

In Vitro Production of Germ Cells from Stem Cells: Hypes and Hopes

Pirouz M., M.Sc., Valadbeigy T., M.Sc., Shahverdi A., Ph.D., Baharvand H., Ph.D.*

** Department of stem cells, Cell Science Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Several lines of evidence have reported that mouse ESCs can successfully differentiate into primordial germ cells (PGCs) as well as into mature male and female gametes. Human ESCs and adult stem cells (ASCs) can also differentiate into PGCs. Differentiation of ESCs into germ cells of various stages seems to be a spontaneous and quick process, probably due to the nature of ESCs themselves and the microenvironment of the culture conditions that favor this process. Although the functionality of these ESC-derived gametes remains to be established, derivation of both male and female gametes from ESCs raises the possibility of using these gametes to gain a better understanding of basic reproductive biology and, in particular, in conjunction with nuclear transfer technology, to extend the potential for therapeutic cloning and the treatment of infertility.

Key words: Stem Cells, Germ Cells, Sperm, Oocyte

تولید آزمایشگاهی سلول‌های زاینده از سلول‌های بنیادی: امیدها و چالش‌ها

مهدی پیروز ^{M.Sc.}، طاهره ولدبیگی ^{M.Sc.}، عبدالحسین شاهرودی ^{Ph.D.}، حسین بهاروند ^{Ph.D.}،**

* گروه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشکده رویان، تهران، ایران

** گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

تاریخ وصول: تیرماه ۸۷، تاریخ پذیرش: شهریورماه ۸۷

چکیده

یافته‌های اخیر نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی جنینی (ES: Embryonic Stem Cells) موشی می‌توانند در موجود زنده و نیز در شرایط آزمایشگاهی با موفقیت به سلول‌های زاینده بدوی (PGCs: Primordial Germ Cells) و گامت‌های نر و ماده بالغ تمایز یابند. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نیز می‌توانند به PGC ها تمایز یابند. همچنین به‌تازگی نشان داده شده است که انواع سلول‌های بنیادی بزرگسال نیز تا حدودی این قابلیت را از خود نشان می‌دهند. ظاهراً تمایز سلول‌های ES به مراحل مختلف سلول‌های زاینده فرآیندی خودبخودی و سریع است که می‌تواند ناشی از ماهیت خود سلول‌های ES یا شرایط ریز محیط کشت باشد که به نفع این فرایند است. اگر چه عملکرد داشتن این گامت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی باید مورد تأیید قرار گیرد اما این موفقیت‌ها می‌تواند به درک بهتر اساس زیست‌شناسی تولید مثل و به‌ویژه با تلفیق با فن‌آوری انتقال هسته به شبیه‌سازی درمانی و درمان ناباروری کمک کند.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی، سلول‌های زاینده، اسپرم، تخمک

مقدمه

سلول‌های نادری هستند که در پستانداران، در همان مراحل اولیه تکوین جنینی از سلول‌های رویشی کنار گذاشته می‌شوند و تحت شرایط خاصی تکوین پیدا می‌کنند. این سلول‌ها اگر چه در حفظ حیات فرد تأثیر چندانی ندارند اما برای بقای گونه اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند؛ در حقیقت این سلول‌ها حلقه اتصال نسل‌های متمادی‌اند. همانند سلول‌های رویشی، سلول‌های زاینده نیز از الگوهای کلی مشترکی برای تکوین بهره می‌برند؛ با این حال رخداد های تکوینی منحصر به فردی نیز در روند تخصصی شدن سلول‌های زاینده مشاهده می‌شود. برای مثال این سلول‌ها تنها سلول‌هایی از بدن هستند که می‌توانند علاوه بر تقسیم میتوز، متحمل تقسیم میوز شده و همچنین می‌توانند به لحاظ تئوری، به‌طور نامحدودی در

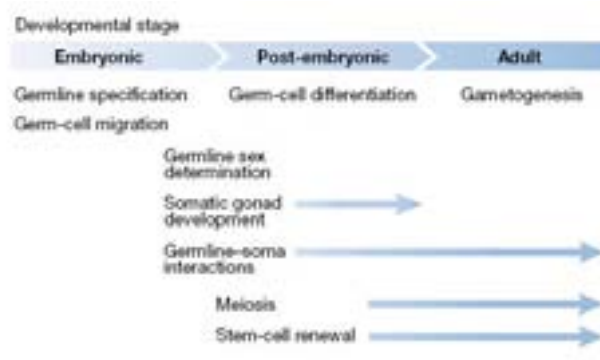
با نگاهی به مطالعات گذشته، توانایی سلول‌های بنیادی جنینی انسان و موش برای تمایز خودبخودی به سلول‌های زاینده در محیط آزمایشگاهی بدیهی به نظر می‌رسد؛ نظر به این که سلول‌های بنیادی جنینی موشی می‌توانند در دودمان جنسی در موجود زنده دخیل باشند، با این حال شروع خودبخودی و پیشرفت گامت‌زایی پستانداران در محیط آزمایشگاهی کاملاً باور نکردنی است؛ مطالعاتی که به‌طور چشمگیری نگرش محققان نسبت به پتانسیل تمایزی انواع سلول‌های بنیادی جنینی و بزرگسال را تغییر داده است. سلول‌های زاینده

آدرس مکاتبه: تهران، گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده رویان، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

E-mail: baharvand@RoyanInstitute.org

تخصصی شده و سلول‌های زاینده را به وجود آورند و این هنگامی رخ می‌دهد که سلول‌های اپی بلاست دور در مجاورت اکتودرم خارج جنینی قرار گرفته باشند. برعکس، سلول‌های اپی بلاست نزدیک که به نواحی دور پیوند زده می‌شوند، PGC ها را به وجود نمی‌آورند بلکه در عوض جمعیتی از دودمان‌های اکتودرمی را پدید می‌آورند. بنابراین سلول‌های اپی بلاست دارای قابلیت حفظ همه توانی یا تمایز به انواع سلول‌های سوماتیک هستند. تخصصی شدن سلول‌های اپی بلاست به دودمان جنسی، دخالت یک کنام^۷ مشخص در سرنوشت PGC را نشان می‌دهد، درحالی که نسبت به تمایز سوماتیک مقاوم است [۲].

اخیراً پس از این یافته که موش‌های دارای نقص در تولید BMP4^۸، یک عضو از خانواده بزرگ TGF- β ^۹، فنوتیپ فاقد PGC^{۱۰} را نشان می‌دهند، اولین جزء پاراکراین سازنده کنام مخصوص PGC، توصیف شده است [۳]. مطالعات بعدی نقش مسیر پیام‌رسانی BMP در تعیین سرنوشت دودمان جنسی را به شدت تأیید کردند [۴].



شکل ۱. خلاصه‌ای از رخدادهای کلیدی در تکوین دودمان جنسی جانوران. ارتباط ضمنی تقریبی بین این رخدادها و مرحله تقریبی وقوع آنها نسبت به کل تکوین نشان داده شده است. جزئیات تکوین دودمان جنسی بین گونه‌ها و نیز بین جنس‌ها متفاوت است و می‌تواند دقیقاً منطبق بر این نمودار کلی نباشد.

7. Niche

8. Bone Morphogenetic Protein 4

9. Transforming Growth Factor- β

10. PGC-null

نسل‌های متمادی امکان بقا پیدا کنند؛ این سلول‌ها طی تکوین جنینی خود دچار برنامه‌ریزی مجدد^۱ اپی ژنتیکی شده و ژنوم آنها دستخوش تغییرات گسترده اپی ژنتیکی می‌شود.

در این مقاله به اختصار با بررسی آزمایش‌های اخیر که تمایز آزمایشگاهی PGC ها را نشان داده‌اند، قابلیت استفاده از این روش‌ها برای توسعه آگاهی خود از تعهد به تمایز و برنامه‌ریزی مجدد اپی ژنتیک PGC ها مرور می‌شود.

تکوین سلول‌های زاینده بدوی (PGCs) در جنین

اولیه موش

PGC ها در سال ۱۹۵۴ برای اولین بار از نظر مورفولوژیکی شناسایی شدند. اما هنوز درک کاملی از پیام‌های مورد نیاز برای متعهد شدن دودمان جنسی و پیشرفت تکوین آن (شکل ۱) در دست نیست. تکوین PGC در پستانداران و موجودات پست تر که سلول‌های زاینده در آنها به واسطه بخش بندی سیتوپلاسم اووسیت به وجود می‌آیند متفاوت است. PGC های پستانداران در طول گاسترولاسیون اولیه تعیین سرنوشت می‌شوند و ابتدا (در ۷/۲۵ dpc) به صورت حدوداً ۲۰ تا ۶۰ سلول رنگ‌آمیزی شده برای TNAP^۲، در قاعده آلانتوئیس در حال تکوین و درون مزودرم خارج جنینی خلفی مشاهده می‌شوند [۱]. نقشه سرنوشت آنها^۳ نشان داده است که سلول‌های زاینده از اپی بلاست نزدیک^۴ مشتق شده‌اند (شکل ۲A)؛ درحالی که مطالعات پیوند سلولی نشان داده است که پیام‌های نشأت گرفته از اکتودرم خارج جنینی^۵ برای تخصصی شدن PGC ها درون اپی بلاست نزدیک، ضروری هستند. سلول‌های اپی بلاست دور^۶ که به طور طبیعی برای اکتودرم سطحی یا عصبی شدن تعیین سرنوشت می‌شوند نیز می‌توانند

1. Reprogramming

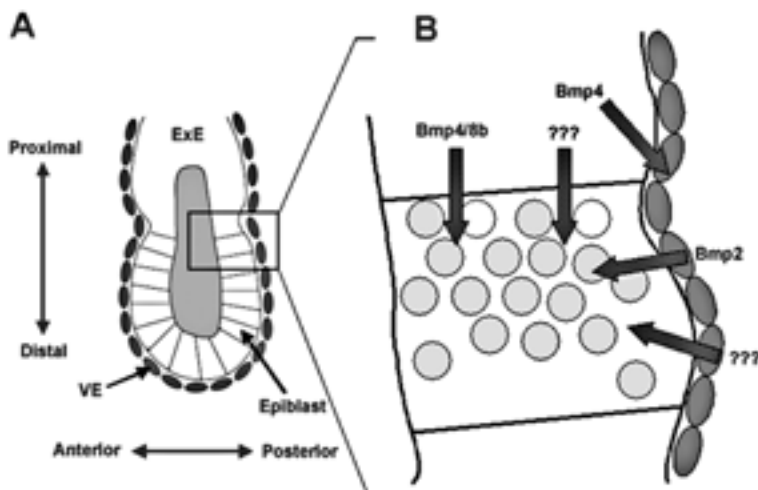
2. Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase

3. Fate mapping

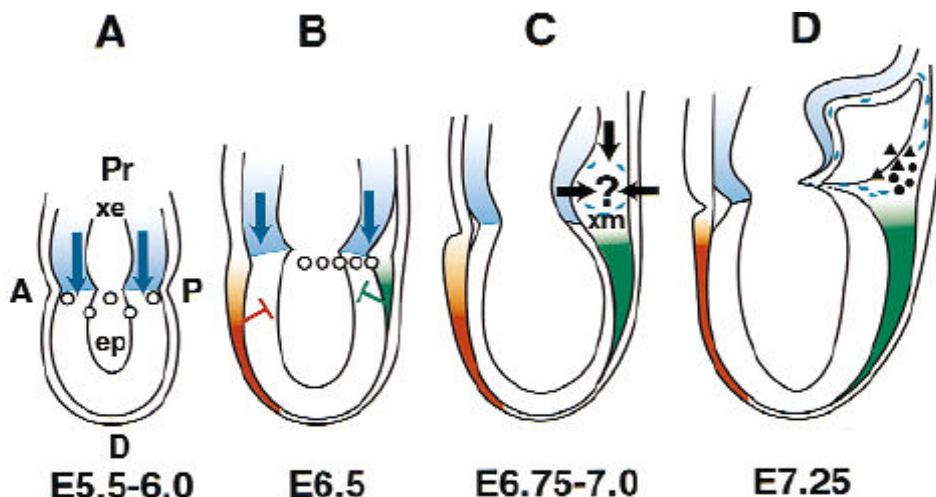
4. Proximal

5. Extraembryonic ectoderm

6. Distal



شکل ۲. پیام‌های تخصصی کننده PGC ها در جنین ۶/۰ روزه. A: یک جنین مرحله پیش از تشکیل شیار اولیه را نشان می‌دهد. از سلول‌های ستونی اپی بلاست حفره توخالی میانی (خاکستری) را مفروش می‌کند و مجاور اکتودرم خارج جنینی (ExE) قرار می‌گیرند. هم اکتودرم خارج جنینی و هم اپی بلاست به وسیله اندودرم احشایی (VE) غلاف می‌شوند. محورهای اصلی جنینی نشان داده شده‌اند. B: سلول‌های اپی بلاست نزدیک می‌توانند به سلول‌های زاینده تخصص یابند. BMP4 و BMP8b از ExE ترشح می‌شوند و برای تکویت سلول‌های زاینده ضروری‌اند. مشخص نیست که آیا این پروتئین‌ها تنها پروتئین‌های ضروری‌اند که از ExE منشأ می‌گیرند. در تخصصی شده PGC ها درگیر است. احتمالاً BMP4 از ExE عمل کرده و موجب ترشح دیگر فاکتورهای القا کننده دودمان جنسی از VE می‌شود. BMP2 از VE ترشح می‌شود اما ممکن است دیگر فاکتورهایی که از VE نشأت می‌گیرند نیز به تخصصی شدن سلول‌های زاینده کمک کنند. Blimp1 تنها در برخی از نزدیک ترین لایه سلول‌های پشتی اپی بلاست بیان می‌شود (سلول‌های سفید). آزمایش‌های تعیین نقشه سرنوشت ثابت کرده‌اند که این سلول‌های Blimp1- مثبت تقریباً به‌طور انحصاری در ساخت دودمان جنسی مشارکت می‌کنند [V] در حالی که دیگر سلول‌های نزدیک (خاکستری) می‌توانند در PGC ها یا مزودرم خارج جنینی شرکت کنند [A].



شکل ۳. مدل دو پیامی تنظیم تخصصی^۱ PGC ها توسط BMP4: A: مرحله پیش از شیار اولیه (preprimitive streak stage) BMP4. به وسیله اکتودرم خارج جنینی (xe) مجاور اپی بلاست نزدیک (ep) تولید می‌شود و شبیهی (فلش‌های آبی) پدید می‌آورد که سلول‌های اپی بلاست نزدیک به آن پاسخ داده و به سمت سرنوشت پیش‌سازهای آلانوتویس/PGC (دایره‌های توخالی) جهت‌دهی می‌شوند. (A) نشان دهنده جلو (Anterior)، (P) نشان دهنده پشت (Posterior)، (Pr) نشان دهنده نزدیک (Proximal) و (D) نشان دهنده دور (Distal) است. B: مرحله ابتدایی شیار اولیه (early primitive streak stage) ساخت BMP4 توسط اکتودرم خارج جنینی ادامه پیدا می‌کند. شیب غلظت BMP4 می‌تواند با حضور آنتاگونیست‌های آن یعنی mCer-1 (رنگ قرمز) در سمت جلویی و فولیستاتین (follistatin) (رنگ سبز) در سمت پشتی تندتر شود. این می‌تواند همچنین بازه زمانی که BMP4 در آن بر اپی بلاست اثر می‌کند را محدود کند. در بین دیگر سلول‌های اپی بلاستی پیش‌سازهای آلانوتویس/PGC هر ۶/۵ تا ۷/۰ ساعت یک بار تقسیم می‌شوند و سلول‌های به‌وجود آمده ردیف می‌شوند و به سمت شیار پشتی شروع به حرکت می‌کنند.

1. Allocation

اولین نسل موش‌های جهش یافته هموزیگوت در تشکیل سلول جنسی بی‌نقص بودند در حالی که نسل دوم موش‌ها در طول تسهیم اولیه مردند. به نظر می‌رسد که stella یک ژن با اثر مادری باشد که یک نشانگر ویژه اما احتمالاً غیرفعال برای سلول‌های PGC اولیه است [۱۱].

سرانجام Blimp1 شناسایی شد که یک گیرنده رونویسی در تمایز نهایی B-cell است و برای تخصصی شدن PGC ضروری است [۱۲]. موش‌هایی که در آن‌ها ژن Blimp1 خاموش شده است کاملاً فاقد PGC های مهاجر هستند و ممکن است به وسیله سرکوب رونویسی ژن‌های ضروری برای القای سرنوشت سلول سوماتیک، مانند اعضای خانواده ژن هومئوباکس، عمل کنند. سلول‌های بیان کننده Blimp1 در اوایل ۶/۲۵ dpc فقط در اولین لایه سلولی اپی بلاست نزدیک خلفی مشاهده شده است که نشان می‌دهد تماس مستقیم با اکتودرم خارج جنینی برای القای آن ضروری است [۱۳]. با ردیابی دودمان، معلوم شد که تقریباً تمام سلول‌های اپی بلاست بیان کننده Blimp1، بیان نشانگرهای PGC، TNAP و Stella را ادامه می‌دهند [۱۴]. در حال حاضر Blimp1 اولین و تخصصی‌ترین نشانگر شناخته شده برای سلول‌های پیش ساز PGC است [۱۵].

این یافته‌ها موجب توسعه قابل توجهی در دانش شناخت مولکولی PGC ها می‌شود. با این حال چندین سؤال بی‌پاسخ مانده است. برای مثال ماهیت سیگنال‌های القاء کننده‌ای که بیان Blimp1 را به نزدیکترین لایه اپی‌بلاستی و تنها یک سری از سلول‌های بیان کننده fragilis، محدود می‌کند چیست؟ آیا نشانگرهای دیگری وجود دارند که همراه با Blimp1 یا قبل از آن بیان شوند و پیش سازهای PGC را بیشتر توصیف نمایند؟ همچنین سری کامل ژن‌های مورد هدف Blimp1 برای اثر بر تخصصی شدن PGC چه هستند؟

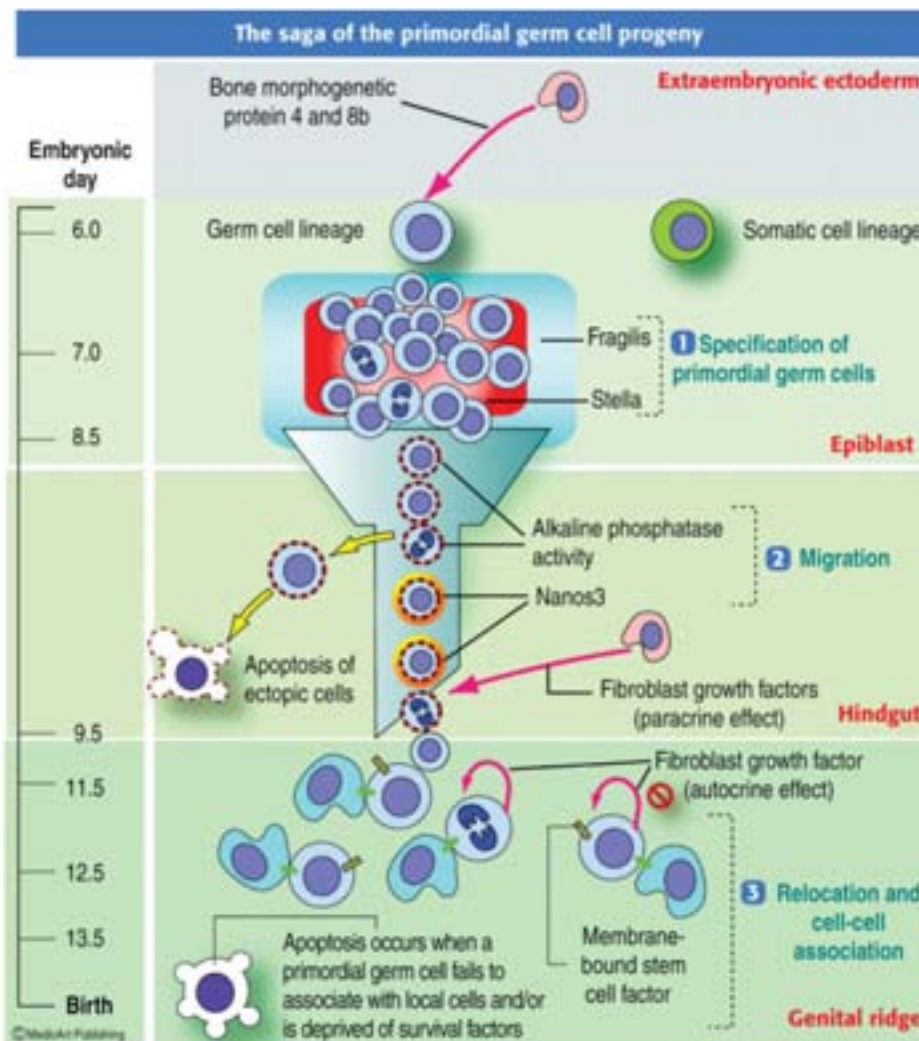
بیان fragilis در PGC های مهاجر افزایش می‌یابد (شکل ۴) و موجب القای بیان سایر ژن‌های اختصاصی سلول‌های زاینده مانند stella (که به‌عنوان DPPa3 و PFC7 نیز شناخته می‌شود)

BMP4 و BMP8b به طور سینرژیک^۱ عمل می‌کنند و از اکتودرم خارج جنینی ترشح می‌شوند و موجب تخصصی شدن PGC ها می‌شوند [۵] (شکل‌های ۲ و ۳). BMP2 یک پروتئین بسیار همولوگ با BMP4، از اندودرم احشایی^۲ (VE) خلفی بیان می‌شود و بر تمایز PGC اثر می‌گذارد؛ سرانجام موش‌های دارای نقص در smad4، smad6 یا smad5 (که همگی پایین دست فعالیت BMP4 هستند) تعداد کمی PGC دارند یا به‌طور کلی تکوین PGC را از دست می‌دهند [۶].

