

Investigation and Comparison of Communication Network and Expression of *KLF4* and *POU5F1* Genes During Spermatogenesis

Maedeh Yazdani Dizicheh¹ , Hossein Azizi^{2*} , Dariush Gholami³ , Amir Khaki⁴ 

¹Dept of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran

²Dept of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

³Dept of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

⁴Dept of veterinary medicine, Faculty of veterinary medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Dec. 18, 2023

Received in Revised Form:

Feb. 23, 2024

Accepted: May. 19, 2024

Published Online: Oct. 05, 2024

* Correspondence to:

Hossein Azizi

Dept of Nano Biotechnology,
Faculty of Biotechnology,
Amol University of Special
Modern Technologies, Amol,
Iran

Email:

h.azizi@ausmt.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Spermatogenesis is the primary process of sperm production occurring in seminiferous tubules. Spermatogonial stem cells (SSCs) have the ability for self-renewal, differentiation, and the transmission of genetic information to subsequent generations. *KLF4* and *POU5F1* are transcription factors expressed in a wide range of tissues and play key roles in such processes as apoptosis, differentiation, proliferation, and cellular development. The present study aimed to assess the expression levels of *KLF4* and *POU5F1* genes in mouse embryonic stem cells (*mESCs*), spermatogonial stem cells (SSCs), embryonic-like stem cells (*ES-like*), and testicular cells, and identify the signaling pathways associated with them in the process of spermatogenesis.

Materials & Methods: In this experimental study, spermatogonial cells were extracted from mouse testes using enzymatic digestion method and cultured in GSC medium containing FGF, EGF, and GDNF. Thereafter, the expression of *KLF4* and *POU5F1* genes was examined in *mESCs*, *SSCs*, *ES-like*, and testicular cells was investigated using immunocytochemistry, immunohistochemistry, and reverse transcription-polymerase chain reaction methods, and protein-protein interactions and signaling pathways were evaluated using bioinformatics methods.

Results: The *KLF4* and *POU5F1* genes exhibited positive expression in *ES-like* cells and testicular cells. The assessment of *KLF4* mRNA and *POU5F1* mRNA expression levels demonstrated that *KLF4* expression is higher in *mESCs* and *ES-like* cells compared to other cells, while *POU5F1* expression is higher in *SSCs*. Both *KLF4* and *POU5F1* are considered essential and powerful genes that share a common class and function.

Conclusion: The findings of this study indicated that *KLF4* and *POU5F1* play crucial roles in the proper development of sperm and are present in various types of cells, including *mESCs*, *SSCs*, *ES-like* cells, and testicular cells. These factors are key components of sexual stem cells and contribute to stem cell proliferation, making them potential diagnostic markers for these cell lines.

Keywords: Embryonic stem-like cells, *KLF4*, *POU5F1*, signaling pathways, Spermatogenesis, Spermatogonial stem cells

How to cite this paper: Yazdani Dizicheh M, Azizi H, Gholami D, Khaki A. Investigation and Comparison of Communication Network and Expression of *KLF4* and *POU5F1* Genes During Spermatogenesis. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(4):53-65.

بررسی و مقایسه شبکه ارتباطی و نحوه بیان ژن های *KLF4* و *POU5F1* طی فرایند اسپرماتوژنز

مآنده یزدانی دیزجه^۱، حسین عزیزی^{۲*}، داریوش غلامی^۳، امیرخاکي^۴

^۱ گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
^۲ گروه نانو زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
^۳ گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
^۴ گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

مقدمه: اسپرماتوژنز فرایند اصلی تولید اسپرم است که در لوله های اسپرم ساز انجام می شود. سلول های بنیادی اسپرم ساز (SSCs) توانایی خودنوسازی، تمایز و انتقال اطلاعات ژنتیکی را به نسل های بعدی دارند. *POU5F1* و *KLF4* جزو عوامل های رونویسی هستند که در طیف وسیعی از بافت ها بیان می شوند و نقش مهمی در فرایندهایی مانند آپوپتوز، تمایز و تکثیر و توسعه سلولی ایفا می کنند. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان بیان ژن های *POU5F1* و *KLF4* در سلول های بنیادی جنینی موش (*mESCs*)، سلول های بنیادی اسپرم ساز (*SSCs*)، سلول های بنیادی شبه جنینی (*ES-like*) و سلول های بیضه و همچنین شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آنها در فرایند اسپرماتوژنز است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های اسپرم ساز از بیضه موش با استفاده از روش هضم آنزیمی استخراج گردید و در محیط کشت GSC موش حاوی EGF، FGF، EGF و GDNF کشت داده شدند؛ سپس بیان ژن های *POU5F1* و *KLF4* با روش های ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و واکنش زنجیره ای پلیمراز رونویسی معکوس در سلول های *mESCs*، *SSCs*، *ES-like* و سلول های بیضه بررسی گردید و تعاملات پروتئین-پروتئین و مسیر سیگنالینگ با روش های بیوانفورماتیکی ارزیابی شد.

یافته های پژوهش: ژن های *POU5F1* و *KLF4* در سلول های *ES-like* و بیضه بیان مثبت داشتند. اندازه گیری میزان بیان *mRNA KLF4* و *mRNA POU5F1* نشان داد که بیان *KLF4* در سلول های *mESCs* و *ES-like* نسبت به سایر سلول ها بیشتر و میزان بیان *POU5F1* در سلول های *SSCs* بیشتر است و *KLF4* و *POU5F1*، هر دو از ژن های اصلی و قدرتمندند که یک کلاس مشترک و عملکرد مشترک دارند.

بحث و نتیجه گیری: این نتایج نشان می دهد که *POU5F1* و *KLF4* از عوامل ضروری برای انجام صحیح فرایند اسپرماتوژنز هستند و در سلول های *mESCs*، *SSCs*، *ES-like* و سلول های بیضه بیان دارند. این فاکتورها از عوامل اصلی سلول های بنیادی جنسی و عوامل پرتوانی سلول های بنیادی به شمار می روند و قابلیت استفاده به عنوان عامل های تشخیصی برای این رده های سلولی را دارند.

واژه های کلیدی: اسپرماتوژنز، سلول های بنیادی اسپرم ساز، مسیرهای سیگنالینگ، *POU5F1*، *KLF4*

استاد: یزدانی دیزجه مآنده، عزیزی حسین، غلامی داریوش، خاکی امیر. بررسی و مقایسه شبکه ارتباطی و نحوه بیان ژن های *POU5F1* و *KLF4* طی فرایند اسپرماتوژنز. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مهر ۱۴۰۳؛ ۳۲(۴): ۶۵-۵۳.



