

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۲۲، آذر ۱۴۰۲، ۹۶۲-۹۴۷

# بررسی بیان ژن *ZBTB16* با تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک و روش‌های ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی در سلول‌های بنیادی شبه جنینی برگرفته شده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا بیضه موش: یک مطالعه آزمایشگاهی

مهلا مسعودی<sup>۱</sup>، حسین عزیزی<sup>۲</sup>، داریوش غلامی<sup>۳</sup>، امیر خاکی<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۱۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا (Spermatogonia stem cells; SSCs) می‌توانند سلول‌های بنیادی شبه جنینی (Embryonic stem-like; ES-Like) را تولید کنند که هر دو دارای پتانسیل سلول‌های بنیادی پرتوان می‌باشند. ژن *ZBTB16* (Zinc Finger and BTB Domain Containing 16) عملکردهای مختلفی در مسیر سیگنالینگ، تنظیم تمایز و رشد سلولی دارد. هدف از پژوهش حاضر شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ژن *ZBTB16* با روش‌های بیوانفورماتیک و بررسی میزان بیان این ژن در SSCs و ES-Like می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا ۱۰۰ ژن دارای ارتباط و اتصال با *ZBTB16* از پایگاه پروتئینی استخراج و توسط نرم‌افزارهای مرتبط آنالیز شدند. در ادامه، سلول‌های ES-Like از SSCs بیضه موش استخراج و کشت داده شدند. سپس با انجام رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی بیان *ZBTB16* در سلول‌های ES-Like و SSCs بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که بیان *ZBTB16* در جمعیت تمایز نیافته SSCs و ES-Like به وضوح دیده می‌شود. همچنین، بیان شد که در صورت حذف *ZBTB16* از شبکه ژنی می‌توان در برخی از مسیرهای سیگنالینگ نامطلوب اختلال ایجاد کرد، زیرا *ZBTB16* به عنوان یک فاکتور رونویسی خاص در غنی کردن مسیرهای خاصی دخالت دارد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های تجربی می‌توانند از آنالیز رشد سلول‌های اسپرماتوگونیا در *in vivo* و *in vitro* حمایت کنند و روش‌های بیوانفورماتیک با شناسایی عملکردهای بیولوژیکی که *ZBTB16* در تنظیم آن‌ها دخیل می‌باشد، نشان دادند که برای ضعیف کردن برخی مسیرهای نامطلوب می‌توان از *ZBTB16* به عنوان ژن هدف استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، سلول‌های بنیادی شبه جنینی، مسیر سیگنالینگ، ارتباط پروتئین-

پروتئین، *ZBTB16*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، ایران

۲- (نویسنده مسئول) دکترای زیست شناسی سلولی و ملکولی، سلول‌های بنیادی، دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، ایران

تلفن: ۰۱۱-۴۴۴۴۲۱۳۵ دورنگار: ۰۱۱-۴۴۱۵۴۲۶۵ پست الکترونیکی: h.azizi@ausmt.ac.ir

۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، ایران

۴- دکترای تخصصی مامایی دام، استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، ایران

## مقدمه

سلول‌های بنیادی شبه جنینی (Embryonic stem-like; ES-Like) از توده سلولی پرتوان درونی (Inner cell mass; ICM) جنین‌های پستانداران مشتق شده‌اند. سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells; ESCs) نوعی از سلول‌ها هستند که قادر به خود نوسازی و تمایز چند جهته می‌باشند. عواملی از جمله فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های مسیر سیگنالینگ، سیتوکین‌ها، تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی و ترکیبات مولکولی کوچک در تنظیم خود نوسازی ESCs دخیل می‌باشند. از نظر عملکردی فاکتورهای رونویسی اصلی با فاکتورهای رونویسی کمکی در ارتباط هستند تا ژن‌های دخیل در حفظ پرتوانی را بیان کنند، این در حالی است که به سرکوب بیان ژن‌های مرتبط با تمایز نیز می‌پردازند. ESCs برای حفظ پرتوانی عوامل رونویسی ضروری را بیان می‌کنند. تنظیم خود نوسازی و تمایز ESCs با تشکیل شبکه‌های سیگنالینگ توسط این عوامل رونویسی انجام می‌شود. ESCs به دلیل توانایی در خود نوسازی نامحدود و تمایز به انواع سلول‌ها خصوصاً سلول‌های اسپرماتوگونیال، اهمیت زیادی دارند [۱].

از آن‌جا که سلول‌های جنسی توانایی انتقال اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد دارند، به عنوان مهم‌ترین سلول‌ها در اکثر موجودات در نظر گرفته می‌شوند. سلول‌های جنسی اپیتلیوم اسپرم‌ساز در بیضه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (Spermatogonia stem cells; SSCs) می‌باشند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال با ثابت نگه داشتن مخزن سلولی خود از طریق خود نوسازی باعث حفظ سلول‌های بنیادی تمایز نیافته می‌شوند، در حالی که به طور

هم‌زمان از طریق تمایز، سلول‌های اسپرماتوگونیال را ایجاد می‌کنند که به اسپرم تبدیل می‌شوند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال می‌توانند با کاهش یا از دست دادن عملکرد خود سبب ایجاد اختلال در اسپرماتوژنز شوند که در نهایت منجر به ناباروری در مردان می‌شود [۲].

وجود SSCs طبیعی برای تولید سلول‌های بنیادی شبه جنینی (ES-Like) ضروری است، زیرا SSCs می‌توانند به حالت پرتوان تمایز زدایی شوند و سلول‌های ES-Like را ایجاد کنند که دارای پتانسیل سلول‌های بنیادی پرتوان می‌باشند. سلول‌های ES-Like ممکن است به انواع گیرنده‌های متصل به غشاء و یا فاکتورهای رشد وابسته باشند. این سلول‌های پرتوان به نوبه خود می‌توانند به چندین دودمان سلولی از جمله سه لایه زایای جنینی و سلول‌های جنسی تبدیل شوند [۳]. اسپرماتوژنز یک فرآیند پیچیده است که در آن سلول‌های اسپرماتوگونیال تمایز نیافته از طریق تقسیم‌های میتوزی و میوزی متوالی و هم‌چنین بازآرایی مورفولوژیکی برای تشکیل سلولی که قادر به بارور کردن تخمک است، تغییر می‌یابند [۴].

خانواده پروتئین انگشت روی از فراوان‌ترین خانواده‌های پروتئین‌های تنظیم‌کننده در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشند که بیش از ۲۰۰ عضو آن‌ها شناخته شده است. انگشت روی و دومین ZBTB16 (Zinc Finger and BTB Domain) Containing 16 به عنوان لوسمی پرومیلوسیتیک انگشت روی (هم‌چنین Promyelocytic leukaemia zinc finger; PLZF نیز نامیده می‌شود) شناخته می‌شود، زیرا برای اولین بار در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد به شکل یک پروتئین ترکیبی با گیرنده آلفا رتینوئیک اسید (Retinoic Acid Receptor Alpha; RARA) کشف شد [۵]. جمعیت SSCs

ممکن است از نظر پتانسیل خودنوسازی و تمایز سلول‌های بنیادی، جنبه رفتاری و بیان پروتئین در طول اسپرماتوژنز دچار تغییرات متعددی شوند. در طی اسپرماتوژنز، پروتئین‌های مولکولی مانند ZBTB16 به‌عنوان مارکر حیاتی برای عملکرد SSCs به شمار می‌روند [۶]. در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی بیان ژن ZBTB16 در SSCs تمایزنیافته در بیضه موش و سلول‌های ES-Like، به بررسی ارتباط میان ژن‌های اصلی مرتبط با ZBTB16 و کشف مسیرهای سیگنالینگ تنظیم شده توسط ZBTB16 با روش‌های بیوانفورماتیک می‌پردازیم.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.AUSMT.REC.1400.03 به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل رسید.

