

*Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Buněčné biologie*



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Charakterizace pre-Sertoliho buněk *Xenopus tropicalis* ve  
tkáňové kultuře**

**Descriptions of *Xenopus tropicalis* pre-Sertoli cells in tissue  
culture**

**Jana Ševčíková Jonáková**

**V Praze 2008**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tereza Tlapáková, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Terezy Tlapákové, PhD., v Laboratoři vývojové biologie Přírodovědecké fakulty v Praze za použití uvedené literatury.

V Praze, srpen 2008

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, PhD. za odborné vedení, ochotu, trpělivost i čas. A dále všem, kteří přispěli ke vzniku této práce, zejména RNDr. Jaroslavu Máchovi, Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Mgr. Janě Oujezdské, Marii Hladečkové, Janě Dvořákové, Bc. Lukáši Faltejskovi a Bc. Radce Teichmanové, za cenné rady a pomoc. Děkuji všem členům kolektivu naší laboratoře za příjemné pracovní prostředí a přátelskou atmosféru.

Děkuji rodině a blízkým za podporu a trpělivost.

## Abstrakt

*Xenopus tropicalis* je významným modelovým organismem vývojové i buněčné biologie. Dlouhodobá primární smíšená buněčná kultura získaná z juvenilních varlat *Xenopus tropicalis*, je první tkáňovou kulturou u tohoto živočišného druhu. Její charakterizace je důležitá pro další práci a ní a následné pokusy. Kultura je tvořena prekurzory Sertoliho buněk. Podpůrná vrstva těchto buněk umožňuje dlouhodobou kultivaci zárodečných kmenových buněk. Významnou roli při kultivaci představuje vliv kondicionovaného média na proliferaci buněk. Výsledky této práce prokázaly vliv kondicionovaného média na růst tkáňové kultury. Analýza genové exprese buněk kultury a varlat odhalila, že v procesu diferenciaci Sertoliho buněk je zapojena celá řada růstových a diferenciacních faktorů. Přítomnost markerových genů byla prokázána RT-PCR a *in situ* hybridizací. Tento *in vitro* systém může pomoci k objasnění rozdílných rolí pre-Sertoliho a Sertoliho buněk v diferenciaci varlat. Představuje tak nový model spermatogeneze umožňující oddělení části diferenciaci pre-Sertoliho a Sertoliho buněk, které lze u savčích modelů oddělit jen s obtížemi.

**Klíčová slova:** *Xenopus tropicalis*, tkáňová kultura, pre-Sertoliho buňky, Sertoliho buňky, diferenciaci varlat, genová exprese

## **Abstract**

*Xenopus tropicalis* is an important model organism used in developmental and cell biology. Long term primary mixed cell culture, derived from juvenile testis of *Xenopus tropicalis*, is the first tissue culture of this specie. Characterization of this tissue culture is important for its further handling and subsequent experiments. The culture is composed of Sertoli cell precursors. Feeder layer of this cells enables long term germinal stem cell cultivation. Influence of conditioned medium plays important role during the cell culture cultivation. Result of this task approved effect of conditioned medium for cell culture growth. Cell culture and testis gene expression analyse revealed, that in process of Sertoli cell differentiation many growth and differentiation factors are involved. Presence of marker genes has been approved by RT-PCR and *in situ* hybridization. This *in vitro* system can contribute to clarification of different roles of pre-Sertoli and Sertoli cells in testis differentiation, and therefore it establishes a new spermatogenesis model offering the possibility to distinguish parts of the pre-Sertoli and Sertoli cells differentiation, which is difficult in mammal models.

**Keywords:** *Xenopus tropicalis*, tissue culture, pre-Sertoli cells, Sertoli cells, testicular differentiation, gene expression

# OBSAH

<b>Obsah</b> .....	6
<b>Seznam zkratk</b> .....	10
<b>1. Úvod</b> .....	14
<b>2. Cíle diplomové práce</b> .....	15
<b>3. Literární přehled</b> .....	16
<b>3.1 Modelový organismus <i>Xenopus tropicalis</i></b> .....	16
3.1.1 Rod <i>Xenopus</i> jako modelový organismus.....	16
3.1.2 Systematické zařazení.....	18
3.1.3 Srovnání <i>X. laevis</i> a <i>X. tropicalis</i> .....	18
3.1.4 Velikost genomu a karyotyp <i>X. tropicalis</i> .....	19
3.1.5 Cytogenetické studie.....	20
<b>3.2 Zárůdečné kmenové buňky</b> .....	21
3.2.1 Determinace primordiálních zárodečných kmenových buněk u vybraných obratlovčích modelových organismů.....	21
3.2.1.1 Determinace PGC u <i>Xenopus</i> .....	21
3.2.1.1.1 Lokalizace zárodečné plazmy a jejích komponent.....	21
3.2.1.1.2 Segregace zárodečné plazmy.....	22
3.2.1.1.3 Migrace presumptivních PGC.....	23
3.2.1.1.4 Diferenciace presumptivních PGC na PGC.....	23
3.2.1.2 Determinace PGC u myši.....	24
3.2.1.2.1 Původ a identifikace PGC.....	24
3.2.1.2.2 Specifikace presumptivních PGC.....	24
3.2.1.2.3 Migrace presumptivních PGC.....	25
3.2.1.2.4 Faktory ovlivňující proliferaci PGC.....	26
<b>3.3 Určení pohlaví u obratlovců</b> .....	28
<b>3.4 Vývoj a determinace gonád</b> .....	29
3.4.1 Vývoj urogenitálního systému u myši.....	29
3.4.1.1 Vývoj varlat z bipotenciálního primordia.....	29
3.4.1.2 Role PGC v morfogenezi varlat.....	30
3.4.1.3 Diferenciace Sertolihových buněk.....	31
3.4.1.4 Migrace buněk mesonephros.....	32
3.4.1.5 Diferenciace Leydigových buněk.....	33
3.4.2 Nejvýznamnější faktory zapojené ve vývoji varlat.....	34

3.4.2.1 SRY (sex-determining region on the Y chromosome).....	34
3.4.2.2 SOX9 (SRY-related HMG box gene 9).....	35
3.4.2.3 WT1 (Wilms tumor supresor gene).....	37
3.4.2.4 FGF9 (fibroblast growth factor).....	38
3.4.2.5 SF1 (steroidogenic factor 1).....	39
3.4.2.6 AMH (Anti-Müllerian hormonem či MIS – Müllerian inhibiting substance).....	40
3.4.2.7 HGF (Hepatocyte growth factor).....	41
<b>4. Materiál a metody</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Materiál</b> .....	<b>42</b>
4.1.1 Živý materiál.....	42
4.1.1.1 Žáby.....	42
4.1.1.2 Buněčná kultura.....	42
4.1.1.3 Bakterie.....	42
4.1.2 Materiál užívaný při kultivaci buněčné kultury.....	42
4.1.2.1 Kultivační médium.....	42
4.1.2.2 Trypsin, prostaglandin.....	43
4.1.3 Roztoky.....	43
4.1.4 Primery.....	44
4.1.5 Přístroje.....	47
<b>4.2 Metody</b> .....	<b>48</b>
4.2.1 Kultivace buněčné kultury <i>in vitro</i> .....	48
4.2.1.1 Podmínky kultivace buněčné kultury.....	48
4.2.1.2 Testování zárodečných kmenových buněk.....	48
4.2.2 Růstová křivka.....	48
4.2.3 Indukce diferenciacie pre-Sertoliho buněk Prostaglandinem D2 a jejich vizualizace.....	49
4.2.3.1 Indukce diferenciacie pre-Sertoliho buněk Prostaglandinem D2...49	
4.2.3.2 Vizualizace buněk před a po indukci diferenciacie.....	50
4.2.4 Charakterizace buněk zhodnocením exprese vybraných markerů .....	51
4.2.4.1 Microarray analýza.....	51
4.2.4.1.1 Izolace RNA.....	51
4.2.4.1.2 Vlastní microarray analýza.....	51
4.2.4.2 RT-PCR.....	51

4.2.4.2.1 Návrh primerů pro PCR amplifikaci vybraných genů.....	51
4.2.4.2.2 Izolace RNA.....	52
4.2.4.2.3 Syntéza prvního vlákna cDNA (First Strand).....	52
4.2.4.2.4 RT amplifikace DNA podle (ss)cDNA.....	52
4.2.4.2.5 Elektroforéza na agarózovém gelu.....	53
4.2.4.3 <i>In situ</i> hybridizace na mRNA buněk kultivovaných <i>in vitro</i> .....	54
4.2.4.3.1 Kultivace buněk na podložních sklech.....	54
4.2.4.3.2 Příprava značené sondy pro fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci.....	54
4.2.4.3.2.1 Příprava (ss)cDNA, RT-PCR amplifikace.....	54
4.2.4.3.2.2 Elektroforéza na agarózovém izolačním gelu.....	54
4.2.4.3.2.3 Izolace PCR amplifikátu pro klonování.....	55
4.2.4.3.2.4 Příprava a amplifikace DNA konstruktů.....	55
4.2.4.3.2.5 Izolace plazmidové DNA.....	55
4.2.4.3.2.6 Kontrola přítomnosti inzertu restrikčním štěpením.....	55
4.2.4.3.2.7 Re-PCR – amplifikace inzertu.....	56
4.2.4.3.2.8 Kontrola a izolace amplifikované cDNA pro přípravu sondy.....	56
4.2.4.3.2.9 Příprava sondy značené digoxigeninem.....	56
4.2.4.3.3 Příprava preparátů, fixace a permeabilizace.....	57
4.2.4.3.4 <i>In situ</i> hybridizace.....	58
4.2.4.3.5 Mytí preparátů.....	58
4.2.4.3.6 Imunofluorescenční detekce.....	59
4.2.4.3.7 Analýza a zpracování obrazu.....	59
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Identifikace buněčných typů přítomných v smíšené buněčné kultuře.....</b>	<b>60</b>
5.1.1 Důkaz přítomnosti kolonií zárodečných kmenových buněk pozitivní reakcí na alkalickou fosfatázu.....	61
<b>5.2 Průkaz vlivu kondicionovaného média na růst buněčné kultury.....</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Indukce diferenciací pre-Sertoliho buněk prostaglandinem D2, jejich vizualizace a důkaz přítomnosti kolonií zárodečných kmenových buněk.....</b>	<b>63</b>
5.3.1 Indukce diferenciací pre-Sertoliho buněk prostaglandinem D2 .....	63
5.3.2 Vizualizace buněk před a po indukci diferenciací.....	63

<b>5.4 Charakterizace buněk pomocí úrovně genové exprese vybraných markerů</b> .....	64
5.4.1 Microarray analýza a RT-PCR.....	64
5.4.2 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	73
<b>6. Diskuse</b> .....	76
<b>7. Závěr</b> .....	81
<b>8. Přehled citované literatury</b> .....	82
<b>9. Přílohy</b> .....	98

## SEZNAM ZKRATEK

ACC	adaptive contrast control
ANGPT	angiopoietin
AMH	anti-Müllerian hormone
ARTN	artemin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMP	bone morphogenetic protein
bp	base pair
BrdU/dT	5-bromo-2-deoxyuridin/ deoxythymidin
c-AMP	cyclic adenosine monophosphate
CCD	charge-coupled device
CDC25C	cell division cycle 25 homolog C
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Col	collagen
c-SRC	cellular SRC
CTGF	connective tissue growth factor
Cyp11	cholesterol side-chain cleavage enzym
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dax1	dosage-sensitive sex-reversal gene
DAZ	deleted in Azoospermia
DAZL	deleted in Azoospermia -like
Dazla	deleted in Azoospermia -like, autosomal
Dhh	desert hedgehog
Dhh Ptch	desert hedgehog Patched
DIPS	digital image processing system
DNA	deoxyribonucleic acid
DNER	delta/notch-like EGF repeat containing
dpc	days post coitum

dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EDS	ethylene dimethyl sulfonate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EST	expressed sequence tag
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FISH-TSA	fluorescent <i>in situ</i> hybridization – tyramide signal amplification
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
Grip	glutamate receptor interacting protein
GRN	granulin
hCG	human chorionic gonadotropin
HDGF	hepatoma-derived growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
HMG-box	high mobility group box
IGF	insulin-like growth factor
INHA	inhibin alpha
INHBA	inhibin beta A
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)
JGI	Joint Genome Institute
LEF1	lymphoid enhancer factor 1
LIF	leukemia inhibitory factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDH	malate dehydrogenase
METRO	message transport organizer
MHC	major histocompatibility complex
MIS	Mullerian-inhibiting substance

MIS-RE-1	MIS regulatory element 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCAM	neural cell adhesion molecule
NELL2	neural epidermal growth factor-like 2
NGF-B	nerve growth factor – B
NRG	neuregulin
NT3	neurotrophin 3
NTF4/5	nuclear transport factor 4/5
OGF	opioid growth factor
<i>p.a.</i>	pro analysi
p75NTR	p75 neurotrophin receptor
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGF-BB	platelet-derived growth factor beta polypeptide -
homodimer	
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PENK	developmental regulation of preproenkephalin
PGC	primordial germ cell
PGD2	prostaglandin D2
PGD2S	prostaglandin D2 synthase
RNA	ribonucleic acid
RT	room temperature
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction
SCF	stem cell factor
SCW	surface contraction waves
SF1	steroidogenic factor 1
SOX	SRY-related HMG box
SRY	sex-determining region on the Y chromosome
SSC	saline-sodium citrate
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
TBE	Tris/borate/EDTA

TGFB	transforming (tumor) growth factor beta
UTR	untranslated region
Wnt	wingless-related MMTV integration site
WT1	Wilms tumor supresor gene
Xdazl	<i>Xenopus laevis</i> DAZ-like gene
Xist	X-inactive specific transcript
Xklp	<i>Xenopus</i> kinesine-like protein
Xlsirt	<i>Xenopus laevis</i> short interspersed repeat transcript
Xtdazl	<i>Xenopus tropicalis</i> DAZ-like gene

## 1. ÚVOD

Význam *Xenopus tropicalis* jako modelového organismu vývojové i buněčné biologie v poslední době vzrůstá. Sdílí výhody *Xenopus laevis*, který je rozšířeným modelovým organismem již od 50. let minulého století, díky svému diploidnímu genomu navíc dovoluje provádění genetických analýz, které je u *Xenopus laevis* vzhledem k přítomnosti paralogních genů komplikované. Oproti vyšším modelovým organismům je ale *Xenopus tropicalis* znevýhodněn neúplností genetických a cytogenetických dat.

Na mapování genomu *Xenopus tropicalis* se podílí i Laboratoř vývojové biologie PřF UK. Lokalizace genů na mitotických chromozómech byly prováděny na buňkách sleziny, což vyžadovalo usmrcení pokusného zvířete, z důvodu nedostupnosti dlouhodobé buněčné kultury u *Xenopus tropicalis*. Tento fakt byl podnětem k založení buněčné kultury, která by byla využitelná pro tyto experimenty. Ze všech orgánů, které byly použity při prvních pokusech o založení kultury, to byla pouze varlata, která opakovaně umožnila získat dlouhodobou buněčnou kulturu.

Buňky této kultury vykazovaly morfologické charakteristiky pre-Sertoliho buněk, navíc po dlouhodobé kultivaci bez výměny média došlo v kultuře k výskytu kolonií malých buněk s odlišnou morfologií, o nichž se předpokládalo, že jsou zárodečnými kmenovými buňkami. Byl pozorován výrazný efekt při kultivaci buněk v kondicionovaném médiu na rychlost jejich proliferace.

Potvrzení těchto předpokladů a charakterizace buněk kultury byla předmětem této práce.

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací buněk smíšené buněčné kultury, která byla získána z juvenilních varlat samce žáby *Xenopus tropicalis*. Její cíle byly následující:

### 1. Průkaz vlivu kondicionovaného média na růst buněčné kultury.

Při zakládání této buněčné kultury bylo pozorováno, že kultivace v přítomnosti kondicionovaného média má výrazný vliv na rychlost proliferace buněk a tudíž na úspěšnost kultivace. Jedním cílů této práce bylo prokázat vliv kondicionovaného média na rychlost růstu této buněčné kultury.

### 2. Indukce diferenciaci pre-Sertoliho buněk prostaglandinem D2 a sledování jeho vlivu na buněčnou kulturu.

Prostaglandin D2 (PGD2) je členem zpětnovazebné smyčky, která hraje zásadní roli v diferenciaci Sertoliho buněk. Dalším cílem této práce bylo ovlivnění pre-Sertoliho buněk PGD2 a sledování jeho efektu na buněčnou kulturu.

### 3. Charakterizace buněk pomocí úrovně genové exprese vybraných markerů.

Výchozím bodem hodnocení genové exprese byly výsledky microarray analýzy, která byla ve spolupráci s JGI institutem (USA) provedena firmou NimbleGene (Island). Ověření výsledků této analýzy bylo provedeno metodou RT-PCR. Vizualizace mRNA molekul některých transkribovaných genů byla provedena *in situ* hybridizací metodou FISH-TSA.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 MODELOVÝ ORGANISMUS *XENOPUS TROPICALIS*

V minulém století sehráli obojživelníci klíčovou roli při objasnění mechanismů časného embryonálního vývoje obratlovců (Beck a Slack, 2001). Vajíčka i embrya jsou dostatečně velká a vyvíjejí se externě, což umožňuje sledovat embryonální vývoj okamžitě po oplození, na rozdíl od savčích modelových organismů, kde je možné sledovat pouze závěrečná stadia diferenciací. Ovlivnění časně embryogeneze savců umožňuje pouze knock out genu. Jedná se ovšem o náročnou a pracnou metodu. Další možností je transfekce zárodečných kmenových buněk kultivovaných *in vitro*, jejich selekce a transplantace do gonád sterilizovaných zvířat. Tomuto přístupu ovšem dosud brání jejich omezený růst a nedostatečná znalost přirozených diferenciačních signálů.

#### 3.1.1 Rod *Xenopus* jako modelový organismus

První embryologické experimenty byly prováděny s embryi rodů *Rana* (skokan), *Triturus* (čolek) a *Ambystoma* (mlok), ale v 50. letech minulého století byl jako modelový organismus zaveden *Xenopus laevis*, který se v předchozích letech rozšířil do mnoha laboratoří díky faktu, že sloužil k testování moči na přítomnost lidského choriogonadotropinu (hCG). Injekčním podáním tohoto hormonu lze kdykoli během roku vyvolat ovulaci (Shapiro a Zwarenstein, 1934; Bellerby C.W, 1934) a získat tak v laboratorních podmínkách mnoho oocytů a následně embryí. Jejich velikost a odolnost je činí vhodnými pro mikromanipulace, ať už se jedná o mikrochirurgické zákroky na embryích, či mikroinjekce umožňující aplikaci látek do oocytů či embryí. V 50. letech 20. století se podařilo Fischbergově laboratoři v Ženevě prokázat, že po transplantaci jader buněk epitelu střeva

pulce *X. laevis* do enukleovaných vajíček dojde k normálnímu vývoji dospělého. V dalších letech se podařilo transplantovat do enukleovaných oocytů také jádra dalších typů buněk pocházejících z různých tkání dospělých žab, včetně plně diferencovaných buněk keratinizované pokožky (Gurdon *et al.*, 1975). Experiment provedený v 70. letech 20. století odhalil, že oocyt žab rodu *Xenopus* dokáže translatovat injektovanou mRNA (Gurdon *et al.*, 1971). Nedlouho na to se zjistilo, že oocyt lze u rodu *Xenopus* využít i jako *in vivo* zkuševku při studiu funkcí biologických makromolekul (Gurdon, 1975). Embrya po mikromanipulačních zásazích navíc velice snadno regenerují. Tohoto přístupu se dnes využívá při blokování exprese zkoumaných genů aplikací antisense RNA a morfolino oligonukleotidů. Po aplikaci je exprese blokována na úrovni transkripce (antisense RNA), nebo translace (morfolino oligonukleotidy), na základě výsledného fenotypu je pak identifikována funkce zkoumaných genů.

