Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Communication network between pluripotency factors in Embryonic Stem Cell-like cells and their role in testicular germ cell cancer

Mahla Masoudi[1], **Hossein Azizi**[2]*

ABSTRACT

Background and Aims: In stem cells, the activation of specific powerful factors, such as *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, and *SOX2*, in conjunction with transcriptional control, triggers potency in both sperm-producing and cancerous stem cells. In the present study, we not only construct a protein-protein network and examine the roles of these factors in the development and advancement of testicular germ cell cancer but also explore the immunohistochemistry of the mentioned genes in pseudo-embryonic stem cells (ESC-like cells).

Materials and Methods: In this experimental study, the String database was used along with software tools, such as Cytoscape and Gephi, to examine the strength and interaction between these genes and construct functional networks. Following this, spermatogonial stem cells were isolated from mice, and after culture, ESC-like cells were manually generated from them. Subsequently, the expression of *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, and *SOX2* in these ESC-like cells was investigated using immunocytochemistry (ICC).

Results: According to the bioinformatics results, the target genes exhibit very strong interactions with each other, leading to the enhancement of their functionality and the enrichment of signaling pathways, particularly in cancer. Furthermore, the permanent expression of the *OCT4* gene and the expression of the *NANOG*, *SOX2*, and *KLF4* genes were demonstrated in ESC-like cells.

Conclusion: These data provide further insights into the potential of ESC-like cells. Given the highly interconnected network among these mentioned genes, their roles in enriching cancer pathways, and their key role in advancing spermatogenesis for male infertility treatment and cancer diagnosis, they have significant importance. These findings contribute to a better understanding of the potential therapeutic applications of these genes and open avenues for further research in these areas.

Keywords: Embryonic stem cell-like cells, Protein-protein interaction network, Signaling pathways, Testicular germ cells cancer, Transcription factors

Citation: Masoudi M, Azizi H. [Communication network between pluripotency factors in Embryonic Stem Cell-like cells and their role in testicular germ cell cancer]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(3): 216-230. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/

Received: July 31, 2023 **Accepted:** November 8, 2023

[1] Master of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
[2] Ph.D. in Cellular and Molecular Biology, Stem Cells, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

***Corresponding author:** Ph.D. in Cellular and Molecular Biology, Stem Cells, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
Tel: +981144442135 Fax: +981144154265 E-mail: h.azizi@ausmt.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

شبکه ارتباطی میان فاکتورهای پرتوانی در سلول‌های بنیادی شبه جنینی و نقش آن‌ها در ایجاد سرطان سلول‌های جنسی بیضه

مهلا مسعودی[۱]، حسین عزیزی[۲*]

چکیده

زمینه و هدف: در سلول‌های بنیادی با اتصال برخی از فاکتورهای پرتوانی مانند OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 ضمن تنظیم رونویسی باعث القای پرتوانی در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و سرطانی می‌شوند. در مطالعه حاضر علاوه بر رسم شبکه پروتئین–پروتئین و نقش این فاکتورها در بروز و پیشرفت سرطان سلول‌های جنسی بیضه، به بررسی ایمونوهیستوشیمی ژن‌های نام برده شده در سلول‌های شبه جنینی (ESC-like cells) می‌پردازیم.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، برای بررسی قدرت اثر و ارتباط میان ژن‌های مذکور و رسم شبکه پروتئینی از پایگاه String و نرم‌افزارهای Cytoscape و Gephi استفاده شد، سپس سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال موش جدا شد و پس از کشت، سلول‌های ESC-like به صورت دستی از آن‌ها استخراج شد. سپس بیان OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در ESC-like cells با روش ایمونوهیستوشیمی (ICC) بررسی شد.

یافته‌ها: طبق نتایج بیوانفورماتیک، ژن‌های هدف دارای تعامل بسیار قوی با یکدیگر می‌باشند که سبب پیشبرد عملکرد آن‌ها و غنی کردن مسیرهای پیام‌رسانی خصوصاً در سرطان می‌شوند. هم‌چنین نتایج بیان دائمی ژن OCT4 و بیان ژن‌های NANOG، SOX2 و KLF4 در ESC-like cells را نشان داد.

نتیجه‌گیری: این داده‌ها اطلاعات بیشتری در مورد پتانسیل پرتوانی ESC-like cells ارائه می‌دهد. با توجه به ارتباط شبکه‌ای بسیار قوی میان ژن‌های مذکور و نقش آن‌ها در غنی کردن مسیرهای سرطان و هم‌چنین نقش کلیدی در پیشبرد اسپرماتوژنز برای درمان ناباروری در مردان و تشخیص سرطان حائز اهمیت می‌باشند. این یافته‌ها به درک بهتر کاربردهای درمانی بالقوه این ژن‌ها کمک می‌کنند و راه هایی را برای تحقیقات بیشتر در این زمینه‌ها باز می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی، شبکه ارتباط پروتئین–پروتئین، مسیرهای پیام‌رسانی، سرطان سلول‌های جنسی بیضه، فاکتورهای رونویسی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰ (۳): ۲۱۶-۲۳۰.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۷

[۱] کارشناسی ارشد زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

[۲] گروه زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

***نویسنده مسئول:** دکترای زیست شناسی سلولی و ملکولی، سلول‌های بنیادی، گروه زیست‌فناوری، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

آدرس: آمل- خیابان طالقانی- اباذر ۳۵- ساختمان مرکزی

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

مقدمه

یکی از سلول‌های بنیادی بافت بالغ در بیضه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (SSCs[1]) می‌باشند که همانند سایر سلول‌های بنیادی، نادر هستند. SSCs دارای دو پتانسیل خودنوسازی به منظور حفظ جمعیت سلول‌های بنیادی و همچنین تمایز برای تولید مداوم اسپرم در مردان بالغ می‌باشند. اسپرماتوژنز به SSCs به دلیل ایجاد تعادل میان خودنوسازی و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونیا وابسته می‌باشد. SSCs را می‌توان با آرایش کلونال در اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (A_s, A_{pr}, A_{al})، فاکتورهای رونویسی (OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, …) و پتانسیل بیولوژیکی توصیف کرد (۱). کاهش تنظیم فاکتورهای رونویسی پرتوانی سبب ایجاد اختلال در فرایند تمایز می‌شود. در سلول‌های بنیادی با اتصال برخی از فاکتورهای رونویسی از جمله SOX2 و NANOG به OCT4 رونویسی ژن تنظیم می‌شود. بازسازی اصلاحات اپی‌ژنتیکی در حین برنامه‌ریزی مجدد به کسب پرتوانی وابسته می‌باشد. در طول برنامه‌ریزی مجدد اصلاح‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی با مشارکت فاکتورهای رونویسی OCT4، SOX2 و KLF4 به صورت هم‌زمان و تدریجی باعث غیرفعال شدن ژن‌های مربوط به تمایز و شروع فعالیت ژن‌های مرتبط با پرتوانی می‌شوند. فعال شدن چندین ژن مانند NANOG، OCT4 و SOX2 توسط KLF4 سبب ارتقا در خودنوسازی ESCs[2] می‌شود (۲). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال موش (SSCs) سلول‌های بنیادی تک توانی هستند که هم نشانگرهای پرتوانی و هم نشانگرهای سلول‌های جنسی را بیان می‌کنند. SCCs می‌توانند به طور خود به خود به سلول‌های بنیادی جنینی پرتوان (ESC-like cell) تحت شرایط کشت سلول جنسی بدون افزودن مصنوعی ژن‌های پرتوانی اگزوژن یا مولکول‌های کوچک تبدیل شوند. این سلول‌های پرتوان می‌توانند تبدیل به چندین دودمان سلولی از جمله سلول‌های جنسی و سه لایه زایای جنینی شوند (۳).