فرایند تولید شدن اسپرم در پستانداران به عنوان اسپرم‌زایی تعریف می‌شود که در لوله‌های اسپرم‌ساز در بیضه رخ می‌دهد. این فرایند ۵-۷ روز پس از تولد در جوندگان و ۱۰ تا ۱۳ سال پس از تولد در مردان شروع و طی حیات ادامه می‌یابد (۱). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (SSCs) سلول‌های بنیادی در بیضه هستند که اساس اسپرم‌زایی اند و برای باروری ضروری هستند (۲). SSCها دو ویژگی دارند: ۱. خودتجدیدشوندگی برای حفظ جمعیت سلول‌های بنیادی و ۲. تمایز برای تداوم تولید اسپرم در مردان پس از بلوغ (۳). SSCها سلول‌های پتانسیل تمایزی هستند که با سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) قابل مقایسه‌اند. علاوه بر این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی (*ES-like*) نیز یافت شده‌اند که منبع سلول‌های پرتوان برای درمان بر پایه سلول‌های بنیادی هستند (۴)؛ بنابراین، تعادل میان خودنوسازی SSC و تمایز در بیضه بالغ برای حفظ اسپرم‌زایی و باروری در زندگی ضروری است (۵). در پستانداران، اسپرماتوژنز در طول حیات توسط زیرجمعیتی از اسپرماتوگونی‌های نوع A (تمایز نیافته) حفظ می‌شود. اسپرماتوگونی‌های A با هسته تیره (Adark) سلول‌های بنیادی ذخیره‌شونده هستند، در حالی که اسپرماتوگونی‌های A با هسته بی‌رنگ (Apale) سلول‌های بنیادی خود تجدیدشونده‌اند (۶). چندین زیرگروه در اسپرماتوگونی A در جوندگان بالغ وجود دارد (۷).

(AS) SSCs یک زیرجمعیت از اسپرماتوگونی نوع A هستند. اسپرماتوگونی‌های تک‌سلولی جدا شده‌ای هستند که توانایی تجدید خود یا تقسیم و تمایز به اسپرماتوگونی‌های (Apr) را دارند. اسپر (Apr) ماتوگونی‌های جفت‌شده دوتایی هستند. آن‌ها به‌طور همزمان به زنجیره‌های اسپرماتوگونی (Aal) تقسیم می‌شوند. از آنجا که از نظر مورفولوژیکی ویژگی‌های کمی از تمایز هسته‌ای یا سیتوپلاسمی را نشان می‌دهند، سلول‌های A، Apr و Aal در مجموع اسپرماتوگونی تمایز نیافته نامیده می‌شوند (۷)؛ بنابراین، اسپرماتوگونی‌های AP به‌صورت میتوز تقسیم می‌گردند و اسپرماتوگونی‌های ۴، ۸، ۱۶ و گاهی اوقات ۳۲ Aal را به‌وجود می‌آورند که باعث

ایجاد اسپرماتوگونی‌های متوسط و نوع B می‌شوند (۸). اسپرماتوگونی‌های نوع B آخرین تقسیم میتوز را برای تولید اسپرماتوسیت‌های اولیه انجام می‌دهند که اولین تقسیم میوز را برای تولید اسپرماتوسیت‌های ثانویه انجام می‌دهند؛ در نتیجه، تقسیم میوز دوم در نهایت، به اسپرماتید هاپلوئید منجر می‌گردد. در فرایند اسپرماتوژنز، عامل‌های بسیاری نقش دارند؛ از جمله *KLF4* و *POU5F1*. عامل *KLF4* یک پروتئین انگشت روی حاوی عامل رونویسی است که در طیف وسیعی از بافت‌ها در پستانداران بیان می‌شود (۹). جایگاه ژن *KLF4* انسان روی کروموزوم q31۹ قرار دارد، در حالی که *KLF4* موش روی کروموزوم B34 است. عامل *KLF4* به خانواده عامل‌های SP/KLF تعلق دارد (۱۰). *KLF4* بخشی از گروهی از پروتئین‌ها (همراه با Sox2، *POU5F1* و c-Myc) است که امکان برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های تمایز یافته نهایی را به سلول‌های بنیادی پرتوان فراهم می‌کند (۱۱). عامل *KLF4* موجود در موش ۴۸۳ اسید آمینه با وزن مولکولی تخمین زده‌شده ۵۳ کیلو دالتون دارد و ۹۱ درصد شباهت به اسید آمینه *KLF4* انسان دارد. عامل *KLF4* نقش مهمی در تولید اسپرم دارد. در بیضه موش، *KLF4* به‌شدت در سلول‌های زایا پس از میوز که در حال تمایز و تبدیل به سلول‌های اسپرم هستند و در سلول‌های سرتولی بیان می‌شود (۱۲). در بیضه انسان، *KLF4* در اسپرماتیدهای تمایز دهنده و در بیشتر سلول‌های لیدینگ نیز بیان می‌گردد (۱۳). در موش‌ها، عامل *KLF4* همراه با عامل‌های رونویسی دیگر پروتئین غشایی CXADR همانند پروتئین غشایی (CLMP) را در سلول‌های سرتولی فعال می‌کند و بنابراین، انتقال سلول‌های جنسی را در سراسر بیضه می‌تواند تنظیم نماید (۱۴). OCT4 که توسط *POU5F1* کدگذاری می‌شود، یک عامل رونویسی از خانواده POU است (۱۴). خانواده OCT4 به‌شدت در سلول‌های جنینی پرتوان و سلول‌های زاینده بیان می‌گردد؛ اما در طول تمایز رشدی موش جنینی در سطوح پایینی قرار دارد. OCT4 با تنظیم رونویسی ژن، تمایز خودنوسازی سلول‌های بنیادی را تنظیم می‌کند. OCT4 در اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته بیان می‌شود. با این حال، بیان OCT4 محدودتر است و OCT4

KEGG (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>)
Gephi (<https://www.genome.jp/kegg>) و از نرم افزار
استفاده شد.

هضم آنزیمی بافت بیضه و کشت سلول‌های آن:

سلول‌های بیضه موش، بعد از جداسازی از حیوان، در محلول نمکی بافر فسفات قرار داده شدند؛ سپس لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه از کپسول بیضه جدا گردیدند؛ سپس محلول حاصل برای به‌دست آوردن سوسپانسیون تک‌سلولی به آرامی پیتاژ شد. پس از سانتریفیوژ و حذف محلول بالایی، نمونه‌ها شسته و پس از عبور از فیلتر نایلونی، سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف گردید و سلول‌های باقی‌مانده در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونیال کشت داده شدند (۱۷)؛ سپس سلول‌های منفرد حاصل از بافت بیضه هضم‌شده روی ظروف کشت پوشش داده‌شده با ژلاتین قرار گرفتند. سلول‌های کشت‌شده در محیط GSC موش (mGSC) شامل محیط *stemPro-34*، ۱ درصد مکمل (*Invitrogen*، N2 (USA)، ۶ میلی گرم/میلی لیتر D-گلوکز (*Sigma Aldrich*، USA)، ۵ میلی گرم/میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (*Sigma Aldrich*، USA)، ۱ درصد L-گلوتامین (*PAA*، USA)، ۰/۱ درصد β -mercaptoethanol (*Invitrogen*، USA)، ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین (*PAA*، USA)، ۱ درصد ویتامین‌های NEAA MEM (*PAA*، USA)، ۱ درصد آمینو اسیدهای غیرضروری (*PAA*، USA)، ۳۰ نانوگرم/میلی لیتر استرادیول (*Sigma Aldrich*، USA)، ۶۰ نانوگرم/میلی لیتر پروژسترون (*Sigma Aldrich*، USA)، ۲۰ نانوگرم/میلی لیتر EGF (*Sigma Aldrich*، USA)، ۱۰ نانوگرم/میلی لیتر FGF (*Sigma Aldrich*، USA)، ۸ نانوگرم/میلی لیتر GDNF (*Sigma Aldrich*، USA)، ۱۰۰ واحد/میلی لیتر LIF (*Sigma Aldrich*، USA)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر آسکوربیک اسید (*Sigma Aldrich*، USA)، ۳۰ میکروگرم/میلی لیتر پیرویک اسید (*Sigma Aldrich*، USA)، ۱ میکروگرم/میلی لیتر DL-لاکتیک اسید (*Sigma Aldrich*، USA) و استرادیول ۳۰ نانوگرم/میلی لیتر، پروژسترون ۶۰ نانوگرم/میلی لیتر و ES-1 FBS (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 5 درصد) کشت داده شدند (۱۸).

