

Bölüm 6

SPERMATOGONİAL KÖK HÜCRELERİN KENDİNİ YENİLEME VE FARKLILAŞMASINI DÜZENLEYEN MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

Meltem YARDIM¹

Damla KAYALP²

GİRİŞ

Dünya genelinde çiftlerin yaklaşık %12'si infertilite sorunu yaşarken bu vakalarının yaklaşık %40-50'sinin erkek faktörüne bağlı infertilite vakaları olduğu düşünülmektedir. Klinik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler erkek üreme sorunları insidansının arttığını göstermektedir. Sedanter yaşam, beslenme bozuklukları, gelişen teknolojiyle birlikte artan kimyasal toksin maruziyeti, sigara, alkol ve diğer bağımlılık yapan ilaçların kullanımında artış, değişen iş alanları erkek infertilitesinin artmasından sorumlu temel değişkenlerdir (1-3). Spermatogenez, testiküler seminifer tübüllerde diploid spermatogonial kök hücrelerin (SKH'ler) haploid spermatozoaya farklılaşmasıyla sonuçlanan oldukça karmaşık ve çok adımlı bir süreçtir (4). SKH, seminifer tübüllerinin bazal membranında bulunan genetik bilgiyi sonraki nesillere aktaran yetişkin doku kök hücreleridir. SKH'ler spermatogenez ve erkek fertilitésinin temelidir (5,6). SKH'lerin medikal tedaviler, genetik hastalıklar ve çevresel faktörler sebebiyle kaybı, işlev bozuklukları spermatogenezini etkileyerek erkek infertilitesine yol açar (7). SKH'ler kök hücre havuzunun stabilitesini korumak için kendini yenileme ve ergenlik sonrası erkeklerde sürekli sperm üretimini sürdürmek için farklılaşma potansiyeline sahiptir (8). SKH'lerin kendini yenileme, ve farklılaşmasını düzenleyen hücresel ve moleküler mekanizmaların ayrıntılı olarak anlaşılması üreme biyolojisi ve erkek infertilitesine yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için çok önemlidir.

¹ Uzm. Dr., Yerköy Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, meltem_yardim@hotmail.com.tr

² Uzm. Dr. Yozgat Şehir Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, damlakayalp@hotmail.com.tr

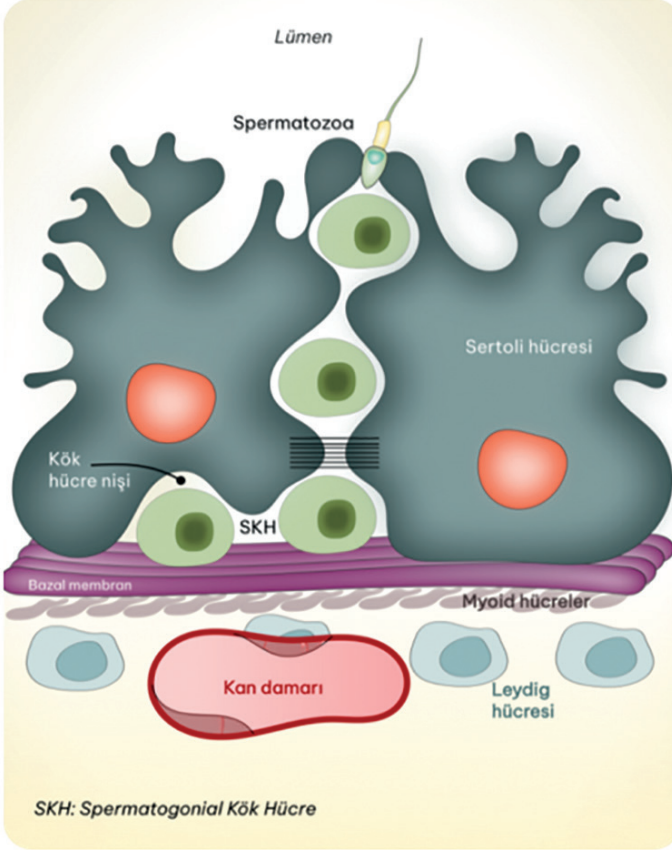
SPERMATOGONİAL KÖK HÜCRE

Embriyonik gelişim sırasında, primordial germ hücreleri (PGC'ler) allontoisin tabanından arka bağırsak boyunca genital kabartıya göç eder ve ardından gonositleri oluştururlar. Doğumdan sonra bazı gonositler çoğalır ve seminifer kordların merkezinden seminifer tübüllerin bazal membranına göç eder ve burada spermatogenezi yönlendiren SKH'lere farklılaşır (9). Spermatogenez mitoz, mayoz ve spermiyogenez olarak üç farklı fazda gerçekleşir. 1) Proliferasyon fazında, spermatogonia mitotik bölünmelerle çoğalarak primer spermatositlere farklılaşır. 2) Mayotik fazda, germ hücreleri genetik rekombinasyonun meydana geldiği mayoz bölünmeye girer ve bu süreç haploid spermatidlerin oluşumu ile sonuçlanır. 3) Spermiyogenez olarak adlandırılan üçüncü aşamada, haploid yuvarlak spermatidler sitoskeletal yapının yeniden düzenlenmesiyle özelleşmiş spermatozoaya dönüşür. Testiste oluşan spermatozoalar, epididimiste ileri hareketlilik ve dölleme yeteneği kazanır (10). Spermatogonianın alt tipleri kemirgenler ve insanlar arasında farklılık gösterir. SKH'ler sayısal bakımdan nadirdir. Kemirgen testislerindeki toplam germ hücre kitlesinin yalnızca %0.03'ünü oluşturdukları düşünülmektedir. SKH'leri belirlemek ve işlevlerini düzenleyen mekanizmaları anlamak düşük sayıları nedeniyle zordur. Kemirgenlerde A_{single} (A_s) hücreler SKH'ler olarak kabul edilirken, A_{paired} (A_{pr}) ve $A_{aligned}$ (A_{al}) hücreleri çoğalmaya ve nihayetinde haploid hücreler üretmeye kararlı progenitör hücrelerdir. A_s , A_{pr} ve A_{al} spermatogonia farklılaşmamış spermatogonia $A_{(un-diff)}$ olarak adlandırılır. SKH'ler kendilerini yeniler veya A_{pr} spermatogonia'ya farklılaşır. A_{pr} spermatogonia ayrıca 4, 8 veya 16 A_{al} spermatogonia zincirleri oluşturmak üzere bir dizi mitotik bölünmeye maruz kalır. Ardından A_{al} hücreler tip A1 spermatogoniaya farklılaşacaktır. A1 spermatogonia ardışık mitoz bölünmeler ile sırasıyla A2, A3, A4, intermediate ve B spermatogonia'ları oluşturur. Tip B spermatogonia ise bölünerek primer spermatositleri meydana getirmektedir. Daha sonra spermatositler, haploid spermatozoa oluşturmak üzere mayoz bölünmeye girerler ve sonunda sitofarklılaşma yoluyla spermatozoaya dönüşürler (11,12). İnsanlarda spermatogenez gonodotropin hormonunun artması ile birlikte pubertede ortalama 10-13 yaşlarında başlar ve yaşam boyu devam eder. İnsanlarda ve insan olmayan primatlarda farklılaşmamış SKH popülasyonu nükleer morfolojileri, büyüklükleri, farklı hematoksilen boyama yoğunluklarına dayalı olarak ayırt edilen A_{koyu} (A_d) ve A_{soluk} (A_p) spermatogonidan oluşur. Tip A_d yedek kök hücrelerdir ve bölünerek A_p spermatogonia'ya