Žáby rodu *Xenopus* se postupně staly jedním z nejoblíbenějších modelových systémů, na kterém byla získána řada poznatků vývojové i buněčné biologie. Studie na *Xenopus laevis* přispěly k objasnění mechanismů replikace chromozómů, struktury chromatinu a jádra a molekulární podstaty kontroly buněčného cyklu, dynamiky cytoskeletu a signálních drah. Experimenty s žábími embryi pak odhalily mechanismy indukce, určení osudu buněk během zárodečného vývoje a morfogeneze, uspořádání tělního plánu obratlovců a rané organogeneze.

*Xenopus laevis* má řadu vlastností, které by z něj činily téměř dokonalý modelový organismus, nevýhodou je ovšem dlouhá generační doba a v první řadě jeho nevhodnost pro genetické studie z důvodu jeho tetraploidního původu a velkého počtu duplikovaných genů. Genom *X. laevis* je tvořen 36 chromozómy, jeho velikost je přibližně  $3 \times 10^9$  bp (Thiebaud a Fischberg, 1977). *X. laevis* je tetraploidní (Graf a Kobel, 1991; Cannatella a de Sa, 1993), nicméně vykazuje některé vlastnosti diploidního organismu. Jeho karyotyp

tvoří 18 párů chromozómů, jež v meióze tvoří bivalenty (Tymowska a Fischberg, 1973; Muller, 1974), dochází k nezávislé segregaci duplikovaných genů (Graf, 1989) a haploidní (18-ti chromozómové) zygoty nejsou životaschopné (Hamilton, 1963). Část genetické informace je tedy přítomna v neduplikované podobě. Nevhodnost *X. laevis* ke genetickým manipulacím způsobila, že se v poslední době pozornost soustřeďuje na jiného zástupce rodu *Xenopus*. Jedná se o druh *X. tropicalis*, který je jediným diploidním zástupcem tohoto rodu (Tymowska, 1973; de Sa a Hillis, 1990).

### 3.1.2 Systematické zařazení

Rod *Xenopus* představují tzv. drápkaté žáby. Toto označení pochází z anglického Clawed frogs. Systematicky jsou řazeny do čeledi *Pipidea* a podčeledi *Xenopodinae* (de Sa a Hillis, 1990; Cannatella a de Sa, 1993). Do stejné čeledi je řazena i podčeleď *Pipinae*, kterou tvoří sedm druhů amerických Pip. Druhá, africká větev obsahuje čtyři druhy rodu *Hymenochirus* a jeden druh rodu *Pseudohymenochirus* (Cannatella a Trueb, 1988).

### 3.1.3 Srovnání *X. laevis* a *X. tropicalis*

Kromě ploidie, jak bylo zmíněno výše, se tyto druhy na první pohled liší velikostí těla. *X. tropicalis* je podstatně menší, což umožňuje snížení prostorových i finančních nároků na chov (Obr.1). *X. tropicalis* sdílí většinu výhod *X. laevis*, ve srovnání s ním ale není tak tolerantní k životním podmínkám. Jedná se o vodní druhy, takže jejich chov a rozmnožování se odehrávají ve vodních nádržích. Na rozdíl od většiny obojživelníků nevyžadují živou stravu (Amaya *et al.*, 1998). Další výhodou je kratší generační interval 4 – 6 měsíců místo 1 – 2 roky u *X. laevis* (Duellman a Trueb, 1986). Snůška samice *X. tropicalis* navzdory její menší velikosti obsahuje větší množství oocytů (1000 - 3000 vs. 200 – 500 u samice *X. laevis*), liší se ale velikostí.

Stejně jako oocyty, i embrya jsou menší než u *X. laevis* (0,7 – 0,8 mm vs. 1,0 – 1,3 mm), jejich velikost je ale dostatečná k provádění mikromanipulačních zásahů. Protože se jedná o blízce příbuzné druhy, mnoho sekvencí je mezi nimi vysoce konzervováno, je tedy možné u *X. tropicalis* použít molekulární přístupy vyvinuté u *X. laevis*, stejně jako nashromážděná data z EST (Expressed Sequence Tag) a cDNA (complementary DNA) knihoven (Amaya *et al.*, 1998), RNA sondy či protilátky (Khokha *et al.*, 2002).



Obr.1: Srovnání velikosti dospělých samic *Xenopus laevis* (vlevo) a *Xenopus tropicalis* (vpravo). (Amaya *et al.*, 1998)

### 3.1.4 Velikost genomu a karyotyp *X. tropicalis*

Velikost genomu *X. tropicalis* se pohybuje kolem  $1,7 \times 10^9$  bp (Thiebaud a Fischberg, 1977), jedná se o jeden z nejmenších genomů mezi obojživelníky. Je srovnatelný s velikostí genomu *Danio rerio* ( $1,8 \times 10^9$  bp), v porovnání s myší je téměř o polovinu menší ( $3 \times 10^9$  bp) (Amaya *et al.*, 1998). Jak již bylo zmíněno, představuje *X. tropicalis* jediného diploidního zástupce rodu *Xenopus* ( $2n = 20$ ). Karyotyp se vyznačuje 20 mitotickými chromozómy, které lze na základě velikosti a polohy centroméry rozdělit do

šesti morfologicky odlišných skupin submetacentrických a akrocentrických chromozómů, přičemž na dvou odlišných párech (č. 5 a 6) je patrná sekundární konstriktce (Tymowska, 1973).

### 3.1.5 Cytogenetické studie

U *X. laevis* byla identifikace jednotlivých chromozómových párů provedena na základě replikačního pruhování, které využívá inkorporaci bromdeoxyuridinu (BrdU/dT) v S fázi buněčného cyklu (Schmid a Steinlein, 1991). Pomocí této techniky se podařilo rozlišit všech 18 párů chromozómů. Na základě délky, pozice centroméry a rozmístění replikačních pruhů je možné chromozómy rozdělit do skupin po čtyřech (kvartety).

Chromozomální lokalizace pozice genů byly poprvé provedeny metodou ISH na štětkovitých chromozómech. Podařilo se tak lokalizovat některé repetitivní sekvence nebo genové skupiny (Pardue *et al.*, 1973; Jamrich *et al.*, 1983; Fostel *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1984; Kay *et al.*, 1984). Dosud ovšem není známa homologie mezi štětkovými a mitotickými chromozómy.

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) v kombinaci s tyramidovou amplifikací signálu (TSA) umožnila lokalizaci repetitivních genů imunoglobulinů, MHCa (Major Histocompatibility Complex) a MHC1b lokusů do metafázních chromozómů v případě, že byly přítomny alespoň tři přilehlé kopie daného genu. (Courtet *et al.*, 2001).

Modifikace tohoto postupu umožnila poprvé lokalizovat jedinečnou kódující sekvenci (gen c-SRC1) (Krylov *et al.*, 2003), a jak bylo prokázáno později, je tato metoda vhodná i k rozlišení sekvenčně velmi blízkých lokusů, kdy se kódující oblast lokalizovaných genů shodovala na 95% (paralogy

mitochondriální malát-dehydrogenázy, MDH2A a MDH2B) (Tlapakova *et al.*, 2005).

Mitochondriální malát-dehydrogenáza 2 (MDH2) byla také prvním genem, který byl mapován u *X. tropicalis* (Krylov *et al.*, 2007). V současné době probíhá vytváření fyzické mapy genomu *X. tropicalis*.

## **3.2 ZÁRODEČNÉ KMENOVÉ BUŇKY**

### **3.2.1 Determinace primordiálních zárodečných kmenových buněk u vybraných obratlovčích modelových organismů**

Primordiální zárodečné kmenové buňky (PGC - primordial germ cell) mohou být určeny autonomně pomocí cytoplazmatických determinant přítomných v oocytu, jak je tomu například u žab, či k jejich determinaci může docházet na základě interakce s okolními buňkami (např. u savců).

#### **3.2.1.1 Determinace PGC u *Xenopus***

##### ***3.2.1.1.1 Lokalizace zárodečné plazmy a jejích komponent***

Zárodečná plazma se v neoplozených oocytech nachází v podobě cytoplazmatických ostrůvků, které jsou lokalizovány v kortikální oblasti vegetativního pólu. Zárodečná plazma je součástí oblasti METRO (message transport organizer) mitochondriálního oblaku. Obsahuje germinální granula a množství kódujících i nekódujících RNA molekul. Při studiu ultrastrukturální úrovně distribuce RNA molekul v různých kompartmentech zárodečné plazmy během oogeneze a embryogeneze bylo zjištěno, že pouze 3 z 11-ti studovaných RNA molekul jsou lokalizovány v granulích, další se nacházejí na jejich periferii či v matrix mezi granuly. Lokalizace některých RNA

molekul se v čase mění. Asociace RNA molekul s granuly není tedy nezbytným předpokladem jejich funkcí při formaci a migraci PGC. Germinální granula jsou dynamickou 3-D strukturou, která se mění v čase během oogeneze a embryogeneze (Kloc *et al.*, 2002). Translokace heterologních RNA molekul do oblasti vegetativního kortexu je zprostředkována Xist repetitivní RNA (homologní k savčímu Xist genu, který se účastní inaktivace X chromozómu), která kolokalizuje se zárodečnou plazmou (Kloc *et al.*, 1993).

Při fluorescenčním barvení komponent zárodečné plazmy bylo zjištěno, že po oplození jsou ostrůvky zárodečné plazmy během prvního dělení připojeny k mase vegetativního žloutku a migrují s ní během kortikální rotace. Působením UV záření dochází k narušení tohoto procesu. Po skončení rotace se ostrůvky zárodečné plazmy odpojují a začínají fúzovat (Savage a Danilchik, 1993). Důležitou roli v tomto procesu zaujímá cytoskelet. Agregace zárodečné plazmy je závislá na mikrotubulech a vyžaduje Xklp1 (Xenopus kinesine-like protein 1) (Robb *et al.*, 1996). Při jeho nepřítomnosti nedochází ke správné lokalizaci a agregaci ostrůvků zárodečné plazmy díky narušení pohybů cytoplazmy SCW (surface contraction waves), které závisí na mikrotubulárním transportu a jsou významné pro správnou distribuci cytoplazmatických determinant (Quaas a Wylie, 2002).

### **3.2.1.1.2 Segregace zárodečné plazmy**

Presumptivní PGC (PGC, které dosud nedosáhly gonád) jsou determinovány přítomností zárodečné plazmy. Během prvních dělení jejich počet významně nevzrůstá. Zárodečná plazma je rozdělena mezi první 4 blastomery, poté je lokalizována v oblasti vegetativního pólu a následnými děleními je segregována vždy pouze do jedné dceřiné buňky. Během časné gastrulace se zárodečná plazma přemísťuje do blízkosti jádra a v následujících mitózách je zárodečná plazma dělena symetricky mezi dceřiné buňky

(Whittington a Dixon, 1975). Ingrese zárodečné plasmy není závislá na mikrotubulárním cytoskeletu, dochází k ní v důsledku proudění cytoplazmy (Ressom a Dixon, 1988). Presumptivní PGC se dělí dvakrát mezi stádiem časné gastruly a okamžikem, kdy opouští entoderm a začínají migrovat do budoucích gonád (Whittington a Dixon, 1975).

### ***3.2.1.1.3 Migrace presumptivních PGC***

Presumptivní PGC migrují z embryonálního střeva skrz dorzální mezenterium. Důležitou roli v tomto procesu hraje extracelulární matrix. Buňky epitelu mezenteria syntetizují velké množství glykoproteinu fibronektinu, který napomáhá adhezi a migraci presumptivních PGC (Heasman *et al.*, 1981). Základem pohybu presumptivních PGC je vytváření adhezních plaků s epiteliálními buňkami (Heasman a Wylie, 1981). Úspěšná migrace presumptivních PGC je také ovlivněna Grip2 mRNA (glutamate receptor interacting protein 2), která je součástí zárodečné plazmy. To bylo prokázáno inhibicí její translace použitím morfolino oligonukleotidů, jejímž výsledkem bylo narušení procesu migrace presumptivních PGC (Kirilenko *et al.*, 2008).

### ***3.2.1.1.4 Diferenciace presumptivních PGC na PGC***

Meiotická diferenciace presumptivních PGC je u celé řady organismů ovlivňována DAZ genovou rodinou (Deleted in Azoospermia), např. homolog u *Drosophily* je nezbytný pro vstup zárodečných buněk do meiózy během spermatogeneze (Eberhart *et al.*, 1996). U *X. laevis* vede snížení dávky Xdazl mRNA (*Xenopus laevis* DAZ-like gene) k defektům proliferace, migrace a diferenciace presumptivních PGC (Houston a King, 2000). U *X. tropicalis* byla jako první specifický marker zárodečné plazmy a presumptivních PGC identifikována Xtdazl mRNA (*Xenopus tropicalis* DAZ-like gene), která

kóduje RNA vazebný protein homologní s Xdazl. Xtdazl mRNA je exprimována během oogeneze od stádia previtellogenních oocytů i po oplození až do stádia časného pulce (Sekizaki *et al.*, 2004).

### 3.2.1.2 Determinace PGC u myši

#### **3.2.1.2.1 Původ a identifikace PGC**

U embrya myši jsou PGC odvozeny z části populace buněk epiblastu, z kterých vzniká extraembryonální mezoderm. Na začátku gastrulace se prekurzory PGC shromažďují u primitivního proužku v posteriorní oblasti embrya a procházejí jím. Přibližně 45 buněk se poté usídluje v oblasti extraembryonálního mezodermu (Lawson a Hage, 1994).

Presumptivní PCG je možné poprvé morfologicky identifikovat 7 – 7,5 dpc jako shluk 8 buněk posteriorně od primitivního proužku v extraembryonálním mezodermu. Ke konci gastrulace se jejich počet zvyšuje na 50 – 80 buněk. Přibližně 125 buněk se 8 dpc nachází v oblasti entodermu zadního střeva a v místě základu allantois (Ginsburg *et al.*, 1990).

Presumptivní PGC exprimují tkáňově nespecifickou alkalickou fosfatázu (Hahnel *et al.*, 1990; MacGregor *et al.*, 1995). Na základě její aktivity je možné presumptivní PGC identifikovat histochemickým barvením (CHIQUOINE, 1954).

#### **3.2.1.2.2 Specifikace presumptivních PGC**

Budoucí PGC jsou určeny na základě interakce s okolními buňkami a jimi produkovanými signálními molekulami. Významnou roli zde hraje rodina BMP (bone morphogenetic proteins). Formování PGC a dalších struktur

extraembryonálního mezodermu odvozených z prekurzorů proximálního epiblastu je regulováno expresí BMP4 v buňkách extraembryonálního ektodermu. Následkem homozygotní ztrátové mutace v tomto genu nedojde k vývoji PGC a dalších tkání (např. allantois) (Lawson *et al.*, 1999). Další nezbytnou signální molekulou produkovanou buňkami extraembryonálního ektodermu je BMP8b. V důsledku mutace tohoto genu dochází také k absenci PGC či k výraznému poklesu jejich počtu (Ying *et al.*, 2000). Vliv má také BMP2 (Tres *et al.*, 2004).

Specifikace PGC je umožněna expresí genu *fragilis*, který kóduje transmembránový protein. Ten umožňuje díky homeotypické asociaci oddělit budoucí PGC od somatických buněk. Pouze buňky s nejvyšší expresí *fragilis* začínají následně exprimovat také gen *stella*. Ten je exprimován výhradně zárodečnými buňkami a umožňuje reprimovat homeoboxové geny, což může vysvětlovat zachování pluripotence u PGC (Saitou *et al.*, 2002).

### **3.2.1.2.3 Migrace presumptivních PGC**

Presumptivní PGC migrují ventrálně a posteriorně z posteriorního primitivního proužku do přilehlých struktur (allantois, extraembryonálního i embryonálního entodermu). Buňky, které vstoupí do entodermu, jsou inkorporovány do zadního střeva a pokračují v migraci do gonád. Buňky na ostatních místech v migraci nepokračují a po čase umírají (Anderson *et al.*, 2000).

Během migrace ze zadního střeva, PGC exprimují gen *nanos3* (Tsuda *et al.*, 2003). Tento gen je nezbytný pro přežití PGC během migrace. Pokud k jeho expresi nedochází, u obou pohlaví je možné pozorovat ztrátu PGC.

Podobně jako u *X. laevis*, jak bylo zmíněno výše, je v migraci PGC zapojen glykoprotein fibronectin (Ffrench-Constant *et al.*, 1991).

Úspěšné osídlení gonád je podmíněno expresí  $\beta 1$  integrinu primordiálními zárodečnými buňkami. PGC s mutací tohoto genu nejsou schopny efektivně kolonizovat gonády (Anderson *et al.*, 1999).

Roli hrají i faktory produkované buňkami genitálních rýh, které chemotakticky atrahují PGC, což bylo prokázáno *in vitro* (Godin *et al.*, 1990).

#### **3.2.1.2.4 Faktory ovlivňující proliferaci PGC**

Poté co PGC dosáhnou genitálních rýh, pokračují zde v proliferaci. Role parakrinních faktorů, které jejich proliferaci regulují, není dosud zcela známá.

Významnými geny pro specifikaci, přežívání a funkce PGC jsou c-kit a SCF (stem cell factor). Jedná se o receptorovou tyrozin kinázu (c-kit) z rodiny PDGF receptorů (platelet derived growth factor) a její ligand (SCF). Ten je produkován Sertoliho buňkami v solubilní a membránově vázané formě, která je nezbytná pro jeho funkci. Vliv těchto molekul na PGC byl identifikován u mutací myších genů White spotting a Steel, kdy docházelo ke ztrátě PGC u obou pohlaví. Obě jsou tedy nezbytné pro proliferaci a přežívání PGC (Sette *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že v podmínkách *in vitro* SCF brání programované buněčné smrti či apoptóze. Stejný efekt vykazuje i LIF (leukemia inhibitory factor) (Pesce *et al.*, 1993).

Dalším faktorem, který ovlivňuje zárodečné kmenové buňky je GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). Je produkován Sertoliho buňkami, v podmínkách *in vitro* stimuluje proliferaci vyvíjejících se Sertoliho buněk (Wu *et al.*, 2005). Vysoká koncentrace GDNF podporuje proliferaci nediferencovaných spermatogonií a zárodečných kmenových buněk (Tadokoro *et al.*, 2002). Výsledkem transfekce Sertoliho buněk myších varlat

cDNA lidského GDNF bylo výrazné zvýšení počtu zárodečných kmenových buněk (Yomogida *et al.*, 2003). Myši se ztrátou jedné alely tohoto genu vykazují nižší počet kmenových buněk, při nadprodukci naopak dochází k akumulaci nediferencovaných spermatogonií. GDNF tedy přispívá k parakrinní regulaci obnovy spermatogonií a ovlivňuje jejich diferenciaci (Meng *et al.*, 2000; Naughton *et al.*, 2006).

FGF9 (fibroblast growth factor 9) je dalším faktorem, který ovlivňuje zárodečné kmenové buňky. Ty se v samčích gonádách mezi 10,5 – 11,5 dpc stávají závislé na FGF9 signalizaci. FGF9 přímo napomáhá jejich přežití po 11,5 dpc nezávisle na diferenciaci Sertoliho buněk. Ztrátová mutace FGF9 vede k snížení počtu zárodečných kmenových buněk v samčích gonádách, počet zárodečných buněk v samičích gonádách naproti tomu není ovlivněn (DiNapoli *et al.*, 2006).