POU5F1 (نام دیگر OCT4) دومین POU کلاس ۵ فاکتور رونویسی ۱ اصلی‌ترین فاکتور رونویسی است که با همراهی سایر عوامل رونویسی شامل C-MYC، SOX2 و KLF4 مجموعه OSKM YAMANKA (Y4) را می‌سازند که لازمه حفظ خواص سلول‌های ES می‌باشند. بیان OCT4 توسط سلول‌های جنسی اولیه و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به شدت انجام می‌شود و بیان آن در توده سلولی داخلی بلاستوسیت‌ها (ICM[3]) حفظ می‌شود. نقش مهم این نشانگر در تنظیم و حفظ خودنوسازی، کنترل مراحل اولیه‌ی جنینی و حفظ پرتوانی ثابت شده‌است. این فاکتور رونویسی اصلی جهت تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSC[4]) است و به عنوان یک نشانگر ویژه در سرطان‌های سلول‌های اسپرم‌ساز بیضه استفاده می‌شود؛ زیرا شدت بیان آن در سرطان‌هایی با ویژگی‌های تمایزنیافته‌تر بسیار بالا می‌باشد و عدم بیان در اجزای تمایزیافته دیده می‌شود. در ایجاد iPSCs استفاده از OCT4، KLF4، SOX2، NANOG و c-Myc نشان‌دهنده اهمیت زیاد این ژن‌ها جهت حفظ خواص بنیادی می‌باشد. کاربرد بالینی iPSCs با وجود پتانسیل بالا، به یافتن روش‌هایی جهت نابودی پتانسیل ایجاد سرطان وابسته می‌باشد (۲). NANOG یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی در سلول‌های بنیادی می‌باشد که در سطوح مختلف و به‌صورت پیچیده تنظیم می‌شود. امکان تنظیم شدن چندین ژن به طور همزمان توسط این فاکتور وجود دارد که نقش اساسی در تنظیم رشد انسان ایفا می‌کند و در ESCs برای حفظ حالت پرتوانی بسیار مهم می‌باشد. بیان NANOG در طول تمایز کاهش می‌یابد و به همین دلیل امکان تشخیص آن پس از تولد وجود ندارد یا به مقدار خیلی کم در بافت‌ها دیده می‌شود که خود می‌تواند منشأ ایجاد سرطان و پیشرفت آن تا بدخیمی باشد و یا باعث ایجاد متاستاز شود (۴). NANOG در CSCs[5] به شدت بیان می‌شود و در تنظیم انتقال اپیتلیال–مزانشیمی (EMT[6]) این سلول‌ها دخیل می‌باشد که این موضوع آن را به فاکتور پیش‌آگهی ضعیف جهت تشخیص سرطان تبدیل کرده‌است. این فاکتور رونویسی به واسطه‌ی رگ‌زایی و کاهش بیان E-cadherin که

[1] Espermatogonial Stem Cells
[2] Embryonic stem cells
[3] Inner cell mass
[4] Induced pluripotent stem cells
[5] Cancer stem cells (CSCs)
[6] Epithelial–mesenchymal transition

متاستاز را تسهیل می‌کند، سبب توسعه و پیشرفت CSCs می‌شود (۵). SOX2 یک فاکتور رونویسی کارآمد است که توانایی انجام برنامه‌ریزی مجدد، خودنوسازی سلول‌های بنیادی تمایزنیافته و هومئوستاز را دارد. ژن SOX2 سه دومین[1](حوزه) اصلی را کد می‌کند: دومین TAD[2] در پایانه C، دومین DIM[3] در مرکز و دومین HMG[4] در پایانه N. این فاکتور از طریق دومین TAD اقدام به شناسایی و اتصال پروموتر ژن‌های هدف می‌کند و سبب تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی ESCs در طول جنین‌زایی می‌شود (۶). SOX2 قادر است نقش فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده سرطان را وابسته به محیط سلولی که در آن قرار دارد، ایفا کند. از آنجا که SOX2 در مشارکت با NANOG و OCT4 می‌تواند سلول‌های سوماتیک را به iPSCs تبدیل کند و باعث نگهداری از سلول‌های بنیادی جنینی شود، در صورت بروز اختلال یا جهش در آرایش هسته‌ای، SOX2 می‌تواند بیانگر پیش‌آگهی ضعیف سرطان و بیماری‌های رشدی شدید باشد (۷). KLF4 از اعضای خانواده SP/KLF می‌باشد که دارای یک دومین TAD در پایانه N و یک دومین سرکوبگر در مجاورت آن می‌باشد و در پایانه C دارای سه موتیف انگشت روی[5] است. تعامل دومین‌ها با سایر عوامل و تعدیل اتصال DNA سبب تنظیم فعالیت KLF4 می‌شود. بیان این فاکتور هم در سطح رونویسی و هم پس از رونویسی تنظیم می‌شود. KLF4 یکی از چهار فاکتور رونویسی موردنیاز جهت القای پرتوانی در سلول‌های بنیادی می‌باشد. توالی این فاکتور در طی تکامل به خوبی حفظ شده‌است و در فرایندهای متنوعی از جمله تکثیر، تمایز و رشد سلولی نقش ایفا می‌کند. نقش KLF4 در انواع سرطان‌ها ثابت نیست و احتمالاً الگوهای بیان ژن‌های دیگر، بافت‌های سلولی متفاوت و محیط کروماتین سلول‌های مختلف تعیین کننده نقش KLF4 به‌عنوان انکوژن یا سرکوب کننده تومور باشند، با این حال مکانیسم‌های اساسی این تفاوت‌ها ناشناخته باقی مانده است (۸).

مطالعات نشان می‌دهد که همه سلول‌های سرطانی در ایجاد سرطان دخالت نمی‌کنند بلکه پیشرفت و گسترش سرطان توسط سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) که قادر به انجام خودنوسازی می‌باشند، هدایت می‌شود. CSCs دارای ویژگی‌هایی از جمله خاصیت خودنوسازی و ناهمگنی هستند که به سرطان‌زایی و پیشرفت آن کمک می‌کنند. OCT4، NANOG و SOX2 که توانایی تنظیم تکثیر و تمایز سلولی را دارند باعث پرتوانی سلول‌های بنیادی سرطانی می‌شوند و از تنظیم‌کننده‌های مهم خودنوسازی به شمار می‌روند. طبق مطالعات انجام شده، این عوامل به عنوان نشانگرهای بالقوه پیش‌بینی جهت پیش‌آگهی ضعیف سرطان نیز به کار می‌روند (۹). تومور بیضه در مردان از شایع‌ترین تومورها می‌باشد و در این میان سرطان سلول‌های جنسی بیضه (TGCTs[6]) بیشترین درصد سرطان‌های بیضه را شامل می‌شود. TGCTs با نرخ پایین جهش‌های سوماتیک و ناهنجاری‌های کروموزومی مکرر مشخص می‌شوند. پیش‌ساز مشترک همه TGCTs نئوپلازی سلول‌های جنسی در محل (GCNIS[7]) می‌باشد که تصور می‌شود به دلیل تغییر بلوغ طبیعی گونوسیت‌ها پس از تولد یا در طول رشد جنینی ایجاد می‌شود که این فرایند با حفظ نشانگرهای اولیه‌ی گونوسیت‌ها همراه می‌باشد. پس از بلوغ، پیشرفت TGCTs به سمت TGCTs تهاجمی (سمینوما و غیرسمینوما) رخ می‌دهد. کوریوکارسینوما، کارسینوم جنینی تمایزنیافته و تراتوم تمایزیافته را می‌توان به عنوان TGCTs غیرسمینوما طبقه‌بندی کرد. شایع‌ترین نوع TGCTs، سمینوم‌ها می‌باشند که ۵۰٪ از تومورها در مردان جوان را تشکیل می‌دهند در حالی‌که ۴۰٪ به تومورهای غیرسمینوما و ۱۰٪ باقی نیز به اشکال مختلط تعلق می‌گیرد (۱۰).

بیوانفورماتیک، زمینه‌ای که به لطف تلاش‌های ترکیبی زیست‌شناسی و انفورماتیک در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است، درک عمیق‌تری از داده‌های بیولوژیکی پیچیده ارائه می‌دهد. در نتیجه، بیوانفورماتیک دارای یک پایه بین رشته‌ای و بدنه گسترده غنی از نظر مطالعه حوزه‌های خاص است. دستیابی به درک جامع در این زمینه با بررسی مباحث کلیدی، الگوهای در حال تحول آن‌ها و مراحل توسعه برای ترسیم یک تصویر کامل از تحقیقات

[1] Domain
[2] Transactivation
[3] Dimerization
[4] High Mobility Group
[5] Zinc finger motif

[6] Testicular germ cell tumors
[7] Germ cell neoplasia in situ

بیوانفورماتیک بسیار مهم است (۱۱).

