

Роль микроРНК в сперматогенезе

С.А. Руднева, А.А. Хаченкова

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, Москва, 115478, ул. Москворечье, 1

Контакты: Светлана Айвенговна Руднева sveta_a_r@mail.ru

Мужские половые клетки имеют сложный транскриптом. Помимо кодирующих белки матричных РНК в нем присутствует много некодирующих РНК, включая микроРНК. Известно, что микроРНК – важные регуляторы экспрессии генов. Они функционируют в основном посттранскрипционно, контролируя трансляцию их целевых мессенджеров – матричных РНК – и участвуя в каждом этапе дифференцировки мужских половых клеток. В данном обзоре продемонстрировано значение путей микроРНК для нормального сперматогенеза. Определена функциональная роль ряда микроРНК на различных этапах дифференцировки половых клеток. Рассмотрены микроРНК в сперматозоидах и семенной плазме человека в качестве потенциальных биомаркеров мужского бесплодия.

Ключевые слова: микроРНК, сперматогенез, сперматозоид, эпигенетика сперматогенеза, некодирующие РНК, биомаркер, мужская фертильность

DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-23-37

Role of microRNAs in spermatogenesis

S.A. Rudneva, A.A. Khachenkova

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115478, Russia

Male germ cells have a complex transcriptome. In addition to protein-coding messenger RNAs, many noncoding RNAs, including microRNAs (miRNAs), are produced. The miRNAs are important regulators of gene expression. They function mainly post-transcriptionally to control the stability or translation of their target messenger RNAs. The miRNAs are expressed in a cell-specific manner during spermatogenesis to participate in the control of each stage of male germ cell differentiation. Clinical studies have exploited the well-defined expression profiles of miRNAs, and human spermatozoal or seminal plasma miRNAs have been explored as potential biomarkers for male factor infertility.

Key words: microRNAs, spermatogenesis, male germ cells, epigenetics of spermatogenesis, Dicer, noncoding RNAs, biomarker, male infertility

Этапы сперматогенеза

Сперматогенез – процесс, в результате которого происходит дифференцировка первичных половых клеток (ППК) в зрелые сперматозоиды. В сперматогенезе можно выделить 3 основные фазы: пролиферацию и дифференцировку сперматогониев, мейоз и спермиогенез. У мужчин сперматогенез начинается в период полового созревания и продолжается до конца жизни.

Сперматогенез отличается от женского оогенеза наличием гаплоидной стадии дифференцировки. Кроме этого, у женщин весь резерв ППК закладывается в период эмбрионального развития, и затем происходит непрерывное снижение числа ооцитов вплоть до полного их истощения, что проявляется как менопауза. Сперматогенез, напротив, представляет собой непрерывный процесс, в ходе которого каждый день, вплоть до преклонного возраста, образуются миллионы сперматозоидов.

Комплекс клеточных трансформаций, приводящих к дифференцировке ППК в сперматозоиды, осуществляется в сперматогенном эпителии, выстилающем изви-

тые семенные каналы (рис. 1) [1–4]. Сперматогонии, расположенные между клеток Сертоли вдоль базальной мембраны, служат источником недифференцированных клеток для сперматогенеза и по мере дифференцировки продвигаются в адлюминальном направлении. Герминативный эпителий извитых семенных канальцев организован таким образом, что каждое сечение канальца содержит последовательные группы различных типов половых клеток на разных стадиях развития (см. рис. 1). У мышей существует 12 (I–XII) определенных клеточных стадий, у человека – 6, которые расположены упорядоченно, согласно прогрессу развития [5].

Согласованное регулирование процессов в половых клетках на разных стадиях дифференцировки осуществляется благодаря клеткам Сертоли, формирующим для них микроокружение, и благодаря синхронизированному действию гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [6]. Гормональная функция яичек при наличии обратных связей находится под контролем гипоталамуса и гипофиза, а в самих яичках эта функция обеспечивается деятельностью 2 типов клеток – клеток

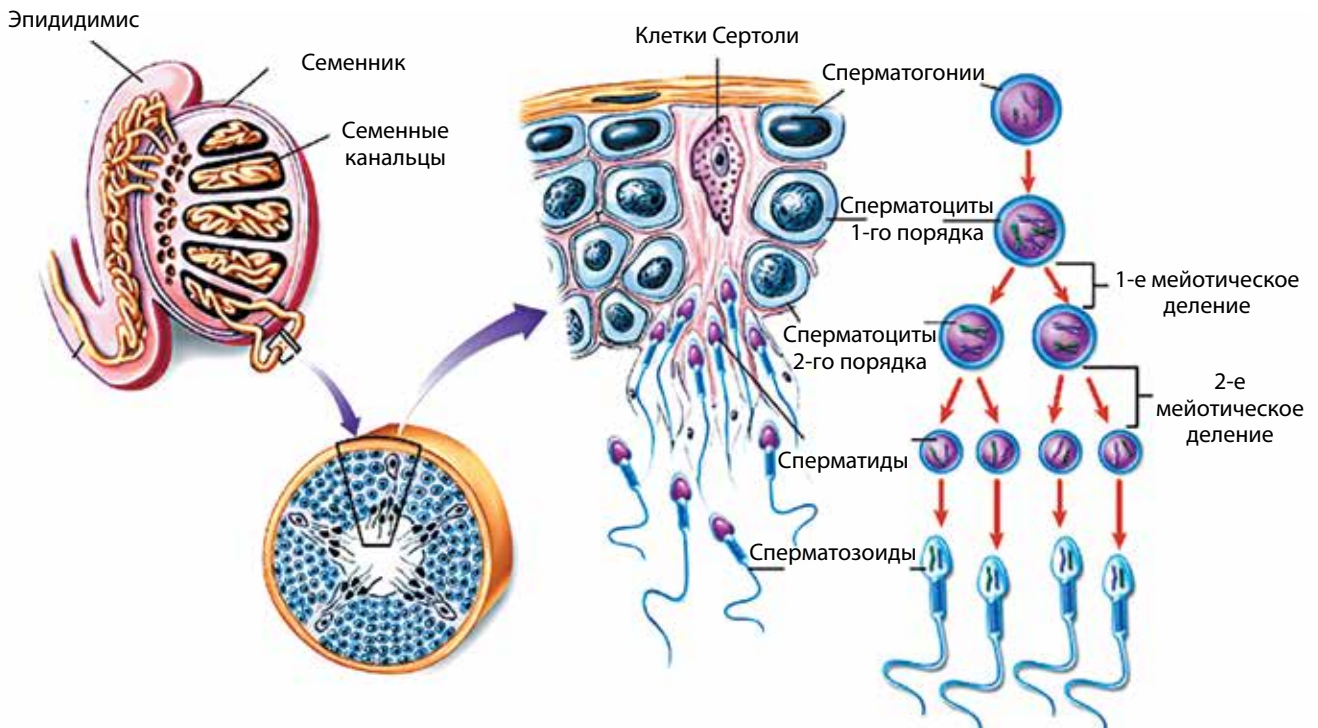


Рис. 1. Схема сперматогенеза

Лейдига, вырабатывающих тестостерон, и клеток Сертоли, вырабатывающих ингибин, антимюллеров гормон, эстрадиол. Клетки Сертоли многофункциональны. Они не только обеспечивают микроокружение для дифференцирующихся клеток, но также принимают участие в фагоцитозе дегенерирующих половых клеток, в паракринной регуляции сперматогенеза, выполняют опорные и трофические функции. Формирующиеся между клетками Сертоли плотные контакты (один из компонентов, структур гемато-тестикулярного барьера) разделяют семенные каналцы на 2 отдела: базальный и адлюминальный. Базальный отдел – зона активного размножения сперматогониев, в адлюминальном отделе происходит их дальнейшая дифференцировка через мейоз и спермиогенез [7, 8].

Светлые сперматогонии типа А вступают в процесс сперматогенеза, темные являются резервными, включающимися в сперматогенез по мере необходимости. По мере дифференцировки половых клеток сперматогонии типа А 4 раза делятся митотически, дифференцируясь в сперматогонии типа В, которые и вступают в мейоз, преобразуясь в сперматоциты 1-го порядка [4, 9].

Благодаря неполному разделению клеток первичные сперматоциты оказываются соединенными между собой межклеточными мостиками. Последующие поколения клеток также остаются связанными между собой, в результате чего образуется синцитий, клетки которого делятся синхронно.

Во время профазы I мейоза в сперматоците 1-го порядка на стадии зиготены происходит конъюгация

между гомологичными родительскими хромосомами. На стадии пахитены между сконъюгированными гомологами происходит обмен участками хромосом (кроссинговер) – гомологичная рекомбинация, важнейший генетический процесс. После коротких стадий диплотены и диакинеза сперматоциты 1-го порядка вступают в стадию метафазы I мейоза, во время которой хромосомы выстраиваются по экватору, закрепляясь на микротрубочках веретена деления с помощью центромер (кинетохоров), и на стадии анафазы I мейоза гомологичные хромосомы расходятся к противоположным полюсам веретена деления [4, 9].

В соответствии с этими изменениями профазы I мейоза делится на 5 последовательных стадий: лептотену (начало конденсации хромосом), зиготену (начало конъюгации гомологичных хромосом и формирование синаптонемного комплекса, который скрепляет гомологичные хромосомы по всей длине и удерживает их вместе), пахитену (осуществление кроссинговера), диплотену (начало расхождения гомологичных хромосом), диакинез (разделение гомологичных хромосом). После диакинеза в метафазе I бивалентные хромосомы выстраиваются вдоль экватора клетки, а в анафазе I гомологичные хромосомы расходятся к полюсам.

