بررسی بیان ژن *Tsga10* در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های ژرمینال در محیط آزمایشگاهی

سید محمد میریونسی[۱]
زینب جمالی[۲]
معصومه رضی‌پور[۲]
الهه علوی‌نژاد[۲]
محمد حسین مدرسی[*۲]

۱- مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲٤ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

زمینه و هدف: تولید سلول‌های ژرمینال در محیط آزمایشگاهی می‌تواند نویددهنده درمان تعدادی از موارد ناباروری مردان باشد. مطالعه حاضر ضمن بررسی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های ژرمینال، بیان ژن Testis specific 10 (*Tsga10*) را نیز برای اولین‌بار در این فرایند مورد بررسی قرار داده است.

روش بررسی: این مطالعه یک مطالعه آزمایشگاهی (In vitro) است که در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران از بهمن ۱۳۹۰ تا اسفند ۱۳۹۱ انجام شده است. سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط رتینوییک اسید (Retinoic acid, RA) به سمت سلول‌های ژرمینال القا شدند. در نمونه سلول‌های در حال تمایز روزهای هفت، ۱۲ و ۲۵ بیان سه گروه از ژن‌های Pre-meiotic، Meiotic و Post-meiotic با استفاده از Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) بررسی شد. برای بررسی بیان ژن *Tsga10* به‌عنوان یک ژن اختصاصی اسپرماتوژنز، Real-time RT-PCR انجام گرفت و نتایج تفسیر گردید. حضور پروتیین TSGA10 در سلول‌های تمایزیافته با وسترن بلاتینگ و ایمونوسایتوشیمی (Immunocytochemistry) تایید شد.

یافته‌ها: در مراحل اولیه روند تمایز (روز ۱۲) میزان نسبی بیان *Tsga10* به ۰/۳۲ مقدار پایه آن در سلول‌های غیر تمایزیافته کاهش یافت. پس از بیان ژن‌های Post-meiotic (روز ۲۵) میزان نسبی بیان *Tsga10* به‌مقدار ۲/۲ افزایش یافت. همچنین میزان بیان نسبی *Tsga10* در بیضه موش پنج، ۱۰ و ۱۵ روزه به‌ترتیب ۱۲۵، ۱۵۰ و ۱۷۰ بود. این میزان در بیضه موش بالغ برابر ۱٦۵۰ برآورد شد.

نتیجه‌گیری: در طی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی، بیان *Tsga10* پس از بیان ژن‌های Post-meiotic نسبت به مرحله Meiotic حدود ٦/٦ برابر افزایش داشت. افزایش بیان *Tsga10* در طی عبور از مرحله Meiotic به Post-meiotic، نقش این ژن و محصول پروتیین آن‌را در مراحل تکامل سلول‌های ژرمینال نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، *Tsga10*، سلول‌های بنیادی جنینی، تمایز سلولی، ناباروری مردان، موش.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۳۰۰۵
E-mail: modaresi@tums.ac.ir

مقدمه

حدود ۱۵-۱۰٪ زوج‌ها در سراسر دنیا از مشکل ناباروری رنج می‌برند که نیمی از آنها را مردان نابارور تشکیل می‌دهند.[۱] اگرچه برخی از موارد ناباروری مردان با علل شناخته شده‌ای مانند مشکلات مجاری تناسلی یا اختلالات هورمونی قابل توجیه هستند، اما موارد بسیاری نیز همچنان ناشناخته مانده‌اند. از علل اصلی ناباروری در مردان کاهش تعداد اسپرم، کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی یا اسپرم‌های فاقد حرکت پیشرونده است.[۲] پژوهش‌های انجام‌شده درباره علل مولکولی اختلال حرکت اسپرم در سال‌های اخیر، اجازه بررسی ژن‌ها و پروتیین‌های مؤثر در تولید اسپرم سالم را به پژوهشگران داده است. ژن‌ها و پروتیین‌های مربوط به ساختار اسپرم،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

سیگنال‌های کلسیمی، فسفوریلاسیون پروتیینی و متابولیسم هر یک می‌توانند در کارکرد طبیعی اسپرم مؤثر باشند. تاکنون عوامل ژنتیکی مختلفی به‌عنوان عامل مؤثر در اختلال حرکتی اسپرم مطرح شده‌اند. یکی از این بیماری‌ها، سندرم کارتاژنر (Kartagener syndrome) است که به‌عنوان بیماری اتوزومال مغلوب با اختلال عمومی در سلول‌های مژکدار بدن از جمله اسپرم و مسیرهای تنفسی شناخته می‌شود.