با تشخیص و درک دقیق‌تر عملکرد و برهم‌کنش‌های میان فاکتورهای رونویسی SOX2، NANOG، OCT4 و KLF4 امکان‌پذیر خواهد شد تا رویکردهای درمانی نوینی در برابر سرطان‌ها ایجاد گردد. از آنجا که این فاکتورها در فرآیندهای تمایز و تجدیدسلولی نقش دارند، می‌توان به‌صورت هدفمند، تأثیرگذاری بر آن‌ها را مورد بررسی قرار داد و باعث مهار یا کاهش رشد غیرطبیعی سلول‌های سرطانی گردید.

هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در سلول‌های ESC-like cells به روش ایمونوهیستوشیمی می‌باشد و سپس با تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک به شناخت دقیق‌تر ارتباط میان این فاکتورهای رونویسی پرتوان پرداخته و به بررسی نقش آن‌ها در بروز و پیشرفت TGCTs در بیضه می‌پردازیم. درک و شناخت عملکرد این عوامل در پیش‌بینی بروز سرطان و درمان ناباروری در مردان اهمیت دارد. این یافته‌ها به درک بهتر کاربردهای درمانی بالقوه این ژن‌ها کمک می‌کنند و راه‌هایی را برای تحقیقات بیشتر در این زمینه‌ها باز می‌کنند.

روش تحقیق

هضم و کشت سلول های بیضه

سلول‌های بیضه سویه موش نر C57BL/6 با ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز IV، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر DNase و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دیسپاز (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا) جداسازی شدند. سلول‌های بیضه در محیط SSC، متشکل از محیط StemPro-34، ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D+گلوکز (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا)، ۱٪ ال–گلوتامین (PAA، ایالات متحده آمریکا)، ۱٪ مکمل N2 (Invitrogen، ایالات متحده آمریکا)، ۰/۱٪ β–مرکاپتواتانول، ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین، ۵ میلی‌لیتر در میکروگرم آلبومین سرم گاوی، ۱٪ اسیدهای آمینه غیر ضروری (NEAA، PAA، ایالات متحده آمریکا)، ۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر استرادیول (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا)، ۶۰ نانوگرم در میلی‌لیتر پروژسترون (Sigma-Aldrich)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF، Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا)، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF، Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا)، ۸ نانوگرم در میلی‌لیتر GDNF (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی (LIF، millipore، ایالات متحده آمریکا)، ۱٪ ویتامین‌های حداقل محیط ضروری (MEM، PAA، ایالات متحده آمریکا)، ۱٪ سرم جنین گاوی واجد شرایط با سلول ES (FBS، Gibco، ایالات متحده آمریکا)، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید اسکوربیک، ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید پیرورویک و ۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر DL–لاکتیک اسید (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا) در ۵٪ CO2 در هوا و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شدند (۱۳).

کشت ESC-like cells

طبق مطالعات گذشته ما رده سلولی ESC-like cells ایجاد شد (۱۲). این سلول‌ها در محیط پایه سلول‌های بنیادی جنینی متشکل از ۱٪ محلول NEAA، ۱٪ L–گلوتامین، ۰/۱٪ β–مرکاپتواتانول، ۱۵٪ FBS، ۱٪ Pen/Strep و LIF در غلظت نهایی ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر کشت داده شدند (۱۳).

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

برای ایمونوهیستوشیمی، هر نوع سلول در صفحات ۲۴ چاهی کشت و در ۴٪ پارافورمالدئید تثبیت شد. پس از شستشو، نمونه‌ها با ۰/۱٪ بافر سالین تریتون/فسفات نفوذپذیر شدند و محل‌های رنگ‌آمیزی غیراختصاصی با آلبومین سرم گاوی ۱٪ PBS/(BSA) مسدود شدند. سلول‌ها به مدت یک شب با آنتی‌بادی‌های اولیه برای Nanog (Abcam، USA)، Klf4 (Cell Signaling، USA) و SOX2 (Abcam، USA) انکوبه شدند. پس از چندین بار شستشو با PBS، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های ثانویه مخصوص گونه

که به فلوروکروم‌های مختلف کونژوگه شده بودند، انکوبه شدند. پس از آن، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با DAPI (۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر '۴ و 6–diamidino-2-phenylindole) (Sigma, USA) به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند و با معرف Mowiol 4-88 (Sigma, USA) تثبیت شدند. به عنوان کنترل منفی برای همه آنتی‌بادی‌ها، حذف هر آنتی‌بادی اولیه در نمونه انجام شد (۱۴).

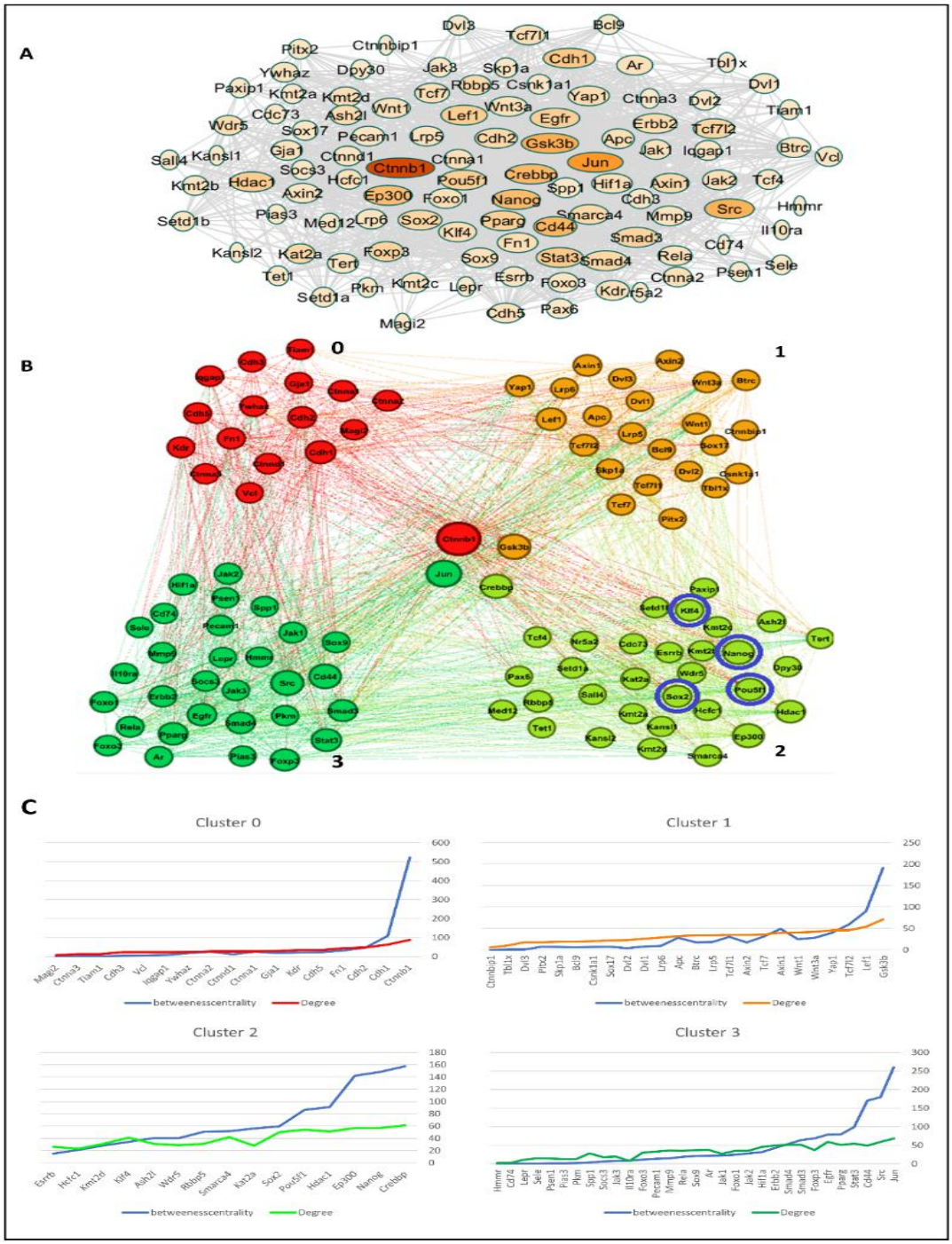
تجزیه و تحلیل شبکه‌ای PPI[1]