Важно отметить, что к полюсам расходятся целые хромосомы, состоящие из 2 хроматид. В каждую дочернюю клетку попадает по 1 гомологичной хромосоме, материнские и отцовские гомологи случайным образом распределяются между дочерними клетками. В телофазе I хромосомы деспирализуются, появляется

ядерная оболочка. Анафаза и телофаза 1-го деления мейоза протекают быстро.

Во время 2-го деления мейоза из каждого сперматоцита 2-го порядка образуются 2 гаплоидные сперматиды. Ранние (округлые) сперматиды претерпевают дальнейшую дифференцировку (спермиогенез). При этом формируются жгутик и акросома, происходит изменение формы ядра, компактизация хроматина с помощью протаминов, заменяющих большинство гистонов [1–4].

Процесс спермиогенеза можно условно разделить на несколько фаз: фазу округлой сперматиды (образование акросомы, содержащей литические ферменты), фазу удлинённой сперматиды (образование жгутика из центриолей) и фазу созревания (конденсация хроматина, замена гистонов на протамины, сбрасывание цитоплазматической капли с шейки сперматозоида) (рис. 2).

Сперматозоиды, которые высвобождаются в просвет канальцев, продолжают свой путь к придатку яичка – эпидидимису – для окончательного (биохимического) созревания. Там они теряют цитоплазматические капли, изменяется заряд их мембран, сперматозоиды приобретают подвижность и способность связываться с мембраной ооцитов [5].

Транскриптом мужской половой клетки и транскрипционные волны

Ход сперматогенеза сопровождается высокоорганизованными транскрипционными волнами, которые генерируют специфичные профили транскриптомов, характерные для каждой стадии дифференцировки ППК, что было подтверждено в ряде работ [10–12]. Показано, что в митотических сперматогониях, мейотических сперматоцитах и гаплоидных сперматиде экспрессируются совершенно разные группы генов (рис. 3).

В связи с заменой гистонов протаминами на поздних стадиях сперматогенеза происходит значительно более плотная конденсация хроматина, и, как следст-

вие, транскрипция в этих клетках снижается. В связи с этим матричные РНК (мРНК) для многих сперматидных белков синтезируются на более ранних стадиях и сохраняются до надобности в виде рибонуклеопротеиновых комплексов [13, 14]. Последние исследования показали, что в клетках человека транскрибируется большая часть генома, но лишь малая часть из транскрибируемой РНК кодирует белки [14]. Таким образом, большинство РНК-транскриптов является некодирующими, но при этом выполняет важные клеточные функции. В частности, некодирующие РНК играют определяющую роль в регуляции экспрессии генов как на транскрипционном уровне (в качестве компонентов комплексов транскрипционных факторов), так и посттранскрипционно [14, 15].

Гены некодирующих РНК, как и гены белков, дифференцированно экспрессируются во время сперматогенеза [14]. Поскольку некодирующие РНК участвуют в регуляции трансляции мРНК, у каждого типа дифференцирующихся клеток образуются свои паттерны экспрессии обоих типов РНК, что приводит к возможности формирования сложных регуляторных сетей. Мужские половые клетки, особенно сперматоциты и округлые сперматиды, транскрипционно активны. Было показано, что клетки семенников имеют наиболее сложные по составу транскриптомы по сравнению с клетками других тканей и органов. В этих клетках экспрессируются гены не только белков, но и большое количество генов различных некодирующих РНК [11, 16–19]. Очевидно, что точная, пространственная и временная регуляция экспрессии генов имеет фундаментальное значение для нормального протекания сперматогенеза.

Разница в судьбах РНК контролируется в основном их ассоциацией с РНК-связывающими белками. Существует широкий спектр различных РНК-связывающих белков, в том числе специфичных для мейотических и постмейотических клеток семенников [20, 21].

Рибонуклеопротеиновые комплексы, специфичные для дифференцирующихся половых клеток, считающиеся их особенностью, и, по всей видимости, участвуют в посттранскрипционном контроле РНК. Например, постмейотические гаплоидные округлые сперматиды содержат необыкновенно большую цитоплазматическую рибонуклеопротеиновую гранулу, которая аккумулирует РНК и различные белки, вовлеченные в процессы регуляции РНК, и, как предполагают, является центральной структурой в управлении сложнейшим транскриптомом гаплоидных клеток [22–24]. Не удивительно, что из-за высоких требований к регуляции экспрессии генов микроРНК обеспечили важный дополнительный уровень в регуляции спермиогенеза.

МикроРНК и их экспрессия во время сперматогенеза

МикроРНК – небольшие одноцепочечные РНК длиной около 22 нуклеотидов [25–28], которые ком-

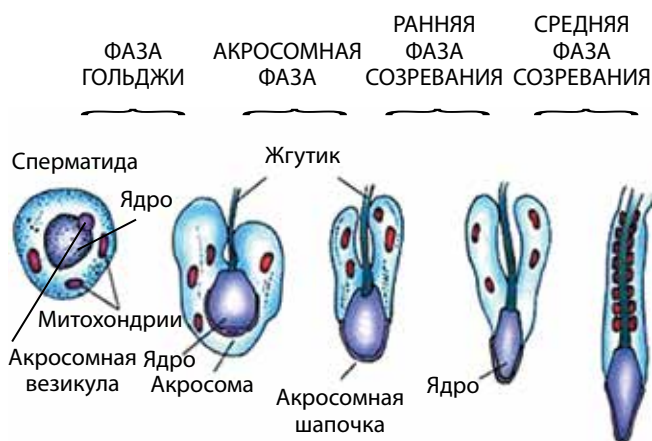


Рис. 2. Схема спермиогенеза

ГЕНЫ						КЛЕТКИ	ФУНКЦИИ
<i>Acvr2a</i>	<i>Cldn11</i>	<i>Cdi1</i>	<i>Lhcgr</i>	<i>Serpina5</i>		Сертоли, Лейдига	РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ, ГОНАДОТРОПИН, РЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ, РЕЦЕПТОРЫ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ
<i>Adralb</i>	<i>Cyp17a1</i>	<i>Cdnf</i>	<i>Man2a2</i>	<i>Sfc12a2</i>			
<i>Ar</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Sox8</i>			
<i>B4galnt1</i>	<i>Dhh</i>	<i>Hmga1</i>	<i>Nrob1</i>				
<i>Bcf2l2</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hmgb2</i>	<i>Rbp4</i>				
<i>Cdkn2c</i>	<i>Dnaja1</i>	<i>Inha</i>	<i>Sf1</i>				
<i>Cdkn2e</i>	<i>Efv5</i>	<i>Kitl</i>	<i>Sbf1</i>				
<i>Adamts2</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Pi3K</i>	<i>Sycp2</i>			
<i>Apaf1</i>	<i>Daz1</i>	<i>Kit</i>	<i>Rbp4</i>	<i>Utp14b</i>			
<i>Bax</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Limk2</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Zbt16</i>			
<i>Bmp8b</i>	<i>Dnmt3l</i>	<i>Nanos2</i>	<i>Slc19a2</i>				
<i>Csf1</i>	<i>Etv5</i>	<i>Pin1</i>	<i>Sohfh2</i>				
<i>Cdkn2d</i>	<i>Gdnf</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Stra8</i>				
<i>Adrafb</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Eroc1</i>	<i>lhpk1</i>	<i>Piwil2</i>			
<i>Atm</i>	<i>Cona1</i>	<i>Exo1</i>	<i>Limk2</i>	<i>Piwil4</i>			
<i>Bat3</i>	<i>Cks2</i>	<i>Fanca</i>	<i>Lmna</i>	<i>Pms2</i>			
<i>Bcl2</i>	<i>Cnb1ip1</i>	<i>Fkbp6</i>	<i>Mei1</i>	<i>Psmc3ip</i>			
<i>Bcl6</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Fus</i>	<i>Mth1</i>	<i>Rad51c</i>			
<i>Bcl2l2</i>	<i>Cpeb1</i>	<i>Gal3st1</i>	<i>Mth3</i>	<i>Rara</i>			
<i>Bcl2l2</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Gnpat</i>	<i>Morc1</i>	<i>Rarb</i>			
<i>Bmp8a</i>	<i>Csda</i>	<i>H2afx</i>	<i>Msh4</i>	<i>Rec8</i>			
<i>Brca2</i>	<i>Dazap1</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Msh5</i>	<i>Slc25a4</i>			
<i>Btrc</i>	<i>Dmc1</i>	<i>Hsf1</i>	<i>Mybl1</i>	<i>Sgol2</i>	<i>Smc1b</i>		
<i>Bsg</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hsf2</i>	<i>Ovol1</i>	<i>Siah1a</i>	<i>Sohfh1</i>		
<i>Bub1b</i>	<i>Egr4</i>	<i>Hspa2</i>	<i>Pafah1b2</i>	<i>Slc25a4</i>	<i>Stx2</i>		
<i>Adamts2</i>	<i>Ddx25</i>	<i>Pank2</i>	<i>Ppp1cc</i>	<i>Tdrd1</i>			
<i>Bcl2l2</i>	<i>Fndc3a</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Pygo2</i>	<i>Tbp1l</i>			
<i>Cadm1</i>	<i>H1fnt</i>	<i>Pafah1b1</i>	<i>Rpb4</i>	<i>Theg</i>			
<i>Camk4</i>	<i>Hip1</i>	<i>Parp2</i>	<i>Rnf17</i>	<i>Tjp</i>			
<i>Cib1</i>	<i>lhpk1</i>	<i>Piwil1</i>	<i>Six5</i>	<i>Tnp1</i>			
<i>Crem</i>	<i>Krt9</i>	<i>Prm1</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Tnp2</i>			
<i>Csnk2a</i>	<i>Lmtk2</i>	<i>Prm2</i>	<i>Slc4a2</i>	<i>Ube2b</i>			
<i>Cugbp1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Prnd</i>	<i>Styx</i>	<i>Ybx2</i>			
<i>Ace</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Spag16</i>	<i>Taf7l</i>	<i>Pcsk4</i>	<i>Vdac3</i>	<i>Pvrl2</i>	
<i>Acr</i>	<i>Tekt3</i>	<i>Spag9</i>	Морфология	<i>Pla2g4c</i>	Фертильность	<i>Rasip1</i>	
<i>Adad1</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Tsn</i>	<i>Aff4</i>	<i>Pgs1</i>	<i>Acr</i>	<i>Rbmxl2</i>	
<i>Adsm2</i>	<i>Tnp1</i>	<i>Vipr2</i>	<i>Agtpbbp1</i>	<i>Pltp</i>	<i>Ace</i>	<i>Spaml</i>	
<i>Adsm3</i>	<i>Tnp2</i>	Олигогерато-зооспермия	<i>Atp2b4</i>	<i>Pold4</i>	<i>Adam2</i>	<i>Tyst2</i>	
<i>Apob</i>	<i>Pcsk4</i>	<i>Fhl5</i>	<i>Bbs1</i>	<i>Prkaca</i>	<i>Adam3</i>	<i>Wipf3</i>	
<i>Bub1</i>	<i>Vdac3</i>	<i>Gmcl1</i>	<i>Bbs4</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>B4gaft1</i>	<i>Zpbb</i>	
<i>Clgn</i>	Количество	<i>Nphp1</i>	<i>CatSper1</i>	<i>Ros1</i>	<i>Cadm1</i>		
<i>Csnk2a2</i>	<i>Adamts2</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>CatSper2</i>	<i>Sirt1</i>	<i>Cib1</i>		
<i>Dnahc1</i>	<i>Arl4</i>	Олигоастенотератозооспермия	<i>CatSper3</i>	<i>Slc9a10</i>	<i>Cplx1</i>		
<i>Egr4</i>	<i>Ahr</i>	<i>Apob</i>	<i>CatSper4</i>	<i>Smcp</i>	<i>Crem</i>		
<i>Inpp5b</i>	<i>Apob</i>	<i>Brdt</i>	<i>Cd59b</i>	<i>Spag6</i>	<i>Crisp</i>		
<i>Jund</i>	<i>Cenpb</i>	<i>Cadni7</i>	<i>Cga</i>	<i>Sultle1</i>	<i>Fndc3a</i>		
<i>Klhl10</i>	<i>Gamt</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Fillr</i>	<i>Taldo1</i>	<i>Hexb8</i>		
<i>Pebp1</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Gapddhs</i>	<i>Tcf21</i>	<i>Mfge8</i>		
<i>Prm1</i>	<i>Hspa4l</i>	<i>Gmcf1</i>	<i>Gm101</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Mmel1</i>		
<i>Prm2</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Jam3</i>	<i>Inpp5b</i>	<i>Tekt3</i>	<i>Pgap1</i>		
<i>Pbmxl2</i>	<i>P2nd</i>	<i>Polg</i>	<i>Ldhc</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Piwil1</i>		
<i>Rxb</i>	<i>Rxfp1</i>	<i>Prnd</i>	<i>Lrp8</i>	<i>Tekt18</i>	<i>Plcb1</i>		
<i>Ros1</i>	<i>Sh2b1</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Mthfr</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Plcd4</i>		
<i>Spnr</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Spg6</i>	<i>Nsun7</i>	<i>Theg</i>	<i>Pmd</i>		
						Сперматозоиды	
						СОЗРЕВАНИЕ В ПОЛОВЫХ ПУТЯХ, КАПАЦИТАЦИЯ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ, ГИПЕРАКТИВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ	

