

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

Maedeh Yazdani Dizicheh <sup>1</sup> , Hossein Azizi <sup>2\*</sup> , Dariush Gholami <sup>3</sup> , Amir Khaki <sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran

<sup>2</sup> Dept of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

<sup>3</sup> Dept of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

<sup>4</sup> Dept 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 (*mESC*s), 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 *mESC*s, *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 *mESC*s 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 *mESC*s, *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.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

## بررسی و مقایسه شبکه ارتباطی و نحوه بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* طی فرایند اسپرماتوزنز

مآنده یزدانی دیزیجه<sup>۱</sup>، حسین عزیزی<sup>۲\*</sup>، داریوش غلامی<sup>۳</sup>، امیرخاکی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران  
<sup>۲</sup> گروه نانو زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران  
<sup>۳</sup> گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران  
<sup>۴</sup> گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**مقدمه:** اسپرماتوزنز فرایند اصلی تولید اسپرم است که در لوله‌های اسپرم‌ساز انجام می‌شود. سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (SSCs) توانایی خودنوسازی، تمایز و انتقال اطلاعات ژنتیکی را به نسل‌های بعدی دارند. *KLF4* و *POU5F1* جزو عوامل‌های رونویسی هستند که در طیف وسیعی از بافت‌ها بیان می‌شوند و نقش مهمی در فرایندهایی مانند آپوپتوز، تمایز و تکثیر و توسعه سلولی ایفا می‌کنند. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های بنیادی جنینی موش (*mESCs*)، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (*SSCs*)، سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی (*ES-like*) و سلول‌های بیضه و همچنین شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن‌ها در فرایند اسپرماتوزنز است.

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های اسپرم‌ساز از بیضه موش با استفاده از روش هضم آنزیمی استخراج گردید و در محیط کشت GSC موش حاوی EGF، GDNF و EGF کشت داده شدند؛ سپس بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* با روش‌های ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس در سلول‌های *mESCs*، *SSCs*، *ES-like* و سلول‌های بیضه بررسی گردید و تعاملات پروتئین-پروتئین و مسیر سیگنالینگ با روش‌های بیوانفورماتیکی ارزیابی شد.

### نویسنده مسئول:

حسین عزیزی  
 گروه نانو زیست فناوری،  
 دانشکده زیست فناوری،  
 دانشگاه تخصصی فناوری‌های  
 نوین آمل، آمل، ایران

Email:  
 h.azizi@ausmt.ac.ir

**یافته‌های پژوهش:** ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های *ES-like* و بیضه بیان مثبت داشتند. اندازه‌گیری میزان بیان *mRNA KLF4* و *mRNA POU5F1* نشان داد که بیان *KLF4* در سلول‌های *mESCs* و *ES-like* نسبت به سایر سلول‌ها بیشتر و میزان بیان *POU5F1* در سلول‌های *SSCs* بیشتر است و *KLF4* و *POU5F1* هر دو از ژن‌های اصلی و قدرتمندند که یک کلاس مشترک و عملکرد مشترک دارند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد که *KLF4* و *POU5F1* از عوامل‌های ضروری برای انجام صحیح فرایند اسپرماتوزنز هستند و در سلول‌های *mESCs*، *SSCs*، *ES-like* و سلول‌های بیضه بیان دارند. این فاکتورها از عوامل‌های اصلی سلول‌های بنیادی جنسی و عوامل پرتوانی سلول‌های بنیادی به‌شمار می‌روند و قابلیت استفاده به‌عنوان عامل‌های تشخیصی برای این رده‌های سلولی را دارند.

