



Analysis of the expression of PLZF and VASA genes and their protein relationships in mouse spermatogenic stem cells during the process of differentiation into sperm

Babatabar Darzi M^a, Nemati F^{a*}, Azizi H^b, Dehpour Jouybari A^a

¹ Department of biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

² Department of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Babatabar Darzi M, Nemati F, Azizi H, Dehpour Jouybari A. Immunohistochemistry and immunocytochemistry analysis of PLZF and VASA in mice testis during spermatogenesis. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(2): 153-165



<https://10.61186/JCT.14.2.153>

KEYWORDS

Germ cells
Spermatogonial stem cells
PLZF
VASA

ABSTRACT

Aim: Spermatogonial stem cells (SSCs) are the basis of male spermatogenesis and fertility. SSCs are distinguished by their ability to self-renew and differentiate into spermatozoa throughout the male reproductive life and pass genetic information to the next generation. Immunohistochemical analysis showed PLZF-positive cells in the basement membrane of the seminiferous tubule. It seems that the PLZF germ cell marker is specifically expressed in the spermatogonial cells of the testis. In mice with genetic deletion of the VASA gene, males show reproductive deficiency with reduced sperm production. In this study, we looked at the expression of PLZF and VASA in spermatogenic tubules and germ cells in vivo and in vitro. **Material and method:** Isolation of spermatogonial stem cells, Cultivation of testis on STO feeder layer, Immunohistochemistry (IHC), Immunocytochemistry (ICC) and Fluidigm reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), Network analysis of protein-protein interactions (PPI), Pathway enrichment analysis and gene analysis (GO), were used to analyze the expression of PLZF and VASA in mice testis tissue. **Results:** In this experimental study, whereas undifferentiated spermatogonial cells sharply express PLZF, other types of germ cells located in the seminiferous tubule were negative for this marker. In other hand, the germ cells near the basal membrane of seminiferous tubule showed expression of VASA whereas the undifferentiated germ cells located on the basal membrane were negative. The ICC analysis indicated higher expression of PLZF in the isolated undifferentiated cells in compare to the differentiated germ cells. Fluidigm real-time RT-PCR result demonstrated a significant expression ($P < 0.05$) of VASA in the spermatogonial stem cells compared to differentiated cells and also showed expression of PLZF in undifferentiated spermatogonia. In the present experiment, after the production of SSCs under the stimulation of growth factors FGF, EGF, and GDNF, immunocytochemical staining showed a clear expression of PLZF and VASA in SSCs compared to in-vivo conditions, and VASA is less expressed in these cells. The data obtained from IHC analysis showed that VASA is expressed in the center of testicular cords. The data set related to protein-protein interaction members was used in this research due to the lack of information about PLZF expression in different stages of spermatogenesis. The study of gene expression showed that several biological and functional pathways are involved in the expression of PLZF in different stages of spermatogenesis. **Conclusion:** These results clearly proved the role of PLZF as a specific marker for spermatogonial stem cells, and can be beneficial for advance research about in-vitro differentiation of SSCs to functional sperms.

* Corresponding author. Tel.: 011-42155025, Fax: 01142155025

E-mail address: f.nemati@iau.ac.ir

DOI: <https://10.61186/JCT.14.2.153>

Received: 27 Mar. 2023; Received in revised form: 7 Sep. 2023; Accepted: 17 Sep. 2023

Original Article

© Author





تجزیه و تحلیل بیان ژن های PLZF و VASA و ارتباطات پروتئینی آن در سلول های بنیادی اسپرم ساز موش طی روند تمایز به اسپرم

محمد باباتبار درزی^۱، فرخنده نعمتی^{۱*}، حسین عزیزی^۲، عباسعلی دهپور جویباری^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

^۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه فناوری های نوین ویژه آمل، آمل، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: در این تحقیق، ما به بیان PLZF و VASA در لوله های اسپرم ساز و سلول های زایای <i>in vivo</i> و <i>in vitro</i> نگاه کردیم. مواد و روش ها: جداسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا، ایمونوهیستوشیمی (IHC)، ایمونوسیتوشیمی (ICC) و واکنش زنجیره ای پلیمرز رونوشت معکوس Fluidigm (RT-PCR) برای تجزیه و تحلیل بیان PLZF و VASA در بافت بیضه موش استفاده شد. نتایج: در این مطالعه تجربی، در حالی که سلول های اسپرماتوگونیا تمایز نیافته به شدت PLZF را بیان می کنند، سایر سلول های زاینده واقع در لوله لوله اسپرم ساز برای این نشانگر منفی بودند. از سوی دیگر، سلول های زایا نزدیک غشای پایه لوله های اسپرم ساز بیان VASA را نشان دادند در حالی که سلول های زایای تمایز نیافته واقع در غشای پایه منفی بودند. تجزیه و تحلیل ICC بیانگر بیان بالاتر PLZF در سلول های تمایز نیافته جدا شده در مقایسه با سلول های زایای تمایز یافته بود. نتایج RT-PCR بلا درنگ Fluidigm بیان معنی داری ($p > 0.05$) را در سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا در مقایسه با سلول های تمایز یافته نشان داد و همچنین بیان PLZF را در اسپرماتوگونی تمایز نیافته نشان داد. نتیجه گیری: این نتایج به وضوح نقش PLZF را به عنوان یک نشانگر اختصاصی برای سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا اثبات کرد و می تواند برای تحقیقات پیشرفته در مورد تمایز آزمایشگاهی SSCs به اسپرم های عملکردی مفید باشد.</p>	<p>سلول های زاینده سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا PLZF VASA</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶</p>