در این مطالعه که از نوع تجربی می‌باشد، از سلول‌های بیضوی ۳ موش سویه C57BL/6 (۴ هفته) استفاده شد. به منظور هضم و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از بافت بیضه، ترکیبی از ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز IV، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DNase و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیسپاز استفاده شد. محلول هضم آنزیمی در بافر HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) حل شد. سلول‌های بیضه هضم شده در محیط SSC، متشکل از محیط StemPro-34، ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر D + گلوکز، ۱ درصد L-گلوتامین، ۱ درصد مکمل N2 کشت شدند. ۰/۱٪  $\beta$ -مرکاپتواتانول، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۱ درصد

اسیدهای آمینه غیرضروری (Non-essential amino acids; NEAA)، ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرادیول، ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر پروژسترون، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor; EGF)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاست، ۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDN (Glial cell line-derived growth factor)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی (Leukemia inhibitory factor; LIF)، ۱ درصد ویتامین‌های محیط حداقل ضروری، ۱ درصد سرم جنین گاوی واجد شرایط با سلول ES (Fetal bovine serum; FBS)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید اسکوریک، ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید پیروویک و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر DL-اسید لاکتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> در هوا می‌باشند [۷].

پس از کشت سلول‌های بیضه موش در محیط GSC، کلنی‌های SSCs نوع I به صورت دستی در طول کشت اولیه روی یک لایه تغذیه‌کننده (Mouse Embryonic Fibroblast Cells; MEF) جدا شد. مشخص شده است که کلنی‌های ES-Like در یک دوره زمانی بین ۱۲۵-۴۰ روز از آغاز کشت، از این SSCs ایجاد می‌شوند. در مرحله بعد، از طریق تریپسینه کردن محیط ES موش سلول‌های تکی از کلنی‌های ES-Like به دست آورده شد. این محیط شامل محلول با گلوکز بالا (تنظیم شده بر اساس حجم محلول)، حاوی ۱ درصد محلول NEAA، ۱۵ درصد FBS، ۱ درصد L-گلوتامین، ۰/۱ درصد  $\beta$ -مرکاپتواتانول، LIF در غلظت نهایی ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و ۱ درصد Pen/Strep می‌باشد. کلنی‌های ES-Like کشت داده شدند و ۳-۴ روز یک‌بار پاساژدهی شدند. پس از شستشو با PBS و افزودن

تریپسین-EDTA، سلول‌های ES-Like به یک لایه MEF جدید منتقل شدند. در نهایت با استفاده از ۱۵ درصد FBS، تریپسین-EDTA غیرفعال شد [۸].

برای رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی، SSCs و سلول‌های ES-Like با پارافورمالدئید ۴ درصد مخلوط شدند و سپس با Triton/PBS ۰/۱ درصد نفوذپذیر شدند. سلول‌ها با BSA/PBS ۱ درصد مسدود شدند و به دنبال آن انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه ZBTB16 انجام شد. در مرحله بعد، از آنتی‌بادی ثانویه فلوروکروم مخصوص گونه‌های فلوروکروم انکوباسیون شبانه استفاده شد و سلول‌های نشاندار شده با ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رنگ ۴ اینچ DAPI (diamidino-2-phenylindole-6) رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌های مثبت نشاندار شده با میکروسکوپ کانفوکال Zeiss LSM 700 (ساخت آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند و تصاویر با استفاده از دوربین Zeiss LSM-TPMT (ساخت آلمان) به دست آمد [۹].

سپس به منظور پردازش بافت برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بافت بیضه موش با PBS شسته شد و در پارافورمالدئید ۴ درصد فیکس شد. سپس بافت با Paraplast Plus احاطه شد و با دستگاه میکروتوم به ضخامت ۱۰ میکرومتر برش داده شد. مقاطع بافت بیضه بر روی اسلایدهای Superfrost Plus نصب شد و تا زمان استفاده در دمای اتاق نگهداری شد. برای پردازش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوفلورسانس، نمونه‌ها با زایلن شسته شدند و سپس به تدریج با آب در اتانول قبل از رنگ‌آمیزی جایگزین شدند. برای مقاطع بافتی، بازیابی آنتی‌ژن با بازیابی اپی‌توپ ناشی از گرما در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد، محل اتصال غیراختصاصی نمونه‌های بافت

با ۱۰ درصد سرم، ۰/۳ درصد تریتون در PBS مسدود شد. آزمایش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس برای این نمونه‌ها همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، ادامه یافت [۹].

تجزیه و تحلیل شبکه‌ای از تعاملات پروتئین-پروتئین (PPI) ابتدا جهت استخراج شبکه‌ای از ژن‌ها که بیشترین ارتباط را با ZBTB16 دارند و برای بررسی فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین شناخته شده و ارتباطات پیش‌بینی شده، از داده پایگاه String (<https://string-db.org>) استفاده شد. پس از رسم شبکه‌ای از پروتئین‌های مرتبط با ZBTB16 به منظور کشف دقیق‌تر روابط میان ژن‌ها و برجسته کردن جایگاه ژن ZBTB16 درون شبکه، داده‌های به دست آمده وارد نرم‌افزار Gephi نسخه 0.9.2 شدند. ژن‌ها بر اساس پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری کلاس‌بندی شده و اختلاف میان آن‌ها به صورت نمودار توسط نرم‌افزار Grapher نسخه 20.2.321 رسم شد. در ادامه از پایگاه آنالین Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) جهت تفسیر ژن‌های عملکردی کلاس‌بندی شده برای مطالعه مسیرهای سیگنالینگ بر اساس پایگاه KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) استفاده شد.

