

Evaluation and Comparison of the Expression Levels of the ZBTB16 (Plzf) and ZFP Genes and Alkaline Phosphatase in Three Cell Populations: Mouse Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Stem-Like Cells (Es-Like), And Embryonic Stem Cells

Emad Reza¹ , Hossein Azizi^{1*} , Ali Asghar Ahmadi² 

¹ Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

² North Research Center, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 06 June 2022

Revised: 16 September 2022

Accepted: 23 October 2022

Published Online: 26 February 2023

* Correspondence to:

Hossein Azizi

Faculty of Biotechnology, Amol

University of Special Modern

Technologies, Amol, Iran.

Email:

h.azizi@ausmt.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: One of the vital enzymes during spermatogenesis, which is one of the pluripotency factors of stem cells and contributes to maintaining their pluripotency is alkaline phosphatase. ZBTB16 and ZFP proteins are critical elements in stem cells which are expressed in pluripotent stem cells and maintain their pluripotency due to their role in messaging pathways.

Material & Methods: The separation of the spermatogonial stem cells is the initial stage, followed by the preparation of the mouse embryonic stem cells and ES-like cells. The protein-protein network and the connections between genes were then investigated after alkaline phosphatase staining. Then, using the Fluidigm PCR method, the expression of the ZBTB16 and ZFP genes was determined. Finally, spermatogonia was immunohistochemically stained for the ZBTB16 protein. (Ethic Code: IR.AUSMT.REC.1400.29)

Findings: Alkaline phosphatase was expressed positively by stem cell types; moreover, it was absent in Sertoli and fibroblast cells. Additionally, the specificity of these factors was demonstrated by the positive expression of the ZBTB16 and ZFP genes in these three cells and their negative expression in Sertoli cells. The connection and effect of these genes on the other genes are shown by the Protein-Protein network analysis.

Discussion & Conclusion: Alkaline phosphatase, as well as ZBTB16 and ZFP genes are expected to be among the special markers of pluripotent stem cells and the critical elements of embryonic stem-like cells.

Keywords: Alkaline phosphatase, Embryonic stem cells, Spermatogonial stem cells (SSCs), ZBTB16 protein, ZFP protein

➤ How to cite this paper

Emad R, Azizi H, Ahmadi AA. Evaluation and Comparison of the Expression Levels of the ZBTB16 (Plzf) and ZFP Genes and Alkaline Phosphatase in Three Cell Populations: Mouse Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Stem-Like Cells (Es-Like), And Embryonic Stem Cells. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(1): 29-41.

بررسی و مقایسه میزان بیان ژن های ZFP، ZBTB16(Plzf) و آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت سلولی: سلول های بنیادی جنینی، شبه جنینی (ES-like) و اسپرم ساز موش

عماد رضا^۱ ID، حسین عزیزی^{۱*} ID، علی اصغر احمدی^۲ ID

^۱ گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

^۲ پژوهشکده شمال، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷

نویسنده مسئول:

حسین عزیزی

گروه زیست فناوری، دانشکده

زیست فناوری، دانشگاه تخصصی

فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

Email:

h.azizi@ausmt.ac.ir

مقدمه: آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیمهای اساسی طی فرایند اسپرماتوژنز است که جزو عامل های پرتوانی سلول های بنیادی است و در حفظ پرتوانی آن ها نقش دارد. پروتئین های ZFP و ZBTB16 نیز جزو عوامل با اهمیت سلول های بنیادی هستند که در سلول های بنیادی پرتوان بیان می شوند و با نقش خود در مسیرهای پیامرسانی باعث حفظ حالت پرتوانی آن ها می گردند.

مواد و روش ها: اولین اقدام، جداسازی سلول های بنیادی اسپرم ساز و پس از آن، تهیه سلول های بنیادی جنینی موش و سلول های ES-like است. پس از آن، رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز انجام شد و در ادامه، بررسی شبکه پروتئین-پروتئین و ارتباط ژن ها صورت گرفت؛ سپس با استفاده از فن Fluidigm PCR بیان ژن های ZFP و ZBTB16 سنجیده گشت و همچنین در انتها، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی پروتئین ZBTB16 در لوله های اسپرم ساز نیز انجام شد.

یافته های پژوهش: جمعیت های سلول های بنیادی بیان مثبت آلکالین فسفاتاز را نشان دادند و همچنین بیان بسیار اندک و منفی آن در سلول های سرتولی و فیروبلاستها مشاهده گردید. بیان مثبت ژن های ZFP و ZBTB16 نیز در این سه جمعیت نشان داده شد و بیان منفی آن ها در سلول های سرتولی نیز مشاهده گردید که نشان دهنده اختصاصی بودن این عوامل است. شبکه ارتباطی رسم شده نشان دهنده میزان و نوع تأثیر این ژن ها بر یکدیگر و دیگر ژن ها است.

بحث و نتیجه گیری: می توان چنین نتیجه گیری کرد که آلکالین فسفاتاز و همچنین ژن های ZFP و ZBTB16 جزو نشانگرهای خاص سلول های بنیادی پرتوان و همچنین جزو عامل های اصلی سلول های بنیادی شبه جنینی هستند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی اسپرم ساز (SSC)، سلول های بنیادی جنینی، آلکالین فسفاتاز، پروتئین ZBTB16،

پروتئین ZFP

استناد: رضا، عماد؛ عزیزی، حسین؛ احمدی، علی اصغر. بررسی و مقایسه میزان بیان ژن های ZFP، ZBTB16(Plzf) و آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت

سلولی: سلول های بنیادی جنینی، شبه جنینی (ES-like) و اسپرم ساز موش. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۲؛ ۴۱-۲۹.



اسپرماتوژنز فرایندی بسیار سازمان یافته با مراحل مختلف است (۱). عوامل و فاکتورهای بسیاری هستند که مراحل مختلف این چرخه و مسیرهای پیامرسانی دخیل در آن را تحت کنترل دارند. آلکالین فسفاتازها (AP) گروهی از آنزیمها هستند که در شرایط قلبی، مولکولهای حاوی فسفات را هیدرولیز می کنند. برای سلول بنیادی جنینی (ESC) موش، از روش آزمایشگاهی تشکیل کلونی AP مثبت، به عنوان معیاری برای سنجش پرتوانی آنها استفاده می شود (۲). اخیراً از تشکیل کلونیهای AP مثبت در مراحل اولیه برنامه ریزی مجدد سلولی، به عنوان شاخص اولیه برنامه ریزی مجدد موفق سلولها استفاده می گردد. سنجش بیان AP معیاری برای سنجش تفاوت میان سلولهای تمایز یافته و تمایز نیافته است که کمتر استفاده شده است؛ زیرا سطح بیان آن با توجه به مرحله تمایز، متفاوت است؛ در نتیجه، بیان AP یک نشانگر مناسب برای سلولهای بنیادی پرتوان است؛ اما با برخی محدودیت ها. سطح بالای AP با فوتوپهای پرتوانی و سلولهای بنیادی پرتوان تمایز نیافته همبستگی بسیار مناسبی دارد. سطح پایین فعالیت AP نشان دهنده محدودیت پرتوانی است که در سلولهای اپی بلاست و تمایز یافته مشاهده می شود (۳، ۴). در همه موارد دیگر، یعنی در SC بزرگ سالان و غیره، سطح بالای AP با فرایند تمایز همراه است (۵).