ممکن است ترجیحاً در As بیان گردد (۱۵). با توجه به نقش حیاتی آن در حفظ پرتوانی، فعالیت OCT4 باید به‌شدت تنظیم شود تا از تداوم رده زایا و تمایز مناسب بافت‌ها و اندام‌های مختلف اطمینان حاصل گردد (۱۶). با توجه به مطالعات و تحقیقات انجام‌شده در گذشته و اکنون، ضرورت و اهمیت برخی از عوامل برای روند طبیعی اسپرماتوژنز شناخته‌شده است و این مطالعه نیز با هدف یافتن نشانگرها و ژن‌های سلول‌های زایا برای پیشبرد و رویکردهای جدید برای درمان ناباروری و سایر بیماری‌ها انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۲-۱۴۰۱، در گروه نانو زیست‌فناوری دانشکده زیست‌فناوری دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردید؛ همچنین این مطالعه کد اخلاق از دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل به شماره ثبت Ir.ausmt.Rec.1402.007 دارد.

ایجاد شبکه PPI، تجزیه و تحلیل مجموعه ژن‌ها و نقش آن‌ها:

ژن‌های دخیل در فرایند اسپرماتوژنز در NCBI توسط COREMINE شناسایی شدند و در پایگاه‌های داده آنالین STRING vol.11.5 برای ساخت شبکه PPI استفاده گردیدند. از نرم افزار Cytoscape vol.3.9.1 (<http://www.cytoscape.org>) برای ایجاد، تجزیه و تحلیل شبکه PPI و نمایش ارتباطات آن‌ها استفاده شد. اولین گره‌های همسایه با ارتباط مستقیم با یکدیگر شناسایی و انتخاب گردید. نقش‌های بیولوژیکی ژن‌ها و محل بیان آن‌ها در شبکه PPI و گره‌های همسایه و نقش تنظیم‌کنندگی آن‌ها بر یکدیگر نشان داده شد و تجزیه و تحلیل ارتباط ژن‌های عملکردی با استفاده از تجزیه و تحلیل STRING Enrichment در نرم افزار Cytoscape انجام گردید. ارتباط عملکردی مرتبط با داده‌های ما نیز بدون در نظر گرفتن مقدار FDR بررسی شد.

بررسی مسیرهای سیگنالینگ ژن‌های *KLF4* و *POU5F1*:

برای مطالعه و بررسی مسیرهای پیام‌رسانی غنی‌شده توسط ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* از Enricher

اختصاصی توالی در یک لوله آزمایشگاهی تکثیر گردید و تعداد رونوشت‌های هدف با استفاده از TaqMan RT-PCR بر روی BioMark Real-Time (qPCR) مشخص شد. رونویسی معکوس در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام گردید که با حرارت دادن به ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه غیرفعال شد. cDNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه دناتوره گردید. پس از آن، محصولات در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه در ۱۴ سیکل تقویت شدند. محصولات تقویت شده تا ۵ برابر رقیق گردیدند و سپس با Universal PCR Master Mix و TaqMan در یک سیستم BioMark تجزیه و تحلیل شدند. لازم به ذکر است، هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز گردید. برای تجزیه و تحلیل نهایی، داده‌هایی که در سیستم Biomark وجود نداشت، با یک Ct 30 جایگزین شدند و داده‌ها با GAPDH و تغییر بیان mRNA در مقایسه با سلول‌های تغذیه کننده MEF نرمال گردیدند. تجزیه و تحلیل با نرم افزار GenEx صورت گرفت و از تجزیه و تحلیل MultiD، Excel و SPSS vol.26 استفاده شد (۲۰).

پردازش بافت برای ایمونوهیستوشیمی (IMH):

بافت بیضه از موش‌های نر برداشته و سپس در PBS شسته شد و در پارافورمالدئید ۴ درصد برای حدود ۲۴ ساعت در دمای اتاق تثبیت گردید. بیضه دهیدراته شده در Paraplast Plus قالب گیری شد و بلوک‌های بافت بیضه با میکروتوم با ضخامت حدود ۱۰ میکرومتر بریده شدند. بخش‌ها روی اسلایدهای Superfrost Plus نصب گردید و تا زمان استفاده در دمای اتاق نگهداری شد. همه برش‌ها با گریل پارافین زدایی گردید و پیش از رنگ آمیزی در یک سری کاهشی (درصد) اتانول دهیدراته شد. پس از بازیابی شدن آنتی ژن با واسطه گرما و بافر نیترات سدیم ۱۰ میلی مولار با pH 6 یا 1 EDTA میلی مولار با pH 8 در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه، آنتی ژن‌هایی که متصل نگردیدند، با سرم ۱۰ درصد و Triton X-100 3 درصد و در PBS 90 درصد مسدود و غیرفعال شدند و رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس (همان‌طور که در بالا توضیح داده شد) ادامه

کشت سلول‌های mESC و ES-like cell:

سلول‌های mESC و شبه ES در محیط ES حاوی KO-DMEM یا محیط با گلوکز بالا DMEM، FBS، محلول MEM NEAA، L-گلوتامین، Pen-Strep، مرکاپتواتانول و LIF کشت گردیدند. این سلول‌ها به تلاقی رسیدند. حدود ۴ الی ۵ روز پس از شروع کشت، سلول‌های mESC و شبه ES پس از شستشو با PBS به MEFfeeder جدید منتقل شدند و به مدت ۳ دقیقه با تریپسین-EDTA تیمار گردیدند. تریپسین EDTA با ۱۵ درصد FBS غیرفعال شد (۱۸).

رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی (ICC):

برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی، از پلیت‌های ۲۴ خانه استفاده گردید و سلول‌ها در آن کشت داده شدند. برای فیکس کردن سلول‌های کشت داده شده از 4 PFA درصد استفاده می‌گردد؛ سپس این سلول‌ها با FBS و Tween20 شست و شو داده شدند. برای نفوذپذیر کردن یا PCE سلول‌ها از Triton حل شده در PBS، استفاده گردید و سلول‌ها با آنتی بادی‌های اولیه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند؛ سپس این روند برای آنتی بادی‌های ثانویه نشان دار فلوکروم نیز تکرار گردید. برای رنگ آمیزی از DAPI استفاده شد؛ سپس از میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, BX51, Japan) و میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری (کانفوکال) (Zeiss LSM 700) برای بررسی سلول‌های نشان دار شده استفاده گردید (۱۹).

تجزیه و تحلیل بیان ژن در سیستم Fluidigm Biomark:

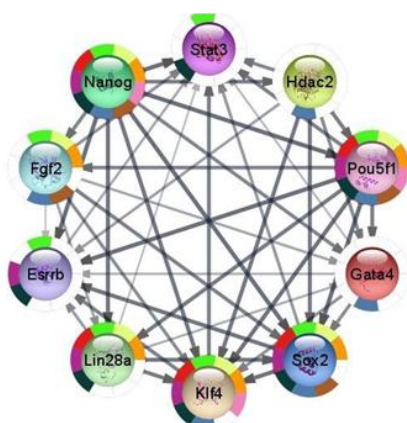
از چیپ‌های مخصوص Fluidigm برای اندازه گیری بیان ژن‌های سلول‌های زایا و پرتوان استفاده شد. ژن خانه‌دار GAPDH که برای کنترل استفاده گردید، در انواع مختلف سلول‌های کشت شده مانند سلول‌های بنیادی اسپرم ساز نوع I، نوع II، ES-like و mESCs بیان نشان داد. در هر نمونه، حدود ۱۰۰ سلول به صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف با میکروپیپت یا میکرومانیپلاتور برداشته شد و بلافاصله منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در ادامه، طی فرایندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، mRNA به cDNA رونویسی معکوس شد که به طور

سپس با استفاده از آزمون *Tukey* ارزیابی شد. اگر مقدار $P < 0.05$ به دست آمد، تفاوت میان گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

بررسی برهم‌کنش‌های *KLF4* و *POU5F1*:

در این بخش، از داده پایگاه‌های موجود همچون COREMINE و NCBI و *STRING* استفاده گردید. در ادامه، از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد و با جداسازی ژن‌های دارای تأثیر مستقیم و نقش تنظیم‌کنندگی بر فرایند اسپرماتوژنز و ارتباط با یکدیگر، رسم شبکه پروتئین-پروتئین آن‌ها صورت گرفت. نتایج بررسی‌ها بر این مشاهدات نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های *KLF4* و *POU5F1* با سایر پروتئین‌ها مانند *FGF2*، *STAT3* و *NANOG* و نحوه تأثیرگذاری آن‌ها بر یکدیگر در فرایند اسپرماتوژنز هستند (A) و در جدول نیز محل بیان هریک از پروتئین‌ها با رنگ مجزا مشخص شده است (B) (شکل شماره ۱).



A

دسته	رنگ نمودار	نام	توضیحات	مقدار value
TISSUES	Orange	BTO:0006081	سلول‌های بنیادی پروتئین استانی	3.32E-15
TISSUES	Yellow	BTO:0006080	سلول‌های بنیادی جنینی انسان	5.4E-15
TISSUES	Green	BTO:0006078	سلول بنیادی پروتئین	3.49E-13
TISSUES	Red	BTO:0001268	سلول سوماتیک	5.29E-12
TISSUES	Purple	BTO:0001086	سلول بنیادی جنینی	3E-10
GO Biological Process	Dark Blue	GO:0019827	نگهداری از جمعیت سلول‌های بنیادی	6.97E-10
TISSUES	Light Blue	BTO:0000452	فیبروبلاست	4.22E-8
TISSUES	Brown	BTO:0002666	سلول بنیادی بالغ	3.04E-6
TISSUES	Pink	BTO:0001581	خط سلول‌های بنیادی جنینی	2.44E-5

B

شکل شماره ۱. تجزیه و تحلیل عملکرد ژنی *STRING* با استفاده از Cytoscape

ارتباط یک ژن با ژن‌های دیگر گفته می‌شود و مرکزیت واسطه‌گری برای تشخیص میزان تأثیر انتقال یک ژن بر جریان انتقال اطلاعات در یک شبکه می‌گویند. *POU5F1* و *KLF4* از ژن‌های اصلی هستند و ارتباطاتشان با دیگر ژن‌های اصلی مشخص شده است (شکل شماره ۲). این نرم‌افزار امکان تشخیص قدرت ژن‌ها در شبکه و شناسایی ژن‌های اصلی را فراهم می‌کند؛ سپس ژن‌های موجود در شبکه بر اساس این مؤلفه‌ها کلاس‌بندی شدند و موقعیت ژن‌های *KLF4* و

یافت. برای ایمونوهیستوشیمی در برش‌های حاصل، بافت بیضه (همان‌طور که در بالا توضیح داده شد) تثبیت گردید. بافت بیضه خشک‌شده در *PBS* شسته شد و در ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد ساکارز *PBS* به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردید و سپس بافت در *Tissue Tek* قرار داده شد. بلوک‌های منجمد با *cryostat (Leica CM 3050S)* در برش‌های ۱۲ تا ۲۰ میکرومتر برش داده شدند. برش‌ها روی اسلایدهای شیشه‌ای *Superfrost Plus* قرار گرفتند و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. همه برش‌های منجمد در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه خشک شدند و پس از آن، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس انجام گردید که در بالا به تفصیل توضیح داده شد (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری:

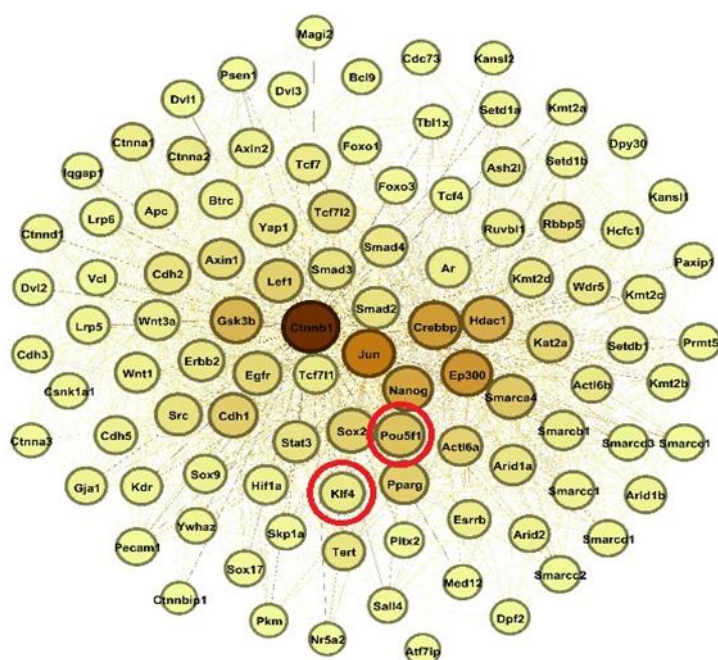
همه آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار گردید. میانگین بیان ژن‌ها در گروه‌ها محاسبه شد و گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار SPSS vol.26 بررسی گردید؛

