DOI: 10.48305/jims.v41.i741.0965

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۴۱/هفته‌ی اول دی ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۱۴ تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۷

ارتباط بیان فاکتور رونویسی POU5F1 با افزایش سن به عنوان یک عامل اپی‌ژنتیکی

مهدی مهدی‌نژاد روشن[۱،۳]، پردیس ارجمند[۲]، حسین عزیزی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی ارتباط میزان بیان فاکتور مهم رونویسی POU5F1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سن و ارائه‌ی الگوهای بیانی این فاکتور در لوله‌ی اسپرم‌ساز موش می‌باشد.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر پس از استخراج بیضه‌ی موش‌های نوزاد دو هفته‌ای و بالغ ۱۶ هفته‌ای که از مؤسسه‌ی پاستور ایران خریداری شد، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جداسازی گردید؛ پس از کشت سلول‌ها در محیط کشت StemPro-34 medium حاوی فاکتورهای رشد اختصاصی کشت داده شدند. همینطور بافت برش داده شده پس از انجام مراحل فیکس کردن و آماده‌سازی، با آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه انکوبه شدند و بررسی ایمنوهیستوشیمیایی با میکروسکوپ کونفوکال انجام گردید. همچنین آنالیز real-time PCR برای بررسی کمی میزان بیان فاکتور رونویسی POU5F1 استفاده شد.

یافته‌ها: در حالی که در آنالیز ایمنوهیستوشیمیایی، بیان بالای فاکتور رونویسی POU5F1 در بیضه‌ی نوزاد مشاهده شد، تعداد سلول‌های POU5F1 مثبت در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ی بالغ بیشتر از نوزاد بود. همینطور تجزیه و تحلیل real-time PCR نشان داد که میزان بیان ژن POU5F1 در SSCهای نوزاد به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بالاتر از SSCهای ۱۶ هفته‌ای بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل می‌تواند پایه ابعاد جدیدی در ارتباط فاکتورهای اپی‌ژنتیکی با قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی را آشکار سازد که باید در پژوهش‌های تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سلول‌های اسپرم مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بیضه؛ لوله‌های اسپرم‌ساز؛ سلول‌های زایا؛ فاکتور رونویسی؛ POU5F1

ارجاع: مهدی‌نژاد روشن مهدی، ارجمند پردیس، عزیزی حسین. **ارتباط بیان فاکتور رونویسی POU5F1 با افزایش سن به عنوان یک عامل اپی‌ژنتیکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۱): ۹۷۰-۹۶۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (Spermatogonial stem cell SSCs) گروهی از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزنیافته هستند که به عنوان سلول‌های آغاز کننده‌ی اسپرماتوژنز، وظیفه‌ی انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی را دارد (۱). این دسته از سلول‌های بنیادی همانند سایر سلول‌های بنیادی، توانایی خود ترمیمی (Self-renewal) و همینطور تمایز به سایر سلول‌ها را داشته که منجر به ایفای نقش در انجام صحیح مراحل اسپرماتوژنز و متعاقباً پتانسیل تولید مثلی جنس مذکر در پستانداران را می‌شود (۲). سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز شامل دو گروه‌اند؛ گروه اول که عموماً با نام گونوسیت (Oocytes) شناخته می‌شوند در واقع همان سلول‌های جنسی اولیه در مراحل اسپرماتوژنز هستند که از مرکز لوله‌ی اسپرم‌ساز به بخش اپی‌تلیوم آن مهاجرت کرده و به گروه دوم یعنی اسپرماتوگونیای تمایز نیافته، تبدیل می‌شوند؛ اسپرماتوگونیای تمایز نیافته معمولاً در ناحیه‌ی پایه‌ای یا بازال لوله‌ی اسپرم‌ساز یافت می‌شود و طی مراحلی به اسپرماتوگونیای تمایز یافته، تبدیل می‌شوند (۳، ٤).