ZFP145 یکی دیگر از عوامل دخیل در اسپرماتوژنز است که در مراحل اولیه سلولهای بنیادی مشاهده شده است. اطلاعات اندکی درباره سازوکارهای مولکولی وجود دارد که چگونه و تحت چه سازوکارهای پیامرسانی، اسپرماتوگونیا (سلولهای زایای بیضه) خود تجدید شوندگی را اعمال می کنند و یا به اسپرم بالغ تمایز میابند. راجع به برخی ژن ها اطلاعات بسیار اندکی موجود است و ممکن است شناخت کامل و درک سازوکار هر کدام از این ژن ها، این حلقه های گم شده از مسیرها را کامل کند. علاوه بر این، مشخص شده است که پروتئین ZFP145، کد کننده ژن سرکوب کننده رونویسی ZBTB16، نقش مهمی در

اسپرمزایی دارد (۶، ۷). بیان ZFP145 به گنوسیتها و اسپرماتوگونی تمایز نیافته محدود می شود و در لوله های اسپرم ساز جهش یافته که بدون این سلولهای تمایز نیافته بودند، وجود ندارد (۸). موش های بدون ZFP145 با افزایش سن، دچار از دست دادن تدریجی اسپرماتوگونی میگردند که با افزایش آپوپتوز و از دست دادن ساختار لوله ها همراه است؛ اما بدون ایجاد نقص در تمایز و یا از دست دادن سلولهای سرتولی که به عنوان پشتیبان هستند (۹). ZBTB16 در غدد جنسی نر در طول دوره جنینی موش و پس از تولد بیان می شود. بیان ZBTB16 با گذشت زمان کاهش می یابد و به اسپرماتوگونی محدود میگردد. موش های نر بدون بیان ZBTB16 که یک سرکوب کننده رونویسی است، کاهش تدریجی سلولهای زاینده را به علت کاهش جمعیت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی نشان می دهند. این امر احتمالاً به سبب بیان تنظیم نشده ژنهایی است که نقش انتقال میان خودنوسازی اسپرماتوگونی و تمایز را کنترل می کنند (۱۰).

ZBTB16 بر مسیرهای پیامرسانی متنوعی از جمله چرخه سلولی، تمایز، مسیرهای مرگ سلولی برنامه ریزی شده و همچنین در رشد و بیولوژی آنها نقش اصلی دارد (۱۱). فرایندهایی از جمله اسپرمزایی و نگهداری سلولهای بنیادی جزو فرایندهایی هستند که این ژن در تنظیم و رخ دادن آنها مؤثر است (۱۲، ۱۳). از نظر مورفولوژیکی، هم نئوپلازی سلولهای زایا و هم اسپرماتوگونی به صورت سلولهای زایای بزرگ ظاهر می شوند (۱۴). در بیضه ها، ZBTB16 به طور اختصاصی در اسپرماتوگونی تمایز نیافته بیان می گردد. مطالعات نشان داده اند که ZBTB16 برای افزایش خودتجدید شوندگی سلولهای بنیادی اسپرم ساز عمل می کند و نقش کلیدی در حفظ اسپرماتوژنز طبیعی دارد (۱۵). ناباروری در موشهای ZBTB16-null به علت اختلال در خودتجدید شوندگی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی و به دنبال آن، از میان رفتن سلولهای اسپرماتوگونی مشاهده می شود (۱۶، ۱۷). ZBTB16 یک سرکوب کننده رونویسی

شناخته شده است که نقش کلیدی در اسپرم‌زایی طبیعی دارد (۱۸، ۱۹).

همان‌طور که اشاره شد، بررسی بیان ژن‌های دخیل در فرایند پیچیده اسپرماتوژنز می‌تواند کمک بزرگی در زمینه درک سازوکارهای دخیل در این فرایند و تنظیم آن‌ها طی مسیرهای سیگنالینگ باشد. از آنجاکه امروزه ناباروری بر اساس آمار روزبه‌روز فراوان‌تر می‌گردد که علل گوناگونی دارد، بسیاری از محققان در تلاش‌اند تا بتوانند با درک کاملی از این سازوکارها، راه درمانی اساسی پیدا کنند تا با تنظیم کنترل‌شده و درمان مسیرهای آسیب‌دیده بتوانند ناباروری افراد را درمان کنند. سلول‌درمانی یکی از راه‌های درمانی است که امروزه برای درمان ناباروری انجام میشود. سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی یکی از منابع جدید سلول‌های بنیادی پرتوان است که اخیراً کشف شده است و ویژگی‌هایی شبیه سلول‌های بنیادی جنینی دارد. چنانچه بتوان از این رده سلولی به‌عنوان منبع سلول‌های بنیادی برای سلول‌درمانی استفاده کرد، با توجه به دسترسی آسان به این رده سلولی، می‌تواند مسیر این روش درمانی را به‌ویژه در زمینه ناباروری مردان تسهیل کند. هدف از این مطالعه بررسی بیان دو ژن ZFP و ZBTB16 و همچنین آلکالین فسفاتاز در سه جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، جنینی و شبه‌جنینی (ES-like) است.

مواد و روش‌ها

هضم آنزیمی و کشت سلول‌های بیضه: همه مراقبت‌های حیوانی مطابق با تأیید دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل و طبق کد اخلاق ir.ausmt.rec.1400.29 صورت گرفت. در اولین مرحله، سلول‌های بیضه از سویه‌های موش نمونه‌برداری گردید؛ سپس نمونه در محلول نمکی بافر فسفات یا (Invitrogen, USA) PBS قرار داده شد. در مرحله بعد، لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه از کپسول بیضه جدا گردید. بافت حاصل که در این میان تخریب شده است، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول بافری HBSS (Laboratories GmbH Co. USA) که یون Ca و Mg دارد، به همراه آنزیم‌های هضم‌کننده DNase (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، کلاژناز تیپ IV (با غلظت ۰/۵

میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و دیسپاز (با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) قرار گرفت؛ سپس عملکرد این آنزیم‌ها در سرم جنین گاوی متوقف گردید. در ادامه، محلول به‌دست‌آمده برای به‌دست آوردن سوپانسیون تک سلولی پیپتاژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول و خارج کردن محلول سطحی، نمونه‌ها با محلول DMEM/F12 (DMEM/Nutrient Mixture F-12) شسته گردید؛ سپس محلول از فیلتر عبور داده و سانتریفیوژ شد. محلول رویی خارج گردید و سلول‌های باقی‌مانده در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونیای کشت داده شدند. سوپانسیون سلول‌های بیضه هضم شده روی ظروف کشت حاوی ژلاتین قرار گرفت. گفته‌نی است، تقریباً 1.05×10^5 سلول در هر $3/8$ سانتیمتر مربع موجود است. سلول‌های کشت‌شده در محیط GSC موش شامل محیط stemPro-34، ۱ درصد مکمل (Invitrogen, USA) N2، ۱ درصد L-گلوتامین (PAA, USA)، ۰/۱ درصد mercaptoethanol (Invitrogen, USA)، ۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر D-گلوتکز (Sigma Aldrich, USA)، ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (Sigma Aldrich, USA)، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (PAA, USA)، ۱ درصد ویتامین‌های NEAA MEM (PAA, USA)، ۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر پروژسترون (Sigma Aldrich, USA)، ۱ درصد آمینواسیدهای غیرضروری (PAA, USA)، ۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر استرادیول (Sigma Aldrich, USA)، ۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر EGF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر LIF (Millipore, USA)، ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر FGF (Sigma Aldrich, USA)، ۸ نانوگرم/میلی‌لیتر GDNF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر DL-لاکتیک اسید (Sigma Aldrich, USA) و پروژسترون (۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر)، ES-FBS 1 درصد و استرادیول (۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) کشت داده شدند (۲۰، ۲۱).

حدود ۲۴ ساعت، در دمای اتاق تثبیت گردید؛ سپس بیضهٔ دهیدراته شده در Paraplast Plus قالب گیری شد و پس از آن، بلوک های بافت بیضه با میکروتوم با ضخامت حدود ۱۰ میکرومتر بریده گشت. برش های حاصل روی اسلایدهای Superfrost Plus قرار گرفت و در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه، برش ها با استفاده از گزلیل پارافین زدایی گردید و سپس در یک سری کاهشی اتانول، دهیدراته شد. پس از آن، آنتی ژن ها با واسطهٔ گرما و بافر سیترات سدیم، pH 6 (۱۰ میلی مولار) یا EDTA، pH 8 (۱ میلی مولار) در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه احیا گردید؛ سپس آن ها که متصل نشده اند، با سرم ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد در PBS ۸۹/۷ درصد غیر فعال می شوند. نمونه حاصل با آنتی بادی های اولیه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید؛ سپس این روند برای آنتی بادی های ثانویه نشان دار نیز تکرار شد. برای رنگ آمیزی هسته از DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) به مقدار ۰/۲ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق استفاده گردید و بعد نمونه های رنگ آمیزی شده با Poly vinyl alcohol (Mowiol®) فیکس شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, BX51, Japan) و کو نفوکال (Zeiss LSM 700) بررسی سلول های نشان دار شده صورت گرفت و سپس تصاویر با دوربین LSM-TPMT Zeiss به دست آمد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن در سیستم Fluidigm Biomark: برای این آزمایش، چیپ های Fluidigm برای اندازه گیری بیان ژن های ZBTB16 و ZFP استفاده گردید. در هر نمونه، با استفاده از میکروبیپیت یا میکرومانیپلاتور حدود ۱۰۰ سلول به صورت دستی از کشت های سلولی مختلف برداشته شد و به سرعت منجمد و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی گراد نگهداری گردید (ژن خانه دار GAPDH که برای کنترل استفاده شد). این سنجش در فرایندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس که mRNA به cDNA رونویسی می شود، صورت میگیرد. در این فرایند، به طور اختصاصی توالی مدنظر در یک لولهٔ آزمایشگاهی تکثیر گردید و تعداد رونوشت های مدنظر

کشت سلول های ES-like: پس از کشت سلول های بیضهٔ نوزاد و بالغ موش در محیط کشت GS، کلونی های سلولی اسپرماتوگونی نوع I، به صورت دستی در کشت اولیه و یا پس از کشت فرعی اولیه روی لایه تغذیه کننده (MEF)، انتخاب شدند. مشخص گردیده است که کلونی های ES-like، در یک بازه زمانی بین ۱۲۵-۴۰ روز پس از شروع کشت، از این سلول های اسپرماتوگونی تولید می شوند. در مرحلهٔ بعد، سلول های تکی از کلونی های ES-like پس از ترپسینه شدن تحت شرایط محیط ES موش به دست آمد که شامل محیط با گلوکز بالا (بسته به حجم محلول)، FBS 15 درصد، محلول MEM NEAA 1 در صد، مرکاپتواتانول ۰/۱ در صد، L-گلوتامین ۱ در صد، Pen-Strep 1 در صد و LIF (۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) است. کلونی های ES-like که رشد کردند، هر ۳-۴ روز یک بار پاساژ داده شدند. این سلول ها حدود ۴ تا ۵ روز پس از شروع کشت، حجم فراوانی از فلاسک را اشغال کردند. سلول های mESC و ES-like پس از شستن با PBS و اضافه کردن ترپسین-EDTA (به مدت ۳ دقیقه)، به یک لایه تغذیه کنندهٔ MEF جدید منتقل شدند (در نهایت، ترپسین-EDTA با ۱۵ درصد FBS غیر فعال گردید) (۲۲).

سلول های TSCs (تغذیه کنندهٔ استرومایی بیضهٔ موش): پس از هضم آنزیمی بیضه، سلول های بیضه در حضور محلول DMEM با ۴۵۰۰ میلی گرم/لیتر گلوکز (بسته به حجم محلول)، FBS 20 درصد، MEM NEAA (۰/۱ میلی مولار)، گلوتامین (۲ میلی مولار)، بتا مرکاپتواتانول ۰/۱ درصد، Pen-Strep 1 درصد و bFGF (۱۰ نانوگرم)، روی فلاسک های کشت بافت T-75 کشت داده شدند. سلول های TSC از بافت بیضهٔ موش بالغ با سن ۴ تا ۸ هفته تولید گردید. در پاساژ، ۲-۳ سلول TSC برای غیر فعال سازی میتوزی از میتومایسین C (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) استفاده شد (مراحل بالا در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂ صورت گرفت).

پردازش بافت برای ایمونوهیستوشیمی (IMH): در این مرحله، نمونه برداری بافت بیضه از موش های نر انجام گردید؛ سپس در PBS شسته شد و در پارافورمالدئید ۴ درصد برای

با استفاده از Real-Time PCR TaqMan روی quantitative PCR (qPCR) BioMark Real-Time مشخص شد. عمل رونویسی معکوس در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد (به مدت ۱۵ دقیقه) با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام گرفت (که با حرارت دادن به ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه غیرفعال گردید). cDNA در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه دناتوره شد. پس از آن، عمل تقویت محصولات در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد (به مدت ۴ دقیقه به مدت ۱۴ سیکل) انجام گرفت. محصولات تقویت شده رقیق گردید و سپس با Universal PCR Master Mix در یک سیستم BioMark تجزیه و تحلیل شد. هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز گردید.

رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز: سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های ESC و سلول‌های ES-like با استفاده از NBT/BCIP (NBT: 4-Nitro blue tetrazolium chloride و BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate و TMN-Puffer، رنگ آمیزی شد. این آزمایش در pH=9.5 صورت گرفت؛ سپس با استفاده از آب دیونیزه این رنگ آمیزی متوقف گردید و با ۴ درصد PFA تثبیت شد. پس از شستشو، قالب گیری نمونه‌ها با استفاده از ژلاتین گلیسرول کایزر صورت گرفت. در نهایت، سلول‌های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

تجزیه و تحلیل مجموعه ژن‌ها و ایجاد شبکه PPI: برای بررسی ارتباطات ژن‌های مؤثر بر تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز، مطالعات *in silico* انجام شد. در این بخش، از پایگاه‌های داده موجود همچون COREMINE و NCBI استفاده و سپس از STRING و Cytoscape استفاده گردید و با جداسازی ژن‌های دارای تأثیر گذاری بر فرایند اسپرماتوژنز و ارتباط مستقیم با آلکالین فسفاتاز، شبکه ارتباطی آن‌ها رسم شد. برای بررسی‌های بیوانفورماتیکی، ژن‌های تأثیر گذار در اسپرماتوژنز ابتدا از NCBI استخراج گردید و همچنین ژن‌های دارای نقش در تنظیم بیان و فعالیت آلکالین فسفاتاز توسط COREMINE شناسایی شد و در STRING (v 11.5) برای ساخت شبکه PPI استفاده گردید. از نرم‌افزار Cytoscape vol.3.9.1 (<http://www.cytoscape.org/>)

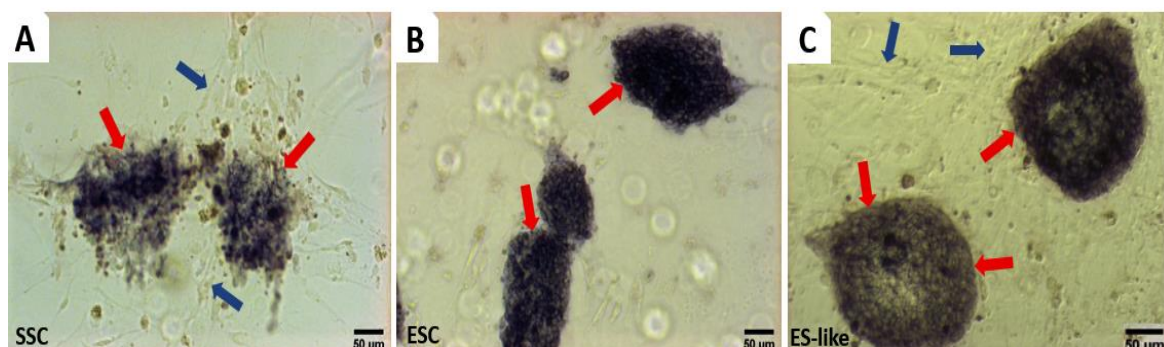
برای ایجاد و تجزیه و تحلیل شبکه PPI استفاده شد.

در ادامه، نقش‌های بیولوژیکی ژن‌ها و محل بیان آن‌ها در شبکه PPI گروه‌های همسایه دارای نقش تنظیم کنندگی بیشتر بر یکدیگر و در ارتباط مستقیم با آلکالین فسفاتاز جدا گردید؛ سپس ارتباط ژن‌های عملکردی با استفاده از تجزیه و تحلیل STRING Enrichment در نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. چندین ارتباط عملکردی مرتبط با داده‌های ما نیز (بدون در نظر گرفتن مقدار FDR) بررسی گردید و در شبکه ارتباطی حاصل نشان داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این بخش با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.26، میانگین بیان ژن‌ها در گروه‌ها محاسبه گردید و گروه‌ها با استفاده از آنالیز one-way ANOVA و سپس با آزمون Tukey، پس از T-Test ارزیابی شدند. بیان ژن‌ها با آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney مقایسه گردید. در صورتی که در نتایج مقدار $P < 0.05$ به دست آمد، تفاوت میان گروه‌ها از نظر آماری قابل اعتماد در نظر گرفته شد؛ سپس بیان ژن‌ها در جمعیت‌های سلولی آزمایش و تجزیه و تحلیل گردید و با استفاده از برنامه نویسی R و پکیج Pheatmap، نمودارهای Heatmap و دندروگرام آن‌ها رسم شد.

یافته‌های پژوهش

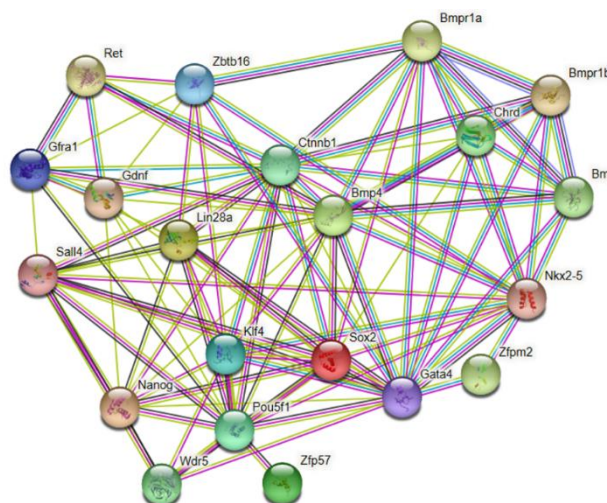
در ادامه، پس از طی مراحل جداسازی، کشت و آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات میکروسکوپی، رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز نمونه‌ها صورت گرفت. با توجه به شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود که در سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های ES-like و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان آلکالین فسفاتاز مثبت است. در اطراف تصاویر سلول‌های فیروپلاست، اپی‌پلاست و تمایز یافته‌ها را می‌بینیم که بیان ندارند و منفی هستند. در حالی که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تا حدی برای AP مثبت بودند که رنگ آمیزی ضعیف‌تر را نشان می‌دهند، سلول‌های ES-like رنگ آمیزی شدید مشابهی را برای AP در مقایسه با mESCs نشان دادند.



شکل شماره ۱. بیان آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های جنینی و سلول‌های ES-like (پیکان قرمز) و سلول‌های سرتولی و سلول‌های فیروبلست با بیان منفی (پیکان آبی)

بر اساس نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی و بررسی شبکه ارتباط پروتئینی، آلکالین فسفاتاز با ژن‌هایی همچون، *Lin28*، *Gata4*، *Klf4*، *Oct4*، *Sox2*، *Nanog*، *Ret*، *Sall4*، *Gfra1* تحت کنترل ژن‌های نامبرده است (شکل‌های شماره ۲ و ۳).