Рис. 3. Группы генов, экспрессирующихся в дифференцирующихся половых клетках, клетках Сертоли и клетках Лейдига (адаптировано по [12])

плементарно (или частично комплементарно) связываются с мРНК, приводя к ее деградации или блокированию трансляции с нее. Оба эти процесса приводят к уменьшению белкового продукта гена, т. е. к подавлению его экспрессии, и поэтому названы посттранскрипционным сайленсингом генов.

Гены, кодирующие идентичные микроРНК (как и сами зрелые микроРНК), называются одинаково и различаются только номером, например, miR-6-1 и miR-6-2. Различающиеся на 1 или 2 нуклеотида зрелые микроРНК и их кодирующие гены обозначают также одинаково, но после номера добавляется латинская буква, например let-7a, let-7b [28].

Транскрипция микроРНК обычно начинается с образования ветвей шпильки, входящей в состав предшественника микроРНК, длиной в несколько сотен нуклеотидов (рис. 4), и называемой первичной микроРНК (pri-микроРНК). Большинство известных микроРНК транскрибируется с помощью РНК-полимеразы II [29]. Далее с помощью «микропроцессора» (ядерного комплекса, включающего ферменты Drosha и двуцепочечный РНК-связывающий белок DGCR8) происходит созревание pri-микроРНК. DGCR8 распознает субстрат РНК, в то время как фермент Drosha, имеющий эндонуклеазную активность (каталитический домен РНК-полимеразы), гидролизует pri-микроРНК на расстоянии 11 нуклеотидов от основания шпильки [29, 30].

После транспортировки в цитоплазму с помощью белка Exportin 5 предшественники микроРНК гидролизуются эндонуклеазой Dicer (также имеющей каталитический домен РНК-полимеразы) на маленькие двуцепочечные РНК (см. рис. 4). Двуцепочечная РНК впоследствии разделяется, и 1 из цепей связывается с белками Argonaute и другими вспомогательными белками, образуя РНК-индуцированный комплекс (RNA-induced silencing complex, RISC), осуществляющий регуляцию активности гена [31]. С помощью этого комплекса микроРНК узнают их мРНК-мишени, и в дальнейшем происходит либо деградация (при полной комплементарности микроРНК и мРНК), либо трансляционная инактивация мРНК (при неполной комплементарности микроРНК и мРНК). Каждая микроРНК может иметь сотни мРНК-мишеней, а каждая мРНК-мишень содержит несколько сайтов связывания для тождественных и разных микроРНК. Кроме этого, было показано, что если в активно делящейся клетке микроРНК, связавшись с комплементарной последовательностью в 3'-участке мРНК, ингибирует синтез (трансляцию) белка, то в состоянии покоя это событие может приводить к прямо противоположному эффекту – усилению синтеза целевого белка [26].

Таким образом, микроРНК образуют мощные регулирующие схемы управления широким диапазоном различных физиологических процессов. Было показано, что подобно генам, кодирующим белок, у генов

микроРНК также выражена тканеспецифическая активность экспрессии. В связи с этим можно сделать предположение о вкладе мутаций в генах микроРНК в развитие различных патологических состояний [32–35].

В мужских половых клетках транскрибируется несколько классов микроРНК: Dicer-зависимые микроРНК, эндогенные интерферирующие РНК (эндо-siРНК), а также Dicer-независимые piРНК [36]. piРНК – класс малых, некодирующих РНК (26–32 нуклеотидов), обнаруженных в комплексах с белками семейства Piwi. Белки Piwi относятся к большой группе белков Argonaute, необходимых для поддержания сперматогониальных стволовых клеток (ССК), сперматогенеза и репрессии мобильных элементов. Уровень экспрессии генов piРНК меняется в ходе сперматогенеза. Они начинают детектироваться в пахитене профазы I деления мейоза [34], однако при образовании гаплоидных сперматид содержание piРНК в них резко падает, и в зрелых сперматозоидах они отсутствуют [28]. Комплексы Piwi с piРНК не только задействованы в сайленсинге ретротранспозонов и других генетических элементов на посттранскрипционном уровне, но имеют и некоторые другие, еще не описанные, эффекты, например эпигенетические [35].

В работах [37–40] дифференциально выраженный паттерн микроРНК в эмбриональных половых клетках и ССК оценивали путем сравнения профилей микроРНК у незрелых и половозрелых мышей и в семенниках приматов, а также в различных тестикулярных популяциях клеток (рис. 5). К ним относят популяции гоноцитов и сперматогониев у мышей [41], *Thy1(+)*-клеточные популяции, состоящие в основном из соматических клеток семенников, и *Thy1(-)*-клеточные популяции [42], сперматогониев *GFRα(+)* (рецептора, располагающегося исключительно на поверхности недифференцирующихся сперматогониев) и сперматогониев *GFRα(-)* [43].

Было выявлено отличие в экспрессии генов микроРНК в клетках семенников мышей во время первой волны сперматогенеза, а также в различных обогащенных (отобранных по определенным маркерам) популяциях клеток: премейотической, мейотической и постмейотической [44–48].

Помимо исследования половых клеток профили микроРНК были оценены в соматических клетках семенников – клетках Сертоли [49–51]. Продемонстрировано, что экспрессия генов нескольких микроРНК в клетках Сертоли регулируется с помощью мужского гормона – тестостерона. Многие из этих микроРНК избирательно транскрибируются в семенниках и регулируют экспрессию генов в клетках Сертоли. Поэтому можно предположить, что андрогены в ряде случаев контролируют фазы сперматогенеза посредством микроРНК-зависимых механизмов [52, 53].