اشتقاق سلول‌های بنیادی به سایر سلول‌ها به فاکتورهای متفاوتی بستگی دارد؛ از جمله‌ی این فاکتورها، ژن‌های مؤثر در فرایند تمایز می‌باشد، بیان ژن نیز مرتبط با مسائل اپی‌ژنتیکی بوده که بدون تردید، سن از جمله‌ی این مسائل است (۵). در مطالعات گذشته نشان داده

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد جهرم، جهرم، استان فارس، ایران

۳- دانشیار، دانشکده‌ی بیوتکنولوژی، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، آمل ۴۹۷۶۷، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین عزیزی: دانشیار، دانشکده‌ی بیوتکنولوژی، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، آمل ۴۹۷۶۷، ایران

Email: h.zizi@ausmt.ac.ir

شد که اشتقاق سلول‌های بنیادی شبه جنینی (Es-like) از SSCها با فاکتور سن مرتبط می‌باشد. همینطور نشان داده شده است که بیان ژن‌های مهمی که در تنظیم پرتوانی نقش دارند مانند Nanog و Sox2، در زمان تبدیل SSCهای بالغ به سلول‌های شبه جنینی با افزایش سن رابطه‌ی معکوس دارد (٦، ٧).

فاکتور رونویسی POU5F1 که با عنوان oct4 نیز شناخته می‌شود، توسط سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال بیان می شود که در تنظیم و حفظ پرتوانی و بقای سلول نقش دارد (٨). Martí و همکاران نشان داده‌اند که POU5F1 دارای دو ایزوفرم POU5F1A و POU5F1B است (٩). بر خلاف POU5F1A، ایزوفرم POU5F1B مربوط به پرتوانی سلول بنیادی نیست و به نظر می‌رسد با پاسخ استرس سلولی مرتبط می‌باشد (١٠، ١١). همینطور محل اصلی سلولی دو ایزوفرم POU5F1A و POU5F1B متفاوت است. POU5F1A در هسته قرار دارد، در حالی که POU5F1B عمدتاً در سیتوپلاسم بیان می‌شود (١٢). با توجه به اهمیت ثابت شده‌ی این فاکتور در تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بررسی ارتباط این فاکتور با عوامل اپی‌ژنتیکی دیگری مانند سن می‌تواند به افزایش درک ما نسبت به توان تولید مثلی مردان و در نتیجه مطالعات پیشرفته آتی در حوزه‌ی بیولوژی تولید مثل شود. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی ارتباط میزان بیان فاکتور مهم رونویسی POU5F1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سن و ارائه‌ی الگوهای بیانی این فاکتور در لوله‌ی اسپرم‌ساز بیشه موش می‌باشد.

روش‌ها

هضم آنزیمی بافت بیضه: تمام آزمایشات حیوانی توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه فناوری‌های نوین آمل تأیید شد (ir.ausmt.rec.1400.03). بیضه‌ی مدل‌های بیولوژیک بعد از جداسازی از موش‌های نوزاد دو هفته‌ای و بالغ ١٦ هفته‌ای، در محلول نمکی بافر فسفات یا (PBS; phosphate-buffered saline ,Invitrogen CO,USA) قرار داده شده و پس از آن لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه از کپسول بیضه جدا شده و به قطعات کوچکتر تقسیم شدند. بافت خرد شده به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد در محلول بافری HBSS ، به همراه آنزیم‌های هضم کننده‌ی کلاژناز تیپ IV ٠/٥ میلی‌گرم /میلی‌لیتر، DNase (٠/٥ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و دیسپاز (٠/٨ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) قرار داده شدند. عملکرد آنزیم‌های هضم‌کننده در سرم جنین گاوی یا FBS ١٠ درصد متوقف شده و سپس محلول حاصل برای بدست آوردن سوسپانسیون تک سلولی به آرامی پیپتاژ شدند. بعد از سانتریفیوژ و حذف محلول بالایی نمونه‌ها با محلول DMEM/F12 شسته شده وپس از عبور از فیلتر نایلونی ٧٠ میکرونی به مدت ١٠ دقیقه با دور ١٥٠٠ rpm سانترفیوژ شدند. محلول رویی حذف و سلول‌های باقی مانده، در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونیا کشت داده شدند.