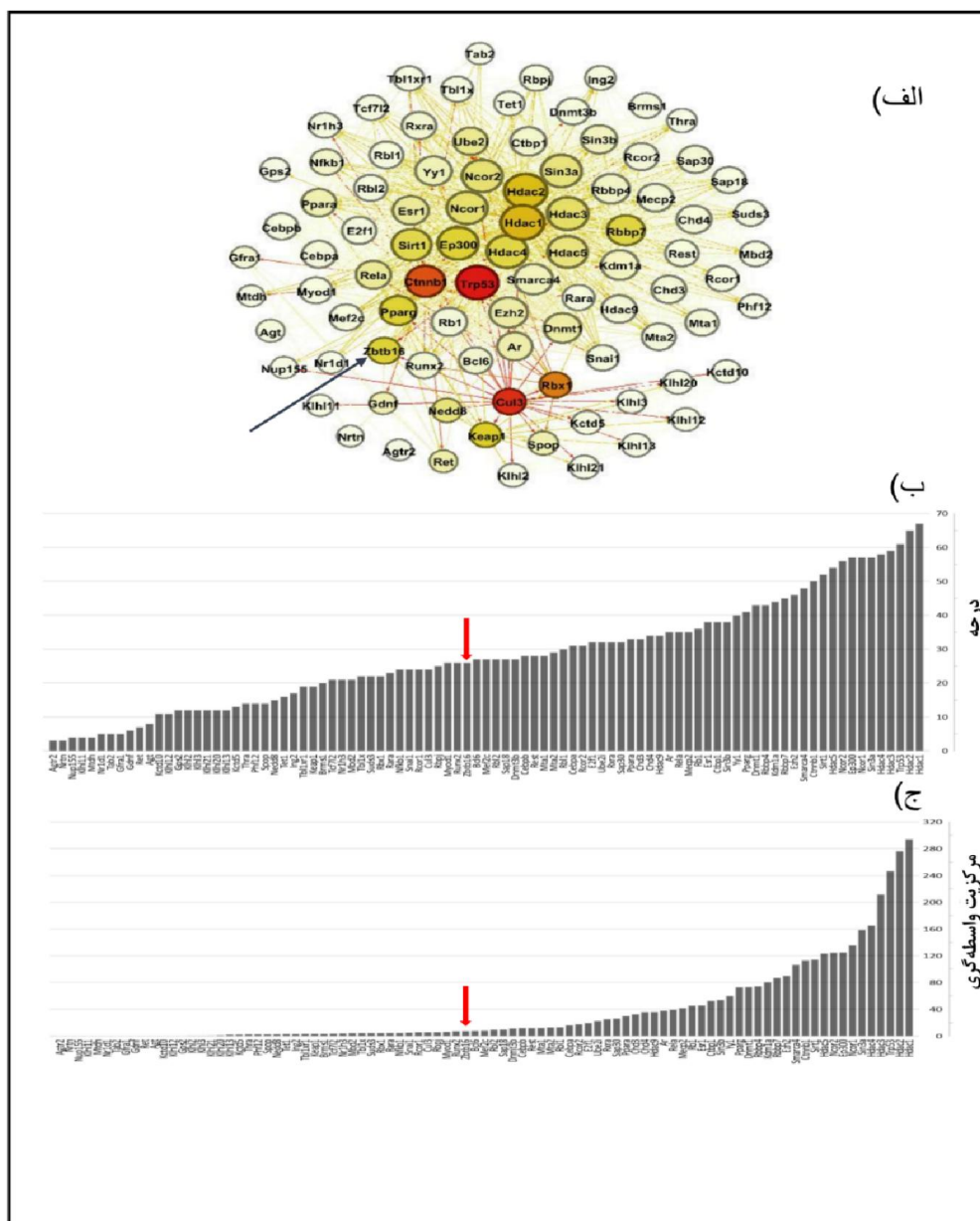
## نتایج

بیان ژن ZBTB16 در جمعیت تمایزنیافته سلول‌های اسپرماتوگونیال و ES-Like نشان داده شد. همچنین، ZBTB16 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی در اسپرم‌سازی برای تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیال بیضه معرفی و بیان شد. پروتئین‌های متصل شونده به ZBTB16 و ژن‌های مرتبط با آن برای درک بهتر مکانیسم‌های عملکردی ZBTB16 مورد بررسی قرار گرفتند. شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین

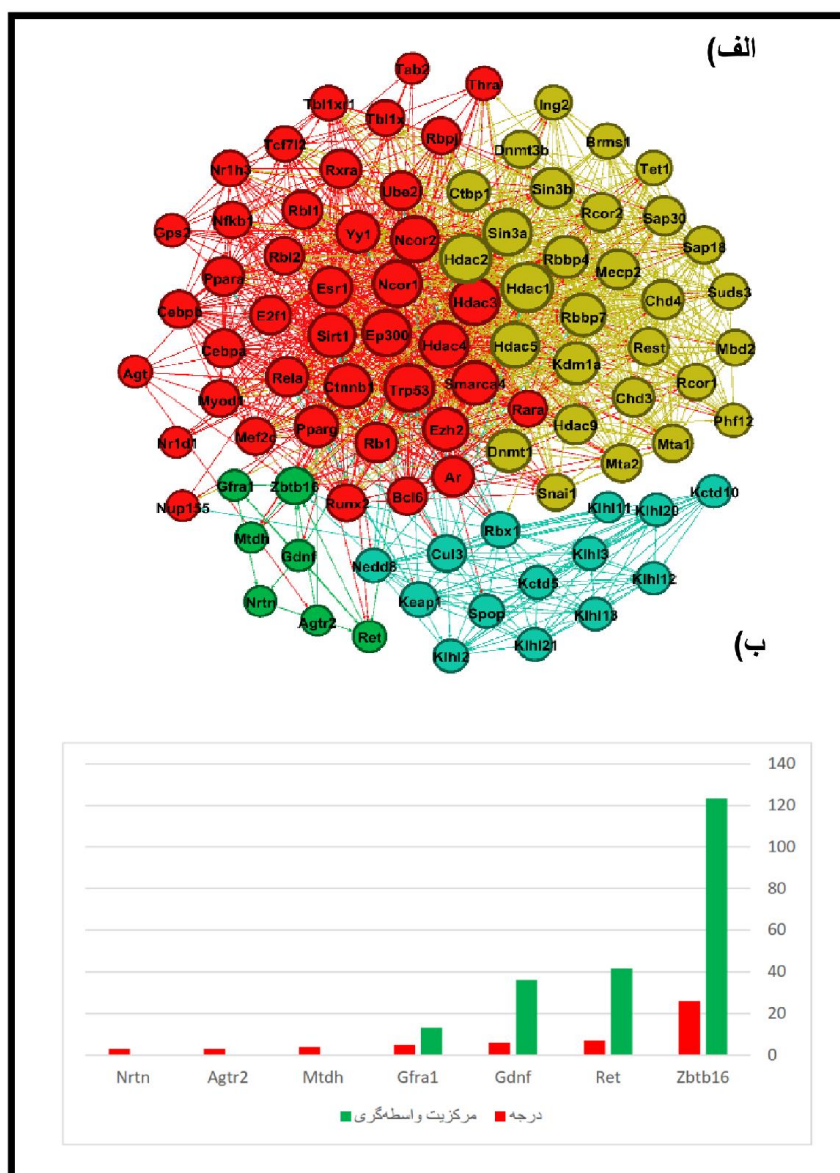
در میانه نمودار قرار دارد و حذف این ژن اختلال چندانی در کل شبکه ایجاد نمی‌کند (شکل ۱-ج) اما ژن Hdac1 با داشتن بیشترین قدرت مرکزیت واسطه‌گری و درجه، در صورت اختلال یا حذف می‌تواند عملکرد شبکه را به طور کامل مختل کند.