داده پایگاه STRING یک منبع آنلاین از فعل و انفعالات پروتئینی در قالب ارتباط مستقیم فیزیکی و غیرمستقیم عملکردی است که می توان از نظر بیولوژیکی معنادار بودن یک ارتباط پیشنهادی براساس شواهد را تخمین زد. ژن‌های موردنظر در پایگاه STRING v11.5 بارگزاری شد. در ادامه با انتخاب ۱۰۰ ژن اصلی مرتبط با ژن‌های هدف و با به‌کارگیری ابزارهای بیوانفورماتیک به بررسی بیان و ارتباط این ژن‌ها با یکدیگر پرداخته شد. ابتدا برای شناسایی برهمکنش‌های میان پروتئین‌ها، ارتباطات مستقیم و غیرمستقیم شواهد تعاملی و تجزیه و تحلیل بیشتر، ژن‌های دارای تعامل را از داده پایگاه STRING وارد نرم‌افزار Cytoscape (نسخه v3.10.0) کرده و شبکه ژنی آن استخراج شد. سپس داده‌های به‌دست آمده را به جهت بررسی پارامترهای ژنی وارد نرم‌افزار Gephi (v 0.9.2) کرده و پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری بر روی شبکه اعمال شد. در ادامه برای بررسی مسیرهای پیام رسانی غنی شده توسط ژن‌ها، از پایگاه KEGG و Enrichr استفاده شد و نمودارهای مربوط رسم گردید.

یافته‌ها

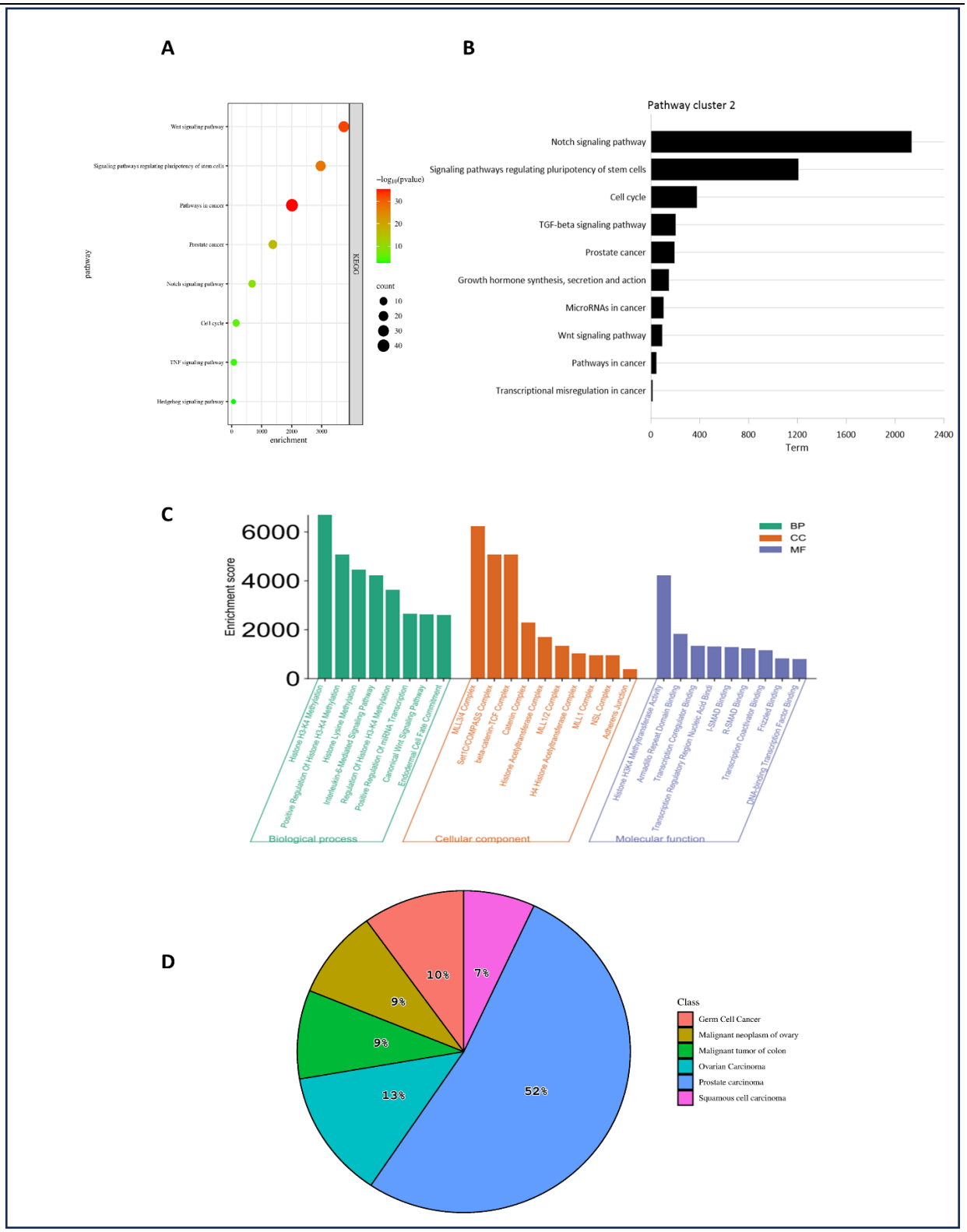
برای بررسی ارتباط میان فاکتورهای رونویسی پرتوانی OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 شبکه ژنی مربوط به آن‌ها از پایگاه String استخراج شد. سپس با انتقال داده‌های استخراج شده از String به نرم‌افزار Cytoscape و به جهت شناخت قدرت ژن‌های مذکور در شبکه ژنی، پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری بر شبکه اعمال شد که ژن‌های مهم با درجه ۳۰ به بالا برجسته شدند (شکل 1A). برای بررسی دقیق‌تر ژن‌های هدف، شبکه براساس پارامترهای موجود برای هر ژن در نرم‌افزار Gephi کلاس‌بندی شد. هر کلاس حاوی زیرمجموعه ژن‌هایی است که بیشترین ارتباط را برای انجام عملکردهای زیستی دارند (شکل 1B). بر اساس نتایج حاصل از کلاس‌بندی، ژن‌های OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در یک کلاس قرار گرفتند (کلاس ۲) که نشان‌دهنده ارتباط عملکردی بالای این ژن‌ها با یکدیگر می‌باشد. در ادامه برای تشخیص و مقایسه قدرت هر ژن در کلاس‌بندی انجام شده، نمودار خطی برای هر کلاس بر اساس پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری رسم شد (شکل 1C). با بررسی نمودارها، قوی‌ترین ژن هر کلاس مشخص شد. قوی‌ترین ژن در کلاس ۲، ژن CREBBP می‌باشد. در میان ژن‌های هدف، قدرت ژن‌های KLF4، SOX2، OCT4 و NANOG به ترتیب زیاد می‌شود. بعد از ژن CREBBP، ژن NANOG بیشترین قدرت را در کلاس ۲ دارد. همان‌طور که در شکل ۱C واضح است، در نمودار مرتبط با کلاس ۲ در ژن‌های NANOG، OCT4 و SOX2 میزان پارامتر مرکزیت واسطه‌گری بیشتر از پارامتر درجه می‌باشد، این بدین معناست که این ژن‌ها غالباً اطلاعات موجود در شبکه را از خود عبور داده و منتقل می‌کنند. در حالی‌که ژن KLF4 پارامتر درجه بالاتری نسبت به مرکزیت واسطه‌گری دارد یعنی در مقایسه با NANOG، OCT4 و SOX2 تعامل زیادتری با سایر ژن‌های موجود در شبکه دارد و نقش واسطه‌گری کمتری را ایفا می‌کند.