farklılaşırlar. A_p spermatogonia bölünerek tip B spermatogonia'ları oluşturur. Daha sonra Tip B spermatogonia'lar primer spermatositleri oluşturmak için bölünür. Spermatogenez kemirgenlerdekine benzer olarak, bu aşamaya kadar seminifer tübüllerin bazal kompartmanında gerçekleşirken, daha sonraki aşamalar olan mayoz bölünme ve spermiyogenez seminifer tübüllerin adluminal kompartmanında gerçekleşir. Primer spermatositler 1. mayoz bölünme ile sekonder spermatositlere farklılaşır. Sekonder spermatositler kardeş kromatitlerin bölünerek haploid yuvarlak spermatidler oluşturduğu mayoz II'ye maruz kalır. Spermatidler spermiyogenez adı verilen morfolojik farklılaşma süreciyle matür spermatozoaları meydana getirmektedir. Spermiyogenez sürecinde kromozom kondansasyonu, akrozom ve orta parça gelişimi, flagella oluşumu ve sitoplazma atılımı gerçekleşir. Spermatogenez süreci insanlarda yaklaşık olarak 72 gün sürmektedir (13,14).

SPERMATOGONIAL KÖK HÜCRE "NİŞİ"

SKH'ler seminifer epitelde, bazal membranın yakınında kendini yenilemesini ve farklılaşmasını dengeleyerek testis homeostazını düzenleyen 'niş' adı verilen özel bir mikro çevre içinde varlığını sürdürür (Şekil 1). Niş ortamı, somatik hücreler (Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve peritübüler myoid hücreler), bazal membran ve özellikle damar ağı tarafından üretilen faktörleri içerir. Bu somatik hücreler, SKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşmasını düzenleyen çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin salgılar (15-17). Seminifer tübüllerdeki somatik hücreler olan Sertoli hücreleri germ hücrelerine yapısal desteğe ek olarak SKH'lerin kendini yenilemesini (Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör; GDNF, Bazik fibroblast büyüme faktörü; bFGF, Epidermal büyüme faktörü; EGF) ve farklılaşmasını (Aktivin A, Kemik morfogenetik protein 4; BMP4, Kök hücre faktörü; SCF) uyaran birçok büyüme faktörleri sentezler (18). Leydig hücreleri spermatogenezin sürdürülmesi için hem doğrudan, hem de dolaylı yoldan işlev gösterebilen testosteron hormonu ve sitokinleri üretir (19). Peritübüler myoid hücreleri seminifer tübülleri çevreleyen kontraktıl düz kas hücreleridir. Kontraktıl özellikleri ile spermilerin ve testiküler sıvının rete testise doğru akışını sağlarlar (20). Testosteron aracılı GDNF ve CSF1 dahil, parakrin faktörlerin salınımı ile SKH'lerin kendini yenilemelerine katkıda bulunurlar (21).



Şekil 1. Spermatogonial kök hücre nişinin şematik gösterimi

SKH'LERİN KENDİNİ YENİLEMESİ (SELF-RENEWAL)

SKH'ler memeli testislerinde spermilere farklılaşırken kök hücre havuzunu korumak için kendini yeniler. SKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşma süreci arasındaki denge yaşam boyu doğurganlığın sürdürülmesi için kritiktir (8). SKH'lerin kaderi, kök hücre nişi olarak adlandırılan mikro çevreden gelen dışsal sinyallerin yanı sıra kök hücre gen ekspresyonu ile sıkı şekilde düzenlenir (15,17). Kendini yenilemeye yönelik eğilim germ hücreli tümör gelişimine neden olabilirken, farklılaşmaya yönelik eğilim kök hücre rezervinin tükenmesiyle sonuçlanarak erkek infertilitesine yol açar (22). SKH'nin kendini yenileme ve idamesi için kritik olan ekstrinsik faktörler arasında GDNF, fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2), koloni stimüle edici faktör 1 (CSF1) yer alır (18). Genetik çalışmalarla SKH'lerin kendini yenilemesinin düzenlenmesinde görev alan birçok

transkripsiyon faktörü tanımlanmış olmakla birlikte, altta yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