۱- مقدمه

بیضه پستانداران از یک سیستم چند سلولی پیچیده تشکیل شده است که به دو بخش تقسیم می شود: لوله های اسپرم ساز و بافت بینابینی. دو نوع سلول موجود در بافت بیضه، سلول های زاینده (سلول های تمایز نیافته و تمایز یافته) و سلول های سوماتیک (شامل سلول های سرتولی، سلول های لیدیک و سلول های میوئید دور لوله ای) وظیفه تولید مثل مردانه را بر عهده دارند که انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی است (۱). سلول های اسپرماتوگونی (همچنین به عنوان سلول های بنیادی اسپرماتوگونی (SSC) که در امتداد غشای پایه لوله های اسپرم ساز قرار دارند، یکی از مهم ترین فرآیندهای بیولوژیکی را در طول زندگی مردان آغاز می کنند، اسپرماتوزن، که در نهایت منجر به تولید سلول های اسپرم می شود. از آنجایی که مطالعه

آزمایشگاهی سیستم‌های مدل متفاوتی که برای زیست‌شناسی تولیدمثل استفاده شده‌اند ممکن است کاملا امکان‌پذیر و قابل دسترس نباشد. کشت ارگانوئیدی امکان مدل‌سازی شرایط بیضه را در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کند، آن را به ابزاری قدرتمند برای مطالعه برهم‌کنش سلول-سلول خاص بافت تبدیل می‌کند و ممکن است بستری برای مطالعه فرآیند بیولوژیکی دقیقا از جمله اسپرم‌زایی فراهم کند. همه مراحل اسپرماتوژنز توسط مسیر سیگنالینگ فاکتور سلول‌های بنیادی (SCF) کنترل می‌شوند (۳ و ۲)

در پستانداران، بیضه از شبکه‌های پیچیده‌ای از لوله‌ها تشکیل شده است که از نظر عمل‌کردی منحصر به فرد هستند و مسئول بیان پتانسیل تولید مثل نر هستند. سلول‌های زایا و سلول‌های سوماتیک در بیضه همکاری می‌کنند. از نظر عمل‌کردی، سلول‌های زایا مسئول تولید اسپرماتیدها و سپس اسپرم‌ها در طی مراحل اسپرم‌زایی هستند. در مرحله اول، اسپرماتوژنز توسط سلول‌های زایا اصلی، به نام اسپرماتوگونیا (Spg) که بر روی غشای پایه لوله‌های اسپرم ساز قرار دارند، آغاز می‌شود. Spgs پس از تقسیم دو سرنوشت دارد، اول تجدید سلول‌های زایا اصلی برای حفظ خود به عنوان سلول‌های پیش‌ساز و دوم تولید اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه. در تقسیم نهایی در اسپرماتوژنز، اسپرماتوسیت‌های ثانویه به اسپرماتید تبدیل می‌شوند که به عنوان سلول‌های باروری مردانه به اسپرم تمایز می‌یابند (۴).

ژن VASA ابتدا برای توسعه سلول‌های بنیادی زایای اووسیت (GSCs) در مگس سرکه کشف شد. در موش‌هایی با حذف ژنتیکی ژن VASA، نرها کمبود تولید مثل را با کاهش تولید اسپرم نشان می‌دهند. GSC‌های نر در مرحله زیگوتن مراحل میوز می‌میرند، در حالی که عملکرد تخمدان طبیعی به نظر می‌رسد. مشاهده شده است که VASA در PGC‌ها در موش‌ها از روز جنینی ۱۲.۵ به بعد مستقیما پس از ورود به آنلاژ گناد موضعی می‌شود. مطالعات قبلی نقش اساسی PLZF را به عنوان یک نشانگر دیگر در سرکوب مستقیم رونویسی کیت، نشانگر تمایز اسپرماتوگونیا نشان دادند (۵ و ۶). همچنین نشان داده شده است که از دست دادن ژن کدکننده PLZF تعداد محدودی از اسپرم‌های طبیعی را تولید می‌کند و سپس به تدریج منجر به فقدان نازایی می‌شود. در طول جنین‌زایی، PLZF مرحله بیان ژن اندام و الگوی اسکلتی محوری را تنظیم می‌کند. در مطالعه حاضر، بیان هم‌زمان PLZF و Oct4 را در دو نوع از جمعیت سلولی موجود در لوله اسپرم‌ساز تجزیه و تحلیل کردیم. PLZF ممکن است نقش مهمی در توسعه SSC ایفا کند. با این حال، مشخص نیست که آیا رشته میانی PLZF در طول تمایز در شرایط آزمایشگاهی مورد نیاز است یا خیر، و برخی از مطالعات بر روی ارتباط مرحله در اپی‌تلیوم منی ساز موش انجام شده است. در نهایت، چند تحقیق در مورد بیان PLZF در سلول‌های زایای نر انجام شده است. در این تحقیق، ما به بیان PLZF در لوله‌های اسپرم ساز و سلول‌های زایای *in vivo* و *in vitro* نگاه کردیم.

۲- مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، آزمایش‌های حیوانی توسط کمیته اخلاق دانشگاه فناوری‌های نوین ویژه آمل (Ir.ausmt.rec.1400.05) تایید شد. موش‌های C57BL/6 در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا: بیضه‌های موش‌ها جمع‌آوری و در محلول هضم آنزیمی حاوی DNA از (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (سیگما آلدریچ)، دیسپاز (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کلاژناز IV (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (سیگما آلدریچ) هضم شدند. در محلول نمک متعادل هنک (بافر PAA) (HBSS، ایالات متحده).