تحلیل ارتباطات عملکردی *POU5F1*، *KLF4* و بررسی مسیرهای سیگنالیستیک:

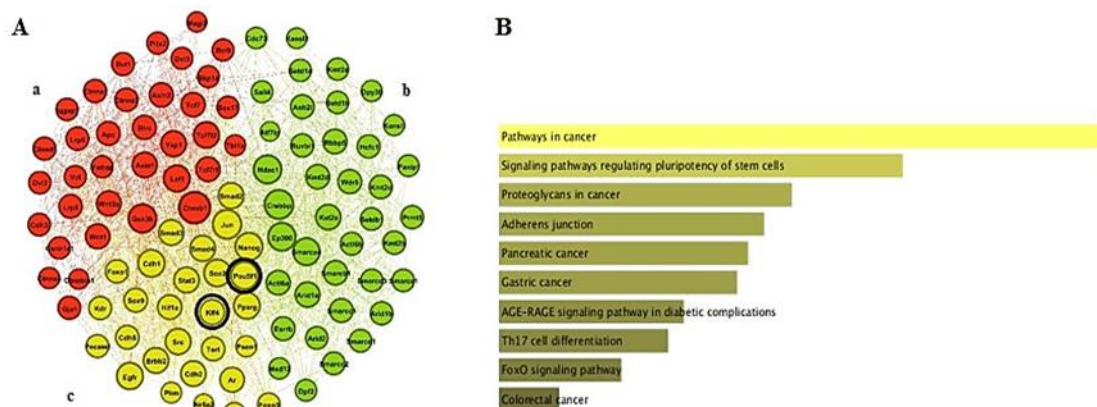
به‌منظور رسم شبکه ژنی مرتبط با *KLF4* و *POU5F1* بر اساس مؤلفه‌های درجه و مرکزیت واسطه‌گری از نرم‌افزار Gephi استفاده شد. در این شبکه، درجه با اندازه دایره‌ها و مرکزیت واسطه‌گری با رنگ مشخص می‌گردد. هرچه درجه بیشتر باشد، دایره‌ها بزرگ‌تر و هرچه مرکزیت واسطه‌گری بیشتر باشد، پررنگ‌تر هستند. درجه به میزان

برای تشخیص ژن‌های اصلی که بیشترین ارتباط را با سایر ژن‌ها دارند، مقایسه مؤلفه‌های درجه و مرکزیت واسطه‌گری مشخص می‌شوند و کلاس‌بندی کردن شبکه مدنظر، مجموعه ژن‌هایی که با یکدیگر ارتباطات بیشتری دارند، با سایت STRING و نرم‌افزار Gephi مشخص شد؛ همچنین تحلیل عملکرد کلاس مدنظر با استفاده از سایت Enricher و KEGG انجام گردید (شکل‌های شماره ۲ و ۳).

POU5F1 در شبکه مشخص گردید (کلاس c). این شبکه به ۳ کلاس a، b و c تقسیم شده است. ژن‌های موجود در هر کلاس ارتباطات ژنی بالا و ارتباط عملکردی بیشتری دارند و *POU5F1* و *KLF4* هر دو در کلاس c قرار دارند (A). تحلیل عملکرد کلاس مدنظر با استفاده از سایت Enricher و KEGG نشان‌دهنده این است که *POU5F1*، *KLF4* و سایر ژن‌های موجود در کلاس c عملکردهایی هماهنگ باهم دارند (B) (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۲. تحلیل و ارزیابی ژن‌های اصلی با اعمال فیلترهای درجه و مرکزیت واسطه‌گری با استفاده از Gephi

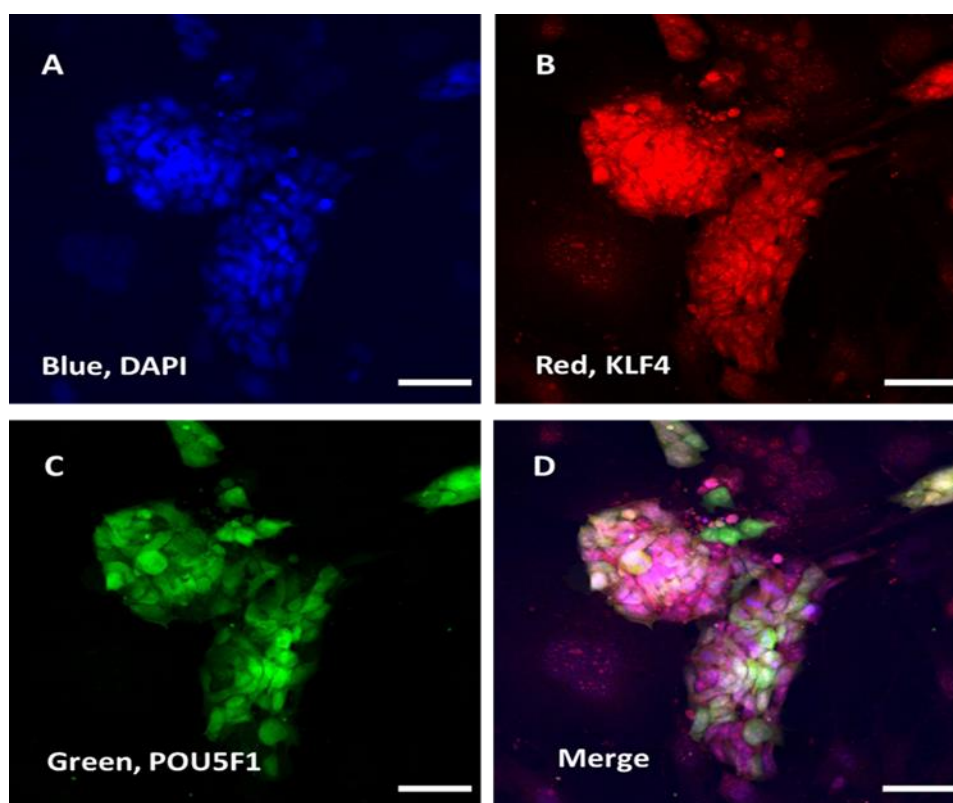


شکل شماره ۳. تحلیل و ارزیابی کلاس‌بندی

تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی *POU5F1* و *KLF4* در سلول های *ES-like*:

در مرحله اول، بیان *POU5F1* و *KLF4* در سلول های *ES-like* موش به وسیله ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شد. تصویر به دست آمده برای تأیید وجود SSC با ایمونوسیتوشیمی بررسی گردید. پس از رنگ آمیزی سلول ها