تاکنون سه ژن مؤثر در ساختمان آکسونم به‌عنوان عوامل مولکولی این بیماری شناخته شده‌اند و به‌نظر می‌رسد همچنان ژن‌های دیگری در این بیماری مؤثر باشند.[۳] در قطعه میانی دم اسپرم، آکسون متوسط با ۹ فیبر فشرده خارجی (Outer dense fibers, ODF) احاطه شده و با پوشش میتوکندریال در برگرفته می‌شود. در بخش انتهایی که پس از قطعه میانی قرار گرفته است، این پوشش میتوکندریال به‌وسیلهٔ پوشش فیبری (Fibrous sheath, FS) جایگزین می‌گردد. در FS دو عدد از ODF به‌وسیلهٔ قطعات طولی جایگزین می‌شود که این قطعات توسط طناب‌های عرضی به‌هم وصل می‌شوند. مطالعاتی که در ساختار و متابولیسم FS انجام شده، نشان داده است که به‌احتمالی این جزء نقش مهمی در توانایی حرکت اسپرم دارد.[۴] ژن *Tsga10* جزو دسته ژن‌های اختصاصی بیضه است که بر روی کروموزوم یک موش و کروموزوم دو انسان واقع شده است. این ژن در مراحل آخر اسپرماتوژنز بیان می‌شود و به‌ظاهر نقش مهمی در پوشش فیبری دم اسپرم دارد. این ژن در بیضه افراد نرمال بیان می‌شود اما در افراد مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی بیان نمی‌شود.[۵]

توانایی تولید سلول‌های ژرمینال از سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells, ESCs) الگو قدرتمندی را برای بررسی تکامل سلول‌های ژرمینال ایجاد کرده است. این الگو به‌ویژه در انسان که برداشت و دستکاری بافت‌ها در محیط داخل بدن دشوار است ارزشمند است.[۶] به‌تازگی در چندین آزمایشگاه تولید سلول‌های شبیه اووسیت و سلول‌های ژرمینال مردانه از ESC نشان داده شده است.[۷]

طبق این مطالعات تعداد کمی از ESCs می‌توانند به‌طور خودبه‌خودی یا در حضور فاکتورهای رشد ویژه مثل BMP4, BMP7 یا BMP8 به سلول‌های ژرمینال پریموردیال (Primordial germ cells, PGCs) که پیش‌ساز اسپرم هستند تبدیل شوند.[۸] در یک مورد هم ثابت شده که سلول‌ها وارد میوز شده‌اند و توانایی لقاح و تولید نوزاد زنده را دارند. به‌طور کلی سلول‌های ژرمینال تولیدی توسط مورفولوژی، پروفایل بیان ژنی، مارکرهای پروتیینی سطحی و الگوی متیلاسیون ویژه ژرمینال قابل تشخیص هستند.[۹] با توجه به مطالعات گذشته هنوز مسایل بسیاری در مورد تولید گامت‌های مردانه از سلول‌های بنیادی جنینی ناشناخته باقی مانده است. در این مطالعه چگونگی بیان ژن *Tsga10* به‌عنوان یک مارکر نهایی تولید گامت‌های مردانه، در طول تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های ژرمینال در موش مورد ارزیابی قرار گرفت و همچنین جنبه‌های جدیدی از این فرایند روشن گردید.