Dazla (Daz-like, autosomal – myší homolog lidského DAZ genu nacházejícího se na Y chromozómu) je exprimován v samčích i samčích gonádách. Ve varlatech, která neobsahují zárodečné buňky, není jeho přítomnost detekovatelná (Cooke *et al.*, 1996). Myši obou pohlaví deficientní v tomto genu vykazují defekty ve vývoji a přežívání zárodečných buněk (Ruggiu *et al.*, 1997). Dazl protein obsahuje RNA vazebný motiv, který rozeznává sekvence bohaté na uridin (konsensus sekvence (GU<sub>n</sub>)<sub>n</sub>). Tento motiv se nachází v 5' nepřekládané oblasti (UTR – untranslated region) CDC25C (cyklin dependentní kináza 25C). V podmínkách *in vitro* byla prokázána interakce mezi CDC25C 5' UTR a Dazl proteinem. CDC25C může tedy být fyziologickým substrátem Dazl proteinu (Venables *et al.*, 2001). U myši je protein Dazl lokalizován v jádrech spermatogonií, při meióze dochází k jeho přemístění do cytoplasmy, je možné ho detekovat v cytoplazmě spermatocytů (Reijo *et al.*, 2000).

### 3.3 URČENÍ POHLAVÍ U OBRATLOVCŮ

U obratlovců je známo několik mechanismů determinace pohlaví. Fenotypicky (enviromentálně) je pohlaví určováno například u některých plazů, u kterých nejsou přítomny dimorfní pohlavní chromozómy. Pohlaví je determinováno během periody určení pohlaví vlivem teploty, při které probíhá inkubace vajec. Například u druhu *Alligator mississippiensis* se z vajec inkubovaných v rozmezí teplot 32,5 – 33,0°C vyvíjejí pouze samečkové (Morrish a Sinclair, 2002).

U většiny savců je pohlaví určeno geneticky přítomností SRY (sex-determining region on the Y chromosome) genu, který se nachází na krátkém raménku Y chromozómu a je určujícím genem pro vývoj samčích gonád (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991). Heterogametickým pohlavím je zde samec (XY).

U ptáků je pohlaví determinováno také geneticky, heterogametickým pohlavím je zde ale samice (ZW), (Clinton, 1998). Stejná situace je i u *Xenopus laevis* či *Xenopus muelleri*, což bylo zjištěno na základě pokusů s křížením jedinců po zvratu pohlaví a poměru pohlaví při zpětném křížení potomstva (Mikamo a Witschi, 1964). Snaha identifikovat morfologicky zřetelné pohlavní chromozómy nebyla úspěšná, u rodu *Xenopus* se tedy vyskytují homomorfní pohlavní chromozómy (Tymowska a Kobel, 1972; Schmid a Steinlein, 1991).

Studie zabývající se ovlivněním genové exprese v závislosti na pohlaví u ZW systému ukázala, že u *X. laevis* a *X. muelleri* je větší množství genů zapojeno do procesu vývoje, diferenciaci a funkce varlat, než do stejných procesů u samičích gonád (Malone *et al.*, 2006).

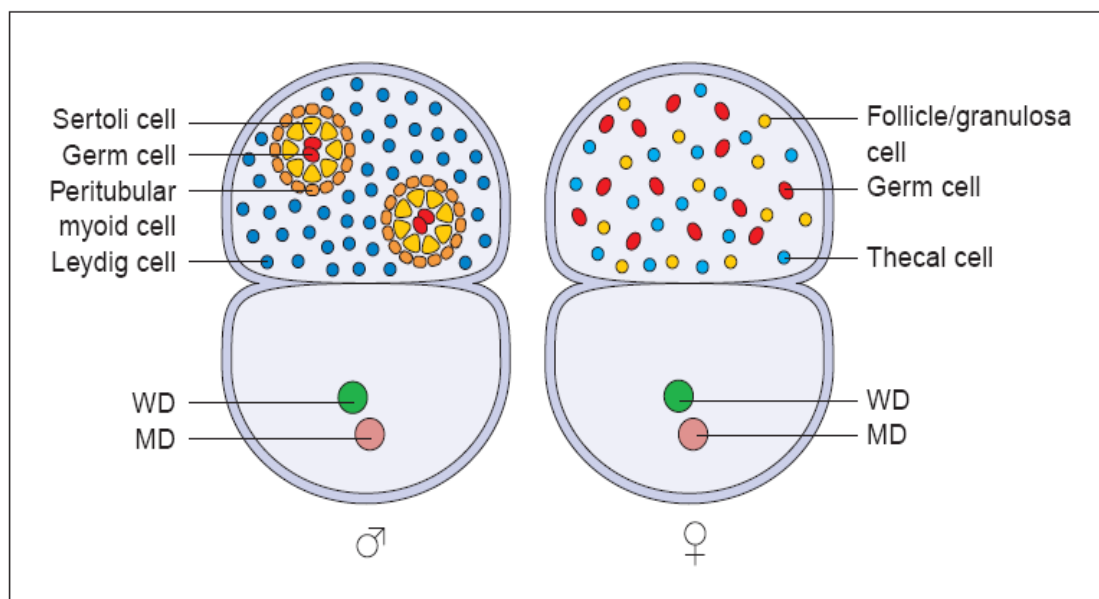
## 3.4 VÝVOJ A DETERMINACE GONÁD

### 3.4.1 Vývoj urogenitálního systému u myši

U myši se urogenitální systém formuje z intermediálního mezodermu. Začátek tohoto procesu je 9,0 – 9,5 dpc. Poté se 10,5 dpc párový urogenitální systém nachází po celé délce embrya a vyplňuje většinu coelomové dutiny. Skládá se ze tří segmentů: pronephros (zahrnuje nadledvinkové primordium), mesonephros (embryonální ledviny) a metanephros (primordium definitivních ledvin).

#### 3.4.1.1 Vývoj varlat z bipotenciálního primordia

Gonády se zakládají jako bipotenciální primordium, jedná se o párovou strukturu, která se formuje na ventromediálním povrchu mesonephros jako proliferující vrstva epiteliálních buněk coelomu okolo 10,5 dpc. V této době je u samců zahájena exprese SRY genu, který determinuje vývoj varlat. Jeho exprese je omezena pouze na pre-Sertoliho buňky v urogenitální rýze (Albrecht a Eicher, 2001) (Obr.3). Exprese SRY dosahuje maxima 11,5 dpc, poté 12,5 dpc náhle ustává (Hacker *et al.*, 1995). Exprese SRY genu vede k rychlé indukci morfologických změn v samčích gonádách. V době 12,5 dpc je možné samčí gonády zřetelně morfologicky odlišit od samičích. Samčí gonády jsou v tomto stádiu dvakrát větší než samičí a skládají se z vysoce strukturovaných základů semenných kanálků obklopených intersticiem, kde se nacházejí Leydigovy a další buňky. Semenné kanálky jsou tvořeny vrstvou Sertoliho buněk, které obklopují zárodečné kmenové buňky, bazální laminou a peritubulárními myoidními buňkami (Morrish a Sinclair, 2002) (Obr.2).

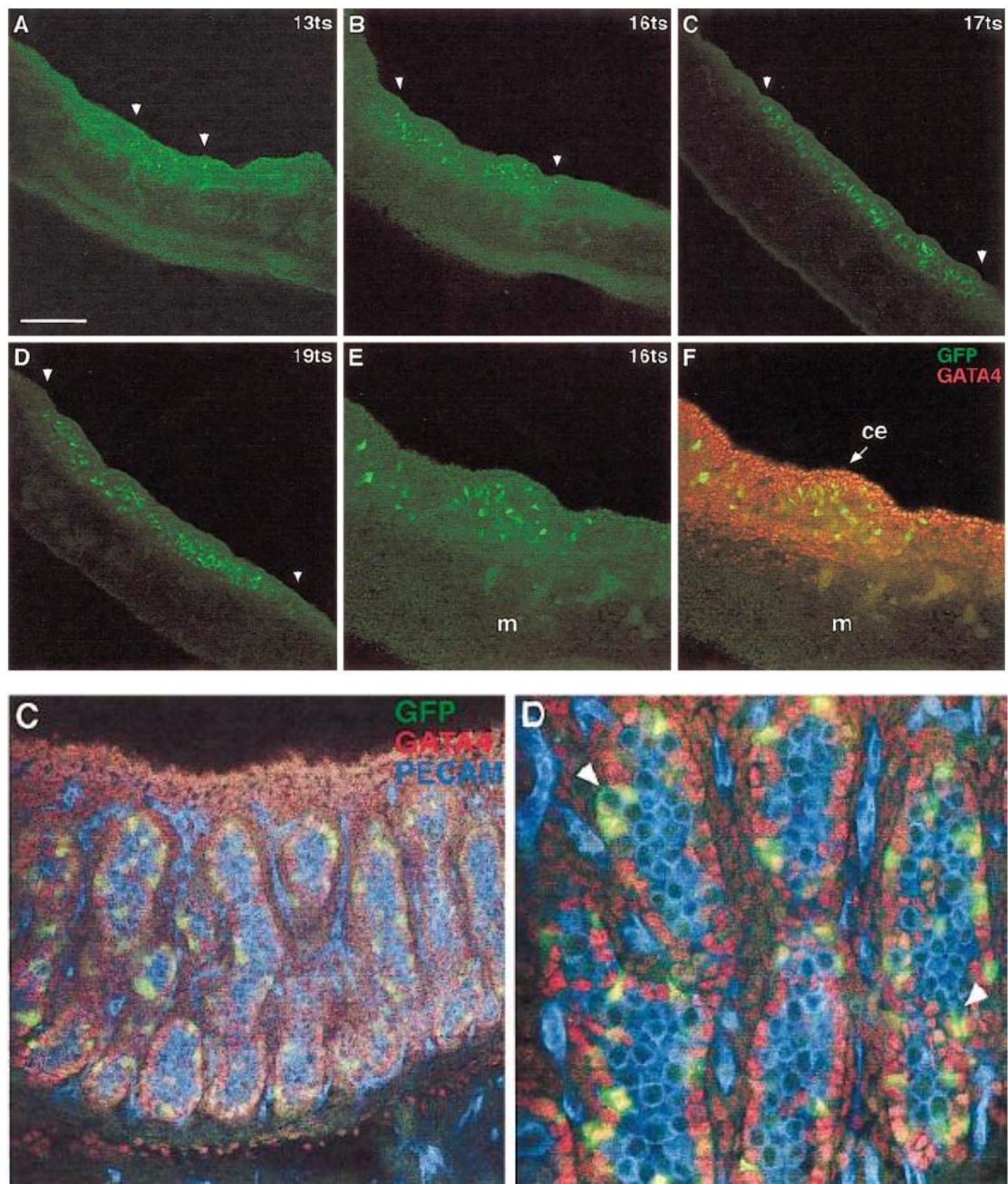


Obr.2: Schématický diagram příčného řezu embryonálními gonádami s přiléhajícím mesonephros 12,5 dpc. WD – Wolfova trubice, MD – Müllerova trubice (Morrish a Sinclair, 2002).

Wolfova trubice vzniká z laterálního mezodermu, Müllerova trubice vzniká invaginací povrchového epitelu mesonephros mezi 11,5 – 12,5 dpc a je paralelní s Wolfovou trubicí. U samic diferencuje na vejcovody, dělohu a horní část vagíny, u samců dochází k její regresi působením Anti-Müllerian hormonu (AMH), který je produkován Sertoliho buňkami. Naopak Wolfova trubice u samic degeneruje, ale u samců pod vlivem testosteronu, jenž je produkován Leydigovými buňkami, diferencuje v *epididimis*, *vas deferens* a semenné váčky (Morrish a Sinclair, 2002).

### 3.4.1.2 Role PGC v morfogenezi varlat

PGC osidlují gonády mezi 10,5 – 11,5 dpc. Jejich úloha při morfogenezi varlat je pouze minimální či zastupitelná paralelními mechanizmy. Při studiu sterilních myši nesoucích Steel mutaci bylo zjištěno, že i přes nepřítomnost PGC a dalších spermatogenních buněk, se ve varlatech nacházejí normální Sertoliho a intersticiální buňky (Younglai a Chui, 1973).



Obr.3: Expres SRY genu v pre-Sertoliho buňkách urogenitální rýhy (označeno šipkou) 11,0 – 11,5 dpc (A-F). Pozitivní buňky se 13,0 dpc nacházejí uvnitř semenotvorných kanálků (C,D). (Albrecht a Eicher, 2004)

### 3.4.1.3 Diferenciace Sertoliho buněk

Sertoliho buňky jsou prvním somatickým buněčným typem, který diferencuje při vývoji varlat. Jejich význam v tomto procesu je naprosto

zásadní. Organizují totiž vývoj všech dalších buněčných typů, které jsou specifické pro samčí pohlaví. Sertoliho buňky se formují z buněk epitelu coelomu, které migrují do gonád mezi 11,2 – 11,4 dpc. Migrace je umožněna přítomností přerušení bazální membrány na straně epitelu coelomu. Buňky, které do gonád migrují mezi 11,5 – 11,7 dpc už nejsou schopny vytvářet Sertoliho buňky, zůstávají vně základů semenotvorných kanálků a vznikají z nich buňky intersticiální. Migrace buněk ustává 12,5 dpc, kdy už jsou vytvořeny semenotvorné kanálky, dochází k zesílení bazální membrány, která vytváří *tunica albuginea* (Karl a Capel, 1998).

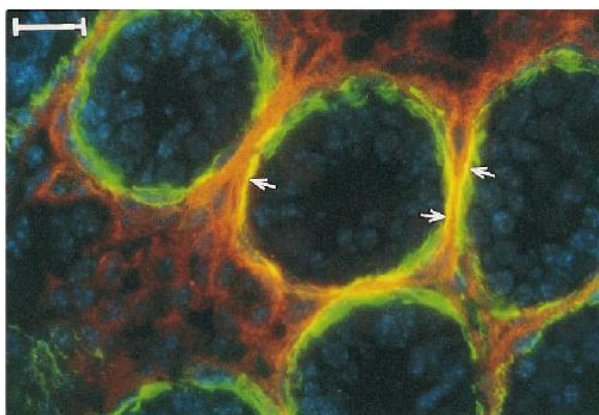
#### 3.4.1.4 Migrace buněk mesonephros

Vytváření semenotvorných kanálků je umožněno migrací buněk mesonephros do vyvíjejících se varlat. Při kultivaci varlat izolovaných z myších embryí 11,5 dpc byla formace semenotvorných kanálků závislá na přítomnosti připojeného mesonephros. Pokud byla varlata kultivována bez něj, či byla od mesonephros oddělena filtrem, postrádala základy semenotvorných kanálků (Buehr *et al.*, 1993). Migrující buňky jsou prekuzory intersticiálních endoteliálních buněk a myoidních peritubulárních buněk (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993).

Migrace buněk mesonephros je závislá na expresi SRY genu (Capel *et al.*, 1999). Při pokusu s kokultivací 11,5 dpc samčích a samičích gonád, které k sobě přiléhaly, bylo zjištěno, že buňky mesonephros mohou za těchto podmínek migrovat i do samičí gonády, kde organizují formaci semenotvorných kanálků a diferenciaci Sertoliho buněk, které byly identifikovány na základě exprese markerového genu (SOX9 – SRY-related HMG box gene 9), (Tilman a Capel, 1999).

Migrující buňky mesonephros exprimují p75NTR (p75 neurotrophin receptor či low affinity nerve growth factor receptor). Jedná se o receptor pro

neurotrophin 3 (NT3). Jeho exprese přetrvává u peritubulárních a některých intersticiálních buněk (Campagnolo *et al.*, 2001) (obr.4). Neurotrophin 3 je produkován Sertoliho buňkami a vykazuje silnou chemotaktickou aktivitu pro buňky mesonephros (Cupp *et al.*, 2003). Migrující buňky pozitivní na p75NTR exprimují také PDGFR- $\beta$  (plateled derived growth factor receptor  $\beta$ ) a jsou schopny migrovat a proliferovat in vitro v přítomnosti PDGF-BB. Ten vykazuje ve vyvíjejících se samčích gonádách vyšší expresi než v samičích, může být tedy zapojen ve vývoji varlat (Puglianiello *et al.*, 2004).



Obr.4: Řez varlaty myši 5 dní po narození, vizualizace p75NTR u intersticiálních buněk (červeně) a  $\alpha$ -SMA u peritubulárních buněk (zeleně). Žlutě jsou zanečeny buňky, kde jsou tyto markery ko-exprimovány. Měřítko 50  $\mu$ m. (Campagnolo *et al.*, 2001).

#### 3.4.1.5 Diferenciace Leydigových buněk

Prekurzory Leydigových buněk byly ve varlatech potkanů identifikovány na základě exprese nestinu, jejich specifického markeru. Populace původních Leydigových buněk byla u dospělých zvířat eliminována aplikací etan dimetan sulfonátu (EDS). Progenitorovými buňkami Leydigových buněk jsou u dospělých zvířat buňky cévního hladkého svalstva a pericyty, které specificky proliferují a následně transdiferencují na stroidogenní Leydigovy buňky (Davidoff *et al.*, 2004).

Diferenciace Leydigových buněk je ovlivňována parakrinním faktorem Dhh (desert hedgehog), který je produkován Sertoliho buňkami. Receptor Dhh Ptch1 (Patched 1) se nachází na prekurzorech peritubulárních a Leydigových

buněk, které se nacházejí vně semenotvorných kanálků. Dhh pravděpodobně nehraje roli v migraci ani přežívání prekurzorů Leydigových buněk, DHH/PTCH1 signalizace aktivuje expresi SF1 a P450 Side Chain Cleavage enzymu (Pierucci-Alves *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2002). Exprese Dhh a SF1 je nezbytná pro vývoj Leydigových buněk (Park *et al.*, 2007).

### **3.4.2 Nejvýznamnější faktory zapojené ve vývoji varlat**

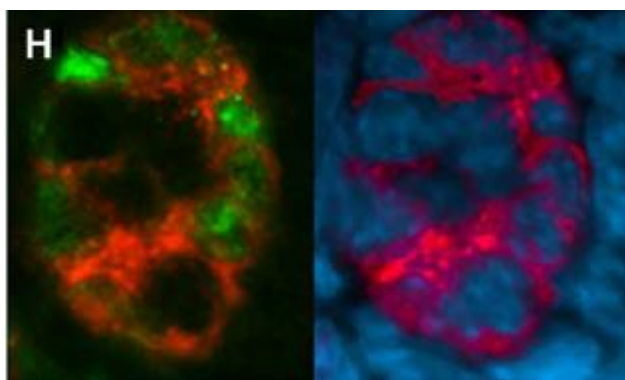
#### **3.4.2.1 SRY (sex-determining region on the Y chromosome)**

U savců jsou varlata determinována přítomností SRY genu. Ten kóduje DNA vazebný protein, který obsahuje doménu HMG-box (high-mobility group box) (Sinclair *et al.*, 1990). SRY je schopen indukovat diferenciaci varlat, pokud je vnesen do XX myších embryí (Koopman *et al.*, 1991).

Jeho exprese probíhá pouze v pre-Sertoliho buňkách v urogenitální rýze (Albrecht a Eicher, 2001), začíná 10,5 dpc, maxima dosahuje 11,5 dpc, poté 12,5 dpc náhle ustává (Hacker *et al.*, 1995). Důležitým regulátorem SRY je +KTS varianta WT1 (Wilms tumor supresor gene) (Hammes *et al.*, 2001).

SRY protein kolokalizuje se sestřihovými faktory v jádře, pokud je v živých buňkách sestřih blokovan, dochází k jeho dynamické redistribuci. DNA vazebná doména (HMG box) tohoto proteinu se v podmínkách *in vitro* účastní sestřihu (Ohe *et al.*, 2002).

SRY protein vystupuje také jako transkripční faktor. U myši spolu s SF1 kooperativně reguluje expresi SOX9 vazbou jeho enhanceru. SOX9 také váže tento enhancer a pomáhá tak udržovat svou expresi po skončení exprese SRY (Sekido a Lovell-Badge, 2008).



