Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Maedeh Yazdani Dizicheh [1], Hossein Azizi [2*], Dariush Gholami [3], Amir Khaki [4]

[1] Dept of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran
[2] Dept of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
[3] Dept of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
[4] 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

A B S T R A C T

Introduction: Spermatogenesis is the primary process of sperm production occuring 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی و مقایسهٔ شبکهٔ ارتباطی و نحوهٔ بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* طی فرایند اسپرماتوژنز

مائده یزدانی دیزیچه [۱]، حسین عزیزی [۲*]، داریوش غلامی [۳]، امیرخاکی [۴]

[۱] گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

[۲] گروه نانو زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

[۳] گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

[۴] گروه دامپزشکی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

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

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

Email:
h.azizi@ausmt.ac.ir

چکیده

مقدمه: اسپرماتوژنز فرایند اصلی تولید اسپرم است که در لوله‌های اسپرم‌ساز انجام می‌شود. سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (*SSC*ها) توانایی خودنوسازی، تمایز و انتقال اطلاعات ژنتیکی را به نسل‌های بعدی دارند. *KLF4* و *POU5F1* جزو عامل‌های رونویسی هستند که در طیف وسیعی از بافت‌ها بیان می‌شوند و نقش مهمی در فرایندهایی مانند آپوپتوز، تمایز و تکثیر و توسعهٔ سلولی ایفا می‌کنند. هدف از مطالعهٔ 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 اسپرماتوژنز است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی، سلول‌های اسپرم‌ساز از بیضهٔ موش با استفاده از روش هضم آنزیمی استخراج گردید و در محیط کشت GSC موش حاوی FGF، EGF و GDNF کشت داده شدند؛ سپس بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* با روش‌های ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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.

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 عامل‌های ضروری برای انجام صحیح فرایند اسپرماتوژنز هستند و در سلول‌های *mESCs*، *SSCs*، *ES-like* و سلول‌های بیضه بیان دارند. این فاکتورها از عامل‌های 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: اسپرماتوژنز، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، مسیرهای سیگنالینگ، *KLF4*، *POU5F1*

استناد: یزدانی دیزیچه مائده، عزیزی حسین، غلامی داریوش، خاکی امیر. بررسی و مقایسهٔ شبکهٔ ارتباطی و نحوهٔ بیان ژن‌های *KLF4* و *POU5F1* طی فرایند اسپرماتوژنز. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، مهر ۱۴۰۳؛ (۴)۳۲: ۶۵-۵۳.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

CC BY NC

مقدمه

فرایند تولید شدن اسپرم در پستانداران به‌عنوان 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 اسپرم‌زایی‌اند 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) قابل‌مقایسه‌اند. علاوه بر این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی شبه‌جنینی (*ES-like*) نیز یافت شده‌اند که منبع سلول‌های پرتوان برای درمان بر پایهٔ سلول‌های بنیادی هستند (۴)؛ بنابراین، تعادل میان خودنوسازی SSC و تمایز در بیضهٔ بالغ برای حفظ اسپرم‌زایی و باروری در زندگی ضروری است (۵). در پستانداران، اسپرماتوژنز در طول حیات توسط زیرجمعیتی از اسپرماتوگونی‌های نوع A (تمایزنیافته) حفظ می‌شود. اسپرماتوگونی‌های A با هستهٔ تیره (Adark) سلول‌های بنیادی ذخیره‌شونده هستند، درحالی‌که اسپرماتوگونی‌های A با هستهٔ بی‌رنگ (Apale) سلول‌های بنیادی خود تجدیدشونده‌اند (۶). چندین زیرگروه در اسپرماتوگونی A در جوندگان بالغ وجود دارد (۷).