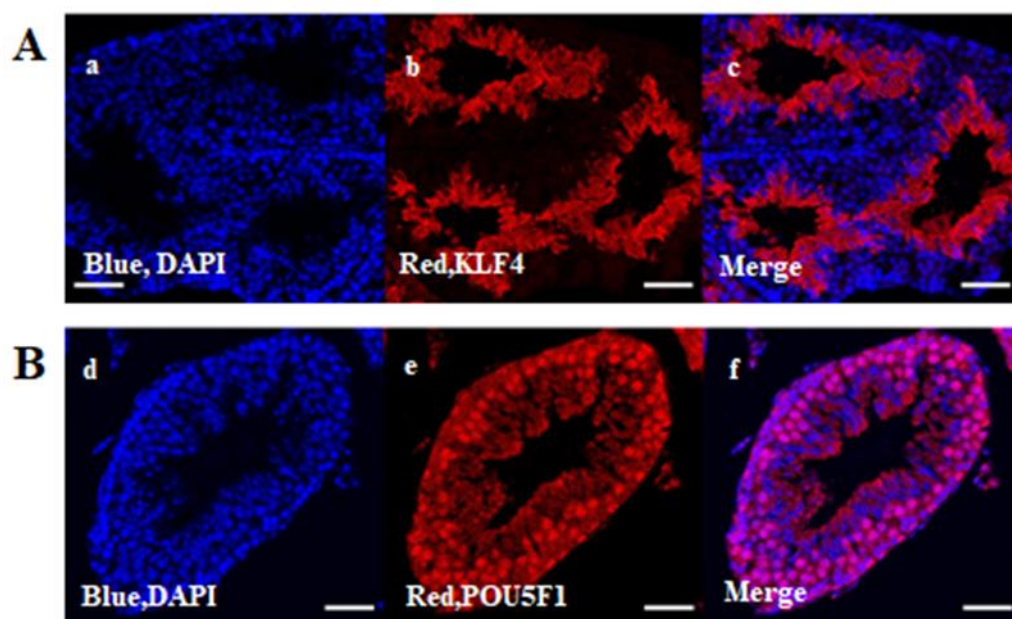
با DAPI و هم پوشانی تصویر حاصل از *POU5F1* و *KLF4* مشخص شد که این نشانگرها بیان بالایی را در سلول های بنیادی شبه جنینی موش دارند. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت نشان می دهد که *KLF4* و *POU5F1* بیان بالایی در سلول های اسپرماتوگونی دارند که در پایه لوله های اسپرم ساز قرار دارند (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴. الگوی بیان *POU5F1* و *KLF4* با تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی در سلول های *ES-like* موش. بیان *POU5F1* و *KLF4* در سلول های *ES-like* آبی برای ۴، ۶-*diamidino-2-phenylindole* (DAPI) نشان دهنده بیان هسته ای پروتئین مدنظر؛ B. قرمز نشان دهنده بیان *KLF4*؛ C. سبز نشان دهنده بیان *POU5F1* و D. تصاویر ادغام شده از بیان پروتئین های مدنظر (مقیاس: ۵۰um)

پس از رنگ آمیزی سلول ها با DAPI و هم پوشانی هر کدام نشان داده شد که این دو در سلول های بیضه بیان بالایی دارند (شکل شماره ۵).

تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی *KLF4* و *POU5F1* در سلول های بیضه: بیان *POU5F1* و *KLF4* در سلول های بیضه به وسیله ایمونوسیتوشیمی بررسی گردید.

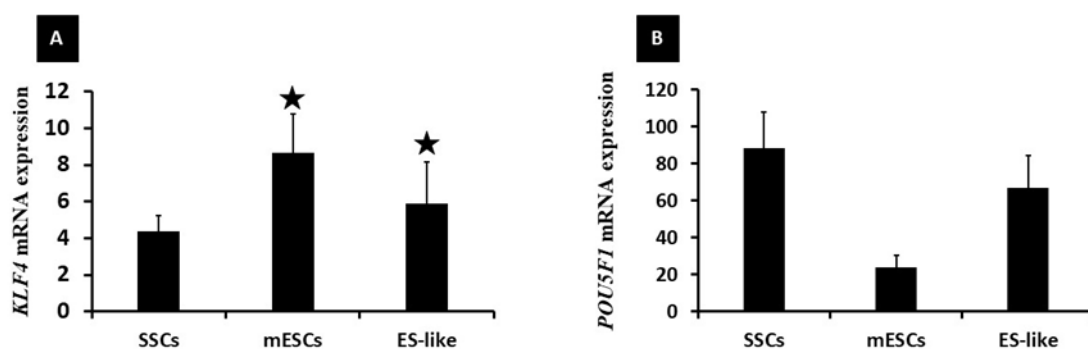


شکل شماره ۵. الگوی بیان *KLF4* و *POU5F1* با تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی در سلول‌های بیضه. A. بیان *KLF4*؛ a. آبی برای DAPI، b. قرمز نشان‌دهنده بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ c. تصویر ادغام‌شده از بیان *KLF4*؛ d. آبی برای DAPI، e. قرمز نشان‌دهنده بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ f. تصویر ادغام‌شده از بیان پروتئین مدنظر.

معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده گردید که نسبت به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بسیار بیشتر بود. در ادامه نیز بیان ژن *POU5F1* بررسی شد که مشخص گردید که این ژن در *SSCs* بیان بیشتری نسبت به سایر سلول‌ها دارد (شکل شماره ۶). بیان ژن‌ها در سلول‌هایی که بیان معنی‌داری ($P < 0.05$) دارند، با ستاره مشخص شده است.

تجزیه و تحلیل RT-PCR Fluidigm برای بیان *KLF4* و *POU5F1*

اندازه‌گیری میزان بیان *KLF4* mRNA و *POU5F1* mRNA در *SSCs*، *ES-like* و *mESCs* که بیان *KLF4* در *mESCs* و *ES-like* بیشتر از سایر سلول‌ها است. میزان بیان *POU5F1* در سلول‌های *SSC* بیان بیشتری نسبت به سایر سلول‌ها دارد. پس از بررسی تست *PCR Fluidigm*، برای ژن *KLF4* در سلول‌های *ES-like* و *mESCs* تفاوت بیان



شکل شماره ۶. بررسی بیان *KLF4* mRNA و *POU5F1* mRNA در سلول‌های *SSCs*، *mESCs* و *ES-like*. A. بیان ژن *KLF4*؛ B. بیان ژن *POU5F1*