به منظور بررسی دقیق‌تر ارتباطات میان ژن‌های شبکه، ژن‌ها توسط نرم‌افزار Gephi کلاس‌بندی شدند. کلاس‌بندی شبکه را به زیرمجموعه‌هایی تقسیم می‌کند که ژن‌ها در بین خود ارتباطات متراکم‌تری دارند. با شناخت ارتباطات میان ژن‌ها می‌توان به وجود مسیرهای سیگنالینگ پی برد. زمانی که مجموعه‌ای از ژن‌ها با یکدیگر ارتباط نسبی بالایی دارند فرضیه ایجاد ارتباط عملکردی بیشتر را مطرح می‌کند. قرارگیری ژن‌ها در یک کلاس نشان دهنده انجام یک پروسه بیولوژیکی می‌باشد که هدف ما پی بردن به آن عملکردها است. کلونی ژن‌ها با ارتباطات بسیار بالا احتمالاً یک یا مجموعه‌ای از عملکردها را با یکدیگر انجام می‌دهند که کشف این عملکردها زمانی میسر می‌شود که کلونی ژن‌ها شناخته شود و سپس ژن‌های دخیل در آن کلونی‌ها شناسایی شوند. این شبکه دارای ۴ کلاس با بیشترین ارتباط عملکردی می‌باشد (شکل ۲-الف). برای بررسی بیشتر ژن هدف، ژن‌های موجود در کلاس مربوط به ZBTB16 را مقایسه کرده و مشخص شد که در میان آن‌ها ZBTB16 بیشترین مرکزیت واسطه‌گری و درجه را دارد و قوی‌ترین ژن موجود در این کلاس می‌باشد که در صورت حذف یا ایجاد اختلال در این ژن، عملکرد کل کلاس تا حد زیادی مختل می‌شود (شکل ۲-ب).

(PPI) بر اساس ۱۰۰ پروتئین متصل شونده به ZBTB16 با استفاده از ابزار String ساخته شدند و سپس با نرم‌افزار Gephi آنالیز شبکه انجام شد. به منظور برجسته کردن ارتباطات میان ژن‌های موجود در شبکه، سایز هر گره برای بیان درجه (Degree) که نشان از شدت ارتباط آن ژن با سایر ژن‌ها دارد، تنظیم شد. از طرفی شدت رنگ هر گره نیز نشان دهنده مرکزیت واسطه‌گری (Betweenness centrality) آن ژن می‌باشد (شکل ۱-الف). هر چه سایز گره بزرگ‌تر باشد به معنای درجه بیشتر است یعنی آن ژن با ژن‌های بیشتری در ارتباط است و هر چه درجه بالاتر باشد، گره مرکزی‌تر است. این اندازه‌گیری مهم است، زیرا بسیاری از گره‌ها با درجه‌های بالا دارای مرکزیت بالایی با سایر معیارها هستند. از طرفی هر چه رنگ گره به سمت قرمز میل کند، به این معنا است که آن گره دارای مرکزیت واسطه‌گری بالاتری است. به عبارتی آن ژن، ژن اصلی واسط میان ژن‌های موجود در شبکه می‌باشد و در صورت حذف آن، انتقال اطلاعات و ارتباط میان ژن‌ها کاهش یافته و عملکرد کلی که آن شبکه ایفاء می‌کند را دچار اختلال می‌کند و حتی ممکن است که فعالیت شبکه متوقف شود. هر چه رنگ به سمت زرد و سپس سفید میل کند، میزان مرکزیت واسطه‌گری آن ژن کاهش می‌یابد. برای تشخیص دقیق میزان پارامترهای هر گره با استفاده از نرم‌افزار Grapher نمودار مرتبط با شبکه ژنی رسم گردید. بر اساس نتایج، ژن ZBTB16 با قرار گرفتن در رتبه ۵۲ در میانه‌ی نمودار مربوط به کل ژن‌های شبکه قرار گرفت (شکل ۱-ب). از طرفی با رسم نمودار مرتبط با مرکزیت واسطه‌گری مشخص شد که ژن ZBTB16 با داشتن رتبه ۸۲ هم‌چنان



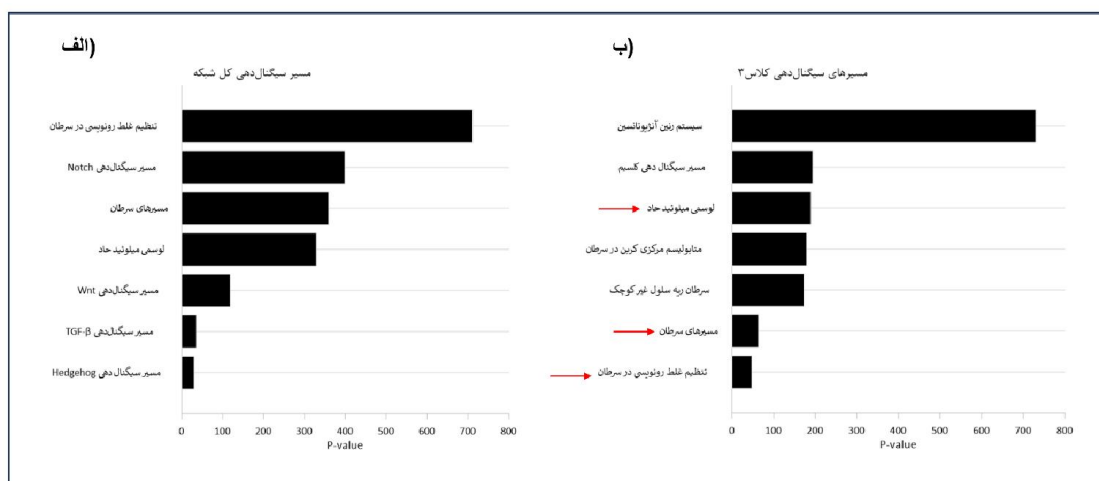
شکل ۱- آنالیز شبکه استخراج شده از String توسط نرم‌افزار Gephi. الف) هر گره نشان دهنده یک ژن می‌باشد. سایز هر گره بیانگر درجه و شدت رنگ نشان دهنده مرکزیت واسطه‌گری ژن است. ب) نمودار مقایسه ژن‌ها بر اساس پارامتر درجه. ج) نمودار مقایسه ژن‌ها بر اساس پارامتر مرکزیت واسطه‌گری. ژن *ZBTB16* در شبکه PPI از نظر پارامتر درجه دارای رتبه ۵۱ و مرکزیت واسطه‌گری با رتبه ۸۲ می‌باشد. انتظار می‌رود که حذف این ژن از شبکه تأثیر به سزایی بر فعالیت کل شبکه نداشته باشد.



شکل ۲- الف) کلاس بندی شبکه ژنی. رنگ قرمز کلاس ۰، رنگ زرد کلاس ۱، رنگ آبی کلاس ۲ و رنگ سبز کلاس ۳ را نمایش می دهند. ب) مقایسه پارامترهای ZBTB16 نسبت به سایر ژن های موجود در کلاس ۳. ZBTB16 در این کلاس بیشترین قدرت را دارد.