یک نتیجه منطقی از طرح‌های مذکور این است که سلول‌هایی که برای PGC شدن مستعدند حتی قبل از اینکه آن‌ها در طول گاسترولاسیون کاملاً متعهد به ایجاد رده جنسی شوند. باید در سطح مولکولی از دیگر انواع سلول قابل تشخیص باشند. موفقیت‌های جدید در توصیف ویژگی‌های متمایز PGC ها وجود داشته است. یک گروه محقق با استفاده از کالبد شکافی تک سلول، ازدیاد RT-PCR و غربال افتراقی cDNA، دو نشانگر جدید تکوین PGC اولیه، Stella و Fragilis را کشف کردند [۹]. Fragilis (mil-1, Ifitm3) یک عضو از خانواده تراغشایی قابل القا با اینترفرون است (Ifitm). اگر چه اعمال حقیقی fragilis هنوز نامشخص است اما ممکن است در اتصال^۳ همتای^۴ سلول به سلول PGC ها (که موجب تفکیک آن‌ها از بافت احاطه کننده می‌شود) دخالت نماید. دخالت خانواده Ifitm در تکوین PGC به الگوی بیان آن‌ها بستگی دارد [۱۰].

Stella یک پروتئین هسته ای با عملکرد نامعلوم است که در مجموعه‌ای از سلول‌های fragilis⁺ بیان شده است و به نظر می‌رسد که به‌طور اختصاصی آن سلول‌ها را برای تبدیل شدن به رده جنسی علامت گذاری می‌کند. با این حال، نقش stella نیز مانند fragilis، در تکوین PGC نامشخص است، به طوری که

1. Synergic
2. Visceral endoderm
3. Adhesion
4. Homotypic

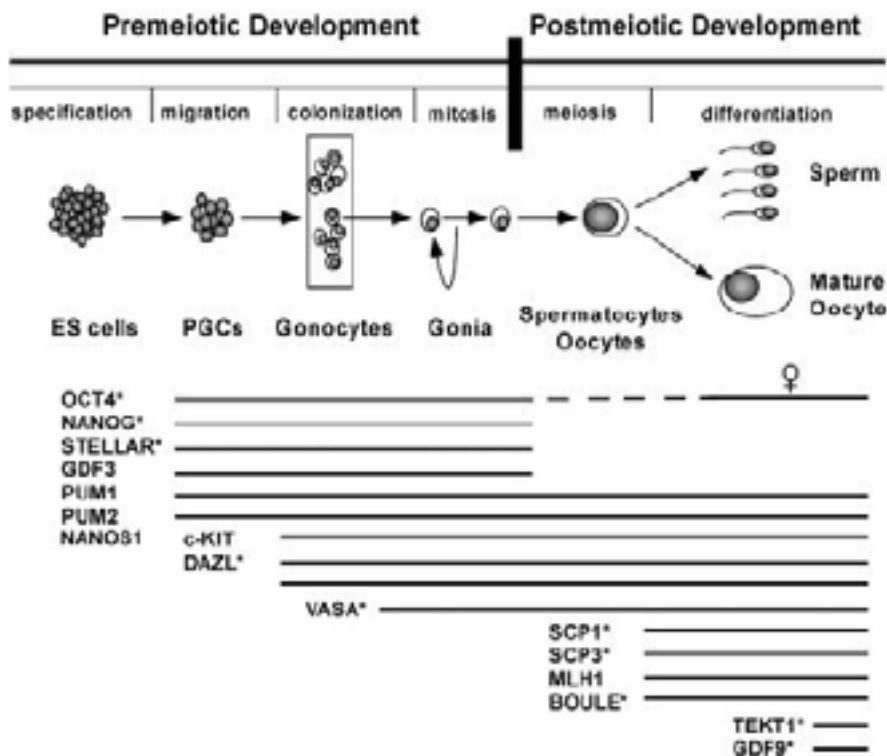


شکل ۴. الگوی زمانی بیان ژن‌های ضروری برای تخصصی شدن، مهاجرت از لوله گوارش پستی و قرارگیری در برآمدگی تناسلی PGC های موشی. تخصصی شدن زمانی رخ می‌دهد که دو ژن *frangilis* و *stella* در محلی بیان می‌شوند که دسته‌ای متشکل از حدود ۴۵ PGC قرار گرفته است. با آغاز مهاجرت این سلول‌ها ژن *nanos3* منجر به تسهیل بقای جمعیت PGC های مهاجر می‌شود [۱۶]. FGF هایی که از توسط سلول‌های سوماتیک مسیر مهاجرت تولید می‌شوند تکثیر PGC ها را تحریک می‌کنند (اثر پاراکرین). PGC های نابجا که فرار می‌کنند یا که در مسیر جا می‌مانند از طریق آپاپتوز از بین می‌روند. با رسیدن به برآمدگی تناسلی، PGC ها احتمالاً به‌واسطه مکانیسم‌های مرتبط با ایتنگرین‌ها و ADAM ها (یک دسینتگرین و متالوپروتئیناز) با سلول‌های سوماتیک ارتباط برقرار می‌کنند. در این زمان FGF به‌وسیله PGC ها بیان می‌شود که رشد سلولی (اثر اوتوکرین) را در حضور فاکتور سلول بنیادی (SCF) محلول و غیاب فاکتور سلول بنیادی (SCF) متصل به غشا تحریک می‌کند [۱۷]. حضور فاکتور سلول بنیادی (SCF) متصل به غشا اثری بازدارنده برای رشد اعمال می‌کند [۱۸]. هنگامی که ارتباطات سلول-سلول و پشتیبانی «فاکتورهای بقا» کارآمد نباشد آپاپتوز رخ می‌دهد [۱۹].

VASA که توسط سلول‌های سوماتیک برآمدگی تناسلی القا می‌شود [۲۰]. جهش در ژن *mhv* منجر به نقص در تکثیر و تمایز PGC ها می‌شود. مطالعات برش‌های سریال بافتی، نشان می‌دهد که در جنین‌های انسانی در حال تکوین نیز مهاجرت رخ می‌دهد و با رسیدن PGC ها به برآمدگی‌های گنادی در هفته ششم بارداری، بیان مجدد همولوگ VASA ی انسانی

و همولوگ موشی VASA (mvh) می‌شود. VASA که تا تشکیل سلول‌های زاینده پس میوزی^۲ باقی می‌ماند یک پروتئین سیتوپلاسمی است (محصول ژن همولوگ (mvh)

1. Mouse vasa homolog
2. Postmeiotic germ cell



شکل ۵. نمای بیان ژن‌های لازم برای مراحل مختلف تمایز سلول‌های زاینده در تکوین جنینی و بزرگسالی. الگوی بیانی مورد انتظار برای پیش‌گویی مرحله‌ای که تکوین سلول‌های زاینده در آن قرار دارد با نام آن ژن و نوار سیاهی که تا سمت راست آن کشیده شده است. سلول‌های زاینده نسبت به سلول‌های سوماتیک از تمامی ژن‌های نشان داده شده غنی‌اند. ژن‌هایی که پس از گاسترولاسیون در موجود زنده تنها در سلول‌های زاینده بیان می‌شوند با ستاره مشخص شده‌اند [۲۳].

گنادی ظاهر می‌شود.

اعضای خانواده ژنی حذف شده در آزوسپرمیا (DAZ)^۱ منحصراً در سلول‌های زاینده بیان می‌شوند [۲۴]. پروتئین ژن DAZL که یکی از این اعضاء است [۲۵] در بیشتر حیات سلول‌های زاینده بیان می‌شود و برای تکوین PGC ها و برای تمایز و بلوغ سلول‌های زاینده از PGC ها لازم است. همچنین معلوم شده است که PGC ها دارای سطح بالایی از فعالیت آلکالین فسفاتاز غیراختصاصی بافت هستند. با این حال معلوم نیست که آیا این فعالیت برای حیات این سلول‌ها لازم است یا خیر. سایر نشانگرهای PGC ها شامل آنتی‌ژن جنینی ۱ ویژه مرحله (SSEA1)^۲ و فاکتور رونویسی oct34 است. PGC ها تنها سلول‌هایی هستند که پس از گاسترولاسیون oct3/4 را بیان می‌کنند؛ گاسترولاسیون در فنوتیپ پرتوانی آن‌ها نقش دارد.

در هفته هفتم بارداری اتفاق می‌افتد. اگر چه mvh برای بقای PGC های موشی لازم است، اما عملکرد VASA در تکوین انسان ناشناخته است [۲۱]. با این حال بیان VASA در موجود زنده و در شرایط آزمایشگاهی، نشانگری انحصاری برای نشان دادن تعهد برگشت ناپذیر سلول‌ها به دودمان زاینده است (شکل ۵).

سایر ژن‌هایی که در PGC ها و سلول‌های زاینده شناسایی شده‌اند متعلق به خانواده *mili*, *piwi* و *miwi* هستند [۲۲] که تولید PGC و اسپرماتوزن را تنظیم می‌نمایند. دو ژن *mil2/mil1* که شباهت‌هایی را با ژن پروتئین تراغشایی القا پذیر با اینترفرون انسانی نشان می‌دهند نیز در PGC ها پذیر با اینترفرون شده است. *Mil* به طور مداوم در تمایز PGC ها تقریباً در روزهای ۶/۵-۷/۵ بیان می‌شود و بیان *mil2* در طول تمایز نیز حدوداً در روزهای ۹/۵-۱۳ dpc در PGC های

1. Deleted in AZoospermia
2. Stage Specific Embryonic Antigen 1

جنینی انسانی و موشی می‌توانند سلول‌های پیش‌ساز جنسی را در شرایط آزمایشگاهی به‌وجود آورند. از آنجایی که سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پیش‌ساز جنسی، نشانگرهای ژنتیکی تکوینی مشترک بسیاری را بیان می‌کنند، برای بررسی تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز جنسی و تمیز دادن این دو نوع سلول از یکدیگر محدودیت‌های فراوانی وجود دارد. از این‌رو به جای آنکه مستقیماً این مطالعات و نتایج آن‌ها ذکر شود، در ابتدا استراتژی‌های خاصی که محققان بدین منظور در پیش گرفتند با نگاه تحلیلی بررسی می‌شود.

راهکارهایی برای شناسایی PGC های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی

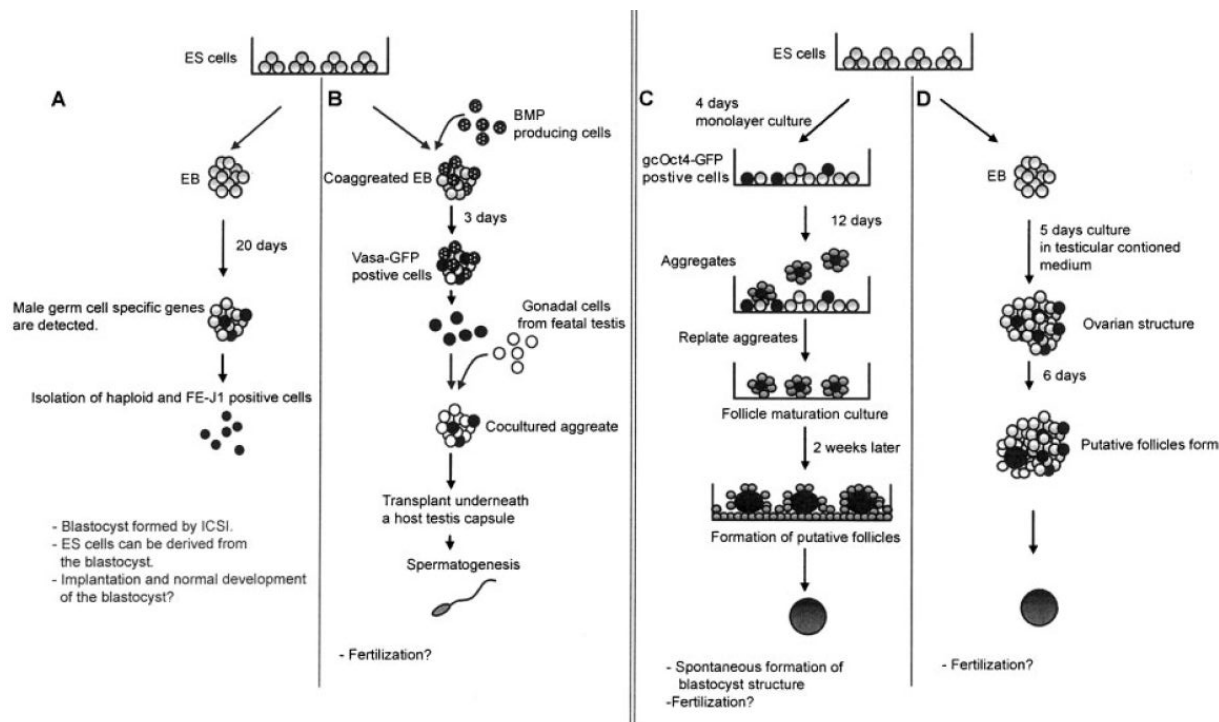
آشکار سازی تشکیل PGC ها از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی، به‌واسطه بیان همزمان چندین گیرنده سطح سلولی و فاکتورهای رونویسی از قبیل oct4، بسیار پیچیده شده است [۳۲]. با وجود این محدودیت، می‌توان برای آشکارسازی تشکیل PGC در شرایط آزمایشگاهی، از بیان چندین نشانگر دیگر (از قبیل آلکالین فسفاتاز غیرتخصصی بافت (TNAP) [۳۳]، Stella و fragilis که نشان دهنده آغاز تعهدمندی و قابلیت سلول جنسی در اپی‌بلاست است) استفاده کرد. همچنین درک مسیرهای پیام رسانی مولکولی موردنیاز برای تشکیل PGC در موجود زنده ضروری است تا به عنوان ابزاری در ارزیابی اینکه آیا این فرایندهای تکوینی در شرایط آزمایشگاهی صادقانه مرور شده‌اند یا خیر، استفاده شود. کشف ژن همولوگ vasa (mvh) در موش که منحصراً توسط سلول‌های متعهد برای دودمان جنسی بیان می‌شود [۳۴] یک نشانگر قطعی برای تمییز PGC ها از سلول‌های بنیادی جنینی در کشت را فراهم کرده است.

رسیدن PGC ها به برآمدگی تناسلی موجب تکثیر سایر سلول‌های مزانشیمی و اپیتلیالی برای تشکیل گنادهای تمایز نیافته‌ای می‌شود که متشکل از ۲ جزء است: جزء اول سلول‌های اپیتلیال شامل PGC اند و جزء دیگر یک بخش استرومال است که دارای رگ‌های خونی و فیبروبلاست است. در حدود روز 12-12.5dpc مورفولوژی گنادهای نر و ماده قابل تشخیص می‌شود. اگر چه تعداد کمی از ژن‌هایی که در هر دو گنادهای نر و ماده ظاهر می‌شوند به ایجاد گنادهای تمایز جنسی اختصاص دارند اما ژن sry که روی کروموزوم Y قرار دارد مورد توجه دانشمندان است [۲۶]. مسیر دقیقی که به‌وسیله آن sry روی تمایز گنادهای نر تأثیر می‌گذارد نامشخص است و احتمالاً نتیجه بیان ژن و برهمکنش‌های سلولی است. به دنبال تعیین نوع جنس، سلول‌های جنسی نر وارد مرحله استراحت میتوزی می‌شوند و تا بعد از تولد در آن باقی می‌مانند. سلول‌های جنسی ماده وارد پروفاز میوزی می‌شوند. اخیراً ژن *stra8* به‌عنوان یک نشانگر مولکولی مرحله اولیه در تمایز سلول‌های زاینده ماده شناسایی شده است. بیان این ژن در سلول‌های زاینده گنادهای XX افزایش می‌یابد. این امر با افزایش بیان ژن میوزی *Dmc1* و کاهش بیان ژن oct3/4 همراه است.

تمایز PGC ها در شرایط آزمایشگاهی:

روش‌های جدید برای حل مشکلات قدیمی

مطالعات پیشگام کارن هابنر (Hubner) و همکارانش برای اولین بار نشان داد که سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی PGC ها را به‌وجود آورند [۲۷]. سایر گروه‌های تحقیقاتی (شکل ۶)، نیز این نتایج هیجان‌انگیز را تأیید و تفسیر کردند. در اینجا روی بررسی راه‌های تمایز PGC در شرایط آزمایشگاهی تمرکز می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که هر دو نوع سلول‌های بنیادی



شکل ۶. نمایش شماتیک نحوه به دست آوردن گامت‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی (ESC). به دست آوردن اسپرم: A: تمایز خودبخودی سلول‌های زاینده از سلول‌های ES در اجسام شبه جنینی (EBs) مشاهده شد [۲۸]. سلول‌های هاپلوئید و FE-J1 مثبت از EB های حدوداً ۲۰ روزه جدا شدند که می‌توانستند اووسیت را بارور نموده و منجر به تکوین به بلاستوسیست شوند. B: سلول‌های vasa مثبت با تشکیل EB از طریق هم‌کشتی با سلول‌های ترشح کننده BMP4 القا شدند [۲۹]. پس از ۳ روز کشت سلول‌های vasa مثبت با سلول‌های گنادی بیضه جنینی هم کشت شدند تا اجتماعی تشکیل دهند؛ این اجتماعات سلولی به زیر کپسول بیضه میزبان پیوند زده شدند تا اسپرماتوژنز در آن‌ها القا شود. C: به دست آوردن اووسیت؛ پس از ۴ روز در کشت تک لایه سلول‌های ES، سلول‌های مثبت برای GFP ی بیان شده از پروموتور Oct4 مختص سلول‌های زاینده (gcOct4-GFP) تشخیص داده شدند [۲۷]؛ ۱۲ روز بعد اجتماعات سلولی معلق جمع آوری شدند و در محیط بلوغ فولیکولی کشت داده شدند که منجر به تشکیل اووسیت‌های فرضی شد. وقتی این اووسیت‌ها بیشتر کشت داده شدند تشکیل خودبخودی بلاستوسیست حاصل شد. قابلیت اووسیت‌ها برای لقاح هنوز باید مورد بررسی قرار گیرد. D: هنگامی که EB ها در محیط شرطی حاصل از سلول‌های بیضه‌ای کشت داده شدند ساختارهای تخمدانی تشکیل شدند [۳۰]. پس از ۱۱ روز کشت، فولیکول‌های فرضی در لبه EB ها مشاهده شدند و نشانگرهای ویژه اووسیت در اووسیت‌ها شناسایی شدند [۳۱].

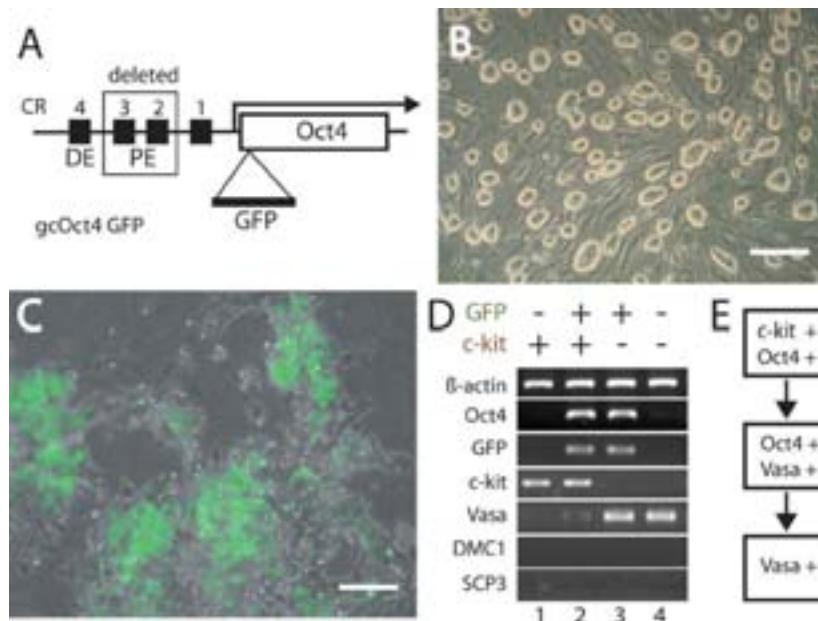
oct4 ذاتی^۱ به عنوان یک نشانگر تکوین PGC در شرایط آزمایشگاهی با مشکل روبرو شده است. دو ترنس ژن گزارشگر oct4 اولیه ساخته شده است [۳۵].