**واژه‌های کلیدی:** اسپرماتوزنز، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، مسیرهای سیگنالینگ، *KLF4*، *POU5F1*

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



فرایند تولید شدن اسپرم در پستانداران به عنوان اسپرم‌زایی تعریف می‌شود که در لوله‌های اسپرم‌ساز در بیضه رخ می‌دهد. این فرایند ۷-۵ 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 *POU5F1*، *Sox2* 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 زده شده 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. باین‌حال، بیان *OCT4* محدودتر است و *OCT4*

KEGG (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>)  
Gephi (<https://www.genome.jp/kegg>) و از نرم‌افزار  
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 کیسول بیضه جدا گردیدند؛ سپس محلول حاصل برای به‌دست آوردن سوسپانسیون تک‌سلولی به آرامی پیپتاژ شد. پس از سانتریفیوژ و حذف محلول بالای، 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 میلی‌گرم/میلی‌لیتر *D-گلوکز* (*Sigma Aldrich, USA*), ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (*Sigma Aldrich, USA*), ۱ درصد *L-گلوتامین* (*PAA, USA*), ۰/۱ درصد  $\beta$ -*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/میلی‌لیتر استرادیول (*Sigma Aldrich, USA*), ۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر پروژسترون (*Sigma Aldrich, USA*), ۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر *EGF* (*Sigma Aldrich, USA*), ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر *FGF* (*Sigma Aldrich, USA*), ۸ نانوگرم/میلی‌لیتر *GDNF* (*Sigma Aldrich, USA*), ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر *LIF* (*Sigma Aldrich, USA*), ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (*Millipore, USA*), ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید (*Sigma Aldrich, USA*), ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر *DL-لاکتیک اسید* (*Sigma Aldrich, USA*) و استرادیول ۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر، پروژسترون ۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر و *ES-1 FBS* (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 نرم‌افزار *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 نرم‌افزار *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. 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 *EDTA* 1 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 تلافی 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 *PFA 4* 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 آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند؛ سپس این روند برای آنتی‌بادی‌های ثانویه نشان‌دار فلورسوم نیز تکرار گردید. برای رنگ آمیزی از *DAPI* استفاده شد؛ سپس از میکروسکوپ فلورسانس (*Olympus, BX51, Japan*) و میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری (کانفوکال) (*Zeiss LSM 700*) برای بررسی سلول‌های نشان‌دار 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 پروتوان استفاده شد. ژن خانه‌دار *GAPDH* که برای کنترل استفاده گردید، در انواع مختلف سلول‌های کشت شده مانند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نوع I، نوع *ES-like* و *mESCs* بیان نشان داد. در هر نمونه، حدود ۱۰۰ سلول به صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف با میکروبیپت 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 به‌طور

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

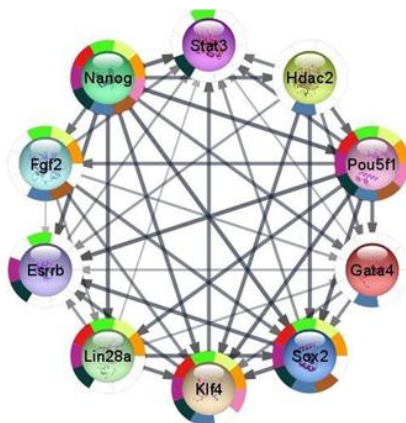
#### بررسی برهم‌کنش‌های *POU5F1* و *KLF4*:

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 اسپرماتوزونز و ارتباط با یکدیگر، رسم شبکه پروتئین-پروتئین آن‌ها صورت گرفت. نتایج بررسی‌ها بر این مشاهدات نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های *POU5F1* و *KLF4* با سایر پروتئین‌ها مانند *STAT3*، *FGF2* و *NANOG* و نحوه تأثیرگذاری آن‌ها بر یکدیگر در فرایند اسپرماتوزونز هستند (A) و در جدول نیز محل بیان هر یک از پروتئین‌ها با رنگ مجزا مشخص شده است (B) (شکل شماره ۱).