Obr.5: Kolokalizace SOX9 (zeleně) a SRY (modře) v semenotvorných kanálcích myši. (Sekido *et al.*, 2004)

### 3.4.2.2 SOX9 (SRY-related HMG box gene 9)

Exprese SOX9 je markerem diferenciaci Sertoliho buněk. U myši je SOX9 (*Sox9*) slabě exprimován v genitální rýze obou pohlaví 10,5 dpc, 11,5 dpc ale dochází k výraznému nárůstu exprese v samčích gonádách, zatímco v samičích gonádách je exprese potlačena. SOX9 hraje roli v určení pohlaví, je zásadním faktorem diferenciaci Sertoliho buněk u všech obratlovců (Kent *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 1996).

Stejně jako SRY obsahuje DNA vazebnou doménu HMG-box, která v podmínkách *in vitro* účastní sestřihu (Ohe *et al.*, 2002). SOX9 je autozomálním genem, jeho heterozygotní mutace u člověka vyvolává syndrom campomelic dysplasia, který se projevuje kostními abnormalitami, u většiny XY heterozygotů v SOX9 je možné pozorovat zvrát pohlaví (muž→žena) (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994).

Ke zvrátu pohlaví u myši je nutná inaktivace obou alel SOX9, embrya s homozygotní mutací ale umírají 11,5 dpc. Specifická inaktivace obou alel v gonádách umožnila demonstrovat zvrát pohlaví u XY myši, exprese SRY (*Sry*) genu u těchto myši ale přetrvává, což ukazuje na roli SOX9 při inhibici transkripce genů determinujících vývoj vaječnicků (Barrionuevo *et al.*, 2006).

Přítomnost nadbytečné kopie SOX9 genu naopak vede k vývoji varlat i při nepřítomnosti SRY (Huang *et al.*, 1999). U transgenních myší dochází k vývoji varlat i u genetických samic (XX), SOX9 je tedy schopen indukovat jejich formaci (Vidal *et al.*, 2001).

SOX9 stejně jako SRY reguluje transkripci genů zapojených ve vývoji varlat. Interaguje s SF1 při aktivaci transkripce AMH v Sertoliho buňkách (De Santa *et al.*, 1998). Je zapojen také v regulaci transkripce během vzniku a diferenciace chrupavek. Jeho cílovými geny jsou Col2a1 a Col9a3 (kolageny typu II a IX). Col2a1 díky alternativnímu sestřihu 2. exonu vytváří transkripční izoformu typickou pro chrupavky a izoformu nechrupavkovou. Nechrupavková izoforma Col2a1 je specificky exprimována během časného vývoje samčích gonád, kde je poprvé detekována 11,5 dpc. V té době je také možné detekovat expresi Col9a1, Col9a2 a Col9a3. Col2a1 a Col9a3 jsou exprimovány Sertoliho buňkami. Exprese Col2a1 ustává 13,5 dpc. Nechrupavkové kolageny typu II obsahují cystein bohatou doménu, která váže členy nadrodiny TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) signálních molekul. Nechrupavková izoforma Col2a1 exprimovaná v samčích gonádách je navíc o 9 bp kratší než nechrupavková izoforma, která se minoritně vyskytuje v chondrocytech. To naznačuje roli Col2a1 v morfogenezi a diferenciaci varlat (McClive a Sinclair, 2003).

V nediferencované gonádě samic i samců je SOX9 lokalizován v cytoplazmě budoucích podpůrných buněk. U samců dochází ke specifické reorganizaci mikrotubulárního cytoskeletu, která umožní přesun SOX9 do jádra, kde aktivuje mimo jiné i vlastní transkripci, na rozdíl od samic, kde zůstává lokalizován v cytoplazmě a jeho exprese klesá (Malki *et al.*, 2005a).

Tento přesun SOX9 z cytoplazmy do jádra je možné pozorovat v době zahájení exprese AMH (De Santa *et al.*, 2000). Jaderný import je ovlivněn interakcí SOX9 s kalmodulinem (Argentaro *et al.*, 2003) a zprostředkovan

prostaglandinovou signalizací díky stimulaci DP1 receptoru spřaženého s adenylátcyklázou prostaglandinem D2. Aktivace c-AMP dependentní proteinkinázy A indukuje fosforylaci SOX9 na S64 a S181 a posiluje vazbu na importin  $\beta$ . V embryonální gonádě je možné detekovat u samců specifické zvýšení exprese PGDS a aktivní signál PGD2 v buňkách, které exprimují SOX9. PGD2 je autokrinní faktor, který indukuje jadernou translokaci SOX9 a následnou diferenciaci Sertoliho buněk (Malki *et al.*, 2005b). Exprese PGDS je aktivována vazbou dimeru SOX9 do promotoru tohoto genu (Wilhelm *et al.*, 2007).

Vinexin  $\gamma$  je zapojen v regulaci exprese SOX9 ovlivněním MAPK kaskády (Matsuyama *et al.*, 2005).

#### 3.4.2.3 WT1 (Wilms tumor supresor gene)

Produktem tohoto genu je DNA vazebný protein, který působí jako transkripční faktor. Detekce WT1 transkriptu je v urogenitální rýze možná 9 dpc u obou pohlaví (Armstrong *et al.*, 1993), u samců je poté WT1 exprimován v pre-Sertoliho a Sertoliho buňkách (Pritchard-Jones *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991; Mundlos *et al.*, 1993). U transkriptu dochází k alternativnímu sestřihu, funkčně významná je inserce tří aminokyselin (Lys-Thr-Ser) mezi 3. a 4. zinečnatým prstem, která mění vazebnou afinitu proteinu. Při *in vitro* experimentech byla pozorována rozdílná role +KTS izoformy a -KTS izoformy při aktivaci transkripce (Shimamura *et al.*, 1997).

WT1 aktivuje expresi SF1 genu, pouze -KTS izoforma je schopná vazby promotoru SF1 a aktivace transkripce (Wilhelm a Englert, 2002). Tato izoforma také asociuje s SF1 a spolupracuje s ním na aktivaci transkripce MIS. Dax1 (dosage-sensitive sex-reversal gene) brání této kooperaci přímou interakcí s SF1. WT1 a Dax1 tedy funkčně oponují při vývoji varlat ovlivněním transkripce zprostředkované SF1 (Nachtigal *et al.*, 1998). Ve

vyvíjející se urogenitální rýze může WT1 aktivovat Dax-1 promotor, který je u samců exprimován do 12 dpc, poté exprese probíhá pouze v samičí gonádě (Kim *et al.*, 1999).

Důležitým regulátorem SRY je +KTS varianta WT1. U myši postrádajících tuto izoformu je možné pozorovat kompletní zvrát pohlaví, který je zapříčiněn výrazným snížením exprese SRY. WT1 +KTS izoforma tedy hraje významnou roli při určení pohlaví (Hammes *et al.*, 2001).

#### 3.4.2.4 FGF9 (fibroblast growth factor)

FGF9 stimuluje proliferaci Sertoliho buněk *in vitro* (Willerton *et al.*, 2004). Ztrátová mutace FGF9 (Fgf9) u myši vyvolává hypoplazii varlat až úplný zvrát pohlaví. Exprese FGF9 je detekovatelná 11,5 dpc v samčích gonádách, 12,5 dpc je FGF9 exprimován v semenotvorných kanálcích. Exprese FGF9 je závislá pravděpodobně na expresi SRY. FGF9 stimuluje proliferaci mezenchymálních buněk, migraci buněk *mesonephros* do gonád a diferenciaci Sertoliho buněk v embryonálních varlatech (Colvin *et al.*, 2001).

FGF9 je tedy nezbytný pro vývoj samčích gonád, u samičích gonád nedochází k narušení vývoje. U ztrátové mutace FGF9 nedojde 11,5 dpc ke zvýšení proliferace prekurzorů Sertoliho buněk. Aplikace exogenního FGF9 tento efekt ruší. FGF9 je také nezbytný pro jadernou lokalizaci FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) v prekurzorech Sertoliho buněk. Jaderná lokalizace tohoto receptoru se překrývá se zahájením exprese SRY a jadernou lokalizací SOX9 během časně diferenciaci Sertoliho buněk a determinace varlat. FGFR2 se nachází na plazmatické membráně buněk u samců i samic, ale pouze v samčí gonádě dochází k zvýšení buněčné proliferace. Roli zde hraje extracelulární matrix. Pohlavně specifické heparan sulfáty na povrchu buněk vedou k odlišné vazebné afinitě receptoru k FGF9 (Schmahl *et al.*, 2004).

Delece FGFR2 (*Fgfr2*) v embryonálních gonádách má stejný efekt jako delece FGF9 a vede ke zvratu pohlaví. FGFR2 hraje rozdílné role při proliferaci a diferenciaci Sertoliho buněk během vývoje varlat. Delece FGFR2 v pre-Sertoliho buňkách vede k výraznému poklesu exprese SOX9 12,5 dpc, ačkoli 11,5 dpc není exprese výrazně ovlivněna, což naznačuje, že došlo k determinaci pre-Sertoliho buněk, udržení jejich diferenciace je ale závislé na FGF9 signalizaci (Kim *et al.*, 2007). FGF9 neovlivňuje počáteční expresi SOX9. SRY spouští v samčí gonádě zpětnovazebnou smyčku mezi SOX9 a FGF9, která udržuje vysokou úroveň exprese i v nepřítomnosti SRY. FGF9 působí jako antagonist WNT4 (*Wnt4*) (wingless-related MMTV integration site), který hraje roli při determinaci samičích gonád. Plasticita bipotenciální gonády je tak regulována protichůdnými signály WNT4 a FGF9, které se vzájemně reprimují. WNT4 reprimuje i expresi SOX9 a blokuje tak vývoj samičí gonády (Kim *et al.*, 2006).

#### 3.4.2.5 SF1 (steroidogenic factor 1)

SF1 je členem rodiny hormonálních jaderných receptorů, které regulují transkripci cílových genů. SF1 je důležitým regulátorem exprese genů zapojených v regulaci steroidogeneze (Zhao *et al.*, 2004).

Expese SF1 v gonádách má zásadní význam pro jejich normální vývoj a funkci. U myši s inaktivovaným SF1 pouze ve specifických buňkách gonád, což bylo provedeno pomocí Cre rekombinázy-LOX P systému, byly pozorovány histologické abnormality ve vývoji varlat již v časných vývojových stádiích. U těchto myši se vyskytovala nápadná hypoplazie varlat, která nebyla způsobena jejich setrváním v břišní dutině, pozorováno bylo také narušení spermatogeneze. Myši byly sterilní a nedocházelo u nich k postnatálnímu pohlavnímu zrání. Dále byla pozorována výrazně snížená expese dvou základních komponent biosyntézy testosteronu (*Cyp11* –

Cholesterol side-chain cleavage enzym a StAR – Steroidogenic acute regulatory protein) v Leydigových buňkách. Nedošlo také k vytvoření lumen semenotvorných kanálků, příčinou bylo pravděpodobně porušení sekrece tekutiny Sertoliho buňkami, což je proces závislý na androgenech (Jeyasuria *et al.*, 2004).

Kromě regulace syntézy testosteronu v Leydigových buňkách, reguluje SF1 také expresi genu AMH (resp. MIS – Müllerian inhibiting substance) v Sertoliho buňkách. U samců dochází k vyšší expresi SF1 genu a následně expresi MIS a regresi Müllerovy trubice. SF1 se váže do konzervovaného upstream regulačního elementu MIS-RE-1 (MIS regulatory element 1), jehož sekvence se přesně shoduje s rozpoznávanou sekvencí SF1 (Shen *et al.*, 1994).

#### 3.4.2.6 AMH (Anti-Müllerian hormonem či MIS – Müllerian inhibiting substance)

Produktem tohoto genu je homodimerní glykoprotein, který je sekretován Sertoliho buňkami (Blanchard a Josso, 1974; Tran *et al.*, 1977). Jeho exprese je detekována poprvé 12,5 dpc (Koopman *et al.*, 1990). U potkana k regresi Müllerovy trubice dochází parakrinním mechanismem, jehož výsledkem je apoptóza epiteliálních buněk Müllerovy trubice. AMH ovlivňuje buňky sousedícího mezenchymu, které exprimují AMHRII (Anti-Müllerian hormone receptor typu II). Regrese postupuje kranio-kaudálně, což koreluje s expresí AMHRII v buňkách sousedícího mezenchymu. AMH indukuje v těchto buňkách akumulaci cytoplazmatického  $\beta$ -kateninu, který je zapojen v Wnt signalizační dráze.  $\beta$ -katenin může v jádře interagovat s LEF1 (Lymphoid enhancer factor 1) a ovlivňovat transkripci cílových genů.  $\beta$ -katenin a LEF1 jsou tedy možnými mediátory působení AMH (Allard *et al.*, 2000).

#### 3.4.2.7 HGF (Hepatocyte growth factor)

HGF je exprimován peritubulárními myoidními buňkami a sekretován do média při jejich kultivaci *in vitro*. Kultivované buňky nediferencované genitální rýhy formují základy semenotvorných kanálků pouze v přítomnosti externího HGF. Peritubulární myoidní buňky takto ovlivňují utváření základů semenotvorných kanálků (Catizone *et al.*, 2005).

V procesu vývoje a diferenciaci varlat je zapojena celá řada faktorů, u všech dosud není znám přesný mechanismus působení a jejich vzájemné interakce. Objasnění této problematiky zůstává důležitým úkolem dalšího výzkumu.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Živý materiál

##### 4.1.1.1 Žáby

*Xenopus tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov PřF UK.

##### 4.1.1.2 Buněčná kultura

Dlouhodobá primární kultura odvozená z juvenilních varlat samce *Xenopus tropicalis*.

##### 4.1.1.3 Bakterie

Pro amplifikaci plazmidů byly použity chemokompetentní bakterie *E. coli* kmene TOP 10 (Invitrogen).

#### 4.1.2 Materiál užívaný při kultivaci buněčné kultury

##### 4.1.2.1 Kultivační médium

Složení média:

L-15 Leibovitz (tekuté) (L5520, Sigma)	33,3%
RPMI 1640 (16,4mg/ml) HEPES modification (práškové) (Sigma)	33,3%
FBS (Fetal bovine serum) (F7524, Sigma)	6,67%
Glutamin (25mg/ml) (práškový) (Sevapharma a.s.)	0,66%
Uhličitan ( $\text{NaHCO}_3$ ) 7,5% stabilizovaný roztok (Sevapharma a.s.)	0,13%
Gentamycin (80mg/ml) veterinární (Lek)	0,05%

(do 100% doplnit TK H<sub>2</sub>O)

Práškové komponenty média byly nejprve naředěny TK H<sub>2</sub>O. RPMI-1640 bylo po naředění zfiltrováno.

TK H<sub>2</sub>O je připravována z deionizované H<sub>2</sub>O sterilizací v autoklávu.

#### 4.1.2.2 Trypsin, prostaglandin

Trypsin užívaný pro pasážování buněčné kultury: Trypsin-EDTA solution 10x (T4174, Sigma).

Prostaglandin D2 užívaný pro indukci diferenciac buněk: Prostaglandin D2, approx. 95% (P5172-1MG, Sigma).

### 4.1.3 Roztoky

- 0,5 % Triton X-100 v 2/3 PBS
- 1x PBS: 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>; 2,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- 1x TBE (Tris-borát-EDTA): 89 mM Tris base; 2 mM EDTA; 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,0
- 1x TNT: 0,1 M Tris-HCl ; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20, pH 7,5
- 2x SSC: 300 mM NaCl; 30 mM citrát sodný, pH 7,0
- 2% paraformaldehyd v 1 x PBS, pH 7,3 – 7,4
- 2/3 PBS: 2 díly PBS, 1 díl destilované H<sub>2</sub>O
- 3,8% formaldehyd v 2/3 PBS, pH 7,3
- 4% formaldehyd + 5% kyselina octová + 0,6% NaCl
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 15 mM NH<sub>4</sub>Cl v 2/3 PBS
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM
- Etidiumbromid: 1 mg/1 ml H<sub>2</sub>O

- Krystalová violet': 2 mg/1 ml H<sub>2</sub>O
- Krytalviolet' pufr: 30% glycerol; 20 mM EDTA; 100 µg/ml krystalové violeti
- Mowiol/DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol): 6 g glycerolu; 2,4 g Mowiol 4.88 (Sigma); 6 ml H<sub>2</sub>O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; 0,5 µg/ml DAPI (Sigma)
- TNB: 0,1 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,5% Blocking Reagent (Boehringer), pH 7,5

#### 4.1.4 Primery

Seznam použitých primerů viz tabulka (Tab.1).

Tab. 1: Seznam použitých primerů pro RT-PCR a *in situ* hybridizace (\*).

Název genu	Přední/zadní primer orientace 5' → 3'	Velikost produktu (bp)
SOX2*	TGGAGACCGATCTCAAGCC/ TGGAGGGCCACAGTTTGTC	990
SOX9*	GAGAACACCAGACCCCAAGA/ CTGTTGCTGCTGGTCACTGT	1002
DAZL	CAAGCTTTTGTGTTGCCAGA/ AATGCCATGATCCCAAAGAG	1114
WT1	GTAGGTGGGACCCAGGAG/ CTAAAGGGCCAGCTGGAGT	1268
SF1	AAGCTGGAAGAGGAACGTCA/ GAAGAGACGCTGTCCCAGAG	1159
SCF	TCTCCATTGCTTTGGGAATC/ TTCAGCTCTCGGTTCCACT	710
NCAM*	GAAGCTCCTCAACCAACAGC/ CAGGTGAAGATGGGGTGTCT	1319
VASA*	CATTCTGAGTTCTGGCGTGA/ GTTTGTCTCCTCTTTTGC	1284
PGD2S	GTGCACCACCATCATCACTC/ GATCAGTATGGGGCAGGATG	359

Název genu	Přední/zadní primer orientace 5' → 3'	Velikost produktu (bp)
<b>FGF7</b>	TTGGATCCTTCCAACCTTTGC/ CTTTGCTGTTCAAGGCAACA	491
<b>FGF9</b>	GTGTGCAGGATGCAGTGTCT/ TTTCTGGTGCCGTTTAGTCC	515
<b>FGF11</b>	TGTGGTCAGTACGTGGCAAT/ GAGCTTGGGCAGAAAGTGAG	240
<b>FGF12</b>	ATGCACCCAGATGGCACTAT/ TTCATGCAATGATGGCTCTC	387
<b>FGF13</b>	ACAGCAGGCAAGGTTACCAC/ CGGATCTGGAAAATTCTGTGA	435
<b>FGF16</b>	AGCGTTTTGGATTTTCATGG/ ATCTCTTGGGGAGCCATCTT	489
<b>TGFB1</b>	GGTGCTGCATCTTCCACTT/ TCCAGGACATCAGGAACACA	1026
<b>TGFB2</b>	GCAGCACCTTAGACATGGAT/ GGATGGTCAAGGAGTCCAGA	1010
<b>ANGPT1</b>	GCACGCAGTTCAGAACCATA/ CATTGTTGTTGCACGTAGGG	1123
<b>ANGPT2</b>	GGCCCAGTAAGAAGTTGCAG/ AGTGGGCCCTTCCAGTAGT	1217
<b>ANGPTL4</b>	GAAGGAGATCAGTGGCAAGC/ TCCTCCTGAAAGGTGTTTGG	1006
<b>INHA</b>	TAACATGGCTTCTGCTGGTG/ GCCATGGCAGTAGTGGAAC	1001
<b>INHBA</b>	TGTGCCCAGTTCTCAGAGTG/ AGCCACATTCCTCCACAATC	1091
<b>BMP1</b>	TGAAGCACTGTGTGGAGGAG/ TGGTGGGACTCCAGGTCTAC	1101
<b>BMP2</b>	GGATCCACTCTCTGCTCCTG/ CGTTCTCGTCCAGGTAGAGC	1128
<b>BMP3</b>	TCGGAGAAGTCTGAAGGAT/ ACTTTGGCATTGGAAACTGG	1122
<b>BMP4</b>	CTTGCCATTGAGGTTGTTCA/ TTCCACCACCATCTCCTGAT	501
<b>BMP6</b>	AAGCGAGAGATGCAAAAGGA/ ACTGAGATGGCGTTGAGCTT	1109
<b>BMP7</b>	CCGACTTCACCTTGGACAAT/ CTGTACGATGGCATGATTGG	1046
<b>NGF-B</b>	TCTTCACCATCACCATGGAA/ AGGTTTCGACCTTTCCTGCTT	560
<b>BDNF</b>	CCCATGAAAGAAGCCAGTGT/ TTCCCTTTTAATGGTCAGTG	682
<b>NTF4/5</b>	TTCCAGAGCCAAAACACAGA/ CCTGTCCGACTCAACAAGGT	641