SSCs (AS) یک زیرجمعیت از اسپرماتوگونی نوع A هستند. اسپرماتوگونی‌های تک‌سلولی جداشده‌ای هستند که توانایی تجدید خود یا تقسیم و تمایز به اسپرماتوگونی‌های (Apr) را دارند. اسپر (Apr) ماتوگونی‌های جفت‌شدهٔ دوتایی هستند. آن‌ها به‌طور همزمان به زنجیره‌های اسپرماتوگونی (Aal) تقسیم می‌شوند. ازآنجاکه از نظر مورفولوژیکی ویژگی‌های کمی از تمایز هسته‌ای یا سیتوپلاسمی را نشان می‌دهند، سلول‌های A، Apr و Aal درمجموع اسپرماتوگونی تمایزنیافته نامیده می‌شوند (۷)؛ بنابراین، اسپرماتوگونی‌های AP به‌صورت میتوز تقسیم می‌گردند و اسپرماتوگونی‌های ۴، ۸، ۱۶ و گاهی اوقات Aal ۳۲ 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؛ درنتیجه، تقسیم میوز دوم درنهایت، به اسپرماتید هاپلوئید منجر می‌گردد. در فرایند اسپرماتوژنز، عامل‌های بسیاری نقش دارند؛ ازجمله *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 q319 قرار دارد، درحالی‌که *KLF4* موش روی کروموزوم B34 است. عامل *KLF4* به خانوادهٔ 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 تمایزیافتهٔ 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 اسیدآمینهٔ *KLF4* انسان دارد. عامل *KLF4* نقش مهمی در تولید اسپرم دارد. در بیضهٔ 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 بیضهٔ انسان، *KLF4* در اسپرماتیدهای تمایزدهنده و در بیشتر سلول‌های لیدیگ نیز بیان می‌گردد (۱۳). در موش‌ها، عامل *KLF4* همراه با عامل‌های رونویسی دیگر پروتئین غشاییCXADR همانند پروتئین غشایی (CLMP) را در سلول‌های سرتولی فعال می‌کند و بنابراین، انتقال سلول‌های جنسی را در سراسر بیضه می‌تواند تنظیم نماید (۱۳). OCT4 که توسط *POU5F1* کدگذاری می‌شود، یک عامل رونویسی از خانوادهٔ POU است (۱۴). خانوادهٔ 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 تمایزنیافته بیان می‌شود. بااین‌حال، بیان OCT4 محدودتر است و OCT4

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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

ایجاد شبکهٔ PPI، تجزیه‌وتحلیل مجموعه‌ژن‌ها و نقش آن‌ها:

ژن‌های دخیل در فرایند اسپرماتوژنز در NCBI توسط COREMINE شناسایی شدند و در پایگاه‌های دادهٔ آنلاین STRING vol.11.5 برای ساخت شبکهٔ *PPI* استفاده گردیدند. از نرم‌افزار Cytoscape vol.3.9.1 (http://www.cytoscape.org) برای ایجاد، تجزیه‌وتحلیل شبکهٔ *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 شبکهٔ PPI و گره‌های همسایه و نقش تنظیم‌کنندگی آن‌ها بر یکدیگر نشان داده شد و تجزیه‌وتحلیل ارتباط ژن‌های عملکردی با استفاده از تجزیه‌وتحلیل 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 (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr)، KEGG (https://www.genome.jp/kegg) و از نرم‌افزار Gephi استفاده شد.

هضم آنزیمی بافت بیضه و کشت سلول‌های آن:

سلول‌های بیضهٔ 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 به‌آرامی پیپتاژ 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 بیضهٔ 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, USA*) *N2*، 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 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/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* (*Millipore, USA*)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (*Sigma Aldrich, USA*)، ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرویک اسید (Sigma *Aldrich, USA*)، ۱ میکرولیتر/میلی‌لیتر DL-لاکتیک اسید (*Sigma Aldrich, USA*) و استرادیول ۳۰ نانوگرم/میلی‌لیتر، پروژسترون ۶۰ نانوگرم/میلی‌لیتر و *ES*-1 *FBS* درصد (در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و 5 *CO2* درصد) کشت داده شدند (۱۸).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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).

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی (*ICC*):

برای رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی، از پلیت‌های ۲۴ خانه استفاده گردید و سلول‌ها در آن کشت داده شدند. برای فیکس کردن سلول‌های کشت داده‌شده *از* 4 *PFA* درصد استفاده می‌گردد؛ سپس این سلول‌ها با *FBS* و *Tween20* شست‌وشو داده شدند. برای نفوذپذیر کردن یا *PCE* سلول‌ها از *Triton* حل‌شده در *PBS*، استفاده گردید و سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند؛ سپس این روند برای آنتی‌بادی‌های ثانویهٔ نشان‌دار فلوکروم نیز تکرار گردید. برای رنگ‌آمیزی *از DAPI* استفاده شد؛ سپس از میکروسکوپ فلورسنس (*Olympus, BX51, Japan*) و میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال) (*Zeiss LSM 700*) برای بررسی سلول‌های نشان‌دارشده استفاده گردید (۱۹).