[1] Protein-protein interaction (PPI)

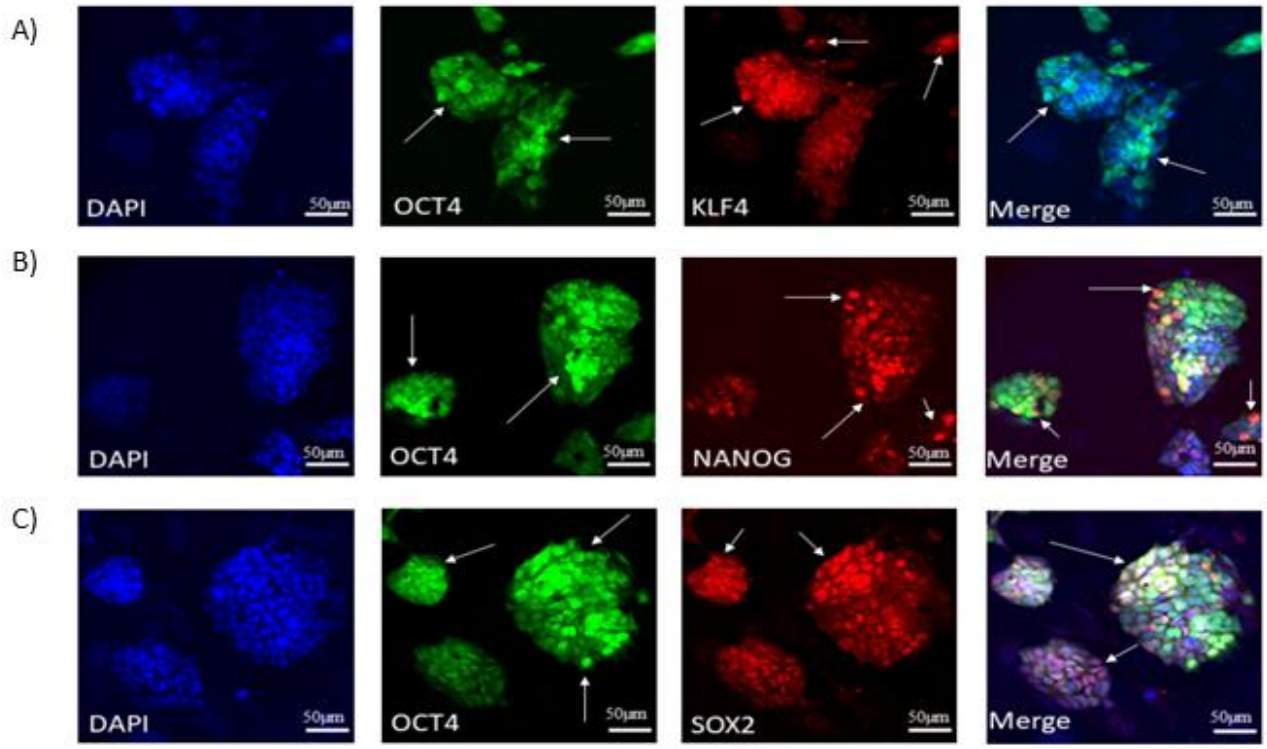


شکل۱– A) شبکه برهمکنش پروتئین–پروتئین ۱۰۰ ژن اصلی در ارتباط با ژن‌های OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در Cytoscape، اندازه‌های هر گره بیان‌کننده درجه و شدت رنگ، قدرت واسطه‌گری را نمایش می‌دهد. B) کلاس‌بندی شبکه پروتئینی براساس پارامترهای ژنی. C) مقایسه قدرت ژن‌های موجود در هر کلاس براساس پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری. ژن‌های هدف براساس ارتباط زیاد میان پارامترهای موجود در یک کلاس قرار گرفته و جزو ژن‌های قوی شبکه محسوب می‌شوند.

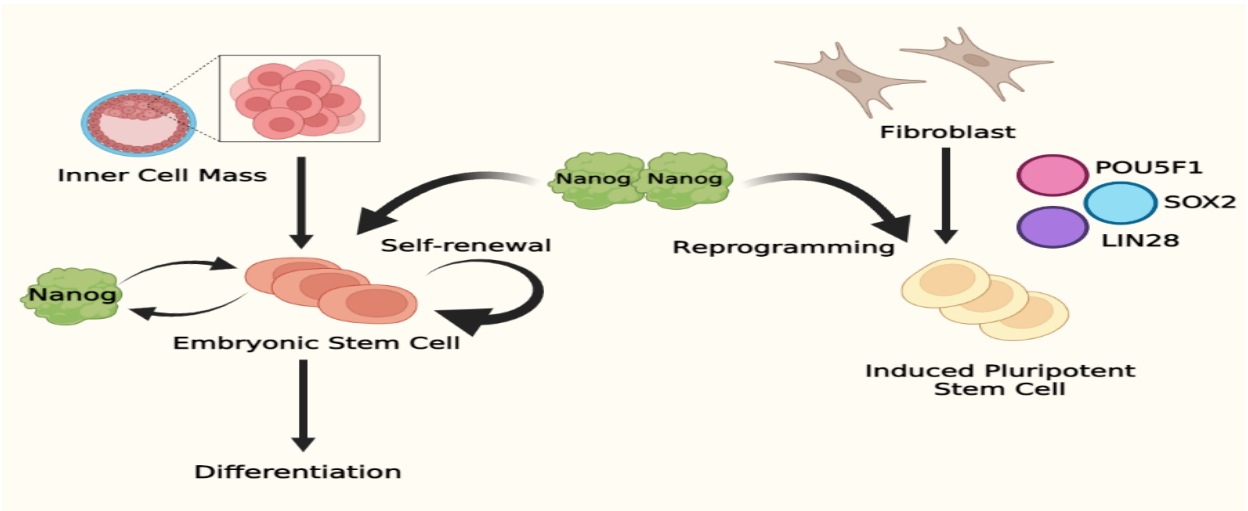
در ادامه برای شناسایی مسیرهای پیام رسانی KEGG که توسط این شبکه غنی می‌شوند، از پایگاه آنلاین Enrichr استفاده شد. نتایج به دست آمده از KEGG 2021 نشان داد که ژن‌های موجود در کل شبکه در غنی کردن مسیر پیام رسانی Wnt، مسیرهای پیام رسانی تنظیم کننده پرتوانی سلول‌های بنیادی، مسیرهای سرطان، سرطان پروستات، مسیر پیام رسانی Notch، چرخه سلولی، مسیر پیام رسانی TNF و مسیر پیام رسانی Hedgehog بیشترین نقش را دارند (شکل 1A). از طرفی به بررسی هستی شناسی ژن (Gene ontology: GO) در سه حوزه‌ی فرایندهای بیولوژیکی (Biological Process)، جزء سلولی (Cellular component) و عملکرد ملکولی (Molecular function) پرداخته شد (شکل 2C). نتایج حاصل نشان داد که شبکه ژنی حاصل در فرایندهای بیولوژیکی شامل متیلاسیون هیستون H3-K4، تنظیم مثبت متیلاسیون هیستون H3-K4، متیلاسیون هیستون لایزین، مسیر پیام رسانی با واسطه اینترلوکین ۶، تنظیم متیلاسیون هیستون H3-K4، تنظیم مثبت رونویسی miRNA، مسیر پیام رسانی Wnt، تعهد سرنوشت سلول اندودرمی شرکت دارد. در حوزه جزء سلولی (Cellular component) درکمپلکس‌های MLL3/4، کمپلکس Set1C/COMPASS، کمپلکس beta-catenin-TCF، کمپلکس catenin، کمپلکس هیستون استیل ترانسفراز، کمپلکس MLL1/2، کمپلکس H4 هیستون استیل ترانسفراز، کمپلکس MLL1، کمپلکس NSL و Adherens Junction مشارکت دارند و در حوزه عملکرد ملکولی در فعالیت‌های متیل ترانسفراز هیستون H3K4، Armadillo Repeat Domain Binding، رونویسی Coregulator Binding، رونویسی ناحیه تنظیم‌کننده اتصال اسید نوکلئیک، اتصال I-SMAD، اتصال R-SMAD، اتصال فعال‌کننده مشترک رونویسی، اتصال Frizzled و اتصال به فاکتور رونویسی به DNA دخالت دارند (شکل 2B). برای بررسی بیماری‌هایی که ژن‌های هدف در ایجاد آن‌ها دخیل می‌باشند، لیست ژن‌ها وارد پایگاه Disgenet شد. همان‌طور که در بالا اشاره شد ژن‌های OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 غالباً در بروز سرطان نقش دارند که در صورت بروز هرگونه اختلال در بیان آن‌ها می‌توانند در تنظیم سرطانی شدن سلول‌ها اثرگذار باشند. ژن‌های هدف دارای بیان واضح و مشخص در TGCTs می‌باشند که تأییدکننده هدف مطالعه ما یعنی دخالت در ایجاد TGCTs می‌باشد (شکل 2D). پس از انجام مراحل کشت و رنگ‌آمیزی و با آنالیز تصاویر ایمونوهیستوشیمی حاصل، بیان ژن‌های NANOG، OCT4، SOX2 و KLF4 در ESC-like cells بررسی شد. کلنی‌های ES مشتق شده از موش‌های تراریخته OCT4-GFP مثبت به شدت برای ژن‌های NANOG، SOX2 و KLF4 رنگ‌آمیزی شدند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی نمونه‌ها گزارش داده شد که فاکتورهای پرتوانی NANOG، OCT4، SOX2 و KLF4 توسط ESC-like cells بیان می‌شوند (شکل ۳).