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؛



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

A

B

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

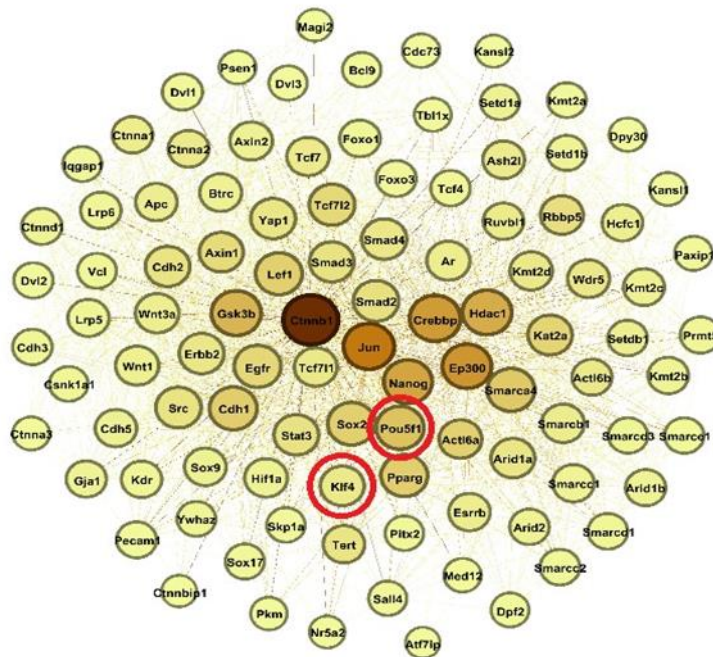
ارتباط یک ژن با ژن‌های دیگر گفته می‌شود و مرکزیت واسطه‌گری برای تشخیص میزان تأثیر انتقال یک ژن بر جریان انتقال اطلاعات در یک شبکه می‌گویند. *POU5F1* و *KLF4* از ژن‌های اصلی هستند و ارتباطاتشان با دیگر ژن‌های اصلی مشخص شده است (شکل شماره ۲). این نرم‌افزار امکان تشخیص قدرت ژن‌ها در شبکه و شناسایی ژن‌های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

#### تحلیل ارتباطات عملکردی *POU5F1*، *KLF4* و بررسی مسیرهای سیگنالینگ:

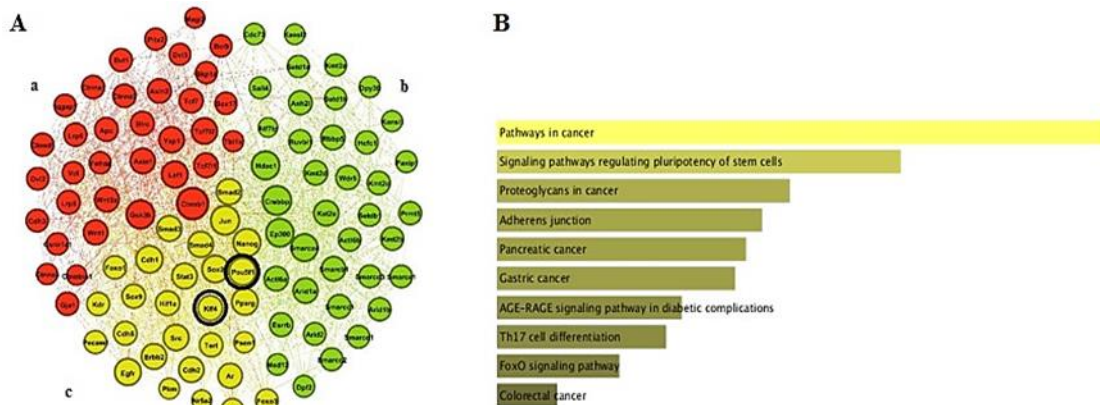
به‌منظور رسم شبکه ژنی مرتبط با *KLF4* و *POU5F1* بر اساس مؤلفه‌های درجه و مرکزیت واسطه‌گری از نرم‌افزار Gephi استفاده شد. در این شبکه، درجه با اندازه دایره‌ها و مرکزیت واسطه‌گری با رنگ مشخص می‌گردد. هرچه درجه بیشتر باشد، دایره‌ها بزرگ‌تر و هرچه مرکزیت واسطه‌گری بیشتر باشد، پررنگ‌تر هستند. درجه به میزان