بر اساس نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی و بررسی شبکه ارتباط پروتئینی، آلکالین فسفاتاز با ژن‌هایی همچون، *Lin28*، *Gata4*، *Klf4*، *Oct4*، *Sox2*، *Nanog*، *Ret*، *Sall4*، *Gfra1*

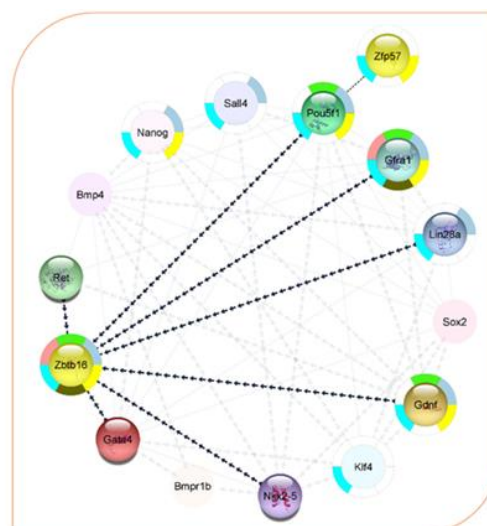


شکل شماره ۲. آنالیز شبکه ارتباطی پروتئین-پروتئین ژن‌های اصلی دخیل در تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز. این شبکه ارتباطی با توجه به نقش هریک از ژن‌ها و با استفاده از منابع مختلف که تأثیر و ارتباط این ژن‌ها را مشخص می‌کنند، رسم شده است (جدول راهنمای خطوط).

مشخص شده است که در راهنمای شکل شماره ۳ قابل مشاهده است؛ همچنین مشخص گردید که بیان *Oct4* حلقه اتصال ارتباط میان دو ژن *ZFP* و *ZBTB16* است. *Oct4* کنترل‌کننده فعالیت و نقشهای این دو ژن است و از این طریق می‌تواند تأثیر خود را بر مسیرهای پیام‌رسانی بگذارد.

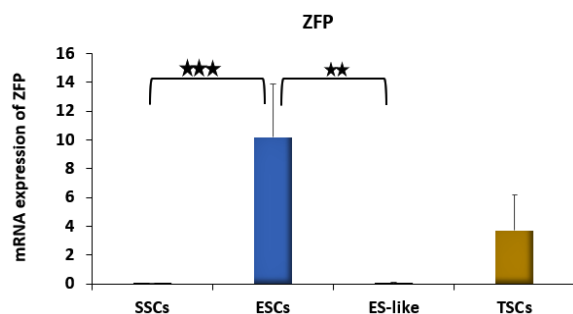
در مرحله بعدی، ژن‌های با تأثیر مستقیم بر یکدیگر از میان ژن‌های بالا جدا شدند که بر اساس این، شبکه ارتباطی آن‌ها رسم گردید. در این شبکه، ژن‌های *ZFP*، *Pou5f1*، *ZFP*، *Gdnf* بیشترین ارتباط را باهم دارند که در این مقاله به بررسی سه مورد از آن‌ها پرداخته شد. در این شکل محل دقیق بیان هریک از این عوامل نیز

Term names	description	FDR value	Color
BTO:0000535	Germ cell	2.15E-10	Blue
BTO:0000958	Spermatogonium	2.45E-8	Green
BTO:0004982	Gonocyte	6.9E-4	Pink
BTO:0000081	Reproductive system	8.2E-4	Cyan
BTO:0001235	Seminiferous tubule	0.0028	Brown
BTO:0000082	male reproductive system	0.0197	Yellow



شکل شماره ۳. شبکه ارتباطی ژن های ZFP و ZBTB16. نحوه تأثیر آن ها و تنظیم هریک بر دیگری توسط خطوط درون شبکه و همچنین محل بیان هر ژن در سلول ها و غدد جنسی (در جدول راهنما) مشخص شده است.

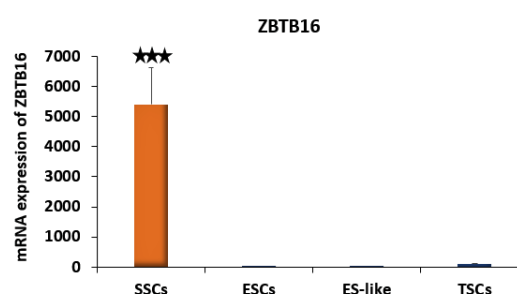
هستند؛ اما گفتنی است، بیان آن ها در سطح بسیار پایینی مشاهده شده است. نمونه سلول TSC نیز بیان مثبتی را نشان می دهد که این موضوع بیانگر حضور این ژن در سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته اسپرماتوگونی است؛ در نتیجه، این ژن می تواند در روند تمایز سلول های بنیادی اسپرم ساز نیز نقش داشته باشد.



شکل شماره ۵. بیان mRNA ژن ZFP در سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like. ژن ZFP در سلول های بنیادی جنینی به طور معنی داری نسبت به رده های سلولی سلول های ES-like و همچنین سلول های بنیادی اسپرم ساز ($P < 0.001$) بیان شده است.

همچنین برای مقایسه بهتر بیان ژن های ZFP و ZBTB16 در جمعیت های سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like، نمودار Heatmap و دندروگرام آن ها رسم گردید (شکل شماره ۶). در این نمودار نیز شباهت و نزدیکی سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like از نظر بیان این دو ژن عامل پرتوانی، قابل مشاهده است.

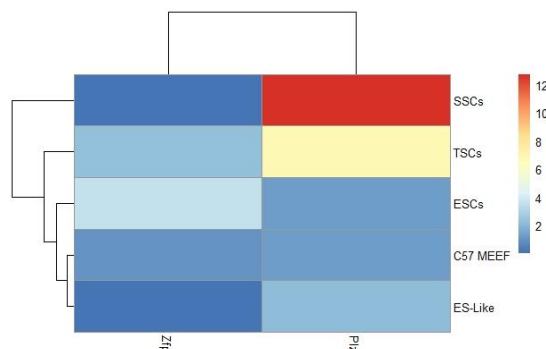
در ادامه، با بررسی آزمون PCR Fluidigm، بیان ژن های ZFP و ZBTB16 در سه رده سلولی سلول های بنیادی جنینی، سلول های ES-like و سلول های بنیادی اسپرم ساز سنجیده شد. بدین منظور، بیان ژن ZBTB16 بررسی گردید که بر اساس مشاهدات، بیان این ژن در سلول های بنیادی اسپرم ساز به شدت بالا است و نسبت به دو رده دیگر، معنی داری فراوانی ($P < 0.01$) دارد (شکل شماره ۴). سلول های بنیادی جنینی و ES-like نیز بیان مثبتی دارند؛ اما مانند ژن پیشین، سطح بیان آن ها بسیار پایین است و همچنین سلول های TSC نیز بیان مثبتی را نشان می دهند.