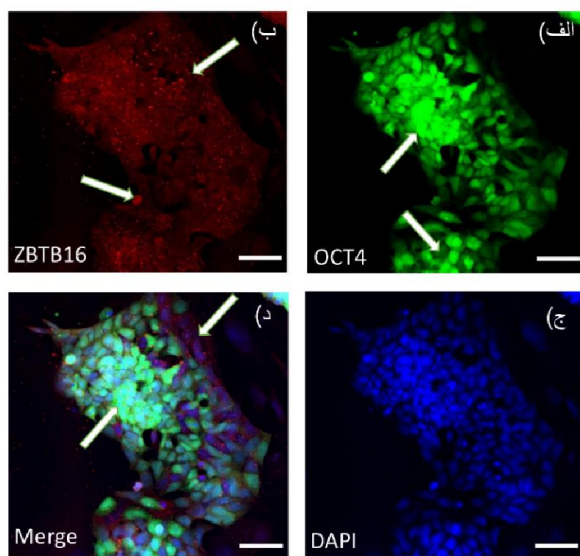
بیولوژیکی انجام شده توسط این دو گروه ژن میسر شود. اطلاعات مرتبط با مسیرهای اصلی غنی شده توسط دو گروه ژنی در شکل ۳ آورده شده است.

لیست تمامی ژن های موجود در شبکه و ژن های کلاس ۳ را به صورت مجزا وارد پایگاه آنالین Enrichr شد تا مسیرهایی که توسط این ژن ها انجام می شوند، بر مبنای پایگاه KEGG شناسایی شوند و امکان مقایسه عملکردهای



شکل ۳- مقایسه مسیرهای سیگنالینگ. (الف) مسیرهای غنی شده توسط ژن‌های کل شبکه. (ب) مسیرهای غنی شده توسط ژن‌های کلاس ۳.

VASA در جمعیت تمایز نیافته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال، بیان *ZBTB16* در این جمعیت سلولی بسیار کم می‌باشد (شکل ۵).



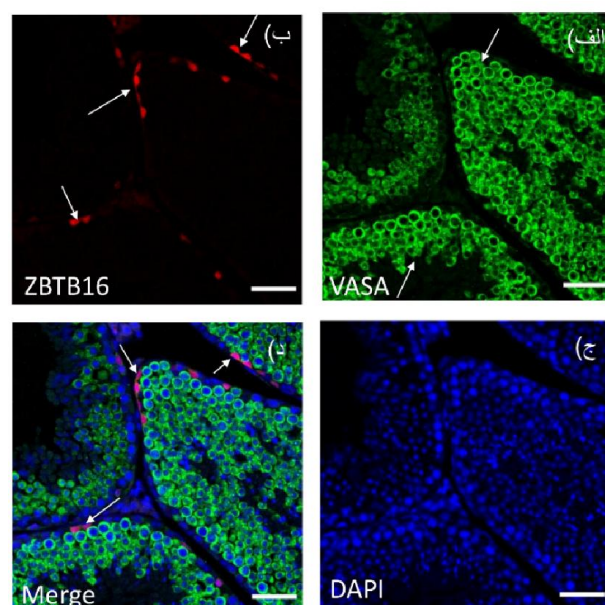
شکل ۴- خصوصیات ایمونوسیتوشیمی *ZBTB16* در ES-Like (الف) بیان *OCT4* در ES-Like (ب) بیان *ZBTB16* در ES-Like (ج) رنگ‌آمیزی سلول‌های ES-Like با DAPI (د) تصاویر ادغام شده. *ZBTB16* در ES-Like به خوبی بیان می‌شود (نوار مقیاس ۵۰ μm).

علاوه بر این، SSCs و سلول‌های ES-Like در محیط آزمایشگاهی برای بررسی بیان *ZBTB16* کشت داده شدند. SSCs پس از هضم آنزیمی جداسازی شدند و سلول‌های تولید شده در حضور فاکتورهای رشد حمایت کننده از کشت SSC کشت داده شدند. ما بیان *ZBTB16* را در جمعیت تمایز نیافته SSCs و سلول‌های ES-Like بیضه موش مطالعه کردیم. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که پروتئین *ZBTB16* در سلول‌های ES-Like بیان می‌شود. این در حالی است که رده‌های سلولی ES-Like حاوی گزارشگر پروموتور OCT4-GFP (Octamer-binding transcription factor 4-green fluorescent protein) در موش‌های تراریخته نشان دادند که در این سلول‌های پرتوان، *OCT4* نیز به شدت بیان می‌شود اما *ZBTB16* در هر بخشی که بیان *OCT4* دیده می‌شود، بیان زیادی نشان نمی‌دهد (شکل ۴). از طرفی، با آنالیز نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز مشخص شد که برخلاف بیان بسیار زیاد ژن



ZBTB16 نسبت به بیان VASA به طور محسوسی کمتر می‌باشد. این نتایج تأییدی است بر مطالعه Azizi و همکاران که بیان کردند ZBTB16 در طول تمایز (اسپرماتوژنز) و تبدیل SSCs تک‌توان به سلول‌های ES-Like پرتوان تنظیم می‌شود [۱۰]. Sharma و همکاران در مطالعه خود عنوان کردند که از آنجایی که جهش در ZBTB16 باعث از بین رفتن سلول‌های جنسی وابسته به سن می‌شود، ZBTB16 یک فاکتور رونویسی خاص را در سلول‌های اسپرماتوگونیال نوع  $A_s$ ،  $A_{pr}$  و  $A_{al}$  کد می‌کند که برای نگهداری از SSCs الزامی می‌باشد [۱۱]. ZBTB16 یک سرکوب‌کننده و فعال‌کننده رونویسی است که در کنترل SCCs نقش دارد [۱۱]. ZBTB16 در ابتدا به‌عنوان یک فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده با تنظیم اثرات واسطه رونویسی عمل می‌کند و همچنین برای تمایز و توسعه بافت‌های سالم ضروری است و می‌تواند خودنوسازی سلول‌های بنیادی را حفظ کند. ZBTB16 حتی می‌تواند ایمنی ضد میکروبی، رد کردن تومور و بیماری‌های التهابی را از طریق سلول‌های T کشنده طبیعی (iNKT) تنظیم کند [۱۵-۱۲].

در ادامه برای شناخت ژن‌های اصلی که ارتباط چشم-گیری با ZBTB16 دارند، شبکه ژنی مربوط به آن از String استخراج شد و سپس به جهت تعیین میزان پارامترهای مهم ژن‌ها که بیانگر میزان اثرگذاری و قدرت هر ژن در شبکه می‌باشد، شبکه ژنی با نرم‌افزار Gephi آنالیز شد. نتایج به دست آمده از Gephi، ژن هیستون داستیلاز ۱ (Hdac1) را به عنوان قوی‌ترین ژن در شبکه معرفی کرد زیرا دارای بالاترین میزان درجه و مرکزیت واسطه‌گری نسبت به سایر ژن‌ها می‌باشد. همان‌طور که مطالعه Luo و همکاران نشان



شکل ۵- خصوصیات ایمونوهیستوشیمی ZBTB16 در سلول‌های تمایز نیافته اسپرماتوگونیال. (الف) بیان ZBTB16 با فلورسنت قرمز. (ب) بیان VASA با فلورسنت سبز. (ج) رنگ‌آمیزی هسته‌ای سلول‌ها با DAPI. (د) تصاویر ادغام شده. بیان بسیار کم ZBTB16 و بیان شدید VASA در جمعیت سلول‌های تمایز نیافته اسپرماتوگونیال در غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قابل توجه است (نوار مقیاس ۵۰  $\mu$ m).