روش بررسی

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی (In vitro) بوده و از بهمن ۱۳۹۰ تا اسفند ۱۳۹۱ در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. در این مطالعه از سلول‌های فیبروبلاست‌های جنینی موشی Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) به‌عنوان لایه‌ی سلولی تغذیه‌کننده (Feeder) استفاده شد، جهت تهیه این سلول‌ها، جنین‌ها را در روز ۱۲/۵ بارداری موش‌ها خارج کرده، کیسه زرده، آمنیون و جفت از آن جدا شده و جنین‌ها پس از چندین مرحله شست‌وشو، قطعه‌قطعه می‌شوند، سپس این قطعات درون ۱۰ ml محلول Trypsin/EDTA ریخته و پس از چرخش مغناطیسی و سانتریفیوژ، رسوب سلولی تشکیل می‌شود که آن‌را در محیط کشت قرار داده سپس این محلول را به دو فلاسک کشت سلولی ۷۵ cm^2 منتقل می‌شوند. از میتومایسین C برای متوقف کردن تکثیر این سلول‌ها استفاده شد.

سلول‌های بنیادی جنینی روی این محیط کشت داده شدند. جهت القای فرایند تمایز، سلول‌های بنیادی جنینی با به‌کارگیری تریپسین از سلول‌های MEF جدا می‌شوند. پس از آن، مراحل تمایز برای سلول‌ها شروع شد. برای شروع تمایز ابتدا لازم است Leukemia inhibitory factor (LIF) از مواد محیط کشت حذف شود. در این مطالعه از رتینوییک اسید (Retinoic acid, RA) با غلظت 10^{-5} M برای القای تمایز استفاده شد. پس از اضافه کردن RA به محیط کشت، تعدادی از سلول‌های بنیادی جنینی وارد مرحله میوز می‌شوند. برای اینکه سلول‌ها بتوانند میوز را به پایان برسانند باید سلول‌هایی که وارد میوز

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

نشده‌اند را از بقیه جدا کرد. سلول‌های بنیادی جنینی مورد استفاده در این مطالعه حاوی ناقل pEGFP1 بودند که پیش‌تر، پروموتر ژن *Stra8* پیوست به سکانس EGFP در آن کلون گردیده بود. بنابراین با ورود سلول‌ها به میوز، GFP در آنها بیان می‌شود و سلول‌ها سبزرنگ می‌شوند، که اساس جداسازی سلول‌ها است. جداسازی سلول‌ها با دستگاه BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام گرفت. طول‌موج دستگاه برای این آزمایش روی ۵۰۷ nm به‌عنوان سیگنال Emission تنظیم شد. پس از انجام Cell sorting سلول‌های جداشده به یک فلاسک ۲۵ cm^2 حاوی MEF غیرفعال شده منتقل شدند.

برای تمایز نهایی، از سلول‌هایی که بر اساس بیان GFP جدا شده‌اند استفاده شدند. این سلول‌ها را تحت اثر RA با غلظت 10^{-8} M قرار داده و هر روز محیط کشت سلول‌ها را تعویض شد و در طی این مدت مورفولوژی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌هایی از سلول‌ها در فواصل زمانی هفت، ۱۲ و ۲۵ روز پس از آغاز RA، از سلول‌ها تهیه شد. RNA از سلول‌ها و نیز از بافت بیضه موش پنج و ۱۰ و ۱۵ روزه استخراج شد.

بررسی بیان سه گروه ژن Pre-meiotic، Meiotic و Post-meiotic: در این مطالعه بیان ژن‌های *Oct4* و *Nanog* به‌عنوان مارکرهای Pluripotency، ژن *Stra8* به‌عنوان مارکر Pre-meiotic، ژن‌های *Dazl* و *Sycp3* به‌عنوان مارکرهای Meiotic و ژن‌های *Protamin1* و *Spata19* به‌عنوان مارکرهای Post-meiotic با استفاده از تکنیک Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) بررسی شد.

بررسی تغییرات بیان ژن *Tsga10*: بیان این ژن به‌عنوان یک ژن اختصاصی اسپرماتوژنز توسط Real-time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و در کنار آن از ژن *Tbp* نیز به‌عنوان یک ژن House keeping استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از StepOne™ software version 2.1 (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) استفاده گردید.