В ткани семенников экспериментально доказано избирательное профилирование микроРНК, выявлен

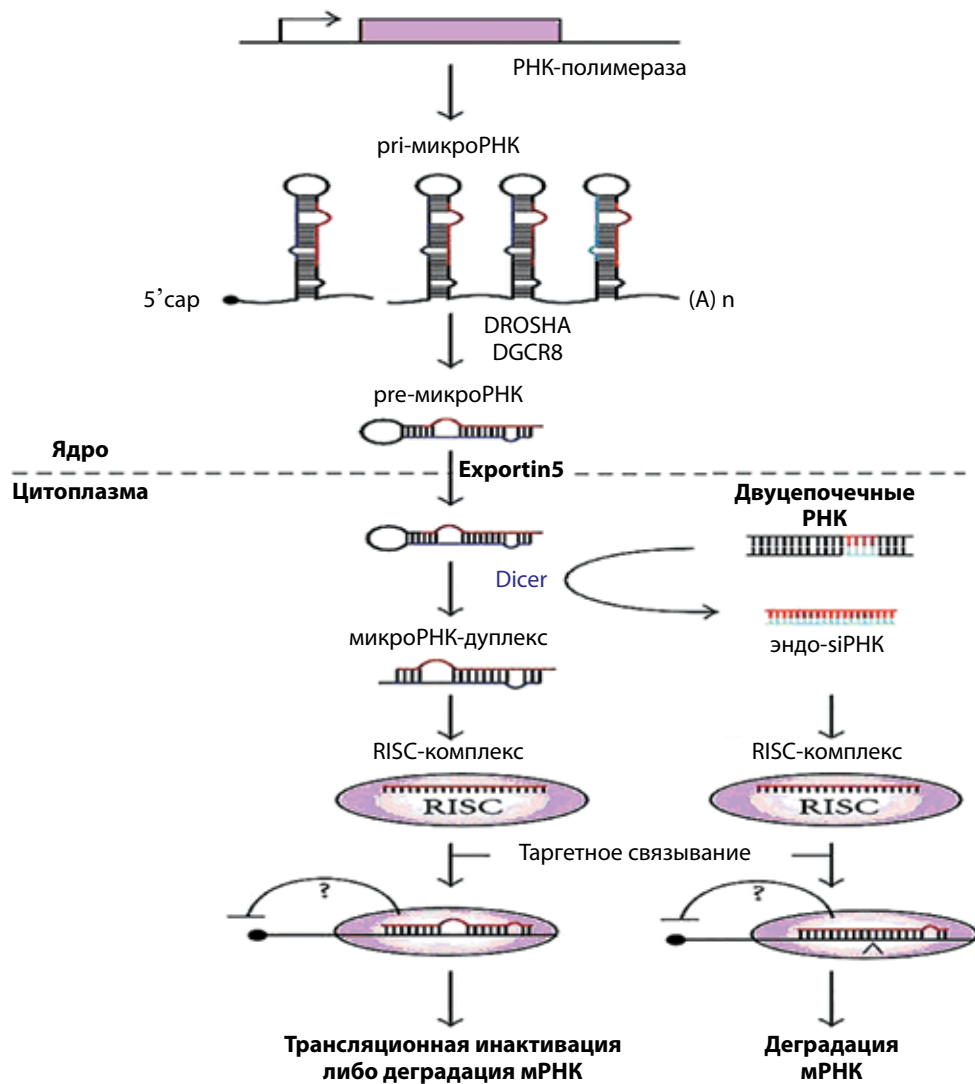


Рис. 4. Биогенез микроРНК

ряд специфических микроРНК для данного типа клеток (см. рис. 5) [44].

Также в клетках семенников были проанализированы эндо-siРНК, образующиеся из длинных двуцепочечных РНК, в биогенезе которых участвует Dicer, но не участвует «микропроцессор» (Drosha–DGCR8) [54–60]. В общей сложности были определены 73 эндо-siРНК, полученные из различных хромосом [60]. Биоинформатический анализ показал, что эндо-микроРНК в семенниках в основном нацелены на мРНК (92 %), на мРНК псевдогенов (3 %), ретротранспозонов (1 %), а также на некодирующие РНК (4 %) [60].

МикроРНК в качестве регуляторов дифференцировки сперматогонимальных стволовых клеток

Во время преобразования ППК в гоноциты на 12,5 дпс (дней после спаривания у мышей) начинается дифференцировка предшественников клеток Сертоли. Этот процесс запускается действием гена Y-хромосомы *Sry*.

В дальнейшем клетки Сертоли синтезируют множество факторов, запускающих процесс превращения половых тяжей в эмбриональные семенные каналцы [61–64].

Недавние исследования показали, что микроРНК играют важную роль в регуляции этого процесса [62, 63]. Сигнальная система клеток Сертоли (они продуцируют факторы роста, нейротропные факторы (GDNF), цитокины, которые связываются с различными рецепторами ССК, такими как *GFRα1*, и тирозинкиназами) существенно влияет на дифференцировку ССК [62, 63, 65]. Так, при гипоэкспрессии гена *Gdnf* полностью нарушается сперматогенез, и мыши приобретают синдром только клеток Сертоли. При гиперэкспрессии гена *Gdnf* возникает блок дифференцировки ССК, что также приводит к нарушениям сперматогенеза. Статус ССК является строго регламентированным, и микроРНК вносят свой вклад в регулирование этого процесса. Показано, что гены микроРНК-21, наряду с микро-









		Типы клеток	микроРНК (предполагаемые функции)			
ГИСТОНЫ	ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ		Гоноциты 3 дпс Thy1(+) клетки	miR-291a-5p, -293, -294, -290-5p miR-21 (устойчивость к апоптозу, подавление дифференцировки сперматогониев) miR-34c, -182, -183, -146a-465a-3p, -465b-3p, -465c-3p, -465c-5p	41 42	
		Сперматогонии	6 дпс GFRa1(+)-клетки Thy1(+)-клетки	miR-20, -106a (подавление дифференцировки сперматогониев) miR-221/222 (подавление дифференцировки сперматогониев) miR-17-92 (делеция приводит к синдрому маленьких яичек и нарушению сперматогенеза у мышей)	43 67 68	
			GFRa1(+)/Thy1(+) 7-9 дпс Сперматогонии	miR-146 (подавление дифференцировки) miR-136, 743a, -463	66 41	
		Ранние сперматоциты	Stra8(+) Сперматоциты	let-7f, -7a, -7b, -c7, -7g, -7i miR-99a, -34a, -322, -201, -547, -204 let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e, -7g	46 69	
			Sycp3(+) Сперматоциты Поздние сперматоциты Округлые сперматиды	miR-15b, -34b-5p, -34b-3p, -34c, -449a, -425, -375, -3470a, -18a, -296-5p, 466i-5p, -3085-5p miR-464, -t13, -t12, -t20, -t8, -t14, -t17, -469, -t3	46 45	
		Поздние сперматиды	18-20 дпс MI, MII	miR-34c (индукция апоптоза) miR-449 (регуляция мейоза) miR-18 регуляция (деградация) мРНК транскрипционного фактора Hsf2	80 85 81	
			Округлые сперматиды	28 дпс	miR-469 регуляция (деградация) мРНК транзиторных белков TP2 и протаминаов Prm2 miR-122 регуляция (деградация) мРНК транзиторных белков TP2	83 84
			Удлиненные сперматиды,		Потенциальные биомаркеры мужского бесплодия микроРНК в сперме олигозооспермия: miR-141, -200a повышенный уровень miR-34b, -15b, 34c-5p, -34b, -449a, -1973, -122, -16, -19a пониженный уровень астенозооспермия: miR-200a, -141 повышенный уровень miR-1973, -34b, -122 пониженный уровень МикроРНК в семенной плазме miR-34c-5p, -122, -146b-5p, -181a, -374b, -509-5p, -513a-5p пониженный уровень при необструктивной азооспермии повышенный уровень при астенозооспермии miR-141, -429, -7-1-3p пониженный уровень при необструктивной азооспермии	113
			Сперматозоиды			112
		ПРОТАМИНЫ			Оплодотворение	
	Зигота			В сперматозоидах: miR-34c (необходима во время первого деления дробления)	111	

Рис. 5. МикроРНК, которые преимущественно транскрибируются в семенниках и в специфических типах клеток семенников. miR – микроРНК (адаптировано по [44])

РНК-34с, -182, -183 и -146а, преимущественно экспрессируются в ССК [44] (см. рис. 5). Ингибирование микроРНК-21 в популяции ССК привело к существенному увеличению числа клеток, перешедших в апоптоз [42]. Гены и микроРНК-20 и -106а также преимущественно транскрибируются в ССК и участвуют в дифференцировке сперматогонимальных клеток на посттранскрипционном уровне, поскольку имеют таргетные области связывания с мРНК Stat3 и CyclinD1 [43]. Ген микроРНК-146 также выражено экспрессируется в недифференцированных сперматогониях, так как в дифференцированных сперматогониях уровень его экспрессии снижается почти в 180 раз [66]. Уменьшение уровня экспрессии гена микроРНК-146 приводит к индукции дифференцировки сперматогониев [66].

Другие микроРНК, участвующие в поддержании недифференцированного статуса сперматогониев, являются микроРНК X-хромосомного кластера микроРНК-221 и -222, гены которых имеют высокий уровень экспрессии в недифференцированных клетках и также участвуют в индукции дифференцировки сперматогониев, поскольку при понижении уровня экспрессии этих генов запускается механизм дифференцировки сперматогониев [67]. Нарушения функций микроРНК-221 и -222 также индуцируют дифференцировку и потерю свойств стволовых клеток у мышей [67]. Нокаутирование кластера генов микроРНК-17–92 у мышей, который избирательно экспрессируется в недифференцированных сперматогониях, приводит к синдрому микрояичек и существенному снижению количества сперматозоидов в эпидидимисе [68]. Интересно отметить, что удаление кластера генов микроРНК-17–92 приводит к увеличению экспрессии другого кластера генов микроРНК-106b–25, также избирательно экспрессирующегося в недифференцированных сперматогониях, что, по всей видимости, указывает на их функциональное сотрудничество [68]. Показано, что при дифференцировке сперматогониев снижается регуляция семейством микроРНК let-7 таргетных целей мРНК *Mycn*, *Cnd1* и *Colla2* [69–75].