محیط کشت سلول‌های اسپرماتوگونیا: سلول‌های جدا شده در محیط کشتی شامل، stempro-34medium، 1 درصد مکمل (Invitrogen, USA) N2، 1 درصد L-گلوتامین (PAA,USA)، ٥ میکروگرم/میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (Sigma Aldrich, USA)، ٦ میلی‌گرم/ لیتر-D گلوکز (Sigma Aldrich, USA)، ١ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (PAA,USA)، 1 درصد آمینواسیدهای غیرضروری (PAA,USA)، ٢٠ نانوگرم/میلی‌لیتر (Sigma Aldrich, USA) EGF، ١٠ نانوگرم/میلی‌لیتر (Sigma Aldrich, USA) FGF، ٦٠ نانوگرم/ میلی‌لیتر پروژسترون (Sigma Aldrich, USA)، 1 درصد ویتامین‌های (PAA, USA) MEM، ٠/١ درصد β-mercaptoethanol (Invitrogen, USA)، ١٠٠ واحد/میلی‌لیتر LIF (Millpore, USA)، ٨ نانوگرم/میلی‌لیتر (Sigma Aldrich, USA) GDNF، ١٠٠ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ٣٠ میکروگرم/میلی‌لیتر پیرورویک اسید (Sigma Aldrich, USA)، ١ میکرولیتر/میلی‌لیتر لاکتیک‌اسید (DL-Sigma Aldrich, USA) و ٣٠ نانوگرم/میلی‌لیتر استرادیول (Sigma Aldrich, USA) کشت داده شدند. لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی STO به صورت تجاری خریداری شدند و در محیط کشت DMEM حاوی ١٠ درصد و دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد و ٥ درصد CO2، کشت داده شدند. در آخر با اشعه‌ی گاما (γ-irradiation) و یا Mitomycin C (١٠ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، تقسیم سلول‌های STO متوقف شدند.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی: پس از فیکس شدن بافت با paraformaldehyde ٤ درصد، بافت‌ها با FBS و Tween20، شستشو داده شدند. برای نفوذپذیری یا permeabilized بافت از Triton ١ درصد حل شده در PBS، استفاده و به مدت ٢٤ ساعت با آنتی‌بادی‌های اولیه، انکوبه شدند. برای آنتی‌بادی‌های ثانویه‌ی نشاندار نیز همین مراحل تکرار شدند. از DAPI (٠/٢ میکروگرم/میلی‌لیتر)، برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده شد و سپس سلول‌ها با Poly vinyl alcohol فیکس شدند. برای بررسی سلول‌های نشاندار شده از میکروسکوپ فلورسنس (Olympus,BX51, Japan) و کونفوکال (Zeiss LSM 700) استفاده شد.

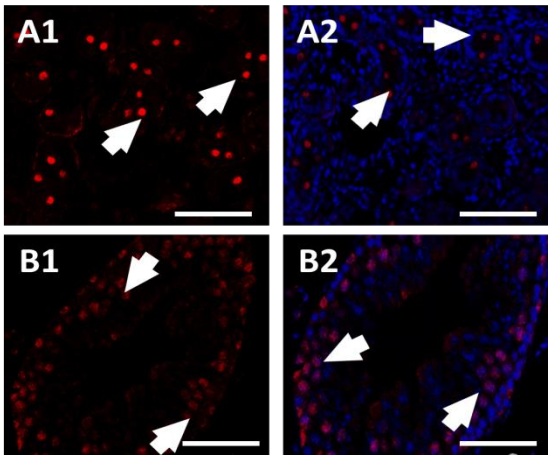
آنالیز Real-time PCR: مقدار بیان ژن POU5F1 در سلول‌های بیضه‌ی موش‌های نوزاد و بالغ مورد سنجش قرار گرفت. گلیسرآلدهید-٣-فسفات دهیدروژناز به عنوان یک ژن خانه‌دار برای استانداردسازی استفاده شد. سلول‌های بیضه با میکروکنترلر انتخاب