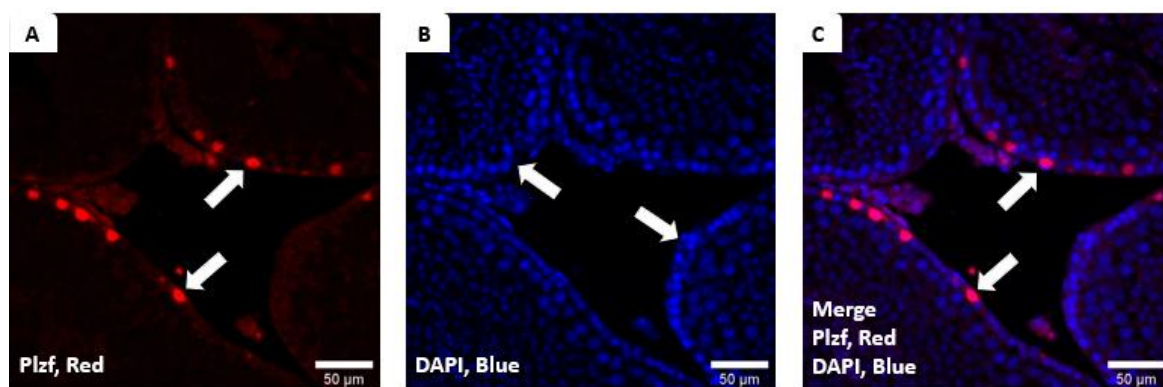
شکل شماره ۴. بیان mRNA ژن ZBTB16 در سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like. بیان ژن ZBTB16 در سلول های بنیادی اسپرم ساز بسیار بالا و معنی داری ($P < 0.001$) نسبت به دیگر جمعیت های سلولی دارد.

در ادامه، بر اساس نتایج به دست آمده مشاهده شد که ژن ZFP در سلول بنیادی جنینی بیان مثبت و معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به دو رده دیگر دارد (شکل شماره ۵). سلول های بنیادی اسپرم ساز و ES-like نیز دارای بیان مثبت

پس از بررسیهای بیشتر، با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بیان پروتئین ZBTB16 بررسی شد که یکی از ژنهای حیاتی در فرایند اسپرماتوژنز است و همچنین نقش تنظیم کننده بر فعالیت آلكالین فسفاتاز دارد (شکل شماره ۷). علاوه بر این، هسته های سلول های موجود در لوله های اسپرم ساز با استفاده از رنگ آمیزی مخصوص هسته ای رنگ آمیزی گردید و در ادامه، تفاوت بیان هسته ای و سیتوپلاسمی پروتئین ZBTB16 بررسی شد. همان طور که مشخص است، بیان ZBTB16 در لوله های اسپرم ساز بیشتر سیتوپلاسمی است.



شکل شماره ۶. نمودار Heatmap و دندروگرام بررسی بیان ژنهای ZBTB16(Plzf) و ZFP در جمعیت های سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های بنیادی جنینی و سلول های ES-like. بیان های بیشتر با رنگ قرمز و بیان های اندک با رنگ آبی مشخص شده اند.



شکل شماره ۷. الگوی بیان ژن ZBTB16 (Plzf) در لوله های اسپرم ساز موش توسط میکروسکوپ کونفوکال UV؛ A. نشان دهنده رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین ZBTB16 (پیکان سفید نشان دهنده بیان ژن Plzf) است؛ B. رنگ آمیزی هسته ای DAPI نشان دهنده هسته سلول ها (آبی رنگ، پیکان سفید) و C. تصویر همپوشانی Merge شده که تفاوت بیان هسته ای و سیتوپلاسمی پروتئین ZBTB16 را نمایان می کند.

بحث و نتیجه گیری

ناباروری یکی از مشکلات اصلی ادامه نسل و بقای بشر است. علل فراوانی وجود دارد که موجب به وجود آمدن این اتفاق می شوند. اختلالات ژنتیکی، آسیب های وارده به اندام های تولید مثل، اشعه های مضر، نحوه زندگی و حتی رژیم غذایی از جمله عوامل بروز این بیماری هستند. یکی از آسیب هایی که تحت این عوامل ایجاد می شود، تولید نکردن و یا تولید ناقص اسپرم در مردان است. اسپرم بالغ طی فرایند اسپرماتوژنز از سلول های بنیادی اسپرم ساز بیضه تولید می گردد. این فرایند بسیار سازمان یافته است و تا امروز سازوکارهای مولکولی و پیامرسانیهایی که وظیفه هدایت و کنترل آن را بر عهده دارند، تماماً شناخته نشده اند. با درک کامل عوامل تأثیر گذار و استفاده از این عوامل برای درمان ناباروری می توان راهی

قطعی برای درمان این بیماری به دست آورد. آلكالین فسفاتاز یکی از عوامل تأثیر گذار در اسپرماتوژنز است. در این مطالعه، بیان آن در سه رده از سلول های بنیادی موش بررسی گردید. بر اساس نتایج مشاهده شده، بیان این آنزیم در سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های بنیادی جنینی و سلول های شبه جنینی (ES-like) مثبت است و با توجه به منفی بودن بیان آن در سلول های تمایز یافته مشاهده شده در نتایج آزمایش ها، احتمالاً در حفظ حالت پرتوانی سلول های بنیادی نقش ایفا می کند (۲۳). سازوکار مربوط به تغییر بیان EAP (جنینی) و GCAP (سلول های جنسی) در توده داخلی بلاستوسیت (inner cell mass) ICM، نسبت به بیان آلكالین فسفاتاز غیر اختصاصی بافتها (TNAP)، در سایر سلول های پرتوان و سلول های PG هنوز درک نشده اند. در سایر مطالعات

مشاهده شده است که فعالیت TNAP طی روند تمایز افزایش میابد، با وجود اینکه سایر نشانگرهای پرتوانی کاهش میابند (۳). باین حال، سلول های PG سطوح بالایی از Oct4، Nanog و TNAP را بیان می کنند (۲۴). متأسفانه اهمیت فعالیت AP برای سلول های پرتوان و دیگر سلول های بنیادی هنوز به طور کلی نامشخص است.