بحث و نتیجه گیری

هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن های *KLF4* و *POU5F1* در سلول های بنیادی جنینی موش (*mESCs*)، سلول های بنیادی اسپرم ساز (*SSCs*)، سلول های بنیادی شبه جنینی (*ES-like*) و سلول های بیضه، بررسی و شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن ها در فرایند اسپرماتوژنز است. در این مطالعه و با استفاده از بررسی های انجام شده مشخص گردید که *KLF4* و *POU5F1* عامل هایی هستند که در سلول های اسپرم ساز بیان بالایی دارند و کلاس مشترکی دارند که حاکی از این است که این دو عامل با یکدیگر و دیگر عامل ها ارتباط نزدیکی دارند و عملکردهای هماهنگ و مهمی را در سلول عهده دار هستند و به نحوی در فرایند اسپرماتوژنز تأثیر گذارند. *KLF4* عامل رونویسی است که در بافت های پستانداران وجود دارد و می تواند نقش اساسی و حیاتی در فرایندهایی مانند تمایز، توسعه، تکثیر، هموستاز بافت طبیعی و آپوپتوز داشته باشد و همچنین *KLF4* و *KLF5* دو عضو نزدیک به خانواده *KLF* هستند که نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی، برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک و پرتوانی دارند (۲۱). *POU5F1* یک عامل رونویسی و تنظیم کننده اصلی پرتوانی سلولی با نقش های ضروری در رشد اولیه جنین و تعیین نسل سلولی است (۲۲). در این مطالعه نشان داده شده است که عامل های *KLF4* و *POU5F1* در سلول های بنیادی پرتوان انسانی، سلول های بنیادی جنینی انسانی، سلول های پرتوان، سلول های سوماتیک، سلول بنیادی جنینی و فیرو بلاست بیان دارند (شکل شماره ۱) و با توجه به نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه بایر و همکاران نیز نشان داده شده است که *POU5F1*، *NANOG* و *SOX2* به عنوان عامل های رونویسی اصلی در حفظ پرتوانی عمل می کنند (۲۳). در این میان، هاو کینز و همکاران در مطالعه خود دریافتند که *POU5F1* و *SOX2* برای تولید سلول های بنیادی پرتوان ضروری هستند. علاوه بر این، *C-MYC* و *KLF4* را نیز به عنوان عامل ضروری شناسایی کردند (۲۴). مطالعه براس و همکاران نشان داده است که *KLF4* در سلول های بنیادی جنینی تمایز نیافته به شدت بیان می شود و بیان آن در طول تمایز

به طور چشمگیری کاهش می یابد (۲۵). در این پژوهش، با استفاده از داده پایگاه ENRICHER و KEGG مشخص شد که *KLF4* و *POU5F1* ژن های اصلی در کلاس بندی خود هستند و هماهنگ باهم عملکرد مشترکی دارند که حذف آن ها باعث اختلال در عملکرد سلول می شود و این دو عملکردهای هماهنگی مانند نقش در سرطان، مسیر سیگنالینگ تنظیم پرتوانی سلول های بنیادی، سرطان روده بزرگ، سرطان پانکراس و دیگر نقش ها دارند (شکل های شماره ۲ و ۳). در این مطالعه با استفاده از تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی، ایمونو هیستوشیمی و تجزیه و تحلیل FLUIDIGM RT-PCR مشاهده شد که عامل *KLF4* در سلول های بنیادی اسپرم ساز و شبه جنینی و سلول های بیضه بیان بالایی دارد (شکل های شماره ۳، ۴، ۵ و ۶). عامل *KLF4* به شدت در سلول های زایا پس از میوز بیان می گردد؛ همچنین در بررسی های گادمن و همکاران شواهدی ارائه شد مبنی بر اینکه حذف *KLF4* در سلول های زایای موش نر بر رونوشت پس از میوز از جمله تنظیم کننده های رونویسی تأثیر می گذارد؛ بنابراین، این داده ها به کشف شبکه های رونویسی و سلسله مراحل کنترل کننده رشد اسپرماتید کمک می کند. با این حال، داده های ریز آرایه یک فرایند بیولوژیکی خاص یا مسیرهای انتقال سیگنال را که ممکن است توسط *KLF4* کنترل شود، نشان ندادند. در واقع، آثار *KLF4* بر برنامه رونویسی سلول های زایای بیضه به نظر می رسد که نسبتاً پلیوتروپیک باشد. به طور خلاصه، نبود *KLF4* به تنهایی در سلول های زایای مردانه به طور غیرمنتظره ای از اسپرم زایی و باروری مردان جلوگیری نمی کند (۲۶). با توجه به مطالعات انجام شده، در این پژوهش نشان داده شده است که *KLF4* در سلول های اسپرم ساز بیان دارد (شکل شماره ۶). مطالعه هامیل و هال تأییدی است بر اینکه *KLF4* در سلول های اسپرم ساز بیان می شود. نشان داده شده است که بیان *KLF4* در سلول های پس از میتوز نیز وجود دارد و تنها به آن محدود نمی شود و در سلول های پس از میوز که تحت اسپرم زایی قرار می گیرند نیز بیان می گردد (۲۷).

POU5F1 نقش مهمی در تنظیم خودنوسازی و

مانند *STAT3* و *LIN28A*، *SOX2*، *FGF2*، *NANOG* مستقیم دارند و همچنین *KLF4* و *POU5F1*، هر دو از ژن‌های اصلی هستند و در یک کلاس قرار دارند و با یکدیگر و سایر ژن‌های موجود در کلاس ارتباطات عملکردی بیشتری دارند و هماهنگ باهم مجموعه‌ای از عملکردها را انجام می‌دهند.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان «بررسی آزمایشگاهی بیان *KLF4* در سلول‌های لوله اسپرم‌ساز موش به‌عنوان یک فاکتور تأثیرگذار در تکوین و تمایز سلول‌های بنیادی» است که در سال ۱۴۰۱ با حمایت دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است. بدین‌وسیله از پروفسور توماس اسکوتلا که ما را در انجام تست‌های مولکولی در دانشگاه هایدلبرگ یاری کردند، نهایت تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه بر اساس توافق‌نامه همکاری (MOU) میان دانشگاه هایدلبرگ آلمان و دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد. مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل و کمیته اخلاق در پژوهش با کد IR.ausmt.Rec.1402.007 صورت گرفت.

کد اخلاق

IR.ausmt.Rec.1402.007

مشارکت نویسندگان

مائه یزدانی و حسین عزیزی در ارائه ایده، مائه یزدانی، حسین عزیزی و داریوش غلامی در طراحی مطالعه، مائه یزدانی در جمع‌آوری داده‌ها، حسین عزیزی، داریوش غلامی و امیرخاکی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

پرتوانی ESCها و در برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک ایفا می‌کند (۲۸). عزیزی و همکاران در بررسی بیان mRNA تأیید کردند که بیان شدن ژن‌های اختصاصی در سلول‌های جنسی با افزایش سن رابطه معکوس دارد و با افزایش سن، بیان کاهش می‌یابد و بنابراین، بیان *POU5F1*، *NANOG* و *SOX2* به‌طور چشمگیری در SSCهای نوزادی فراوان و در SSCهای بالغ کمتر است. همان‌طور که در این مطالعه نشان داده شده است که *POU5F1* در سلول‌های اسپرم‌ساز بیان دارد، در مطالعه پس‌چرخه و همکاران بیان شد که این عامل همچنین ممکن است به‌طور خاص در اسپرماتوگونی تمایز نیافته و تخمک‌های بالغ مورد نیاز باشد. از داده‌های ارائه شده نمی‌توان نتیجه‌گیری کرد که آیا سرکوب *POU5F1* در طول گامتوژنز ممکن است به علت اصلاح کروماتین باشد یا بیان سرکوبگرهایی که ژن *POU5F1* را به شیوه‌ای خاص تنظیم می‌کنند. جالب توجه است که GCNF یک گیرنده اختصاصی سلول زایا (۲۹)، الگویی از بیان را نشان می‌دهد که می‌تواند در تنظیم فعالیت پروموتور OCT4 نقش داشته باشد (۳۰). با توجه به شکل شماره ۶ و تجزیه و تحلیل و بررسی‌های انجام شده، نتایج نشان داد که بیان *POU5F1* در سلول‌های SSC بیشتر است. در مطالعه دان و همکاران نشان داده شده است که *POU5F1* برای حفظ پرتوانی در طول رشد اولیه جنینی و در سلول‌های ES و برای زنده ماندن سلول‌های زایای اولیه حیاتی است و همچنین *POU5F1* برای عملکرد سلول‌های SSC و برای خودنوسازی SSCها با ارتقای تکثیر و بقای آن‌ها مورد نیاز است (۳۱).