شکل۲- A) نمودار حبابی مسیرهای پیام رسانی KEGG غنی شده توسط کل شبکه. B) مسیرهای پیام رسانی غنی شده توسط ژن‌های کلاس ۲. C) نمودار هستی شناسی ژن‌های شبکه پروتئینی. D) بررسی ژن‌های OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در پایگاه Disgenet.



شکل۳- بررسی بیان ژن‌های OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در سلول‌های ESC-Like به روش ایمونوهیستوشیمی. فلورسنت سبز نشان‌دهنده بیان OCT4 و فلورسنت آبی نشان‌دهنده DAPI می‌باشد. A) فلورسنت قرمز برای KLF4 در سلول‌های ESC-Like. B) فلورسنت قرمز برای NANOG در سلول‌های ESC-Like. C) فلورسنت قرمز برای SOX2 در ESC-Like. NANOG، KLF4، OCT4 و SOX2 بیان قابل توجهی را در ESC-Like نشان می‌دهند.



شکل۴- شکل شماتیک برای بیان نقش پیشتاز NANOG در حفظ خواص سلول‌های بنیادی جنینی.

بحث

سطح بیان ژن‌های پرتوانی برای حفظ حالت پرتوانی حیاتی است. در این مطالعه با انجام آنالیزهای بیوانفورماتیک به بررسی دقیق‌تر ارتباط میان ژن‌های NANOG، KLF4، OCT4 و SOX2 و هم‌چنین ژن‌هایی که دارای ارتباط نزدیک با آن‌ها می‌باشند، پرداختیم. با اعمال پارامترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری بر شبکه ژنی توانستیم قوی‌ترین ژن‌ها در شبکه را شناسایی کنیم که پارامتر درجه نشان‌دهنده میزان ارتباط هر ژن با سایر ژن‌های موجود در شبکه می‌باشد و مرکزیت واسطه‌گری بیانگر میزان انتقال اطلاعات موجود در شبکه از یک ژن خاص است. بر این اساس ژن‌های Crebbp، Gsk3b، Jun و Ctnnb1 قوی‌ترین ژن‌های شبکه می‌باشند. در ادامه با تقسیم بندی شبکه بر اساس پارامترهای موجود برای هر ژن، شبکه به چهار کلاس تقسیم شد. سپس با رسم نمودار مرتبط، قدرت ژن‌های موجود در هر کلاس سنجیده و مقایسه شد. هرکلاس بیانگر یک کلونی از ژن‌ها می‌باشد که بیشترین ارتباط را با یکدیگر دارند که این ارتباط نشان‌دهنده انجام عملکردهای زیستی توسط این کلونی‌ها می‌باشد. در این تقسیم‌بندی ژن‌های هدف ما در یک کلاس قرار گرفتند که نشان از تعامل زیاد آن‌ها با یکدیگر می‌باشد (کلاس ۲)، هم‌چنین با ژن‌های Crebbp، Ep300، Hdac1، Kat2a، Smarca4، Rbbp5، Wdr5، Ash21، Kmt2d، Hcfc1 و Esrrb دارای ارتباط نزدیکی هستند و در غنی کردن مسیرهای پیام رسانی شامل مسیر پیام رسانی Notch، مسیرهای پیام رسانی تنظیم‌کننده پرتوانی سلول‌های بنیادی، سندرم کوشینگ، چرخه سلولی، مسیر پیام رسانی TGF-β[1]، سرطان پروستات، سنتز هورمون رشد و ترشح و عمل، microRNAs در سرطان، مسیر پیام رسانی Wnt، مسیرهای تنظیم نادرست سرطان، رونویسی سرطان دخیل می‌باشند. لوستوفین و همکاران با مطالعه بر روی نمونه‌های بیضه انسانی، که بیان مشترک گیرنده‌های Notch2 و Notch4 را در سمینوما و کارسینوم در محل نشان می داد، این احتمال را مطرح کردند که سیگنال‌دهی Notch در کنترل تغییر میتوتیک/میوز در سلول‌های زایای اولیه نقش دارد. نویسندگان پیشنهاد کردند که اختلال در عملکرد این مکانیسم می‌تواند منجر به جداسازی غیرطبیعی کروموزومی و تولید سلول‌های آنیوپلوئیدی – پیش‌سازهایی برای رشد بیشتر سلول‌های سرطانی شود (۱۵). چندین لیگاند فوق‌خانواده TGF-β بر عملکرد سلول‌های بدنی در حال رشد در موش‌ها در طول بازه تکاملی معادل ایجاد GCNIS در بیضه جنین انسان تأثیر می‌گذارند. در انسان، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن TGF-β1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان بیضه مرتبط است (۱۶). فعال شدن مسیر Wnt توسط متیلاسیون پروموتر و افتراقی جهش سوماتیک یکی از ویژگی‌های برجسته TGCT در کودکان، نوجوانان و جوانان است و با نتایج بالینی ضعیف همراه است. به‌طور قابل توجهی مهارکننده‌های مولکولی کوچک Wnt می‌توانند سلول‌های TGCT را هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی سرکوب کنند (۱۷).

برخی از نشانگرهایی که در سلول‌های بنیادی نرمال بیان می‌شوند، توسط CSCs نیز بیان می‌شوند. فاکتورهای رونویسی پرتوان از جمله OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 فعالیت‌های بیولوژیکی CSCs را تنظیم می‌کنند. برای تشخیص بیماری‌هایی که ژن‌های هدف ما در آن‌ها دخیل می‌باشند از پایگاه Disgenet استفاده شد. ژن‌های مذکور غالباً در ایجاد انواع سرطان‌ها خصوصاً سرطان پروستات، نئوپلاسم بدخیم تخمدان و TGCTs دخیل می‌باشند. مطابق با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، Das و همکاران نیز با اشاره به نقش کلیدی OCT4 در حفظ خواص بنیادی بودن TGCTs، عنوان کردند با کاهش سطح پروتئین OCT4، سطوح سایر پروتئین‌های نشانگر بنیادی همچون SOX2 و NANOG کاهش می‌یابد (۱۸). از طرفی Baroni و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که ناحیه کروموزومی ۱۲p دارای ژن‌هایی از جمله NANOG و OCT4 می‌باشد که در توسعه TGCTs نقش دارند. این فاکتورهای رونویسی پرتوان بیان مشابهی توسط سلول‌های جنسی اولیه (PGCs)، گونوسیت‌های جنینی و GCNIC دارند (۱۹).