در ادامه مطالعه، به بیان ژن ZBTB16 و ZFP پرداخته گردید که هر دوی این ژنها، در هر سه رده سلولهای بنیادی جنینی، شبه جنینی و اسپرمساز، بیان مثبت داشتند. تجزیه و تحلیل ریز آرایه اسپرماتوگونی جدا شده از موش ZFP145-null، پیش از انحطاط بیضه، تغییراتی را در مشخصات بیان ژن های مرتبط با اسپرمزایی نشان داده است. نتایج مشاهده شده ZBTB16 را به عنوان یک عامل رونویسی اختصاصی اسپرماتوگونی در بیضه معرفی می کند که برای تنظیم خودنوسازی و نگهداری محیط اطراف سلول های بنیادی لازم است. ZBTB16 در غدد جنسی نر در طول جنین زایی موش و پس از تولد بیان می شود. ژوزه کاستویا و همکاران در آزمایش های خود با تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی، ZBTB16 را در بیضه موش بررسی کردند که بر اساس بیان آن ها در بیضه موش پس از تولد، بیان این پروتئین در یک هفتگی به اوج خود میرسد و در گنوسیتها و اسپرماتوگونیهها قرار میگیرد. در این مرحله از رشد، هنگامی که بیان ZBTB16 در بالاترین حد است، گنوسیتها از توقف چرخه سلولی خود خارج و وارد موج تکثیر می شوند. بیان ZBTB16 به اسپرماتوگونی محدود می گردد. این موضوع بدون وجود رنگ آمیزی ZBTB16 در جهش یافته هایی که بدون این سلول ها هستند، با هیبریداسیون درجا نشان داده شده است (۱۷). در ادامه، برای درک نوع اسپرماتوگونی که ZBTB16 را بیان می کند، برش های بیضه رنگ آمیزی شده با ZBTB16 را بررسی کردند. بیان ZBTB16 به اسپرماتوگونی ها محدود می شود (۱۵، ۱۷). در ادامه، گروه Filipponi نشان دادند که ZBTB16 مستقیماً رونویسی Kit را سرکوب می کند که نشانه تمایز اسپرماتوگونی است؛ همچنین افزایش چشمگیر

در بیان Kit نیز در اسپرماتوگونی تمایز نیافته موش ZBTB16 منفی یافت می شود؛ بنابراین، پیشنهاد می کنند که یکی از سازوکارهایی که ZBTB16 از طریق آن مجموعه سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را حفظ می کند، سرکوب مستقیم بیان Kit است (۲۵)؛ همچنین پیشنهاد شده است که غیرفعال شدن ZBTB16 باعث افزایش تکثیر اسپرماتوگونوم و به دنبال آن کاهش سریع بخش اسپرماتوگونی در حال توسعه می گردد. ژن ZFP انواع مختلفی دارد و ZFP-29 یکی از آن ها است که سطح بالایی از رونویسی را در بیضه موش بالغ نشان می دهد و ممکن است در توسعه اسپرم ها نقش داشته باشد (۲۶). یکی دیگر از این ژن ها، ZFP-4 است که در بیضه موش بالغ بیان می شود. ZFP-37 یک پروتئین اختصاصی است که در سلول های زایای مردانه بیان می گردد (۲۷، ۲۸). همان طور که گفته شد، ژن ZFP انواع مختلفی دارد و ZFP-29 یکی از آن ها است که سطح بالایی از رونویسی را در بیضه موش بالغ نشان می دهد و ممکن است در توسعه اسپرم ها نقش داشته باشد. یکی دیگر از این ژن ها، ZFP-4 است که در بیضه موش بالغ بیان می شود. پاول دنی و آلن اشورس نیز در مطالعات خود، ZFP-29 را در بیضه موش بالغ بررسی و مشاهده کردند که بیان مثبت دارد (۲۷). بیضه، ZFP-29 در اولین سلول های حاصل پس از میوز که اسپرماتیدهای گرد هستند، بیشتر بیان می گردد (۲۸). در مطالعات حسینی و همکاران نشان داده شده است که ZFP145، به عنوان سرکوب کننده رونویسی ZBTB16، نقش مهمی در اسپرمزایی دارد (۲۹). بیان ZFP145 به گنوسیتها و اسپرماتوگونی تمایز نیافته محدود می شود و در لوله های اسپرمساز جهش یافته که بدون این سلول ها بودند، وجود نداشت. موش های بدون ZFP145 با افزایش سن، دچار از دست دادن تدریجی اسپرماتوگونی شدند (۳۰، ۳۱). این مطالعات تأیید کننده نقش این دو ژن بر فرایند اسپرمزایی و ارتباط آن ها با یکدیگر هستند.

با توجه به مطالعات بررسی شبکه پروتئین-پروتئین دو ژن ZBTB16 و ZFP بر اساس نتایج، این دو ژن که در تنظیم بیان و فعالیت آلكالین فسفاتاز دخیل هستند، جزو ژن های

صورت گرفته و نتایج آزمایش ها می توان به این جمع بندی رسید که آلكالین فسفا تاز یکی از عوامل نمایان کننده سلول های بنیادی پرتوان است و در سلول های تمایز یافته بیان آن کاهش میابد؛ همچنین مشخص شد، این آنزیم به همراه ژن های ZFP و ZBTB16 جزو عامل های دارای بیان مثبت در سلول های بنیادی هستند. این ژن ها که در سلول های بنیادی اسپرم ساز بیان می شوند، می تواند به عنوان نشانگری برای تشخیص این رده سلولی استفاده گردند. بیان ZBTB16 و ZFP در سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته نشان دهنده نقش آن در هدایت سلول های بنیادی به سوی تمایز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل (طبق طرح با شماره ۸۱۹۱۳) و همچنین دانشگاه هایدلبرگ آلمان (طبق قرارداد همکاری MOU) تشکر و قدردانی میکنند، که در انجام این مطالعه همکاری های لازم در جهت تسهیل امور مربوط به اجرای آزمایش ها را انجام داده و ما را در پیشبرد مطالعات و همکاری های طرفین یاری رساندند.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تعارض منافع و اعتراضی ندارند، و موافق انتشار مقاله هستند.

کد اخلاق: IR.AUSMT.REC.1400.29

References

1. Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:2681-95. doi: 10.1007/s00018-019-03101-9.
2. Al-Rashida M, Iqbal J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. *Mini Rev Med Chem* 2015;15:41-51. doi: 10.2174/1389557515666150219113205.
3. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int* 2015;2015:628368. doi: 10.1155/2015/628368.
4. Sato M, Saitoh I, Kiyokawa Y, Iwase Y, Kubota N, Ibano N, et al. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of

تنظیم کننده اسپرماتوژنز هستند و در سلول های جنسی و بیضه، در مراحل مختلف این فرایند، میزان بیان متفاوتی دارند؛ همچنین این ژن ها با برخی دیگر از ژن های دخیل در این مسیر مرتبط اند و موجب تنظیم میزان بیان و فعالیت یکدیگر می شوند. ژن هایی از جمله Ret, Gdnf, Nanog, Klf4, Bmpr1b, ZFP, ZBTB16 (ZBTB16), Pou5f1, Sox2 و BMP جزو این شبکه ارتباطی مستقیم هستند؛ همچنین مشخص شد که بیان Oct4 حلقه اتصال ارتباط میان دو ژن ZFP و ZBTB16 است و با بیان خود در کنترل مسیر های پیام رسانی تحت کنترل، این دو ژن را مدیریت می کند؛ در نتیجه، بررسی بیان این ژن ها و نقش هریک بسیار کمک کننده است تا سازوکار پیام رسانی اسپرماتوژنز به طور کامل درک گردد.