خصوصیات سلول های بیضه: پس از هضم آنزیمی، سلول های بیضه موش با استفاده از ۴ درصد پارافورمالدئید تثبیت شدند و با سانتریفیوژ سیتوسپین روی لام قرار گرفتند. اسلایدها با PBS شسته شدند، با ۱ درصد BSA/PBS مسدود شدند و یک شبه با anti-PLZF انکوبه شدند تا اسپرمتوگونی و anti-VASA نشان داده شود. سپس اسلایدها یک شبه با آنتی بادی های ثانویه مخصوص گونه های فلوروکروم انکوبه شدند. هسته ها با ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر ۴،۶-۲-diamidino phenylindole (DAPI) رنگ آمیزی شدند و سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس اسکن لیزری کانفوکال آنالیز شدند.

کشت بیضه بر روی لایه تغذیه کننده STO: SSC ها روی لایه فیدر تیوگوانین مشتق شده از جنین موش سیم کارت و مقاوم در برابر اوبین (STO) کشت داده شدند. محیط کشت شامل ۱ درصد ال-گلوتامین (PAA، ایالات متحده آمریکا)، ۱٪ مکمل N2 (Invitrogen، ایالات متحده)، محیط StemPro-34، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۶ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز D+ (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین (PAA، ایالات متحده)، ۳۰ نانوگرم در میلی لیتر استرادیول (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری (PAA، ایالات متحده)، ۰/۱ درصد β -مرکاپوتاتانول (اینویترژن، ایالات متحده)، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر FGF (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا)، ۶۰ نانوگرم در میلی لیتر پروژسترون (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا)، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر LIF انسانی (میلیپور)، ۸ نانوگرم در میلی لیتر GDNF (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۱ درصد ویتامین MEM (PAA، ایالات متحده)، ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر پیروویک اسید (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپی درمی (EGF) (سیگما آلدریج، ایالات متحده)، ۱ درصد سلول ES واجد شرایط FBS، ۱ میکرولیتر در میلی لیتر DL-لاکتیک اسید (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید اسکوربیک (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ در هوا. این روش طبق پروتکل هضم آنزیمی یک مرحله ای بود.

رنگ آمیزی ایمونوهیستو فلورسنس: بافت بیضه پس از کپسولاسیون تونیکا آلبوژینیا برداشته شد، با PBS شسته شد و در پارافورمالدئید ۴ درصد ثابت شد. بافت در طول پردازش بافت کم آب شده و در Paraplast Plus احاطه شده است. سپس، بافت با میکروتوم (معمولا ضخامت حدود ۸-۱۰ میکرومتر) برش داده شد. برش هایی از بافت بیضه بر روی لام های هیدروفیلک پلاس نصب و تا زمان استفاده در دمای اتاق نگهداری شد. در طول فرآیند رنگ آمیزی ایمونوهیستو فلورسنس، لام ها با زایلن شسته شدند و به آرامی از طریق یک سری کاهش غلظت اتانول، آب را جایگزین کردند. قبل از رنگ آمیزی، بازیابی آنتی ژن با روش بازیابی اپی توپ القا شده با حرارت (HIER) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و محل اتصال غیراختصاصی در بخش های بافت با ۱۰ درصد سرم / ۰/۳ درصد تریتون در PBS مسدود شد. خصوصیات رنگ آمیزی ایمونوهیستو فلورسنس و ایمونوسیتو فلورسنس برای این مقاطع به عنوان مطالعه گذشته دنبال شد.

رنگ آمیزی ایمونوسیتو فلورسنس: سلول های جدا شده از بیضه با ۴ درصد پارافورمالدئید تثبیت شدند، با ۰/۱ درصد Triton X-100 / PBS نفوذ پذیر شدند، با ۱ درصد BSA/PBS مسدود شدند و با آنتی بادی اولیه PLZF و VASA انکوبه شدند. این فرآیند با انکوباسیون در یک شب (۱۶ ساعت) آنتی بادی ثانویه مخصوص گونه های فلوروکروم در دمای ۴ درجه سانتی گراد ادامه یافت. سلول های نشان دار شده با رنگ آمیزی ساده هسته ای با رنگ ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر ۴،۶-

diamidino-2-phenylindole (DAPI) شناسایی شدند. سلول‌های مثبت نشاندار شده با آنتی بادی توسط میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال Zeiss LSM 700 در نظر گرفته شد و تصاویر سلول‌ها با استفاده از دوربین Zeiss LSM-TPMT به دست آمد (۸۷).

زنده ماندن سلول‌ها: سلول‌های بیضه بر روی صفحات کشت ۱۰۰ میلی‌متری کاشته شدند و به مدت ۴ روز کشت داده شدند و برای تعیین زنده ماندن تریپسینه شدند. محلول تریپان بلو در روز چهارم اضافه شد و برای آزمایش اثر تکثیر فاکتور رشد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت، نسبت سلول‌های زنده به مرده شمارش و تعیین شد.

سیستم Fluidigm Biomark: سطح بیان ژن CD-117، سلول‌های SSC و TSC توسط سیستم بیومارک fluidigm مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های SSC و TSC با تکنیک‌های میکرومانیپلاتور، لیز شده با محلول بافر لیز که حاوی ۹ میکرولیتر RT-PreAmp Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر سلول‌های مستقیم ۲× مخلوط واکنش (Invitrogen، ایالات متحده آمریکا)، ۰/۲ میکرولیتر RT/Taq Superscript III بود، لیز شدند. (Invitrogen، ایالات متحده)، ۲/۵ میکرولیتر ۰/۲× حوضچه سنجش و ۱/۳ میکرولیتر بافر TE. سپس مقدار محصول تکثیر شده کپی‌های هدف‌گیری شده با RNA را با TaqMan Fluidigm Real-time PCR بر روی سیستم BioMark fluidigm مورد بررسی قرار دادیم. نمونه‌ها در دو تکنیک فنی آنالیز شدند. مقادیر Ct با استفاده از نرم افزار GenEx و Excel محاسبه شد (۹)