از طرفی بیان شدید OCT4_GFP در ESC-like cells

[1] Transforming growth factor-beta

نشان‌دهنده پتانسیل پرتوانی آن‌ها می‌باشد. طبق نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز ایمونوهیستوشیمی، ژن‌های NANOG، KLF4، SOX2 و OCT4 بیان قابل توجهی در ESC-like cells نشان دادند. این نتایج تأییدی است بر مطالعه Zhang و همکاران که OCT4، NANOG و SOX2 را به عنوان فاکتورهای تنظیم‌کننده پرتوانی ESC-like cells معرفی کردند (۲۰). Azizi و همکاران با تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی مقایسه‌ای لوله‌های اسپرم‌ساز موش‌ها نشان داد که KLF4 هم در محفظه پایه و هم در محفظه مجرای لوله‌های اسپرم‌ساز (قسمت تمایزنیافته و تمایزیافته) موش‌های بارور بیان می‌شود. در مقابل، در موش‌های تحت درمان با بوسولفان، هیچ بیانی از KLF4 مشاهده نشد (۲۱). مطالعات انجام شده بیان شدید KLF4 را در جمعیت تمایزنیافته سلول‌های اسپرماتوگونیا ثابت کرده‌اند که این فاکتور با تنظیم بیان NANOG مانع از تمایز ESCs می‌شود. از طرف دیگر عفونت لنتی ویروسی با بیان shRNA KLF4 باعث مهار بیان KLF4 و شروع تمایز ESCs می‌شود که این امر اهمیت این فاکتور رونویسی را در حفظ پرتوانی و خودنوسازی ESCs نشان می‌دهد. طی این مطالعه ثابت شده‌است که هر دو فاکتور رونویسی SOX2 و NANOG تنها با مکانیسم‌های پس از ترجمه، رونویسی KLF4 را تنظیم می‌کنند (۹). از طرفی Ronchi و همکاران به بیان مشترک چندین فاکتور رونویسی پرتوان از جمله NANOG، OCT4 و SOX2 در سمینوما و گونوسیت‌های طبیعی اشاره کردند. فاکتور SOX2 به عنوان نشانگر اختصاصی‌تر برای تشخیص سمینوما از سلول‌های سرطانی جنینی کاربرد دارد و امکان تشخیص افتراقی با این فاکتور میسر می‌شود (۲۲). هم‌چنین در مطالعه Perri و همکاران به بیان بسیار زیاد KLF4 در سلول‌های سمینوما اشاره شد که باعث مهار تمایز و حفظ تکثیر و پرتوانی سلول‌های جنسی در طول تومورزایی می‌شود و از این رو KLF4 برای تبدیل نئوپلاستیک در سلول‌های بنیادی بیضه حیاتی به شمار می‌آید (۲۳). OCT4 یکی از فاکتورهای رونویسی اصلی در رشد اولیه جنین است اما بیان آن در بزرگسالان نادر می‌باشد. با این حال، با بیان مجدد این ژن در سلول‌های سرطانی باعث بدخیم شدن سرطان می‌شود. Kim و همکاران در مطالعه خود نشان دادند فسفوریلاسیون سرین ۲۳۶ OCT4 سبب ایجاد تداخل در اتصال پروتئین فسفاتاز ۱ (PP1) به OCT4 می‌شود که سبب از دست رفتن فعالیت رونویسی OCT4 می‌شود و در ادامه تمایز سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد (۲۴). در مقایسه با سایر ژن‌های بنیادی، OCT4 بیان فراگیری در CSCs سرطان تخمدان، سرطان پروستات و سرطان مثانه دارد (۲۵). بساطی و همکاران NANOG را یکی از اساسی‌ترین فاکتورهای رونویسی در CSCs معرفی کردند؛ زیرا این فاکتور EMT را در CSCs تنظیم می‌کند و باعث پیش‌آگهی ضعیف در چندین سرطان می‌شود. NANOG با بیان بیش از حد در CSCs به‌عنوان فاکتور رونویسی ضروری در تومورزایی شناخته می‌شود (۲۶).

همان‌طور که در بالا اشاره شد قدرت ژن NANOG در کلاس‌بندی مربوطه بیشتر از سایر فاکتورها می‌باشد. فاکتور رونویسی NANOG با تنظیم تکثیر، آشکلپوتوز، تعیین سرنوشت سلولی و حفظ پرتوانی ESCs در رشد نقش بسزایی دارد. هم‌چنین با شناخت گسترده‌تر مسیرهای تنظیمی پایین‌دستی تأیید شد که NANOG نقش چند جانبه اعم از مقاومت دارویی، فرار از سیستم ایمنی، تکثیر سلول‌های سرطانی، تحرک و EMT را در تنظیم توسعه سرطان ایفا می‌کند و از طرف دیگر بسیاری از مطالعات ضمن تأیید صحت این موضوع که افزایش بیان NANOG و OCT4 مرتبط با زمان بقا، پیش‌آگهی ضعیف و ویژگی‌های آسیب‌شناسی نامطلوب می‌باشد، عنوان کردند که بیان کنترل نشده این دو فاکتور توسط CSCs سبب تکثیر گسترده، افزایش ظرفیت سرطان‌زایی و افزایش خودنوسازی نیز می‌شوند. (۲۷). بیان SOX2 به مراحل ابتدایی رشد جنینی محدود می‌شود. وجود این فاکتور برای پیشرفت فرآیندهای رشدی الزامی می‌باشد و اهمیت آن زمان مرگ جنین‌های دارای کمبود SOX2 بلافاصله بعد از لانه‌گزینی مشخص می‌شود.

SOX2به دلیل بیان زیاد پروتئین و تقویت کردن ژن، در بسیاری از سرطان‌های انسانی تنظیم نمی‌شود. یکی از عوامل مهم در پاتوژنز سرطان، ایجاد اختلال در بیان SOX2 می‌باشد. SOX2 به‌واسطه‌ی فعال کردن مسیرهای پیام رسانی اعم از مسیر Wnt و EMT بر تکثیر، تهاجم، متاستاز و مهاجرت سلول‌های سرطانی تأثیر

مثبت می‌گذارد که این اثر بسته به نوع سرطان می‌تواند متفاوت باشد. علاوه‌براین، شواهد نشان می‌دهند که SOX2 سبب ایجاد مقاومت در برابر درمان سرطان می‌شود و در CSCs بیان می‌شوند (۲۸). افزون بر نقش KLF4 در حفظ پرتوانی ESCs و برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک، این پروتئین به واسطه مدولاسیون در سرطان‌زایی و از طرفی به‌عنوان سرکوب‌گر سرطان در بافت‌های بالغ نقش دارد. به‌عنوان مثال، KLF4 سطوح نشانگرهای اپیتلیال مختلف در هومئوستاز اپیتلیال قرنیه هم‌چون E-cadherin را افزایش می‌دهد و از طرفی باعث کاهش نشانگرهای مزانشیمی مثل کاهش بیان ویمنتین و محلی‌سازی هسته‌ای β-کاتنین می‌شود. KLF4 می‌تواند باعث کاهش سیگنال‌دهی TGF-β از طریق ممانعت از انجام فسفوریلاسیون و محلی‌سازی هسته‌ای SMAD2 شود که در نهایت باعث مهار EMT در اپیتلیوم قرنیه می‌گردد (۲۹). در نتیجه کاهش ظرفیت ایجاد سرطان و متاستاز سلولی در نتیجه کاهش KLF4 می‌باشد (۳۰).

نتیجه‌گیری

بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که فاکتورهای رونویسی SOX2، NANOG، OCT4 و KLF4 دارای ارتباط و برهمکنش شدید با یکدیگر می‌باشند که برای حفظ خاصیت پرتوانی و تمایز الزامی می‌باشند. هم‌چنین نقش چشمگیری در سرطان‌های انسانی به‌ویژه در TGCT دارند. از طرفی طبق نتایج حاصل علاوه بر بیان شدید OCT4 در ESC-like cells، ژن‌های NANOG، KLF4 و SOX2 نیز در این رده سلولی بیان می‌شوند. اطلاعات بیشتر درباره بیان فاکتورهای پرتوانی در نمونه‌های بیماری‌ها و تغییرات ناشی از آن‌ها در طول زمان، به پژوهش‌های بالینی و توسعه داروهای جدید کمک خواهد کرد. از آن‌جایی که این فاکتورها ممکن است به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی سرطان مورد استفاده قرار گیرند، شناخت دقیق‌تر برای تشخیص زودهنگام و کاهش مخاطرات احتمالی بسیار حیاتی است. چنانچه تشخیص داده شود که بیان این فاکتورها در نمونه‌های بیمار افزایش یافته است، می‌توان به عنوان پیش‌آگهی برای تشخیص اولیه بیماری در نظر گرفته شود. همچنین، این مطالعات می‌توانند به محققان کمک کنند تا در راستای ایجاد درمان‌های دقیق‌تر و هدفمندتر برای بیماران سرطانی گام بردارند. در نتیجه، تحقیقات در حوزه بیوانفورماتیک و مطالعه برهم‌کنش‌های میان فاکتورهای اصلی پرتوانی به‌عنوان یک زمینه مهم و حیاتی در علم پزشکی به‌شمار می‌آید. با توسعه دانش در این حوزه، امید می‌رود که بتوان در تشخیص زودهنگام و بهبود بهترین روش‌های درمانی برای مبارزه با این بیماری مهم پیشرفت حاصل شود.

