelerinin somatik hücrelerdeki ile benzer biçimde histonlarla paketlenmiş olarak değişmeden kaldığı gösterilmiştir (7). Somatik ya da kök hücrelerde gözlenen epigenetik bölgeleri anımsatan DNA'da ki bu özellikli bölgeler, farklı modifiye histonlar tarafından işaretlenmektedir (2,4). Histon tutulum bölgeleri olarak da isimlendirilen bu bölgeler, spermatogenezin transkripsiyonel hikâyesinin anlaşılmasını sağlar (8). Transkripsiyon penceresinin önceden belirlenmesi sırasında RNA'lar üretilir, spermden tutulur ve fertilizasyon sırasında oosite aktarılır. Fertilizasyon sonrası kalan bu transkriptlerin biyolojik rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fonksiyonları henüz göz ardı edilse de bu RNA transkriptlerinin bazılarının erkek fertilesi için biyolojik işaretleyiciler gibi geliştirilebileceği de düşünülmektedir (9).

Sperm kromatini: Protaminler

Protaminler, spermatogenezin geç haploid fazında DNA'yı pakettleyen histonlar ile yer değiştiren küçük, arjininden zengin, çekirdek proteinleridir. Sperm kromatinin kondenzasyonu ve DNA stabilizasyonu için çok



Şekil 1: Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli. Bu model bağlanan her bir toroidin sperm kromatininin sperm nüklear matriksine tutunan DNaz-hassas bölgesi olduğu öngörülmektedir. (MAR= Matriks tutunma bölgeleri) (3).

önemli oldukları düşünülmektedir. DNA'ya bağlanırlar ve spermatid genomunu genetik olarak inaktif hale yoğunlaştırırlar. İnsanlarda ve bazı primatlarda, sperm genomunun %10-15'i histonlar tarafından paketlenir (6). Sperm DNA'sı protaminler tarafından paketlenirken yaklaşık 50kb büyüklüğündeki toroidler şeklinde paketlenerek düzenlenir. Her bir protamin toroid bir DNA ilmek domeyni olarak düşünülmektedir (Şekil 1).

Spermatogenezde histon-protamin değişimleri

Spermiyogenez, histonların büyük bir bölümünün düzenli şekilde protaminlerle yer değiştirmesi ile karakterizedir. Spermatogonyumlar bu farklılaşma yolağına doğru yönelirken, testis-özellikli histon çeşitlerini kromatinlerine dahil etmeye başlarlar (10,11). Spermiyogenezin ilk evreleri sırasında, yuvarlak spermatidlerde pek çok genin transkripsiyonunun olduğu ve yuvarlak spermatidlerin, nükleozomlarla organize DNA'sı olan tüm somatik hücrelerdeki ile benzer bir kromatin yapısına sahip olduğu bilinmektedir (12). Daha sonra yuvarlak spermatidlerin DNA'sındaki histonlar hiperasetillenir, nükleozomlar ayrılır, topoisomera II, DNA'nın süper heliks yapısını gevşetir ve transkripsiyon başlamasının ardından transizyon (geçiş) proteinleri (TNP'ler) DNA'ya bağlanır. Spermiyogenezin son evresinde, TNP'ler silinir ve bunların yerine protaminler artarak DNA'ya bağlanır. Sperm gelişimi sırasında, epididimiste protaminlerdeki disülfid bağlarının düzenlenmesiyle nükleoprotamin kompleksini daha da sağlamlaştırır (13). Bu proteinlerin sentezi ve depolanması mayoz sırasında giderek artış göstermektedir (14). Spermiyogenez sürecindeki bu nükleer yeniden modellenmenin sperm 3 fonksiyonu için önemli olduğu bilinmektedir (3):

1. Sperm nükleusunun azalan büyüklüğü ve şekli fertilite için değeri olan hidrokinamik yapısının oluşumunu sağlar (15-17).
2. Protaminasyon, sperm genomunu nükleaz saldırısına ve radyasyona karşı dayanıklı hale getirir (18).
3. Seçilen post-mayotik histonların tutulumu (diğer bir deyişle histonlarla paketlenen kalan seçilmiş DNA bölgeleri) zigotun erken gelişimde kullanılmak üzere tercih edilen gen bölgelerini sunan kromatin paketini oluşturmaktadır (2,4,19).