این ترنس ژن‌ها یا با استفاده از یک قطعه oct4 ژنومی ۱۸ کیلو بازی شامل عناصر تنظیمی فرادست ژن oct4 موشی ساخته شده‌اند یا با استفاده از بخشی از عنصر نزدیک حذف شده طراحی شده‌اند (شکل ۷A). از این ترنس ژن‌های گزارشگر

بیان افتراقی ترنس ژن‌های oct4 در سلول‌های بنیادی جنینی، اپی بلاست و PGC ها

PGC های اولیه را می‌توان به واسطه بیان تمایزی ترنس ژن‌های oct4 که حاوی عناصر تنظیمی ویژه سلول‌های زاینده هستند از سلول‌های اپی بلاست و سلول‌های بنیادی جنینی همه توان تمیز داد. همانند فعالیت آلکالین فسفاتاز، به واسطه بیان در سلول‌های بنیادی جنینی و اپی بلاست، استفاده از ژن

1. Endogenous



شکل ۷. نمای شماتیک ژن گزارشگر Oct4 (gcOct4-GFP) شامل ۴ توالی حفاظت شده (CR1-4) در ناحیه تنظیمی ۵' ناحیه حذف شده داخل کادر قرار داده شده است (A). ناحیه حفاظت شده با دو جزء تنظیمی همپوشانی دارد: اینهنسر دور (DE؛ مختص سلول‌های زاینده) و اینهنسر نزدیک (PE؛ مختص اپی بلاست). B: تصویر کلونی‌های سلول‌های ES آلوده شده با gcOct4-GFP. C: تصویر تلفیق شده میکروسکوپ فلئورسانت و فازکتر است سلول‌های ES ترنس ژن که در غیاب سلول‌های تغذیه کننده به مدت ۷ روز (d7) کشت شده‌اند. D: آنالیز بیان ژنی در ۴ جمعیت سلولی مجزا که با استفاده از روش FACS برای دو نشانگر GFP و c-kit [۳۹] از هم تفکیک شده‌اند. (E) بر اساس آنالیز بیان ژنی می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های بنیادی در ابتدا سلول‌های بیان کننده GFP و c-kit اند؛ با آغاز تمایز، سلول‌ها تبدیل به جمعیتی از سلول‌ها می‌شوند که به طور همزمان Oct4 و vasa را بیان می‌کنند؛ در ادامه سلول‌ها بیان Oct4 را سرکوب کرده و تنها vasa را بیان می‌کنند [۲۷].

با مقایسه توالی‌های پروموتری فرادست ارتولوگ‌های oct4 انسانی، موشی و گاوی، چهار ناحیه حفاظت شده یکسان در عناصر دور و نزدیک شناسایی شده است [۳۷]. دو ناحیه اول که درون توالی نزدیک یافت می‌شوند برای بیان در سلول‌های همه توان اپی بلاست مورد نیازند. توالی دور نیز برای بیان در سلول‌های زاینده مورد نیاز است و نواحی حفاظت شده ۳ و ۴ را در خود دارد. با حذف ناحیه حفاظت شده ۳، فعالیت در سلول‌های همه توان جنین‌ها به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [۳۲]؛ این مسأله موجب شد که این ترنس ژن جدید سلول جنسی (gcOct4-eGFP) نشانگر بهتری برای شناسایی PGC‌های تولید شده در کشت به حساب بیاید. این ترنس ژن oct4-eGFP در شرایط آزمایشگاهی به منظور تسهیل شناسایی تکوین PGC از سلول‌های بنیادی جنینی پرمات‌های غیرانسانی و انسانی استفاده می‌شود [۳۸].

برای پیش بردن بیان ژن گزارشگر پروتئین فلورسانس سبز تشدید شده (eGFP) استفاده می‌شود. در موش ترنس ژن، فعالیت گزارشگر، الگوی بیان oct4 ذاتی را در سرتاسر تکوین جنینی منعکس می‌کند [۳۶] در حالی که سیگنال eGFP در اپی بلاست موش کم شده است. با این حال هر دو ترنس ژن در PGC و نیز در سلول‌های بنیادی جنینی بیان شده‌اند. تعیین خصوصیات پروموتری oct4 در چندین گونه که تکوین یک ترنس ژن ویژه دیگر از سلول‌های زاینده را تسهیل کرده است، یک وسیله ارزشمند برای مطالعه تکوین PGC از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی را فراهم نموده است [۲۷].

1. enhanced Green Fleourescent Protein

بیان پیوسته آلكالین فسفاتاز در طول گزینش

یک روش ساده و مناسب برای شناسایی PGC های فرضی آلكالین مثبت (AP^+) به دست آمده در EB ها گزارش شده است. این روش به واسطه یک مرحله پس از گزینش انجام می‌شود. پس از جدا کردن EB های ۷ روزه، سلول‌های تکی شده به مدت یک هفته دیگر روی یک لایه تغذیه کننده MEF، با حذف LIF و در حضور رتینوئیک اسید کشت داده شدند. رتینوئیک اسید تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی به دودمان‌های سلولی مزودرمی و اکتودرمی را القا می‌کند در حالی که موجب تکثیر PGC ها در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. هر سلول بنیادی جنینی که در EB های ۷ روزه، به صورت تمایز نیافته باقی مانده باشد در طول هفته دوم گزینش با رتینوئیک اسید تمایز می‌یابد. سلول‌های AP^+ زنده در این کشت تک لایه ثانویه، از نظر مورفولوژیکی شبیه PGC های مهاجر هستند و الیگوساکارید سطح سلولی 3-Fucosyl lacto amine (قابل تشخیص توسط آنتی بادی SSEA-1) را نیز بیان می‌کنند که هم در PGC های ۹/۵ روز پس از لقاح (9.5dpc) و هم در سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته دیده می‌شود. اگرچه فقدان یک نشانگر ویژه PGC تفسیر این نتایج را محدود می‌سازد، شناسایی متعاقب و جداسازی سلول‌های زاینده هاپلوئید نر در EB های بدون گزینش رتینوئیک اسید، قطعاً تشکیل PGC ها درون EB ها را تأیید می‌کند [۲۸].

آشکار سازی نشانگرهای پس مهاجرتی PGC ها

بیان mvh برای نشان دادن تعهد دودمان جنسی PGC های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی و تفکیک سلول‌های زاینده به منظور سنجش پیوند عملکردی بعدی استفاده شده است. دودمان‌های سلول‌های بنیادی جنینی که دارای ژن‌های گزارشگر mvh-lacz یا mvh-eGFP درج شده^۱ هستند، برای

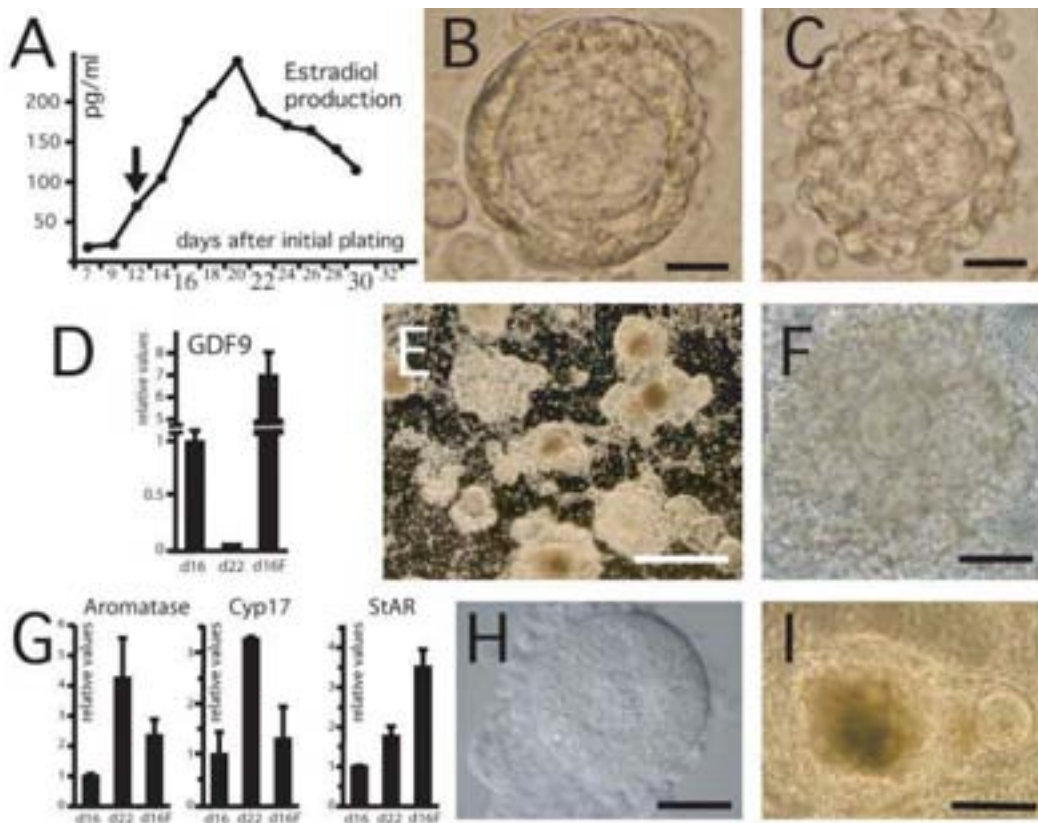
آشکار سازی PGC های مرحله آخر به دست آمده از EB ها تولید شده‌اند؛ این نشانگرهای ترنس ژنی نه تنها برای مطالعه گامت‌زایی پس از تمایز EB ها مورد استفاده قرار می‌گیرند بلکه برای تخلیص PGC های mvh^+ (القا شده به صورت آزمایشگاهی) به وسیله فلوسایتومتری نیز به کار می‌روند. سپس PGC های فرضی جدا شده همراه با سلول‌های استرومایی گناد جنینی مجتمع شده و به درون بیضه فرد گیرنده پیوند زده می‌شوند تا سلول‌ها مستقیماً وارد اسپرم‌زایی شوند. بدون توجه به روش‌های مختلف مورد استفاده برای آشکار سازی و حمایت گامت‌زایی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، هر سه این سیستم‌ها به تشکیل PGC های اولیه در کشت بستگی دارد [۲۹].

تولید اووسیت و اسپرم از سلول‌های بنیادی جنینی

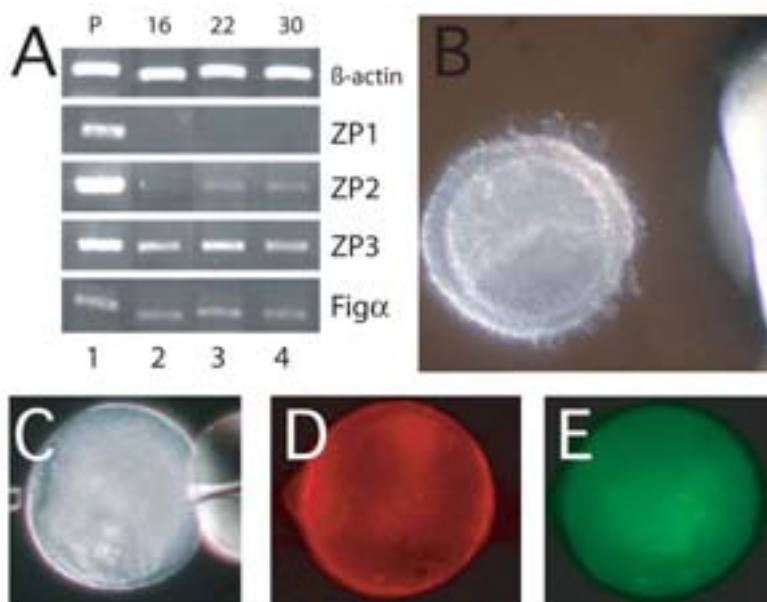
همان طور که در شکل ۶ آمده است هابنر (Hubner) و همکاران [۲۷] برای نخستین بار با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی موشی ترنس ژن خاص و پی گیری تمایز این سلول‌ها در کشت تک لایه موفق به تمایز آن‌ها به ساختارهایی شبیه به اووسیت شدند (شکل ۷). آن‌ها در ادامه کشت و با تفکیک سلول‌ها بر اساس بیان GFP و c-kit به ۴ جمعیت سلولی دست یافتند (شکل ۷D) و مطابق با آن روندی را برای تمایز سلول‌ها در کشت خود مطرح نمودند (شکل ۷E).

با بررسی میزان استرادیول موجود در محیط کشت مشخص شد با ادامه روند تمایز در کشت تک لایه، این میزان افزایش می‌یابد (شکل ۸A). همچنین ساختارهای فولیکولی (شکل ۸B و ۸C)، ویژگی‌های سلول‌های اووسیتی (شکل ۸D و ۸G) و به خصوص ساختارهایی با مورفولوژی شبیه به اووسیت در حال hatching نیز در کشت مشاهده شد (شکل ۸I). این سلول‌ها از لحاظ نشانگرهای اووسیتی و نیز داشتن زونا بررسی شدند (شکل ۹).

1. knock in



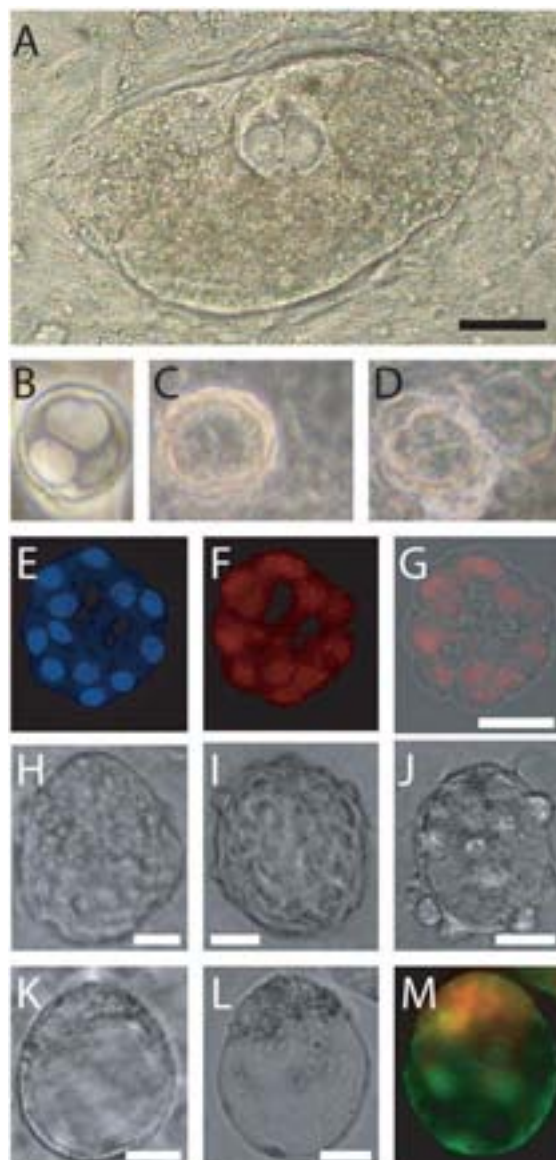
شکل ۸. تشکیل ساختارهای شبه فولیکولی. A: سطح استرادیول محیطی بین روزهای ۷ تا ۳۴ کشت بر حسب pg/ml و B و C: تصاویر شاخص فاز کنتراست ساختارهای فولیکولی اولیه/ ثانویه. D: آنالیز RT-PCR کمی بیان GDF9 در روزهای ۱۶ (d16) و ۲۲ (d22) و در روز ۱۶ کشت‌های replate شده (d16F). E، F و H نشان دهنده ساختارهای شبه فولیکولی مشاهده شده در کشت با بزرگنمایی‌های مختلف است. G آنالیز RT-PCR کمی بیان آروماتاز، StAR و Cyp17 در روزهای ۱۶ (d16) و ۲۲ (d22) و در روز ۱۶ کشت‌های replate شده (d16F). H: یک کشت چسبنده؛ I: تصویر فاز کنتراست سلول شبه اووسیت رها شده در روز ۲۶ کشت [۲۷].



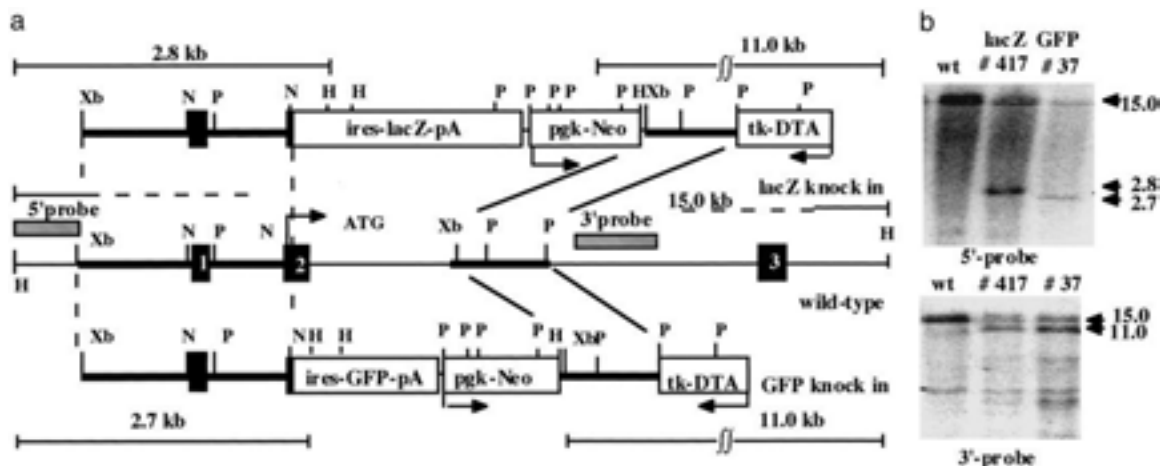
شکل ۹. تعیین ویژگی‌های اووسیت. A: آنالیز بیان نشانگرهای اووسیتی در زمان‌های مختلف کشت. B: تصویر فاز کنتراست یک سلول کوچک شبه اووسیت که با پپیت (سمت راست) نگه داشته شده است. C: تصویر فاز کنتراست یک سلول شبه اووسیت رشد کرده که در دو طرف آن پپیت (سمت راست) و سوزن (سمت چپ) برای مقایسه اندازه قرار داده شده است. D و E: عکس‌های فلئورسانت همان سلول شبه اووسیت به ترتیب برای GFP و آنتی‌بادی ZP2 [۲۷].

با ادامه تمایز، جنین‌های دو، سه و چند سلولی و همچنین ساختارهای شبه بلاستوسیستی نیز در کشت پدیدار شد (شکل ۱۰). به نظر می‌رسد این جنین‌ها ناشی از تکوین پارتنوژنی اووسیت‌های به‌وجود آمده در کشت باشند.

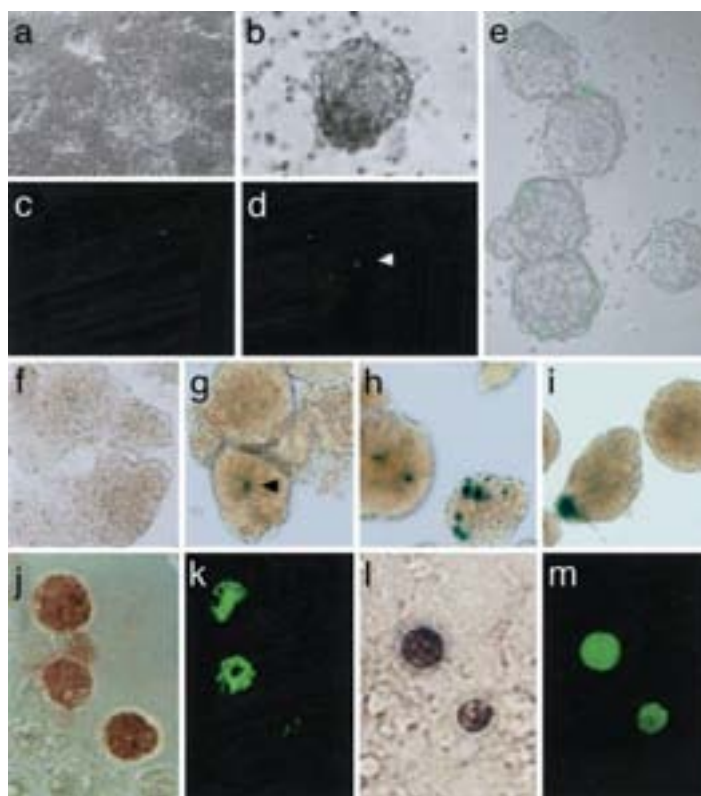
اولین گزارش از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به اسپرم توسط تویوکا (Toyooka) و همکاران [۲۹] منتشر شد. این گروه با استناد به اینکه پروتئین BMP4 نقش بسیار حائز اهمیتی در آغاز تکوین جنینی PGC ها ایفا می‌کند سلول‌های بنیادی جنینی موشی را با سلول‌هایی که با دستکاری ژنتیکی آن‌ها را وادار به ساخت و ترشح BMP4 نموده بودند مخلوط کرده و اجسام شبه جنینی تشکیل دادند. سلول‌های بنیادی جنینی که آن‌ها استفاده کردند نیز حاوی ژن گزارشگر بود؛ گزارشگر (lacZ یا GFP) تحت پروموتور mvh (همولوگ موشی vasa) بیان می‌شد (شکل ۱۱) و بدین ترتیب تنها در نشان دهنده تمایز سلول‌های زاینده پیش میوزی بود. اجسام جنینی شکل گرفته در روزهای سوم، پنجم و هفتم مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۱۲). تویوکا (Toyooka) و همکاران سلول‌های بنیادی جنینی را به مدت ۲۴ ساعت با سلول‌های ترشح کننده BMP4 هم‌کشت نمودند (تشکیل EB) که در این حالت ۲/۹ درصد از سلول‌ها vasa- مثبت شدند. پس از تفکیک این سلول‌ها با سلول‌های گرفته شده از بیضه جنینی به نسبت ۱ به ۴ به مدت ۱۶ ساعت مخلوط شدند و سپس اجتماع سلولی شکل گرفته به زیر کپسول بیضه موش گیرنده پیوند زده شد. ۵ تا ۶ هفته بعد بیضه گیرنده مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۱۳)؛ لوله‌های سمینفروس شکل گرفته بودند و گامتوژنز در آن‌ها مشاهده می‌شد. مطالعات ایمنوسیتوشیمی نشان داد که سلول‌های موجود در پیوند نشانگرهای سلول‌های زاینده را بیان می‌کنند (شکل ۱۴A)؛ همچنین آنالیز DNA نشان داد که اسپرم‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده بودند نه از میزبان (شکل ۱۴B)؛ اسپرم‌های به‌وجود آمده هم مورفولوژی طبیعی داشتند (شکل ۱۴B).