تجزیه‌وتحلیل بیان ژن در سیستم *Fluidigm Biomark*:

از چیپ‌های مخصوص *Fluidigm* برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های سلول‌های زایا و پرتوان استفاده شد. ژن خانه‌دار *GAPDH* که برای کنترل استفاده گردید، در انواع مختلف سلول‌های کشت‌شده مانند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نوع I، نوع *II*، *ES*-like و *mESCs* بیان نشان داد. در هر نمونه، حدود ۱۰۰ سلول به‌صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف با میکروپیپت یا میکرومانیپلاتور برداشته شد و بلافاصله منجمد و در دمای ۸۰– درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید. در ادامه، طی فرایندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، *mRNA* به *cDNA* رونویسی معکوس شد که به‌طور اختصاصی توالی در یک لولهٔ 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 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام گردید که با حرارت دادن به ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه غیرفعال شد. *cDNA* در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه دناتوره گردید. پس از آن، محصولات در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در ۱۴ سیکل تقویت شدند. محصولات تقویت‌شده تا ۵ برابر رقیق گردیدند و سپس با *Universal PCR Master Mix* و *TaqMan* در یک سیستم *BioMark* تجزیه‌وتحلیل شدند. لازم به ذکر است، هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز گردید. برای تجزیه‌وتحلیل 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 تغذیه‌کنندهٔ *MEF* نرمال گردیدند. تجزیه‌وتحلیل با نرم‌افزار GenEx صورت گرفت و از تجزیه‌وتحلیل 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. بیضهٔ دهیدراته‌شده در *Paraplast Plus* قالب‌گیری 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. همهٔ برش‌ها با گزیلل پارافین‌زدایی گردید و پیش از رنگ‌آمیزی در یک سری کاهشی (درصد) اتانول هیدراته شد. پس از بازیابی شدن آنتی‌ژن با واسطهٔ گرما و بافر نیترات سدیم ۱۰ میلی‌مولار با *pH* 6 یا 1 *EDTA* میلی‌مولار با 8 *pH* در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، آنتی‌ژن‌هایی که متصل نگردیدند، با سرم ۱۰ درصد و 3 *Triton X-100* درصد و در *PBS 90* درصد مسدود و غیرفعال شدند و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس (همان‌طور که در بالا توضیح داده شد) ادامه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

یافت. برای ایمونوهیستوشیمی در برش‌های حاصل، بافت بیضه (همان‌طور که در بالا توضیح داده شد) تثبیت گردید. بافت بیضهٔ 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 تجزیه‌وتحلیل در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. همهٔ برش‌های منجمد در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه خشک شدند و پس از آن، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس انجام گردید که در بالا به‌تفصیل توضیح داده شد (۲۰).

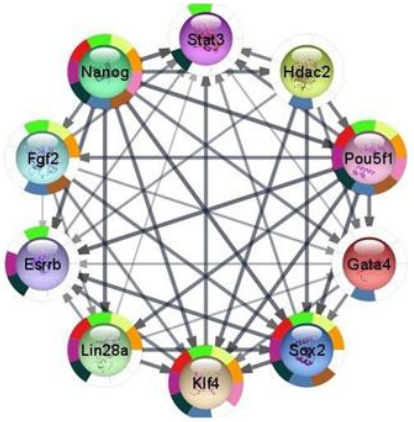
تجزیه‌وتحلیل آماری:

همهٔ 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؛ سپس با استفاده از *آزمون Tukey* ارزیابی شد. اگر مقدار $P<0.05$ به‌دست 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 شبکهٔ پروتئین-پروتئین آن‌ها صورت گرفت. نتایج بررسی‌ها بر این مشاهدات نشان‌دهندهٔ برهم‌کنش‌های *KLF4* و *POU5F1* با سایر پروتئین‌ها مانند *FGF2*،*STAT3* و *NANOG* و نحوهٔ تأثیرگذاری آن‌ها بر یکدیگر در فرایند اسپرماتوژنز هستند (A) و در جدول نیز محل بیان هریک از پروتئین‌ها با رنگ مجزا مشخص‌شده است (B) (شکل شمارهٔ ۱).



مقدار value	توضیحات	نام	رنگ نمودار	دسته
3.32E-15	سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی	BTO:0006081		TISSUES
5.4E-15	سلول‌های بنیادی جنینی انسان	BTO:0006080		TISSUES
3.49E-13	سلول بنیادی پرتوان	BTO:0006078		TISSUES
5.29E-12	سلول سوماتیک	BTO:0001268		TISSUES
3E-10	سلول بنیادی جنینی	BTO:0001086		TISSUES
6.97E-10	نگهداری از جمعیت سلول‌های بنیادی	GO:0019827		GO Biological Process
4.22E-8	فیبروبلاست	BTO:0000452		TISSUES
3.04E-6	سلول بنیادی بالغ	BTO:0002666		TISSUES
2.44E-5	خط سلول های بنیادی جنینی	BTO:0001581		TISSUES

A B

شکل شماره ۱. تجزیه‌وتحلیل عملکرد ژنی STRING با استفاده از Cytoscape

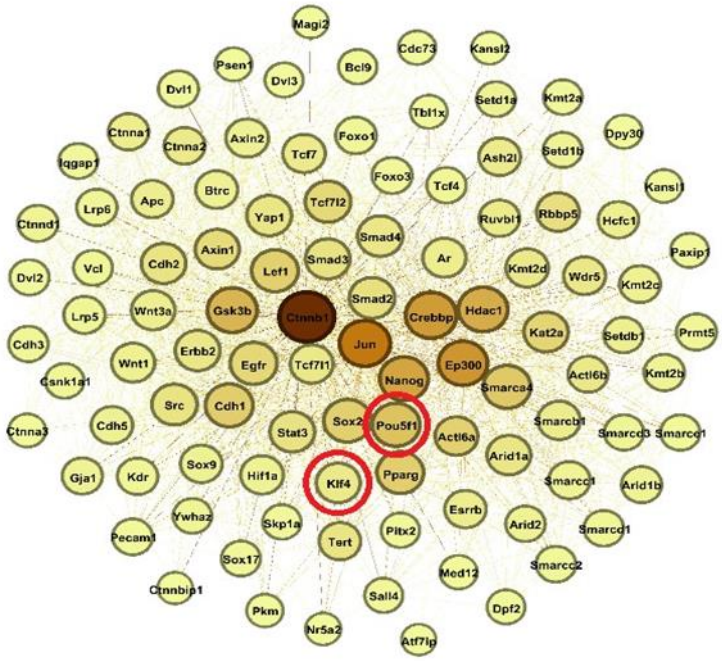
تحلیل ارتباطات عملکردی KLF4، POU5F1 و بررسی مسیرهای سیگنالینگ:

به‌منظور رسم شبکهٔ ژنی مرتبط با *KLF4* و *POU5F1* بر اساس مؤلفه‌های درجه و مرکزیت واسطه‌گری از نرم‌افزار Gephi استفاده شد. در این شبکه، درجه با اندازهٔ 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 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. *KLF4* و *POU5F1* از ژن‌های اصلی هستند و ارتباطاتشان با دیگر ژن‌های اصلی مشخص‌شده است (شکل شمارهٔ 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

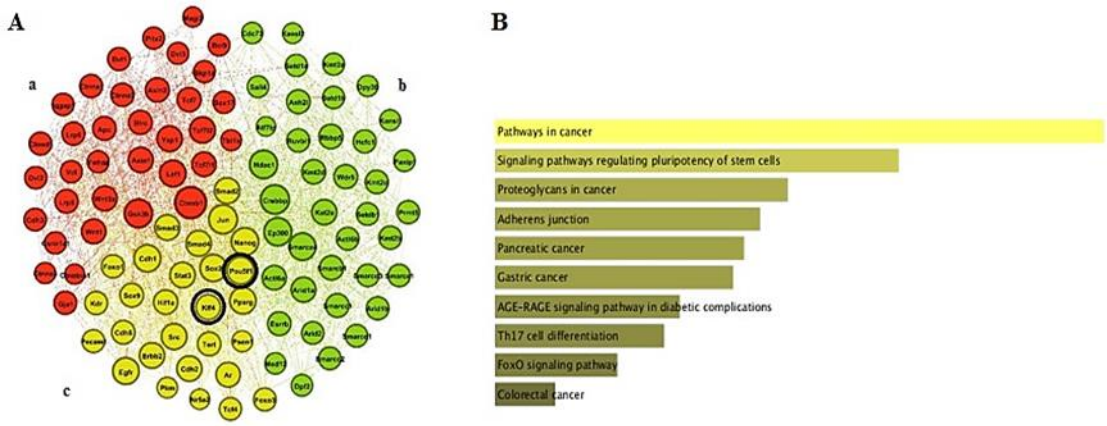
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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

برای تشخیص ژن‌های اصلی که بیشترین ارتباط را با سایر ژن‌ها دارند، مقایسهٔ مؤلفه‌های درجه و مرکزیت واسطه‌گری مشخص می‌شوند و کلاس‌بندی کردن شبکهٔ مدنظر، مجموعه‌ژن‌هایی 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 شمارهٔ ۲ و ۳).



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

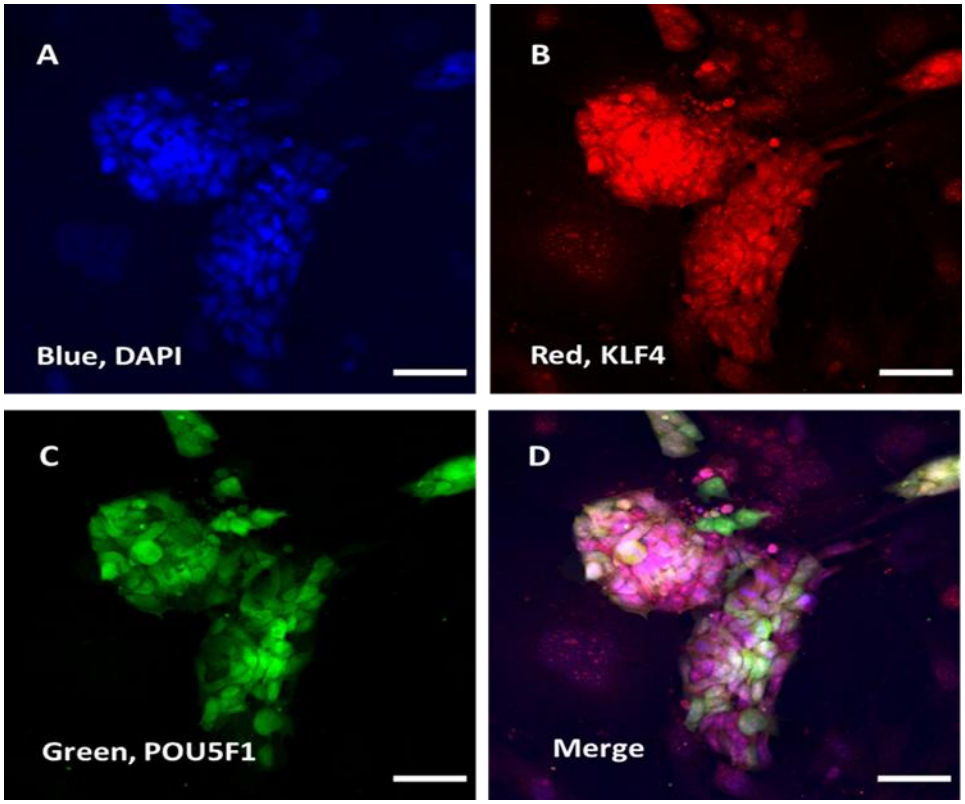


شکل شماره ۳. تحلیل و ارزیابی کلاس‌بندی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

تجزیه‌وتحلیل ایمونوسیتوشیمی KLF4 و POU5F1 در سلول‌های ES-like:

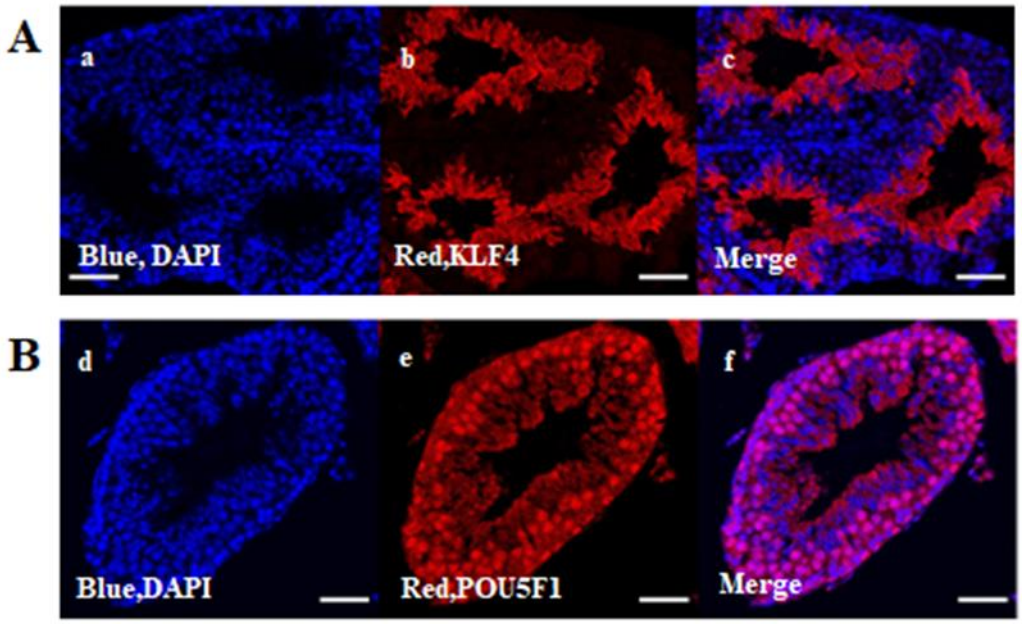
در مرحلهٔ اول، بیان *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های *ES-like* موش به‌وسیلهٔ ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شد. تصویر به‌دست‌آمده برای تأیید وجود SSC با ایمونوسیتوشیمی بررسی گردید. پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با *DAPI* و هم‌پوشانی تصویر حاصل از *KLF4* و *POU5F1* مشخص شد که این نشانگرها بیان بالایی را در سلول‌های بنیادی شبه جنینی موش دارند. تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ فلوئوروسنت نشان می‌دهد که *KLF4* و *POU5F1* بیان بالایی در سلول‌های اسپرماتوگونی دارند که در پایهٔ لوله‌های اسپرم‌ساز قرار دارند (شکل شمارهٔ ۴).



شکل شماره ٤. الگوی بیان *KLF4* و *POU5F1* با تجزیه‌وتحلیل ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های *ES-like* موش. بیان *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های A. *ES-like* آبی برای ۴',۶-*diamidino-2-phenylindole (DAPI)* نشان‌دهندهٔ بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ B. قرمز نشان‌دهندهٔ بیان *KLF4*؛ C. سبز نشان‌دهندهٔ بیان *POU5F1* و D. تصاویر ادغام‌شده از بیان پروتئین‌های مدنظر (مقیاس: um50)

تجزیه‌وتحلیل ایمونوهیستوشیمی *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های بیضه: بیان *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های بیضه به‌وسیلهٔ ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید. پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با *DAPI* و هم‌پوشانی هرکدام نشان داده شد که این دو در سلول‌های بیضه بیان بالایی دارند (شکل شمارهٔ ۵).

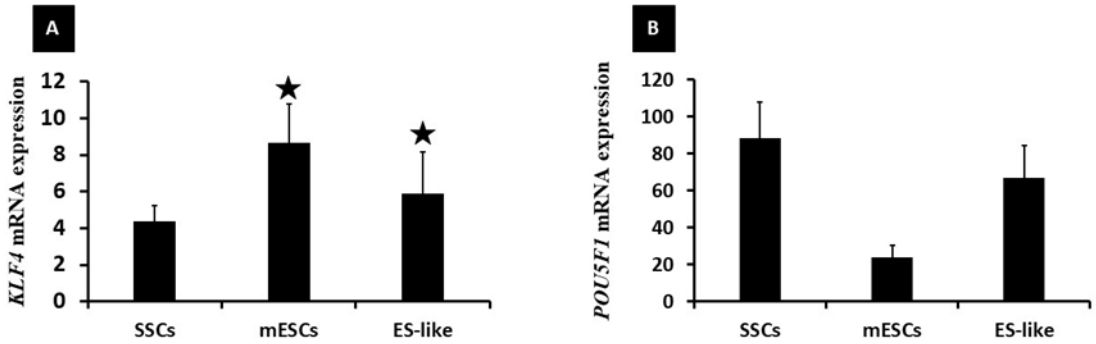
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]



شکل شماره ۵. الگوی بیان *KLF4* و *POU5F1* با تجزیه‌وتحلیل ایمونوهیستوشیمی در سلول‌های بیضه. A. بیان *KLF4*؛ a. آبی برای ۶,'۴-*diamidino-2-phenylindole (DAPI)* نشان‌دهندهٔ بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ b. قرمز نشان‌دهندهٔ بیان *KLF4*؛ c. تصویر ادغام‌شده از بیان پروتئین مدنظر؛ B. بیان *POU5F1*؛ d. آبی برای ۶,'۴-*diamidino-2-phenylindole (DAPI)* نشان‌دهندهٔ بیان هسته‌ای پروتئین مدنظر؛ e. قرمز نشان‌دهندهٔ بیان *POU5F1*؛ f. تصویر ادغام‌شده از بیان پروتئین مدنظر

تجزیه‌وتحلیل Fluidigm RT-PCR برای بیان KLF4 و POU5F1:

اندازه‌گیری میزان بیان mRNA *KLF4* و *POU5F1* 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 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 شمارهٔ ۶). بیان ژن‌ها در سلول‌هایی که بیان معنی‌داری ($P<0.05$) دارند، با ستاره مشخص‌شده است.



شکل شماره ٦. بررسی بیان *mRNA KLF4* و *mRNA POU5F1* در سلول‌های *SSCs*، *mESCs* و *ES-like*. A. بیان ژن *KLF4*؛ B. بیان ژن *POU5F1*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه 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، بررسی و شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن‌ها در فرایند اسپرماتوژنز است. در این مطالعه و با استفاده از بررسی‌های انجام‌شده مشخص گردید که *KLF4* و *POU5F1* عامل‌هایی هستند که در سلول‌های اسپرم‌ساز بیان بالایی دارند و کلاس مشترکی دارند که حاکی از این است که این دو عامل با یکدیگر و دیگر عامل‌ها ارتباط نزدیکی دارند و عملکردهای هماهنگ و مهمی را در سلول عهده‌دار هستند و به‌نحوی در فرایند اسپرماتوژنز تأثیرگذارند. *KLF4* عامل رونویسی است که در بافت‌های پستانداران وجود دارد و می‌تواند نقش اساسی و حیاتی در فرایندهایی مانند تمایز، توسعه، تکثیر، همئوستاز بافت طبیعی و آپوپتوز داشته باشد و همچنین *KLF4* و KLF5 دو عضو نزدیک به خانوادهٔ KLF هستند که نقش مهمی در تنظیم چرخهٔ سلولی، برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک و پرتوانی دارند (۲۱). *POU5F1* یک عامل رونویسی و تنظیم‌کنندهٔ اصلی پرتوانی سلولی با نقش‌های ضروری در رشد اولیهٔ جنین و تعیین نسل سلولی است (۲۲). در این مطالعه نشان داده‌شده است که عامل‌های *KLF4* و *POU5F1* در سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، سلول‌های پرتوان، سلول‌های سوماتیک، سلول بنیادی جنینی و فیبروبلاست بیان دارند (شکل شمارهٔ ۱) و با توجه به نتایج مطالعهٔ حاضر، در مطالعهٔ بایر و همکاران نیز نشان داده‌شده است که *POU5F1*، *NANOG* و *SOX2* به‌عنوان عامل‌های رونویسی اصلی در حفظ پرتوانی عمل می‌کنند (۲۳). در این میان، هاوکینز و همکاران در مطالعهٔ خود دریافتند که *POU5F1* و *SOX2* برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان ضروری هستند. علاوه بر این، *C-MYC* و *KLF4* را نیز به‌عنوان عامل ضروری شناسایی کردند (۲۴). مطالعهٔ براس و همکاران نشان داده است که *KLF4* در سلول‌های بنیادی جنینی تمایزنیافته به‌شدت بیان می‌شود و بیان آن در طول تمایز به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۲۵). در این پژوهش، با استفاده از داده پایگاه ENRICHER و KEGG مشخص شد که *KLF4* و *POU5F1* ژن‌های اصلی در کلاس‌بندی خود هستند و هماهنگ باهم عملکرد مشترکی دارند که حذف آن‌ها باعث اختلال در عملکرد سلول می‌شود و این دو عملکردهای هماهنگی مانند نقش در سرطان، مسیر سیگنالینگ تنظیم پرتوانی سلول‌های بنیادی، سرطان رودهٔ بزرگ، سرطان پانکراس و دیگر نقش‌ها دارند (شکل‌های شمارهٔ ۲ و ۳). در این مطالعه با استفاده از تجزیه‌وتحلیل ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و تجزیه‌وتحلیل RT-PCR *FLUIDIGM* مشاهده شد که عامل *KLF4* در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و شبه‌جنینی و سلول‌های بیضه بیان بالایی دارد (شکل‌های شمارهٔ ۳، ۴، ۵ و ۶). عامل *KLF4* به‌شدت در سلول‌های زایا پس از میوز بیان می‌گردد؛ همچنین در بررسی‌های گادمن و همکاران شواهدی ارائه شد مبنی بر اینکه حذف *KLF4* در سلول‌های زایای موش نر بر رونوشت پس از میوز ازجمله تنظیم‌کننده‌های رونویسی تأثیر می‌گذارد؛ بنابراین، این داده‌ها به کشف شبکه‌های رونویسی و سلسله مراحل کنترل‌کنندهٔ رشد اسپرماتید کمک می‌کند. بااین‌حال، داده‌های ریزآرایه یک فرایند بیولوژیکی خاص یا مسیرهای انتقال سیگنال را که ممکن است توسط *KLF4* کنترل شود، نشان ندادند. درواقع، آثار *KLF4* بر برنامهٔ رونویسی سلول‌های زایای بیضه به‌نظر می‌رسد که نسبتاً پلیوتروپیک باشد. به‌طور خلاصه، نبودِ *KLF4* به‌تنهایی در سلول‌های زایای مردانه به‌طور غیرمنتظره‌ای از اسپرم‌زایی و باروری مردان جلوگیری نمی‌کند (۲۶). با توجه به مطالعات انجام‌شده، در این پژوهش نشان داده‌شده است که *KLF4* در سلول‌های اسپرم‌ساز بیان دارد (شکل شمارهٔ ۶). مطالعهٔ هامیل و هال تأییدی است بر اینکه *KLF4* در سلول‌های اسپرم‌ساز بیان می‌شود. نشان داده‌شده است که بیان *KLF4* در سلول‌های پس از میتوز نیز وجود دارد و تنها به آن محدود نمی‌شود و در سلول‌های پس از میوز که تحت اسپرم‌زایی قرار می‌گیرند نیز بیان می‌گردد (۲۷).