МикроРНК в мейотических и постмейотических клетках

Транскриптом семенников млекопитающих гораздо более сложно организован, чем описанные транскриптомы других тканей. Это объясняется повышением транскрипционной активности в сперматоцитах в пахитене профазы I мейоза и в сперматиде на ранних стадиях спермиогенеза [18, 76, 77]. Этот вывод позволяет предположить, что эффективный посттранскрипционный контроль, в том числе микроРНК-регуляция, играет одну из ключевых ролей в мейотических и постмейотических клетках. Данное утверждение подтверждает и тот факт, что модельные мыши с нокаутированным геном *Dicer1* имеют выраженное нарушение мейоза.

Существует много подтверждений функциональной важности конкретных микроРНК в сперматогенных клетках. Так, микроРНК-34с была выявлена уже в ППК, но во время сперматогенеза ее уровень варьирует. Ее роль изначально связывали с поддержанием определенного клеточного статуса. Однако в дальнейшем было показано, что на более поздних этапах сперматогенеза в сперматоцитах и сперматиде уровень микроРНК-34с в клетке возрастает [78–80]. Снижение уровня экспрессии гена микроРНК-34с в первичных сперматоцитах считается необходимым для блокировки индуцированного апоптоза. Напротив, повышение экспрессии гена микроРНК-34с в культивируемых половых клетках является триггером апоптоза — процесса, который частично опосредован связыванием микроРНК-34с с 3'-нетранслируемой областью гена *ATF1* (циклического АМФ-зависимого транскрипционного фактора ATF1).

Считается, что кластер микроРНК-449 также участвует в регуляции мейоза, поскольку экспрессия его генов сильно возрастает в этот период сперматогенеза, и, кроме того, он участвует в регуляции таких транскрипционных факторов, как CREMtau и Sox5 [81]. Однако, несмотря на высокий уровень экспрессии генов кластера микроРНК-449 в мужских половых клетках, у мышей мужского пола с делецией данного гена наблюдали нормальный сперматогенез [81].

Важной составляющей сперматогенеза считается компактизация хроматина, в ходе которой происходит замена гистонов на протамины. Регуляция этого процесса осуществляется в том числе с помощью посттранскрипционного микроРНК-контроля. Было показано, что мишенью для микроРНК-469 являются мРНК транзитного белка TP2 и мРНК протамин *Ppm2*, в результате чего подавляется экспрессия белка TP2 и *Ppm2* в пахитенных сперматоцитах и ранних сперматиде. Другая микроРНК, контролирующая экспрессию гена *Trp2*, — микроРНК-122а, эта микроРНК активирована дегградацию мРНК *Trp2* [82–84]. МикроРНК-18, принадлежащая онкогенному микроРНК-кластеру — Oncomir-1 — регулирует трансляцию транскрипционного фактора HSF2 во время сперматогенеза [85, 86]. Экспрессия гена транскрипционного фактора HSF2 в семенниках регистрируется между 14-м и 21-м днем постнатального развития. Самый высокий уровень экспрессии HSF2 в семенниках мужчин наблюдается в сперматоцитах и ранних сперматиде. Иммуноцитохимическое окрашивание показывает, что белок HSF2 локализуется в ядрах сперматоцитов и ядрах округлых сперматид, и этот транскрипционный фактор находится в семенниках в конститутивно активном ДНК-связывающем состоянии. Кроме этого, было выявлено, что транскрипционный фактор HSF2 способен взаимодействовать с промоторной последовательностью гена HSP70.2 — члена семейства генов HSP70, которые,

в свою очередь, необходимы для нормального функционирования андрогенового рецептора [86]. HSF2 и микроРНК-18 демонстрируют обратную корреляцию во время сперматогенеза. Так, уменьшение экспрессии гена микроРНК-18 приводит к повышению уровня белка HSF2 и наоборот [85].

Модельные системы для изучения путей микроРНК при сперматогенезе

Значение регуляторных путей микроРНК в сперматогенезе стало понятно после создания особых типов моделей нокаутированных мышей (рис. 6). Для изучения влияния мутаций, приводящих к генетическим заболеваниям, часто используют модели животных. При этом в геном модельного животного вносят мутации либо как у больных людей, либо нарушающие экспрессию тех генов, регуляция которых у больных нарушена [87]. Однако генетический нокаут не всегда позволяет понять функции гена и последствия его мутаций. Для многих генов нарушение их работы на уровне всего организма несовместимо с нормальным развитием и приводит к гибели эмбрионов. Эту проблему возможно решить с помощью выборочного редактирования генома в определенном типе клеток. В этих целях в настоящее время часто используют рекомбиназу Cre, которая узнает специальные последовательности длиной 34 пар нуклеотидов, называемые LoxP [88]. Эта рекомбиназа, впервые обнаруженная в бактериофаге P1, может проводить специфическую реком-

бинацию 2 сайтов узнавания LoxP (т. е. удалять участок ДНК между фрагментами LoxP) независимо от того, в каком геноме они находятся. Последовательность LoxP состоит из 2 инвертированных повторов и специфического спейсера между ними. Последовательность спейсера может изменяться, однако Cre-рекомбиназа осуществляет рекомбинацию только между LoxP-сайтами с одинаковыми спейсерами. Таким образом, можно создавать сложные конструкции с большим числом LoxP-сайтов [89]. Мыши, несущие ген Cre-рекомбиназы, называют Cre-делитерами. В настоящее время описано несколько сотен различных линий Cre-делитеров, обеспечивающих широкое разнообразие выбора клеток-мишеней [90]. Их используют для получения гибридных мышей, у которых рекомбиназа будет синтезироваться и удалять ген-мишень только в клетках определенного типа.

Последствия удаления *Dicer1* в эмбриональных и дифференцирующихся половых клетках изучали, используя различные мышинные модели, в которых *Dicer1* был нокаутирован в конкретной ткани и в конкретный момент дифференцировки половых клеток с помощью специфических промоторов, управляющих экспрессией рекомбиназы *Cre*.

Исследования генетически модифицированных линий мышей показали, что *Dicer1* имеет решающее значение для мужской фертильности, а также для развития тестикулярных клеток и клеток Сертоли. При удалении *Dicer1* в клетках Сертоли с помощью *SF1* промотор-

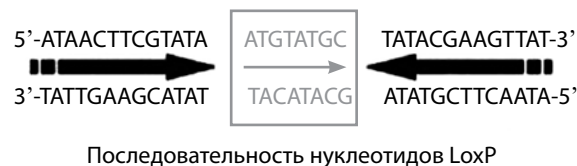
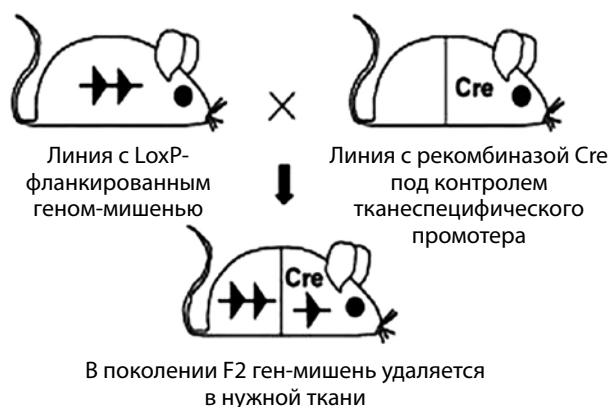
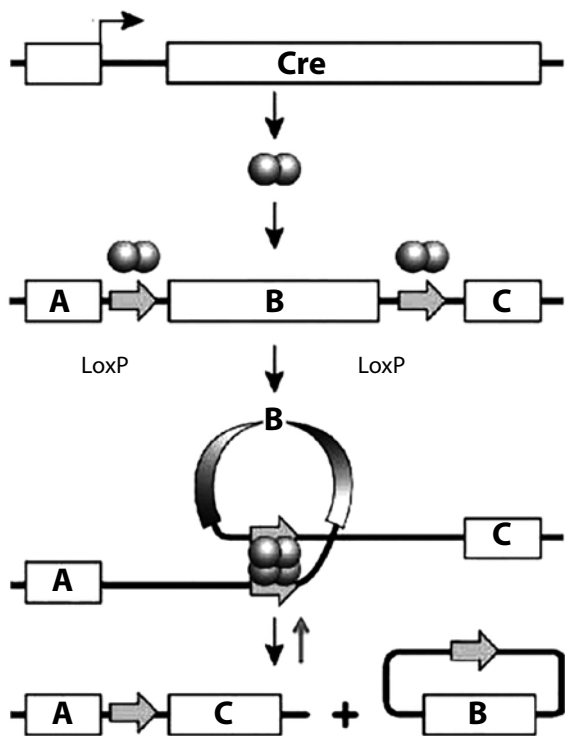


Рис. 6. Принцип редактирования гена с использованием тканеспецифической Cre-рекомбиназы (адаптировано по [92])

управляемой *Cre*-рекомбиназы не выявлено отклонений в течение внутриутробной жизни плода, хотя согласно этой методике удаление *Dicer1* было осуществлено уже в ППК. Однако это привело к полной дегенерации семенника вскоре после рождения [88]. На 5-й день после рождения значительно уменьшилось количество пролиферирующих клеток Сертоли и клеток Лейдига [91]. Решающая роль *Dicer1* в функционировании клеток Сертоли была также продемонстрирована с использованием *AMF* промоторуправляемой *Cre*-рекомбиназы. С ее помощью было проведено модельное нокаутирование *Dicer1* исключительно в клетках Сертоли мышей. Это привело к нарушению сперматогенеза и прогрессирующей тестикулярной дегенерации [50, 51, 92].