استراتژی جستجو و آماده سازی داده‌ها برای تجزیه و تحلیل شبکه: مجموعه داده‌های مربوط به اسپرماتوزن از پایگاه داده ژن (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) مورد بررسی قرار گرفت. استراتژی جستجو (اسپرماتوزن) و "Mus musculus" [porgn: __txid10090] بود. سپس پروفایل‌های بیان ژن در یک فایل اکسل جمع آوری شد. برای انتخاب برهم‌کنش‌ها و خوشه‌های ژنی در این بخش $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین (PPI): ابزار آنلاین Retrieval of Interacting Genes (STRING v.11) برای پیش‌بینی تعاملات بیولوژیکی و عمل‌کردی پروتئین-پروتئین (<https://stringdb.org>) استفاده شد. ژن‌های اسپرم‌زایی با نقش مهم در ویمنتین در ابزار STRING بارگذاری شدند. PPI‌های پیش‌بینی شده برجسته شدند. برای شناسایی تنظیم‌کننده اصلی ویمنتین و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوزن برجسته شدند. ژن‌های برجسته شده به Cytoscape (نسخه ۳.۸.۲) با افزونه CentiScape برای تجزیه و تحلیل بیشتر و تجسم شبکه PPI وارد شدند.

تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر و بررسی ژن (GO): (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) Enrich، یک ابزار نرم افزار آنلاین برای آنالیز GO ژن عمل‌کردی، برای مطالعه KEGG (دانشنامه کیوتو ژن‌ها و ژنوم‌ها، <https://www.genome.jp/kegg/>) استفاده شد. و مسیر غنی سازی (<https://reactome.org/Reactome>) برای تأیید نقش بیولوژیکی ژن‌های دخیل در شبکه PPI اولین گره‌های تعامل پروتئین-پروتئین با ژن‌های ترمیم DNA، ما آنالیز غنی‌سازی ژن عمل‌کردی را با استفاده از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی STRING (<https://string-db.org>) انجام داده شد. در نرم افزار Cytoscape فرآیند بیولوژیکی با واسطه ژن‌های مرتبط با ابزار ShinyGO رسم شد.

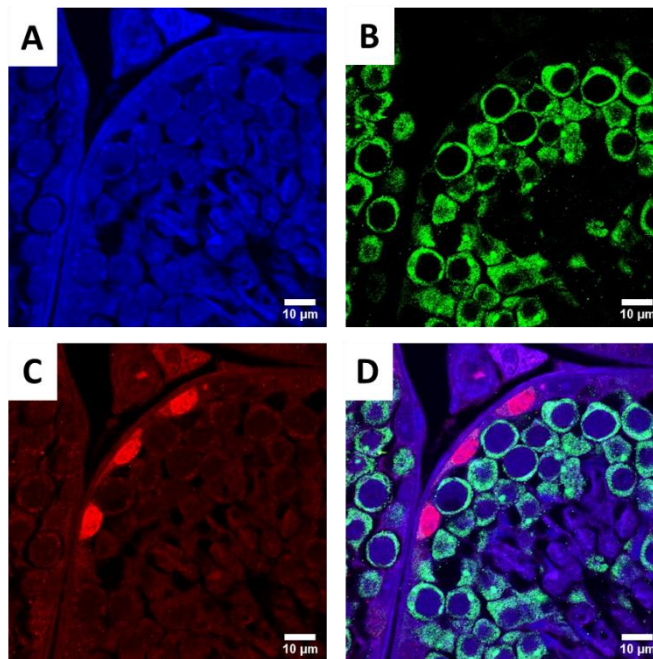
۳- آنالیز آماری

مقایسه بیان PLZF و VASA در دو جمعیت سلول های تمایز یافته و تمایز نیافته با استفاده از آزمون t نمونه های مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد ($p < 0.05$).

۴- نتایج

بیان PLZF در لوله های منی ساز با روش ایمونوهیستوشیمی

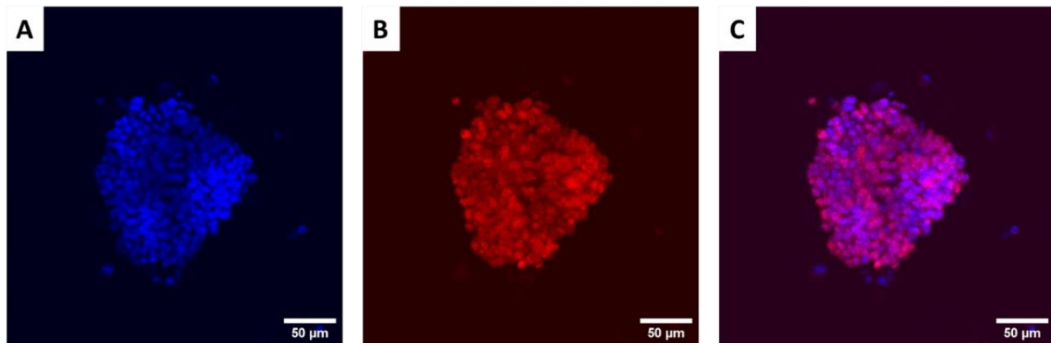
در مرحله اول، بیان PLZF و VASA را در بیضه بالغ از طریق ایمونوهیستوشیمی بررسی شد (شکل ۱). ایمونوهیستوشیمی با میکروسکوپ کانفوکال نشان داد که پروتئین PLZF در سلول های اسپرماتوگونیا که بر روی غشای پایه لوله های اسپرم ساز قرار داشتند بیان می شود (شکل ۱.B). در بخش های بیضه بالغ، سلول های VASA مثبت از طریق اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها با حذف سلول های SSC واقع در لایه سلولی که مستقیماً به غشای پایه لوله اسپرم ساز متصل هستند، توزیع شدند و در اسپرم نیز فراوان بودند (شکل ۱.C).