بررسی حضور پروتیین TSGA10 در سلول‌های تمایزیافته: جهت انجام وسترن بلاتینگ سلول‌های تمایزیافته لیز شده و الکتروفورز SDS-PAGE بر روی محصول لیز سلولی و همچنین لیز بافت بیضه انجام شد پس از آن بلاتینگ صورت گرفت. واکنش ایمونوسایتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی اولیه منوکلونال TSGA10 Mouse Anti Human و آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti Mouse Ig-HRP انجام شد. پس از آن با استفاده از محلول رنگ‌زا DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، بودن پروتیین TSGA10 بررسی شد.

یافته‌ها

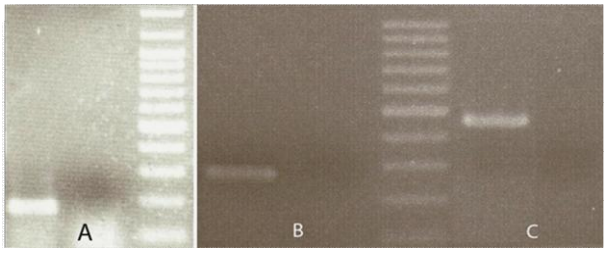
ژن‌های پرتوانی (Pluripotency): در سلول‌های بنیادی جنینی ژن‌های *Nanog* و *Oct4* بیان بالایی داشتند ولی در نمونه‌های کنترل منفی بیانی نداشت.

بیان ژن‌های Pre-meiotic، Meiotic و Post-meiotic: بیان ژن *Stra8* (به‌عنوان ژن Pre-meiotic) بعد از شروع RA به‌شدت افزایش یافته و این به‌معنی ورود سلول‌ها به مرحله میوز است. در همین زمان است که سلول‌های بنیادی جنینی که ناقل وارد آنها شده است به رنگ سبز در می‌آیند. بیان *Stra8* در تمامی نمونه‌های روزهای هفت و ۱۲، ۲۵ بالا بود. بیان ژن‌های Meiotic (*Dazl* و *Sycp3*) از هفت روز پس از شروع RA آغاز شد. ژن *Dazl* روز هفت و ژن *Sycp3* در نمونه‌های روز ۱۲ شروع به بیان کردند. به‌نظر می‌رسد آغاز ورود سلول‌ها به میوز از روز هفت پس از شروع RA باشد (شکل ۱). بیان ژن‌های *Prm1*، *Spata19* به‌عنوان مارکرهای Post-meiotic در تمامی نمونه‌های ES غیرتمایزیافته و نمونه‌های روزهای هفت و ۱۲ منفی بود. پس از گذشت ۲۵ روز از شروع فرایند تمایز بیان این ژن‌ها مثبت شد.

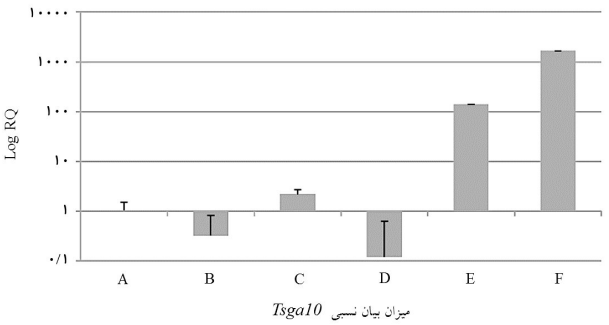
واکنش Real-time برای بررسی بیان ژن *Tsga10* در تمامی نمونه‌های موجود انجام شد. واکنش‌ها به‌صورت دوتایی (Duplicate) طراحی و در دستگاه StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) انجام شد.

سلول‌های بنیادی جنینی غیرتمایزیافته بیان پایینی از *Tsga10* را نشان دادند. در آنالیز میزان بیان ژن با نرم‌افزار StepOne Software، این میزان بیان در سلول‌ها را معادل بیان پایه در نظر گرفته شد و عدد یک به آن اختصاص داده شد. نتایج نشان داد که در مراحل اولیه روند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های ژرمینال (یعنی در روز ۱۲) میزان نسبی بیان *Tsga10* به ۰/۳۲ کاهش یافت. پس از بیان ژن‌های Post-meiotic یعنی در نمونه مربوط به روز ۲۵ میزان نسبی بیان *Tsga10* به‌مقدار ۲/۲ افزایش یافت. در این مطالعه از نمونه بیضه موش پنج، ۱۰ و ۱۵ روزه و نیز موش بالغ به‌عنوان کنترل استفاده شد. میزان بیان نسبی