Удаление *Dicer1* в примордиальных половых клетках после 10-го дня эмбрионального развития с использованием управляющего промотора тканенеспецифической щелочной фосфатазы (tissue non-specific alkaline phosphatase, *TNAP*) для *Cre*-рекомбиназы привело к проявлению дефектов пролиферации в примордиальных половых клетках. Последствием этого процесса стало выраженное нарушение сперматогенеза [93, 94]. Однако низкая пенетрантность трансгена *TNAP-Cre* (трансгенные мыши экспрессировали *Cre*-рекомбиназу только в 50 % половых клеток) препятствовала точному анализу дефектов в данной модели мыши.

Удаление *Dicer1* в линии мышинных мужских половых клеток непосредственно перед рождением с помощью *Ddx4* промоторуправляемой *Cre*-рекомбиназы привело к возникновению серьезных дефектов в мейо-

тических и постмейотических половых клетках [78, 95]. Произошла задержка в прохождении профазы I мейоза во время сперматогенеза, значительно увеличилось количество апоптотических сперматоцитов, что, в свою очередь, привело к уменьшению числа сперматид. Гаплоидная дифференцировка оставшихся сперматид привела к образованию нескольких морфологически атипичных нефункциональных сперматозоидов [78]. Удаление *Dicer1* в сперматогониях с помощью моделей *Ngn3-Cre* и *Stra8-Cre* обусловило появление менее тяжелых фенотипов [92–94].

Ngn3 – член семейства транскрипционных факторов. Этот белок синтезируется преимущественно в недифференцированных сперматогониях половозрелых мышей. Селективное удаление *Dicer1* в сперматогониях типа А с помощью *Ngn3* промоторуправляемой *Cre*-рекомбиназы не повлияло на прогрессирование мейоза, и первые явные дефекты проявились лишь в гаплоидных мышинных мужских половых клетках (рис. 7) [96]. Возникли серьезные проблемы с компактизацией хроматина и формированием правильной формы головки сперматозоида [96]. Подобные дефекты возникли и у модельных мышей с нокаутом *Ddx4-Cre-Dicer1*: морфология сперматозоидов в эпидидимисе была атипичной – с маленькими деформированными головками и атипичной структурой жгутиков, кроме того, значительно снизилось количество продуцируемых сперматозоидов. Удаление *Dicer1* в ранних сперматогониях с помощью модели *Stra8-Cre* привело к серьезным нарушениям в гаплоидной дифференцировке [97, 98],

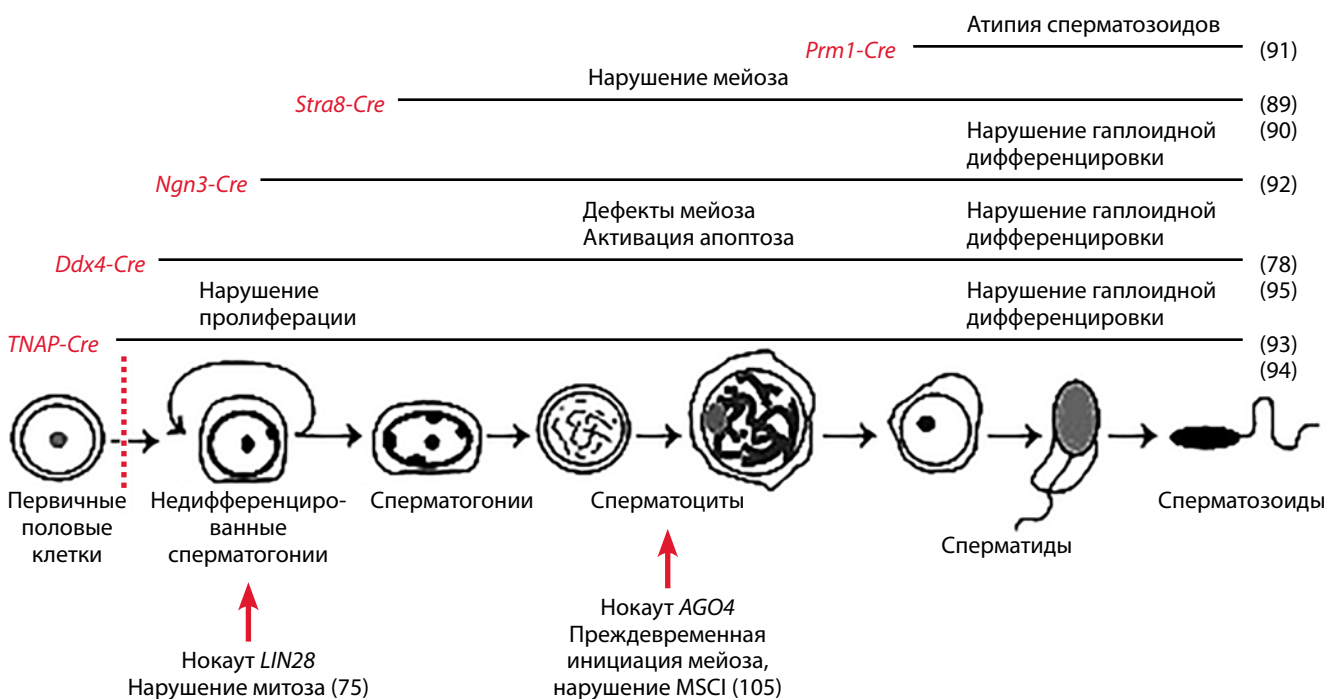


Рис. 7. Обобщенный анализ моделей мыши с использованием тканеспецифической *Cre*-рекомбиназы. Показаны выявленные основные дефекты сперматогенеза в каждой модельной системе (адаптировано по [44])

а также к замедлению мейотического деления. Позднее делетирование *Dicer1* в гаплоидных клетках с использованием модельных мышей линии *Protamine 1 (Prm1)-Cre* привело к менее серьезным нарушениям сперматогенеза, чем в предыдущих модельных системах *Ngn3-Cre* и *Stra8-Cre* [95, 96]. Они имели атипичную форму головки сперматозоидов и неправильную компактизацию хроматина [99]. Это исследование показало, что инактивация *Dicer1* в округлых сперматиде замедляет трансляционную активность в половых клетках.

Было продемонстрировано, что микроРНК существенно влияют на экспрессию генов. Выявлены значительные различия в уровне экспрессии многих генов при отсутствии *Dicer* [97, 98]. Однако экспрессия транспозонов не пострадала в семенниках мышей, нокаутированных по *Ngn3-Cre-Dicer1*.

Суммарный анализ фенотипов этих специфических для мышечных мужских половых клеток нокаутов по *Dicer1* указывает на зависимость дифференцировки мужских половых клеток от деятельности *Dicer*. Причем его модельные делеции на более ранних стадиях дифференцировки приводят к накоплению дефектов [44]. Кроме этого, активность *Dicer* является важным звеном для нормального прохождения мейоза, как было показано на модельных мышцах *Ddx4-Cre*.

Чтобы выявить роль путей микроРНК в сперматогенезе, были также созданы мыши, нокаутированные по *Drosha* с помощью модели *Stra8-Cre*, фенотип которых был сравнен с мышами, нокаутированными по *Dicer*. Отмечено, что *Drosha* имеет несколько независимых функций, а именно участвует в гидролизе мРНК и биогенезе рибосомной РНК. *Drosha* участвует только в процессинге микроРНК, в то время как *Dicer* участвует также в процессинге эндо-микроРНК. Сравнение 2 линий модельных мышей, у которых нокаутирование *Dicer* и *Drosha* было произведено в яичках с помощью *Cre*-рекомбиназы, позволило выявить, что оба гена необходимы для нормального прохождения сперматогенеза. Анализ транскриптома показал изменение профилей мРНК в обоих *Drosha*- и *Dicer*-нулевых пахитенных сперматоцитах и округлых сперматиде. Некоторые мРНК показали схожие изменения в обоих мышечных линиях. Однако большинство изменений в уровнях экспрессии мРНК уникальны для каждого из 2 мутантных генотипов. Таким образом, микроРНК и другие *Dicer*-зависимые пути (например, эндо-микроРНК) играют расходящиеся и независимые друг от друга роли в процессе сперматогенеза [97, 98].

Пути микроРНК и половые хромосомы

Плотность локализации генов микроРНК выше на X-хромосоме млекопитающих, чем на аутосомах. Это является следствием кластерной организации X-хромосомных генов микроРНК, которые представ-

ляют собой копии, образованные в результате дупликации генов микроРНК [100].

Сравнение уровней экспрессии генов микроРНК в сперматоцитах и сперматиде с уровнем их экспрессии в соматических клетках показало, что многочисленное семейство генов микроРНК на X-хромосоме имеет более высокие уровни экспрессии в мужских половых клетках, чем все другие категории генов микроРНК [100]. Известно, что гены половых хромосом подвергаются эпигенетическому сайленсингу в сперматоцитах на стадии пахитены во время профазы I мейоза путем мейотической инактивации половых хромосом (*meiotic sex chromosome inactivation, MSCI*) с образованием полового тельца. При этом происходят модификации хроматина, сопровождающие процесс репрессии генов. Транскрипционно неактивное состояние половых хромосом сохраняется и после первого деления мейоза, и даже на этапе спермиогенеза. Тем не менее оказалось, что микроРНК, в частности семейства микроРНК X-хромосомы, не подвергаются сайленсингу по типу MSCI [101]. Это говорит о том, что дуплицирование генов микроРНК на X-хромосоме является эволюционно значимым процессом, важным для того, чтобы гены микроРНК имели возможность экспрессироваться в сперматоцитах и сперматиде, несмотря на инактивацию половой хромосомы [100, 101].