شدند، با محلول بافر لایز حاوی ۱/۳ میکرولیتر بافر TE، ۹ میکرولیتر RT-PreAmp master Mix، ۰/۲ میکرولیتر RT-Taq Superscript و ۲/۵ میکرولیتر Pool assay*0.2 (Invitrogen, USA). سلول‌ها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی Ct توسط نرم‌افزار GenEx انجام و از تجزیه و تحلیل MultiD استفاده شد.

برای تمامی آزمایش‌ها سه تکرار در نظر گرفته شده و برای تحلیل داده‌های خام به‌دست‌آمده در بخش‌های مختلف آزمایشی بنا به نیاز از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ (IBM Corporation, version 25, Armonk, NY) استفاده شد. میانگین بیان ژن در تمامی گروه‌ها به وسیله آزمون t-student محاسبه و به وسیله‌ی آزمون Wilcoxon، Mann-Whitney مقایسه شد. معنی‌داری تفاوت میان گروه‌ها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

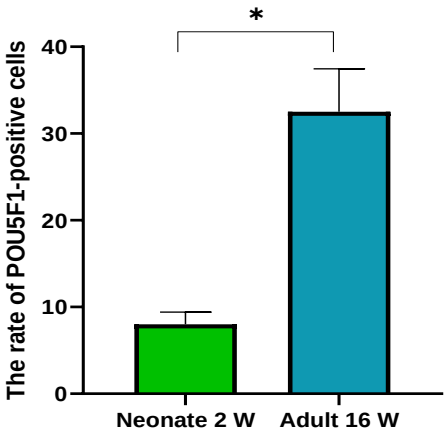
یافته‌ها

آنالیز با میکروسکوپ کانفوکال، شدت بیان بالای POU5F1-GFP را در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ی موش نوزاد مشخص کرد. مقایسه‌ی بیان POU5F1-GFP در لوله های اسپرم‌ساز بیضه‌ی موش نوزاد با بیضه‌ی موش بالغ به وضوح بیان بسیار بیشتر POU5F1 را در بیضه‌ی موش دو هفته‌ای نسبت به موش‌های ۱۶ هفته‌ای نشان داد. بعلاوه، آنالیز ایمونوهیستوشیمی بیان هسته‌ای و سیتوپلاسمی POU5F1 را در سلول‌های بنیادی جنسی نوزاد که در لومن لوله اسپرم‌ساز هستند نشان می‌دهد که پس از مهاجرت و استقرار در بخش بازال لوله‌ی اسپرم‌ساز در موش بالغ بیان متفاوت را نشان می‌دهد (شکل ۱).



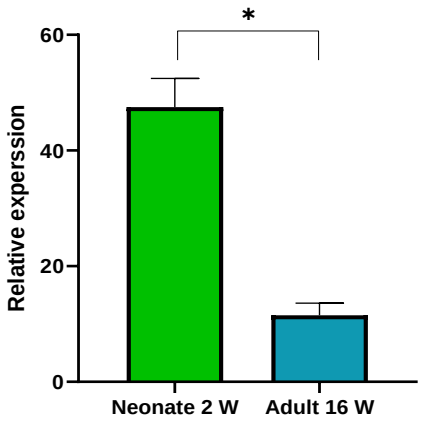
شکل ۱. آنالیز ایمنوهیستوشیمی بیان POU5F1 در بیضه‌ی موش بالغ و نوزاد. بیان POU5F1 در لوله‌ی اسپرم‌ساز موش نوزاد ۲ هفته‌ای (A1)، تصویر همپوشان با DAPI (A2). بیان POU5F1 در لوله‌ی اسپرم‌ساز موش بالغ ۱۶ هفته‌ای (B1)، تصویر همپوشان با DAPI (B2). (Scale bar = ۱۵ µm)

شمارش سلول‌های بیان‌کننده‌ی POU5F1 نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه‌ی موش نوزاد و بالغ است به طوری‌که تعداد سلول‌های POU5F1 مثبت در موش بالغ بیشتر از نوزاد است (شکل ۲).