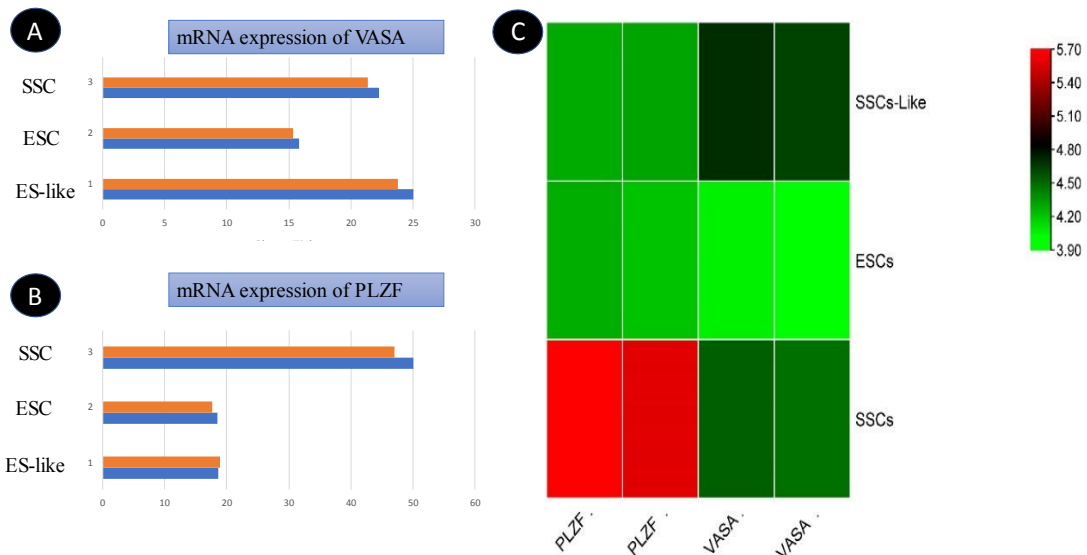
شکل ۱: آنالیز ایمونوهیستو فلورسنس در بخش بیضه. تجزیه و تحلیل ایمونوهیستو فلورسنس برای بیان PLZF در بیضه (B) و VASA (C). تصویر را با DAPI آبی (D) ادغام (نوار مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

جداسازی سلول های بیضه و بیان VASA و PLZF آنالیز ایمونوسیتوشیمیایی

به عنوان گام بعدی، سطح بیان PLZF را در SSC های بالغ پس از جداسازی و کشت روی لایه فیدر با روش ایمونوسیتوشیمی ارزیابی کردیم. تصاویر ICC نشان داد که SSC های تولید شده برای PLZF مشابه شرایط *in vivo* (شکل ۲) مثبت بودند در حالی که بیان این نشان گر در سلول های زایای متمایز کننده بسیار کم بود (شکل ۳).

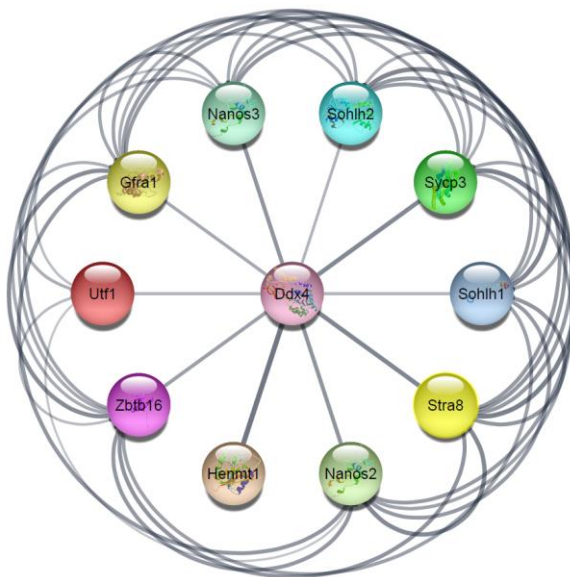


شکل ۲: آنالیز ایمونوسیتو فلورسنتس PLZF در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال. تجزیه و تحلیل immuno-cyto-fluorescence نشان داد که کلنی‌های نهایی از گسترش سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی عصاره ما، (نوار مقیاس = ۵۰ میکرومتر)



شکل ۳: بیان mRNA Vasa و PLZF. تجزیه و تحلیل Fluidigm Real-time PCR بیان Vasa در دو جمعیت سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته (A). تجزیه و تحلیل بیان PLZF در دو جمعیت سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته (B)

تجزیه و تحلیل Real-time PCR ما به‌عنوان پشتیبان برای رنگ آمیزی ایمنی ما نشان داد که بیان mRNA PLZF در SSCها به طور قابل توجهی بالاتر از سایر سلول‌های زایا بود ($p > 0.05$) در مقابل mRNA VASA که تفاوت معنی‌داری را در اسپرماتوگونی تمایز نیافته و تمایز یافته نشان نداد. (شکل ۴).



شکل ۴: تجسم PPI عمل کردهای PLZF و VASA در فرآیند اسپرم زایی. (شبکه PPI با استفاده از پایگاه داده STRING رسم شد)

برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و آنالیز GO در ژن VASA و PLZF در فرآیند اسپرماتوژنز

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با ۶۵۰ ژن با استفاده از پایگاه داده STRING (v.11) مشاهده شد. این نشان داد که یک رابطه نزدیک بین تعامل و PLZF تنظیم شده در فرآیند اسپرم سازی وجود دارد. ما سطح بالایی از تعامل بین Nanog، Tert، Nanos3، DAZL، Nanos2، Sohlh2، Sohlh2، Zbtb16، Gfra1، Sox9، Sox2، vimentin و DDX4 مشاهده شد. علاوه بر این، ارتباط واضحی بین Utr1، Zbtb16، Sohlh2، Nanos2، Sohlh2 وجود داشت. KEGG و Reactome هر مسیر سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوژنز را برای برجسته کردن تنظیم کننده اصلی مسیرهای اسپرم‌زایی انتخاب کردند. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، بین ژن‌های برجسته شده همبستگی قوی وجود دارد (شکل ۴).