GDNF

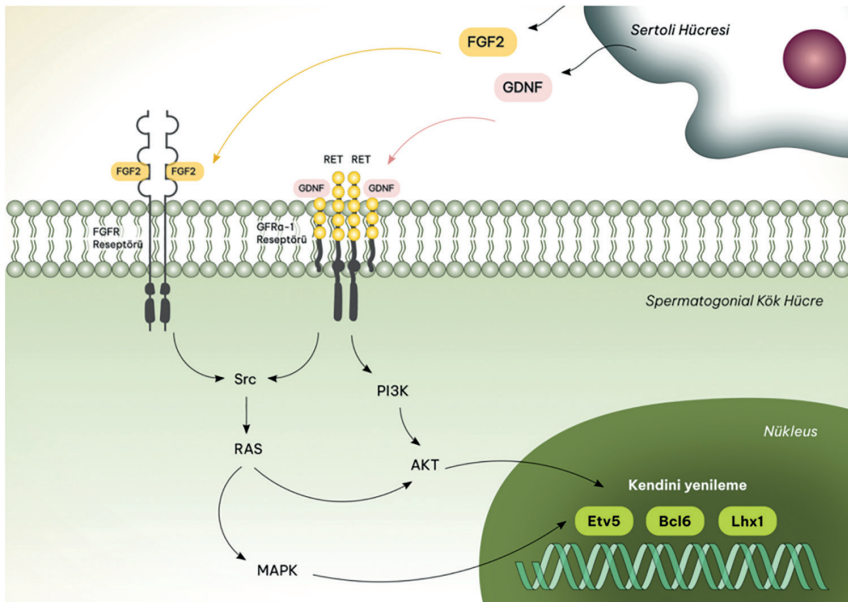
GDNF, SKH popülasyonunun korunması ve kök hücre havuzunun kendini yenilemesi için gerekli olduğu gösterilen parakrin bir büyüme faktörüdür. SKH'nin in vivo ve in vitro koşullarda kendini yenilemesi için gereklidir. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) süper ailesinin üyesi olan GDNF, testis içinde Sertoli ve peritübüler myoid hücreler tarafından üretilir (23). Ayrıca son veriler testiküler endotel hücrelerinin de GDNF ürettiğini göstermektedir (24). GDNF'nin aşırı ekspresyonu seminifer tübüllerde farklılaşmamış spermatogonia birikimine neden olur. GDNF'nin kaybı ise SKH'lerin kendi kendini yenilemesindeki başarısızlığa bağlı olarak kök hücre havuzunun tükenmesi ile sonuçlanır (25). İn vitro kültür ortamına GDNF eklenmesi SKH'nin uzun süreli proliferasyonunu indükler (26). GDNF, glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı hücre yüzeyi molekülü GDNF ailesi reseptörü alfa-1 (Gfra-1) ve RET tirozin kinaz transmembran proteininden oluşan bir reseptör kompleksi aracılığıyla SKH'lerde sinyal verir (27). GDNF'nin Gfra-1'e bağlanması ve ardından RET protein tirozin kinazın aktivasyonu birçok farklı sinyal yolağını aktive edebilmektedir (28). GDNF sinyali SKH'lerin kendini yenilemesini ve hayatta kalmasını desteklemek için Src familyası kinazı (SFK), PI3K/Akt ve MEK/ERK-mTOR dahil aşağı akış yollarını sinyal yollarını aktive eder (23, 29). GDNF aynı zamanda SKH'lerin kendini yenileme durumunu korunmasında görev alan Ets varyant 5 (ETV5), B hücreli CLL/lenfoma 6 member B (Bcl6b), LIM homeobox 1 (Lhx1), ID4, POU3F1 gibi genlerin ekspresyonunu da uyarmaktadır (30-33). GDNF sinyali tarafından aktive edilen diğer bir yol, RAS/ERK 1/2 yoludur. RAS/ERK 1/2 yolağı aktive edici transkripsiyon faktörü-1 (ATF-1), cAMP'ye yanıt veren element bağlayıcı protein 1 (CREB-1), cAMP yanıt elemanı modülasyon proteini 1 (CREM- fosforilasyonu ve c-FOS transkripsiyon faktörünün upregülasyonu aracılığıyla GDNF kaynaklı SKH'nin kendini yenileme ve proliferasyonu sürecine dahil olur (34). Sertoli hücrelerinde GDNF üretimi endokrin, parakrin ve otokrin faktörlerin etkisi altındadır (35,36). Hipofizer kaynaklı folikül uyarıcı hormon (FSH), Sertoli hücrelerinde GDNF ekspresyonunu önemli ölçüde uyarmaktadır (37). FSH'a ek olarak, testosteron da peritübüler myoid hücrelerden GDNF salgılanmasını tetiklemektedir (38). Farklılaşmamış spermatogonia sayısı arttıkça, germ hücreleri tarafından eksprese edilen

JAG1 ligandı, NOTCH sinyali aktive edebilmektedir. Aktive edilmiş NOTCH, HES1 ve HEY1'in ekspresyonunu etkinleştirerek GDNF ekspresyonunu baskılar (39,40). GDNF'nin HES/HEY tarafından inhibisyonu, TNF- α /NF-kB yolu ile güçlendirilebilir. TNF- α 'nın NF-kB'ye bağlı bir mekanizma tarafından transkripsiyonel baskılayıcı HES1 ekspresyonunu indüklediğini ve bunun da GDNF'yi down regüle ettiği gösterilmiştir (41). Sertoli hücrelerinde GDNF ekspresyonu retinoik asit ve FGF2 tarafından da azaltılmaktadır (42). GDNF, spermatogenez sırasında Sertoli hücrelerinde döngüsel olarak ifade edilir. SKH proliferasyon evrelerinde (X-III) en yüksek ve spermatogonia'nın sakin olduğu ve sonunda A1 spermatogonia'ya (IV-IX) farklılaştığı evrelerde en düşük seviyelerde bulunur (43). GDNF, kök hücre kendini yenilemesinin uyarılması, progenitörler hücrelerin çoğalması ve farklılaşmamış durumun korunmasını sağlayan SKH nişinin önemli bir bileşenidir. Germ hücre homeostazı üzerindeki kritik etkilerine rağmen, düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. GDNF sinyali ile diğer yollar arasındaki karşılıklı etkileşimler, GDNF/GFRA1 tarafından yürütülen RET'ten bağımsız mekanizmalar veya germ hücrelerinde RET'i yönlendiren GDNF'den bağımsız mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır (44). GDNF'nin SKH'ler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerekmektedir (29). Promiyelositik Lösemi Çinko-Parmak (PLZF), Foxo 1 Taf4b ve GILZ de SKH'lerin kendini yenileme sürecinde görev alır, fakat işleyiş GDNF tarafından düzenlenmez (35).