شکل ۲. شمارش سلول‌های POU5F1 مثبت در لوله‌ی اسپرم‌ساز موش نوزاد و بالغ ($P < ۰/۰۵$)

همینطور تجزیه و تحلیل real-time PCR نشان داد که بیان ژن POU5F1 در SSCهای نوزاد به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بالاتر از SSCهای ۱۶ هفته‌ای بود (شکل ۳).



شکل ۳. آنالیز Real-time PCR Fluidigm برای بیان POU5F1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد و بالغ. تفاوت معنی‌داری در بیان POU5F1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد ۲ هفته‌ای در مقایسه با موش بالغ ۱۶ هفته‌ای ($P < ۰/۰۵$) حاصل شد. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شده است ($P < ۰/۰۵$).

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال گروهی از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایزنیافته هستند که به عنوان سلول‌های آغازکننده‌ی اسپرماتوژنز، وظیفه‌ی انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی را دارد. تنظیم تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال مستقیماً توسط گروهی از فاکتورهای رونویسی انجام می‌گیرد. از جمله‌ی این فاکتورهای رونویس، فاکتور رونویسی POU5F1 است که با عنوان oct4 نیز شناخته می‌شود. ما در مطالعه‌ی حاضر، بیان POU5F1 را در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ی نوزاد و بالغ در بیضه‌ی موش ارائه کردیم. نتایج نشان داد اگرچه سلول‌های زایای نوزاد به طور قابل‌توجهی POU5F1 را نسبت به سلول‌های زایای بالغ بیشتر بیان می‌کنند، اما تعداد سلول‌های POU5F1 مثبت در بیضه بالغ بیشتر از برش‌های بیضه نوزاد است و همچنین بیان POU5F1 در طی تمایز SSCs به سلول‌های اسپرم کاهش می‌یابد. این نتایج با تجزیه و تحلیل Real-Time PCR Fluidigm که نشان داد، میزان بیان ژن POU5F1 در SSCهای نوزادی بالاتر از SSCهای ۱۶ هفته است، تأیید شد بیان POU5F1 عمدتاً دارای موقعیت هسته‌ای در سلول‌های زایای تمایز نیافته مانند PGCs، گنوسیت ها و اسپرماتوگونی است (۱۳، ۱۴). همینطور میکروسکوپ کانفوکال تراکم پایین سلول‌های POU5F1 مثبت را در لوله‌های اسپرم‌ساز موش نوزاد نسبت به بالغ نشان داد که این تفاوت تراکم سلول‌های POU5F1 مثبت ممکن است با مهاجرت جمعیت سلولی اسپرماتوگونی تمایز نیافته اولیه به جایگاه صحیح خود در بیضه با توجه به افزایش سن مرتبط باشد. با توجه به یافته‌های سندیپ گوئل و همکاران، بیان نشانگرهای پرتوان در رده‌ی زایا به مرحله‌ی تمایزی و همچنین به سن گونه بستگی دارد (۱۵، ۱۶).

مطالعه‌ی خود را با بیان POU5F1 در بافت بیضه را با روش ایمونوهیستوشیمی شروع کردیم، که به وضوح مشخص شد که بیان POU5F1 در بیضه‌ی موش نوزاد در مرکز لوله‌های اسپرم‌ساز و در موش‌های بالغ در غشای پایه بیضه بوده و در طی مهاجرت کاهش می‌یابد. مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که در طی تمایز اولیه، POU5F1 در ESCهای پرتوان، بلاستومرها و در توده‌ی سلولی داخلی بلاستوسیست بیان می شود و پس از گاسترولاسیون، POU5F1 در تروفکتودرم و اندودرم اولیه کاهش می‌یابد اما در PGCها حفظ می‌شود (۱۷-۲۰). PGCها بیان POU5F1 را تا زمان شروع اسپرم زایی در مردان حفظ می کنند بنابراین، کاهش POU5F1 یک مرحله‌ی اساسی در تمایز طی فرایند اسپرم‌زایی است.