آنالیز GO نشان می‌دهد ژن های vasa و plzf در آنالیز سلولی تقسیم سلول‌های بنیادین بالغ شدن اسپرم و افزایش میل تمایز در سلول بنیادی اسپرم ساز می باشد. آنالیز GO نشان می‌دهد ژن‌های vasa و plzf در آنالیز عملکرد مولکولی اتصالات Mrnae و RNA دخیل می باشد. و در آنالیز اجزای سلولی در PI-BODY حداکثر فعالیت را دارد (شکل ۵).



شکل ۵: آنالیز GO ژن های VASA و PLZF. (A) آنالیز سلولی (B) آنالیز عمل کرد مولکولی (C) آنالیز اجسام تشکیل دهنده سلولی

۵- بحث

سلول های اسپرماتوگونی (همچنین به عنوان سلول های بنیادی اسپرماتوگونی SSC)، که در امتداد غشای پایه لوله های اسپرم ساز قرار دارند، یکی از مهم ترین فرآیندهای بیولوژیکی را در طول زندگی مردان آغاز می کنند، اسپرماتوژنز، که در نهایت منجر به تولید سلول های اسپرم می شود. تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی سلول های PLZF مثبت را در غشای پایه لوله اسپرم ساز نشان داد (۱۰). به نظر می رسد نشانگر سلول های زایای PLZF به طور خاص در سلول های اسپرماتوگونیال بیضه بیان می شود. خصوصیات میکروسکوپی کانفوکال برای بخش بیضه، محلی سازی سلول های VASA مثبت در نزدیکی محفظه پایه را نشان داد (۱۱).

اثر متقابل و تنظیم PLZF در فرآیند اسپرم زایی ارتباط نزدیکی نشان داد. DAZL, Nanaos3, Sohlh2, Tert Nanaos2 و DDX4 همگی تنظیم کننده های مهم جداسازی کروموزومی در میوز هستند. VASA تنظیم کننده کلیدی مسیرهای اسپرم زایی میوز است. بنابراین، PLFZ ممکن است فاز میوز را طولانی تر کند (۴، ۱۲، ۱۳، ۱۴).

عمل کرد پروتئین (MAELSTROM (MAEL در اسپرم زایی به تدریج در حال شناسایی است، اما توزیع دقیق MAEL در سلول های اسپرماتوژن در طول اسپرم زایی هنوز مطالعه نشده است. بیان MAEL را در بیضه موش توسط ایمونوفلورسانس و میکروسکوپ ایمونوالکترونی (IEM) مطالعه شد. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس نشان داد که MAEL در بین میتوکندریایی، گرانول های دور هسته ای به شکل نامنظم و بدنه های ماهواره ای اسپرماتوسیت های پاکیتن، و در اجسام کروماتوئید اسپرماتیدها قرار دارد. SB ها به طور انحصاری در اسپرماتوسیت های پاکیتن در مراحل IX-X ظاهر شدند و به شدت برای MAEL رنگ آمیزی شدند. در مرحله ۱۲-۱۹ اسپرماتیدها، گرانول های زیادی برای MAEL رنگ آمیزی شدند اما DDX4 رنگ آمیزی نشدند. تایید شد که این گرانول ها ساختارهای غیر nuage هستند، از جمله گرانول های مرتبط با میتوکندری، بدن مشبک، بدن دانه دار توسط IEM. در ناحیه گردن اسپرماتیدهای دیررس و اسپرم، دانه های کوچک MAEL مثبت یافت شد. MAEL با MIWI در nuage و non nuage کلوکالیزه می شود. نتایج نشان می دهد که به نظر می رسد MAEL در ساختارهای nuage و non nuage عمل می کند و با MIWI تعامل دارد (۱۵).

در فرآیند اسپرم زایی، ارتباط تنگاتنگی بین تعامل و PLZF تنظیم شده وجود داشت. Tert، Nanog، vimentin و PLZF تعامل گسترده ای داشتند. برای برجسته کردن تنظیم کننده اصلی مسیرهای اسپرم زایی، KEGG و Reactome هر مسیر سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوژن را انتخاب می کنند. ارتباط قوی بین ژن های برجسته وجود دارد. یافته های ایمونوهیستوشیمی یافته های مطالعات قبلی ما در موش های بارور و تحت درمان با بوسولفان بیان DDX4 را در محفظه پایه و مجرای لوله های اسپرم ساز موش های بارور نشان داد در حالی که هیچ بیانی در موش های تحت درمان با بوسولفان مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی دو مورد انسانی با سطوح مختلف آرواسپرمی غیر انسدادی سلول های مثبت DDX4 مجرای بیشتری را نشان داد (۱۶).