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

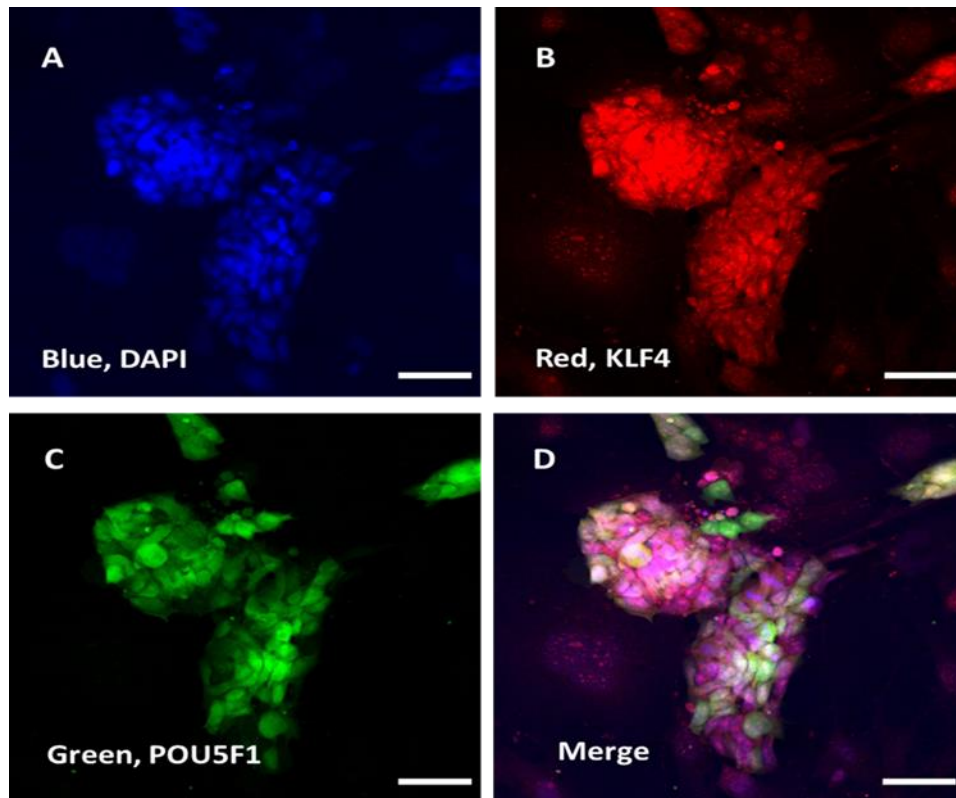


شکل شماره ۳. تحلیل و ارزیابی کلاس‌بندی

### تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی *POU5F1* و *KLF4* در سلول‌های *ES-like*:

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

با *DAPI* و هم‌پوشانی تصویر حاصل از *KLF4* و *POU5F1* مشخص شد که این نشانگرها بیان بالایی را در سلول‌های بنیادی شبه جنینی موش دارند. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلئوروسنت نشان می‌دهد که *KLF4* و *POU5F1* بیان بالایی در سلول‌های اسپرماتوگونی دارند که در پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار دارند (شکل شماره ۴).