Spermde histonla paketlenen kalan bölgeler (histon tutulumu) ve nükleozomal bölgelerin önemi

Kemirgen sperm genomunun %1-2'si (2,6) insan sperm genomunun %15'i nükleozom (histonlar) ile paketlenmiş olarak kalır. Nükleozomal bağlantıların olmadığı bölgelerde, memeli spermlerinin sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde, histonlar ve protaminler karışık halde bulunurlar (1). Özellikle bu bölgeler, H3K9me3, H2A.Z gibi modifiye histonları içermektedir (4).

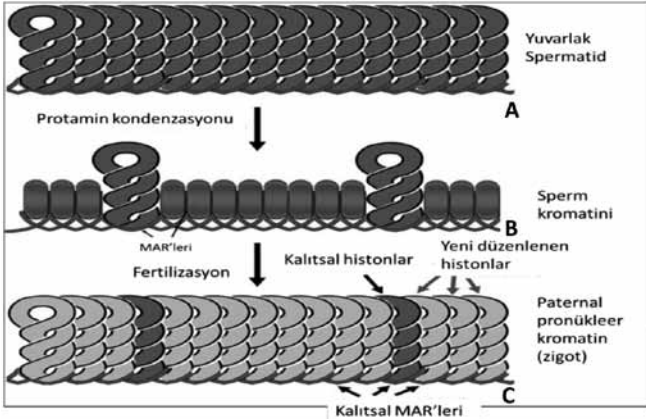
Bazı araştırmacılara göre, nükleozomların bu özellikli bölgelerdeki devamlılığı, fertilizasyondan kısa süre sonra kullanılmak için spermdeki gizli ve gerekli DNA bölgesini hazırlamaktadır. Bu hipoteze öncülük eden çalışmaların bulgularına göre; insan sperminde histonlar gen düzenleyici bölgelerde DNA'ya sekans özellikli olarak bağlanmaktadır (1). Bu hipotezin devamında yapılan çalışmalarda; testise-özgü histon çeşitlerinin olabileceği ve bu histonun H2B olduğu (20); telomerik bölgede olduğu (21); insan sperminde olmayan farede bulunan H1 ile ise telomerik bölgelerin sınırlandığı (22) gösterilmiştir.

Fertilizasyon ile birlikte, nükleoprotamin paketinin açılması ve nükleohiston yapısının yeniden düzenlenme aşaması başlar. Fertilizasyonda, oldukça kompakt olan nükleoprotamin yapısının açılmasına bağlı olarak disülfid bağlarının azalması, paternal histon hiperasetillenmesi, nükleozom şeklinin yeniden düzenlenmesi, epigenetik bilginin yeniden kurulması ya da devam etmesi ve gen ekspresyonunun başlaması gerçekleşmektedir (13).

Kromatin/matriks bağlanma bölgeleri

Nükleusta kromatinin düzgün konumlanmasının, sperm nüklear matriks tutunma bölgeleri (S/MAR) sekanslarının, RNA ve protein ağına tutunmasına bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 2). Kromatin, matrikse S/MAR'lar ile demirlenir ve nükleuslarda hücre tipi özellikli ilmek bölgelerini düzenler ve hücre tipi-özelikli gen ekspresyonuna katkıda bulunur (23). Spermde, replikasyon ve transkripsiyon olmamasına rağmen, nüklear matriksin paternal genomun yapısal düzenlenmesinde fonksiyonel olduğu gösterilmiştir (24).

Nükleozom-bağlı DNA, olgun spermde korunur ve nüklear matriks bağlantılarının işaretlenmiş bölgelerini oluşturur. Sperm nüklear matriks tutunma bölgeleri ile



Şekil 2: Sperm kromatin yapısal elementlerinin embriyo tarafından kalıtımı. Yuvarlak spermatidlerde DNA histonlar tarafından paketlenir (A) fakat spermiyogenez sırasında, birçoğu protaminler ile yer değiştirir (B) Fertilizasyondan sonra, protaminler silinir ve histonlar oositler tarafından karşılanır. Ancak, spermatozoadan gelen bazı histonlar fertilizasyon sonrasında yeniden düzenlenecek olan paternal pronükleusta kalır (C) (5).

uyumluluk gösteren bu yapısal işaretleyiciler olan özelleşmiş histonların, decondanse DNA ilmeklerini demirlediği ve daha sonra zigotta yinelenen paternal nüklear mimarisinin oluşumu sırasında kullanılacak bölgeyi işaret ettiği düşünülmektedir (5).