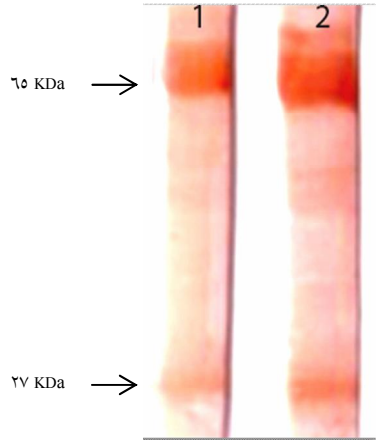
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]



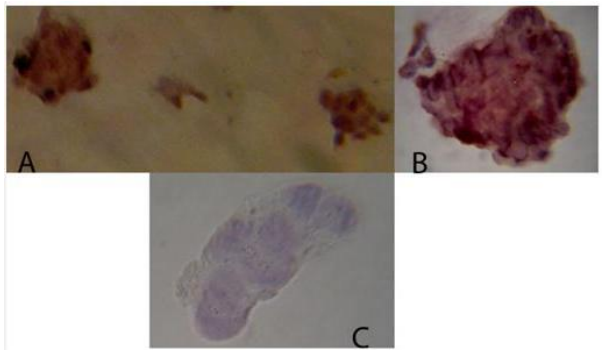
شکل ۱-A: بیان ژن *Star8* در (۱) سلول‌های ES پس از RA و (۲) سلول‌های بنیادی جنینی غیرتمایزیافته. B: بیان *Dazl* در (۱) نمونه روز هفت و (۲) سلول‌های بنیادی جنینی غیرتمایزیافته و C: بیان *Sycp3* در (۱) نمونه روز ۱٤ و (۲) سلول‌های بنیادی جنینی غیرتمایزیافته. (Ladder 100bp)



شکل ۲: میزان بیان نسبی *Tsga10* در نمونه‌های مختلف: A: سلول‌های بنیادی جنینی غیرتمایزیافته. B: روز ۱۲، C: روز ۲۵، D: تمایز به کاردیومیوسایت، E: بیضه موش ۱۵ روزه و F: بیضه موش بالغ.



شکل ۳: بیان پروتیین TSGA10 در سلول‌های تمایزیافته (۱) و بیضه موش بالغ (۲)



شکل ٤: A و B: کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی در طی تمایز بیان پروتیین TSGA10، C: کنترل منفی (کلونی‌های بدون آنتی‌بادی اولیه)

Tsga10 در بیضه موش پنج روزه برابر ۱۲۵، در بیضه موش ۱۰ روزه برابر ۱۵۰ و در بیضه موش ۱۵ روزه ۱۷۰ بود. میزان این بیان در بیضه موش بالغ برابر ۱٦۵۰ بود (شکل ۲).

بر اساس این داده‌ها در طی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های ژرمینال در هنگام ورود سلول‌ها به میوز میزان بیان *Tsga10* به حدود ۱/۳ کاهش یافت. سپس در طی گذر از میوز به مرحله Post-meiotic میزان بیان *Tsga10* حدود ٦/۹ برابر افزایش یافت. در محیط In vivo نیز میزان بیان *Tsga10* در بیضه موش ۱۵ روزه ۱/۱۳ برابر موش ۱۰ روزه و در موش ۱۰ روزه ۱/۲ برابر موش پنج روزه بود. میزان بیان *Tsga10* در بیضه موش بالغ حدود ۹/۷ برابر بیان در موش ۱۵ روزه بود.