از مجموعه داده های مربوط به اعضای برهمکنش پروتئین-پروتئین در این تحقیق به دلیل کمبود اطلاعات در مورد بیان PLZF در مراحل مختلف اسپرم زایی استفاده شد. مطالعه بیان ژن نشان داد که مسیرهای بیولوژیکی و عمل کردی متعددی در بیان PLZF در مراحل مختلف اسپرم زایی نقش دارند. با این حال، افزایش بیان این پروتئین با تمایز سلولی مرتبط است. اخیراً بیان PLZF با تمایز SSC، محلی سازی و مسیرهای سیگنال دهی از طریق گیرنده های سطح سلولی مرتبط شده است. بررسی های بیولوژیکی و عمل کردی نشان داد که ژن های Stat3، Mmp2، Trp53، Casp7، Aurkb، Pik3r1، Ctnnb1، Lgals3، Snai1، Cdkn1a و Pou5f1 بیان PLZF را افزایش دادند (جدول ۱). این جدول نقش ژن و بیولوژیکی را در تمایز سلول های زایایی پوشش می دهد. رابطه نزدیکی بین برهم کنش و ویمنتین تنظیم شده در فرآیند اسپرم زایی وجود داشت. تعامل بالایی بین Stat3، Mmp2، Trp53، Casp7، Aurkb، Pik3r1، Ctnnb1، Lgals3، Cdkn1a، Snai1 و Pou5f1 وجود داشت (۵ و ۱۷). علاوه بر این، ارتباط واضحی بین Stat3، Casp7، Mmp2، Trp53، Pik3r1 و وجود داشت. Reactome و KEGG هر مسیر سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوژن را برای برجسته کردن تنظیم کننده اصلی مسیرهای اسپرم زایی انتخاب کردند. همبستگی قوی بین ژن های برجسته وجود داشت (۱۸ و ۱۹).

در آزمایش حاضر پس از تولید SSCs تحت تحریک فاکتورهای رشد EGF، FGF و GDNF، رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی بیان واضحی از PLZF و VASA را در SSCها در مقایسه با شرایط in-vivo نشان داد که VASA در این سلول ها کم بیان می شود. داده های به دست آمده از تجزیه و تحلیل IHC نشان داد که VASA در مرکز طناب های بیضه بیان می شود (۲۰). ما بیان پروتئین VASA را در اسپرماتوسیت های واقع در بالای لایه سلول اسپرماتوگونیا در لوله اسپرم ساز بیضه موش بالغ و

کاهش بیان پروتئین VASA در طول اسپرم‌زایی مشاهده شد (۲۱). این ممکن است به دلیل تغییرات بافت شناسی در این بخش، از جمله جدا شدن از سلول‌های سرتولی و تغذیه کننده‌ها باشد. در واقع، سرنوشت سلول‌های زایا به تنظیم ژن کلیدی، تنظیم‌کننده‌های هورمونی و سایر پشتیبانی‌های شیمیایی و فیزیکی نیاز دارد که در شرایط رسانه‌های فرهنگی دوبعدی و سه‌بعدی به خوبی شناخته نشده‌اند. فرهنگ دو بعدی نقش مهمی در مطالعات زیست شناسی تولید مثل ایفا کرده است. به‌عنوان یک سیستم دوبعدی دیگر، سیستم‌های کشت همزمان سلول‌های زایا و سلول‌های سوماتیک، بینش‌هایی را در مورد این‌که چگونه این سلول‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در بیضه در تماس نزدیک با هم باقی می‌مانند، امکان پذیر می‌سازد. اخیراً مطالعات از کشت سه بعدی یا کشت ارگانوئیدی استفاده کردند که نتایج آن‌ها را برای شرایط *in vivo* قابل فهم می‌کند (۲۲ و ۲۳).

جدول ۱: رابطه نزدیک تعامل پروتئین-پروتئین بین تمایز و تنظیم در فرآیند اسپرم سازی

شرح	
ژن	
Klf4	Klf4 به عنوان یک فاکتور رونویسی مورد نیاز برای تمایز سلول‌های اپیتلیال پس از تکثیر شناسایی شده است. Klf4 به شدت در سلول‌های زایای <i>postmeiotic</i> تحت تمایز نهایی به سلول‌های اسپرم بیان می‌شود و همچنین در سلول‌های سوماتیک سرتولی بیان می‌شود. Klf4 ممکن است نقش مهمی در تمایز بیضه پستانداران ایفا کند.
Vim	ویمنتین یک رشته میانی با نقش‌های اساسی در مراحل تمایز سلول‌های زایای بیضه است. ویمنتین به صورت جانبی یا انتهایی به میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی متصل است.
POU5F1	در طول توسعه طبیعی، POU5F1 پروتئین را کنترل می‌کند. POU5f1/POU5F1 با تنظیم سلول‌های دارای ظرفیت پرتوان نقش مهمی در تمایز دارد. با توجه به یافته‌ها، کاهش POU5F1 در تمایز اسپرماتوگونی مرحله مهمی در فرآیند اسپرم سازی است.
Ddx4	DEAD-box پلی پپتید-۴ (Ddx4) در جنین زایی، اسپرم زایی و رشد و تقسیم سلولی نقش دارد.
DAZL	ژن حذف شده DAZL از طریق کنترل تشکیل اسپرماتیدها در کلاف‌های پس از بلوغ و همچنین دخالت منحصر به فرد در حفظ عملکرد اسپرماتوگونی در اسپرم زایی نقش دارد.
SOX2	خانواده فاکتورهای رونویسی HMG-box (SOX2) مرتبط با SRY که در تنظیم رشد جنینی نقش دارند.
SOX9	Sox9 در تمایز سلول‌های Sertoli، فعال سازی Mis و Sox8 و غیر فعال سازی Sry نقش دارد.
Zbtb16	فعال سازی افتراقی ژن‌های c-Kit و Zbtb16 در سلول‌های زایا اسپرماتوگونی مجاور توسط فعال سازی انتخابی مسیرهای سیگنالینگ کلاسیک یا غیر کلاسیک در سلول‌های سرتولی در داخل ریزنمونه‌های بیضه ایجاد شد. تحویل یک مهارکننده از هر دو مسیر به سلول‌های سرتولی بیضه موش، به سد خونی بیضه، که برای اسپرم‌زایی لازم است، آسیب رساند.
Nanog	در طول توقف میتوزی، تعداد سلول‌های زاینده NANOG مثبت به طور چشمگیری کاهش یافت. بیضه‌ها و تخمدان‌های موش بالغ فاقد سلول‌های زاینده NANOG مثبت بودند. NANOG در تکثیر سلول‌های زایا در طول رشد سلول‌های زایا بیان می‌شود.
GFRA1	گیرنده خانواده GDNF آلفا ۱ (GFRA1) نقش اساسی در حفظ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در حالت تمایز نیافته ایفا می‌کند.
Tert	تلومراز یک ریبونوکلوپروتئین پلیمرز است که انتهای تلومر را با افزودن تکرار تلومر TTAGGG حفظ می‌کند، که در تمایز بیضه در پستانداران بیان می‌شود.