در انتها می توان این گونه نتیجه گیری کرد که ژن های ZFP و ZBTB16 در سلول های بنیادی اسپرم ساز و سلول های بنیادی جنینی که جزو سلول های پرتوان هستند، بیان مثبت دارند و در سلول های سرتولی و سلول های فیرو بلاست حضور ندارند و چنانچه حضور داشته باشند، سطح بیان آن بسیار پایین است. با توجه به مطالب یاد شده می توان امیدوار بود که در آیندهای نزدیک بتوان از سلول های ES-like که ویژگیهای مشابه بسیاری با سلولهای بنیادی جنینی دارند، به عنوان منبعی بسیار مهم و قابل دسترسی برای درمان بیماریها به کمک سلول درمانی، به منظور درمان ناباروری و اصلاح اسپرماتوژنز ناقص استفاده کرد. با توجه به بررسیهای

Cell Maturation: Towards a New Paradigm. *Cells* 2021;10:3338. doi: 10.3390/cells10123338.

5. Pham HT, Ono M, Hara ES, Nguyen HTT, Dang AT, Do HT, et al. Tryptophan and kynurenine enhances the stemness and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. *Materials* 2021;14:208. doi: 10.3390/ma14010208.
6. Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells. *Cell (Yakhteh)* 2020;22:60. doi: 10.22074/cellj.2020.6532.
7. Azizi H, Niazi Tabar A, Mohammadi A. Experimental investigation of Ki67, POU5F1, and ZBTB16 expression in the pig and mouse

- testicular cells using immunocytochemistry and RT-PCR. *J Ilam Uni Med Sci* 2020;28:1-10. doi: 10.29252/sjimu.28.5.1.
8. Wei BH, Hao SL, Yang WX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and proliferation in mammals. *Histol Histopathol* 2022;37: 825-38. doi: 10.14670/HH-18-461.
 9. Fukuda K, Makino Y, Kaneko S, Shimura C, Okada Y, Ichiyanagi K, et al. Transcriptional states of retroelement-inserted regions and specific KRAB zinc finger protein association are correlated with DNA methylation of retroelements in human male germ cells. *Elife* 2022;11:e76822. doi:10.7554/eLife.76822.
 10. Shen Z, Chen M, Gao Y, Dong F, Cen C, Wu H, et al. The function of Foxo1 in spermatogonia development is independent of PI3K/PTEN signaling. *FASEB J* 2022;36:e22522. doi: 10.1096/fj.202200640RR.
 11. Xiao GQ, Li F, Unger PD, Katerji H, Yang Q, McMahon L, et al. ZBTB16: a novel sensitive and specific biomarker for yolk sac tumor. *Mod Pathol* 2016;29:591-8. doi: 10.1038/modpathol.2016.46.
 12. Xiao GQ, Sherrod AE, Hurth KM. ZBTB16: A new biomarker for primitive neuroectodermal tumor element/Ewing sarcoma. *Pathol Res Pract* 2019;215:152536. doi: 10.1016/j.prp.2019.152536.
 13. Damjanov I. Testicular Germ Cell Tumors: Serological and Immunohistochemical Diagnosis. *Acta Med Acad* 2021;50:58-70. doi: 10.5644/ama2006-124.326.
 14. Azizi H, Asgari B, Skutella T. Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis. *Cell J (Yakhteh)* 2019;21:281. doi: 10.22074/cellj.2019.6068.
 15. Zhou W, Shao H, Zhang D, Dong J, Cheng W, Wang L, et al. PTEN signaling is required for the maintenance of spermatogonial stem cells in mouse, by regulating the expressions of PLZF and UTF1. *Cell Biosci* 2015;5:1-10. doi: 10.1186/s13578-015-0034-x.
 16. Cao D, Snir OL. Ovary-II Germ Cell Tumors and Sex Cord Tumors. *Practical Gynecologic Pathology: Springer* 2021:263-82. doi: 10.1007/978-3-030-68608-6_10.
 17. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004;36:653-9. doi: 10.1038/ng1367.
 18. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell* 2012;10:284-98. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.004.
 19. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res* 2018;29:207-14. doi: 10.1016/j.scr.2018.04.009.
 20. Azizi H, Hamidabadi HG, Skutella T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. *Cell J (Yakhteh)* 2019;21:186. doi: 10.22074/cellj.2019.5802.
 21. Azizi H, Skutella T, Shahverdi A. Generation of mouse spermatogonial stem-cell-colonies in a non-adherent culture. *Cell J (Yakhteh)* 2017;19:238. doi: 10.22074/cellj.2016.4184.
 22. Azizi H, Conrad S, Hinz U, Asgari B, Nanus D, Peterziel H, et al. Derivation of pluripotent cells from mouse SSCs seems to be age dependent. *Stem Cells Int* 2016;2016:8216312. doi: 10.1155/2016/8216312.
 23. González F, Boué S, Belmonte JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 2011;12:231-42. doi: 10.1038/nrg2937.
 24. O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008;26:1109-16. doi: 10.1634/stemcells.2007-0801.
 25. Fukuda K, Makino Y, Kaneko S, Shimura C, Okada Y, Ichiyanagi K, et al. Potential role of KRAB-ZFP binding and transcriptional states on DNA methylation of retroelements in human male germ cells. *Elife* 2022;11:e76822. doi: 10.7554/eLife.76822.
 26. Harchegani AB, Dahan H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Effects of zinc deficiency on impaired spermatogenesis and male infertility: the role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Hum Fertil* 2018;23:5-16. doi: 10.1080/14647273.2018.1494390.
 27. Denny P, Ashworth A. A zinc finger protein-encoding gene expressed in the post-meiotic phase of spermatogenesis. *Gene* 1991;106:221-7. doi: 10.1016/0378-1119(91)90202-m.
 28. Looman C, Mark C, Åbrink M, Hellman L. MZF6D, a novel KRAB zinc-finger gene expressed exclusively in meiotic male germ cells. *DNA Cell Biol* 2003;22:489-96. doi: 10.1089/10445490360708892.
 29. Hosseini R, Marsh P, Pizzey J, Leonard L, Ruddy S, Bains S, et al. Restricted

- expression of a zinc finger protein in male germ cells. *J Mol Endocrinol* 1994;13:157-65. doi: 10.1677/jme.0.0130157.
30. Zhang S, Qiu W, Wu H, Zhang G, Huang M, Xiao C, et al. The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis. *Biochem J* 2001;359:721-7. doi: 10.1042/0264-6021:3590721.
31. Kolesnichenko M, Vogt PK. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle* 2011;10:771-5. doi: 10.4161/cc.10.5.14829.