Fibroblast Büyüme Faktörü 2 (FGF2)

FGF2, SKH'lerin kendini yenilemesinde işlev gördüğü gösterilen başka bir büyüme faktörüdür (26). FGF2, testiste Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve farklılaşan germ hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde eksprese olmaktadır (45). FGF2, MA2K1 sinyal kaskadı aracılığıyla Etv5, Bcl6b ekspresyonunu artırarak SKH'lerin kendi kendini yenilemesini sağlar (46) (Şekil 2). FGF2 ayrıca AKT ve ERK'nin otokrin fosforilasyonu yoluyla SKH'lerin proliferasyonunu doğrudan düzenleyebilmektedir (48). FGF2 ve GDNF in vitro kültür koşullarında farklılaşmamış spermatogonia proliferasyonunu teşvik etmek için sinerjik etki gösterirler (26,48). İnsanlarda hücre kültürüne FGF2 ilavesinin SKH proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (48). Son yıllarda yapılan çalışmalarda FGF2'nin SKH'deki işlevi hakkında çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (29). Takashima ve ark. (49) FGF2'nin Etv5, Bcl6b transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu aracılığıyla kültürde tek başına SKH kendini yenilemesini teşvik etti-

ğini gösterdiler. Ayrıca in vivo olarak testiste FGF2 azalmasının SKH'lerin zen-
gileştirilmesi ile ilişkili olan GDNF seviyesini arttırdığını bildirdiler. GDNF ve
FGF2'nin farklılaşmamış spermatogonia üzerindeki etkilerini karşılaştıran bir
çalışmada FGF2'nin GFRA1 + spermatogonia'yı in vivo olarak genişletmesine
rağmen, bu hücrelerin GDNF tarafından genişletilenlere göre daha farklılaş-
mış bir fenotip (RARG ifadesi) sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca FGF2, Retinoik
asit (RA) metabolizmasını ve GDNF üretimini baskılamıştır (50). Bu sonuçlar,
FGF2'nin, farklılaşmamış spermatogonia'nın korunmasından ziyade farklılaş-
manın indüklenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. SKH'lerde
FGF2 fonksiyonunun farklı sonuçları, daha ayrıntılı çalışılmalar yapılması ge-
rektiğini göstermektedir (29). Son zamanlarda FGF2 dışında giderek daha fazla
FGF üyesinin SKH'lerle ilgili süreçlerde rol aldığı belirtilmiştir. FGF8 FGFR1
reseptörü aracılığıyla ERK1/2 sinyalini aktive ederek farklılaşmamış SKH po-
pülasyonunun korunmasında rol oynar (51). FGF5, ERK ve AKT aktivasyonu
yoluyla farelerde SKH proliferasyonunu destekler (52). FGF9, seminifer tübül-
lerdeki somatik hücreler tarafından eksprese edilir. Yang ve ark. FGF9'un, p38
MAPK fosforilasyonu yoluyla sırasıyla *Etv5* ve *Bcl6b*'yi upregüle ederek SKH
proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisi olduğu göstermiştir (53).



Şekil 2. GDNF ve FGF2 moleküllerinin spermatogonial kök hücreler üzerindeki etkisinin şematik gösterimi.

CXCL12-CXCR4

Sertoli hücresi tarafından salgılanan CXCL12, SKH'lerde bulunan CXCR4 reseptörü ile tanımlanmamış bir hücreler arası sinyal yolu aracılığıyla SKH'lerde kendini yenilemeyi desteklemek için sinyal verir (54). CXCL12/CXCR4 sinyalinin A_{undiff} spermatogonia üzerindeki etkisine ilişkin veriler çelişkilidir. Ancak in vitro kültür koşullarında A_{undiff} spermatogonia'nın kendini yenileme durumunu teşvik ettiği ve progenitor duruma geçişi önlediği öne sürülmüştür (55).

Koloni Stimüle Edici Faktör (CSF1)

Leydig ve peritübüler miyoid hücreleri tarafından salgılanan Csf1, SKH'lerin kendi kendini yenileme sürecinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Thy1⁺ germ hücrelerince zenginleştirilmiş kültür ortamına Csf1r için spesifik ligand olan rekombinant Csf1 eklenmesinin SKH'lerinin kendi kendini yenilemesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (56).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Kendini Yenilemesini Düzenleyen Hücre İçi Moleküler Mekanizmalar

Promiyelositik Lösemi Çinko-Parmak (PLZF)

PLZF, testiste SKH'nin kendi kendini yenilemesi için gerekli olduğu gösterilen ilk transkripsiyon faktörüdür. PLZF'yi kodlayan gen olan Zbtb16'daki mutasyon farelerde ilerleyici germ hücre kaybı, testis hipoplazisi ve infertiliteye neden olmuştur. PLZF tüm farklılaşmamış spermatogonia popülasyonunda (A_s , A_{pr} ve A_{al}) ifade edildiğinden, farklılaşmamış spermatogonia'nın biyobelirteçi olarak kullanılmaktadır (57,58). PLZF'nin c-Kit promotör bölgesine bağlandığı ve spermatogonial farklılaşma belirteçi olan *c-Kit* ekspresyonunu doğrudan baskıladığını gösterilmiştir (59). PLZF'nin bu aktivitesi SKH belirteci Sall4'ün ekspresyonunun artmasıyla baskılanır. Sall4, PLZF'yi antagonize eder ve artan Sall4 ekspresyonu ile SKH'lerin farklılaşarak c-Kit ekspresyonunu sağlamaları sağlar (60). PLZF Redd1 geninin transkripsiyonunu arttırarak hücre büyümesinin kritik bir aracısı olan mTORC1 aktivitesine dolaylı yoldan karşı çıkarak SKH'nin kendini yenilemesini destekler. SKH'lerde aktive edilmiş mTORC1, GDNF reseptörü RET'in ekspresyonunu baskılar. PLZF geni eksikliğinde spermatogonialar GDNF sinyaline zayıf yanıt vermektedir. Bu durum PLZF yokluğunda Redd1 geninin transkripsiyonunun azalması nedeniyle mTORC1 kompleksinin aktivasyonunun artmasıyla GFRa1/ RET reseptörlerinin baskılanmasından kaynaklanır (61).

Forkhead-box protein O1 (FOXO1)

SKH'nin kendini yenilenmesinde görev alan SKH'lerde eksprese edilen diğer bir transkripsiyon faktörüdür. Fare testisinde, Foxo1 gen delesyonu spermatogenezdeki bir blok nedeniyle spermatojenik başarısızlıkla sonuçlanır (62). Foxo1 spermatogenez üzerinde etkisini SKH'lerde eksprese edilen Ret, Lhc1, Egr2 ve Sall4 gibi transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi aracılığıyla gösterir. Foxo1'in bu genleri düzenleme mekanizmasının anlaşılması amacıyla daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (63,64).