جهت بررسی وجود پروتیین TSGA10 در سلول‌های بنیادی جنینی تمایزیافته به سلول‌های ژرمینال و نمونه بیضه موش از تست وسترن بلات استفاده شد. در نمونه بیضه موش یک باند قوی ٦۵ کیلودالتون و یک باند ضعیف‌تر در محدوده ۲۷ کیلودالتون دیده شد. در نمونه سلول‌های تمایزیافته هم این دو باند با شدت کمتر دیده شد (شکل ۳). بر اساس پروتکل، سلول‌های بنیادی جنینی تمایزیافته به ژرم سل با آنتی‌بادی پلی‌کلونال TSGA10 مورد بررسی قرار گرفتند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

پس از اضافه کردن DAB، سلول‌های موردنظر به رنگ قهوه‌ای درآمدند که نشان‌دهنده حضور پروتیین TSGA10 در سلول‌ها بود (شکل ٤).

بحث

در مطالعه حاضر روند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت سلول‌های ژرمینال را بر اساس زمان‌بندی گذر از مراحل مختلف میوز بررسی و از ژن *Tsga10* به‌عنوان یک شاهد جهت بررسی سلول‌های ژرمینال تولیدی از نظر بیان ژن‌های عملکردی و نیز مقایسه‌ی تمایز بین محیط In vitro و In vivo استفاده کردیم.

مطالعات پیشین نشان‌دهنده ارتباط قوی بین بیان ژن *Tsga10* و انجام اسپرماتوژنز هستند.[۱۰] پروتیین کامل TSGA10 قبل از شکسته شدن ٦٥ کیلودالتون است و پس از شکسته شدن، تکه ۲۷ کیلودالتونی قسمت N-terminal آن در ساختار دم اسپرم شرکت می‌کند. در پژوهش‌های پیشین نشان داده شده که پروتیین TSGA10 یک دامین تفکیک کروموزومی دارد و در سلول‌های با میزان رشد بالا مانند بافت‌های جنینی و تعداد زیادی از سرطان‌های اولیه بیان بالایی دارد.[۱۱]

در نتیجه این ژن به‌عنوان یک ژن Cancer testis antigen معرفی شده است.[۱۲و۱۳] همچنین در پژوهش‌های اخیر بیان این ژن در برخی از بیماری‌های اتو ایمیون نشان داده شده است.[۱٦-۱٤] مشاهده گردید که در طی گذر سلول‌های ژرمینال تولید شده در محیط آزمایشگاهی از مرحله Meiotic به Post-meiotic میزان بیان Tsga10 افزایش می‌یابد که این افزایش مطابق با تغییرات In vivo است. مراحل تکامل سیر اسپرماتوژنز در بیضه موش پس از تولد به سه فاز می‌تواند تقسیم شود: ازدیاد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (Spermatogonial stem cells, SSCs) در روزهای یک تا هفت پس از تولد، شروع میوز و تمایز SSCs به اسپرماتوسایت و در نهایت تولید اسپرماتیدهای گرد هاپلویید در طی روزهای هشت تا ۲۰ پس از تولد و در نهایت اسپرمیوژنز و تولید اسپرماتوزوآی بالغ در طی روزهای ۲۱ تا ۳٦ پس از تولد موش.[۱۷]

نتایج این مطالعه نشان داد، میزان بیان ژن *Tsga10* در بیضه موش بالغ نسبت به موش ۱۵ روزه حدود ۹/۷ برابر است، که در طی گذر سلول‌های ژرمینال از فاز میوزی (موش ۱۵ روزه) به Post-meiotic و اسپرم بالغ میزان بیان Tsga10 به‌شدت افزایش می‌یابد و همچنین در طی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی، بیان *Tsga10* در روز ۲۵ پس از شروع RA (پس از بیان ژن‌های Post-meiotic) نسبت به کشت روز ۱۲ (فاز میوزی) حدود ٦/٦ برابر افزایش داشت. افزایش بیان *Tsga10* در طی عبور از فاز Meiotic به Post-meiotic، نقش این ژن و محصول پروتیین آن‌را در مراحل تکامل سلول‌های ژرمینال نشان می‌دهد. اگرچه هم در محیط In vivo و هم در محیط In vitro افزایش بیان *Tsga10* مشاهده شد اما این افزایش در محیط In vivo بیش از محیط In vitro بود. این تفاوت بیان ممکن است به‌علت تفاوت در میزان کارایی فرایند تمایز در بیضه موش نسبت به کشت تک لایه در محیط In vitro باشد.