Název genu	Přední/zadní primer orientace 5' → 3'	Velikost produktu (bp)
<b>EGF</b>	TGGATTTGCAATTGACTGGA/ TCTCCATGATTGATGGCTTC	530
<b>NELL2</b>	GACATCAGCCAAGCTGTCAA/ CCTTCCCGTAGCACATTCAT	1081
<b>GDNF</b>	ATGAAGTTATGGGCTATTCTGGC/ TCAAATACATCCACATTTCTTAGCG	684
<b>ARTN</b>	CTTCAGAAGGGCACATCCAT/ CCAGTTGTTGTTGACATCCAG	417
<b>MIDKINE</b>	CCCAAGCAGCAAAGAACAA/ TCTTGCCTTTGGATTGGAC	354
<b>PDGFA</b>	AAGCGTCTGCTGCTACCTGT/ CACGTGCATTCCAGATGTTTC	519
<b>PDGFB</b>	AGAGGGAGCTGTCACTTCCA/ AGGGACAGGTTACACTTGC	442
<b>PDGFC</b>	CAGTGCCAAGCAAGCAAATA/ TTTTTCATCCCACTCCTTTGC	627
<b>CTGF</b>	TGCTCCTCTTCGCTCTCTTC/ GCCATGTCCCCATACATCTT	1003
<b>CYR61</b>	GGAGTTGGAATGGTTCTGGA/ TGCATGTGGGCAGTTGTAGT	948
<b>HDGF</b>	TGCTAGGGTTGACGAAGTCC/ TCCAGAGTCCTCTGCAGGTT	631
<b>HDGF 2</b>	CGGGATTACAAAGCAGGAGA/ CCGAGACAGCTTGGATGATT	462
<b>TGas123h04.1</b>	AAGCGCAAATGCAAGAAGAT/ TCGCCTTCTCCAAGTAGGAA	1072
<b>WNT9a</b>	GCAGGAGTGCGAGTACCAGT/ ACACCTCCTCCCTTTGTGTG	803
<b>IGF2</b>	CACAGAAGTAGCAGCGTGGA/ ACGTACAATGGCAGGGACTC	501
<b>LIF</b>	TGTGCAACTGCTGATTCTCC/ CATTGACTGCTTGGTGGATG	581
<b>GRN</b>	TATGCACTGCTGTCCCATA/ CCCCAGTTTGGGATACACAT	329
<b>PENK (OGF)</b>	GGGCAGACTGCACTAAGGAC/ TCCATCCTCCTCTGAAGGAA	659
<b>NRG1</b>	TTGGCATCATGTGTGTTGTG/ TCGGAGCTTGTGTCAGTGTC	952
<b>JAG1</b>	TGTGCTGCCTTTTCAGTTTTG/ GTTGGCATTACGCAAGGTT	916
<b>DNER</b>	GTGGCTTCAAACAGTGCTCA/ GACATGGGTTGCTGTACACAC	1038
<b>CRUMBS-like 2</b>	CCAGGAAACAGCAAGTGGAT/ TCCAGCACAAGCATTCGTAG	929

### 4.1.5 Přístroje

- CO<sub>2</sub> inkubátor Sanyo MCP-18AIC (UV) (Sanyo electric)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf)
- Centrifuga Multi-spin MSC-3000 (Biosan)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Wilovert® (WILL Wetzlar)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort)
- Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1, (Ika Works)
- Vodní lázeň Techne FTE 10DE (Techne)
- Termocyklér Techne FTGRAD FD (Techne)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vyhřívaný blok Eppendorf TermoStat Plus (Eppendorf)
- Spektrofotometr Shimadzu UV-1601 (Shimadzu Corporation)
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP)
- CCD (Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation)
- Programy pro zpracování a analýzu obrazu DIPS a ACC (SOFO)

## **4.2 METODY**

### **4.2.1 Kultivace buněčné kultury *in vitro*.**

#### 4.2.1.1 Podmínky kultivace buněčné kultury

Buňky jsou kultivovány v médiu, které se skládá z čerstvě připraveného kultivačního média (viz bod 4.1.2.1) smíchaného v poměru 1:1 s filtrovaným kondicionovaným médiem (médiem z již kultivovaných buněk). Kultivace probíhala při teplotě 28°C a 6% koncentraci CO<sub>2</sub>. V závislosti na hustotě buněk byla kultura pasážována dle potřeby standardním postupem.

#### 4.2.1.2 Testování zárodečných kmenových buněk

Přítomnost zárodečných kmenových buněk byla testována histochemicky reakcí alkalické fosfatázy. Ta byla detekována pomocí Fast Red TR/Naphthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tabletes Set (F4648, Sigma). Buňky byly fixovány v 4% roztoku formaldehydu po dobu 2 hodin, substrát byl připraven dle instrukcí výrobce.

### **4.2.2 Růstová křivka**

Buňky byly kultivovány ve stejné hustotě na kultivačních deskách TPP® 24 důlků. Desky byly inkubovány v termostatu 24 hodin, aby bylo buňkám umožněno adorovat a poté byly v intervalu 12 hodin fixovány. Každá deska obsahovala 6 důlků s normálním kultivačním médiem a 6 důlků s kondicionovaným kultivačním médiem. Jako výchozí bod růstové křivky byla brána deska 0, která byla fixována 24 hodin po nasazení buněk, aby bylo zřejmé, kolik buněk skutečně adherovalo.

Postup fixace:

Desky byly nejprve promyty 3 x 2 minuty v 2/3 PBS, poté fixovány 45 minut v 3,8% roztoku formaldehydu v 2/3 PBS pH 7,3 při teplotě 28°C. Poté byly desky promyty v 1x PBS 3 x 3 minuty, 5 minut inkubovány v 15 mM NH<sub>4</sub>Cl, promyty 3 x 2 minuty v 1x PBS a následně barveny 15 minut roztokem DAPI v 1x PBS v koncentraci 1µg/1ml. Poté byly desky opláchnuty v 1x PBS, který byl následně přidán do každého důlku a takto byly desky skladovány v lednici při 4°C ve tmě.

Desky byly vyhodnoceny laserovou skenovací cytometrií na přístroji LSC iCys, který k excitaci fluorescence využívá laserové zdroje (argon laser – 488 nm, helium-argon laser – 633 nm, violet diodelaser – 405 nm) v Centru pro cytometrii AV ČR. Počet buněk byl určen na základě fluorescence obarvených jader, snímání a analýza dat byla provedena pomocí softwaru Scan data WinCyte.

### **4.2.3 Indukce diferenciacce pre-Sertoliho buněk Prostaglandinem D2 a jejich vizualizace**

#### **4.2.3.1 Indukce diferenciacce pre-Sertoliho buněk Prostaglandinem D2**

Při indukci diferenciacce buněk Prostaglandinem D2 (PGD2), byl do média přidáván Prostaglandin D2 approx. 95% (Sigma) v koncentraci 0,5 µl na 1 ml média. Buňky byly s PGD2 kultivovány 4 dny, po odstranění média byly buňky opláchnuty v 2/3 PBS pro TK a dále kultivovány v kondicionovaném médiu či použity k izolaci RNA či *in situ* hybridizaci.

#### 4.2.3.2 Vizualizace buněk před a po indukci diferenciaci

Vizualizace neovlivněných buněk a buněk ovlivněných působením PGD2 byla provedena barvením aktinového cytoskeletu pomocí phalloidinu konjugovaného s fluorescein isothiokyanátem (phalloidin-FITC).

Buňky byly pro tento účel kultivovány na krycích sklech standardním způsobem (kultivace neovlivněných buněk popsána v bodě 4.2.1.1, kultivace buněk, u nichž byla indukována diferenciaci popsána v bodě 4.2.3.1) a fixovány následujícím způsobem:

Po odstranění média byly buňky narostlé na krycích sklech 3x opláchnuty 2/3 PBS a fixovány 30 minut roztokem 3,8% formaldehydu v 2/3 PBS pH 7,3, oba roztoky byly temperovány na teplotu 28°C. Následovalo promytí 3 x 5 minut v 1x PBS, inkubace 5 minut v roztoku 15 mM NH<sub>4</sub>Cl a opět promytí v 1x PBS po dobu 3 x 1 minuty. Poté byly buňky permeabilizovány v roztoku 0,5% Triton v 2/3 PBS po dobu 2 minut a znovu promyty 3 x 5 minut v 1x PBS. Poté byla skla inkubována 1 hodinu v roztoku phalloidinu-FITC, který byl ředěn 1:100 v H<sub>2</sub>O (výsledná koncentrace 12,5 ng/μl), opláchnuta opět 3 x 5 minut v 1x PBS, opláchnuta vodou a promyta 3 minuty v H<sub>2</sub>O. Skla byla usušena na vzduchu a montována do Mowiol/DAPI. Následovalo pozorování pod fluorescenčním mikroskopem.

Obrázky byly snímány CCD černobílou kamerou. Pro zpracování a analýzu obrazu včetně přiřazení pseudobarev byl použit software DIPS a ACC.

## **4.2.4 Charakterizace buněk zhodnocením exprese vybraných markerů.**

### 4.2.4.1 Microarray analýza

#### ***4.2.4.1.1 Izolace RNA***

RNA byla izolována 1) z neovlivněných buněk, 2) buněk po indukci diferenciace PGD2 a 3) varlat pomocí RNeasy® Mini Kit (74104, Qiagen) dle instrukcí výrobce. Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm.

#### ***4.2.4.1.2 Vlastní microarray analýza***

RNA z neovlivněných a ovlivněných buněk a varlat byly odeslány ke zpracování firmě NimbleGen. Syntéza sond byla provedena maskless array technologií.

### 4.2.4.2 RT-PCR

#### ***4.2.4.2.1 Návrh primerů pro PCR amplifikaci vybraných genů***

Sekvence vybraných genů byla vyhledána v genomové databázi Ensembl ([http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/index.html](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html)). Pro návrh primerů byly použity DNA sekvence komplementární k molekulám mRNA (messenger RNA). Primery byly navrženy v programu Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) tak, aby amplifikovaný úsek měl v ideálním případě velikost přibližně 1000 bp a teplota nasedání primerů byla 60°C. Následně byla provedena kontrola primerů v programu FastPCR k vyloučení tvorby dimerů.

#### **4.2.4.2.2 Izolace RNA**

RNA byla izolována 1) z neovlivněných buněk, 2) buněk po indukci diferenciace působením PGD2 4 dny, 3) buněk po indukci diferenciace působením PGD2 4 dny a dalších 11 dnů kultivovaných v kondicionovaném médiu bez přítomnosti PGD2 a 4) varlat. Izolace byla provedena stejně jako v bodě 4.2.4.1.1.

#### **4.2.4.2.3 Syntéza prvního vlákna cDNA (First Strand)**

Syntéza byla provedena pomocí RevertAid H minus First strand cDNA Synthesis Kit (K1632, Fermentas) dle instrukcí výrobce. Jako primer byl použit oligo(dT)<sub>18</sub>, templátem byla RNA z neovlivněných a ovlivněných buněk a varlat (1 – 4), jak je popsáno v bodě 4.2.4.2.2. Pro každou reakci bylo použito vždy 700 ng příslušné RNA. Aby bylo zabráněno degradaci RNA ve vodném roztoku, byl do reakční směsi navíc v prvním kroku přidáván 0,5 µl RiboLock Rnase Inhibitor 40 u/µl (EO0381, Fermentas), kterým byl nahrazen odpovídající objem vody.

#### **4.2.4.2.4 RT amplifikace DNA podle (ss)cDNA**

Jednovláknová cDNA, která byla produktem předchozí reakce, byla použita jako templát při amplifikaci specifických úseků DNA metodou RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR).

Složky reakční směsi:

- 35 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl 10x Taq pufru s KCl (Fermentas)
- 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)
- 2 µl 25 µM předního primeru (F) (Invitrogen)

- 2  $\mu\text{l}$  25  $\mu\text{M}$  zadního primeru (R) (Invitrogen)
- 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP Mix (R0192, Fermentas)
- 1  $\mu\text{l}$  templátu (ss cDNA)
- 1  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerázy LC (recombinant) 1 U/ $\mu\text{l}$   
(EP0403, Fermentas)

Reakční směs byla promíchána, krátce centrifugována a poté převrstvena parafínovým olejem. Amplifikační reakce probíhala v termocykléru podle následujícího teplotního schématu:

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	94°C	1 min	35
Nasedání primerů	60°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	10 min	1

#### 4.2.4.2.5 Elektroforéza na agarózovém gelu

Produkty PCR amplifikace byly separovány na 1,5% agarózových gelech s etidiumbromidem v koncentraci 1  $\mu\text{g}/1\text{ ml}$  gelu. Vzorky byly vždy připravovány z 10  $\mu\text{l}$  PCR amplifikátu a 2  $\mu\text{l}$  BFM. Jako velikostní DNA marker byl používán Gene Ruler DNA Ladder mix (Fermentas). Elektroforéza probíhala v TBE v rozmezí napětí 70 – 130 V v závislosti na velikosti použitého gelu. Vzorky byly analyzovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 254 nm a snímány CCD černobílou kamerou. Obrázky byly upravovány v programech DIPS a Corel Photopaint.

### **4.2.4.3 *In situ* hybridizace na mRNA buněk kultivovaných *in vitro***

#### **4.2.4.3.1 *Kultivace buněk na podložních sklech***

Buňky použité pro *in situ* hybridizace byly kultivovány standardním způsobem. Pokud byly buňky ovlivňovány PGD2, byl použit postup, který je popsán v bodě 4.2.3.1. Použitá skla byla odmaštěna ve směsi saponátu a HCl, opláchnuta vodovodní vodou a následně H<sub>2</sub>O pro tkáňové kultury (TK H<sub>2</sub>O), ponořena do metanolu a opálena v plameni kahanu. Poté byla skla povařena v TK H<sub>2</sub>O a použita pro kultivaci buněk v Petriho miskách.

#### **4.2.4.3.2 *Příprava značené sondy pro fluorescenční in situ hybridizaci***

##### **4.2.4.3.2.1 *PŘÍPRAVA (SS)CDNA, RT-PCR AMPLIFIKACE***

Pro přípravu sondy byla použita stejná cDNA jako pro PCR amplifikaci. Postup její přípravy je popsán v bodě 4.2.4.2.3. Následná RT-PCR amplifikace byla provedena stejným způsobem, jak je popsáno v bodě 4.2.4.2.4, jedinou odchylkou bylo užití jiné koncentrace enzymu, a to Taq DNA polymerázy 5 U/μl (Fermentas).

##### **4.2.4.3.2.2 *ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM IZOLAČNÍM GELU***

PCR produkt byl separován na 1,5% izolačním gelu s přidaným roztokem krystalové violeti v koncentraci 1,6 μg/1 ml gelu. Ke vzorku byla přidána 1/6 krystalvioletového pufu.

#### 4.2.4.3.2.3 IZOLACE PCR AMPLIFIKÁTU PRO KLONOVÁNÍ

Fragmenty odpovídající velikosti byly skalpelem vyříznuty z gelu a izolace DNA byla provedena pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (Cat. No. 74104, Quiagen) dle instrukcí výrobce. Izolovaná DNA byla eluována do 50 µl injekční H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.4.3.2.4 PŘÍPRAVA A AMPLIFIKACE DNA KONSTRUKTU

Přečištěný PCR produkt byl vložen do plazmidového vektoru pCR-XL-TOPO® a amplifikován v chemokompetentních bakteriích *E. coli* kmene TOP 10 (Invitrogen), za použití TOPO® XL PCR Cloning Kit (45-0008, Invitrogen). Postup dle instrukcí výrobce. Transfekované bakterie byly vysety na agarové plotny s kanamycinovým antibiotikem (1 µl/ml agaru) a inkubovány přes noc v termostatu při 37°C. Vybrané kolonie byly přečárkovány opět na agarové plotny s kanamycinovým antibiotikem a taktéž kultivovány v termostatu při 37°C přes noc.

#### 4.2.4.3.2.5 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Izolace plazmidové DNA z bakteriálních klonů byla provedena pomocí NucleoSpin® Plasmid kitu (740588.250, Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce. Plazmidová DNA byla eluována do 50 µl injekční H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.4.3.2.6 KONTROLA PŘÍTOMNOSTI INZERTU RESTRIKČNÍM ŠTĚPENÍM

Přítomnost inzertu v získaných plazmidech byla ověřena pomocí restričního štěpení restriční endonukleázou FastDigest™ *EcoRI* (FD 0274, Fermentas). Postup byl následující: reakční směs tvořená 2 µl vzorku spolu s 2 µl FastDigest™ pufru, 1 µl FastDigest™ *EcoRI* a 15 µl vody byla inkubována

při 37°C po dobu 10 minut. Poté byla k vzorkům přidána 1/5 BFM a velikost vyštěpených fragmentů byla ověřena na 1,5% agarózovém gelu s etidiumbromidem.

#### *4.2.4.3.2.7 RE-PCR – AMPLIFIKACE INZERTU*

Plazmidy klonu s nepoškozeným inzertem byly použity jako templát PCR amplifikace.

Složení reakční směsi (s vyjímkou templátu) a teplotní schéma reakce byly totožné s těmi, co jsou popsány v bodě 4.2.4.2.4.

#### *4.2.4.3.2.8 KONTROLA A IZOLACE AMPLIFIKOVANÉ CDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY*

Velikost amplifikovaného fragmentu byla ověřena elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu s etidiumbromidem. Izolační elektroforéza byla provedena stejně jako v bodě 4.2.4.3.2.2. Vyříznuté fragmenty byly izolovány pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (74104, Quiagen) dle instrukcí výrobce. Fragmenty byly eluovány do 30 µl injekční H<sub>2</sub>O a byla stanovena jejich koncentrace.

#### *4.2.4.3.2.9 PŘÍPRAVA SONDY ZNAČENÉ DIGOXIGENINEM*

K označení přečištěné cDNA byl použit DecaLabell™ DNA Labeling Kit (K0622, Fermentas), který využívá metodu značení pomocí náhodných primerů. Postup přípravy sondy byl následující:

Reakční směs tvořená 10 µl náhodného (random) primeru v 5x reakčním pufru, 1 µg cDNA a doplněná vodou do 42 µl byla promíchána a inkubována 10 minut ve vroucí vodní lázni. Následně byla ochlazena v ledové tříšti a krátce centrifugována. Poté bylo přidáno 5 µl Non radioactive Labeling mix, 1,75 µl Dig-11-dUTP nukleotidu (Roche) a 1 µl Klenowova fragmentu

exo minus 5 U/ $\mu$ l. Směs byla opět promíchána a centrifugována a následně inkubována při 30°C po dobu 20 hodin v termocykléru.