TATA-box bağlayıcı protein ilişkili faktör 4b (TAF4B)

TFIID kompleksinin gonada spesifik bir alt birimi olan TAF4b, spermatogenezin sürdürülmesi, özellikle de spermatogoniyal kök hücrelerin proliferasyonu için gereklidir.. Farede Taf4b, doğum sonrası testislerde gonositlerde ve yetişkin testislerde spermatogonia ve spermatidlerde eksprese edilir. *Taf4b* -null fareler başlangıçta doğurganken, 3 aylıkken infertil hale gelir ve sonunda germ hücrelerinden yoksun seminifer tübüller içeren testis fenotipi sergiler (65). Yakın tarihli bir çalışmada Taf4b gen mutasyonunun nonobstrüktif azospermi ile ilişkili olabileceğini gösterilmiştir (66).

Octomer-4 (OCT4)

OCT4, çoğalan gonositlerde ve doğumdan sonra A_{undiff} spermatogoniada eksprese olur ve SKH'lerin bir belirteci olarak kullanılır. OCT4 knockout modellerde SKH'ler hem kültürde, hem de nakledildiği testislerde kolonize olamamıştır. OCT4 ve PLZF'nin SKH'lerin kendini yenilemesini sürdürmek için farklı yollarda işlev gördüğü düşünülmektedir (67,68). Son yıllarda yapılan bir çalışmada POU5F1'in değil, POU3F1'in, fare SKH'lerinde GDNF'nin neden olduğu hayatta kalma ve kendini yenilemesinin hücre içi bir düzenleyicisi olduğunu ileri sürülmüştür (69).

GILZ

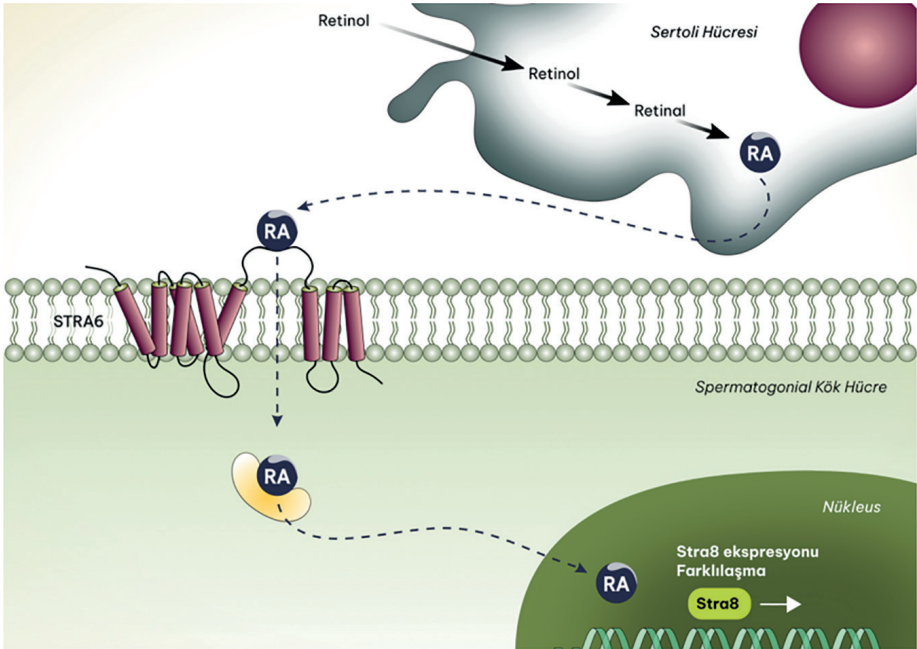
GILZ, SKH'lerde kendini yenilemeyi desteklemek için ERK MAPK ve aşağı akış mTORC1 sinyal yolağının aktivasyonunu kısıtlar. GILZ delesyonu, mTORC1'in anormal aktivasyonu nedeniyle SKH tükenmesi ile sonuçlanır. GILZ, ERK MAPK sinyalinin baskılanmasını ve USP9X ekspresyonu ile mTORC1'i negatif olarak regüle eder. GILZ, mTORC1 düzenlemesinden bağımsız olarak spermatogenez için gerekli olan ZMYM3'ün ifadesini de destekler (64,70).

SPERMATOGONİAL FARKLILAŞMA

Sertoli hücreleri tarafından üretilen KIT ligand (SCF) ve Retinoik asit (RA)'nın spermatogonial hücre farklılaşmasının kontrolünde ana bileşen olduğu düşünülmektedir (71). WNT/ β -katenin sinyali, kendi kendini yenilemeden RA'ya yanıt veren duruma geçişi teşvik ederek A_{undiff} spermatogonia'nın farklılaşmaya hazırlanmasında önemli bir rol oynar (72). RA'nın ilk dalgası, germ hücrelerinde Stra8 ekspresyonunu upregüle eder ve farklılaşmamış tip A spermatogonia'nın farklılaşmış A1 spermatogonia'ya geçişi sağlar (Şekil 3). Spermatogonial farklılaşmanın başlatılması sırasında, kendini yenileme ile ilişkili (Id4, Gfra1, Pou5f1, Nanos 2, PLZF, Lin28, vb.) genler baskılanır. Farklılaşma için gerekli c-Kit, SOHLH1/2, Stra8, Ccnd ve Sall 4 gibi genlerin ekspresyonu ise uyarılır (74-76).