شکل ۱۰. ویژگی‌های جنین پیش از لانه‌گزینی. جنین‌های شبه مرحله تسهیم و ساختارهای شبه بلاستوسیستی حوالی روز ۴۳ کشت نشان داده شده است. A: یک جنین مرحله دو سلولی درون ساختار شبه فولیکولی رشد کرده. B: یک جنین مرحله سه سلولی شناور. C و D: یک جنین چسبیده پس از ۲۴ ساعت؛ به زوناپلوسیدای جدا شده در D توجه کنید. (E-G) یک جنین ۱۶ سلولی با رنگ‌آمیزی DNA (آبی در G) یا واکنش دهنده با آنتی بادی Oct4 (قرمز در F)؛ G: تلفیق E و F؛ H: جنین شبه بلاستوسیست با اتصالات سلول-سلول کمتر. I و J: بلاستوسیستی فاقد لایه سطح خارجی تروف اکتودرم؛ در عوض هسته‌ها بیرون زده‌اند. توجه داشته باشید که این ساختار در جنین‌های طبیعی، در صورتی که زونا پیش از تسهیم جنینی برداشته شود نیز یافت می‌شود. K و L: دو بلاستوسیست که از لحاظ مورفولوژیکی از بلاستوسیست‌های طبیعی غیرقابل تشخیص‌اند. جای‌گیری ایمنوسیتوشیمی Troma-1 در لایه‌های سلولی خارجی و پروتئین Oct4 در سلول‌های داخلی تر ساختار شبه بلاستوسیستی که همانند بلاستوسیست‌های طبیعی به صورت نامتقارن توزیع شده‌اند [۲۷].

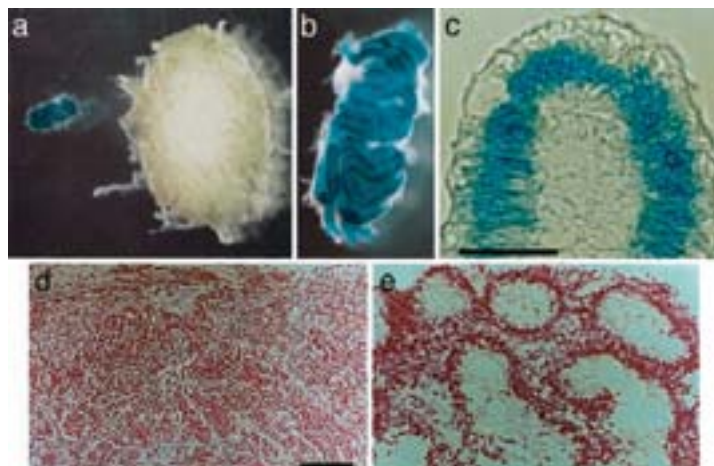


شکل ۱۱. ژن هدف جایگزین شده *Mvh*. a: سازمان بندی ژنومی جایگاه *Mvh* و ساختار وکتور هدف استفاده شده برای جایگزینی ناحیه 3.0 kb حاوی جایگاه آغاز ترجمه به همراه IRES-lacZ یا IRES-GFP و *pgk-Neo*. پروب های استفاده شده برای ساترن بلات با نوارهای هاشور خورده نشان داده شده اند. b. ساترن بلات های DNA ژنومی هضم شده با *HindIII* از کلون های ES. جایگاه های وحشی، *LacZ* knock-in و *GFP* knock-in. به ترتیب با پروب 5' باندهای 15.0، 2.8، 2.7 و با پروب 3' باندهای 11.0، 11.1، 15.0 و با پروب 3' باندهای 11.0 kb ایجاد می کنند. *HindIII*، *H*؛ *BamHI*، *B*؛ *XbaI*، *Xb*؛ *PstI*، *P*؛ *NotI*، *N* [۲۹].

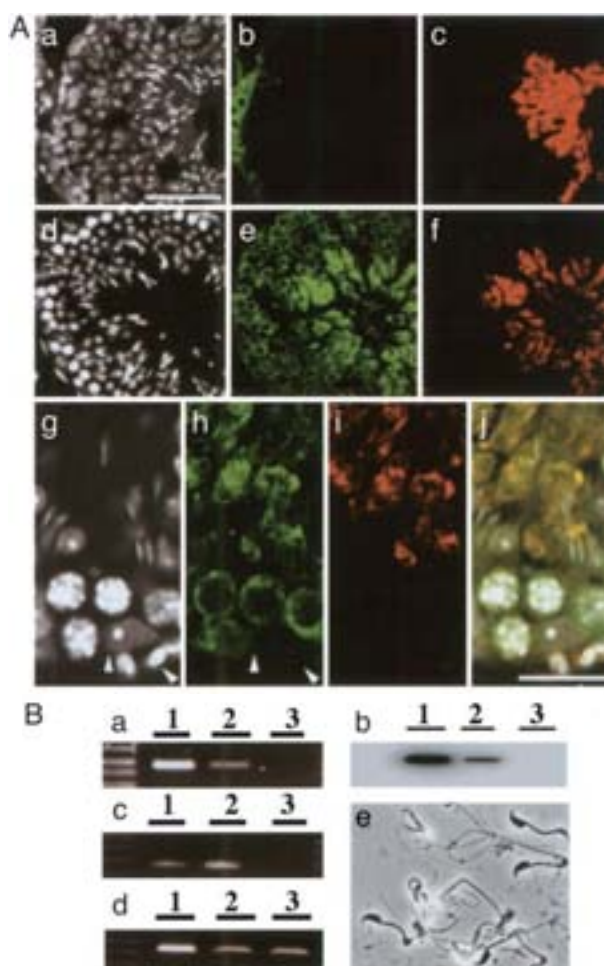


شکل ۱۲. تمایز آزمایشگاهی EB ها از سلول های ES knock-in. تصاویر فازکتراسست (a و b) و فلئورسانت (c و d) سلول های ES knock-in در حالت تمایز نیافته (a و c) و EB سه روزه (b و d؛ فلش، یک سلول GFP-مثبت را نشان می دهد). e: منظره هم کانون^۱ تلفیق شده تصاویر میکروسکوپ فازکتراسست و فلئورسانت از EB های ۵ روزه. رنگ آمیزی ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندول بتا-د-گالاکتوزید (X-Gal) سلول های *LacZ*-knock in-ES در وضعیت تمایز نیافته (f)، EB سه روزه (g؛ فلش سلول آبی بیان کننده *LacZ* را نشان می دهد)، EB های ۵ روزه (h) و EB های ۷ روزه (i). سلول های *LacZ*-مثبت تا حدی از EB های ۵ روزه خالص شدند و با آنتی-MVH رنگ آمیزی شدند تا بیان *MVH* درون زاد مشخص شود (j و l). سلول های نسبتاً خالص شده به صورت دوگانه با آنتی بادی های آنتی-MVH (j) و آنتی-GCNA1 (k) یا آنتی-MVH (l) و آنتی-SYCP3 (m) [۴۰] رنگ آمیزی شدند [۲۹].

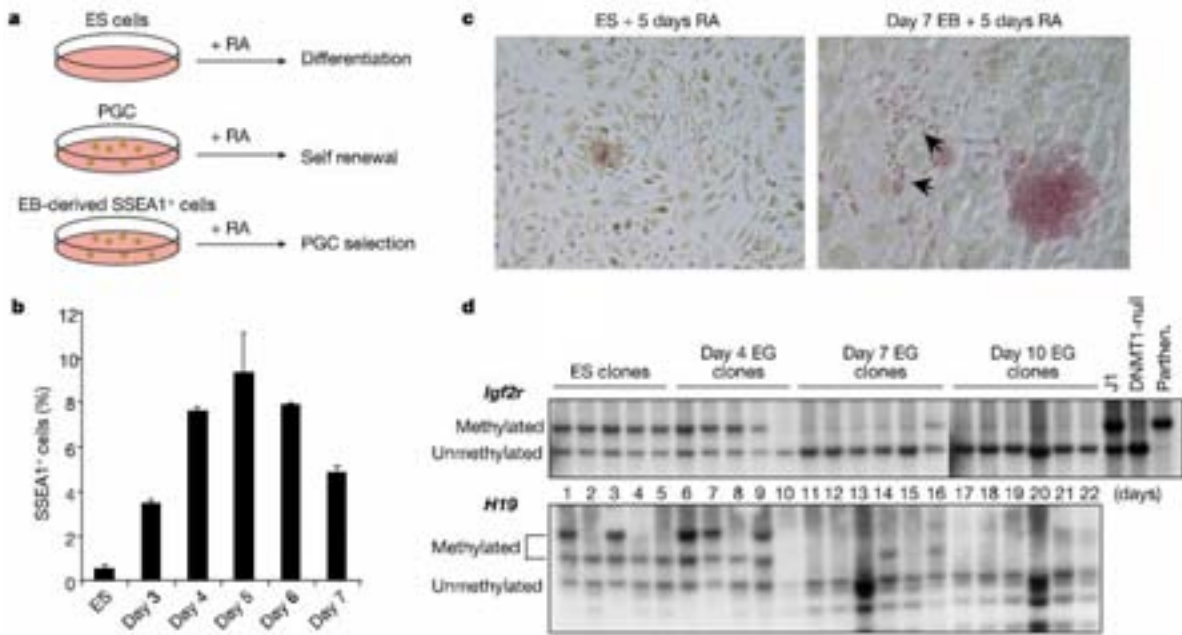
1. Confocal



شکل ۱۳. پیوند سلول‌های زاینده مشتق از سلول‌های ES به بیضه بالغ. a: ۵ تا ۶ هفته پس از پیوند، بیضه میزبان و پیوند با رنگ آمیزی شدند. b: نمای بزرگ شده پیوند. c: نمای شاخص لوله‌های سمینفروس در مقطعی از پیوند. d: مقطعی از پیوند شامل سلول‌های ES خالص نشده و سلول‌های گنادی جنینی. e: پیوندی از سلول‌های گنادی به تنهایی [۲۹].



شکل ۱۴. مقطع (A) لوله‌های بیضه‌ای وحشی (a-c) و پیوند شده (d-j) که به صورت دوگانه با آنتی‌بادی‌های علیه β-gal و علیه HSC70t رنگ آمیزی شده‌اند. تصاویر نشان دهنده رنگ‌آمیزی هسته‌ای (a, d, g) و آنتی HSC70t (b, e, h) و آنتی β-gal (c, f, i). (j) بزرگ‌نمایی بیشتر (۶ X) یک لوله پیوند خورده و تصویر تلفیق شده g-i. فلش‌های g و h نشان دهنده موقعیت سلول‌های سرتولی و میوئید است. تشخیص (B) آلل knock-in در DNA ژنومی استخراج شده از سلول‌های ES Mvh-lacZ knock-in (ردیف ۱)، اسپرم از پیوند lacZ مثبت (ردیف ۲) و یک لوله سمینفروس وحشی (ردیف ۳)؛ (a): lacZ، (b): Neo، و (c): Sry؛ e: اسپرم‌های خالص شده از لوله‌های سمینفروس پیوند شده [۲۹].



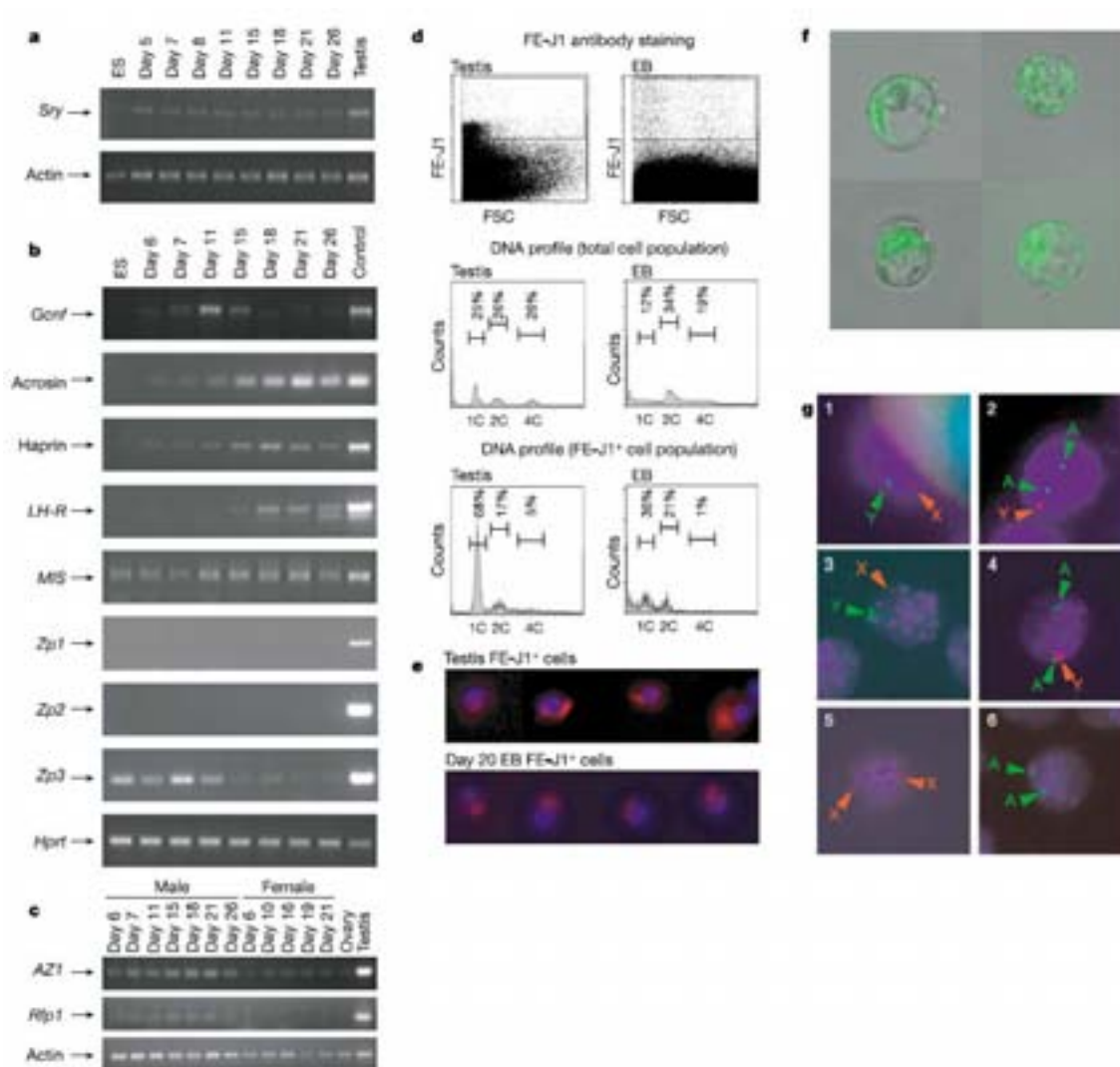
شکل ۱۵. تکوین سلول‌های زاینده اولیه در EB در حال تمایز. a: تأثیر تیمار با رتینوئیک اسید (RA) [۴۱] بر سلول‌های مشتق از EB. رتینوئیک اسید سلول‌های ES (پانل بالا) را تمایز می‌دهد اما حفظ PGC ها را حمایت می‌کند (پانل وسط). کشت سلول‌های SSEA1⁺ مشتق از EB در حضور RA، موجب انتخاب PGC ها می‌شود که بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های زاینده را حفظ می‌کنند (پانل پایین). b: سلول‌های SSEA1⁺ در زمان‌های مختلف به کمک ذرات immunomagnetic beads از EB ها جدا شدند و به مدت ۷ روز در حضور RA کشت شدند و سپس بیان SSEA1 به‌وسیله فلوسایتومتری ارزیابی شد. درصد سلول‌های بنیادی GFP⁺ یا مشتق از EB بیان کننده SSEA1 نشان داده شده است (n=3). c: بیان آلکالین فسفاتاز (AP) در سلول‌های ES (پانل چپ) و سلول‌های مشتق از EB ۷ روزه پس از ۵ روز کشت در حضور رتینوئیک اسید. سلول‌های مشتق از EB ۷ روزه کلونی‌هایی از سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت تشکیل می‌دهند که شبیه PGC هاست. سلول‌های مثبت برای آلکالین فسفاتاز به سمت خارج کلونی‌های بزرگ مهاجرت می‌کنند (فلش‌ها). d: پاک شدن نشانه‌گذاری جایگاه‌های Igf2r و H19/Igf2. پانل بالا ناحیه DMR2 از جایگاه Igf2r را نشان می‌دهد [۴۲]. آنالیز ساترن DNA ژنومی کلون‌های منفرد ES و سلول‌های زاینده جنینی مشتق از EB هضم شده با PvuII و MluI نشان داده شده است. پانل پایین، جایگاه H19/Igf2 همان کلون‌های پانل بالا با SacI و HhaI هضم شدند. روزی از تکوین EB که در آن کلون سلول‌های زاینده جنینی به‌دست آمده‌اند نشان داده شده است. ردیف‌های کنترل: سلول‌های ES J1 (پروفایل متیلاسیون سوماتیک)، سلول‌های ES حامل نقص در متیلاسیون DNMT1^{null} و سلول‌های ES پارتنوژنتیک (parthen) (نشان دهنده الگوی متیلاسیون مادری در هر دو آلل Igf2r [۲۸]).

سیتوپلاسمی به اووسیت‌های طبیعی جنین‌های مرحله بلاستوسیست را به‌وجود آوردند (شکل ۱۶f).

فرضیات مرتبط با تشکیل PGC در شرایط آزمایشگاهی

سه سناریو برای تمایز PGC های مشاهده شده در کشت‌های تک لایه و EB وجود دارد: این سلول‌ها یا در ابتدا به یک حالت شبه اپی‌بلاستی حد واسط تمایز می‌یابند؛ یا مستقیماً به PGC تمایز می‌یابند یا آن‌که کلونی‌های سلول‌های بنیادی

در مطالعه‌ای دیگر جیجسن (Geijsen) و همکاران [۲۸] با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی ترنس ژن Oct4 و بهره‌گیری از تفاوت سلول‌های زاینده و سلول‌های بنیادی جنینی در پاسخ به تیمار با رتینوئیک اسید (شکل ۱۵a) و در ادامه با انتخاب سلول‌های بیان کننده نشانگر سطحی SSEA1 (شکل ۱۵b) موفق به تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به اسپرم شدند. این سلول‌ها نشانه‌گذاری‌های اپی ژنتیکی را پاک کردند (شکل ۱۵d) و از لحاظ ویژگی‌های مولکولی شبیه به اسپرم‌های طبیعی بودند (شکل ۱۶a)؛ همچنین پس از تزریق درون



شکل ۱۶. EB ها تمایز سلول‌های زاینده نر هاپلوئید را حمایت می‌کنند؛ این سلول‌ها می‌توانند با اووسیت لقاح انجام دهند. a: بیان Sry [۴۳] در EB های در حال تکوین کف با تکنیک RT-PCR آنالیز شده است (پانل بالا). b: بیان ژن‌های تنظیم کننده تخصصی شده سلول‌های زاینده نر جین تکوین EB. Gcnf کمک می‌کند [۴۴] که بیان Oct4 به دودمان جنسی محدود شود. آکروزین، پروتئین آکروزومی که در میان کنش با اووسیت نقش دارد؛ هاپرین، پروتئین انگشت RING مختص سلول‌های زاینده هاپلوئید؛ LH-R و MIS به ترتیب نشانگر های سلول‌های لایدیگ [۴۵ و ۴۶] و سرتولی [۴۷-۴۹]؛ Zp1-3 پروتئین‌های زونا پلوسیدای اووسیت. Hprt به عنوان کنترل استفاده شده است. (c) آنالیز بیان ژن‌های اختصاصی اختصاصی سلول‌های زاینده هاپلوئید نر در EB های نر و ماده به کمک RNA RT-PCR. بیضه یا تخمدان به عنوان کنترل استفاده شده است. d: شناسایی سلول‌های زاینده هاپلوئید نر در بیضه بالغ (چپ) یا روز ۱۳ EB ها (راست) به کمک رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی FE-J1. سلول‌ها با رنگ متصل شونده به DNA (Hoechst 33342) رنگ آمیزی شدند تا محتوی DNA آن‌ها اندازه‌گیری شود. 1C، هاپلوئید؛ 2C، فاز G0/G1؛ 4C، فاز G2/M. e: ایمونوسیتوشیمی سلول‌های FE-J1⁺ تفکیک شده در مرحله d. FE-J1-PE به رنگ قرمز؛ Hoechst 33342 هسته‌ای به رنگ آبی. f: تصویر فلورسانس بلاستوسیت‌های به‌وجود آمده از تزریق درون سیتوپلاسمی اووسیت‌ها با سلول‌های هاپلوئید FE-J1⁺ مشتق از EB. g: آنالیز FISH سلول‌های ES کنترل و جنین‌های مرحله مورولا به‌وسیله سیگنال‌های فلورسانس مشخص شده با فلش. پانل‌های ۱ (نشانگر های کروموزوم X و Y) و ۲ (نشانگر های اوتوزومی (زنجیره سبک K) و کروموزوم Y) نشان دهنده جنین‌های حاصل از تزریق درون سیتوپلاسمی اووسیت‌ها با سلول‌های هاپلوئید FE-J1⁺ هستند. پانل ۳ (نشانگر های کروموزوم‌های X و Y) و ۴ (نشانگر های اوتوزومی (زنجیره سبک K) و کروموزوم Y)، سلول‌های ES نر کنترل را نشان می‌دهند. پانل ۵ (نشانگر های کروموزوم X و Y؛ به دو کروموزوم X و غیاب کروموزوم Y توجه کنید) و ۶ (نشانگر های اوتوزومی (زنجیره سبک K) و کروموزوم Y؛ به غیاب سیگنال Y توجه کنید)، سلول‌های ES ماده کنترل را نشان می‌دهند [۲۸].