POU5F1A یک فاکتور رونویسی است که وضعیت بنیادی و پرتوانی سلول‌های ES را حفظ می‌کند (۲۱). دو گونه از ژن POU5F1 شامل POU5F1A و POU5F1B در سلول‌های موش شناسایی شد. POU5F1A تنظیم‌کننده‌ی اصلی سلول‌های بنیادی پرتوان است، در حالی که سه ایزوفرم POU5F1B شامل POU5F1B-247aa، POU5F1B-190aa، و POU5F1B-164aa در سلول‌های سوماتیک موش ایجاد می‌شوند و به طور کلی POU5F1B عمدتاً در سیتوپلاسم سلول‌های غیر پرتوان قرار دارد، که نمی‌تواند خود نوسازی سلول‌های ES را بروز دهد و در سلول‌های بنیادی غیر پرتوان کاهش می یابد، اما ممکن است به استرس سلولی پاسخ دهد (۱۰، ۲۲، ۲۳).

نتیجه‌گیری

در راستای بررسی ارتباط بیان فاکتور رونویسی POU5F1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با فاکتور اپی‌ژنتیکی سن، مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی ما طبق انتظار، مکان بیانی متفاوتی را در لوله‌ی اسپرم‌ساز بیضه‌ی موش نوزاد و بالغ نشان داد؛ اما نتیجه‌ی قابل توجه مطالعه‌ی حاضر کاهش بیان POU5F1 در بیضه‌ی موش‌های بالغ نسبت به موش نوزاد بوده که می‌تواند بیانگر رابطه‌ی معکوس افزایش سن با پیشروی مراحل تمایزی و تکاملی بیضه باشد. نتایج حاصل می‌تواند در افزایش درک و دانش از مکانیسم مولکولی و سلولی روند اسپرماتوژنز سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی در دانشگاه دانشگاه فناوری‌های نوین آمل به شماره‌ی ۲۳۷۴۱ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات این مرکز تقدیر و تشکر می‌شود. پروژه حاضر نتیجه‌ی گروهی از پروژه‌های دوران کارشناسی دانشجویان نویسنده مقاله نیز می‌باشد.

References

1. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. Am J Stem Cells 2014; 3(2): 74-82.
2. Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells†. Biol Reprod 2018; 99(1): 52-74.
3. Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells. Cell J 2020; 22(1): 60-5.
4. Azizi H, Ghasemi Hamidabadi H, Skutella T. Differential proliferation effects after short-term cultivation of mouse spermatogonial stem cells on different feeder layers. Cell J 2019; 21(2): 186-93.