در آزمایش وسترن بلات در نمونه بیضه موش ما دو باند مجزا مشاهده کردیم که باند بزرگ‌تر مربوط به پروتیین کامل TSGA10 و باند کوچک‌تر مربوط به بخش شکسته شده است که در ساختار دم اسپرم نقش دارد. در نمونه سلول‌های ژرمینال حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی نیز ما به‌طور ریزبینانه همین الگو را مشاهده کردیم که بیانگر مسیر درست تمایزی است. در این مطالعه جهت پیگیری تمایز سلول‌های بنیادی به مرحله‌ی Post-meiotic از ژن *Stra8* به‌عنوان ژن Pre-meiotic، ژن‌های *Dazl* و *Sycp3* به‌عنوان ژن‌های Meiotic و ژن‌های *Prm1* و *Spata19* به‌عنوان ژن‌های Post-meiotic استفاده شد.

یکی از روش‌های بررسی اثرات یک ژن در موجودات زنده غیرفعال کردن این ژن و مطالعه تغییر در بیان ژن‌های هدف و یا اختلالات عملکردی در موجود است. تولید موجود زنده به این روش یعنی تولید حیوان Knockout روش زمان‌بر و پرهزینه‌ای است.[۱۸] مشکلات تولید سازه مناسب جهت غیرفعال کردن ژن به‌علاوه مسایل مربوط به تولید جنین و حیوان زنده، این کار (تولید حیوان Knockout) را در زمره سخت‌ترین مطالعات آزمایشگاهی قرار داده است. زمانی که قرار است بررسی ژن‌های دخیل در فرایند اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گیرند این فرایند کمی سخت‌تر می‌شود.

یک روش جایگزین برای بررسی نقش ژن‌های دخیل در مراحل اسپرماتوژنز، استفاده از الگو تولید سلول‌های ژرمینال در محیط

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

آزمایشگاهی (In vitro derived germ cells) از سلول‌های بنیادی جنینی به‌جای تولید حیوان Knockout است. به‌طوری که اگر در سلول‌های بنیادی جنینی یک ژن اختصاصی بیضه را Knockout کرده (در یک زنجیره یا هر دو زنجیره DNA) و سپس این سلول‌ها را در فرایند تمایز به‌سمت سلول‌های ژرمینال قرار دهیم، اثرات غیرفعال شدن آن ژن در سلول‌های حاصل قابل بررسی است.

بنابراین به‌نظر می‌رسد با توجه به شباهت الگوی بیان ژنی در فرایند تولید آزمایشگاهی سلول‌های ژرمینال از سلول‌های بنیادی جنینی، از این سلول‌ها می‌توان به‌عنوان الگویی برای بررسی اثرات غیرفعال کردن یک ژن در فرایند اسپرماتوژنز استفاده کرد. افزون بر این با بررسی‌های بیشتر و بهبود روش‌های تمایزی در آینده می‌توان از این سلول‌ها برای حل مشکل ناباروری در تعدادی از بیماران نابارور استفاده کرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان "بررسی بیان ژن *Tsga10* در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های ژرمینال در محیط آزمایشگاهی (In vitro)" است که در مقطع دکتری تخصصی، در سال ۹۱-۱۳۹۰ با کد ۱۱۸۶۸-۳۰-۰۱-۹۰ با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