## بحث

در این مطالعه، آنالیزهای ایمونوهیستوشیمی و ایمونوسیتوشیمی نشان می‌دهند که برخلاف بیان ضعیف ZBTB16 در SSCs، بیان آن در ES-Like به طور قابل توجهی زیاد است که سبب حفظ وضعیت مولکولی آن‌ها می‌شود. همچنین مشخص شده است که بیان OCT4 در ES-Like شدید می‌باشد، اما تصویر ادغام شده بیان محدود ZBTB16 را در مناطقی که OCT4 شدیداً بیان شده است، نشان می‌دهد. آنالیز ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که بیان ZBTB16 در SSCs منحصر به غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز می‌باشد. همچنین سلول‌های SSCs نزدیک غشاء پایه لوله اسپرم‌ساز بیان قوی VASA را نشان دادند، اما بیان

داد که ژن‌های مرتبط با Hdac1 عمدتاً در غنی کردن مسیرهایی مانند مسیرهای متابولیک، برهم‌کنش لیگاند-گیرنده عصبی و برهم‌کنش گیرنده سیتوکین-سیتوکین دخالت دارند [۱۶]. با مطالعه مسیرهای KEGG برای شبکه ژنی مشخص شد که این شبکه در مسیر سیگنالینگ Hedgehog، مسیر سیگنالینگ TGF-beta، مسیر سیگنالینگ Wnt، لوسمی میلوئید حاد، مسیرهای سرطانی، مسیر سیگنالینگ Notch و مسیرهای تنظیم نادرست رونویسی در سرطان نقش دارد. Yan و همکاران عنوان کردند که مسیر سیگنالینگ غیر طبیعی TGF-beta ممکن است باعث دیسپلازی بیضه و اسپرم‌زایی غیرطبیعی شود [۱۷]. Khaleel و همکاران در مطالعه خود بیان کردند لوسمی میلوئید حاد ضمن آسیب به لوله‌های اسپرم‌ساز باعث اختلال در توسعه اسپرماتوژنز در موش‌های نابالغ بزرگسال می‌شود و با کاهش قابل توجه در سلول‌ها در مرحله میوز و سلول‌های پس از میوز باعث افزایش سلول‌های آپوپتوز شده در لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شوند [۱۸]. Dilower و همکاران مسیر سیگنالینگ Hedgehog را تنظیم کننده عملکردهای غدد جنسی از جمله استروئیدوژنز، اسپرم‌زایی و فولیکولوژنز را در بزرگسالان معرفی کردند که از دست رفتن آن منجر به ناباروری در مردان می‌شود [۱۹]. مسیر سیگنالینگ Notch برای تقویت رشد اسپرم در سلول‌های سوماتیک غدد جنسی مورد نیاز است، از طرفی افزایش سطح سیگنالینگ Notch در سلول‌های سوماتیک منجر به توقف رشد سلول‌های کیست سوماتیک در بیضه‌ها و توقف آن در اسپرم‌زایی می‌شود [۲۰].

اگرچه در نتایج کلی اولیه ZBTB16 قدرت چندانی نداشت اما به جهت مطالعه‌ی دقیق‌تر ژن مورد نظر، شبکه بر اساس پارامترهای مربوط به ژن‌ها کلاس‌بندی شد و نشان داده شد که ارتباط زیاد و قابل توجهی میان ZBTB16 و ژن‌های Ret، Gdnf، Gfra1، Mtdh، Agtr2 و Nrtn وجود دارد. در ادامه پارامترهای ژن‌های Ret، Gdnf، Gfra1، Mtdh، Agtr2 و Nrtn را که با ژن ZBTB16 در یک کلاس قرار گرفته‌اند (کلاس ۳)، مقایسه کردیم. آنالیز داده‌ها نشان داد که ZBTB16 برخلاف قدرت کمتر خود در شبکه اصلی، در این کلاس بیشترین قدرت را در مقایسه با سایر ژن‌های موجود دارد و می‌توان از طریق این ژن بر عملکرد سایر ژن‌ها نیز تأثیر گذاشت. به عبارتی از آن‌جا که ZBTB16 اصلی‌ترین ژن در کلاس ۳ می‌باشد، بیشترین اطلاعات موجود در شبکه برای رسیدن به کلاس ۳ از ZBTB16 عبور می‌کنند. از طرفی این ژن نسبت به سایر ژن‌های کلاس ۳ دارای ارتباط بیشتری با ژن‌های موجود در شبکه می‌باشد. با استناد به نتایج حاصل، می‌توان در مسیر سیگنالینگ که توسط این ژن‌ها غنی می‌شود از طریق ژن‌های قوی شناخته شده تغییراتی ایجاد کرد. به همین منظور، به مطالعه مسیرهای سیگنالینگ غنی شده توسط شبکه ژنی مرتبط با ZBTB16 پرداختیم. مسیرهای اصلی که توسط ژن‌های کلاس ۳ غنی می‌شوند شامل سیستم رنین-آنژیوتانسین، لوسمی میلوئید حاد، متابولیسم مرکزی کربن در سرطان، سیگنالینگ آدرنرژیک در کاردیومیوسیت‌ها، مسیرهای دخیل در سرطان، تنظیم نادرست رونویسی در سرطان، سرطان تیروئید، مسیر سیگنالینگ کلسیم و برهم‌کنش لیگاند-گیرنده عصبی می‌باشد. Edenfield و همکارش در

مطالعه خود بیان کردند که دخالت سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون در بیضه باعث نفوذ SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) و تداخل با ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) بیضه می‌تواند منجر به عفونت، از بین رفتن اثرات محافظتی در طول حالت‌های التهابی و انعقاد و التهاب شود که می‌تواند اسپرم‌زایی و عملکرد بیضه را مختل کند [۲۱].

با مقایسه مسیرهای سیگنالینگ اصلی تنظیم شده توسط کل شبکه با مسیرهای سیگنالینگ تنظیم شده توسط کلاس ۳ که ژن هدف ما در آن قرار دارد، به مسیرهای مشابهی که شامل مسیرهای دخیل در سرطان، تنظیم نادرست رونویسی در سرطان و لوسمی میلوئید حاد می‌باشند، دست یافتیم. از این مقایسه می‌توان دریافت که کلاس ۳ در شبکه ژنی در تنظیم مسیرهای ذکر شده دخالت زیادی دارد و از آن‌جا که ژن ZBTB16 دارای بیشترین میزان مرکزیت واسطه‌گری و درجه در کلاس می‌باشد، در صورت خاموش شدن یا ایجاد هرگونه خطا در عملکرد ژن ارتباط میان ژن‌های موجود در کلاس ۳ دچار اختلال می‌شود و از طرفی انتقال اطلاعات از سایر کلاس‌های شبکه به کلاس ۳ به میزان زیادی محدود می‌شود. نتایج حاصل می‌توانند اطلاعات دقیق و با اهمیتی را در جهت ایجاد تغییر در تنظیم مسیرهای مذکور از طریق ایجاد اختلال در ژن ZBTB16 ارائه کنند. تجزیه و تحلیل مسیرهای KEGG مکانیسم‌های مولکولی بالقوه‌ای را نشان داد که ZBTB16 را به سرطان مرتبط می‌کند.