انسانی در شرایط آزمایشگاهی تسریع شده است و دیگر آنکه PGC های اولیه قبلاً در کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی در شروع تمایز وجود داشته‌اند. در تأیید احتمال اخیر، القای سریع آزمایشگاهی PGC های فرضی mvh^+ از سلول‌های بنیادی جنینی موش، به طور بالقوه مانع از تشکیل یک حالت اپی بلاست حد واسط می‌شود. به طور مشخصی، هنگامی که سلول‌های بنیادی جنینی وحشی با سلول‌های تروفوبلاست یا دودمان‌های سلولی بیان کننده BMP4 مجتمع می‌شوند، پروتئین *vasa* ی درونزاد در EB یک روزه مشاهده می‌شود. همچنین هنگامی که این آزمایش‌ها با دودمان‌های سلول بنیادی جنینی حاوی گزارشگر *mvh* تکرار شوند، یک روز پس از تمایز، نزدیک به ۳ درصد از سلول‌ها فعالیت *mvh-lacZ* را نشان می‌دهند. در مقابل این اثر BMP8b روی اپی بلاست‌های اولیه کشت شده برای ایجاد یک افزایش در PGC های مرحله اولیه لازم است. به علاوه اپی بلاست‌های اولیه کشت شده برای ایجاد یک افزایش در PGC های مرحله اولیه لازم است. همچنین PGC های مشتق شده در این آزمایش‌ها $vasa^+$ بودند در حالی که نشان می‌دادند که BMP4 مستقیماً بیان *mvh* را افزایش نمی‌دهد. این اختلاف ظاهری بین دو مطالعه با استفاده از اپی بلاست‌ها در مقابل PGC های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی بر این نکته دلالت دارد که BMP4 به تنهایی اثر القایی عمده‌ای روی تشکیل سلول‌های زاینده در EB ندارد. احتمالاً افزایش عمده در سلول‌های $Vasa^+$ مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی، در نتیجه اثر میتوژنیک BMP4 روی PGC های اولیه است. یک تفسیر دیگر برای بیان زود هنگام *vasa* در EB های حاوی سلول‌های بیان کننده BMP4 این است که کلونی‌های سلول بنیادی جنینی تمایز نیافته از نظر مورفولوژی، قبلاً شامل سلول‌هایی متعهد به دودمان جنسی بوده‌اند. این سؤال که آیا یک حالت اپی بلاست حد واسط در EB ها، تشکیل شده است و آیا BMP4 بر القاء یا توقف تکثیر PGC های تمایز یافته در شرایط آزمایشگاهی اثر دارد یا خیر ناشناخته باقی مانده است.

جنینی، قبلاً شامل PGC بوده‌اند. به منظور القای تمایز خودبخودی سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های زاینده، سوسپانسیون از سلول‌های بنیادی جنینی منفرد یا به صورت کشت تک لایه و یا در قطره آویزان^۱ دوباره کشت می‌شوند و در غیاب MEF در محیط کشت فاقد LIF پس از یک شب به صورت EB مجتمع می‌شوند.

در سیستم کشت تک لایه، PGC های فرضی در مرحله اولیه، هم محصول ترنس ژن *gcoct4-eGFP* و هم گیرنده تیروزین کینازی *c-kit* را با هم بیان می‌کنند، که گیرنده تیروزین کینازی *ckit* بین روزهای ۳ و ۷ تمایز به طور مداوم بیان می‌شود. به طریق مشابه بیان *stella* و *fragilis* هر دو در تمایز خودبخودی PGC های فرضی در EB های بین روزهای ۳، ۵، ۷ به ترتیب مشاهده شده است. به علاوه بیان فاکتور رشد فیبروبلاستی ۵ (FGF5) که یک فاکتور اکتودرمی اولیه است نزدیک به روز ۳ و GCNF [۴۴] در روز ۷ تمایز در EB های همزمان با تشکیل PGC ها مشاهده شده است.

اگر تکوین در شرایط آزمایشگاهی همان زمان بندی تکوین دودمان جنسی در موجود زنده را تکرار نماید، آغاز بیان بعدی نشانگرها پس از مهاجرت سلول جنسی نیز در کشت‌های EB و تک لایه، الگوی حاکم در موجود زنده را دنبال می‌کند. سلول‌های $vasa^+$ در کشت‌های تک لایه در ابتدا بین روزهای ۶ و ۸ تمایز و در EB های ۵ تا ۷ روزه مشاهده می‌شوند. اگر سلول‌های بنیادی جنینی موشی همتای سلول‌های اپی بلاست جنین ۳/۵ تا ۴/۵ روز پس از لقاح باشند، بنابراین آغاز بیان *vasa* در کشت‌های تمایز خودبخودی همانند چیزی است که در طول تکوین موش مشاهده می‌شود. با این حال سلول‌های $VASA^+$ در EB های ۷ روزه انسانی، در مقایسه با هفته هفتم در موجود زنده مشاهده شده‌اند. بنابراین دو سناریوی دیگر ممکن است رخ داده باشد: یکی آنکه تکوین سلول جنسی

1. Hanging drops

تکوین بیشتر PGC های مشتق شده از سلول‌های

بنیادی جنینی به گامت‌ها

زمان‌بندی بیان SRY و تمایز جنسی PGC در موجود زنده و در شرایط آزمایشگاهی

در طول تکوین موش، تمایز جنسی PGC ها به بیان مناسب ژن SRY روی کروموزوم Y بستگی دارد؛ این ژن در میان پستانداران حفظ شده است. بیان SRY بین ۱۱/۵ تا ۱۲/۵ روز پس از لقاح در سلول‌های پیش سرتولی، آغاز کننده تشکیل برآمدگی تناسلی نر است که در آن، اکثریت PGC های $vasa^+$ با کاربوتایپ نر (XY) در ۱۳/۵ روز پس از لقاح، متحمل توقف میتوزی می‌شوند. در روز ۱۴/۵ پس از لقاح، این سلول‌های زاینده نر که گنوسیت نامیده می‌شوند به‌طور برگشت ناپذیری برای اسپرم زایی متعهد می‌شوند به طوری که به وسیله سنچس پیوند به بیضه این مسأله مشخص شده است. بدون بیان کافی SRY در تکوین برآمدگی تناسلی، PGC های XY وارد مسیر تعیین شده ماده شده و مطابق با تمایز اووگونی تغییرات مورفولوژی و استراحت میوزی در محیط کشت را انتخاب می‌کنند؛ همچنین اکثر PGC های منحرف شده (ectopic) که به گنادهای آدرنال مهاجرت کرده‌اند متحمل استراحت میوزی و تمایز اووگونی شده‌اند. با این وجود حالت برعکس تا به حال مشاهده نشده است؛ یعنی وقتی PGC های XX در گناد جنین موش کایمر که از نظر فنوتیپ نر است قرار گیرند متحمل اسپرم‌زایی نشده است. اگر چه حضور سلول‌های زاینده ممکن است تکوین برآمدگی‌های تناسلی را تحت تاثیر قرار دهد، تشکیل استرومای گنادی مشخصاً برای حمایت تمایز جنسی و گامت زایی پس از آن ضروری است. تفاوت در زمان‌بندی بیان SRY در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند ورود PGC های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی با کاربوتایپ XY به مسیر گامت‌زایی ماده و نر به ترتیب در کشت تک لایه و کشت EB را تفسیر نماید.

هنگامی که سلول‌های $mvh-lacZ^+$ جدا شده، با سلول‌های استرومایی نر وحشی بیان کننده SRY در روز ۱۲/۵ تا ۱۳/۵ پس از لقاح مخلوط شوند پس از پیوند به بیضه موش وحشی گیرنده، قابلیت تشکیل اسپرماتوزوآ را پیدا می‌کنند. بیان SRY در EB های ۵ روزه حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی XY مشاهده شده است، درحالی که همان‌طور که انتظار می‌رفت با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی XX هیچ بیانی از SRY دیده نشده است. تعهد PGC های XY حاصل از EB برای تبدیل شدن به دودمان نر به واسطه تشکیل گامت‌های هاپلوئید نر در این دو مطالعه به‌طور قاطع نشان داده شده است (در ادامه توضیح داده می‌شود). در مقابل، بیان SRY در کشت‌های تک لایه تمایز سلول‌های بنیادی جنینی XY تا بعد از تشکیل اووسیت ماده و ساختاری‌های شبه فولیکول به تأخیر می‌افتد. بنابراین تمایز سلول‌های بنیادی جنینی درون EB ها، تشکیل زودرس سلول‌های پیش سرتولی بیان کننده SRY را حمایت می‌کند در حالی که تمایز دورن کشت‌های تک لایه ممکن است این تشکیل اولیه بحرانی سلول‌های استرومایی نر را مهار کرده و PGC ها را به مسیر تعیین شده برای جنس ماده هدایت کنند. تولید گامت‌های نر و ماده در این سیستم، شواهد بیشتری مبنی بر خلاصه سازی تمایز جنسی در شرایط آزمایشگاهی را فراهم می‌کند.

پیشرفت میوزی و تشکیل گامت نر در موجود زنده و در شرایط آزمایشگاهی

سلول‌های زاینده نر قبل از ورود به میوز متحمل چندین تغییر قابل توجه در تکوین بیضه می‌شوند و به نظر می‌رسد که این فرآیند در EB ها در مقایسه با برنامه زمان بندی انتونژنتیک^۱ تکوین بیضه در موش سریع تر رخ می‌دهد. پس از تولد، گنوسیت‌ها در بیضه متحمل فعال‌سازی مجدد میوزی

1. Ontogenetic

و پیشرفت تکوین جنینی پس از آن، گزارش نشده است. فقدان مکانیسم هیپوتالاموسی / هیپوفیزی برای تنظیم اسپرماتوزنر ممکن است موجب ناکامی EB ها در حمایت تشکیل اسپرماتوزوآهای مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی شود. اما سلول‌های زاینده هاپلوئید نر $FE-J1^+$ جدا شده از EB های ۲۰ روزه، مشابه اسپرماتیدهای گرد قادرند پس از تزریق درون سیتوپلاسمی به اووسیت و ادامه تکوین تا مرحله بلاستوسیت، ژنوم پدری خود را به اشتراک بگذارند. PGC های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی قادرند در یک محیط مناسب به اسپرماتوزوآ تبدیل شوند؛ اما ظاهراً در EB ها اسپرم زایی خودبخودی تنظیم خود را از دست داده، تسریع شده و در طول میوز متوقف می‌شود. تاکنون هیچ شواهدی از پیشرفت میوزی سلول‌های زاینده تشکیل گامت در EB های انسانی مشاهده نشده است.

پیشرفت میوزی و تشکیل گامت ماده در شرایط آزمایشگاهی

در غیاب بیان SRY، سلول‌های زاینده مشتق از دودمان‌های سلول‌های بنیادی جنینی XY و XX، مشابه تکوین در موجود زنده، توانایی ورود به میوز و تشکیل ساختاری شبه اووسیت را در کشت‌های تک لایه اولیه دارند. در موش ماده، ژن *oct4* درونزاد همزمان با بیان *DMC1* (همولوگ موشی ژن خاص میوز مخمر) به‌طور طبیعی در روز ۱۳/۵ پس از لقاح سرکوب می‌شود و به پروفاز I میوز وارد می‌شود. در روز ۷ تمایز کشت‌های تک لایه، کاهش بیان مشابهی در محصول ترنس ژن *gc-oct4-eGFP* در اکثر سلول‌های زاینده $vasa^+$ مشاهده می‌شود. بین روزهای ۸ و ۱۲، تمایز، دسته‌های کوچکی از سلول‌های ۵ تا ۲۰ تایی شامل اووگونی‌های فرضی $vasa^+$ و سلول‌های سوماتیک، از کشت‌های اولیه جدا می‌شوند. این دسته‌ها پس از جمع‌آوری و کشت به مدت یک شب در

شده و از مرکز به پیرامون لوله‌های منی‌ساز در حال تکوین مهاجرت می‌نمایند و در طول غشای پایه، جمعیت اجدادی^۱ پرواسپرماتوگونی^۲ های دیپلوئید را تشکیل می‌دهند. برخی از این پرواسپرماتوگونی‌ها جمعیتی از سلول‌های خود نوزایی کننده بنیادی اسپرماتوگونی^۳ تمایز نیافته را به‌وجود می‌آورند [۵۰ و ۵۱] در حالی که اکثریت آن‌ها تکثیر شده، تمایز یافته و در نهایت در اغلب سویه‌های موشی در ۴ تا ۶ هفتهگی متحمل اسپرم‌زایی می‌شوند. اگر چه اولین اسپرماتیدهای هاپلوئید به‌طور طبیعی در بیضه موش ۲۲ روزه (تقریباً ۳۰ روز پس از تشکیل PGC ها) قابل مشاهده هستند، سلول‌های زاینده هاپلوئید نر در EB های ۲۰ روزه به‌وسیله رنگ‌آمیزی با یک رنگ حیاتی متصل شونده به DNA و آنالیز فلوسایتومتری قابل مشاهده‌اند. این سلول‌های زاینده مشابه الگوی مشاهده شده روی آکرزوم اسپرماتوسیت‌های پاکیتن و اسپرماتیدهای کروی، یک رنگ‌آمیزی نامتقارن با آنتی‌بادی *FE-J1* نشان می‌دهند. در این آزمایش‌ها، PGC های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی قادر به ورود به میوز و شروع فرآیند تمایز تخصصی اسپرماتوزنر هستند.

اگر چه به نظر می‌رسد پیشرفت میوزی در سلول‌های زاینده هاپلوئید محدود به EB ها باشد اما PGC های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی قادرند اسپرم‌زایی را در محیط بیضه‌ای تکمیل نمایند. تویوکا (Toyooka) و همکارانش با مخلوط کردن سلول‌های زاینده mvh^+ جدا شده از EB ها با سلول‌های استرومایی ۱۳/۵ روزه پس از لقاح و سپس پیوند این اجتماعات به بیضه موش‌های گیرنده، وجود یک محیط فیزیولوژیکی کامل برای کنترل اسپرم‌زایی را تأیید کردند. با این حال توانایی این اسپرماتوزوآها در بارور کردن اووسیت

1. Progenitor
2. Prospermatogonia
3. Spermatogonial stem cell

پروفاز I، به تکوین همزمان و برهمکنش با سلول‌های استرومایی تخمدان بستگی دارد.

تولید نوزادان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های شبه اسپرم

نیرنیا (Nayernia) و همکاران [۵۳] برای اولین بار نشان دادند که گامت‌های مشتق از سلول‌های ES می‌توانند پس از لقاح موش‌های زنده به‌وجود آورند. سیستم‌های متکی بر ژن گزارشگر^۳ پیش از این برای جداسازی جمعیتی از سلول‌های بنیادی که ژن‌های اختصاصی سلول‌های زاینده از جمله oct4 و دیگر ژن‌ها را بیان می‌کردند استفاده می‌شد و از این طریق در شرایط آزمایشگاهی، جمعیت سلولی، از سلول‌های متعهد به تمایز به گامت‌ها غنی‌تر می‌شد.^۴ نیرنیا (Nayernia) و همکاران استفاده از این سیستم را با طراحی هوشمندانه یک سیستم انتخاب دو مرحله‌ی و با کمک شرایط خاص کشت گسترش دادند. آن‌ها در ابتدا برای انتخاب سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs)^۵ [۵۴] رده‌ای از سلول‌های ES را به‌وجود آوردند که حامل پروموتور Stra8 متصل به ژن گزارشگر eGFP بود (شکل ۱۷)؛ Stra8 در سلول‌های زاینده نر ابتدایی فعال است. جمعیت سلولی جدا شده ویژگی‌های سلول‌های زاینده نر آماده ورود به میوز را نشان می‌داد.

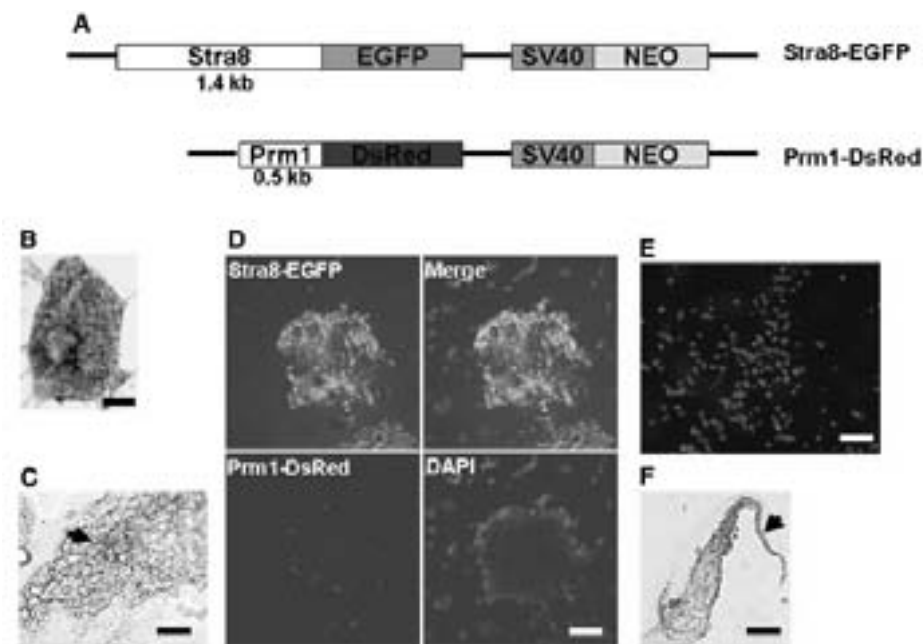
با استفاده از این جمعیت غنی‌شده، دور دوم انتخاب ترتیب داده شد. در این مرحله آن‌ها پروموتوری را به سلول‌ها معرفی کردند که در سلول‌های زاینده نر بالغ تر بیان می‌شود (Prm1) و یک ژن فلورسانت گزارشگر دیگر، dsRED، به آن متصل

حالت سوسپانسیون، اکثراً مجموعه‌هایی تشکیل می‌دهند و سپس در محیط‌های بلوغ در شرایط آزمایشگاهی (IVM)^۱ دوباره کشت می‌شوند. این مجموعه‌های بزرگ به صورت ساختاری‌های شبه فولیکولی سازماندهی شده که پس از اتصال دارای سلول‌های زاینده کوچک با قطر ۱۰ میکرومتر می‌شوند. شواهد پیشرفت میوزی در کشت‌های تک لایه اولیه و ثانویه در روز ۱۶ تمایز مشاهده شده است. پس از ۱ تا ۴ روز ادامه کشت در محیط‌های IVM، مجموعه‌های بزرگ شامل سلول‌های شبه اووسیت در اندازه‌های بین قطر ۱۵ و ۲۵ میکرومتر دوباره به کف پلیت می‌چسبند. ساختارهای شبه فولیکول مشابه نیز بین روزهای ۱۲ و ۱۶ تمایز درون کشت‌های اولیه تکوین می‌یابند. بیان DMCI توسط RT-PCR، هم در کشت‌های اولیه و هم در کشت‌های ثانویه روز ۱۶ تمایز آشکار شده است. به‌علاوه دامنه الگوهای رنگ‌آمیزی هسته‌ای این سلول‌های شبه اووسیت برای SCP3 پیشنهادی برای پیشرفت میوزی همزمان با رشد اووسیت بود.