با توجه به بررسی‌ها و مطالعات انجام شده و نتایج آزمایش‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های بیضه وجود دارند و بیان بالایی را در سلول‌های اسپرماتوگونی دارند که در پایه لوله‌های اسپرم‌ساز موش قرار گرفته‌اند و عامل‌های ضروری برای انجام صحیح فرایند اسپرماتوژنز، تولید اسپرم و حفظ پرتوانی و خودترمیمی سلول‌های بنیادی هستند.

KLF4 و *POU5F1* به همراه ژن‌های دیگر در فرایند اسپرماتوژنز نقش دارند. *KLF4* و *POU5F1* با ژن‌های دیگر

References

- Huang P, Wang T. Spermatogonial stem cell and TGF- β {eta} involved regulation of proliferation and differentiation. arXiv 2017. doi:10.48550/arXiv.1706.03892.
- Lu X, Yin P, Li H, Gao W, Jia H, Ma W. Transcriptome Analysis of Key Genes Involved in the Initiation of Spermatogonial Stem Cell Differentiation. Genes 2024;15:141. doi: 10.3390/genes15020141.
- Yang L, Liao J, Huang H, Lee TL, Qi H. Stage-specific regulation of undifferentiated spermatogonia by AKT1S1-mediated AKT-mTORC1 signaling during mouse spermatogenesis. Dev Biol 2024 ;509:11-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2024.02.002.
- Asadi MH, Javanmardi S, Movahedin M. Derivation of ES-like cell from neonatal mouse testis cells in autologous sertoli cells co-culture system. Iran J Reprod Med 2014;12:37-46.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. Nature 2001;414:98-104. doi: 10.1038/35102160.
- Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. Int J Androl 2011;34:e296-e305. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01199.x.
- Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. Physiol Rev 2016;96:1-17. doi: 10.1152/physrev.00013.2015.
- Robles V, Herraez P, Labbé C, Cabrita E, Pšenička M, Valcarce DG, et al. Molecular basis of spermatogenesis and sperm quality. Gen Comp Endocrinol 2017;245:5-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.04.026.
- Haroush N, Levo M, Wieschaus E, Gregor T. Functional analysis of a gene locus in response to non-canonical combinations of transcription factors. arXiv 2023. doi: 10.48550/arXiv.2308.05685.
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. Int J Biochem Cell Biol 2000;32:1103-21. doi:10.1016/S1357-2725(00)00059-5.
- Zaehres H, Schöler HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. Cell 2007;131:834-5. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.020.
- Behr R, Kaestner KH. Developmental and cell type-specific expression of the zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 4 (*Klf4*) in postnatal mouse testis. Mech Dev 2002;115:167-9. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00127-2.
- Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (*KLF4*): What we currently know. Gene 2017;611:27-37. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
- Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. Stem Cells 2010;28:885-93. doi:10.1002/stem.419.
- Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, et al. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. Mol Cell Biol 2007;27:6770-81. doi:10.1128/MCB.00479-07.
- Jin X, Li Y, Guo Y, Jia Y, Qu H, Lu Y, et al. ER α is required for suppressing OCT4-induced proliferation of breast cancer cells via DNMT1/ISL1/ERK axis. Cell Prolif 2019;52:e12612. doi: 10.1111/cpr.12612.
- 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. J Recept Signal Transduct Res 2022;42:512-20. doi:10.1080/10799893.2022.2047199.
- Azizi H, Karoii DH, Skutella T. Oct4 Protein and Gene Expression Analysis in the Differentiation of Spermatogonia Stem Cells Into Functional Mature Neurons by Immunohistochemistry, Immunocytochemistry, and Bioinformatics Analysis. Stem Cell Rev Rep 2023;19:1828-44. doi: 10.1007/s12015-023-10548-8.
- Azizi H, Ranjbar M, Rahaiee S, Govahi M, Skutella T. Investigation of VASA gene and protein expression in neonate and adult testicular germ cells in mice in vivo and in vitro. Cell J (Yakhteh) 2020;22:171. doi: 10.22074/cellj.2020.6619.
- 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;14:228-33. doi: 10.22074/ijfs.2020.6051.
- Aksoy I, Giudice V, Delahaye E, Wianny F, Aubry M, Mure M, et al. *Klf4* and *Klf5* differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. Nat Commun 2014;5:3719. doi: 10.1038/ncomms4719.
- Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, Ross PJ. Embryonic *POU5F1* is required for expanded bovine blastocyst formation. Sci Rep 2018;8:7753. doi: 10.1038/s41598-018-25964-x.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005;122:947-56. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Hawkins K, Joy S, McKay T. Cell signalling pathways underlying induced pluripotent

- stem cell reprogramming. *World J Stem Cells* 2014;6:620. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.620.
25. Bruce SJ, Gardiner BB, Burke LJ, Gongora MM, Grimmond SM, Perkins AC. Dynamic transcription programs during ES cell differentiation towards mesoderm in serum versus serum-free BMP4 culture. *BMC Genomics* 2007;8:1-26. doi: 10.1186/1471-2164-8-365.
26. Godmann M, Gashaw I, Katz JP, Nagy A, Kaestner KH, Behr R. Krüppel-like factor 4, a “pluripotency transcription factor” highly expressed in male postmeiotic germ cells, is dispensable for spermatogenesis in the mouse. *Mech Dev* 2009;126:650-64. doi: 10.1016/j.mod.2009.06.1081.
27. Hamil KG, Hall SH. Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: regulation of TSC-22 gene expression. *Endocrinology* 1994;134:1205-12. doi: 10.1210/endo.134.3.8161377.
28. Bruno S, Schlaeger TM, Del Vecchio D. Epigenetic OCT4 regulatory network: stochastic analysis of cellular reprogramming. *NPJ Syst Biol Appl* 2024;10:3. doi: 10.1038/s41540-023-00326-0.
29. Chen F, Cooney AJ, Wang Y, Law SW, O'Malley BW. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol* 1994;8:1434-44. doi: 10.1210/mend.8.10.7854358.
30. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler HR. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998;71:89-98. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00002-1.
31. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells* 2008;26:2928-37. doi: 10.1634/stemcells.2008-0134.