در تأیید نتایج مطالعه حاضر می‌توان به مطالعه Wang و همکاران اشاره کرد که با آنالیز غنی‌سازی نشان دادند که ZBTB16 ممکن است اثرات تومورزایی خود را با اتصال به

کروماتین، اتصال به پروتئین، اتصال به فاکتور رونویسی، اتصال یون فلز و اتصال پروتئین یکسان اعمال کند، مطالعه آن‌ها ZBTB16 را به‌عنوان یک سرکوبگر تومور یا انکوژن با نقش کلیدی در بروز و توسعه تومورهای مختلف معرفی کرد [۵]. Sadler و همکاران بیان کردند که ZBTB16 التهاب ناشی از پاتوژن را محدود می‌کند. ZBTB16 با تثبیت یک کمپلکس رپرسور، فعالیت هیستون دی استیلاز را در بر گرفته و وضعیت کروماتین را تغییر می‌دهد که سبب کاهش القاء ژن‌های منتخب پاسخ ایمنی می‌شود و هوموستاز را حفظ می‌کند. در غیاب ZBTB16، ساختار کروماتین تغییر می‌کند و کمپلکس‌های رونویسی فعال را قادر می‌سازد تا فوراً روی پروموتورهای ژن جمع شوند و در نتیجه سیتوکین‌های التهابی بی‌رویه تولید شوند. همچنین در مطالعات اولیه، ZBTB16 را ابتدا با بدخیمی‌های هماتولوژیک مرتبط دانستند و سپس بیان کردند که این ژن در تومورهای جامد مختلف از جمله سرطان پروستات و سرطان تیروئید نقش دارد [۲۲]. ZBTB16 می‌تواند با تنظیم رشد سلولی، تمایز، آپوپتوز و همچنین بهبود پیشرفت بیماری در سیستم ایمنی با کنترل تولید سیتوکین در سلول‌های T و رشد سلول‌های ایمنی ذاتی، تشکیل تومور را مهار کند. به عنوان مثال، ZBTB16 با واسطه سیگنالینگ PTEN/AKT/FOXO3a تومورزایی پروستات را سرکوب می‌کند [۲۳]. ZBTB16 می‌تواند ژن‌ها را برای دستیابی به نگهداری سلول‌های بنیادی و انکوژن با قابلیت اتصال به DNA تنظیم کند پس ZBTB16 به عنوان فاکتوری جهت پیش‌آگهی سرطان معرفی شد، همچنین عنوان شد که بیان پروتئین ZBTB16 ارتباط نزدیکی با جنسیت دارد و بیان

ZBTB16 در بافت‌های مردانه مانند پروستات و بیضه بیشتر از هر بافت دیگری است [۲۴-۲۹].

به علت محدودیت در امکانات، امکان آنالیز و مقایسه داده‌های ریزآرایه (Microarray) وجود نداشت. در صورت وجود داده‌های ریزآرایه مرتبط با ES-Like و SSCs می‌توان آنالیز تفاضلی بیان ژن انجام داد و به صورت بسیار دقیق ژن‌های افزایش بیان‌یافته و کاهش بیان‌یافته در روند تمایز را مشخص کرد. سپس کلیدی‌ترین ژن با بیان متفاوت را شناسایی و حتی به عنوان ژن هدف برای طراحی دارو مورد استفاده قرار داد. در مطالعات آتی می‌توان پروفایل‌های بیان ژن در SSCs و سلول‌های ES-Like را در حضور و غیاب ZBTB16 برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای کلیدی که توسط ZBTB16 تنظیم می‌شوند، مقایسه کرد. این روش می‌تواند میزان نقش نظارتی ZBTB16 را نشان دهد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با آنالیز ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی نشان داده شد که ژن ZBTB16 اگرچه در SSCs بیان می‌شود، اما بیان آن به غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز محدود می‌شود، در حالی که بیان ZBTB16 در

سلول‌های ES-Like قوی و واضح می‌باشد. در ادامه، بر اساس نتایج به دست آمده نشان داده شد که ژن ZBTB16 قوی‌ترین ژن موجود در کلاس خود می‌باشد و با بررسی مسیرهای سیگنالینگ مشترک ما توصیه می‌کنیم که با تغییر در بیان ZBTB16 می‌توان تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مشترک را از حالت عادی خارج نمود، زیرا ZBTB16 نسبت به سایر ژن‌های موجود در کلاس خود، دارای بیشترین ارتباط با ژن‌های موجود در شبکه می‌باشد و در غنی‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مشترک نقش مهمی دارد.

### تشکر و قدردانی

به این وسیله از پروفسور Thomas Skutella که ما را در انجام تست‌های مولکولی در دانشگاه هایدلبرگ آلمان یاری نمودند، نهایت تشکر به عمل می‌آید. مقاله حاضر بر اساس تفاهم‌نامه مشترک بین دانشگاه هایدلبرگ آلمان و دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است. از دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بابت پشتوانه مالی از طرح حاضر قدردانی می‌گردد.

## References

- [1] Azizi H, NiaziTabar A, Mohammadi A, Skutella T. Characterization of VASA gene expression in human cases with non-obstructive azoospermia and in sterile and fertile mice. *Reproduction & Infertility* 2021; 22(2): 85.

- [2] Wei BH, Hao SL, Yang WX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and proliferation in mammals 2022; 37: 825-38.
- [3] Azizi H, Asgari B, Skutella T. Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis. *Cell Journal (Yakhteh)* 2019; 21(3): 281.
- [4] Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular biology of spermatogenesis: novel targets of apparently idiopathic male infertility. *molecular sciences* 2020; 21(5): 1728.
- [5] Wang J, Zhang Y, Wei B, Zhou K, Xu L, Jin Y. A Pan-Cancer Analysis of the Prognostic Value and Immunological Role of Promyelocytic Leukemia Zinc Finger. *Pharmaceutical Sciences* 2022: 217-25.
- [6] Valdivia M, Castañeda-Zegarra S, Lévano G, Lazo J, Reyes J, Bravo Z, et al. Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of PLZF, integrin  $\beta 1$  and reactivity to Dolichos biflorus agglutinin in alpaca adult testes. *Andrologia* 2019; 51(6): e13283.
- [7] Azizi H, Hamidabadi HG, Skutella T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. *Cell Journal (Yakhteh)* 2019; 21(2): 186.
- [8] 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 international* 2016; 2016: 8216312.
- [9] Azizi H, Niazi Tabar A, Skutella T. Successful transplantation of spermatogonial stem cells into the seminiferous tubules of busulfan-treated mice. *Reproductive Health* 2021; 18: 1-9.
- [10] Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells. *Cell Journal (Yakhteh)* 2020; 22(1): 60.
- [11] Sharma S, Wistuba J, Pock T, Schlatt S, Neuhaus N. Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. *Human reproduction update* 2019; 25(3): 275-97.
- [12] Li N, Shi T, Zhang M, He Y, Feng J, Mei Z, et al. PLZF promotes the development of asthma tolerance via affecting memory phenotypes of immune cells. *International Immunopharmacology* 2023; 114: 109559.
- [13] Hashemi Karoii D, Azizi H. A review of protein-protein interaction and signaling pathway of Vimentin in cell regulation, morphology and cell differentiation