۶- نتیجه گیری

نتایج ما در یک نتیجه گیری موازی با مطالعات قبلی است، و نشان می دهد که PLZF یک نشانگر اختصاصی برای SSCs هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی است و VASA یک نشانگر ژرمینال در طول اسپرماتوژنز و همچنین در اسپرماتوژنونی در حال تکثیر است که به طور خاص در SSCها در داخل بدن بیان می شود.

۷- تشکر قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دکتری زیست شناسی جانوری سلولی و تکوینی گروه زیست شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران در سال ۱۴۰۱ می باشد. از استادان راهنما سرکار خانم دکتر فرخنده نعمتی و جناب آقای دکتر حسین عزیزی تشکر می نمایم.

۸- منابع

1. Fayomi, A.P. and K.E. Orwig, Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem cell research*, 2018. 29: p. 207-214.
2. Yamauchi, Y., et al., Two genes substitute for the mouse Y chromosome for spermatogenesis and reproduction. *Science*, 2016. 351(6272): p. 514-516.
3. Shinagawa, T., et al., Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development*, 2015. 142(7): p. 1287-1292.
4. Niazi Tabar, A., et al., Testicular Localization and Potential Function of Vimentin Positive Cells during Spermatogonial Differentiation Stages. *Animals*, 2022. 12(3): p. 268.
5. Onohara, Y., et al., Localization of mouse vasa homolog protein in chromatoid body and related nuage structures of mammalian spermatogenic cells during spermatogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 2010. 133(6): p. 627-639.
6. Kim, J., H. Jung, and M. Yoon, VASA (DDX4) is a putative marker for spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015. 50: (۶) p. 1032-1038.
7. Hashemi Karoii, D. and H. Azizi, A review of protein-protein interaction and signaling pathway of Vimentin in cell regulation, morphology and cell differentiation in normal cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2022: p. 1-9.
8. Karoii, D.H., H. Azizi, and M. Amirian, Signaling Pathways and Protein-Protein Interaction of Vimentin in Invasive and Migration Cells: A Review. *Cellular Reprogramming*, 2022.
9. Azizi, H., et al., Characterization of DDX4 gene expression in human cases with non-obstructive azoospermia and in sterile and fertile mice. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2021. 22(2): p. 85.
10. Luo, H., et al., Splice variants and promoter methylation status of the Bovine Vasa Homology (Bvh) gene may be involved in bull spermatogenesis. *BMC genetics*, 20: (۱) ۱۴. ۱۳ p. 1-12.
11. Li, W., et al., A novel dynamic expression of vasa in male germ cells during spermatogenesis in the Chinese soft-shell turtle (*Pelidiscus sinensis*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 201: (۳) ۲۲۸. ۲ p. 230-239.
12. Hashemi Karoii, D., H. Azizi, and T. Skutella, Microarray and in silico analysis of DNA repair genes between human testis of patients with nonobstructive azoospermia and normal cells. *Cell Biochem Funct*, 2022.
13. Chen, L., et al., Gene ontology and KEGG pathway enrichment analysis of a drug target-based classification system. *PloS one*, 2015. 10(5): p. e0126492.
14. Hashemi Karoii, D. and H. Azizi, Functions and mechanism of noncoding RNA in regulation and differentiation of male mammalian reproduction. *Cell Biochemistry and Function*. n/a(n/a).
15. Takebe, M., Y. Onohara, and S. Yokota, Expression of MAEL in nuage and non-nuage compartments of rat spermatogenic cells and colocalization with DDX4, DDX25 and MIWI. *Histochemistry and Cell Biology*, 2013. 140(2): p. 169-181.
16. Amirian, M., et al., VASA protein and gene expression analysis of human non-obstructive azoospermia and normal by immunohistochemistry, immunocytochemistry, and bioinformatics analysis. *Scientific Reports*, 2022. 12(1): p. 17259.

17. Tanaka, S.S., et al., The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes & development*, 2000. 14(7): p. 841-853.
18. Milani, L., et al., Immunolocalization of *Vasa*, *PIWI*, and *TDRKH* proteins in male germ cells during spermatogenesis of the teleost fish *Poecilia reticulata*. *Acta Histochemica*, 2022. 124(3): p. 151870.
19. Castrillon, D.H., et al., The human *VASA* gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(17): p. 9585-9590.
20. Tsunekawa, N., et al., Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000. 127(12): p. 2741-2750.
21. Guo, X., et al., Differential expression of *VASA* gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian journal of andrology*, 2007. 9(3): p. 339-344.
22. Kobayashi, T., H. Kajiura-Kobayashi, and Y. Nagahama, Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mechanisms of Development*, 2000. 99(1-2): p. 139-142.
23. Shukalyuk, A.I., et al., *vasa*-related genes and their expression in stem cells of colonial parasitic rhizocephalan barnacle *Polyascus polygena* (Arthropoda: Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala). *Cell Biology International*, 2007. 31(2): p. 97-108.