Reakce byla následující den přidáním 1  $\mu$ l 500 mM EDTA. Značená sonda byla přečištěna pomocí Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kitu (D4002, Exbio) dle instrukcí výrobce. Navíc byl přidán 1 objem isopropanolu. Sonda byla eluována do 6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

#### ***4.2.4.3 Příprava preparátů, fixace a permeabilizace***

Podložní skla s adherovanými buňkami byla po odlití média promyta 3x 5 minut v roztoku 2/3 PBS, který byl temperován na 28°C. Promývání preparátů probíhalo za stálého třepání v cca 100 ml promývacích roztoků ve velké Petriho misce. Po odstranění zbytku kultivačního média byly preparáty fixovány v roztoku 4% formaldehydu, 5% kyseliny octové a 0,6% NaCl po dobu 30 minut v kyvetě o objemu 50 ml při pokojové teplotě (RT). Poté následovalo promytí v 1x PBS po dobu 3 x 5 minut. Preparáty byly dále dehydratovány ve stoupající řadě etanolu vždy po dobu 3 minut za třepání v 50 ml kyvetě. Ředící řada etanolu byla 70%, 90% a 100%. Dehydratované preparáty byly inkubovány v 100% xylenu po dobu jedné minuty a poté opět rehydratovány obrácenou ředící řadou etanolu. Následovalo promytí preparátů v 1x PBS po dobu 5 minut a jejich ošetření pepsinem (Sigma-Aldrich). Roztok pepsinu byl připraven bezprostředně před použitím a vytemperován na 37°C ve vodní lázni. Výsledná koncentrace pepsinu byla 50  $\mu$ g/1 ml přehřátého roztoku 0,01 M HCl; 3 mM KAc, pH 4,6. Preparáty byly do roztoku vkládány po 10 sekundových intervalech, inkubovány 5 minut a ve stejných intervalech po inkubaci opět z roztoku vyjímány. Působení pepsinu bylo zastaveno v 80 ml kyvetě s 1x PBS. Poté byly preparáty opět promyty 5 minut v PBS a postfixovány v roztoku 2% paraformaldehydu v 1x PBS, pH 7,3 po dobu 30 minut při RT. Postfixované preparáty byly promyty 3 x 5 minut v 1x PBS a poté inkubovány 30 minut v roztoku 1% peroxidu vodíku v 1x PBS v 50 ml

kyvetě za účelem inaktivace endogenních peroxidáz. Následovalo opět promytí 3 x 5 minut v 1 x PBS. Preparáty byly poté opláchnuty vodou a dehydratovány ve stoupající řadě metanolu za třepání v 50 ml kyvetě. Ředící řada metanolu byla 70%, 90% a 100%. Preparáty byly usušeny na vzduchu.

#### **4.2.4.3.4 In situ hybridizace**

Hybridizační směs byla připravena následovně:

- 25,0  $\mu$ l deionizovaného formamidu (Sigma)
- 6,25  $\mu$ l dextran sulfátu (40%)
- 5,0  $\mu$ l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (250 mM)
- 5,0  $\mu$ l 20x SSC
- 1,2  $\mu$ l salmon sperm DNA (10,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- 1,0  $\mu$ l EDTA (500 mM)
- 2,0  $\mu$ l sondy
- 4,55  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$

Celkový objem hybridizační směsi činil 50  $\mu$ l.

Na každý preparát bylo aplikováno 50  $\mu$ l hybridizační směsi a sklo bylo překryto krycím sklem o rozměrech 24 x 50 mm. Následovala denaturace při 70°C po dobu 5 minut v termocykléru Techne a inkubace ve vlhké komůrce s 30 ml 50% formamidu v termostatu při teplotě 37°C přes noc.

#### **4.2.4.3.5 Mytí preparátů**

Po 12 – 16 hodinách hybridizace byly preparáty vyjmuty z vlhké komůrky a vloženy do kyvety s 45 ml 50% formamidu *p.a.* ve 2x SSC, pH 7,0, za účelem odmytí nespecificky navázané sondy. V tomto promývacím roztoku byly inkubovány po dobu 5 minut při 42°C, po každé minutě byly promyty nahoru a dolů v kyvetě. Tento postup byl opakován ještě dvakrát s novým

mycím roztokem. Mycí roztoky byly předem vytemperovány v kyvetách na teplotu promývání. Poté byly preparáty promyty 3 x 5 minut v 2x SSC a 1 x 5 minut v 1x TNT obojí v Petriho misce.

#### ***4.2.4.3.6 Imunofluorescenční detekce***

Na preparáty byl aplikován 1 ml TNB pufru a následovala inkubace ve vlhké komůrce po dobu 30 minut. Po slití TNB pufru byl na preparáty aplikován 1 ml protilátky proti digoxigeninu konjugované s peroxidázou (Anti-digoxigenin-POD Fab fragmenty, Roche) ředěné 1000x v TNB pufru a centrifugované 5 min při 14 000 ot./min. Preparáty byly inkubovány po dobu 60 minut při RT. Po slití protilátky byla skla opláchnuta 1x TNT pufrům a promyta v Petriho misce 3 x 5 min v 1x TNT při RT.

Pro amplifikaci signálu byl použit TSA–Plus Tetramethylrhodamine System (NEL742, PerkinElmer LAS). Postup byl následující: Na preparáty bylo aplikováno *a* 100  $\mu$ l TSA s tetramethylrhodaminem 1:50 (0,33  $\mu$ l 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 1x Plus Amplification Diluent; 2  $\mu$ l tyramidu; 98  $\mu$ l 1x Plus Amplification Diluent). Poté byly preparáty překryty krycím sklem a inkubovány po dobu 10 min ve tmě při RT. Od tohoto kroku bylo nezbytné minimalizovat dobu, po kterou byly preparáty vystaveny přímému světlu během promývání a další manipulace. Následovalo opláchnutí preparátů 3 x 1x TNT a promytí v 1x TNT po dobu 3 x 5 minut. Poté byly preparáty opláchnuty vodou a 3 minuty promyty ve vodě ve velké Petriho misce. Preparáty byly usušeny na vzduchu ve tmě, zamontovány 50  $\mu$ l Mowiol/DAPI a skladovány při 4°C ve tmě.

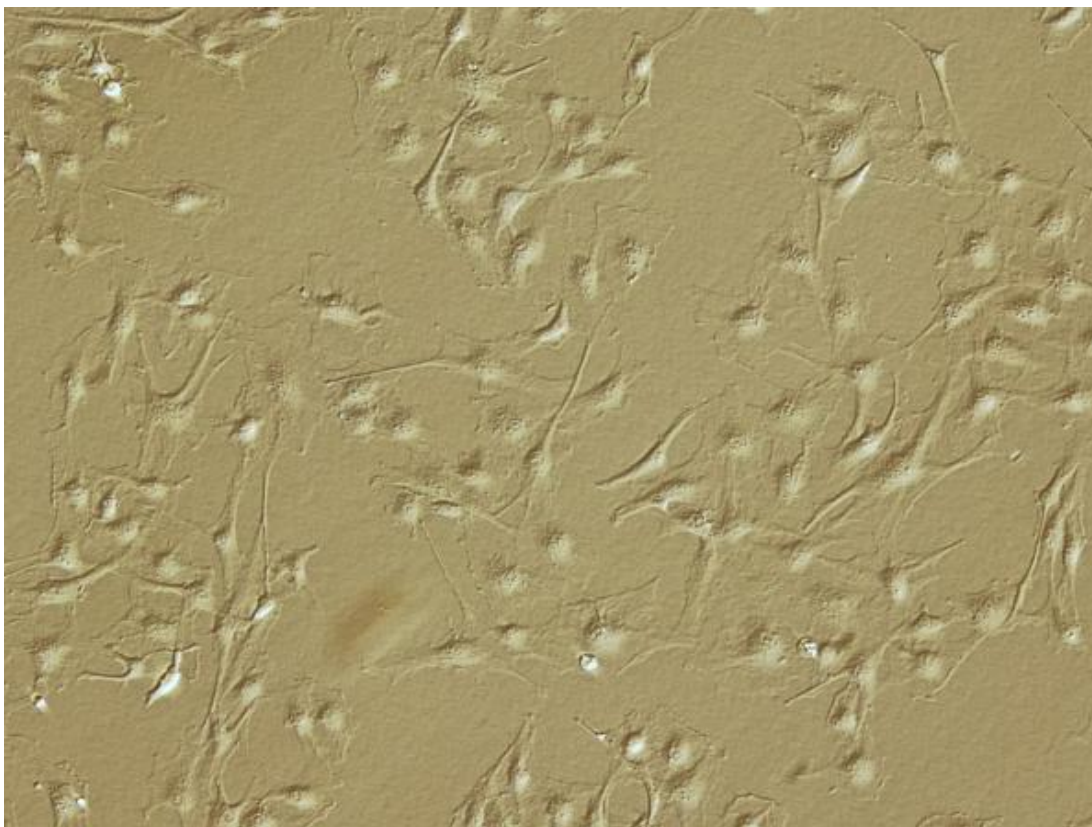
#### ***4.2.4.3.7 Analýza a zpracování obrazu***

Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Obrázky jader a FISH signálů byly snímány CCD černobílou kamerou. Pro zpracování, analýzu obrazu a k přiřazení pseudobarev byl použit software DIPS a ACC.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 IDENTIFIKACE BUNĚČNÝCH TYPŮ PŘÍTOMNÝCH V SMÍŠENÉ BUNĚČNÉ KULTUŘE

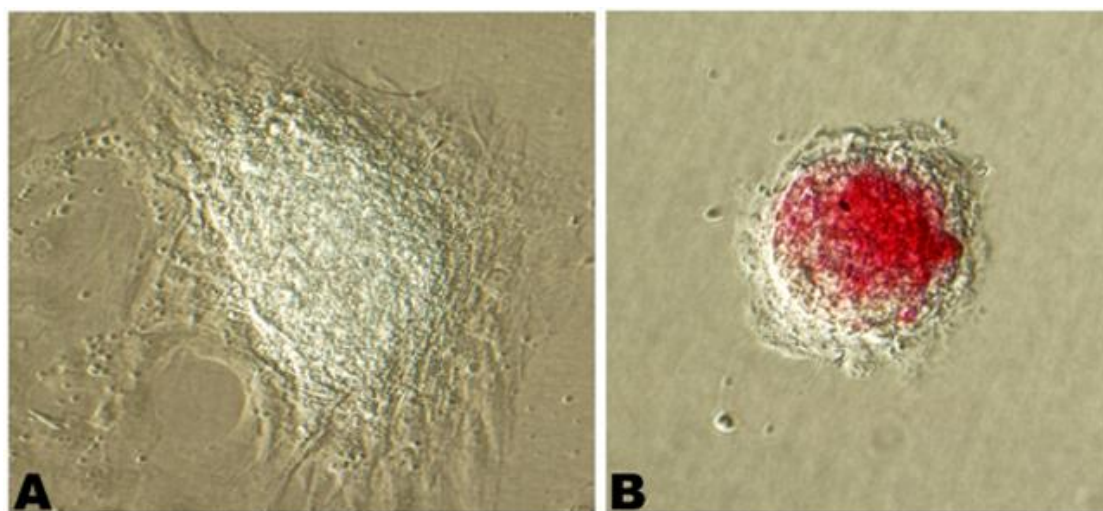
Dominantní buněčný typ vykazuje morfologické charakteristiky pre-Sertoliho buněk. Pre-Sertoliho buňky byly identifikovány na základě exprese genu SOX9, který je charakteristickým markerem Sertoliho buněk.



Obr.6: Pre-Sertoliho buňky, které tvoří dominantní buněčný typ smíšené buněčné kultury. Zvětšení 100x.

### 5.1.1 Důkaz přítomnosti kolonií zárodečných kmenových buněk pozitivní reakcí na alkalickou fosfatázu

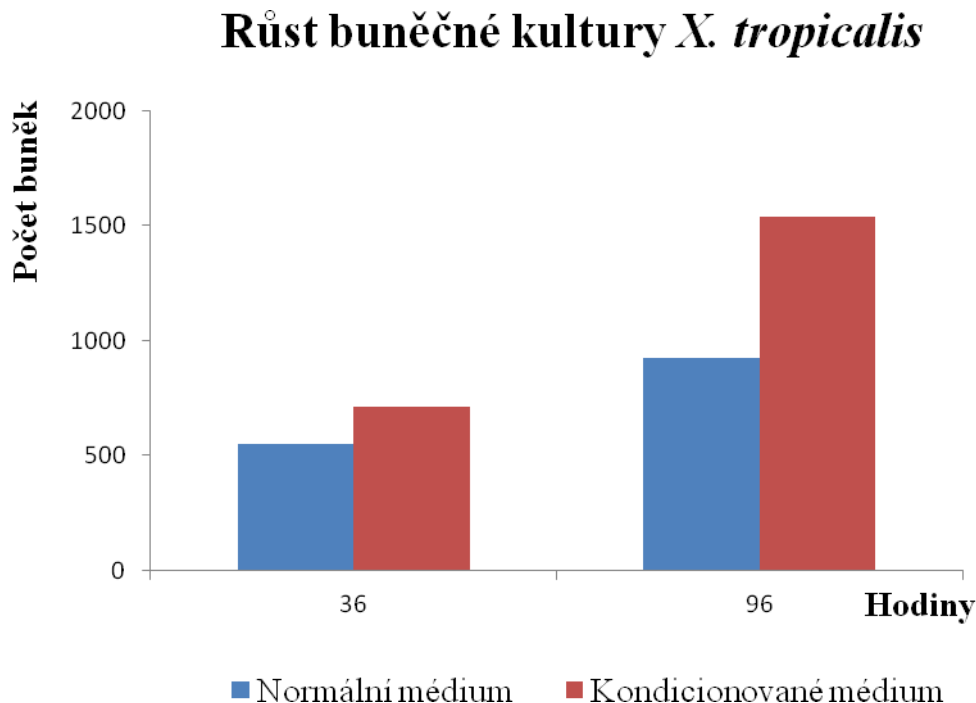
Při dlouhodobé kultivaci bez pasážování se v buněčné kultuře objevují kolonie malých buněk, které se morfolologicky liší od dominantního buněčného typu. Předpoklad, že se jedná o zárodečné kmenové buňky byl testován histochemicky detekcí přítomnosti alkalické fosfatázy. Přítomnost alkalické fosfatázy je jedním ze znaků zárodečných kmenových buněk (Hannel et al., 1990, McGregor et al., 1995). Na základě pozitivní reakce alkalické fosfatázy jsou tyto kolonie buněk považovány za zárodečné kmenové buňky.



Obr.7: Přítomnost alkalické fosfatázy v kolonii zárodečných kmenových buněk. A – pre-Sertoliho buňky s kolonií zárodečných kmenových buněk, B – důkaz přítomnosti alkalické fosfatázy v kolonii zárodečných kmenových buněk. Zvětšení 100x.

## 5.2 PRŮKAZ VLIVU KONDICIONOVANÉHO MÉDIA NA RŮST BUNĚČNÉ KULTURY

Při kultivaci buněčné kultury bylo pozorováno, že v přítomnosti kondicionovaného média dochází k rychlejší proliferaci buněk. K potvrzení tohoto pozorování a kvantifikaci vlivu kondicionovaného média byla vytvořena růstová křivka. Hodnoceny byly buňky kultivované v normálním kultivačním médiu a buňky kultivované v kondicionovaném kultivačním médiu. Počet buněk byl stanoven na základě fluorescence jader obarvených fluorescenčním interkalačním barvivem DAPI, které specificky značí DNA, metodou laserové skenovací cytometrie. Výsledky prokazují vliv kondicionovaného média na zrychlení růstu buněčné kultury. Tento efekt se zvyšuje úměrně s dobou kultivace buněk (Graf 1).



Graf 1: Proliferace buněčné kultury po 36 a 96 hod.

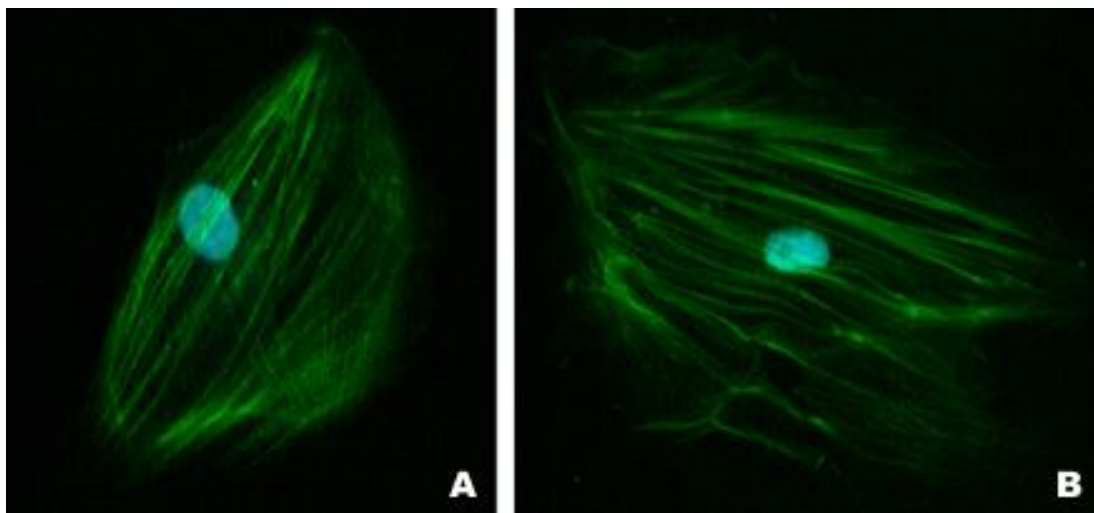
## **5.3 INDUKCE DIFERENCIACE PRE-SERTOLIHO BUNĚK PROSTAGLANDINEM D2, JEJICH VIZUALIZACE A DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI KOLONIÍ ZÁRODEČNÝCH KMENOVÝCH BUNĚK**

### **5.3.1 Indukce diferenciaci pre-Sertoliho buněk prostaglandinem D2**

Vodítkem pro určení dominantního buněčného typu směsné buněčné kultury byla exprese genu SOX9, který je základním genem diferenciaci varlat u obratlovců. Tento gen je exprimován Sertoliho buňkami. K ověření předpokladu, že dominantním buněčným typem jsou pre-Sertoliho buňky, byla směsná buněčná kultura ovlivněna působením PGD2, který je členem zpětnovazebné smyčky vedoucí k indukci exprese genu SOX9. Za tímto účelem byly buňky kultivovány v přítomnosti PGD2 4 dny a poté použity k izolaci RNA či *in situ* hybridizaci, či kultivovány dalších 11 dní v kondicionovaném médiu bez přítomnosti PGD2. Takto ovlivněné buňky byly využity v dalších experimentech, kdy byl sledován vliv působení PGD2 na genovou expresi a morfologii buněk, jejichž cílem byla charakterizace buněčné kultury. Bylo potvrzeno, že dominantním buněčným typem jsou pre-Sertoliho buňky.

### **5.3.2 Vizualizace buněk před a po indukci diferenciaci**

Pomocí barvení aktinového cytoskeletu phalloidin-FITC se podařilo vizualizovat buňky před indukci diferenciaci i buňky ovlivněné působením PGD2. Z dostupných výsledků není možné určit rozdíl v jejich morfologii (Obr.8).



Obr.8: Barvení aktinového cytoskeletu pomocí Phalloidin-FITC.  
 A – neovlivněná pre-Sertoliho buňka, B – buňka po indukci diferenciaci působením PGD2 4 dny. Zvětšení 400x.

## **5.4 CHARAKTERIZACE BUNĚK POMOCÍ ÚROVNĚ GENOVÉ EXPRESE VYBRANÝCH MARKERŮ**

### **5.4.1 Microarray analýza a RT-PCR**

Výsledky microarray analýzy ukázaly, že buňky zkoumané buněčné kultury exprimují celou řadu genů. U mnoha z nich se úroveň exprese liší nejen mezi buňkami a plně diferencovaným orgánem, ale i mezi neovlivněnými a ovlivněnými buňkami navzájem. Pomocí programu Primer 3 se podařilo navrhnout primery pro exprimované geny, metodou semikvantitativní RT-PCR amplifikovat specifické úseky těchto genů, elektroforeticky separovat vzniklé DNA fragmenty a vzájemně tak relativně porovnat expresi neovlivněných a ovlivněných buněk a varlat a tak ověřit výsledky microarray analýzy. Obrázky separovaných fragmentů byly snímány CCD černobílou kamerou a dále upraveny v programech DIPS a Corel Photopaint. Přehled hodnocených genů viz tabulka.