- in normal cells. *Receptors and Signal Transduction* 2022; 42(5): 512-20.
- [14] Karoii DH, Azizi H, Amirian M. Signaling pathways and protein–protein interaction of vimentin in invasive and migration cells: A review. *Cellular Reprogramming* 2022; 24(4): 165-74.
- [15] Hashemi Karoii D, Azizi H, Skutella T. Microarray and in silico analysis of DNA repair genes between human testis of patients with nonobstructive azoospermia and normal cells. *Cell Biochemistry and Function* 2022; 40(8): 865-79.
- [16] Luo K, Wang Z, Zhuang K, Yuan S, Liu F, Liu A. Suberoylanilide hydroxamic acid suppresses axonal damage and neurological dysfunction after subarachnoid hemorrhage via the HDAC1/HSP70/TDP-43 axis. *Experimental & Molecular Medicine* 2022; 54(9): 1423-33.
- [17] Yan Y, Tao Y, Cao Z, Lu S, Xu P, Qiang J. The Effect of Knocked-Down Anti-Müllerian Hormone mRNA on Reproductive Characters of Male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) through Inhibition of the TGF-Beta Signaling Pathway. *Fishes* 2022; 7(5): 299.
- [18] Khaleel Ba, Lunenfeld E, Kapelushnik J, Huleihel M. Effect of Chemotherapy Cytarabine and Acute Myeloid Leukemia on the Development of Spermatogenesis at the Adult Age of Immature Treated Mice. *Molecular Sciences* 2022; 23(7): 4013.
- [19] Dilower I, Niloy AJ, Kumar V, Kothari A, Lee EB, Rumi M. Hedgehog Signaling in Gonadal Development and Function. *Cells* 2023; 12(3): 358.
- [20] Terrell A. Regulation of Spermatogenesis by Notch Signaling. 2023; 129.
- [21] Edenfield RC, Easley IV CA. Implications of testicular ACE2 and the renin–angiotensin system for SARS-CoV-2 on testis function. *Nature Reviews Urology* 2022; 19(2): 116-27.
- [22] Sadler AJ, Rossello FJ, Yu L, Deane JA, Yuan X, Wang D, et al. BTB-ZF transcriptional regulator PLZF modifies chromatin to restrain inflammatory signaling programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112(5): 1535-40.
- [23] Shen H, Zhan M, Zhang Y, Huang S, Xu S, Huang X, et al. PLZF inhibits proliferation and metastasis of gallbladder cancer by regulating IFIT2. *Cell death & disease* 2018; 9(2): 71.
- [24] Hu S, Chen Y, Liu L, Yin X, Yang Y, Tang L. PLZF and PLZF-MAPK10 can predict the prognosis of postoperative patients with hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Pathology* 2020; 13(12): 3158.

- [25] Aballa L, Chraa M, Louhab N, Kissani N. Extensive anaplastic multi-centric ependymoma in a young adult: case report and literature review. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery* 2023; 59(1): 67.
- [26] Hashemi Karoii D, Azizi H. OCT4 protein and gene expression analysis in the differentiation of spermatogonia stem cells into neurons by immunohistochemistry, immunocytochemistry, and bioinformatics analysis. *Stem Cell Reviews and Reports* 2023: 1-17.
- [27] Niazi Tabar A, Azizi H, Hashemi Karoii D, Skutella T. Testicular Localization and Potential Function of Vimentin Positive Cells during Spermatogonial Differentiation Stages. *Animals* 2022; 12(3): 268.
- [28] Azizi H, Hashemi Karoii D, Skutella T. Whole Exome Sequencing and In Silico Analysis of Human Sertoli in Patients with Non-Obstructive Azoospermia. *Molecular Sciences* 2022; 23(20): 12570.
- [29] Hashemi Karoii D, Azizi H, Skutella T. Altered G-Protein Transduction Protein Gene Expression in the Testis of Infertile Patients with Nonobstructive Azoospermia. *DNA and Cell Biology* 2023; 42: 1-21.

## Investigation of ZBTB16 Gene Expression by Bioinformatics Analysis and Immunocytochemistry and Immunohistochemistry Methods in Embryonic Cells Derived From Spermatogonial Stem Cells of Mouse Testis: A Laboratory Study

Mahla Masoudi<sup>1</sup>, Hossein Azizi<sup>2</sup>, Dariush Gholami<sup>3</sup>, Amir Khaki<sup>4</sup>

Received: 01/07/23

Sent for Revision: 05/09/23

Received Revised Manuscript: 15/11/23

Accepted: 18/11/23

**Background and Objectives:** Spermatogonial stem cells (SSCs) can generate embryonic stem-like (ES-Like) cells, both of which possess the potential for pluripotent stem cells. The gene ZBTB16 (Zinc Finger and BTB Domain Containing 16) plays various roles in signaling pathways, cellular differentiation regulation, and growth. The aim of this research was to identify signaling pathways associated with the ZBTB16 gene using bioinformatics methods and investigate the expression levels of this gene in SSCs and ES-Like cells.

**Materials and Methods:** In this experimental study, initially, 100 genes with connections to ZBTB16 were extracted from the protein database and analyzed using relevant software. Subsequently, ES-Like cells were extracted from mouse testicular SSCs and cultured. Then, the expression of ZBTB16 in ES-Like cells and SSCs was examined through immunocytochemistry and immunohistochemistry staining.

**Results:** The results indicated that the expression of ZBTB16 was demonstrated in the undifferentiated population of SSCs and ES-Like cells. It was found that deleting ZBTB16 from the gene network could disrupt undesirable signaling pathways since ZBTB16 is involved in enriching specific pathways as a specific transcription factor.

**Conclusion:** The experimental findings can support the analysis of spermatogonial cell growth in both in vivo and in vitro. Bioinformatics methods, by identifying biological functions that ZBTB16 regulates, have shown that ZBTB16 can be used as a target gene to weaken certain undesirable pathways.

**Key words:** Spermatogonial stem cells, Embryonic stem-like cells, Signaling pathways, Protein-protein interaction, ZBTB16

**Funding:** This study was funded by Amol University of Modern Technologies.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Amol University of Special Modern Technologies approved the study (IR.AUSMT.REC.1400.03).

**How to cite this article:** Masoudi Mahla, Azizi Hossein, Gholami Dariush, Khaki Amir. Investigation of ZBTB16 Gene Expression by Bioinformatics Analysis and Immunocytochemistry and Immunohistochemistry Methods in Embryonic Cells Derived From Spermatogonial Stem Cells of Mouse Testis: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2023; 22 (9): 947-62. [Farsi]

1- MSc Student in Microbial Biotechnology, Dept. of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

2- Associate Prof., PhD in Cellular and Molecular Biology, Stem Cells, Dept. of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran, ORCID: 0000-0001-8246-595X  
(Corresponding Author) Tel: (011) 44442135, Fax: (011) 44154265, E-mail: h.azizi@ausmt.ac.ir

3- Assistant Prof., PhD in Biochemistry, Dept. of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

4- Assistant Prof., PhD in Veterinary Medicine and Obstetrics, Dept. of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran