

Comparing the Expression Levels of Alkaline Phosphatase, *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* Genes in Embryonic Stem Cells, Spermatogonial Stem Cells, and Embryonic Stem-Like Cells in Mice

Emad Reza¹,
Hossein Azizi²

¹ BSc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

² Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received May 8, 2022 ; Accepted June 26, 2022)

Abstract

Background and purpose: Spermatogenesis is a well-organized process that is influenced by a variety of factors. Alkaline phosphatase, and *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* genes are among the key players in this interconnected process. This study aimed to investigate the expression levels of *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* genes in embryonic, spermatogonial, and embryonic stem-like (ES-like) cells in mice.

Materials and methods: First, spermatogonial stem cells were isolated, and then mouse embryonic stem cells and ES-like cells were prepared. Alkaline phosphatase expression was determined by alkaline phosphatase staining. After that, a bioinformatics analysis of directly related genes was done. Then the expression levels of the *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* genes were measured using Fluidigm PCR, and immunohistochemistry was done for *Gfra1* expression.

Results: In pluripotent stem cells and germ cells, the expression levels of *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* genes were found to be significantly positive ($P < 0.05$). Alkaline phosphatase was also expressed positively in germ stem cells and pluripotent stem cells, but not in Sertoli cells or fibroblasts, indicating that this enzyme is exclusive to these cell types.

Conclusion: Because of their interaction and expression in pluripotent stem cells and germ cells, alkaline phosphatase, *Gfra1*, *Lin28*, and *Sall4* genes can be employed as detecting markers for these cell lines.

Keywords: embryonic stem cells, spermatogonial stem cells, alkaline phosphatase

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (210): 13-25 (Persian).

Corresponding Author: Hossein Azizi - Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran. (E-mail: h.azizi@ausmt.ac.i)

مقایسه میزان بیان آلکالین فسفاتاز، ژن *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* در سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی اسپرم ساز و سلول‌های شبه بنیادی جنینی در موش

عماد رضا¹

حسین عزیزی²

چکیده

سابقه و هدف: اسپرماتوژنز یک فرآیند سازمان‌یافته است که فاکتورهای فراوانی بر کنترل و تنظیم آن اثرگذار هستند. آلکالین فسفاتاز به همراه ژن‌های *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* از جمله فاکتورهای اصلی دخیل در این فرآیند هستند که با یکدیگر در ارتباط هستند. هدف از انجام این مطالعه بررسی و مقایسه میزان بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز و همچنین ژن‌های *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* در سلول‌های بنیادی جنینی، اسپرم‌ساز، و شبه جنینی در موش می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جداسازی شدند و سپس سلول‌های بنیادی جنینی موش و سلول‌های ES-like تهیه شدند. در مرحله بعدی سنجش بیان آلکالین فسفاتاز با استفاده از رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز بررسی شد. سپس بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های دارای ارتباط مستقیم انجام شد و برای سنجش بیان ژن‌های *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* از Fluidigm PCR و همچنین از ایمونوهیستوشیمی، برای بیان *Gfra1*، استفاده شد.

یافته‌ها: ژن‌های *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* بیان مثبت و معنی‌دار ($P < 0/05$) در سلول‌های بنیادی پرتوان و سلول‌های جنسی داشتند. آلکالین فسفاتاز نیز دارای بیان مثبت در سلول‌های بنیادی جنسی و سلول‌های بنیادی پرتوان بود و در سلول‌های سرتولی و فیروبلاست‌ها بیان کم و منفی داشت، که نشان از اختصاصی بودن این آنزیم در این رده‌های سلولی دارد. **استنتاج:** آلکالین فسفاتاز به همراه ژن‌های *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4*، با توجه به ارتباط شبکه‌ای با یکدیگر و بیان آن‌ها در سلول‌های بنیادی پرتوان و رده زایا، می‌تواند به عنوان فاکتورهای تشخیصی برای این رده‌های سلولی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی اسپرم ساز (SSC)، آلکالین فسفاتاز

مقدمه

مشخص شده است که *AP* در سایر انواع سلول‌های بنیادی پرتوان مانند سلول‌های رده زاینده جنینی (*EG*، embryonic germ cells)، سلول‌های بنیادی جنینی (*ESC*) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (*iPSC*) در سطوح بالایی بیان می‌شود (2،1).

آلکالین فسفاتازها (*AP*) گروهی از آنزیم‌ها هستند که مولکول‌های حاوی فسفات را در شرایط قلیایی هیدرولیز می‌کنند. در بدن انسان، در درجه اول چهار نوع از این آنزیم وجود دارد: انواع روده‌ای، جفتی، شبه جفت و غیر بافتی. ایزوآنزیم غیراختصاصی آلکالین فسفاتاز داخل بافت در کبد، استخوان و کلیه بیان می‌شود. همچنین

E-mail: h.azizi@ausmt.ac.i

مؤلف مسئول: حسین عزیزی - آمل: خیابان طالقانی، اباذر 35

1. کارشناسی زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
2. استادیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: 1401/2/18 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/2/25 تاریخ تصویب: 1401/4/5

نقش منحصر به فرد *AP* ها در فنوتیپ موجودات در مقایسه با *AP* های فاقد عملکرد کاملاً مشخص است. کاهش *EAP* (embryonic AP) با هیچ ناهنجاری قابل تشخیصی همراه نیست. همچنین، کاهش *TNAP* (tissue nonspecific alkaline phosphatase) هیچ تأثیری بر تمایز یا مهاجرت *PGC* (primordial germ cells) ندارد، بنابراین میتوانیم وضعیت مشابهی را برای *GCAP* (germ cell alkaline phosphatase) در *PGC* انسان نیز پیشنهاد کنیم. می توان عملکرد احتمالی انواع *AP* را در ارتباط با پتانسیل تمایز سلولی (مانند پرتوانی) در نظر گرفت. بیان این آنزیم در ابتدا، هم توسط تروفوآکتودرم و هم توده سلولی داخلی (*ICM*) صورت می گیرد (3). بیان *TNAP* در طول فرآیند برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک به سلول های *iPS* به سرعت تنظیم می شود. در پروتکل اصلی، فنوتیپ *iPS* از طریق بیان چهار ژن القا می شود: *Oct4* (*Pou5f1*), *Sox2* و *Klf4* که مسئول حفظ پرتوانی هستند و *c-Myc* که مسئول القاء و افزایش نرخ تکثیر می باشد. مشاهده شده است که بیان *TNAP* مستقیماً پس از ترانسفکشن سلول های سوماتیک توسط این چهار ژن افزایش می یابد. این موضوع با تنظیم مستقیم بیان *TNAP* توسط *Oct4* و *Sox2* مطابقت دارد (4-6). علاوه بر این، طی تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی (*in-silico*) در این مطالعه، ارتباطات شبکه ای زیادی برای *Oct4* و *Sox2* و عوامل دیگر مرتبط از جمله *Nanog*, *BMP4*, *SALL4*, *Zbtb16*, *Gata4*, *Klf4* و *Gfra1* در ارتباط با *AP*، با استفاده از پایگاه داده *CORMINE* و *Cytoscape*، شناسایی شد. فعالیت *AP* به عنوان یک نشانگر پذیرفته شده برای سلول های بنیادی پرتوان است نشانگرهای مولکولی اختصاصی سلول های زایا را می توان برای شناسایی، نظارت و جداسازی مرحله خاصی از آن ها استفاده کرد. پروتئین *Lin28* در گنوسیت های (سلول های پیش ساز سلول های بنیادی اسپرم ساز) بیضه جنین انسان بیان می شود (7). بیان *Lin28* به جمعیت بسیار کمی از سلول های اسپرماتوگونیال

در انسان، موش و میمون محدود می شود. مشاهدات نشان می دهد که زیرجمعیت سلول های اسپرماتوگونی بیان کننده *Lin28* بسته به نوع گونه متفاوت هستند. این مورد به این دلیل است که اندازه یک زیرجمعیت اسپرماتوگونی در بین گونه ها متفاوت است. بنابراین، حدس زده می شود که نقش آنها حفظ سلول تمایز نیافته باشد. به علاوه، *Lin28* در سلول های لایدیگ واقع در فضای بینابینی قابل تشخیص نبودند. *Lin28* همچنین یکی از فاکتورهای برنامه ریزی مجدد سلولی همراه با *Sox2*, *Oct4* و *Nanog* است که می تواند سلول های سوماتیک را به سلول های بنیادی پرتوان القایی تبدیل کند. در ادامه نشان داده شده است که *Lin28A* نه تنها برای رشد موفقیت آمیز سلول های زایای اولیه (*PGCs*) ضروری است، بلکه در اسپرماتوگونی تمایز نیافته موش ها در طول عمرشان حضور دارد و باعث پایداری آن ها می شود (8). یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار فاکتور رونویسی *SALL4* می باشد که با پرتوانی سلول های جنینی مرتبط است و به عنوان یک نشانگر مهم برای تومورهای سلول زایا نشان داده شده است (9). *SALL4* یک تنظیم کننده اصلی پرتوانی جنینی است و یک شبکه تنظیمی با سایر فاکتورهای رونویسی مرتبط با پرتوانی *Oct4* و *Nanog* تشکیل می دهد (10). *SALL4* برای رشد اولیه جنین مهم است و جهش یافته های هموزیگوت، دچار از دست دادن عملکردهای خود می شوند و گاهاً مرگ جنین مشاهده می شود (11). اگرچه عملکرد دقیق *SALL4* در اسپرماتوگونی هنوز مشخص نیست، سرخهایی در مورد مکانیسم های احتمالی عمل *SALL4* در سلول های زایا یافت شده است (12-14). *Gfra1* یکی دیگر از فاکتورهای حیاتی در مسیر اسپرماتوژنز می باشد، که هنوز مسیر دقیق فعالیت آن مشخص نشده است. مطالعات اخیر به دخالت بالقوه مسیر سیگنالینگ *Gfra1* در تنظیم اسپرماتوژنز پرداخته اند. *Gfra1* در واقع یک گیرنده مشترک برای *Gdnf* است، یک فاکتور مشتق شده از سلول های سرتولی می باشد که تعادل بین خود

نوسازی و تمایز *SSC* ها را کنترل می‌کند (16,15). به دلیل نزدیکی نیای مشترک انسان و موش، بیش از 50 سال است که از موش به عنوان مدل آزمایشگاهی (پیش از آزمایش بر روی انسان)، استفاده می‌شود. از طرفی مشخص شده است که 90 درصد ژنوم و 5/78 درصد اسید آمینه‌های این دو گونه باهم شباهت دارد و همچنین تنها 16 درصد ژن‌های این دو گونه تفاوت بیان داشتند. به علاوه مشخص شده است که ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی و همچنین تولید مثل جنسی نیز بیان ژن‌ها در این دو گونه تغییری نداشته است و حفاظت شده می‌باشند و همچنین دارای هم بیانی با یکدیگر هستند، به همین جهت ما نیز از موش در این آزمایشات استفاده کردیم (17). در این مطالعه در جهت پیشرفت و افزایش آگاهی در این زمینه، بیان آلکالین فسفاتاز، و همچنین ژن‌های *Sall4*، *Gfra1* و *Lin28* در سه جمعیت سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی جنینی (*ES-like cells*) و همچنین در سلول‌های بنیادی اسپرم ساز موش بررسی شد. از آنجایی که ناباروری یکی از مشکلات اصلی جامعه می‌باشد و همچنین با در نظر داشتن اهمیت چرخه اسپرماتوزن در تولید اسپرم بالغ و باروری افراد، در این مطالعه تلاش شد تا بتوان با بررسی بیان ژن‌های اصلی دخیل در اسپرماتوزن، که با یکدیگر در ارتباط هستند، میزان آن‌ها را بررسی کرده و مکانیسم‌های مولکولی درک نشده در این فرآیند، نقش هر یک از فاکتورها و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط را در مطالعات بعدی شناسایی کرد.

مواد و روش‌ها

هضم آنزیمی بافت بیضه و کشت سلول‌های بیضه

این مطالعه تجربی تحت کلیه مراقبت‌های حیوانی مطابق با تأیید دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل و کمیته اخلاق دانشگاه با کد *ir.ausmt.rec.1400.29* انجام شد. سلول‌های بیضه از موش C57BL/6، بعد از جداسازی در محلول نمکی بافر فسفات یا

(*PBS; Phosphate-buffered saline, Invitrogen*) بیضه از کیسول بیضه جدا شده و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند. بافت خرد شده به مدت 10 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در محلول بافری (*Hank's buffered salt solution, PAA*) *HBSS* (*Laboratories GmbH Co. USA*) که حاوی یون *Ca* و *Mg* است، به همراه آنزیم‌های هضم‌کننده کلاژناز تیپ *IV* (0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (*Sigma Aldrich, USA*)، *DNAse* (0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (*Sigma Aldrich, USA*)، و دیسپاز (0/8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (*Sigma Aldrich, USA*)، قرار داده شد. عملکرد آنزیم‌های هضم‌کننده در سرم جنین گاوی یا *FBS* 10 درصد متوقف شده و سپس محلول حاصل برای به‌دست آوردن سوسپانسیون تک سلولی به آرامی پیپتاژ شد. سپس سلول‌های منفرد حاصل از بافت بیضه هضم شده روی ظروف کشت پوشش داده شده با ژلاتین قرار داده شد (تقریباً $10^5 \times 0/5-0/2$ سلول در هر 3/8 سانتی‌متر مربع). سلول‌های کشت شده در محیط *GSC* موش (*mGSC*) شامل محیط *stemPro-34*، 1 درصد مکمل *N2* (*Invitrogen, USA*)، 6 میلی‌گرم/میلی‌لیتر *D-گلوکز* (*Sigma Aldrich, USA*)، 5 میلی‌گرم/میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (*Sigma Aldrich, USA*)، 1 درصد *L-گلوتامین* (*PAA, USA*)، 0/1 درصد β -*mercaptoethanol* (*Invitrogen, USA*)، 1 درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (*PAA, USA*)، 1 درصد ویتامین‌های *MEM NEAA* (*PAA, USA*)، 1 درصد آمینواسیدهای غیرضروری (*PAA, USA*)، 30 نانوگرم/میلی‌لیتر استرادیول (*Sigma Aldrich, USA*)، 60 نانوگرم/میلی‌لیتر پروژسترون (*Sigma Aldrich, USA*)، 20 نانوگرم/میلی‌لیتر *EGF* (*Sigma Aldrich, USA*)، 10 نانوگرم/میلی‌لیتر *FGF* (*Sigma Aldrich, USA*)، 8 نانوگرم/میلی‌لیتر *GDNF* (*Sigma Aldrich, USA*)، 100 واحد/میلی‌لیتر *LIF* (*Millipore, USA*)،

فیکس شدند. از میکروسکوپ فلورسنس (*Olympus, BX51, Japan*) و کونفوکال (*Zeiss LSM 700*) برای بررسی سلول‌های نشان دار شده استفاده شد و سپس تصاویر با دوربین *Zeiss LSM-TPMT* ثبت شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن در سیستم *Fluidigm Biomark* چیپ‌های مخصوص *Fluidigm* برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های سلول‌های زایا و پرتوان از جمله *Gfra1*، *Lin28* و *Sall4* استفاده شد. ژن خانه دار *GAPDH* برای کنترل استفاده شد. در هر نمونه، حدود 100 سلول به صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف با میکروپیپت یا میکرومانیپلاتور برداشته شد و بلافاصله منجمد و در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس طی فرآیندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، *mRNA* به *cDNA* رونویسی معکوس شد، که به‌طور اختصاصی توالی در یک لوله آزمایشگاهی تکثیر شد و تعداد رونوشت‌های هدف با استفاده از *TaqMan Real-Time PCR* بر روی *BioMark Real-Time quantitative PCR (qPCR)* مشخص شد. لازم به ذکر است هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز شد. 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 تغذیه‌کننده *MEF* نرمال شدند. تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزار *MultiD*، *GenEx*، *Excel* و *SPSS* انجام شد.

رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های *ESC* و سلول‌های *ES-like* با *NBT/BCIP* (*NBT: 4-Nitro blue tetrazolium chloride*) و *BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* در *TMN-Puffer*، با *pH 9.5* رنگ آمیزی شدند. سپس این رنگ آمیزی با استفاده از آب دیونیزه متوقف شد و

100 میکروگرم / میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (*Sigma Aldrich, USA*)، 30 میکروگرم / میلی‌لیتر پیرویک اسید (*Sigma Aldrich, USA*)، 1 میکرولیتر / میلی‌لیتر *DL*-لاکتیک اسید (*Sigma Aldrich, USA*) و استرادیول 30 نانوگرم / میلی‌لیتر، پروژسترون 60 نانوگرم / میلی‌لیتر و *ES-FBS* 1 درصد (در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد *CO2*) کشت داده شدند (18).

پردازش بافت برای ایمنوهمیستوشیمی (IHC)

در این قسمت بیان ژن *Gfra1* مورد بررسی قرار گرفت. بافت بیضه از موش‌های نر برداشته شد، سپس در *PBS* شسته شد و در پارافرمالدئید 4 درصد برای حدود 24 ساعت در دمای اتاق (*RT*) تثبیت شد. بیضه دهیدراته شده در *Paraplast Plus* قالب‌گیری شد. بلوک‌های بافت بیضه با میکروتوم با ضخامت حدود 10 میکرومتر بریده شدند. برش‌ها بر روی اسلایدهای *Superfrost Plus* قرار داده شدند و تا زمان استفاده در دمای اتاق نگه داری شدند. تمام برش‌ها با گزلیل پارافین‌زدایی شدند و قبل از رنگ‌آمیزی در یک سری کاهشی غلظت (از 100 درصد تا 10 درصد) اتانول دهیدراته شدند. پس از بازیابی آنتی‌ژن با واسطه گرما و بافر سترات سدیم، *pH 6* (10 میلی‌مولار) یا *EDTA, pH 8* (1 میلی‌مولار) در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه، سپس آن‌ها که متصل نشده‌اند با سرم 10 درصد و *Triton X-100* 0/3 درصد در *PBS* 89/7 درصد غیر فعال شدند و رنگ‌آمیزی ایمنو فلورسانس انجام گرفت. نمونه حاصل با آنتی‌بادی‌های اولیه (آنتی‌بادی *Gfra1*، *SAB 4501166*) به مدت 24 ساعت، انکوبه شدند سپس این روند برای آنتی‌بادی‌های ثانویه نشاندار فلوکروم (*Abcam*) *Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)* نیز تکرار شد. برای رنگ آمیزی هسته از *DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)* (0/2 میکروگرم / میلی‌لیتر) به مدت 3 دقیقه در دمای اتاق استفاده شد و بعد با *Poly vinyl alcohol (Mowiol®)*

سپس با محلول 4 درصد PFA تثبیت شدند. در مرحله بعد عمل شستشو صورت گرفت، سپس نمونه‌ها با ژلاتین گلیسرول کایزر قالب‌گیری شدند و سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (20، 19).

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

سپس ژن‌های دخیل در فرآیند اسپرماتوژنز، در NCBI و همچنین ژن‌های با ارتباط مستقیم در تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز توسط COREMINE شناسایی شدند و در پایگاه‌های داده آنالین *STRING* (v 11.5) برای ساخت شبکه PPI مورد استفاده قرار گرفتند. از نرم‌افزار *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org>) (نسخه 3.9.1) برای ایجاد، تجزیه و تحلیل شبکه PPI و نمایش ارتباط‌های آن‌ها استفاده شد. ژن‌های دارای ارتباط مستقیم با آلکالین فسفاتاز شناسایی و انتخاب شد. تجزیه و تحلیل ارتباط ژن‌های عملکردی با استفاده از تجزیه و تحلیل *STRING Enrichment* در نرم‌افزار *Cytoscape* انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های قبلی همگی حداقل 3 بار تکرار شدند. میانگین بیان ژن‌ها در گروه‌ها محاسبه شد و گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (*one-way ANOVA*) در نرم‌افزار SPSS 26 مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از آزمون‌های *Bonferroni* و *Tukey* پس از *T-Test* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ادامه بیان ژن‌ها با آزمون غیر پارامتریک *Mann-Whitney* مقایسه شد. اگر مقدار $P < 0/05$ به دست آمد، تفاوت بین گروه‌ها از نظر آماری قابل اعتماد و *significant* در نظر گرفته می‌شود. توزیع بیان ژن *Sall4* از توزیع نرمال برخوردار نبود و به همین جهت از آزمون‌های ناپارامتریک مثل کروسکال واریس و سپس *Mann-Whitney* برای سنجش

آن استفاده شد. اما توزیع بیان ژن‌های *Lin28* و *Gfra1*، از بیان نرمال برخوردار بود و به همین جهت از آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه *one-way ANOVA* استفاده شد. همچنین با استفاده از برنامه نویسی *R* و استفاده از تحلیل بیان ژن‌ها، نمودار *Heatmap* و دندروگرام ژن‌های مورد در جمعیت‌های سلولی آزمایش، در پکیج *Pheatmap* رسم شد.

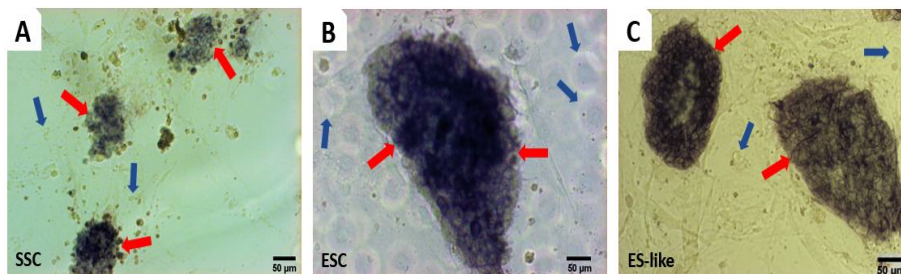
یافته‌ها

پس از طی مراحل جداسازی، کشت و آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز نمونه‌ها صورت گرفت. با توجه به تصویر شماره 1 مشاهده شد که در سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های *ES-like* و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان آلکالین فسفاتاز مثبت بود. در اطراف تصاویر سلول‌های فیروبلاست و سلول‌های سرتولی بیضه دیده شدند که دارای بیان منفی بودند. با این حال سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تا حدی برای *AP* مثبت بودند و رنگ‌آمیزی ضعیف‌تر را نشان دادند، سلول‌های *ES-like* رنگ‌آمیزی شدید مشابهی را برای *AP* در مقایسه با *mESCs* نمایان کردند. برای بررسی ارتباطات ژن‌های مؤثر بر تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز از روش‌های بیوانفورماتیکی استفاده شد. در این بخش از پایگاه‌های داده موجود همچون *COREMINE* و *NCBI* استفاده شد. در ادامه از نرم‌افزار *Cytoscape* استفاده شد و با جداسازی ژن‌های دارای تأثیر مستقیم و نقش تنظیم‌کنندگی بر فرآیند اسپرماتوژنز و ارتباط با آلکالین فسفاتاز، رسم شبکه پروتئین-پروتئین آن‌ها انجام شد (تصویر شماره 2). طبق این نتایج مشاهده شد که آلکالین فسفاتاز با ژن‌هایی همچون *Gfra1*، *Lin28*، *Gata4*، *Klf4*، *Oct4*، *Sox2*، *Nanog*، *Ret*، *Sall4* و *BMP4* ارتباط مستقیم دارد. همچنین این ژن‌ها با تأثیر بر بیان و فعالیت یکدیگر نقش اساسی در تنظیم هدفمند اسپرماتوژنز دارند. سپس ژن‌های دارای ارتباط مؤثرتر

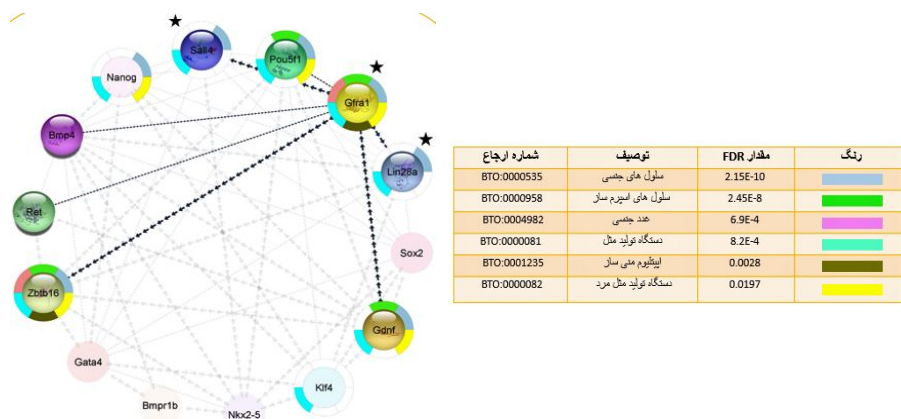
نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی، دارای تفاوت معنی‌دار ($p < 0/01$) بود (تصویر شماره 3 B). *TSCs* نیز مانند ژن *Lin28* بیان منفی داشت. پس از آن، آزمایشات بیان ژن *Gfra1* مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس مشاهده شد که بیان این ژن در هر سه رده سلولی مثبت، اما میزان بیان آن‌ها کم بود. هیچ یکی از این رده‌های سلولی بیان معنی‌داری نسبت به یکدیگر نداشتند (تصویر شماره 3 C). در این قسمت آزمایش نیز *TSCs* بیان نزدیک به صفر داشت. برای مقایسه بهتر بیان ژن‌های مورد نظر نمودار *Heatmap* و دندروگرام آن‌ها رسم شد (تصویر شماره 3 D). در این بخش مشاهده شد که بیان ژن‌های *Lin28*، *Gfra1* و *Sall4* در سلول‌های بنیادی پرتوان و اسپرم ساز مثبت بود و همچنین *Lin28* و *Sall4* بیان بیشتری داشتند. سپس بیان پروتئین *Gfra1* که یکی از اصلی‌ترین ژن‌های تأثیرگذار در فرآیند اسپرماتوزن می‌باشد و به علاوه دارای ارتباط مستقیم با آلكالین فسفاتاز می‌باشد، با توجه به نقش مرکزی و کنترل‌کننده بر روی دو ژن دیگر، با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بررسی شد (تصویر شماره 4). همچنین با استفاده از رنگ آمیزی مخصوص هسته‌ای، هسته‌های سلول‌های موجود در لوله‌های اسپرم ساز مشخص و تفاوت بیان هسته‌ای و سیتوپلاسمی پروتئین *Gfra1* مورد بررسی قرار گرفت، که مشخص شد این پروتئین اکثراً دارای بیان هسته‌ای بود.

بر یکدیگر در این فرآیند، از بین ژن‌های بالا جدا شدند. مشخص شد که ژن‌های *Lin28*، *Sall4*، *Gfra1*، *Gdnf* و *Zbtb16* ارتباط گسترده‌ای با یکدیگر دارند که در این مطالعه به بررسی سه مورد از آن‌ها پرداخته شد. در تصویر زیر محل بیان هر یک از این فاکتورها نیز مشخص شد که در راهنمای آن قابل مشاهده است (تصویر شماره 2). این فاکتورها می‌توانند مسیر پیام‌رسانی اسپرماتوزن را با تأثیر بر یکدیگر کنترل کنند.

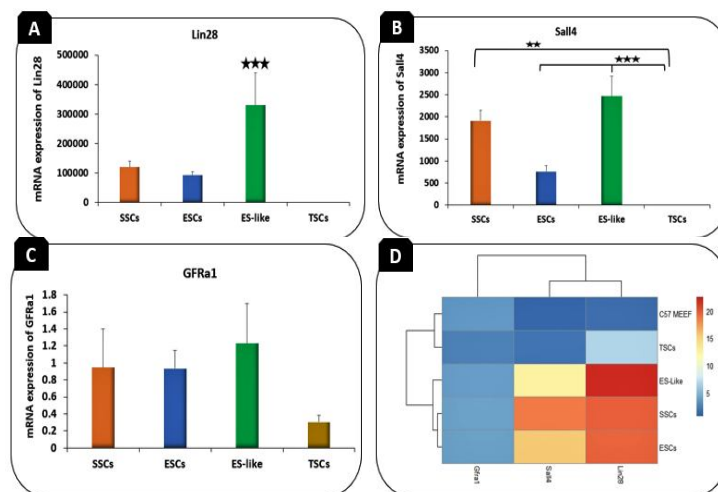
پس از شناسایی و انتخاب ژن‌های با تأثیر مستقیم بر آلكالین فسفاتاز، با بررسی تست *Fluidigm PCR*، بیان ژن‌های *Lin28* و *Sall4*، *Gfra1* در سه رده سلولی سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های *ES-like* و سلول‌های بنیادی اسپرم ساز سنجیده شد. طبق مشاهدات ژن *Lin28* در هر سه رده بیان بالایی داشت. در سلول‌های *ES-like* تفاوت بیان معنی‌داری ($p < 0/05$) مشاهده شد که نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی اسپرم ساز بسیار بیشتر بود (تصویر شماره 3 A). در این آزمایشات از سلول‌های *TSCs* موش به عنوان نمونه کنترل استفاده شد، و مشاهده شد که بیان منفی داشتند. پس از *Lin28*، بیان ژن *Sall4* بررسی شد. *Sall4* نیز در هر سه رده سلولی بیان مثبت داشت. بیان این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی کمتر از سلول‌های بنیادی اسپرم ساز بود. سلول‌های *ES-like* نسبت به بقیه سلول‌ها بیان بیشتری داشت و این بیان



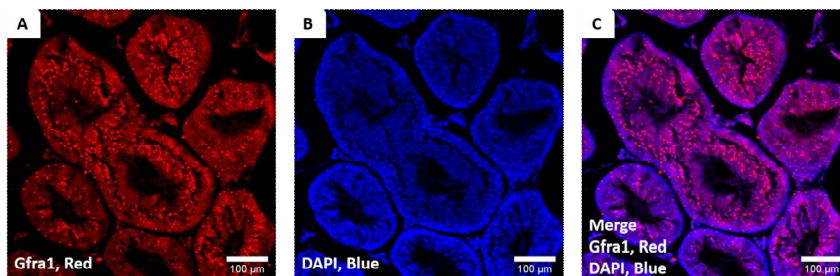
تصویر شماره 1: بیان آلكالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های *ES-like* (پیکان قرمز، مثبت). بیان منفی آلكالین فسفاتاز در سلول‌های سرتولی و فیبروبلاست‌ها (پیکان آبی، منفی).



تصویر شماره 2: شبکه ارتباطی ژنهای *Sall4*، *Gfra1* و *Lin28*. همچنین نحوه تأثیر آنها بر یکدیگر (در اتصالات آنها) و محل بیان هر یک از پروتئین‌ها (در جدول راهنما) مشخص شده است.



تصویر شماره 3: بیان mRNA ژنهای *Lin28*، *Sall4* و *Gfra1* در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های *ES-like* ژن *Lin28* در سلول‌های *ES-like* به‌طور بسیار زیاد و معنی‌داری ($P < 0/001$) (سه ستاره) نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی و اسپرم‌ساز، بیان می‌شود (A). ژن *Sall4* نیز دارای بیان مثبت و معنی‌دار در سلول‌های *SSCs* نسبت به *TSCs* ($P < 0/01$) (دو ستاره) و همچنین در سلول‌های *ES-like* نسبت به سلول‌های *ESCs* و *TSCs* ($P < 0/001$) می‌باشد (B). به‌علاوه ژن *Gfra1* نیز دارای بیان مثبت در هر سه جمعیت سلولی می‌باشد (C). همچنین بیان این ژن در سلول‌های سرتولی بیضه که به‌عنوان نمونه کنترل بودند منفی می‌باشد. نمودار *Heatmap* نشان‌دهنده تفاوت بیان ژن‌های موردنظر در جمعیت‌های سلولی مورد آزمایش می‌باشد (D). ژن‌های با بیان بیش‌تر با رنگ قرمز و ژن‌های با بیان کم‌تر با رنگ آبی مشخص شده‌اند. همچنین میزان نزدیکی و نیای مشترک هر یک نیز مشخص شده است.



تصویر شماره 4: الگوی بیان ژن *Gfra1* توسط میکروسکوپ کونفوکال UV در لوله‌های اسپرم‌ساز موش. (A) رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین *Gfra1* (قرمز رنگ). (B) رنگ آمیزی *DAPI* نشان‌دهنده هسته سلول‌ها می‌باشد (آبی رنگ). (C) تصویر *Merge* شده دو رنگ آمیزی که تمایز دهنده بیان هسته‌ای و سیتوپلاسمی پروتئین *Gfra1* می‌باشد.

بحث

در این مطالعه مشخص شد که آنزیم آلکالین فسفاتاز، به همراه ژن‌های *Gfra1*، *Sall4* و *Lin28*، جزو فاکتورهای شناسایی سلول‌های بنیادی پرتوان به خصوص سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌باشند. همچنین مشخص شد این ژن‌ها با یکدیگر در ارتباط بوده و در روند اسپرماتوزن تأثیرگذارند. اسپرماتوزن یک فرآیند پیچیده است که تحت کنترل و تنظیم ژن‌ها و مسیرهای سیگنالینگ مختلف می‌باشد. محققین در نقاط مختلف دنیا در تلاش هستند که راهی برای درمان اساسی ناباروری، که در اثر اختلال در این مسیر ایجاد می‌شود، پیدا کنند. در همین راستا، طی آزمایشاتی در سال‌های اخیر به بررسی عوامل دخیل بر این فرآیند پرداخته شد (22،21). با بررسی بیوانفورماتیکی عوامل دخیل در اسپرماتوزن و همچنین فاکتورهایی با بیش‌ترین تأثیر بر آلکالین فسفاتاز به سنجش میزان بیان آلکالین فسفاتاز و سه ژن *Gfra1*، *Sall4* و *Lin28* در سه جمعیت سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی جنینی (*ES-like*) و همچنین سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش پرداخته شد. آلکالین فسفاتاز یکی از عوامل حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی می‌باشد (25-23). بیان *TNAP* یک نشانگر مناسب برای سلول‌های بنیادی پرتوان است. سطح پایین فعالیت *AP* نشان‌دهنده محدودیت پرتوانی است که در سلول‌های اپی‌بلاست و تمایز یافته نیز مشاهده شده است. یکی از ژن‌های اصلی دخیل در اسپرماتوزن که با آلکالین فسفاتاز نیز ارتباط زیادی دارد *Lin28* می‌باشد (26). *Lin28* در گنوسیت‌های انسانی و سلول‌های اسپرماتوگونی نابالغ وجود دارد. تعداد بسیار کمی از اسپرماتوگونی‌ها در بیضه بزرگسالان دارای *Lin28* مثبت هستند (27،28). همان‌طور که طی این مطالعه مشاهده شد، بیان *Lin28* در هر سه جمعیت سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، بالا بود با این تفاوت که بیان این ژن در سلول‌های *ES-like* بسیار بالاتر از دو رده دیگر بود. *Lin28* یک فاکتور پرتوانی

است که در سلول‌های پرتوان *ES* موش، کارسینوم جنینی موش و سلول‌های تراتوکارسینومای انسانی به شدت بیان می‌شود. *Lin28* همچنین در طول تولید سلول *iPS* در سلول‌های انسان، حمایت‌کننده و ضروری می‌باشد (29). در سال‌های اخیر، به اهمیت سلول‌های *ES-like* چند توان و پرتوان کم‌تر پرداخته شده است، به این دلیل در این مطالعه به برخی از ویژگی‌های بیانی در این رده سلولی پرداخته شد. با این وجود همچنان مطالعات در این زمینه ادامه دارد زیرا این رده سلولی می‌تواند بسیار مهم واقع شود و پس از درک کامل و دقیق مکانیسم‌های مولکولی آن، می‌توان از این سلول‌ها در جهت درمان‌های بالینی استفاده کرد، زیرا این سلول‌ها همان‌طور که از ویژگی‌هایشان مشخص است، شبیه سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند و در نتیجه جزو سلول‌های پرتوان محسوب می‌شوند و می‌توان با کنترل و شناخت آن‌ها از این سلول‌ها در سلول درمانی و همچنین درمان ناباروری استفاده کرد. *Wang* و همکاران در سال 2005 در یک مطالعه نشان دادند که ژن *Lin28* به‌طور متفاوتی عمدتاً در اسپرماتوگونی نوع *A* اولیه موش بیان می‌شود (30). چندین تیم تحقیقاتی نشان داده‌اند که *SSC* ها می‌توانند سلول‌های پرتوان باشند. *Kanatsu-Shinohara* و همکارانش نشان دادند که سلول‌های *ES-like* مشتق از بیضه نوزاد موش به انواع مختلفی از سلول‌های سوماتیک تمایز می‌یابند (31). شواهد زیادی نشان داده‌اند که *Lin28* نقش مهمی در حفظ حالت تمایز نیافته سلول‌ها ایفا می‌کند. بنابراین، می‌توان از آن به عنوان یک نشانگر مولکولی برای *SSC* های تمایز نیافته استفاده کرد (26،32). در ادامه به بررسی ژن *SALL4* که یکی دیگر از ژن‌های مهم دخیل در اسپرماتوزن می‌باشد پرداخته شد و بیان آن در سه رده موردنظر بررسی شد. طبق نتایج حاصل، مشاهده شد که این ژن در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و همچنین در سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی جنینی سطح بالایی داشت. اما نکته جالب توجهی که وجود داشت مشاهده

تولد، عمدتاً از آژنزی کلوی می‌میرند. علاوه بر این، *GDNF* نه تنها توسط سلول‌های سرتولی، بلکه توسط سلول‌های میوئید دور لوله‌های اسپرم ساز نیز بیان می‌شود، که تفسیر آزمایش‌های حذفی را چالش‌برانگیز می‌کند (36). همچنین در مطالعات بررسی شبکه پروتئین-پروتئین سه ژن *Sall4*، *Gfra1* و *Lin28* طبق نتایج حاصله، این سه ژن که ارتباط اصلی با آلکالین فسفاتاز دارند و در تنظیم بیان و فعالیت آن دخیل هستند، جزو ژن‌های دخیل در تنظیم اسپرماتوژنز هستند و در سلول‌های جنسی و بیضه، در مراحل مختلف این چرخه تمایزی بیان می‌شوند. همچنین ژن‌های مذکور با برخی دیگر از ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز مستقیماً ارتباط دارند و موجب تنظیم بیان و فعالیت یکدیگر می‌شوند، ژن‌هایی از جمله *Ret*، *Gdnf*، *Nanog*، *Klf4*، *Sox2*، *Pou5f1*، *Bmp4*، *Zbtb16* و *Bmpr1b* جزو این شبکه ارتباطی مستقیم هستند.

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته مشخص شد که آلکالین فسفاتاز یکی از فاکتورهای نمایان کننده سلول‌های بنیادی پرتوان می‌باشد و در سلول‌های تمایز یافته بیان آن کاهش می‌یابد. همچنین مشخص شد، این آنزیم به همراه ژن‌های *Sall4*، *Gfra1* و *Lin28* جزو فاکتورهای محافظت کننده حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی هستند. آلکالین فسفاتاز به همراه ژن‌های *Sall4*، *Gfra1* و *Lin28* در فرآیند اسپرماتوژنز نیز نقش دارند و با شبکه ارتباطی خود، نقش تنظیم کنندگی در آن ایفا می‌کنند.

تعارض در منافع:

هیچ یک از نویسندگان تعارضی در منافع خود ندارند.

سپاسگزاری

این مطالعه تحت حمایت مالی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل (با کد طرح: 81913) و همچنین توافقنامه همکاری بین دانشگاه هایدلبرگ آلمان (MOU) انجام شده است.

اختلاف بسیار معنی‌دار ($P < 0/01$) در بیان این ژن بین سلول‌های بنیادی جنینی (بیان مثبت) و سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی جنینی (*ES-like*) می‌باشد، که این موضوع از دیگر تفاوت‌های این دو رده سلولی مشابه است، با این وجود که هر دو نتیجه مثبتی داشتند. در ادامه *Eildermann* و همکارانش در سال 2012 نشان دادند که در بیضه، پروتئین *SALL4* در هسته سلول‌های رده زاینده اولیه و بیش‌تر در گنوسیت‌های بیضه قبل از تولد و اندکی پس از تولد قرار دارد. علاوه بر این مشاهده کردند، در بیضه بالغ، *SALL4* در اسپرماتوگونی تمایز نیافته وجود دارد (31). آخرین فاکتوری که مورد بررسی قرار گرفت *GFRA1* می‌باشد. با توجه به مطالب گفته شده و نتایج مشابهی که در این مطالعه به دست آمد، مشاهده شد که *GFRA1* در هر سه جمعیت سلولی تحت آزمایش بیان مثبتی داشت اما میزان آن‌ها زیاد نبود. مورد بعدی این که، میزان بیان در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های *ES-like* شبیه و نزدیک بهم بود و این موضوع جزو شباهت‌های این دو رده محسوب می‌شود. برای به دست آوردن بینش بیش‌تر در رابطه با زیرمجموعه‌های مختلف اسپرماتوگونی تمایز نیافته، گروه‌های مختلفی توزیع سلول‌های بیان کننده *GFRA1* را در مراحل بعدی فرایند اسپرماتوژنز، تجزیه و تحلیل و کمی‌سازی کرده‌اند. *McGuinness* و *Orth* مشاهده کردند که مدت کوتاهی پس از تولد، اسپرماتوگونی‌ها به سمت غشای پایه مهاجرت می‌کنند و به *SSC*‌ها تبدیل می‌شوند. همچنین *Komatsu* و *Shinohara*، *Naughton* و *Meng* به همراه همکارانشان در سال‌های بعد هر یک به صورت جداگانه مشاهده کردند که *GDNF* به کمپلکس گیرنده *RET/GFRA1* متصل می‌شود و خود نوسازی آن‌ها را القا می‌کند (33-35). *Sanchez* و همکارانش گزارش کردند رمزگشایی اهمیت عملکردی *GDNF* و کمپلکس گیرنده آن در اسپرم زایی دشوار بوده است، زیرا موش‌های ناک اوت شده در حوالی