Tab.2 : Expresse vybraných genů.

Název	Genová exprese - data z čipu			RT-PCR			
	buňky	buňky kultivované s PGD2	varlata	1	2	3	4
SOX2	72.2068	123.1883	316.1577				
SOX9	41.0269	149.5943	334.7956				
	1593.7987	1466.4182	5594.2896				
	255.2843	371.2040	185.0467				
	324.8775	467.2387	217.9078				
DAZL	197.7695	57.7200	12946.0889				
WT1	648.4794	1961.2041	500.5053				
	968.2848	2705.6874	777.7351				
	475.1622	1724.3312	187.9743				
SF1	15130.9071	8979.0340	989.5462				
SCF	77.0694	93.4597	110.5440				
NCAM	2619.6108	6032.3174	215.9123				
	6844.3174	13501.7208	99.7149				
	26860.2408	34988.6108	2656.314				
	2533.3508	6018.4974	442.5651				
	13620.3501	11274.6670	1408.5746				
VASA	188.2462	78.8627	7114.0208				
PGD2S	741.3673	255.7405	189.9749				
	25383.7987	28609.9474	49020.0174				
FGF7	1074.5202	424.9798	62.6560				
FGF9	120.0704	157.6218	116.9671				
FGF11	108.1697	129.3997	1815.2220				
FGF12	114.9536	90.8471	762.4501				
FGF13	382.6141	253.7750	471.8170				
FGF16	421.6005	501.1266	275.4035				
TGFB1	2956.0709	2114.6390	342.2405				
TGFB2	9005.0541	11040.6125	429.6814				
	14293.6141	28823.2774	2220.6474				

Název	Genová exprese - data z čipu			RT-PCR			
	buňky	buňky kultivované s PGD2	varlata	1	2	3	4
ANGPT1	5398.8324	4507.5129	82.6364				
ANGPT2	1174.0380	204.5017	429.3004				
ANGPTL4	30318.7091	32335.9457	293.6911				
INHA	94.1744	122.5281	2394.5930				
	92.2751	88.0431	1748.0541				
INHBA	838.2710	1058.9628	407.2447				
	437.4736	1387.2808	515.8214				
BMP1	18628.1519	12510.9212	3608.0741				
BMP2	1899.7052	676.6233	237.6615				
BMP3	163.3916	118.8708	389.5500				
BMP4	2507.4842	918.6058	137.2733				
BMP6	4705.0701	1518.1894	291.5746				
BMP7	2025.0069	1016.0384	568.7931				
NGF-B	128.0899	140.3348	950.6077				
BDNF	73.5531	139.0260	543.0459				
NTF4/5	176.7446	108.9884	774.4885				
EGF	84.6047	105.6798	94.6890				
NELL2	2211.5825	1119.0518	1156.8505				
GDNF	100.9117	57.5669	219.1623				
ARTN	142.3123	240.0963	2724.0467				
MIDKINE	22321.7590	20855.0089	4828.6809				
PDGFA	23402.7203	16930.9301	169.8096				
PDGFB	1778.2497	1694.7608	1206.2495				
PDGFC	1402.3323	543.5565	336.5915				

Název	Genová exprese - data z čipu			RT-PCR			
	buňky	buňky kultivované s PGD2	varlata	1	2	3	4
CTGF	12296.6967	5598.4321	55.1385				
CYR61	6763.9671	2259.0224	374.4662				
HDGF	26727.2512	20743.8702	6665.8761				
HDGF 2	5059.2010	4201.3020	1775.7820				
TGas123h04.1	1343.5897	884.5395	181.5281				
WNT9a	924.9566	803.3148	636.2964				
IGF2	10122.2272	14790.2093	7107.3580				
LIF	5322.7689	3263.2242	291.9006				
GRN	13570.7564	14096.7208	2083.3114				
PENK (OGF)	1629.7922	1826.5852	1149.9125				
NRG1	5922.7042	4357.2395	572.1305				
JAG1	283.1637	594.6800	762.7329				
DNER	697.3874	5689.2041	153.6817				
CRUMBS-like 2	177.2097	254.4914	1849.5569				

Tab.2 : Exprese vybraných genů. Data z čipu odpovídají RT-PCR 1, 2, 4, tj. neovlivněné buňky, buňky ovlivněné působením PGD2 4 dny a varlata. RT-PCR 3 – buňky ovlivněné působením PGD2 4 dny, dalších 11 dní kultivovány bez jeho přítomnosti. Velikost amplifikovaných fragmentů ověřena srovnáním s velikostním markerem. Geny řazeny podle příslušnosti do rodin (neuveďeno).

Výsledky microarray analýzy dále ukázaly, že u celé řady genů je možné pozorovat výrazný rozdíl v expresi mezi pre-Sertoliho buňkami a plně diferencovanými varlaty. Přehled genů, u nichž exprese ve varlatech klesá více než 100 násobně, je uveden v tabulce.

Oficiální symbol	Název genu (anglicky) a zařazení
	Růstové faktory
<b>CTGF</b>	X. tropicalis connective tissue growth factor
<b>ANGPT2</b>	angiopoietin 2
<b>ANGPTL4</b>	angiopoietin-like 4
<b>PDGFA</b>	platelet-derived growth factor A
<b>TGFB2</b>	transforming growth factor, beta 2
<b>LTBP3</b>	latent transforming growth factor beta binding protein 3
<b>LTBP1</b>	latent transforming growth factor beta binding protein 1
<b>PDGFRL</b>	platelet-derived growth factor receptor-like protein
	Regulační proteiny
<b>ALDH1A3</b>	aldehyde dehydrogenase 1A3 (Retinaldehyde dehydrogenase 3)
<b>RAI1</b>	retinoic acid induced 1
<b>LRAT</b>	lecithin retinol acyltransferase
<b>FOS</b>	X. tropicalis v-fos FBJ viral oncogene homolog
<b>FOSL1</b>	X. tropicalis LOC100038288, FOS-like antigen 1
<b>PIM1</b>	pim-1 oncogene
<b>JUNB</b>	X. tropicalis jun B proto-oncogene
<b>RHOJ</b>	ras homolog gene family, member J
<b>MYC</b>	myc proto-oncogene
<b>MYCT1</b>	myc target 1
<b>TAL1</b>	t-cell acute lymphocytic leukemia-1 protein (Stem cell protein)
<b>RSU1</b>	ras suppressor protein 1
<b>RASGRP2</b>	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)
<b>IQGAP1</b>	ras GTPase-activating-like protein IQGAP1
<b>ERRFI1</b>	ERBB receptor feedback inhibitor 1
<b>ERG</b>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like
<b>RGS4</b>	X.tropicalis regulator of G-protein signaling 4
<b>CRIP1</b>	cysteine-rich protein 1 (CRIP), zinc finger protein family
<b>NR4A1</b>	X. tropicalis nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
<b>PTGER2</b>	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)
<b>FAP</b>	fibroblast activation protein, alpha subunit
<b>DIO3</b>	X. tropicalis deiodinase, iodothyronine, type 3
<b>PDE4B</b>	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific isoform 2
<b>TNIP2</b>	A20-binding inhibitor of NF-kappaB activation 2 (TNIP2)
<b>ZFP36</b>	zinc finger protein 36, C3H type
<b>EDG1</b>	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 1
<b>AXUD1</b>	AXIN1 up-regulated 1 (Wnt signalling pathway)
<b>ANTXR1</b>	tumor endothelial marker 8 isoform 1
<b>RPS6KA1</b>	ribosomal protein S6 kinase (MAPK signalling pathway)
<b>PEA15</b>	X. laevis MGC131326, phosphoprotein enriched in astrocytes 15
<b>CEBPB</b>	X. tropicalis CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
<b>CDKN1B</b>	X. tropicalis TTPA019b19, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
<b>NDRG4</b>	X. tropicalis ndrg4 protein
<b>ADIPOR1</b>	X. tropicalis adiponectin receptor 1
<b>SCAF1</b>	serine arginine-rich pre-mRNA splicing factor SR-A1
<b>SMAD7</b>	X.laevis Smad7, TGF beta inhibitor

Oficiální symbol	Název genu (anglicky) a zařazení
	Regulační proteiny
<b>PALLD</b>	palladin (Sarcoma antigen NY-SAR-77)
<b>ROR2</b>	X. tropicalis receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
<b>SDPR</b>	serum deprivation response protein; phosphatidylserine-binding protein
<b>TFE3</b>	transcription factor E3 (Tcf3)
<b>PLA2G4A</b>	cytosolic phospholipase A2, group IVA
<b>CDC5L</b>	CDC5 cell division cycle 5-like
<b>LPP</b>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
<b>TM9SF2</b>	transmembrane 9 superfamily member 2
<b>B4GALT5</b>	beta-1,4-galactosyltransferase 5
<b>NR2F2</b>	orphan nuclear hormone receptor COUP-TFII
<b>POR</b>	nADPH--cytochrome P450 reductase
<b>RBMS1</b>	c-myc gene single strand binding protein 2
<b>NAP1L1</b>	nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP-1 related protein)
<b>CCDC80</b>	coiled-coil domain containing 80
<b>PTPRK</b>	receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa
<b>SGK1</b>	serine/threonine-protein kinase , serum/glucocorticoid regulated kinase 1
<b>TPP2</b>	tripeptidyl-peptidase II
<b>ARHGEF6</b>	pAK-interacting exchange factor beta2-PIX
<b>NFIB</b>	Xenopus laevis nuclear factor I/B
<b>GPR177</b>	G protein-coupled receptor 177
<b>CCDC6</b>	coiled-coil domain containing protein 6 (H4 protein)
<b>ECE1</b>	endothelin-converting enzyme 1
<b>JAK1</b>	janus tyrosine kinase 1
<b>HEX</b>	homeobox protein PRH (Hematopoietically expressed homeobox, HEX)
<b>PI4K2B</b>	phosphatidylinositol 4-kinase type-II beta
<b>PTPRS</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S
<b>RBMS1</b>	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
<b>SAMD4A</b>	sterile alpha motif domain containing 4 (smaug homolog)
<b>TPP2</b>	tripeptidyl peptidase II
<b>SLC12A6</b>	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6
<b>ANKRD17</b>	ankyrin repeat domain protein 17
<b>TMEM181</b>	G protein-coupled receptor 178
<b>GLUD1</b>	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
<b>CSDE1</b>	cold shock domain containing E1
<b>ARHGEF7</b>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
<b>AHNAK</b>	AHNAK nucleoprotein
<b>APLP2</b>	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
<b>DAB2</b>	disabled homolog 2,
<b>NCOR2</b>	nuclear receptor co-repressor 2
<b>SH3PXD2B</b>	SH3 and PX domains 2B
<b>ENG</b>	endoglin precursor
<b>FLI1</b>	X. tropicalis Friend leukemia virus integration 1
<b>GCN1L1</b>	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1
<b>CTNNB1</b>	X. tropicalis catenin (cadherin-associated protein), beta
<b>HUWE1</b>	HECT, UBA and WWE domain containing 1

Oficiální symbol	Název genu (anglicky) a zařazení
	Regulační proteiny
<b>TRAF3IP2</b>	TRAF3 interacting protein 2
	<b>Imunita a apoptóza</b>
<b>IL10RB</b>	X. laevis interleukin 10 receptor, beta
<b>IL13RA2</b>	interleukin 13 receptor alpha 2
<b>BAT3</b>	X. tropicalis HLA-B associated transcript 3
<b>IRF1</b>	X. tropicalis interferon regulatory factor 1
<b>DRAM</b>	X. tropicalis damage-regulated autophagy modulator
<b>TNFRSF9</b>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
<b>TNFRSF12A</b>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
<b>TNFAIP2</b>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
<b>CPAMD8</b>	C3 and PZP-like, alpha-2-macroglobulin domain containing 8
<b>CFH</b>	X. tropicalis complement component factor H (cfh)
<b>HTRA3</b>	HtrA serine peptidase 3
<b>BIRC6</b>	baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)
<b>BCL2L10</b>	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
<b>APCS</b>	serum amyloid P component
<b>SERPINE1</b>	plasminogen activator inhibitor-1
<b>BCAP29</b>	b-cell receptor-associated protein 29
	<b>Cytokineze</b>
<b>CXCL14</b>	cytokine B14
<b>NAV1</b>	neuron navigator
<b>SOCS3</b>	X. tropicalis suppressor of cytokine signaling 3
<b>CD99</b>	CD99 molecule
<b>PLXNA2</b>	plexin A2
<b>PLXNB2</b>	plexin B2
<b>OLFM3</b>	noelin-3 precursor (Olfactomedin-3)
<b>SLIT3</b>	slit-3
<b>LRRC15</b>	leucine rich repeat containing 15
<b>CXCL14</b>	jun-suppressed chemokine
	<b>Cytoskele, membránový skelet</b>
<b>SPTBN1</b>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1
<b>SPTAN1</b>	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)
<b>DYSF</b>	dysferlin
<b>VIM</b>	vimentin
<b>ANXA1</b>	annexin AI
<b>ANXA3</b>	X. tropicalis annexin A3
<b>ASB2</b>	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2
<b>FLNA</b>	filamin A, alpha (actin binding protein 280)
	X. tropicalis myosin heavy chain (MGC75596)
<b>MYH9</b>	myosin, heavy chain 9, non-muscle
<b>CDH5</b>	cadherin 5, type 2
<b>VCL</b>	vinculin isoform
<b>MACF1</b>	microtubule-actin crosslinking factor 1
<b>PLS3</b>	plastin 3

Oficiální symbol	Název genu (anglicky) a zařazení
NES	nestin
GYPC	glycophorin C
COTL1	X. tropicalis coactosin-like 1
CGNL1	cingulin-like
HLA-A	transmembrane protein 123
HOOK3	golgi-associated microtubule-binding protein HOOK3
CALD1	caldesmon 1
FLOT1	flotillin-1 (Reggie-2)
FMNL3	formin-like 3
FBNP1L	X. tropicalis formin binding protein 1-like
TAGLN	transgelin
CNN2	X. tropicalis calponin-2
CLTC	clathrin heavy chain
SEPT10	septin 10
PDLIM7	X. tropicalis pdlim7 protein
	<b>Extracelulární matrix</b>
LAMA2	laminin alpha-2 chain (Laminin M chain) (Merosin heavy chain)
LAMA4	laminin alpha-4 chain
LAMB1	laminin beta-1 chain
LAMB2	laminin beta 2 chain
ITGA2B	integrin alpha 2b
ITGB3	integrin beta 3
DCN	decorin
SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular
LOX	X. tropicalis lysyl oxidase
NRXN3	neurexin 3
MMP14	X. tropicalis matrix metalloproteinase 14
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
ADAMTS3	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 3
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
	<b>Ubiquitinilace</b>
CCT8	X. tropicalis clone TTpA010m21, chaperonin containing TCP1, subunit 8
UBQLN4	X. tropicalis ubiquilin 4
THOC4	THO complex 4
CANX	calnexin
UCHL5	ubiquitin C-terminal hydrolase UCH37
USP10	ubiquitin specific peptidase 10
USP7	ubiquitin specific peptidase 7
	<b>Metabolické proteiny</b>
HK1	hexokinase 1
PGK1	phosphoglycerate kinase 1
ALDOA	X. tropicalis aldolase A
HMOX1	heme oxygenase (decyclizing) 1
NARS	asparaginyl-tRNA synthetase

Oficiální symbol	Název genu (anglicky) a zařazení
	Metabolické proteiny
<b>SERINC1</b>	serine incorporator 1
<b>F3</b>	coagulation factor III
<b>TFRC</b>	X. tropicalis transferrin receptor (p90, CD71)
<b>PXDN</b>	X. tropicalis peroxidasin
<b>ABAT</b>	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor
<b>KCNAB3</b>	X. tropicalis kcnab3, voltage-gated potassium (Kv) channel
<b>TAGLN2</b>	transgelin 2
<b>SLC2A14</b>	X. tropicalis glucose transporter 14
<b>ENPP6</b>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
<b>SLC38A2</b>	X. tropicalis solute carrier family 38, member 2
<b>STEAP2</b>	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2
<b>RPL9</b>	X. tropicalis TNeu059k22, ribosomal protein L9
<b>MTHFD2</b>	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 2
<b>TOP1</b>	DNA topoisomerase I
<b>HTRA3</b>	serine protease (Toll- associated serine protease)
<b>SLC40A1</b>	solute carrier family 40, member 1 (Ferroportin 1)
<b>PITRM1</b>	pitrilysin metallopeptidase 1
<b>EPN2</b>	X. tropicalis epsin
<b>ATP8B4</b>	ATPase class I type 8B member 4 (phospholipid-transporting ATPase IM)
	<b>Necharakterizované proteiny</b>
	protein LOC9747
	protein LOC51313
	X. tropicalis LOC496764
	low similarity to urokinase receptor isoform 1
	X. laevis MGC80468
	similar to LIM and senescent cell antigen-like domains 1
	TPR repeat-containing protein (LOC9652)
	conserved protein, contains WD40 repeat and BROMO domains
	dpy-19-like 3 (NP_997208)
	LOC339541
	conserved protein hCG1980844
	coiled-coil domain containing 4
	low similarity muscleblind-like (Drosophila) [Homo sapiens]
	low similarity to ATPase
	LOC339541
	low similarity to cation transporter ATPase

Tab.3: Přehled genů jejichž exprese klesá více než 100x ve varlatech ve srovnání s buňkami kultury.

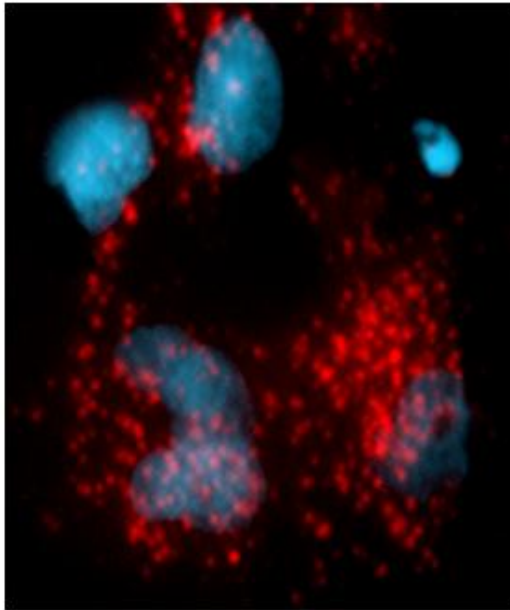
#### 5.4.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace byla použita k vizualizaci mRNA molekul vybraných genů (SOX2, SOX9, NCAM, VASA).