5. 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 2020; 22(2): 171-7.
6. Azizi H, Asgari B, Skutella T. Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis. Cell J 2019; 21(3): 281-9.
7. Azizi H, Conrad S, Hinz U, Asgari B, Nanus D, Peterziel H, et al. Derivation of pluripotent cells from mouse SSCs seems to be age dependent. Stem Cells Int 2016; 2016: 8216312.
8. Malik V, Glaser LV, Zimmer D, Velychko S, Weng M, Holzner M, et al. Pluripotency reprogramming by competent and incompetent POU factors uncovers temporal dependency for Oct4 and Sox2. Nat Commun 2019; 10(1): 3477.
9. Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. Nat Protoc 2013; 8(2): 223-53.
10. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. Stem Cells 2010; 28(5): 885-93.
11. Liu L, Huang R, Yang R, Wei X. OCT4B1 regulates the cellular stress response of human dental pulp cells with inflammation. Biomed Res Int 2017; 2017: 2756891.
12. Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. Stem Cells 2006; 24(12): 2685-91.
13. Zheng Y, Phillips LJ, Hartman R, An J, Dann CT. Ectopic POU5F1 in the male germ lineage disrupts differentiation and spermatogenesis in mice. Reproduction 2016; 152(4): 363-77.
14. Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, et al. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. Dev Biol 2003; 258(1): 209-25.
15. Sohni A, Tan K, Song HW, Burow D, de Rooij DG, Laurent L, et al. The neonatal and adult human testis defined at the single-cell level. Cell Rep 2019; 26(6): 1501-17.e4.
16. Goel S, Fujihara M, Minami N, Yamada M, Imai H. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. Reproduction 2008; 135(6): 785-95.
17. Payne CJ. Cycling to and from a stem cell niche: the temporal and spatial odyssey of mitotic male germ cells. Int J Dev Biol 2013; 57(2-4): 169-77.
18. Yang M, Deng B, Geng L, Li L, Wu X. Pluripotency factor NANOG promotes germ cell maintenance in vitro without triggering dedifferentiation of spermatogonial stem cells. Theriogenology 2020; 148: 68-75.
19. Li YQ. Networks of transcription factors for Oct4 expression in mice. DNA Cell Biol 2017; 36(9): 725-36.
20. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: control of totipotency and germline determination. Mol Reprod Dev 2000; 55(4): 452-7.
21. 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(11): 2928-37.
22. Mehravar M, Ghaemimanesh F, Poursani EM. An overview on the complexity of OCT4: at the level of DNA, RNA and protein. Stem Cell Rev Rep 2021; 17(4): 1121-36.
23. Sneha S, Nagare RP, Manasa P, Vasudevan S, Shabna A, Ganesan TS. Analysis of human stem cell transcription factors. Cell Reprogram 2019; 21(4): 171-80.

DOI: *10.48305/jims.v41.i741.0965*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 741, 1st Week, January 2024**

Received: 07.09.2023 Accepted: 05.12.2023 Published: 28.12.2023

The Relationship between POU5F1 Transcription Factor Expression and Age Increasing as an Epigenetic Factor

Mehdi Mehdinezhad Roshan[1,3], Pardis Arjmand[2], Hossein Azizi[3]

Original Article

Abstract

Background: The purpose of this study is to investigate the relationship between the expression level of the important transcription factor POU5F1 in spermatogonial stem cells with age and to present the expression patterns of this factor in the mouse spermatogenic tube.

Methods: In the present study, spermatogonial stem cells were isolated after extracting the testicles of two-week-old and sixteen-week-old adult mice purchased from the Pasteur Institute of Iran. The cells were cultured in a StemPro-34 medium containing specific growth factors. Also, after fixing and preparing the tissue, they were incubated with primary and secondary antibodies, and an immunohistochemical examination was done with a confocal microscope. Then, real-time PCR analysis was used to quantitatively investigate the expression of the POU5F1 transcription factor.

Findings: While in the immunohistochemical analysis, high expression of the POU5F1 transcription factor was observed in the infant's testis, the number of POU5F1 positive cells in the seminiferous tubules of the adult testis was higher than that of the infant. Also, real-time PCR analysis showed that the level of POU5F1 gene expression in newborn SSCs was significantly ($P < 0.05$) higher than 16-week-old SSCs.

Conclusion: The results can reveal the foundation of new dimensions in the relationship between epigenetic factors and the differentiation power of stem cells, which should be considered in research on the differentiation of spermatogonial stem cells into sperm cells.

Keywords: Testis; Seminiferous tubules; Germ cells; Transcription factor; POU5F1

Citation: Mehdinezhad Roshan M, Arjmand P, Azizi H. **The Relationship between POU5F1 Transcription Factor Expression and Age Increasing as an Epigenetic Factor.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(741): 965-70.

1- MSc Student, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- MSc Student of Genetics, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies 49767, Amol, Iran
Corresponding Author: Hossein Azizi, Associate Professor, Department of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies 49767, Amol, Iran; Email: h.zizi@ausmt.ac.ir