POU5F1 نقش مهمی در تنظیم خودنوسازی و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 رابطهٔ 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 داده‌شده است که *POU5F1* در سلول‌های اسپرم‌ساز بیان دارد، در مطالعهٔ پسچه و همکاران بیان شد که این عامل همچنین ممکن است به‌طور خاص در اسپرماتوگونی تمایزنیافته و تخمک‌های بالغ موردنیاز باشد. از داده‌های ارائه‌شده 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 گیرندهٔ اختصاصی سلول زایا (۲۹)، الگویی از بیان را نشان می‌دهد که می‌تواند در تنظیم فعالیت پروموتر OCT4 نقش داشته باشد (۳۰). با توجه به شکل شمارهٔ ۶ و تجزیه‌وتحلیل و بررسی‌های انجام‌شده، نتایج نشان داد که بیان *POU5F1* در سلول‌های *SSC* بیشتر است. در مطالعهٔ دان و همکاران نشان داده‌شده است که *POU5F1* برای حفظ پرتوانی در طول رشد اولیهٔ 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 موردنیاز است (۳۱).

با توجه به بررسی‌ها و مطالعات انجام‌شده 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 پایهٔ 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 مانند *NANOG*، *FGF2*، *SOX2*، *LIN28A* و *STAT3* 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 پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد با عنوان «بررسی آزمایشگاهی بیان *KLF4* در سلول‌های لولهٔ اسپرم‌ساز موش به‌عنوان یک فاکتور تأثیرگذار در تکوین و تمایز سلول‌های بنیادی» است که در سال ۱۴۰۱ با حمایت دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام‌شده 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 توافق‌نامهٔ 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. مطالعهٔ 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

References

1. Huang P, Wang T. Spermatogonial stem cell and TGF-\b {eta} involved regulation of proliferation and differentiation. arXiv 2017. doi:10.48550/arXiv.1706.03892.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. Nature 2001;414:98-104. doi: 10.1038/35102160.
6. 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.
7. Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. Physiol Rev 2016;96:1-17. doi: 10.1152/physrev.00013.2015.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Zaehres H, Schöler HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. Cell 2007;131:834-5. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.020.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Jin X, Li Y, Guo Y, Jia Y, Qu H, Lu Y, et al. ERα 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Hawkins K, Joy S, McKay T. Cell signalling pathways underlying induced pluripotent

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]