Sperm matriksi, S/MAR bölgeleri ve histon tutulum bölgelerindeki özelleşmiş histonlar embriyonun gelişimsel sürecini etkileyen bilgilerin embriyoya aktarılması

için önem kazanmıştır. Bu bölgelerdeki nükleozom varlığı, modifiye histonlardan hangisini içeriyorsa bir sonraki basamak olan, embriyonun epigenetik kontrolü için oldukça anlamlıdır. Ayrıca, nükleozom-ilişkili DNA'ların farklı toroid ilmeklerini nüklear matrikse bağlayarak olabileceği ve fertilizasyonun devamında, sperm nüklear matriksi ile eşleşen bu sekansların, zigota paternal kromatin yapısının değişen neslin kalıtımı için alan sağladığı düşünülmektedir.

Bu potansiyel kalıtsal kromatin kümeleri erken gelişimde yararlanılan replikonları belirliyor olabilir. Bu olayların bazıları, paternal kökenli mRNA'lar tarafından transkripsiyona uğrayan faktörler tarafından da yönetiliyor olabilir. Spermdeki transkript kalıntılarının oosite gönderildiği ortaya çıkartılmış olsa da bu transkriptlerin henüz fonksiyonel olup olmadığı net olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Spermin nüklear çevresi araştırmacılar için, yeni keşiflere ürün vermek üzere araştırmalara açık bir konudur. Bu araştırmaların pek çoğu, fertilizasyonu takip eden erken embriyonik gelişimde kritik gen ekspresyonlarını kontrol eden mekanizmayı açığa çıkarmak için yararlı olacaktır. İleride yapılacak çalışmalar ile birlikte erkek fertilité işaretleyicileri olarak geliştirilmesi beklenen histonların, bölgesel kromatin yapısında adeta fertil bir imza niteliği taşıyabilecekleri düşünülmektedir.

Kaynaklar:

- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278:29471-7.
- Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schubeler D, Stadler MB, Peters AH. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jun;17:679-87.
- Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* 2001 May;28:10-2.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009 Jul 23;460:473-8.
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2010 Jan;16:30-6.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007 8:227.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction.* 2010 Feb;139:287-301.
- Rousseaux S, Reynold N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online.* 2008 Apr;16:492-503.
- Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med (Berl).* 2009 Jul;87:735-48.
- Meistrich ML, Samuels RC. Reduction in sperm levels after testicular irradiation of the mouse: a comparison with man. *Radiat Res.* 1985 Apr;102:138-47.
- van Rooijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT. Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13:1559-66.
- Ge SQ, Li JZ, Zhang XJ. [Methylation and acetylation of histones during spermatogenesis]. *Yi Chuan.* 2011 Sep;33:939-46.
- Akama K, Horikoshi T, Sugiyama A, Nakahata S, Akitsu A, Niwa N, Intoh A, Kakui Y, Sugaya M, Takei K, Imaizumi N, Sato T, Matsumoto R, Iwahashi H, Kashiwabara S, Baba T, Nakamura M, Toda T. Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun;1804:1272-84.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature.* 2005 Mar 31;434:583-9.
- Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ER. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction.* 2007 Jul;134:19-29.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ER. Sperm design and sperm function. *Biol Lett.* 2006 Jun 22;2:246-9.
- Ostermeier GC, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl.* 2001 Jul-Aug;22:595-603.
- Rathke C, Barckmann B, Burkhard S, Jayaramaiah-Raja S, Roote J, Renkawitz-Pohl R. Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2010 Apr;89:326-38.

19. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 1987 May 22;236:962-4.
20. Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277:43474-80.
21. Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol*. 2000 Dec 25;151:1591-8.
22. Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrossi F, Giordano R, Magnano AR, Lorenzini R, Lavia P, Spadafora C. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 (Pt 20):3537-48.
23. Heng HH, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*. 2004 Mar 1;117:999-1008.
24. Linnemann AK, Krawetz SA. Silencing by nuclear matrix attachment distinguishes cell-type specificity: association with increased proliferation capacity. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37:2779-88.