سلول‌های شبه اووسیت کوچکتر با قطر ۱۵ میکرومتری دارای کروماتین غیرمتراکم با رنگ‌آمیزی ضعیف و پراکنده هستند که شبیه اووسیت مرحله لپتوتن یک تخمدان موش در روز ۱۵/۵ پس از لقاح‌اند. در مقابل، سلول‌های شبه اووسیت ۲۵ میکرومتری دارای کروماتین متراکم بوده و با رنگ‌آمیزی SCP3 شبیه ساختار هسته دیپلوتن هستند [۵۲]. اگر چه به نظر می‌رسد ورود PGC ها به میوز، در موجود زنده و در شرایط آزمایشگاهی یک عمل خود بخودی سلول^۲ باشد، با این حال به نظر می‌رسد که تکوین بعدی آن‌ها به اووسیت‌های بالغ و نیز توقف میوزی نهایی در مرحله دیپلوتن

3. Reporter gene-based
4. Enriched
5. Spermatogonial Stem Cells

1. in vitro Maturation
2. Cell-automatons



شکل ۱۷. استراتژی به کار گرفته شده برای تأسیس رده جنسی بنیادی نر^۱ مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی. A: طرح شماتیک ژن‌های گزارشگر Stra8-EGFP و Prm1-DsRed؛ این ژن‌های گزارشگر می‌توانند به ترتیب نشانگر سلول‌های پیش میوزی و سلول‌های زاینده هاپلوئید باشند. B: رنگ آمیزی HE کلونی شبه جنینی. C: رنگ آمیزی اجسام شبه جنینی با آنتی بادی Mvh نشان دهنده تمایز به PGC هاست (فلش). D: تصاویر فلورسانت پروتئین‌های Stra8-EGFP (سبز) و Prm1-DsRed (قرمز) در رده SSC12 مشتق از سلول‌های ES پس از ۷۲ ساعت القا با ریتینوئیک اسید. E: تصویر تلفیقی فلورسانت محیط رویی سلول‌های SSC12 پس از ۷۲ ساعت القا با ریتینوئیک اسید که تنها سلول‌های قرمز را نشان می‌دهد و نشان‌دهنده رها شدن سلول‌های Prm1-DsRed- مثبت به محیط است. F: بزرگ‌نمایی یک سلول قرمز از محیط رویی که نشان دهنده مثبت بودن واکنش سلول با آنتی بادی ضد پروتئین اختصاصی دم اسپرم (PHGPx) [۵۵] است (فلش) [۵۳]. Male germline stem cell line.

درون سیتوپلاسمی (ICSI)^۲ به داخل اووسیت تزریق کردند. بخشی از تخم‌های لقاح یافته به جنین‌های ظاهراً طبیعی پیش از لانه‌گزینی تکوین یافتند. از بیش از ۶۵ جنین پیش از لانه‌گزینی، ۷ جنین، موش‌های زنده حاوی ترنس ژن Prm1-DsRed به وجود آوردند. با این حال اکثر موش‌های نوزاد جثه‌ای کوچکتر یا بزرگتر از موش‌های کنترل داشتند و بین ۵ روز تا ۵ ماه پس از تولد مردند (شکل ۱۹). بنابراین اسپرم‌های به وجود آمده در شرایط آزمایشگاهی موش‌های طبیعی به وجود نیاموردند. نرخ بالای تکوین غیرطبیعی در اینگامت‌های دستکاری شده احتمالاً به واسطه ماهیت اپی ژنتیکی آن‌هاست نه ژنتیک آن‌ها. این تغییرات اپی ژنتیکی می‌تواند شامل تغییرات DNA همچون متیلاسیون و/یا تغییرات کروماتین باشد که به نوبه خود بیان ژن‌های ضروری

بود. پس از القای تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که غالباً سبز رنگ بودند با ریتینوئیک اسید سلول‌هایی قرمز رنگ به دست آمد که برخی از آن‌ها متحرک به نظر می‌رسیدند. ظهور رنگ فلورسانت قرمز پیشنهاد می‌کرد که سلول‌های هاپلوئید مراحل پایانی اسپرماتوزن را پشت سر گذاشته‌اند. با این حال شکل اسپرم‌های به دست آمده غیرطبیعی بود. با القای تمایز تقریباً یک سوم جمعیت سلولی که از طریق انتخاب با Stra8-eGFP به دست آمده بود به سلول‌های هاپلوئید تبدیل شد (شکل ۱۸). در مرحله بعد محققان عملکرد سلول‌های زاینده مشتق شده در شرایط آزمایشگاهی شان را مورد ارزیابی قرار دادند. احتمالاً به دلیل آنکه اسپرم‌های حاصل به قدر کافی طبیعی نبودند تا بتوانند به خودی خود با اووسیت لقاح انجام دهند، محققان آن‌ها را با استفاده از یک فناوری کمکی تولید مثلی^۲ موسوم به تزریق

3. Intra Cytoplasmic Sperm Injection

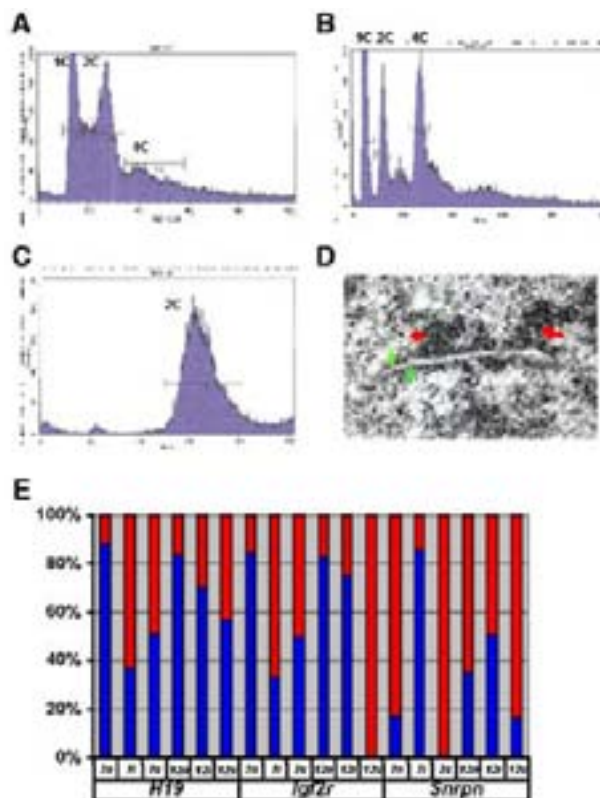
1. Male germline stem cell line
2. Assisted reproductive technology

DNA ویژه والدی^۱ لازم است که در سلول‌های زاینده بدوی پاک شده و مجدداً در مراحل انتهایی گامتوزن، در اینجا اسپرماتوزن، مجدداً بر اساس جنسیت گامت برقرار شود^۲ (شکل ۱۸).

در اینجا سؤال مهم این است که آیا این برنامه‌ریزی مجدد اپی ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی که متحمل تمایز آزمایشگاهی به سلول‌های زاینده می‌شوند نیز به طور طبیعی رخ می‌دهد؟ در غیر این صورت اگر برنامه‌ریزی مجدد صورت نگیرد، اسپرم‌های حاصل دارای الگوهای غیرطبیعی نشانه‌های متیلاسیون خواهند بود. نیرنیا (Nayernia) و همکاران وضعیت متیلاسیون DNA در سه ژن نشانه‌گذاری شده را مورد بررسی قرار دادند؛ در این سه ژن مناطقی به خوبی شناسایی شده‌اند که به صورت افتراقی متیله می‌شوند. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که برخی برنامه‌ریزی‌های مجدد در سیستم کشت رخ داده است اما تمامی نشانه‌های متیلاسیون پاک و مجدداً برقرار نشده‌اند. در حقیقت موش‌های حاصل از اسپرم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی را می‌توان حداقل با برنامه‌ریزی مجدد اپی ژنتیکی ناکامل آن‌ها توضیح داد.

برای روشن شدن میزان برنامه‌ریزی مجدد طبیعی در چنین سلول‌های زاینده مصنوعی، انجام مطالعات و پی‌گیری وضعیت بیان و متیلاسیون طیف گسترده‌ای از ژن‌های نشانه‌گذاری شده طی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های زاینده و در زمان‌های مختلف فرایند می‌تواند مفید باشد. راهکار مشابه و دقیق‌تری باید روی زاده‌های حاصل از اسپرم مشتق از سلول‌های بنیادی انجام شود تا مشخص شود اختلالات فنوتیپی مستقیماً مربوط به نواقص نشانه‌گذاری است.

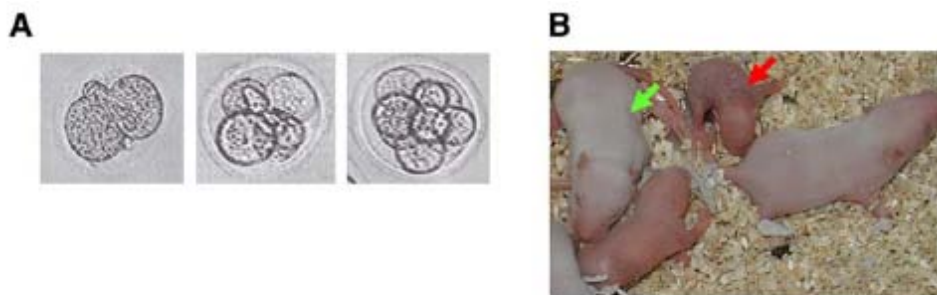
نشان دادن این نکته که اسپرم‌های مشتق از سلول‌های ES



شکل ۱۸. شناسایی سلول‌های زاینده نر هاپلوئید به کمک FACS. رده SSC12 پس از ۷۲ ساعت تیمار با رتینوئیک اسید، حدود ۳۰ درصد سلول‌های هاپلوئید (1C) نشان می‌دهد. B: سوسپانسیون سلولی بیضه دارای جمعیت‌های سلولی در مرحله هاپلوئید (1C)، فاز G0/G1 (2C) و فاز G2/M (4C) است. C: هیچ سلول هاپلوئیدی در لایه سلولی تغذیه کننده مشاهده نمی‌شود. D: تصویر میکروسکوپ الکترونی تشکیل کمپلکس سیناپتومالی در سلول‌های SSC12، پس از تیمار با رتینوئیک اسید؛ کروماتین (فلش قرمز) و اجزای جانبی (فلش سبز) نشان داده شده‌اند. E: وضعیت متیلاسیون H19 [۵۶]، Igf2r و Snrpn در سلول‌های القا نشده (n)، القا شده (i)، پس از FACS و سلول‌های قرمز محیط رویی (s) رده‌های SSC7 و SSC12. درصد جایگاه‌های CpG غیرمتیله (ستون‌های قرمز) و متیله (ستون‌های آبی) در محور Y نمایش داده شده است [۵۳].

تکوین طبیعی را تنظیم می‌کند. در این خصوص ژن‌های نشانه‌گذاری شده بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند؛ این ژن‌ها دسته‌ای از ژن‌های پستانداران هستند که در دودمان جنسی پدر یا مادر متیله می‌شوند و بنابراین در زاده‌های آن‌ها تنها در یکی از کروموزوم‌های والدی بیان می‌شوند. این ژن‌ها تمایل دارند بر رشد جنینی تأثیر بگذارند. نشانه‌های متیلاسیون

1. Parent-specific
2. Restablished



شکل ۱۹. ارزیابی عملکرد گامت‌های نر مشتق از سلول‌های ES. A: تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی حاصل از تزریق درون سیتوپلاسمی (ICSI) سلول‌های هاپلوئید Prm1-DsRed مثبت به اووسیت‌های CD1 یا NMRI. B: تکوین کامل جنین‌های دو سلولی منتقل شده به رحم. فلش قرمز، موش agouti را (۵ روز پس از تولد) نشان می‌دهد که حامل هر دو آلل ترنس ژن Stra8-EGFP و Prm1-DsRed است. فلش سبز، موش سفید را (۷ روز پس از تولد) نشان می‌دهد که تنها حامل ژن گزارشگر Prm1-DsRed است [۵۳].

برنامه‌ریزی مجدد طبیعی ژن‌های نشانه‌گذاری شده را در محیط آزمایشگاهی تحریک کرد؟ از آنجایی که بازیگران درگیر در فرآیند برنامه‌ریزی مجدد هنوز ناشناخته‌اند، آیا می‌توان با استفاده از اسپرم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی به عنوان سیستم‌های مطالعاتی، ژن‌ها و فاکتورهای موثر و ضروری در برنامه‌ریزی مجدد طبیعی را یافت؟

بازدهی کلی جداسازی اسپرم از سلول‌های ES نیز مسئله ساز است: تنها ۳ درصد اووسیت‌هایی که گامت‌های نر مشتق از سلول‌های ES در شرایط آزمایشگاهی به آن‌ها تزریق شد، موش‌های ترنس ژن زنده و بالغ به وجود آوردند. آیا این میزان را می‌توان ارتقاء داد؟ آیا جنین‌هایی که با نقص مواجه شدند دارای اختلالات در برنامه‌ریزی مجدد نشانه‌گذاری بودند؟ آیا می‌توان با استفاده از راهبرد جداسازی دو مرحله‌ای مشابهی سلول‌های زاینده ماده به دست آورد یا اینکه به دست آوردن اووسیت‌های دارای عملکرد، ذاتاً مشکل‌تر است؟ پاسخ به این سئوالات می‌تواند افق‌های زیست‌شناسی تولید مثلی را روشن‌تر کند و طب تولید مثل و فناوری کمک تولید مثلی را ارتقاء بخشد (شکل ۲۰).

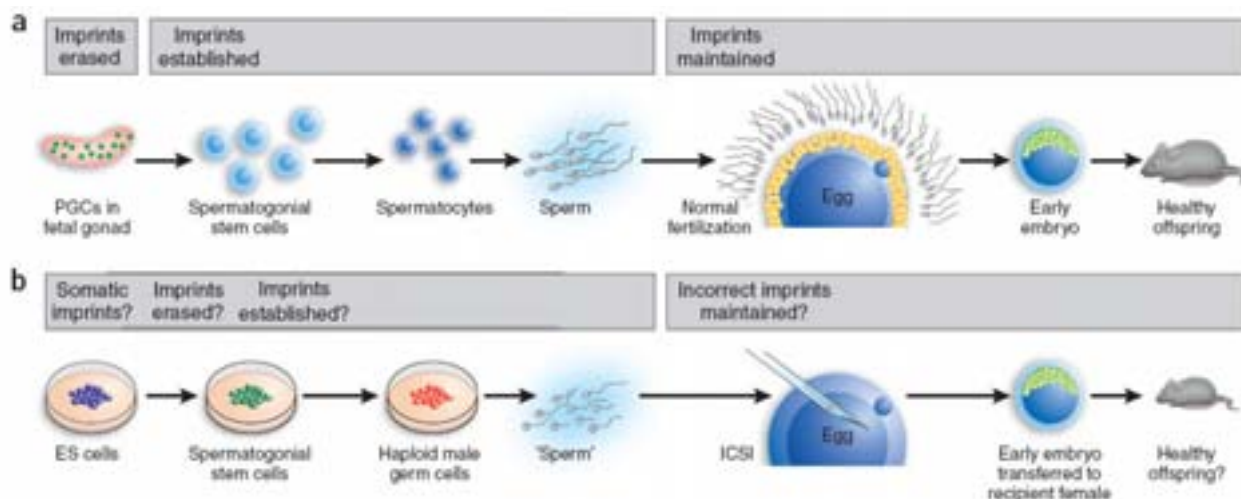
تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به سلول‌های زاینده بدوی

در مقایسه با سلول‌های موشی، تا پیش از این توانایی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در تمایز آزمایشگاهی به سلول‌های زاینده

می‌توانند منجر به ایجاد تولد موش‌های زنده شوند گامی مهم است، اما این مشاهده که این موش‌ها غیرطبیعی‌اند و اختلالات نشانه‌گذاری دارند پیشنهاد می‌کند که کاربردهای درمانی این دستاوردها در آینده هنوز دور از دسترس است. پر واضح است که اسپرم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی را می‌توان به عنوان مدلی برای تحقیق روی تکوین طبیعی و پاتولوژیک سلول‌های زاینده استفاده کرد. به‌ویژه در مورد انسان که به واسطه محدودیت‌های اخلاقی، دسترسی به بافت‌های جنینی مورد نیاز برای این گونه تحقیقات مشکل است. با این حال اهمیت این فناوری در درمان‌های نازایی و به‌عنوان منبعی برای گامت‌ها از لحاظ تحقیقاتی بسیار ارزشمند است. تولید اووسیت از سلول‌های بنیادی انسانی می‌تواند برای به دست آوردن سلول‌های ES ویژه بیمار^۱ به کمک انتقال هسته سلول سوماتیک^۲ بسیار ارزشمند باشد.

مطالعه نیرنیا و همکاران سئوالات فراوانی را برای آینده تحقیقات برانگیخت. برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی تا چه اندازه فراگیر است و در سیستم‌های کشت در مقایسه با وضعیت موجود در موجود زنده، در چه زمانی رخ می‌دهد؟ مطالعه برنامه‌ریزی مجدد توالی‌هایی غیر از ژن‌های نشانه‌گذاری شده نیز مهم است؛ آیا دیگر نشانه‌های اپی‌ژنتیکی نظیر مشخصات کروماتینی نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد؟ آیا می‌توان

1. Patient-specific
2. Somatic cell nuclear transfer



شکل ۲۰. زاده‌های حاصل از سلول‌های زاینده نر مشتق از سلول‌های ES (a) نوع تخصصی و طبیعی سلسله رخدادها طی اسپرماتوژنز موشی و زمان‌بندی طبیعی پاک شدن نشانه گذاری‌ها، برقراری و حفظ آن. (b) راهکار نیرینا و همکاران [۵۳] برای به دست آوردن سلول‌های زاینده نر مشتق از سلول‌های ES به منظور خلق زاده‌های زنده. برای سادگی، مراحل تکوین طبیعی سلول‌های زاینده نر با مراحل کار نیرینا و همکاران در پیش گرفتند جفت شده است؛ این مطابقت خام ممکن است از لحاظ زیستی صحت نداشته باشد. به دست آوردن اسپرم در شرایط آزمایشگاهی منجر به پاک شدن ناقص نشانه گذاری، برقراری یا حفظ آن می‌شود [۵۷].

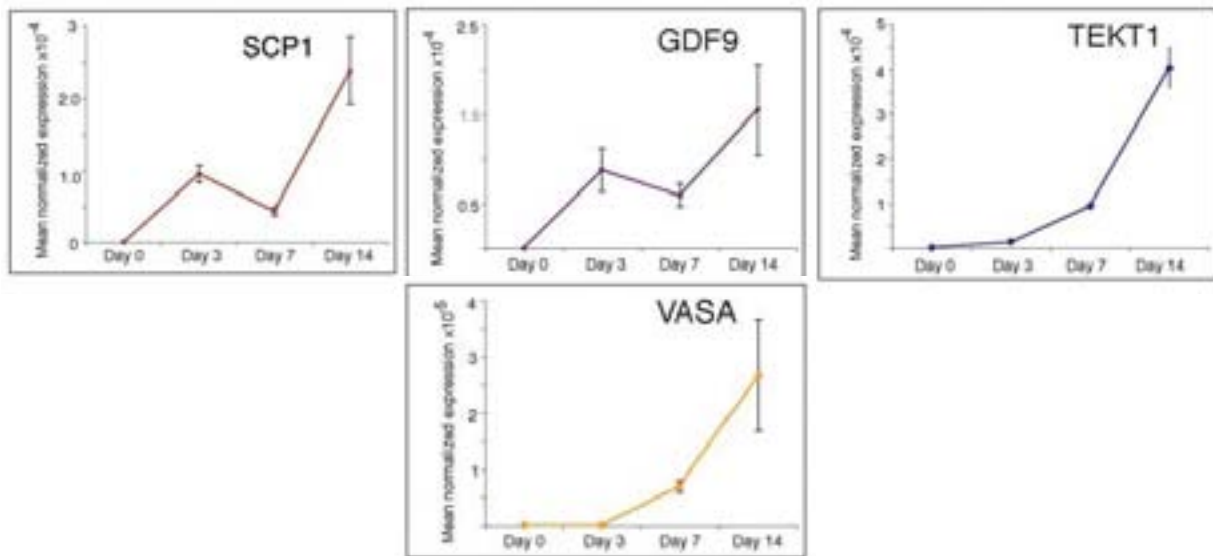
PUM1 (PUMILIO 1)، PUM2 (PUMILIO 2) [۵۸] و همچنین آن‌ها نشان دادند که نشانگرهای پیشرفت میوزی از جمله SYCP1، SYCP3 و VASA در EBهای ۳ روزه شروع به بیان شدن می‌کنند و در EBهای ۱۴ روزه به حداکثر خود می‌رسند (شکل ۲۱). همچنین بیان TEKT1 [۵۹]، ژن اختصاصی گامت‌های نر نیز الگوی مشابهی دارد.