References

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell* 2007; 131(5): 861-872.
2. Miura K, Oiwa Y, Kawamura Y. Induced pluripotent stem cells from cancer-resistant naked mole-rats. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1319: 329-339.
3. Suzuki H, Kasai K, Kimura Y, Miyata S. UV/ozone surface modification combined with atmospheric pressure plasma irradiation for cell culture plastics to improve pluripotent stem cell culture. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 123: 112012.
4. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78(2): 447-467.
5. McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S. *Alkaline phosphatase*: Springer Science & Business Media; Springer New York NY; 2013.
6. Tu J, Tian G, Cheung H-H, Wei W, Lee T-I. Gas5 is an essential lncRNA regulator for self-renewal and pluripotency of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9: 71.
7. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res* 2018; 29: 207-214.
8. Leinonen JT, Chen Y-C, Tukiainen T, Panula P, Widén E. Transient modification of lin28b expression-permanent effects on zebrafish growth. *Molecular and cellular endocrinology* 2019; 479: 61-70.
9. Sun J, Zhang J, Wang D, Shen J. The transcription factor Spalt and human homologue SALL4 induce cell invasion via the dMyc-JNK pathway in *Drosophila*. *Biol Open* 2020; 9(3): bio048850.
10. Fang F, Iaquina PJ, Xia N, Liu L, Diao L, Reijo Pera RA. Transcriptional control of human gametogenesis. *Human Reproduction Update* 2022; 28(3): 313-345.
11. Chen KQ, Anderson A, Kawakami H, Kim J, Barrett J, Kawakami Y. Normal embryonic development and neonatal digit regeneration in mice overexpressing a stem cell factor, Sall4. *PloS one* 2022; 17(4): e0267273.
12. Sweetman D, Münsterberg A. The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev Biol* 2006; 293(2): 285-293.
13. Elling U, Klasen C, Eisenberger T, Anlag K, Treier M. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(44): 16319-16324.
14. Zhao H, Zhang Y, Xu X, Yang C, Wang H, Tao Y, et al. Sall4 and Myocd empower direct cardiac reprogramming from adult cardiac fibroblasts after injury. *Front cell Dev Biol* 2021; 9: 608367.
15. Sharma A, Lagah SV, Nagoorvali D, Kumar BSB, Singh MK, Singla SK, et al. Supplementation of glial cell line-derived neurotrophic factor, fibroblast growth factor 2, and epidermal growth factor promotes self-renewal of putative buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cells by upregulating the expression of miR-20b, miR-21, and miR-106a. *Cell Reprogram* 2019; 21(1): 11-17.
16. Azizi H, Niazi Tabar A, Skutella T, Govahi M. In vitro and in vivo determinations of the

- anti-GDNF family receptor alpha 1 antibody in mice by immunohistochemistry and RT-PCR. *Int J Fertil Steril* 2020; 14(3): 228-233.
17. Monaco G, van Dam S, Casal Novo Ribeiro JL, Larbi A, de Magalhães JP. A comparison of human and mouse gene co-expression networks reveals conservation and divergence at the tissue, pathway and disease levels. *BMC Evol Biol* 2015; 15(1): 259.
 18. Azizi H, Hamidabadi HG, Skutella T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. *Cell J (Yakhteh)* 2019; 21(2): 186-193.
 19. Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, De Lorimier L-P, Fan T, et al. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Vet Pathol* 2005; 42(2): 161-165.
 20. Campbell PA. Alkaline phosphatase staining. *Bio-protocol* 2014; 4(5): e1060-e1060.
 21. Niazi Tabar A, Azizi H, Hashemi Karoii D, Skutella T. Testicular Localization and Potential Function of Vimentin Positive Cells during Spermatogonial Differentiation Stages. *Animals (Basel)* 2022; 12(3): 268.
 22. Azizi H, Asgari B, Skutella T. Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis. *Cell J (Yakhteh)* 2019; 21(3): 281-289.
 23. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Developmental cell* 2006; 11(1): 125-132.
 24. Elliott AM, de Miguel MP, Rebel VI, Donovan PJ. Identifying genes differentially expressed between PGCs and ES cells reveals a role for CREB-binding protein in germ cell survival. *Dev Biol* 2007; 311(2): 347-358.
 25. Hamer G, de Rooij DG. Mutations causing specific arrests in the development of mouse primordial germ cells and gonocytes. *Biology of Reproduction* 2018; 99(1): 75-86.
 26. Lee G, Jung H, Yoon M. The Lin28 expression in stallion testes. *PLoS One* 2016; 11(10): e01.65011.
 27. Cruz A, Sullivan DB, Doty KF, Hess RA, Canisso IF, Reddi PP. Acrosomal marker SP-10 (gene name *Acrv1*) for staging of the cycle of seminiferous epithelium in the stallion. *Theriogenology* 2020; 156: 214-221.
 28. Soler L, Alves S, Brionne A, Jacques A, Guérin V, Cherif-Feildel M, et al. Protein expression reveals a molecular sexual identity of avian primordial germ cells at pre-gonadal stages. *Scientific Reports* 2021; 11: 19236.
 29. Aeckerle N, Eildermann K, Drummer C, Ehmcke J, Schweyer S, Lerchl A, et al. The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod* 2012; 18(10): 477-488.
 30. Wang PJ, Page DC, McCarrey JR. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet* 2005; 14(19): 2911-2918.
 31. Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Katanaya A, Hosokawa M, Shinohara T. Genomic stability of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *Scientific Reports* 2021; 11: 24199.
 32. Kim JY, Jung HJ, Yoon MJ. VASA (DDX4) is a putative marker for spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in stallions. *Reprod Domest Anim* 2015; 50(6): 1032-1038.
 33. Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and

- development. Annual review of Cell and Developmental Biology 2013; 29: 163-187.
34. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science 2000; 287(5457): 1489-1493.
35. Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. Biol Reprod 2006; 74(2): 314-321.
36. Sinha N, Whelan EC, Tobias JW, Avarbock M, Stefanovski D, Brinster RL. Roles of Stra8 and Tcerg11 in retinoic acid induced spermatogonial differentiation in mouse. Biol Reprod 2021; 105(2): 503-518.