تقدیر و تشکّر

این مقاله در راستای پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "بررسی آزمایشگاهی بیان ژن POU5F1 در دو جمعیت تمایزیافته و تمایزنیافته سلول‌های جنسی بیضه" در سال ۱۴۰۱ با حمایت دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است. بدین‌وسیله از پرفسور Thomas Skutella که ما را در انجام تست‌های مولکولی در دانشگاه هایدلبرگ یاری نمودند، نهایت تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه براساس توافق‌نامه همکاری (MOU) بین دانشگاه هایدلبرگ آلمان و دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردید.

ملاحظات اخلاقی

ضمن رعایت پروتکل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های ملی بهداشت، آزمایش‌های حیوانی انجام شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه فناوری‌های نوین ویژه آمل با کد IR.ASMT.REC.1402.006 تأیید شد.

حمایت مالی

این مطالعه به پشتوانه مالی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شد.

مشارکت نویسندگان

مهلا مسعودی: طراحی داده‌های بیوانفورماتیک، نگارش مقاله و تجزیه و تحلیل داده‌ها را انجام داد. حسین عزیزی: انجام و طراحی

آزمایش، جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌ها را به عهده داشت. مقاله نهایی توسط نویسندگان بررسی و تأیید شد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1. Song H, Park H-J, Lee W-Y, Lee KH. Models and Molecular Markers of Spermatogonial Stem Cells in Vertebrates: To Find Models in Nonmammals. Stem Cells Int. 2022; 2022: 4755514. DOI: 10.1155/2022/4755514.
2. Raghavan P. Metadichol, a natural ligand for the expression of Yamanaka reprogramming factors in somatic and primary cancer cell lines. Research Square. 2022. DOI: 10.21203/rs.3.rs-1727437/v4
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): 281-9. DOI: 10.22074/cellj.2019.6068
4. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. Exp Biol Med (Maywood). 2020; 245(5): 456-64. DOI: 10.1177/1535370220905560
5. Najafzadeh B, Asadzadeh Z, Motafakker Azad R, Mokhtarzadeh A, Baghbanzadeh A, Alemohammad H, et al. The oncogenic potential of NANOG: An important cancer induction mediator. J Cell Physiol. 2021; 236(4): 2443-58. DOI: 10.1002/jcp.30063
6. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, et al., editors. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. Semin Cancer Biol. 2020: 67(Pt 1): 122-153. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.03.004
7. Jagga B, Edwards M, Pagin M, Wagstaff KM, Aragão D, Roman N, et al. Structural basis for nuclear import selectivity of pioneer transcription factor SOX2. Nat Commun. 2021; 12(1): 1-11. DOI: 10.1038/s41467-020-20194-0
8. He Z, He J, Xie K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis. Cell Death Discov. 2023; 9(1): 118. DOI: 10.1038/s41420-023-01416-y
9. Villodre ES, Felipe KB, Oyama MZ, de Oliveira FH, da Costa Lopez PL, Solari C, et al. Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth. Biochem Biophys Res Commun. 2019; 517(2): 324-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.07.064
10. Batool A, Karimi N, Wu X-N, Chen S-R, Liu Y-X. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. Cell Mol Life Sci. 2019; 76(9): 1713-27. DOI: 10.1007/s00018-019-03022-7
11. Gurcan F, Cagiltay NE. Exploratory analysis of topic interests and their evolution in bioinformatics research using semantic text mining and probabilistic topic modeling. IEEE Access. 2022; 10: 31480-93. DOI: 10.1109/ACCESS.2022.3160795
12. 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
13. Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells. Cell J (Yakhteh). 2020; 22(1): 60. DOI: 10.22074%2Fcellj.2020.6532
14. Azizi H, Tabar AN, Skutella T, Govahi M. In vitro and in vivo determinations of the anti-GDNF family receptor alpha 1 antibody in mice by immunochemistry and RT-PCR. Int J Fertil Steril. 2020; 14(3): 228-33. DOI: 10.22074/ijfs.2020.6051
15. Lustofin S, Kamińska A, Brzoskwinia M, Cyran J, Kotula-Balak M, Bilińska B, Hejmej A. Nuclear and membrane receptors for sex steroids are involved in the regulation of Delta/Serrate/LAG-2 proteins in rodent sertoli cells. Int J Mol Sci. 2022; 23(4): 2284. DOI: 10.3390/ijms23042284
16. Radhakrishnan K, Luu M, Iaria J, Sutherland JM, McLaughlin EA, Zhu H-J, Loveland KL. Activin and BMP Signalling in Human Testicular Cancer Cell Lines, and a Role for the Nucleocytoplasmic Transport Protein Importin-5 in Their Crosstalk. Cells. 2023;12(7):1000. Cells. 2023; 12(7): 1000. DOI: 10.3390/cells12071000

17. Bu L, Yang Q, McMahon L, Xiao G-Q, Li F. Wnt suppressor and stem cell regulator TCF7L1 is a sensitive immunohistochemical marker to differentiate testicular seminoma from non-seminomatous germ cell tumor. Exp Mol Pathol. 2019; 110: 104293. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104293

18. Das MK, Haugen ØP, Haugen TB. Diverse roles and targets of miRNA in the pathogenesis of testicular germ cell tumour. Cancers. 2022; 14(5): 1190. DOI: 10.3390/cancers14051190

19. Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the origin of testicular germ cell tumors: from gonocytes to testicular cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2019; 10: 343. DOI: 10.3389/fendo.2019.00343

20. Zhang J, Arisha AH, Hua J. Epigenetic regulation in stem cells. Epigenetics and Reproductive Health: Academic Press. 2021; 69-79. DOI: 10.1016/B978-0-12-819753-0.00004-0

21. Azizi H, NiaziTabar A, Mohammadi A, Skutella T. Characterization of DDX4 gene expression in human cases with non-obstructive azoospermia and in sterile and fertile mice. J Reprod Infertil. 2021; 22(2): 85-91. DOI: 10.18502%2Fjri.v22i2.5793

22. Ronchi A, Cozzolino I, Montella M, Panarese I, Zito Marino F, Rossetti S, et al. Extragonadal germ cell tumors: not just a matter of location. A review about clinical, molecular and pathological features. Cancer Med. 2019; 8(16): 6832-40. DOI: 10.1002/cam4.2195

23. Perri A, Rago V, Malivindi R, Maltese L, Lofaro D, Greco EA, et al. Overexpression of p75NTR in Testicular Germ Cell Tumors: a New Biomarker of Cancer Differentiation? 2021; 2021030273. DOI: 10.20944/preprints202103.0273.v1

24. Kim DK, Song B, Han S, Jang H, Bae S-H, Kim HY, et al. Phosphorylation of OCT4 serine 236 inhibits germ cell tumor growth by inducing differentiation. Cancers. 2020; 12(9): 2601. DOI: 10.3390/cancers12092601

25. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, Li W. The role and specific mechanism of OCT4 in cancer stem cells: a review. Int J Stem Cells. 2020; 13(3): 312-25. DOI: 10.15283/ijsc20097

26. Basati G, Mohammadpour H, Emami Razavi A. Association of high expression levels of SOX2, NANOG, and OCT4 in gastric cancer tumor tissues with progression and poor prognosis. J Gastrointest Cancer. 2020; 51(1): 41-7. DOI: 10.1007/s12029-018-00200-x

27. Vasefifar P, Motafakkerazad R, Maleki LA, Najafi S, Ghrobaninezhad F, Najafzadeh B, et al. Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. Gene. 2022; 827: 146448. DOI: 10.1016/j.gene.2022.146448

28. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J, editors. SOX2 in development and cancer biology. Semin Cancer Biol. 2020: 67(Pt 1): 74-82. Elsevier. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.007

29. Subbalakshmi AR, Sahoo S, McMullen I, Saxena AN, Venugopal SK, Somarelli JA, Jolly MK. KLF4 Induces Mesenchymal–Epithelial Transition (MET) by Suppressing Multiple EMT-Inducing Transcription Factors. Cancers. 2021; 13(20): 5135. DOI: 10.3390/cancers13205135

30. Qi X-t, Li Y-l, Zhang Y-q, Xu T, Lu B, Fang L, et al. KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells. Acta Pharmacol Sin. 2019; 40(4): 546-55. DOI: 10.1038/s41401-018-0050-6