کی (Kee) و همکاران [۶۰] همچنین در مطالعه دیگری و این بار با استفاده از مخلوطی از فاکتورهای رشد خانواده BMP ها از جمله BMP4، BMP7 و BMP8b نشان دادند که همانند سلول‌های موشی، مسیر پیام‌رسانی BMP در تخصصی شدن سلول جنسی از سلول‌های بنیادی جنینی انسان نیز درگیر است. آن‌ها نشان دادند که با کاربرد این مخلوط فاکتورهای رشد بیان ژن‌های SYCP3 و VASA نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. همچنین درصد سلول‌های VASA- مثبت نیز در بین سلول‌های اجسام شبه جنینی تمایز یافته افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. با این وجود تا به حال هیچ گزارشی مبنی بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به

ناشناخته باقی مانده بود. نکته مهم آن است که معمولاً این سلول‌ها از جنین‌های اهدایی زوج‌های نابارور به دست می‌آیند و از این رو توانایی این سلول‌ها در تمایز به گامت بسیار تعجب‌آور خواهد بود. بنابراین در گام اول لازم بود تمایز آزمایشگاهی این سلول‌ها به سلول‌های زاینده بدوی بررسی شود. کلارک (Clark) و همکاران [۲۳] با تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به اجسام شبه جنینی و ارزیابی بیان نشانگرهای مختلف شاخص تکوین دودمان زاینده، در سطح mRNA و پروتئین نشان دادند که این سلول‌ها قادرند در تمایز به سلول‌های پیش‌ساز جنسی شرکت کنند. آن‌ها علاوه بر OCT4 که در سلول‌های ES و جنسی هر دو بیان می‌شود، بیان دیگر ژن‌ها را که ویژه سلول‌های زاینده^۱ یا غنی در سلول‌های زاینده^۲ هستند را نیز ارزیابی کردند. از آن جمله STELLA- STELLAR، GDF3 (related)، NANOG، NANOS1، DAZL، VASA، cKIT.

1. Germ cell-specific
2. Germ cell-enriched

Gonadal germ cell enriched genes



شکل ۲۱. بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جنسی در روز سوم تمایز EB آغاز می‌شود و به‌طور کلی تا روز ۱۴ روند فزاینده‌ای دارد [۲۳].

گامت‌های پس میوزی منتشر نشده است. همچنین پاک شدن الگوی متیلاسیون نیز در این سلول‌ها آزمایش نشده است.

گامت‌های پس میوزی منتشر نشده است. همچنین پاک شدن الگوی متیلاسیون نیز در این سلول‌ها آزمایش نشده است.

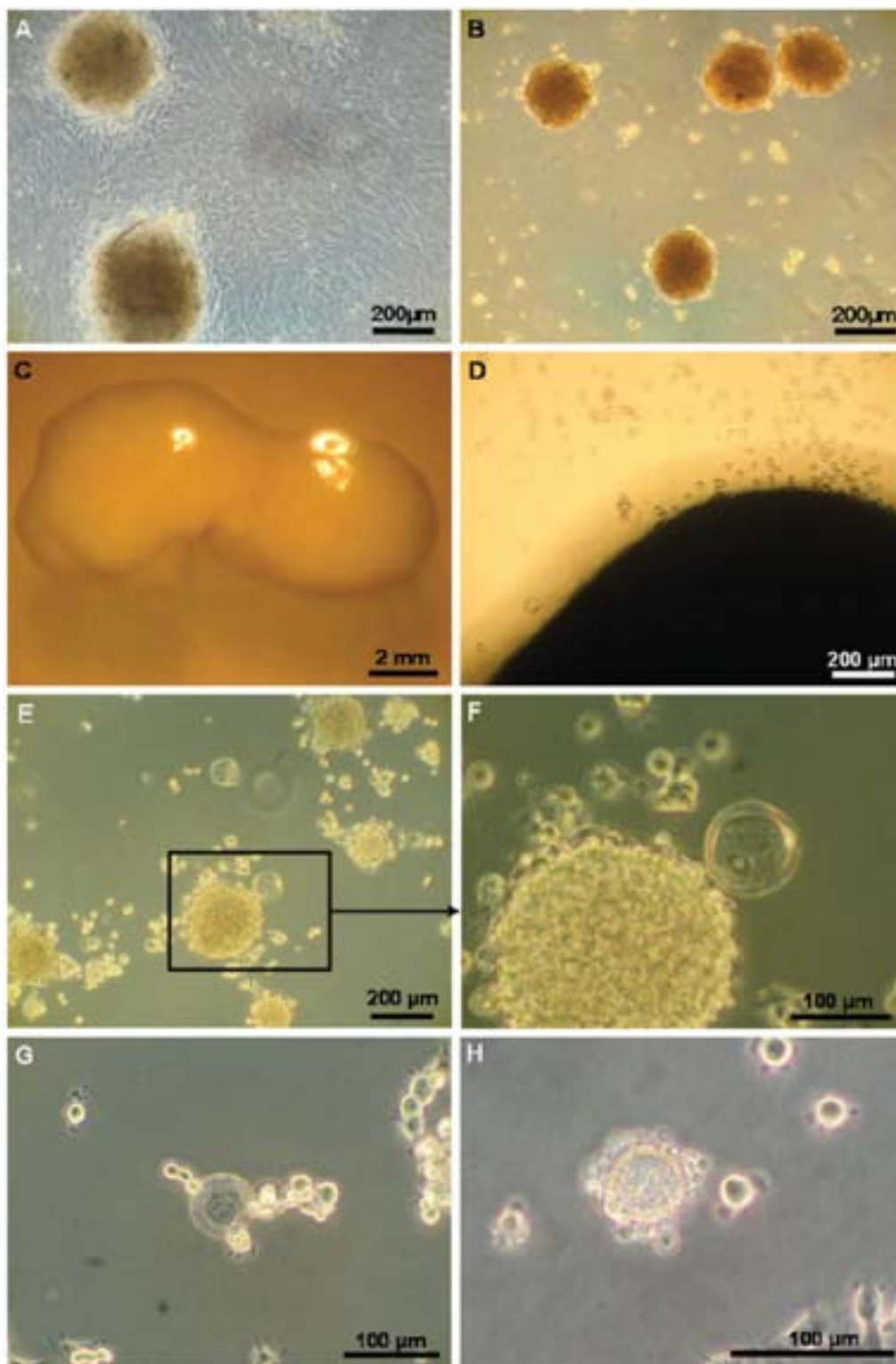
تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی بزرگسال به سلول‌های زاینده از پانکراس به گامت

به تازگی محققان توانسته‌اند از سلول‌های بنیادی بزرگسال نیز سلول‌های زاینده به‌دست آورند. داتر (Danner) و همکاران [۶۱] برای اولین بار توانستند سلول‌های کلونی بنیادی بزرگسال پانکراسی را به سلول‌های شبه اووسیت تبدیل کنند. سلول‌های بنیادی بالغ پانکراسی^۱ (APS) سلول‌هایی هستند که می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی به‌طور خودبه‌خودی به انواع سلول‌های رویشی تمایز پیدا کنند. سلول‌های بنیادی جدا شده از پانکراس می‌توانند در کشت طولانی مدت، تا حد بالایی حیات و ویژگی خودنوسازی شان را حفظ کنند. همچنین این سلول‌ها نشانگرهای اختصاصی بارز سلول‌های بنیادی نظیر

Oct4، Nestin [۶۲] و SSEA1 را بیان می‌کنند. اگر چه پتانسیل تمایزی این سلول‌ها با افزایش پاساژ کاهش می‌یابد اما این سلول‌ها را می‌توان تا پاساژ ۱۴۰ نگهداری کرد. دودمان‌های سلولی کلون شده این سلول‌ها را می‌توان از پاساژهای مختلف به دست آورد که ویژگی‌های مشابهی نشان می‌دهند. این سلول‌های کلونی در کشت سوسپانسیون اجتماعی^۲ را تشکیل دادند که ساختارهای شبه بافتی^۳ به‌وجود آوردند (شکل ۲۲). این اجتماعات سه بعدی در لبه خود سلول‌های جدیدی را به‌وجود آورده و رها کردند که از لحاظ اندازه و با توجه به مطالعه میکروسکوپی، مورفولوژی شبه اووسیتی داشتند (شکل ۲۲). مقایسه الگوی بیان ژنی بین کشت اولیه پاساژهای ۸، ۷۵ و دودمان‌های سلولی کلونی و سلول‌های شبه اووسیتی (OLCs)^۴ تولید شده از ساختارهای شبه بافتی، تفاوت‌هایی را نشان می‌داد. بیان نشانگرهای مختلف سلول‌های زاینده مانند vasa، GDF9 و SSEA1 در دودمان‌های سلولی کلونی افزایش پیدا کرد (شکل ۲۳)؛ OLC‌ها همچنین

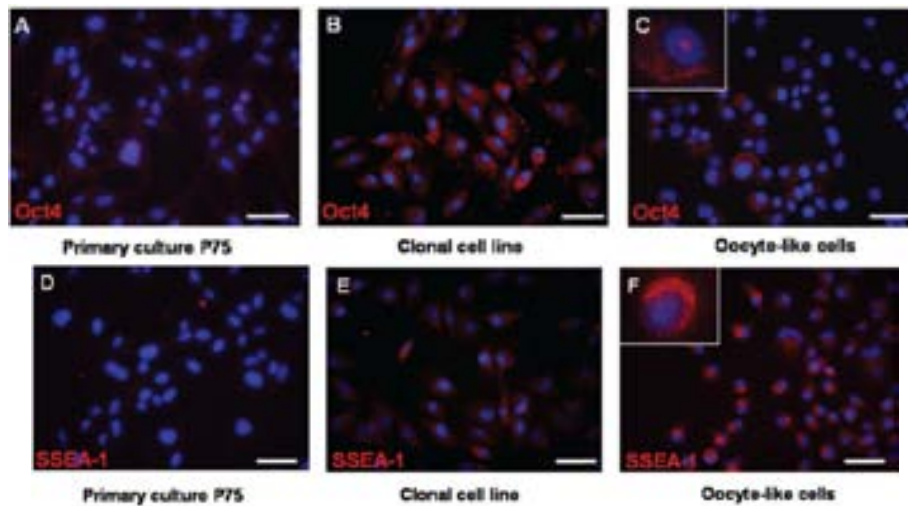
2. Aggregates
3. Tissue-like structures
4. Oocyte-like cells

1. Adult Pancreatic Stem

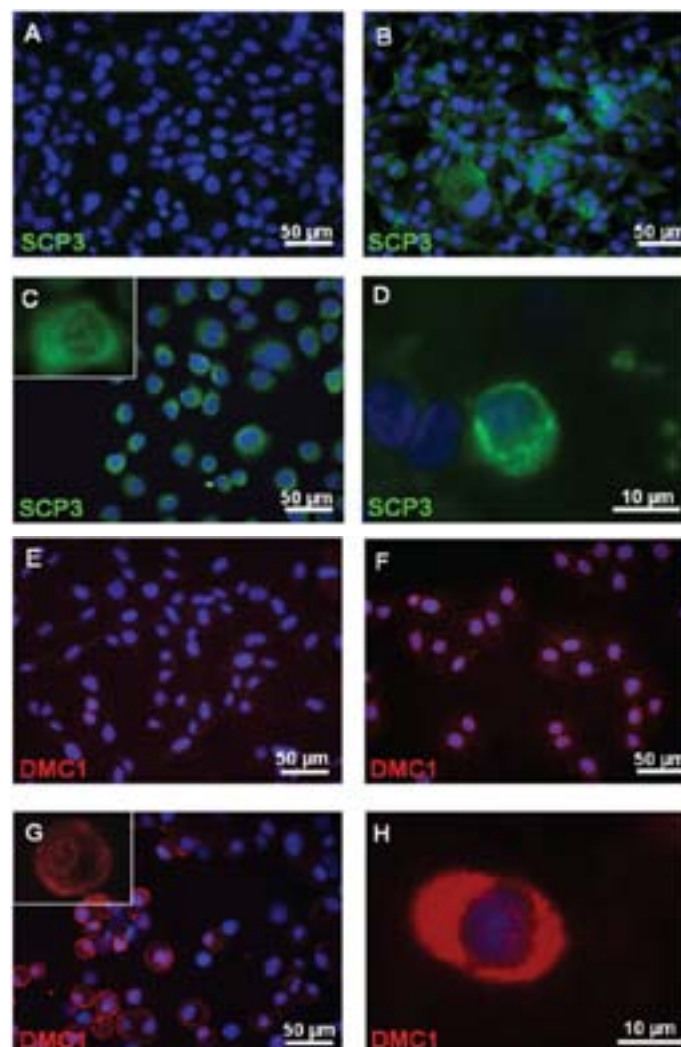


شکل ۲۲. ویژگی‌های ریختی اجسام شبه‌اندامی^۱، اجسام شبه بافتی^۲ و سلول‌های شبه اووسیتی. A: ریخت اجسام شبه‌اندامی چسبیده و در حال رشد و سلول‌های بیرون زده از آنها. B: اجتماع اجسام شبه‌اندامی در کشت معلق. C: جسم شبه بافتی. D: جسم شبه بافتی و سلول‌های کروی شکل منفرد که در حال جدا شدن از آن هستند. E: سلول‌های منفرد بزرگ با شکل تخم مرغی و اجتماعات شکل گرفته. F: بزرگ‌نمایی بیشتر شکل E که یک سلول شبه اووسیتی را نشان می‌دهد. G: سلول شبه اووسیتی. H: ساختار شبه اووسیتی [۶۱].

1. Organoid bodies
2. Tissue bodies



شکل ۲۳. روش ایمنوسیتوشیمی برای تعیین محل Oct4 و SSEA1 در جمعیت سلولی اولیه از پاساژ ۷۵ (A و D)، جمعیت سلولی کلونی برقرار شده از سلول‌های اولیه (B و E) و سلول‌های شبه اووسیتی به دست آمده از سلول‌های کلونی (C و F). هسته‌ها به وسیله DAPI به رنگ آبی درآمده‌اند. [۶۱]



شکل ۲۴. روش ایمنوسیتوشیمی برای تعیین محل نشانگرهای میوزی SCP3 و DMC1 در جمعیت سلولی اولیه از پاساژ ۷۵ (A و E)، جمعیت سلولی کلونی برقرار شده از سلول‌های اولیه (B و F)، و سلول‌های شبه اووسیتی به دست آمده از سلول‌های کلونی (C و G). اووسیت رت به عنوان کنترل استفاده شده است (D و H). هسته‌ها به وسیله DAPI به رنگ آبی درآمده‌اند [۶۱].

تیمار سلول‌های مغز استخوان با RA، بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های مختلف زاینده را مشاهده کردند؛ برای مثال Oct4، Mvh، Rnf17، stella، fragilis (نشانگرهای سلول‌های زاینده بدوی) و همچنین Stra8، Tex18، c-kit، Rbm، Hsp90 α ، Dazl، Piwil2، و اینتگرین‌های β 1 و α 6 که از نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند (شکل ۲۵). این گروه نشان دادند که سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش می‌توانند از طریق تیمار با RA به سلول‌های زاینده بدوی (PGCs) تمایز یابند. با این حال این سلول‌ها چه در محیط کشت و چه پس از پیوند به موش‌های نابارور شده از طریق تیمار با بیوسولفان نتوانستند به سلول‌های جنسی بالغ تر و در نهایت اسپرم تمایز یابند.

نتیجه‌گیری، پیشه اندازه‌ها و پالاش‌ها

تکرار تکوین تولید مثلی در شرایط آزمایشگاهی، احتمالاً در ۳۰ سال گذشته در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا که با سلول‌های بنیادی جنینی کار می‌کرده‌اند، اتفاق افتاده است اما به‌واسطه مشکلات مربوط به مشاهده این فرایند گذرا در محیط کشت، هنوز به‌صورت ناشناخته باقی مانده است. به‌علاوه بیان مشترک نشانگرهایی از قبیل AP و SSEA-1 موجب سر درگمی در تشخیص اولیه PGC‌های ناشی از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. اگر چه خلق ترنس ژن‌های جدید برخی از کشفیات اخیر که در اینجا آورده شد را تسهیل می‌کند، اما دشواری‌هایی شناسایی بیشتر ویژگی‌هایی که خاص PGC‌های اولیه باشند، هنوز پابرجاست. به‌منظور تولید گامت از سلول‌های بنیادی پرتوان استراتژی‌های مختلفی اتخاذ شده است (جدول ۱). برخی آزمایشگاه‌ها از EB برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به PGC استفاده کرده‌اند. اجسام شبه جنینی هنگامی تشکیل می‌شوند که سلول‌های بنیادی جنینی در سوسپانسیون کشت شوند که در این حالت با حذف فاکتورهای حفظ‌کننده پرتوانی، سلول‌ها اجازه پیدا می‌کنند تا درون اجتماعات کرومی تمایز یابند.

نشانگرهای ویژه میوزی SCP3 و DMC1 را بیان کردند (شکل ۲۴).

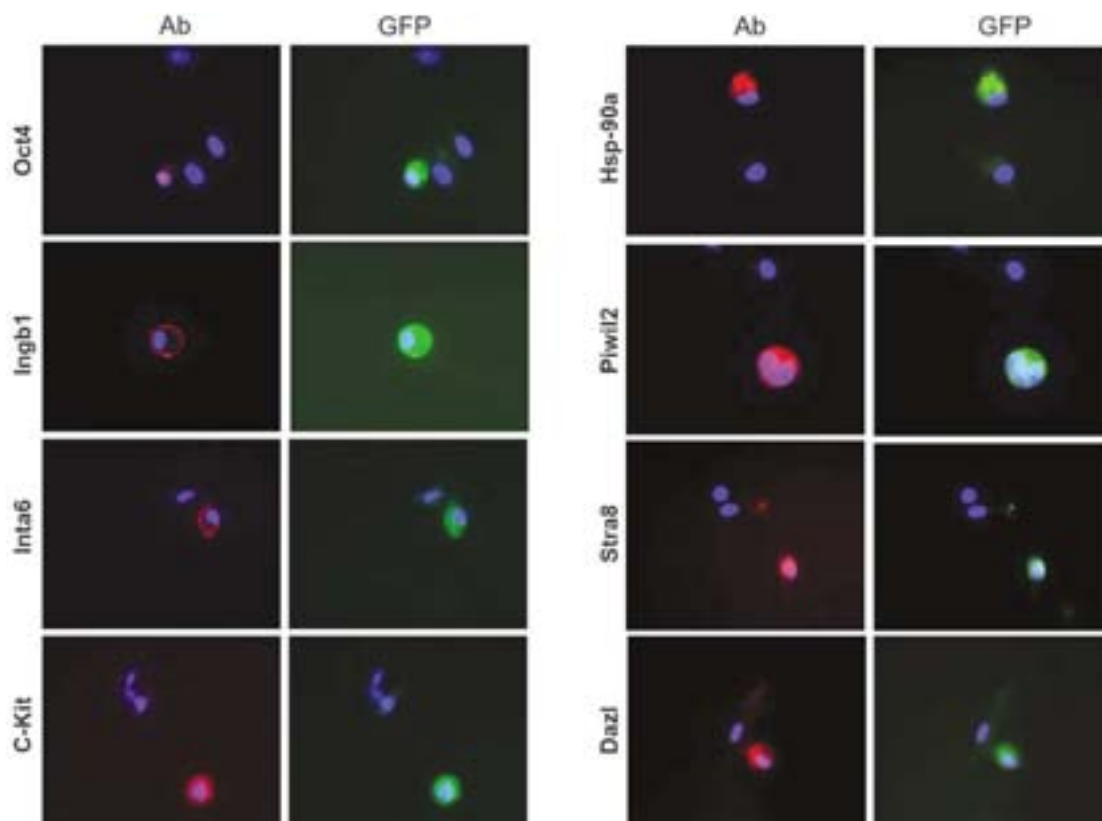
از پوست به گامت

دایس (Dyce) و همکاران [۶۳] نشان دادند که سلول‌های بنیادی جدا شده از پوست جنین‌های خوکی دارای توانایی ذاتی تمایز به سلول‌های شبه اووسیتی هستند. با القای تمایز، زیر جمعیتی از این سلول‌ها نشانگرهایی مانند Oct4، GDF9b، Vasa و DAZL را بیان می‌کردند که همگی از مشخصات سلول‌های زاینده هستند. با ادامه تمایز، این سلول‌ها اجتماعات شبه فولیکولی تشکیل دادند که استرادیول و پروژسترون ترشح می‌کردند و به تحریک با گنادوتروپین پاسخ می‌دادند. برخی از این اجتماعات، سلول‌های بزرگ شبه اووسیتی از خود آزاد می‌کردند که نشانگرهای اووسیتی، از جمله زوناپلوسیدا و نشانگرهای میوزی مانند SCP3 را بیان می‌کردند. برخی از این سلول‌های شبه اووسیتی به طور خودبخودی به ساختارهای شبه جنینی پارتوژنتیک تکوین پیدا می‌کردند.

از خون به گامت

نیرنیا و همکاران [۶۴] نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که سلول‌های بنیادی مغز استخوان^۱ می‌توانند به سلول‌های زاینده ترانتمایز^۲ یابند. این گزارش ثابت کرد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان علاوه بر توانایی تمایز به سلول‌های رویشی^۳ دودمان‌های غیرخونی مانند سلول‌های ریوی، کبد و حتی مغزی، می‌توانند به سلول‌های دودمان زایشی نیز ترانتمایز یابند. نیرنیا و همکاران از سلول‌های مغز استخوان موش‌های ترنس ژنتیکی استفاده کردند که ژن EGFP را تحت پروموتور Stra8 (تحریک شونده با RA) بیان می‌کردند و در نتیجه سلول‌های زاینده موش‌های نر به رنگ سبز در می‌آمدند. آن‌ها با

1. Bone Marrow Stem Cells
2. Transdifferentiation
3. Somatic



شکل ۲۵. بررسی ایمنوهیستوشیمی سلول‌های EGFP- مثبت مشتق از BMS پس از ۷ روز تیمار با RA. آنتی‌بادی (Ab) های اختصاصی علیه Oct4، نشانگر های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یعنی اینتگرین $\beta 1$ (Ing1b) و اینتگرین $\alpha 6$ (Inga6)، نشانگرهای اسپرماتوگونی یعنی c-kit، HSP90 α ، Piwil2، Stra8 و Dazl استفاده شده‌اند (همگی قرمز). هسته‌ها به وسیله DAPI به رنگ قرمز درآمده‌اند [۶۴].