Vitamin A'nın aktif bir türevi olan RA, spermatogonia farklılaşması için gerekli bir dış faktördür (77). Doğum sonrası testislerde RA, farklılaşmamış spermatogonia A'nın farklılaşan spermatogonia A1'e geçişini indükler ve mayoz girişini tetikler (78). Aynı zamanda RA kan testis bariyerinin yeniden şekillenmesi ve geçirgenliği, mayotik rekombinasyon ve spermiyasyon için de gereklidir. Vitamin A (Retinol) karaciğerde sentezlenir, Retinol bağlayıcı protein 4 (RBP4) ve transtiretin tarafından oluşturulan bir kompleks aracılığıyla testislere iletilir. Sertoli hücrelerine retinol STRA6 membran reseptörü tarafından alınır. Retinol iki ardışık oksidatif reaksiyonla RA'e dönüştürülür. İlk olarak retinol NAD bağımlı retinol dehidrogenaz 10 (RDH10) tarafından retinale dönüştürülür. Ardından Retinalin RA'e oksidasyonu retinaldehit dehidrojenazlar (ALDH1A1, ALDH1A2 ve ALDH1A3) tarafından katalize edilir. RA CYP26A1 veya CYP26B1 enzimleri aracılığıyla inaktif metabolitlerine okside edilir (73,79). RA iki farklı nükleer reseptör (RAR, RXR) sınıfı aracılığıyla işlev gösterir. Her iki reseptörün de farklı genler tarafından kodlanan (α , β , γ) üç izotipi vardır. RA ile aktive olan RAR-RXR heterodimerleri Stra8, Hist1, Sall4 genlerinin retinoik asit cevap elemanlarına (RARE'ler) bağlanır ve spermatogoniyal farklılaşmayı başlatmak için ekspresyonlarını indükler (79,80). RA sentezi Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinde gerçekleşir. Buna rağmen RA sinyalinin birincil yeri Sertoli hücreleridir. Sertoli hücresi kaynaklı RA sinyali spermatogenezin ilk turu sırasında Stra8'in upregülasyonuna neden olur (81-83). Uzun süreli Vitamin A eksik diyet verilen veya A vitamini eksikliği olan fareler sterildir, semifer tübüllerinde sadece farklılaşmamış spermatogonia ve Sertoli hücreleri gözlenir. Bu da RA'nın spermatogonial farklılaşmadaki rolünü doğrular. Ekzojen RA takviyeleri sper-

matogonial farklılaşmanın başlamasını geri kazandırır, bu da spermatogenezin yeniden başlaması ve doğurganlığın restorasyonu ile sonuçlanır (84-88). Retinalin RA'ye dönüşümünün ALDH2'nin inhibitörü WIN 18 446 gibi bis-[dikloroasetil]-diaminler) bileşikleri tarafından farmakolojik inhibisyonu spermatogonial farklılaşmanın durmasına neden olur (89). Sertoli hücrelerine özgü RDH10 veya ALDH1A1-3'ün genetik ablasyonu spermatogonial farklılaşmayı bloke eder. RA biyosentezinin farmakolojik inhibisyonu ve RA sentezleyen enzimlerin genetik ablasyonları RA'nın spermatogonial hücrelerin farklılaşmasını düzenlediğine dair ek kanıt sağlamıştır (82,84). RA, fetal gonadlarda mezonefroz tarafından üretilir. Fetal testiste RA'nın CYP26B1 tarafından parçalanması nedeniyle embriyonik gelişim sırasında mayoz bölünmenin oluşması engellenir (73,82). Parekh ve ark. (44) son yıllarda Sertoli hücrelerinde NOTCH sinyali ile CYP26B1 ekspresyonu arasında negatif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Farklılaşmamış spermatogonia, özellikle A_{aligned} spermatogonia sayısı arttıkça, JAG1 ligandı Sertoli hücrelerinde NOTCH sinyalini aktive eder. Aktive edilmiş NOTCH, CYP26B1'in ekspresyonunu down regüle eder ve RA'nın farklılaşmamış spermatogoniadan farklılaşan spermatogonia'ya geçişi tetiklemesine izin verir.



Şekil 3. Retinoik asit varlığında spermatogonial kök hücre farklılaşması

KIT/KITL

KIT tirozin kinaz reseptörünün KITL tarafından aktivasyonufetal gonadal gelişim sırasında PGC'lerin göçünü, hayatta kalmasını ve çoğalmasını düzenler (90). Doğumdan sonra KIT, Sertoli hücreleri tarafından üretilen KITL etkisi altında farklılaşan spermatogoniada yeniden eksprese edilir. A1 farklılaşan spermatogonianın oluşumu KIT ekspresyonunun yeniden kazanılmasıyla çakışır. KIT farklılaşan spermatogoniayı farklılaşmamış öncüllerinden ayıran önemli bir belirteç olarak kabul edilir. KIT, tip A spermatogoniada proliferasyon, hayatta kalma ve farklılaşmaya aracılık eder (91-95). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan BMP4 ve Activin A farklılaşmanın ekstrinsik olarak düzenlenmesinde rol alabilir. Sıçan SKH kültüründe BMP4'ün c-kit ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (95,96). Farklılaşmamış spermatogoniada c-kit ekspresyonu PLZF tarafından baskılanır (59). Farklılaşan spermatogoniada ifade edilen sarmal döngü sarmal transkripsiyon faktörleri SOHLH1 ve SOHLH2, KIT upregülasyonunda rol oynar. SOHLH1 ve SOHLH2'nin delesyonu KIT ifade eden spermatogonianın kaybolmasına neden olur. Ayrıca CHIP-PCR analizi ile Sohlh1'in Kit promotörünü bağlayarak transkripsiyonunu etkinleştirdiğini gösterilmiştir (97).

SOHLH1 ve SOHLH2

Heliks-Loop-Heliks (SOHLH) ailesinin üyesi olan SOHLH1 ve SOHLH2 transkripsiyon faktörlerinin SKH farklılaşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Her iki transkripsiyon faktörünün de spermatogonia farklılaşmasında görev aldığı bilinen c-Kit'i pozitif olarak regüle ettiği gösterilmiştir. Bu iki genden herhangi birinin kaybı, farklılaşmayı bloke ederek infertiliteye neden olur (97-100).

KAYNAKLAR

1. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-670. doi: 10.12688/f1000research.17076.1.
2. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018;110(5):810-814. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015.
3. Sharma A, Minhas S, Dhillon WS, Jayasena CN. Male infertility due to testicular disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(2):e442-e459. doi: 10.1210/clinem/dgaa781.
4. Xi HM, Ren YJ, Ren F, et al. Recent advances in isolation, identification, and culture of mammalian spermatogonial stem cells. *Asian J Androl*. 2022;24(1):5-14. doi: 10.4103/aja.aja_41_21.