References

1. Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl* 2012;14(1):40-8.
2. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002;4 Suppl:s41-9.
3. Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl* 2001;22(2):302-15.
4. Gadella BM, Van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:307-19.
5. Mobasheri MB, Modarressi MH, Shabani M, Asgarian H, Sharifian RA, Vossough P, et al. Expression of the testis-specific gene, TSGA10, in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res* 2006;30(7):883-9.
6. Kerr CL, Cheng L. The dazzle in germ cell differentiation. *J Mol Cell Biol* 2010;2(1):26-9.
7. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(20):11457-62.
8. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 2006;24(2):266-73.
9. Bucay N, Yebra M, Cirulli V, Afrikanova I, Kaido T, Hayek A, et al. A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009;27(1):68-77.
10. Modarressi MH, Cameron J, Taylor KE, Wolfe J. Identification and characterisation of a novel gene, TSGA10, expressed in testis. *Gene* 2001;262(1-2):249-55.
11. Behnam B, Modarressi MH, Conti V, Taylor KE, Puliti A, Wolfe J. Expression of Tsga10 sperm tail protein in embryogenesis and neural development: from cilium to cell division. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344(4):1102-10.
12. Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD. Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(15):5316-9.
13. Ghafouri-Fard S, Modarressi MH. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. *Arch Iran Med* 2009;12(4):395-404.
14. Smith CJ, Oscarson M, Ronnblom L, Alimohammadi M, Perheentupa J, Husebye ES, et al. TSGA10 - A target for autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2011;73(2):147-53.
15. Roghanian A, Jones DC, Pattisapu JV, Wolfe J, Young NT, Behnam B. Filament-associated TSGA10 protein is expressed in professional antigen presenting cells and interacts with vimentin. *Cell Immunol* 2010;265(2):120-6.
16. Reimand K, Perheentupa J, Link M, Krohn K, Peterson P, Uibo R. Testis-expressed protein TSGA10 an auto-antigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Int Immunol* 2008;20(1):39-44.
17. Malkov M, Fisher Y, Don J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 1998;59(1):84-92.
18. Childs AJ, Saunders PT, Anderson RA. Modelling germ cell development in vitro. *Mol Hum Reprod* 2008;14(9):501-11.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, February 2015; Vol. 72, No. 11: 748-754 *Original Article*

Expression analysis of *Tsga10* during in vitro differentiation of germ cells from mouse embryonic stem cell

Mohammad Miryounesi M.D., Ph.D.[1]
Zeinab Jamali M.Sc.[2]
Masoumeh Razipour M.Sc.[2]
Elahe Alavinejad M.Sc.[2]
Mohammad Hossein Modarressi M.D., Ph.D.[2*]

1- Genomic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Pour Sina St., Qods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88953005
E-mail: modaresi@tums.ac.ir

Abstract

Received: 09 Aug. 2014 Accepted: 14 Jan. 2015 Available online: 09 Feb. 2015

Background: About 15% of couples have fertility problems and male factor in fertility accounts for half of the cases. In vitro generation of germ cells introduces a novel approach to male infertility and provides an effective system in gene tracking studies, however many aspects of this process have remained unclear. We aimed to promote mouse embryonic stem cells (mESCs) differentiation into germ cells and evaluate its effectiveness with tracking the expression of the Testis specific 10 (*Tsga10*) during this process.

Methods: This is an in vitro study that was performed in department of Medical Genetics in Tehran University of Medical Sciences from February 2012 to March 2013. Mouse embryonic stem cells were cultured on mouse embryonic fibroblast as feeder layer. Then mESCs were differentiated into germ cells in the presence of Retinoic Acid. Based on developmental schedule of the postnatal testis, samples were taken on the 7th, 12th and 25th days of the culture and were subjected to expression analysis of a panel of germ cell specific genes (*Stra8* as pre-meiotic, *Dazl* and *Sycp3* as meiotic and *Protamin1* and *Spata19* as Post-meiotic). Expression of Testis Specific Gene 10 (*Tsga10*) at RNA and protein levels was then analyzed.

Results: It was shown that transition of embryonic stem cells from mitosis to meiosis occurred between 7th and 12th days of mESC culture and post-meiotic gene expression did not occur until 25th day of the culture. Results showed low level of *Tsga10* expression in undifferentiated stem cells. During transition from meiotic to post-meiotic phase, *Tsga10* expression increased in 6.6 folds. This finding is in concordance with *in vivo* changes during transition from pre-pubertal to pubertal stage. Localization of processed and unprocessed form of the related protein was similar to those in vivo as well.

Conclusion: Expression pattern of *Tsga10*, as a gene with critical function in spermatogenesis, is similar during *in vitro* and *in vivo* germ cell generation. The results suggest that *in vitro* derived germ cells could be a trusted model to study genes behavior during spermatogenesis.

Keywords: Cell differentiation, embryonic stem cells, gene expression, male infertility, mice, *Tsga10*.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]