می‌رسد که EB ها کنام PGC ها در دوره جنینی را فراهم می‌کنند؛ ریز محیطی که در آن، سلول‌های زاینده نشانگرهای عملکردی و مولکولی تکوین دودمان جنسی را بیان می‌کنند. اجسام شبه جنینی به آسانی تولید می‌شوند و ابزار مناسبی برای دستکاری‌های ژنتیکی در شرایط طبیعی فراهم می‌سازند، آن‌ها جوابگوی تکنولوژی‌های جدید از قبیل کتابخانه‌های RNAi لنتی ویروسی یا رترو ویروسی هستند که ممکن است برای پروب‌های مؤثر فاکتورهای ضروری در تعهدمندی دودمان جنسی به‌کار گرفته شوند. به‌علاوه عوامل مولکولی کوچک، آنتی‌بادی‌های خنثی، یا پروتئین‌های نوترکیب محلول را می‌توان به منظور اثر بر محیط EB و تکوین PGC به آسانی به محیط کشت افزود. چنین روش‌های غربالگری در ابعاد بزرگ به‌واسطه کسب ژن‌ها و مسیرهای درگیر در تخصصی

اجسام شبه جنینی دارای این مزیت منحصر به فردند که تماس‌های بین سلولی را در خود فراهم می‌کنند و در این شرایط برخی جنبه‌های تکوین جنینی در شرایط آزمایشگاهی تقلید می‌شود. PGC های مشتق شده از EB تعدادی از نشانگرهای سلول جنسی از جمله stella، fragilis، mvh، SSEA1 و oct4 را بیان می‌کنند. این سلول‌ها از لحاظ عملکرد مشابه PGC های موجود زنده هستند. چرا که آن‌ها به تحریک BMP4 پاسخ می‌دهند، نشانه‌گذاری‌های والدی را پاک می‌کنند و توانایی ایجاد بیضه موشی و تولید اسپرم عملگر را دارند. محققان دریافته‌اند که جمعیت نادری از PGC‌های حاصل از EB می‌توانند متحمل میوز شوند و با تولید اسپرماتیدهای کروی قادرند پس از تزریق به اووسیت موش، جنین‌های مرحله بلاستوسیست تولید نمایند. بنابراین به نظر

جدول ۱. مطالعات آزمایشگاهی تولید گامت

نویسنده	منبع سلولی ^۱	نحوه کار	تولید گامت ^۲	محصول نهایی ^۳
تولید آزمایشگاهی گامت ماده				
[27]	mESC (Pou5f1-reporter)	کشت تک لایه بدون استفاده از سلول‌های تغذیه کننده	S	شبه اووسیت، شبه بلاستوسیت
[30]	mESC	استفاده از محیط شرطی حاصل از سلول‌های بیضه ای در تمایز EB	I	شبه اووسیت
[23]	hESC	تمایز خدو بخودی EB	S	بیان ژن‌های میوزی
[61]	Adult Pancreatic Cells	تمایز خدو بخودی	S	شبه اووسیت، شبه بلاستوسیت
[63]	Fetal Porcine Skin	تمایز خدو بخودی	S	شبه اووسیت، شبه بلاستوسیت
تولید آزمایشگاهی گامت نر				
[29]	mESC (Ddx4-reporter)	EB، انتخاب سلول‌های Ddx4 ⁺ ، اجتماع با سلول‌های برآمدگی تناسلی، اثر مثبت BMP4	S&I	اسپرمتوزوآ
[28]	mESC	EB، انتخاب سلول‌های FE-J1 ⁺ ، اثر مثبت RA	S&I	IVF، شبه بلاستوسیت
[53]	mESC (Stra8- & Prm1-reporter)	کشت تک لایه، تیمار با RA، انتخاب سلول‌های Stra8 ⁺ برای کشت، انتخاب سلول‌های Prm1 ⁺ برای IVF	I	IVF، نوزاد، پیوند به بیضه
[64]	mESC (Stra8- & Prm1-reporter)	کشت تک لایه، تیمار با RA، انتخاب سلول‌های Stra8 ⁺ برای کشت	I	پیوند به بیضه
[23]	hESC	EB	S	بیان ژن‌های میوزی

۱: سلول آغازین برای تولید گامت؛ موشی (m)، انسانی (h). ۲: تمایز خودبه‌خودی (S) یا القایی (I) سلول‌های پرتوان به دودمان جنسی. ۳: محصول نهایی تمایز که آنالیزهای کاربردی بودن روی آن انجام شده است.

تکوینی سلول جنسی تولید کند. در صورتی که این روش به اجرا در آید، امکان مطالعات بیان ژن در مقیاس ژنومی یا chromatin immunoprecipitations برای ارزیابی پروفایل کامل نشانگرها و عوامل فرودست در طول بلوغ PGC ها فراهم می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت که تعداد کمی از فاکتورها برای القای تکوین PGC کافی هستند. در نهایت این امر فراهم کننده مواد کافی برای مطالعه در یک سبک کنترل شده خواهد بود از جمله ماهیت بیوشیمیایی، تخصصی شدن PGC، پاک شدن نشانه‌گذاری، غیرفعال سازی یا دوباره فعال سازی کروموزوم X و سایر مکانیسم‌های خاص رده جنسی.

می‌توان برخی از موانع را که ممکن است از تکوین تمایز

شدن رده جنسی معمولاً در موجود زنده امکانپذیر نیست و ممکن است موجب پیشرفت مطالعه سلول جنسی شوند.

مزیت دیگر EB ها فراهم کردن محیطی سه بعدی است؛ با این حال به دلیل پیچیدگی انواع پیام‌رسانی‌ها و نیز سلول‌هایی که تولید می‌شوند ممکن است نتایج گیج کننده‌ای به دست آیند. یک پروتکل دو بعدی برای تمایز PGC ها این پیچیدگی‌ها را کاهش می‌دهد. با چنین سیستمی، هر کس می‌تواند به‌طور اختصاصی فاکتورهای درگیر در تمایز PGC ها را کنترل نماید و سلول‌هایی همگون^۱ در مراحل مختلف

1. Homogenous

PGC سیگنال BMP4. اگر چه یکسانی این حد واسط‌های سلولی فرضی ناشناخته است، یک گزینه می‌تواند حد واسطی شبیه اکتودرم اولیه یا سلول‌هایی شبیه به اپی‌بلاست باشد. این سلول‌ها می‌توانند نامزدی برای حد واسط مورد نظر باشند چرا که آن‌ها در موجود زنده پیش ساز سلول‌های PGC هستند. از این روست که سیستم کشت دو بعدی برای فراهم آوردن شرایط تمایز PGC ها ممکن است نیازمند دستکاری‌های خاص باشد تا از این طریق حدواسط‌های حساس به BMP4 تولید کند. شاید به این روش بتوان این حدواسط را ایجاد کرد.

باید در نظر داشت که سلول‌های بنیادی و سلول‌های اپی‌بلاست ژن‌هایی از قبیل oct4, fragilis, nanag را نیز بیان می‌کنند. این هم‌پوشانی پروفایل بیان و بیان نسبتاً سریع نشانگرهای PGC پس از مهاجرت (از قبیل vasa) در حد یک روز پس از القاء با BMP4 در موش و یک هفته در EB های انسانی، فرضیاتی را در ذهن ایجاد می‌کند: ظاهراً کلونی‌های سلول‌های بنیادی انسانی و موشی تمایز نیافته، در ابتدای فرایند تمایز به صورت هتروژن حاوی برخی از سلول‌های مشابه حالت اپی‌بلاستی یا حتی شبه PGC هستند. کلونی‌های سلول‌های بنیادی میمون و انسان از لحاظ مورفولوژیکی شبیه قطعات پهنی از سلول‌های کشت شده اپی‌بلاست موشی هستند. هر دو سلول‌های ICM و PGC انسانی و موشی، قابلیت تغییرپذیری تکوینی را حتی پس از تعهدمندی اولیه‌شان در موجود زنده نمایش می‌دهند؛ آن‌ها می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی دودمان‌های سلول جنسی جنینی و سلول‌های بنیادی مشتق شده را تشکیل دهند. مطالعات مقایسه‌ای آینده شباهت‌ها و تفاوت‌های بین این رده‌های سلولی مختلف و هم‌تاهای آن‌ها در موجود زنده را روشن می‌کند.

مشاهدات مستقل در مورد تشکیل ساختارهای شبه اووسیت ماده در کشت‌های تک لایه و سلول‌های زاینده هاپلوئید نر در EB ها و اسپرماتوزوآها (پس از پیوند به بیضه)

دو بعدی PGC جلوگیری کند را تصور کرد و برای برطرف نمودن آن، برخی راه حل‌ها را پیشنهاد کرد. با توجه به موقعیت فضایی پیچیده پیش سازهای PGC موجود زنده، این نگرانی وجود دارد که ممکن است برای تشکیل PGC در شرایط آزمایشگاهی، بر همکنش‌های سه بعدی ضروری باشند. با این حال هابنر (Hubner) و همکارانش پیش از این ثابت کردند که با فراهم کردن امکان تمایز خودبه‌خودی سلول‌های بنیادی جنینی در غیاب LIF، تمایز PGC ها در محیط کشت‌های دو بعدی امکان‌پذیر است. این مشاهده پایه‌ای امیدوارکننده می‌تواند به عنوان مقدمه‌ای برای ساخت یک سیستم مؤثرتر استفاده شود. بنابراین تشکیل خودبه‌خودی PGC به‌وسیله طولانی‌تر کردن مدت زمان کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط‌های حاوی سرم، انجام می‌شود. متأسفانه سرم حاوی بسیاری از فاکتورهای رشد ناشناخته‌ای است که تفسیر نتایج را پیچیده می‌سازد. بنابراین یک پیشنهاد می‌تواند استفاده از محیط‌های بدون سرم به همراه افزودن کنترل شده فاکتورهای القاگر تمایز PGC ها باشد.

پروتئین‌های BMP، پیام‌های پاراکرین ضروری برای تکوین PGC در شرایط طبیعی هستند و احتمالاً برای تمایز PGC ها در شرایط آزمایشگاهی نیز ضروری خواهند بود. با این حال با توجه به آنکه این پیام‌ها، به‌ویژه BMP4، برای حفظ سلول‌های بنیادی جنینی در حالت تمایز نیافته لازم هستند؛ استفاده از آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی پیچیده می‌شود. در حقیقت هنگامی که سلول‌های بیان کننده BMP4 با سلول‌های بنیادی جنینی معلق یا چسبیده، هم‌کشت می‌شوند القای PGC‌ها مشاهده نشده است. در عوض در صورتی که سلول‌های بنیادی جنینی به‌همراه سلول‌های تولید کننده BMP4 مجتمع شده و به صورت EB درآیند سلول‌های شبه PGC را در روز اول انکوباسیون به‌وجود می‌آورند. در این مورد به نظر می‌رسد که تشکیل EB یک مقصد حد واسط ضروری فراهم می‌کند تا برای پاسخ به جنبه القاکنندگی

بیشتری برای استفاده درمانی در انواع بیماری‌ها هستند.

به نظر می‌رسد که در آینده‌ای نه چندان دور با در نظر گرفتن آنچه که در شرایط طبیعی تکوین جنینی اتفاق می‌افتد و برقرار نمودن این شرایط در محیط آزمایشگاهی بتوان از سلول‌های بنیادی پرتوان یا حتی سلول‌های بالغ‌تر، گامت‌های نر و ماده را با کیفیت و بازده بیشتری به دست آورد. این موفقیت می‌تواند اولاً به افزایش درک محققان نسبت به ماهیت سلول‌های زاینده و مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تعهد، تخصصی شدن، تمایز و بلوغ آن‌ها منجر شود و ثانیاً امکان استفاده از این سلول‌ها در طب پیوند برای درمان ناباروری و همچنین استفاده از اووسیت‌های تولید شده انسانی در ایجاد سلول‌های بنیادی پرتوان ویژه بیمار با کمک فناوری شبیه‌سازی درمانی را فراهم آورد.

مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی (جنینی و بزرگسال) در آینده خواهد توانست ضمن افزایش درک محققان نسبت به زیست‌شناسی سلول‌های زاینده و نحوه تخصصی شدن، تکوین و بلوغ آن‌ها و همچنین شناسایی عوامل مختلف ایجاد ناباروری، زمینه استفاده از گامت‌های مشتق از این سلول‌ها در درمان ناباروری‌ها را فراهم آورد.

شواهد بیشتری از تکوین PGC از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی را ارائه می‌دهند. توانایی سلول‌های زاینده مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی برای شروع، بلوغ و فعال‌سازی میوزی و تشکیل ساختارهای شبه جنینی اولیه، مطالعات بیشتری را می‌طلبد تا تعیین کند که آیا این ساختارهای شبه اووسیت می‌توانند برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای و تکوین جنینی نرمال را پشتیبانی کنند یا خیر. باید در نظر داشت که هر دو سیستم کشت EB و تک لایه، برای پشتیبانی پیشرفت گامت‌زایی، به تکوین خودبه‌خودی سلول‌های استرومایی مناسب بستگی دارد. این دو سیستم موشکافی بیشتر مسیرهای پیام‌رسانی کلیدی در اووژنز و اسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی را تسهیل می‌نمایند.

سلول‌های بنیادی جنینی با وجود پتانسیل‌های بالقوه تمایزی، هنوز از استفاده بالینی در درمان بسیار دورند. در حقیقت دانش ما درخصوص بیولوژی این سلول‌ها اندک است؛ همچنین کنترل تمایز جهت دار این سلول‌ها هنوز از عهده محققان خارج است. در این بین سلول‌های بنیادی بزرگسال هر چند که نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی از پتانسیل‌های کمتری برخوردارند با این وجود دارای شانس

References

1. **Lawson KA.** Fate mapping the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 1999; 43(7): 773-5.
2. **Lawson KA , Hage WJ.** Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 1994; 182: 68-84.
3. **udley BM, Runyan C, Takeuchi Y, Schaible K, Molyneaux K.** BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mech Dev* 2007; 124(1): 68-77.
4. **Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al.** Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Gene Dev* 1999; 13(4): 424-36.
5. **Zhao GQ, Liaw L, Hogan BL.** Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis. *Development* 1998; 125(6): 1103-12.
6. **Tabata MJ, Fujii T, Liu JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, et al.** Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(2): 114-20.
7. **Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al.** Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436(7048): 207-13.
8. **Baughman JM , Geijsen N.** In vitro generation of germ cells: new techniques to solve current issues.

- Ann NY Acad Sci 2005; 1061: 33-40.
9. **Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, et al.** Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol* 2003; 13(23): 2110-7.
 10. **Saitou M, Barton SC, Surani MA.** A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 418(6895): 293-300.
 11. **Tanaka SS, Matsui Y.** Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 119: S261-7.
 12. **Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, et al.** Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8(6): 623-30.
 13. **Saitou M, Payer B, O'Carroll D, Ohinata Y, Surani MA.** Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* 2005; 4(12): 1736-40.
 14. **MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P.** Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 1995; 121(5): 1487-96.
 15. **Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, et al.** The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* 2005; 132(6): 1315-25.
 16. **Hayashi Y, Hayashi M, Kobayashi S.** Nanos suppresses somatic cell fate in Drosophila germ line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(28): 10338-42.
 17. **Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M.** Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5): 535-45.
 18. **Miura N, Suda T.** Stem cell factor/c-kit interaction in primordial germ cell, melanoblast and hematopoietic progenitors. *Gan To Kagaku Ryoho* 1992; 19(11): 1777-85.
 19. **Tres L L, Rosselot C, Kierszenbaum A L.** Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol Reprod Dev* 2004; 68(1): 1-4.
 20. **Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N.** Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct Funct* 2001; 26(3): 131-6.
 21. **Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP.** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(17): 9585-90.
 22. **Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, et al.** Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 2004; 131(4): 839-49.
 23. **Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, et al.** Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 2004; 13(7): 727-39.
 24. **Rocchietti-March M, Weinbauer GF, Page DC, Nieschlag E, Gromoll J.** Dazl protein expression in adult rat testis is up-regulated at meiosis and not hormonally regulated. *Int J Androl* 2000; 23(1): 51-6.
 25. **Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A.** DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(6): 405-11.
 26. **Denny P, Swift S, Connor F, Ashworth A.** An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Embo J* 1992; 11 (10): 3705-12.
 27. **Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La et al.** Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300(5623): 1251-6.

28. **Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ.** Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427 (6970): 148-54.
29. **Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T.** Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11457-62.
30. **Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A.** Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cell* 2006; 24(2): 266-73.
31. **Ko K, Scholer HR.** Embryonic stem cells as a potential source of gametes. *Semin Reprod Med* 2006; 24(5): 322-9.
32. **Pesce M, Scholer HR.** Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(4): 452-7.
33. **Beckstead JH.** Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1983; 7(4): 341-9.
34. **Noce T.** [Functional analyses of mammalian spermatogenic genes]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1998; 43(4): 430-7.
35. **Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P.** Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *Embo J* 1990; 9(7): 2185-95.
36. **Scholer HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P.** Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *Embo J* 1989; 8(9): 2551-7.
37. **Brehm A, Ovitt CE, Scholer HR.** Oct-4: more than just a POUerful marker of the mammalian germline? *Apmis* 1998; 106(1): 114-24; discussion 124-6.
38. **Pesce M, Scholer HR.** Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cell* 2001; 19(4): 271-8.
39. **Pesce M, Di Carlo A, De Felici M.** The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 1997; 68(1-2): 37-44.
40. **Kolomiets OL, Borbiev TE, Safronova LD, Borisov YM, Bogdanov YF.** Synaptonemal complex analysis of B-chromosome behavior in meiotic prophase I in the East-Asiatic mouse *Apodemus peninsulae* (Muridae, Rodentia). *Cytogenet Cell Genet* 1988; 48(3): 183-7.
41. **Haneji T, Maekawa M, Nishimune Y.** Retinoids induce differentiation of type A spermatogonia in vitro: organ culture of mouse cryptorchid testes. *J Nutr* 1983; 113(6): 1119-23.
42. **Sievers S, Alemazkour K, Zahn S, Perlman EJ, Gillis AJ, Looijenga LH, et al.** IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(3): 256-64.
43. **Cohen DR, Sinclair AH, McGovern JD.** SRY protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10): 4372-6.
44. **Lan ZJ, Gu P, Xu X, Jackson KJ, DeMayo FJ, O'Malley BW, Cooney AJ.** GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *Embo J* 2003; 22(16): 4070-81.
45. **Ruder HJ, Loriaux DL, Sherins RJ, Lipsett MB.** Leydig cell function in men with disorders of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38(2): 244-7.
46. **Berthezene F, Forest MG, Grimaud JA, Claustrat B, Mornex R.** Leydig-cell agenesis: a cause of male pseudohermaphroditism. *N Engl J Med* 1976; 295(18): 969-72.
47. **Mruk DD, Cheng CY.** Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithel-

- ium during spermatogenesis. *Endocrin Rev* 2004; 25(5): 747-806.
48. **Mruk DD, Cheng CY.** Sertolin is a novel gene marker of cell-cell interactions in the rat testis. *J Biol Chem* 1999; 274(38): 27056-68.
 49. **Roth L M, Cleary RE, Rosenfield RL.** Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary, with an associated mucinous cystadenoma. An ultrastructural and endocrine study. *Lab Invest* 1974; 31(6): 648-57.
 50. **Grinsted J, Byskov AG.** Meiosis-inducing and meiosis-preventing substances in human male reproductive organs. *Fertil Steril* 1981; 35(2): 199-204.
 51. **McLaren A.** Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 1984; 38: 7-23.
 52. **Hunter N.** Synaptonemal complexities and commonalities. *Mol Cell* 2003; 12(3): 533-5.
 53. **Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee J H, Rathsack K, Drusenheimer N, et al.** In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 2006; 11(1): 125-32.
 54. **de Rooij D G.** Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 1998; 79(2): 67-80.
 55. **Puglisi R, Tramer F, Carlomagno G, Gandini L, Panfili E, Stefanini M, et al.** PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception* 2005; 72(4): 291-3.
 56. **Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS.** The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000; 9(19): 2885-94.
 57. **Surani M A.** Stem cells: how to make eggs and sperm. *Nature* 2004; 427(6970): 106-7.
 58. **Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, et al.** Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* 2004; 22(2): 169-79.
 59. **Roy A, Yan W, Burns K H, Matzuk M M.** Tektin3 encodes an evolutionarily conserved putative testicular microtubules-related protein expressed preferentially in male germ cells. *Mol Reprod Dev* 2004; 67(3): 295-302.
 60. **Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA.** Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15(6): 831-7.
 61. **Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C.** Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(1): 11-20.
 62. **Lobo M V, Arenas M I, Alonso F J, Gomez G, Bazan E, Paino C L, et al.** Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res* 2004; 316(3): 369-76.
 63. **Dyce PW, Wen L, Li J.** In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 2006; 8(4): 384-90.
 64. **Nayernia K, Lee J H, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, et al.** Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; 86(7): 654-63.