5. Lei Q, Hamer G. The use of spermatogonial stem cells to correct a mutation causing meiotic arrest. *Asian J Androl.* 2021;23(6):600-601. doi: 10.4103/aja.aja_2_21.
6. Wang J, Liu C, Fujino M, et al. Stem Cells as a Resource for Treatment of Infertility-related Diseases. *Curr Mol Med.* 2019;19(8):539-546. doi: 10.2174/1566524019666190709172636.
7. Valli H, Sukhwani M, Dovey SL, et al. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertil Steril.* 2014;102(2):566-580.e7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.036.
8. Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction.* 2015;149(4):R159-67. doi: 10.1530/REP-14-0481.
9. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006;86(7):654-663. doi: 10.1038/labinvest.3700429.
10. Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod.* 2018;99(1):87-100. doi: 10.1093/biolre/iory027.
11. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1546):1663-1678. doi: 10.1098/rstb.2010.0026.
12. de Rooij DG. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet.* 1973;6(3):281-287. doi: 10.1111/j.1365-2184.1973.
13. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res.* 2009; 87:27-34. doi: 10.1002/bdrc.20141.
14. Fayomi AP, & Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 2018; 29:207-214. doi: 10.1016/j.scr.2018.04.009.
15. Kostereva N, Hofmann MC. Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 2(Suppl 2):386-92. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01189.x.
16. Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev.* 2012;92(2):577-95. doi: 10.1152/physrev.00025.2011.
17. de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech.* 2009;72(8):580-585. doi: 10.1002/jemt.20699.
18. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):411-6. doi: 10.1006/scdb.1998.0203
19. Zaker H, Razi M, Mahmoudian A, et al. Boosting effect of testosterone on GDNF expression in Sertoli cell line (TM4); comparison between TM3 cells-produced and exogenous testosterone. *Gene.* 2022;812:146112. doi: 10.1016/j.gene.2021.146112.
20. Albrecht M. Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat.* 2009;191(6):532-540. doi: 10.1016/j.aanat.2009.08.002.
21. Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction.* 2013;145(5):R107-16. doi: 10.1530/REP-12-0497.
22. Singh SR, Burnicka-Turek O, Chauhan C, et al. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J Cell Mol Med.* 2011;15(3):468-83. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01242.x.
23. Hofmann MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;288(1-2):95-103. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.012.

24. Bhang DH, Kim BJ, Kim BG, et al. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. *Nat Commun.* 2018;9(1):4379. doi: 10.1038/s41467-018-06881-z.
25. Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 2000;287(5457):1489-1493.
26. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(47):16489-16494. doi: 10.1073/pnas.0407063101.
27. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 1996;382(6586):80-83. doi: 10.1038/382080a0.
28. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May;3(5):383-94. doi: 10.1038/nrn812.
29. Wei BH, Hao SL, Yang WX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and proliferation in mammals. *Histol Histopathol.* 2022;37(9):825-838. doi: 10.14670/HH-18-461.
30. Chen C, Ouyang W, Grigura V, et al. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature.* 2005;436(7053):1030-4. doi: 10.1038/nature03894.
31. Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(25):9524-9. doi: 10.1073/pnas.0603332103.
32. Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25842-51. doi: 10.1074/jbc.M703474200.
33. Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, Oatley JM. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod.* 2011;85(2):347-56. doi: 10.1095/biol-reprod.111.091330.
34. He Z, Jiang J, Kokkinaki M, Golestaneh N, et al. Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells.* 2008;26(1):266-278. doi: 10.1634/stemcells.2007-0436.
35. Mäkelä JA, Hobbs RM. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction.* 2019;158(5):R169-R187. doi: 10.1530/REP-18-0476.
36. Simon L, Ekman GC, Tyagi G, Hess RA, Murphy KM, Cooke PS. Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res.* 2007 Aug 15;313(14):3090-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.05.002.
37. Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, et al. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev.* 2002;113(1):29-39. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00004-7.
38. Chen LY, Willis WD, Eddy EM. Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(7):1829-1834. doi: 10.1073/pnas.1517994113.

39. Garcia TX, Parekh P, Gandhi P, et al. The NOTCH Ligand JAG1 Regulates GDNF Expression in Sertoli Cells. *Stem Cells Dev.* 2017;26(8):585-598. doi: 10.1089/scd.2016.0318.
40. Garcia TX, DeFalco T, Capel B, et al. Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Dev Biol.* 2013;377(1):188-201. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.031.
41. Di Persio S, Starace D, Capponi C, et al. TNF- α inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF- κ B-dependent, HES1-dependent mechanism. *Andrology.* 2021;9(3):956-964. doi: 10.1111/andr.12959.
42. Hasegawa K, Namekawa SH, Saga Y. MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells. *Stem Cells.* 2013;31(11):2517-27. doi: 10.1002/stem.1486.
43. Sharma M, Braun RE. Cyclical expression of GDNF is required for spermatogonial stem cell homeostasis. *Development.* 2018;145(5):dev151555. doi: 10.1242/dev.151555.
44. Parekh PA, Garcia TX, Hofmann MC. Regulation of GDNF expression in Sertoli cells. *Reproduction.* 2019;157(3):R95-R107. doi: 10.1530/REP-18-0239.
45. Mayerhofer A, Russell LD, Grothe C, et al. Presence and localization of a 30-kDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology.* 1991;129(2):921-4. doi: 10.1210/endo-129-2-921.
46. Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development.* 2012;139(10):1734-1743. doi: 10.1242/dev.076539
47. Zhang Y, Wang S, Wang X, et al. Endogenously produced FGF2 is essential for the survival and proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res.* 2012 ;22(4):773-776. doi: 10.1038/cr.2012.17.
48. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia.* 2012;44 Suppl 1:41-55. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01135.x.
49. Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, et al. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Reports.* 2015;4(3):489-502. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.010.
50. Masaki K, Sakai M, Kuroki S, et al. FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche. *Stem Cell Reports.* 2018;10(6):1782-1792. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.016.
51. Hasegawa K, Saga Y. FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Biol Reprod.* 2014;91(6):145. doi: 10.1095/biolreprod.114.121012.
52. Tian R, Yao C, Yang C, et al. Fibroblast growth factor-5 promotes spermatogonial stem cell proliferation via ERK and AKT activation. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):40. doi: 10.1186/s13287-019-1139-7
53. Yang F, Whelan EC, Guan X, et al. FGF9 promotes mouse spermatogonial stem cell proliferation mediated by p38 MAPK signalling. *Cell Prolif.* 2021;54(1):e12933. doi: 10.1111/cpr.12933.

54. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Takashima S, et al. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell*. 2012;11(4):567-578.doi: 10.1016/j.stem.2012.06.011
55. Yang QE, Kim D, Kaucher A, et al. CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Sci*;2013;126(Pt 4):1009-1020. doi: 10.1242/jcs.119826.
56. Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, et al. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*. 2009;136(7):1191-1199. doi: 10.1242/dev.032243.
57. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004;36(6):647-652. doi: 10.1038/ng1366.
58. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, , et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004 ;36(6):653-659. doi: 10.1038/ng1367.
59. Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, et al. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27(19):6770-6781.doi: 10.1128/MCB.00479-07.
60. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell*. 2012;10:284-98. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.004.
61. Hobbs RM, Seandel M, Falciatori I, et al. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell*. 2010;142:468-79. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.041.
62. Goertz MJ, Wu Z, Gallardo TD et al . Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3456-66. doi: 10.1172/JCI57984.
63. Liu T, Chen X, Li T, et al. Histone methyltransferase SETDB1 maintains survival of mouse spermatogonial stem/progenitor cells via PTEN/AKT/FOXO1 pathway. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2017;1860(10):1094-1102. doi: 10.1016/j.bbagr.2017.08.009.
64. Mäkelä JA, Hobbs RM. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction*. 2019;158(5):R169-R187. doi: 10.1530/REP-18-0476.
65. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev*. 2005;19(7):794-803. doi: 10.1101/gad.1290105.
66. Xi Q, Zhang H, Zhang X, et al. Analysis of TATA-box binding protein associated factor 4b gene mutations in a Chinese population with nonobstructive azoospermia. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(23):e20561. doi: 10.1097/MD.0000000000020561.
67. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, et al. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*. 1998;71(1-2):89-98. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00002-1.
68. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, et al. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells*. 2008;26(11):2928-2937. doi: 10.1634/stemcells.2008-0134.
69. Wu X, Oatley JM, Oatley MJ, Kaucher AV, Avarbock MR, Brinster RL. The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* .2010;82(6):1103-1111. doi: 10.1095/biolreprod.109.083097.

70. La HM, Chan AL, Legrand JMD, et al. GILZ-dependent modulation of mTORC1 regulates spermatogonial maintenance. *Development*. 2018;145(18):dev165324. doi: 10.1242/dev.165324.
71. Pellegrini M, Filipponi D, Gori M, et al. ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. *Cell Cycle*. 2008;7(24):3878-88. doi: 10.4161/cc.7.24.7262.
72. Tokue M, Ikami K, Mizuno S, et al. SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ β -Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic *Stem Cells*. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8(3):561-575. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.006.
73. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016;96(1):1-17. doi: 10.1152/physrev.00013.2015.
74. Yoshida S. Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells. *Dev Growth Differ*. 2018;60(9):542-552. doi: 10.1111/dgd.12574.
75. Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*. 2018;99(1):52-74. doi: 10.1093/biolre/i0y077.
76. Lord T, Oatley JM. A revised A_{single} model to explain stem cell dynamics in the mouse male germline. *Reproduction*. 2017;154(2):R55-R64. doi: 10.1530/REP-17-0034.
77. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(4):956-62. doi: 10.1172/JCI41303.
78. Chen Y, Ma L, Hogarth C, et al. Retinoid signaling controls spermatogonial differentiation by regulating expression of replication-dependent core histone genes. *Development*. 2016;143(9):1502-1511. doi: 10.1242/dev.1359397
79. Gewiss R, Topping T, Griswold MD. Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis. *Andrology*. 2020;8(4):892-897. doi: 10.1111/andr.12722.
80. Endo T, Mikedis MM, Nicholls PK, et al. Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules*. 2019;9(12):775. doi: 10.3390/biom9120775.
81. Endo T, Romer KA, Anderson EL, et al. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(18):E2347-56. doi: 10.1073/pnas.1505683112.
82. Bhattacharya I, Sharma P, Purohit S, et al. Recent Update on Retinoic Acid-Driven Initiation of Spermatogonial Differentiation. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:833759. doi: 10.3389/fcell.2022.833759.
83. Raverdeau M, Gely-Pernot A, Féret B, et al. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(41):16582-16587. doi: 10.1073/pnas.1214936109.
84. Tong MH, Yang QE, Davis JC, et al. Retinol dehydrogenase 10 is indispensable for spermatogenesis in juvenile males. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jan 8;110(2):543-8. doi: 10.1073/pnas.1214883110.
85. van Pelt AM, van Dissel-Emiliani FM, Gaemers IC, et al. Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biol Reprod*. 1995;53(3):570-8. doi: 10.1095/biolreprod53.3.570.
86. McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice

- based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod.* 2002;66(5):1374-1379. doi: 10.1095/biolreprod66.5.1374.
87. Mitranond V, Sobhon P, Tosukh Wong P, et al. Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. *Acta Anat (Basel).* 1979;103(2):159-168. doi: 10.1159/000145007
88. Bowles J, Knight D, Smith C, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 2006;312(5773):596-600. doi: 10.1126/science.1125691.
89. Hogarth CA, Evanoff R, Snyder E, Kent T, Mitchell D, Small C, et al. Suppression of Stra8 expression in the mouse gonad by WIN 18,446. *Biol Reprod.* 2011;84(5):957-65. doi: 10.1095/biolreprod.110.088575.
90. Dolci S, Williams DE, Ernst MK, et al. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature.* 1991;352(6338):809-11. doi: 10.1038/352809a0.
91. Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG et al. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology.* 1999;140(12):5894-900. doi: 10.1210/endo.140.12.7172.
92. Correia S, Alves MR, Cavaco JE, et al. Estrogenic regulation of testicular expression of stem cell factor and c-kit: implications in germ cell survival and male fertility. *Fertil Steril.* 2014;102(1):299-306. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.009.
93. Rossi P, Lolicato F, Grimaldi Pet al. Transcriptome analysis of differentiating spermatogonia stimulated with kit ligand. *Gene Expr Patterns.* 2008;8(2):58-70. doi: 10.1016/j.modgep.2007.10.007.
94. Rossi P. Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):179-84. doi: 10.1387/ijdb.130014pr.
95. Rossi P, Dolci S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:181. doi: 10.3389/fendo.2013.00181.
96. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2207-14. doi: 10.1095/biolreprod.102.014050.
97. Barrios F, Filipponi D, Campolo F, et al. SOHLH1 and SOHLH2 control Kit expression during postnatal male germ cell development. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 6):1455-64. doi: 10.1242/jcs.092593.
98. Ballow D, Meistrich ML, Matzuk M, et al. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol.* 2006;294(1):161-167. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.027.
99. Ballow DJ, Xin Y, Choi Y, et al. Sohlh2 is a germ cell-specific bHLH transcription factor. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(8):1014-1018. doi: 10.1016/j.modgep.2006.04.007.
100. Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, et al. Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev Biol.* 2009;325(1):238-248. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.10.019.