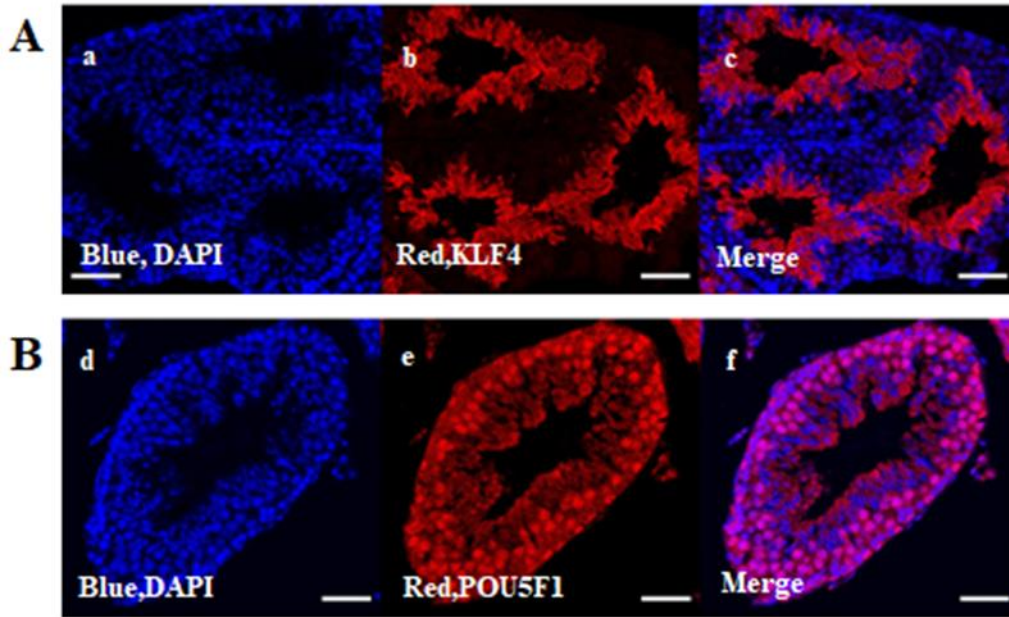


**شکل شماره ۴.** الگوی بیان *POU5F1* و *KLF4* با تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های *ES-like* موش. بیان *POU5F1* و *KLF4* در سلول‌های *ES-like* آبی برای ۴، ۶-*diamidino-2-phenylindole* (*DAPI*) نشان دهنده بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ **B.** قرمز نشان دهنده بیان *KLF4*؛ **C.** سبز نشان دهنده بیان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

پس از رنگ آمیزی سلول‌ها با *DAPI* و هم‌پوشانی هر کدام نشان داده شد که این دو در سلول‌های بیضه بیان بالایی دارند (شکل شماره ۵).

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



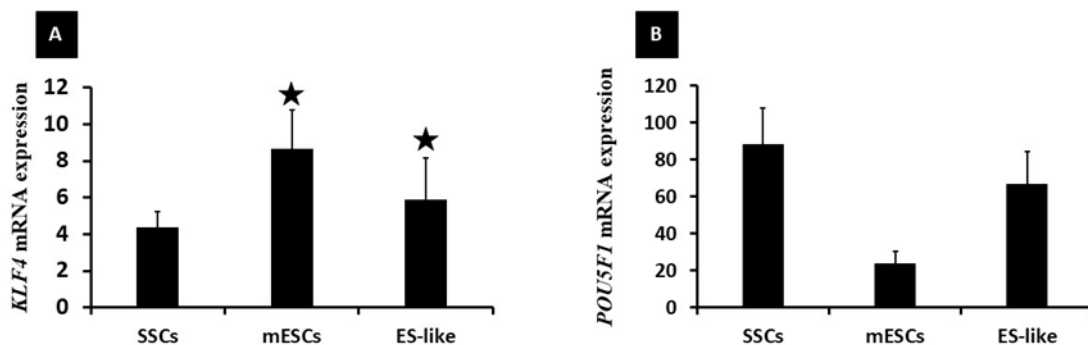


شکل شماره ۵. الگوی بیان *KLF4* و *POU5F1* با تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی در سلول‌های بیضه. A. بیان *KLF4*؛ a. آبی برای ۴، ۶-*diamidino-2-phenylindole* (DAPI) نشان‌دهنده بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ b. قرمز نشان‌دهنده بیان *KLF4*؛ c. تصویر ادغام‌شده از بیان پروتئین مدنظر؛ B. بیان *POU5F1*؛ d. آبی برای ۴، ۶-*diamidino-2-phenylindole* (DAPI) نشان‌دهنده بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ e. قرمز نشان‌دهنده بیان *POU5F1*؛ 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 *Fluidigm RT-PCR* برای بیان *KLF4* و *POU5F1*

اندازه‌گیری میزان بیان *mRNA* *KLF4* و *POU5F1* در *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 *Fluidigm PCR*، برای ژن *KLF4* در سلول‌های *ES-like* و *mESCs* تفاوت بیان



شکل شماره ۶. بررسی بیان *mRNA* *POU5F1* و *mRNA* *KLF4* در سلول‌های *SSCs*، *mESCs* و *ES-like*. 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 اسپرماتوزن 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 اسپرماتوزن 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 پلئوتروپیک 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*، *LIN28A*، *SOX2*، *FGF2*، *NANOG* ارتباط 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 منافی 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

مائده یزدانی و حسین عزیزی در ارائه ایده، مائده یزدانی، حسین عزیزی و داریوش غلامی در طراحی مطالعه، مائده 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 *ESC*ها 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 *SSC*های نوزادی فراوان و در *SSC*های 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 *SSC*ها 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- $\beta$  {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 $\alpha$  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.