Известно, что гены семейства *AGO* (*AGO1-AGO4*) экспрессируются во всех типах тканей организма, однако экспрессия *AGO4* наиболее выражена в семенниках. При этом ген *AGO4* локализуется в эпигенетически молчащем во время профазы I мейоза половом тельце [102]. Модельный *Cre*-нокаут *AGO4* в сперматогониях привел к преждевременному инициированию мейоза и началу неправильной сборки полового тельца, что обусловило нарушение MSCI (см. рис. 7). Интересно, что делеция *AGO4* сопровождалась также уменьшением экспрессии X-хромосомных генов микроРНК, которые способны избежать воздействия на себя MSCI [101, 102].

Эти результаты позволили выявить роль *AGO4* в ядрах пахитенных сперматоцитов в качестве регулятора MSCI, что предполагает участие сетей малых РНК в этом процессе. Кроме этого, было показано, что ряд микроРНК был локализован в ядрах пахитенных сперматоцитов, что дополнительно подтверждает предположение об участии микроРНК в MSCI [47].

Однако удаление *Dicer* или *Drosha* в сперматогониях у мышей не оказало значимого эффекта на формирование половых телец в пахитенных сперматоцитах [103]. Неясно, объясняется ли избыточная экспрессия генов, которые должны быть молчащими при MSCI, прямыми дефектами процесса MSCI в анализируемых пробах нокаутированных семенников или нет [101]. В целом все больше доказательств свидетельствует о причастности *Dicer* и микроРНК к регуляции половых хромосом. Очевидно, что точная связь между *Dicer*,



микроРНК, AGO-белками и сайленсингом генов половых хромосом требует дальнейшего изучения.

Потенциал внеклеточных микроРНК в качестве биомаркеров бесплодия

Помимо присутствия микроРНК на клеточном уровне в ряде исследований было показано наличие микроРНК во внеклеточных жидкостях, таких как плазма крови [104–106], слюна [107, 108], выделения из влагалища, семенная жидкость [108]. В отечественных источниках такую микроРНК называют циркулирующей. Повышение уровня внеклеточной микроРНК связано с различными физиологическими расстройствами [109]. Было отмечено изменение уровня экспрессии генов различных микроРНК, а также мРНК, специфичной для семенников при мужском бесплодии [106–109]. В связи с этим высказано предположение о возможности использования микроРНК в качестве биомаркеров мужского бесплодия.

Первый доклад об изменении уровня экспрессии генов микроРНК в яичках пациентов с необструктивной азооспермией был сделан J. Lian и соавт. [110]. Следует отметить, что необструктивная азооспермия имеет широкий спектр проявления дефектов – от криптозооспермии и блока созревания сперматозоидов до синдрома «только клеток Сертоли». Таким образом, оценка дифференциальной экспрессии генов микроРНК у пациентов с данным диагнозом важна для более точного понимания патологического процесса и расшифровки патогенеза заболевания.

C. Wang и соавт. анализировали уровень экспрессии генов микроРНК в сперме мужчин с бесплодием и сравнили результаты с аналогичными данными, полученными от фертильных мужчин (группа контроля). Они обнаружили изменения в концентрационных профилях микроРНК (более чем в 50 раз) при азооспермии и астенозооспермии для 7 микроРНК: микроРНК-34с-5р, -122, -146b-5P, -181a, -374b, -509-5р и -513A-5P. Концентрация этих 7 микроРНК была значимо (более чем в 50 раз) ниже в случае азооспермии и выше при астенозооспермии по сравнению с группой контроля (см. рис. 5). Авторы сделали вывод, что эти 7 микроРНК имеют достаточный потенциал, чтобы стать молекулярными маркерами диагностики мужского бесплодия [111].

W. Wu и соавт. оценили паттерн экспрессии генов miR-19b и let-7a у мужчин с идиопатическим бесплодием с необструктивной азооспермией или олигозооспермией с помощью количественной полимеразной цепной реакции. Они показали выраженное увеличение концентрации этих микроРНК при бесплодии по сравнению с образцами фертильных мужчин. Авторы заключили, что микроРНК-19B и let-7a являются

хорошими диагностическими молекулярными биомаркерами при идиопатическом бесплодии с необструктивной азооспермией или олигозооспермией [112].

Однонуклеотидные полиморфизмы

С учетом важности влияния микроРНК на процесс сперматогенеза можно предположить, что мутации в генах, вовлеченных в сперматогенез в зоне микроРНК-связывающего сайта, могут привести к бесплодию. H. Zhang и соавт. впервые сообщили о связи между однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) в зоне микроРНК-связывающего сайта с идиопатическим мужским бесплодием [113]. Они исследовали все ОНП в 3'-нетранслируемой области 140 генов млекопитающих, вовлеченных в сперматогенез, и заметили, что некоторые ОНП в пределах сайтов связывания микроРНК могут быть сопряжены с идиопатическим мужским бесплодием. Среди 140 исследованных генов выявлены 6 полиморфизмов (2 в CYP19, Serpina5 и 4 в CGA, CREB1, CREB2), участвующих в снижении уровня экспрессии генов при сперматогенезе и мейозе. С помощью программ биоинформатики, таких как PicTar, Miranda, TargetScan, было высказано предположение, что данные ОНП могут влиять на связывание (средство) с микроРНК [110–116].

Выводы

Мужские половые клетки имеют сложный транскриптом. Помимо кодирующих белков мРНК в нем присутствует много некодирующих РНК, включая микроРНК.

Известно, что микроРНК являются важными регуляторами экспрессии генов. Они функционируют в основном посттранскрипционно, контролируя трансляцию их целевых мессенджеров – мРНК – и участвуя в каждом этапе дифференцировки мужских половых клеток. В данном обзоре продемонстрировано значение путей микроРНК для нормального сперматогенеза. Определена функциональная роль ряда микроРНК на различных этапах дифференцировки половых клеток. Рассмотрены микроРНК в сперматозоидах и семенной плазме человека в качестве потенциальных биомаркеров мужского бесплодия.

Показано, что дисфункции при процессинге микроРНК могут привести к азооспермии и бесплодию. Другие аномалии, такие как наличие ОНП в генах, вовлеченных в сперматогенез в зоне микроРНК-связывающего сайта, либо нарушение регуляции экспрессии данных генов, также могут обуславливать бесплодие. В связи с этим исследователи предполагают, что оценка роли микроРНК может иметь диагностическое значение и в будущем расширить понимание молекулярных механизмов мужского бесплодия, а также углубить представление о патогенезе форм бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jan S.Z., Hamer G., Repping S. et al. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(12):1838–50.
2. Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013;29:163–87.
3. Miller M.P., Amon A., Unal E. Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25(6):687–96.
4. Rathke C., Baarends W.M., Awe S., Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014;1839:155–68.
5. Kotaja N., Kimmins S., Brancorsini S. et al. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* 2004;1:249–54.
6. Ruwanpura S.M., McLachlan R.I., Meachem S.J. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010;205(2):117–31.
7. Guyonnet B., Dacheux F., Dacheux J.L., Gatti J.L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *J Androl* 2011;32(6):651–64.
8. Rato L., Alves M.G., Socorro S. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev* 2012;9(6):330–8.
9. Tilly J.L., Sinclair D.A. Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell Metab* 2013;17(6):838–50.
10. Chalmel F., Rolland A.D., Niederhauser-Wiederkehr C. et al. The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(20):8346–51.
11. Laiho A., Kotaja N., Gyenesei A., Sironen A. Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. *PLoS One* 2013;8(4):e61558.
12. Matzuk M.M., Lamb D.J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Med* 2008;14(11):1197–213.
13. Kimmins S., Kotaja N., Davidson I., Sassone-Corsi P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* 2004;128(1):5–12.
14. Kimmins S., Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005;434(7033):583–9.
15. Rinn J.L., Chang H.Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 2012;81:145–66.
16. Bao J., Wu J., Schuster A.S. et al. Expression profiling reveals developmentally regulated lncRNA repertoire in the mouse male germline. *Biol Reprod* 2013;89(5):107.
17. Sun J., Lin Y., Wu J. Long non-coding RNA expression profiling of mouse testis during postnatal development. *PLoS One* 2013;8(10):e75750.
18. Soumillon M., Necsulea A., Weier M. et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep* 2013;3(6):2179–90.
19. Ascano M., Gerstberger S., Tuschl T. Multi-disciplinary methods to define RNA-protein interactions and regulatory networks. *Curr Opin Genet Dev* 2013;23(1):20–8.
20. Paronetto M.P., Sette C. Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. *Int J Androl* 2010;33(1):2–12.
21. Idler R.K., Yan W. Control of messenger RNA fate by RNA-binding proteins: an emphasis on mammalian spermatogenesis. *J Androl* 2012;33(3):309–37.
22. Meikar O., Da Ros M., Korhonen H., Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* 2011;142(2):195–209.
23. Kotaja N., Bhattacharyya S.N., Jaskiewicz L. et al. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(8):2647–52.
24. Kotaja N., Sassone-Corsi P. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNAProcessing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):85–90.
25. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 2009;10(2):94–108.
26. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318(5858):1931–4.
27. Zheng H., Fu R., Wang J.T. et al. Advances in the techniques for the prediction of microRNA targets. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):8179–87.
28. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК. *Биохимия* 2007;72(11):1427–48. [Makarova Yu.A., Kramerov D.A. Noncoding RNA. *Biokhimiya = Biochemistry* 2007;72(11):1427–48. (In Russ.)].
29. Lee Y., Kim M., Han J. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23(20):4051–60.
30. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007;8(2):93–103.
31. Pratt A.J., MacRae I.J. The RNA-induced silencing complex: a versatile genesilencing machine. *J Biol Chem* 2009;284(27):17897–901.
32. Sood P., Krek A., Zavolan M. et al. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(8):2746–51.
33. Wang Z., Yao H., Lin S. et al. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Lett* 2013;331(1):1–10.
34. Ishizu H., Siomi H., Siomi M.C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev* 2012;26(21):2361–73.
35. Siomi M.C., Sato K., Pezic D., Aravin A.A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(4):246–58.
36. Yadav R.P., Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382(1):498–508.
37. Papaioannou M.D., Nef S. MicroRNAs in the testis: building up male fertility. *J Androl* 2010;31(1):26–33.
38. McIver S.C., Roman S.D., Nixon B., McLaughlin E. A. miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update* 2012;18(1):44–59.
39. Yan N., Lu Y., Sun H. et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* 2007;134(1):73–9.
40. Yan N., Lu Y., Sun H. et al. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(4):179–86.
41. McIver S.C., Stanger S.J., Santarelli D.M. et al. A unique combination of male germ cell miRNAs coordinates gonocyte differentiation. *PLoS One* 2012;7(4):e35553.
42. Niu Z., Goodyear S.M., Rao S. et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(31):12740–5.
43. He Z., Jiang J., Kokkinaki M. et al. MiRNA-20 and miRNA-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the posttranscriptional level via targeting STAT3 and Ccnd1. *Stem Cells* 2013;31(10):2205–17.
44. Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 2014;101(6):1552–62.
45. Ro S., Park C., Sanders K.M. et al. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol* 2007;311(2):592–602.
46. Smorag L., Zheng Y., Nolte J. et al. MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated



- spermatogenesis regulation. *Biol Cell* 2012;104(11):677–92.
47. Marcon E., Babak T., Chua G. et al. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res* 2008;16(2):243–60.
48. Ro S., Park C., Young D. et al. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007;35(17):5944–53.
49. Ortogero N., Hennig G.W., Langille C. et al. Computer-assisted annotation of murine Sertoli cell small RNA transcriptome. *Biol Reprod* 2013;88(1):3.
50. Papaioannou M.D., Pitetti J.L., Ro S. et al. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 2009;326(1):250–9.
51. Papaioannou M.D., Lagarrigue M., Vejnar C.E. et al. Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(4):M900587MCP200.
52. Panneerdoss S., Chang Y.F., Buddavarapu K.C. et al. Androgen-responsive microRNAs in mouse Sertoli cells. *PLoS One* 2012;7(7):e41146.
53. Nicholls P.K., Harrison C.A., Walton K.L. et al. Hormonal regulation of sertoli cell micro-RNAs at spermiation. *Endocrinology* 2011;152(4):1670–83.
54. Schwarz D.S., Zamore P.D. Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev* 2002;16(9):1025–31.
55. Stark A., Brennecke J., Bushati N. et al. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005;123(6):1133–46.
56. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M. et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 2003;115(7):787–98.
57. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33(20):e179.
58. Shingara J., Keiger K., Shelton J. et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA* 2005;11(9):1461–70.
59. Nozawa M., Miura S., Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in *Drosophila* species. *Genome Biol Evol* 2010;2:180–9.
60. Song R., Hennig G.W., Wu Q. et al. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(32):13159–64.
61. Ewen K.A., Koopman P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 2010;323(1):76–93.
62. Wainwright E.N., Jorgensen J.S., Kim Y. et al. SOX9 regulates microRNA miR-202-5p/3p expression during mouse testis differentiation. *Biol Reprod* 2013;89(2):34.
63. Rakoczy J., Fernandez-Valverde S.L., Glazov E.A. et al. MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis. *Biol Reprod* 2013;88(6):143.
64. Matsui Y. The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential. *J Androl* 2010;31(1):61–5.
65. De Rooij D.G., Russell L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000;21(6):776–98.
66. Huszar J.M., Payne C.J. MicroRNA 146(Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biol Reprod* 2013;88(1):15.
67. Yang Q.E., Racicot K.E., Kaucher A.V. et al. MicroRNAs-221 and -222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development* 2013;140(2):280–90.
68. Tong M.H., Mitchell D.A., McGowan S.D. et al. 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(3):72.
69. Tong M.H., Mitchell D., Evanoff R., Griswold M.D. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod* 2011;85(1):189–97.
70. Mayr F., Heinemann U. Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation – a structural and functional perspective. *Int J Mol Sci* 2013;14(8):16532–53.
71. Zheng K., Wu X., Kaestner K.H., Wang P.J. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol* 2009;9:38.
72. Gillis A.J., Stoop H., Biermann K. et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int J Androl* 2011;34(4 Pt 2):e160–74.
73. Gaytan F., Sangiao-Alvarellos S., Manfredi-Lozano M. et al. Distinct expression patterns predict differential roles of the miRNA-binding proteins, LIN28 and LIN28b, in the mouse testis: studies during postnatal development and in a model of hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinology* 2013;154(3):1321–36.
74. Aeckerle N., Eildermann K., Drummer C. et al. The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod* 2012;18(10):477–88.
75. Chakraborty P., Buaas F.W., Sharma M. et al. LIN28A marks the spermatogonial progenitor population and regulates its cyclic expansion. *Stem Cells* 2014;32(4):860–73.
76. Murchison E.P., Stein P., Xuan Z. et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* 2007;21(6):682–93.
77. Platts A.E., Dix D.J., Chemes H.E. et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007;16(7):763–73.
78. Romero Y., Meikar O., Papaioannou M.D. et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PLoS One* 2011;6(10):e25241.
79. Bouhallier F., Allioi N., Laval F. et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010;16(4):720–31.
80. Liang X., Zhou D., Wei C. et al. MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1. *PLoS One* 2012;7(3):e33861.
81. Bao J., Li D., Wang L. et al. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J Biol Chem* 2012;287(26):21686–98.
82. Meikar O., Da Ros M., Kotaja N. Epigenetic regulation of male germ cell differentiation. *Subcell Biochem* 2012;61:119–38.
83. Dai L., Tsai-Morris C.H., Sato H. et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) – null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem* 2011;286(52):44306–18.
84. Yu Z., Raabe T., Hecht N.B. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod* 2005;73(3):427–33.
85. Bjork J.K., Sandqvist A., Elsing A.N. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development* 2010;137(19):3177–84.
86. Akerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(8):545–55.
87. Missirlis P.I., Smailus D.E., Holt R.A. A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *BMC Genomics* 2006;7:73.
88. Landel C.P., Chen S.Z., Evans G.A. Reverse genetics using transgenic mice. *Annu Rev Physiol* 1990;52:841–51.
89. Hoess R.H., Ziese M., Sternberg N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79(11):3398–402.
90. Kuhn R., Wurst W. *Gene Knockout Protocols*. 2nd Edition. New-York: Humana Press, 2009. 517 p.



93. Hayashi K., Chuva de Sousa Lopes S.M., Kaneda M. et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 2008;3(3):e1738.
94. Maatouk D.M., Loveland K.L., McManus M.T. et al. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod* 2008;79(4):696–703.
95. Liu D., Li L., Fu H. et al. Inactivation of Dicer1 has a severe cumulative impact on the formation of mature germ cells in mouse testes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422(1):114–20.
96. Korhonen H.M., Meikar O., Yadav R.P. et al. Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PLoS One* 2011;6(9):e24821.
97. Wu Q., Song R., Ortogero N. et al. The RNase III enzyme Droscha is essential for microRNA production and spermatogenesis. *J Biol Chem* 2012;287(30):25173–90.
98. Greenlee A.R., Shiao M.S., Snyder E. et al. Deregulated sex chromosome gene expression with male germ cell-specific loss of Dicer1. *PLoS One* 2012;7(10):e46359.
99. Chang Y.F., Lee-Chang J.S., Imam J.S. et al. Interaction between microRNAs and actin-associated protein Arpc5 regulates translational suppression during male germ cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(15):5750–5.
100. Meunier J., Lemoine F., Soumillon M. et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res* 2013;23(1):34–45.
101. Song R., Ro S., Michaels J.D. et al. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 2009;41(4):488–93.
102. Modzelewski A.J., Holmes R.J., Hilz S. et al. AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. *Dev Cell* 2012;23(2):251–64.
103. Johanson T.M., Lew A.M., Chong M.M. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Droscha and Dicer. *Open Biol* 2013;3(10):130144.
104. Luteijn M.J., Ketting R.F. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat Rev Genet* 2013;14(8):523–34.
105. Liu W.M., Pang R.T., Chiu P.C. et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(2):490–4.
106. Ostermeier G.C., Dix D.J., Miller D. et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360(9335):772–7.
107. Jodar M., Selvaraju S., Sandler E. et al. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 2013;19(6):604–24.
108. Sandler E., Johnson G.D., Mao S. et al. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res* 2013;41(7):4104–17.
109. Krawetz S.A., Kruger A., Lalancette C. et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011;26(12):3401–12.
110. Lian J., Zhang X., Tian H. et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:13.
111. Wang C., Yang C., Chen X. et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* 2011;57(12):1722–31.
112. Wu W., Hu Z., Qin Y. et al. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol Hum Reprod* 2012;18(10):489–97.
113. Zhang H., Liu Y., Su D. et al. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 2011;96(1):34–9.
114. Abu-Halima M., Hammadeh M., Schmitt J. et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 2013;99(5):1249–55.
115. Montjean D., De La Grange P., Gentien D. et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(1):3–10.
116. Jodar M., Kalko S., Castillo J. et al. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 2012;27(5):1431–8.