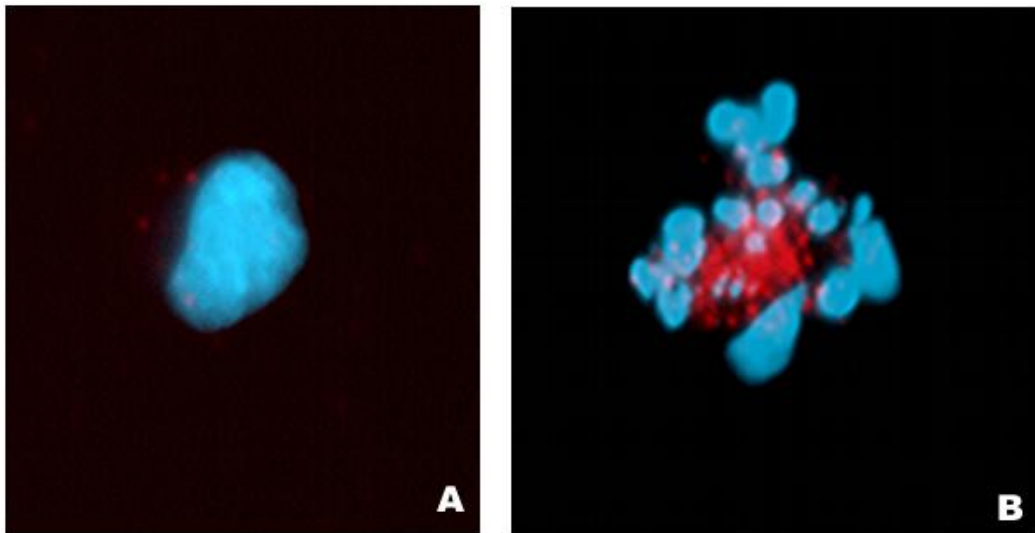
Podařilo se navrhnout specifické primery pro tyto geny, metodou RT-PCR amplifikovat specifické úseky těchto genů, vzniklou cDNA vložit do plazmidového vektoru, namnožené plazmidy z několika klonů izolovat, ověřit kvalitu inzertu štěpením restriční endonukleázou a vybraný klon použít pro reamplifikaci. Plazmidy s nepoškozeným inzertem byly templátem reamplifikace a získaná cDNA byla použita pro přípravu sond. SONDY BYLY ZNAČENY NUKLEOTIDEM DIGOXIGENIN-11-dUTP METODOU ZNAČENÍ POMOCÍ NÁHODNÝCH PRIMERŮ.

Tyto sondy byly použity pro *in situ* hybridizaci na mRNA molekulách spojenou s tyramidovou amplifikací signálu (TSA). Signál byl vizualizován aplikací protilátky proti digoxigeninu konjugované s křenovou peroxidázou a následnou reakcí peroxidázy s tyramidem konjugovaným s tetrametylrhodaminem. Jádra buněk byla obarvena pomocí DAPI.

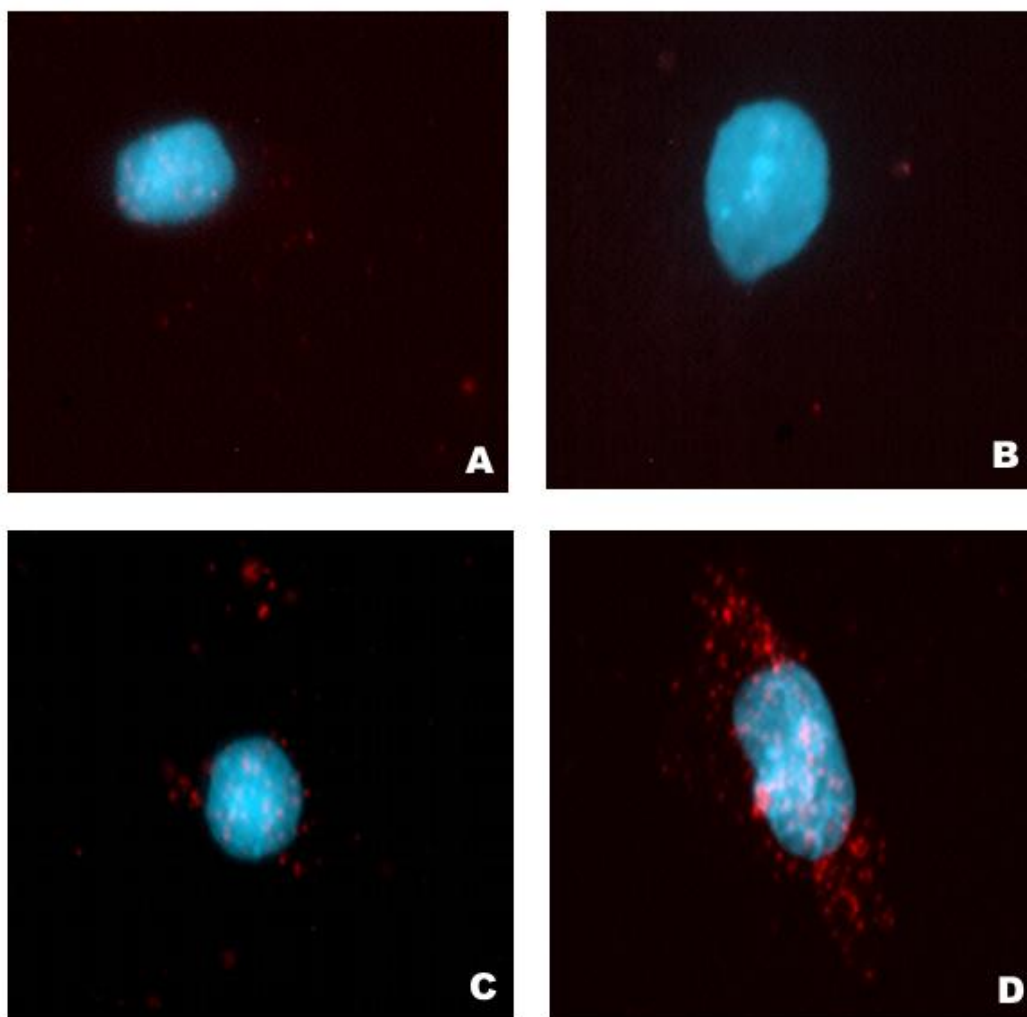
Preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem a obrázky jader a signálů byly snímány CCD černobílou kamerou a dále upraveny v programech DIPS a ACC. Výsledkem byla vizualizace mRNA molekul vybraných genů.



Obr.9: Vizualizace NCAM mRNA. FISH-TSA. Zvětšení 400x.



Obr.10: Vizualizace VASA mRNA. FISH-TSA. A – pre-Sertoliho buňka, B – kolonie zárodečných kmenových buněk. Zvětšení A 400x, B 200x.



Obr.11: Vizualizace SOX2 mRNA(A,B) a SOX9 mRNA (C,D).  
A, C – neovlivněné buňky, B, D – buňky ovlivněné působením PGD2.  
FISH-TSA. Zvětšení 400x.

## 6. DISKUSE

Vzhledem k absenci jakékoliv dostupné kultury *Xenopus tropicalis* byla snaha o její založení jedním z prvořadých cílů laboratoře vývojové biologie. Ze všech orgánů, které byly po homogenizaci kultivovány *in vitro*, pouze varlata umožnila získat dlouhodobou buněčnou kulturu.

Zprvu byly buňky kultivovány bez přítomnosti kondicionovaného média. Výsledkem bylo, že kultura rostla pomalu bez zřetelných výskytů zárodečných kmenových buněk. Při dalších experimentech byly buňky varlat přímo homogenizovány a kultivovány v kondicionovaném médiu s efektem viditelně rychlejší proliferace buněk. Po dlouhodobé kultivaci (cca 2-3 týdny) se v kultuře objevily kolonie malých buněk s odlišnou morfologií. Pozitivní reakce na alkalickou fosfatázu ukázala, že se jedná o zárodečné kmenové buňky. Výskyt zárodečných kmenových buněk je podmíněn přítomností podpůrné vyživovací vrstvy pre-Sertoliho buněk a faktorů, které jsou těmito buňkami produkovány. V současné době probíhá identifikace těchto růstových faktorů hmotnostní spektrometrií metodou MALDI TOF/TOF. Přítomnost těchto faktorů v médiu mají vliv na proliferaci jak zárodečných kmenových buněk, tak i pre-Sertoliho buněk, které tyto faktory produkují a jeví tak parakrinní i autokrinní chování. I přes neznámé složení kondicionovaného média, růstová křivka této kultury potvrdila, že v jeho přítomnosti dochází k rychlejší proliferaci buněk v kultuře.

Dominantní buněčný typ kultury vykazoval morfologické charakteristiky pre-Sertoliho buněk. Jejich identifikace byla provedena na základě exprese genu SOX9, který je základním genem diferenciací varlat u obratlovců. K jeho expresi dochází v pre-Sertoliho a Sertoliho buňkách. Pomocí RT-PCR se podařilo detekovat expresi v buňkách kultury. Sekvence amplifikátu byla ověřena sekvenací.

Expresi SOX9 je v části Sertoliho buněk navozena autonomně, v dalších buňkách dochází k indukci exprese tohoto genu prostaglandinovou signalizací. PGD2 je autokrinní faktor, který stimuluje expresi SOX9 ovlivněním jeho translokace do jádra, kde SOX9 aktivuje transkripci cílových genů, včetně své vlastní. Výsledkem signálu PGD2 je fosforylace SOX9 proteinu, která posiluje jeho vazbu na importin  $\beta$  (Malki *et al.*, 2005b). SOX9 zároveň aktivuje transkripci PGDS, která PGD2 produkuje (Wilhelm *et al.*, 2005, 2007). Vliv této indukce na pre-Sertoliho buňky byl testován ovlivněním buněk kultury pomocí PGD2. Výsledky RT-PCR naznačují, že PGD2 zvyšuje expresi SOX9, nicméně nebyla provedena přesná kvantifikace. K dispozici jsou pouze výsledky microarray analýzy, které je možné brát jako orientační, protože dochází k velkým rozdílům mezi jednotlivými sondami pro daný gen. Po odstranění PGD2 exprese u buněk klesá pravděpodobně na původní úroveň. Přechodné zvýšení exprese SOX9 v ovlivněných buňkách odpovídá dosavadním poznatkům o úloze PGD2 v regulaci jeho exprese, nicméně jeho ektopická aplikace nevede k výrazným změnám, což dává tušit, že role všech faktorů regulujících expresi SOX9 nejsou dosud zcela objasněny.

Dalším důležitým markerem diferenciací varlat je gen FGF9. Jeho ztrátová mutace způsobuje částečný či úplný zvrát pohlaví a ztrátu exprese SOX9. FGF9 tedy může regulovat expresi SOX9 (Colvin *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2006). Výsledky microarray analýzy exprese FGF9 přímo nepotvrdily vzhledem k nespolehlivosti nízkých hodnot, které byly spíše na úrovni pozadí. Pomocí RT-PCR se expresi FGF9 podařilo detekovat, nicméně mezi neovlivněnými a ovlivněnými buňkami a varlaty nejsou patrné rozdíly, které by bylo možné vyhodnotit.

Metoda RT-PCR dovolila pouze semikvantitativní porovnání exprese neovlivněných a ovlivněných buněk a ne vždy podpořila výsledky microarray analýzy. Spíše než přesná kvantifikace, bylo cílem této charakterizace získat

přehled o exprimovaných genech. U důležitých diferenciačních genů (SOX9, FGF9, PGD2S) bude nutné provést přesnou kvantifikaci metodou Real-Time PCR. Dostupné výsledky nicméně naznačují, že u některých genů dochází k ovlivnění exprese působením PGD2. Například u genu NCAM, který byl vybrán na základě výsledků microarray analýzy jako marker pre-Sertoliho buněk, výsledky RT-PCR nepotvrdily nízkou expresi ve varlatech, naopak ukázaly rozdíl mezi neovlivněnými a ovlivněnými buňkami, který naznačovala většina sond. Exprese tohoto genu stoupá po aplikaci PGD2 a po jeho odstranění nedochází k výraznému poklesu.

Výsledky microarray analýzy a RT-PCR naznačují, že efekt působení PGD2 na buněčnou kulturu není pravděpodobně zvláště významný. Dochází sice k ovlivnění exprese některých genů, rozdíly ovšem nejsou výrazné.

Výrazné rozdíly v expresi některých genů je možné podle očekávání pozorovat mezi pre-Sertoliho buňkami a diferencovanými varlaty. Geny zapojené v časných stádiích diferenciaci vykazují výrazný pokles exprese ve varlatech. U řady genů to ukazují nejen výsledky microarray analýzy, ale i RT-PCR. Z hodnocených genů jsou to: PGD2S, FGF7, TGF $\beta$ 2, rodina BMP, z nich nejvýraznější pokles vyazuje BMP6, LIF, PDGFC, CTGF, CYR61 a angiopoietiny. U celé řady genů je pokles exprese na základě microarray analýzy více než stonásobný. Jedná se o geny ze skupiny růstových faktorů, regulačních proteinů, proteinů zapojených v imunitě, apoptóze, cytokinezi, ubiquitinilaci, proteinů cytoskeletu a membránového skeletu, proteinů extracelulární matrix, metabolických proteinů i celou řadu necharakterizovaných proteinů. To odráží skutečnost, že během diferenciačních procesů dochází k intenzivní buněčné proliferaci, apoptóze či programované buněčné smrti, přestavbám cytoskeletu i extracelulární matrix buněk, vyššímu obratu proteinů v buňkách atd. Je tedy zřejmé, že v takto komplexním procesu je zapojeno velké množství genů.

Výrazný pokles exprese je možné pozorovat u faktorů, které řídí růst cév (CTGF, CYR61, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL4 a další) (Oka *et al.*, 2007; Karamysheva, 2008). Z dostupných výsledků vyplývá, že pre-Sertoliho buňky pravděpodobně řídí angiogenezi ve varlatech. Výrazný pokles vykazují i faktory, které řídí růst výběžků neuronů (neuron navigator, plexinA2, plexinB2, SLIT-3)(Martinez-Lopez *et al.*, 2005; Waimey a Cheng, 2006), což naznačuje, že Sertoliho buňky také řídí inervaci varlat. Také geny zapojené v syntéze kyseliny retinové (ALDH1A3, RAI1, LRAT) vykazují pokles ve varlatech oproti expresi v pre-Sertoliho buňkách.

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace s tyramidovou amplifikací signálu umožnila vizualizovat mRNA molekuly vybraných genů (SOX2, SOX9, NCAM, VASA). U genů SOX2 a VASA, jakožto markerů zárodečných kmenových buněk, nebyla detekována přítomnost mRNA v pre-Sertoliho buňkách. Naopak mRNA SOX9 a NCAM byla v pre-Sertoliho buňkách detekována. U SOX9 je možné pozorovat vliv působení PGD2 na indukci exprese tohoto genu. Přítomnost mRNA genu VASA v koloniích zárodečných kmenových buněk odpovídá předpokladům, nicméně může jít o artefakt nedokonalé fixace kolonií následované nedokonalým odmytím nespecificky navázané sondy. Do budoucna bude nezbytné nalézt vhodnou negativní kontrolu. Jako vhodná negativní kontrola pro pre-Sertoliho buňky se jeví gen DAZL, jehož exprese v pre-Sertoliho buňkách nebyla pomocí RT-PCR detekována. Xtdazl mRNA byla identifikována jako první specifický marker zárodečné plasmy a presumptivních PGC u *Xenopus tropicalis* (Sekizaki *et al.*, 2004). Optimalizace této metody umožní rozlišení jednotlivých buněčných typů ve smíšené kultuře pre-Sertoliho buněk, peritubulárních myoidních buněk a zárodečných kmenových buněk, pokud se tuto směsnou kulturu podaří ustanovit. Zvolením vhodných markerů bude možné sledovat interakce těchto buněk a přesně je identifikovat.

Faktorem, který zkresluje získané výsledky je skutečnost, že *in vitro* systém s velkou pravděpodobností reaguje jinak než buňky *in vivo*. Chybí zde kontakt s okolními buňkami, signální molekuly mohou unikat do média a buňky se tak mohou chovat netypicky. Nicméně tento systém může pomoci k objasnění rozdílných rolí pre-Sertoliho a Sertoliho buněk v diferenciaci varlat a představuje tak nový model spermatogeneze, který umožní ukázat chování pre-Sertoliho a Sertoliho buněk a oddělit části diferenciaci, které lze u savčích modelů oddělit jen s obtížemi.

## 7. ZÁVĚR

- Byla ustanovena růstová křivka buněčné kultury *X. tropicalis* a prokázán vliv kondicionovaného média na proliferaci buněk kultury.
- Po ovlivnění buněk PGD2 byl sledován vliv působení PGD2 na morfologii buněk a expresi vybraných genů. U některých genů dochází k ovlivnění exprese, ale celkově není efekt PGD2 příliš významný.
- Pozitivní reakcí na přítomnost alkalické fosfatázy byly v kultuře identifikovány kolonie zárodečných kmenových buněk.
- Na základě exprese markerového genu SOX9 bylo zjištěno, že převládajícím buněčným typem této kultury jsou pre-Sertoliho buňky.
- Provedená RNA microarray analýza odhalila, že buňky kultury exprimují celou řadu růstových a diferenciacních faktorů. U mnoha z nich dochází k výraznému poklesu exprese v diferencovaných varlatech, což ukazuje na jejich úlohu v časných fázích diferenciacce varlat.
- Metodou RT-PCR byla ověřena exprese vybraných genů. Získané výsledky potvrdily výsledky microarray analýzy jen v některých případech.
- Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s tyramidovou amplifikací signálu se podařilo vizualizovat molekuly mRNA vybraných genů.

## 8. PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

Albrecht, K. H., Eicher, E. M.(2001): Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* **240**: 92-107.

Allard, S., Adin, P., Guedard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M. C., Picard, J. Y., Xavier, F.(2000): Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development* **127**: 3349-3360.

Amaya, E., Offield, M. F., Grainger, R. M.(1998): Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet* **14**: 253-255.

Anderson, R., Copeland, T. K., Scholer, H., Heasman, J., Wylie, C.(2000): The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* **91**: 61-68.

Anderson, R., Fassler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R. O., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Schaible, K., Heasman, J., Wylie, C.(1999): Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* **126**: 1655-1664.

Argentaro, A., Sim, H., Kelly, S., Preiss, S., Clayton, A., Jans, D. A., Harley, V. R.(2003): A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* **278**: 33839-33847.

Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., Bard, J. B.(1993): The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* **40**: 85-97.

- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M. M., Englert, C., Scherer, G.(2006): Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* **74**: 195-201.
- Beck, C. W., Slack, J. M.(2001): An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol* **2**: REVIEWS1029.
- Bellerby C.W(1934): A rapid test for the diagnostic of pregnancy. *Nature* **133**: 494-495.
- Blanchard, M. G., Josso, N.(1974): Source of the anti-Mullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatr Res* **8**: 968-971.
- Buehr, M., Gu, S., McLaren, A.(1993): Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* **117**: 273-281.
- Campagnolo, L., Russo, M. A., Puglianiello, A., Favale, A., Siracusa, G.(2001): Mesenchymal cell precursors of peritubular smooth muscle cells of the mouse testis can be identified by the presence of the p75 neurotrophin receptor. *Biol Reprod* **64**: 464-472.
- Cannatella, D. C., de Sa, R. O.(1993): *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst Biol* **42**: 476-507.
- Cannatella, D. C., Trueb, L.(1988): Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). *Zool J Linn Soc* **94**: 1-38.
- Capel, B., Albrecht, K. H., Washburn, L. L., Eicher, E. M.(1999): Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* **84**: 127-131.
- Catizone, A., Ricci, G., Galdieri, M.(2005): HGF and postnatal testis development. *Mol Cell Endocrinol* **241**: 32-40.

- Chiquoine, A. D.(1954): The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* **118**: 135-146.
- Clinton, M.(1998): Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J Exp Zool* **281**: 457-465.
- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., Ornitz, D. M.(2001): Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* **104**: 875-889.
- Cooke, H. J., Lee, M., Kerr, S., Ruggiu, M.(1996): A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet* **5**: 513-516.
- Courtet, M., Flajnik, M., Du Pasquier, L.(2001): Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by in situ hybridization on *Xenopus* chromosomes. *Dev Comp Immunol* **25**: 149-157.
- Cupp, A. S., Uzumcu, M., Skinner, M. K.(2003): Chemotactic role of neurotrophin 3 in the embryonic testis that facilitates male sex determination. *Biol Reprod* **68**: 2033-2037.
- Davidoff, M. S., Middendorff, R., Enikolopov, G., Riethmacher, D., Holstein, A. F., Muller, D.(2004): Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* **167**: 935-944.
- de Sa, R. O., Hillis, D. M.(1990): Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol* **7**: 365-376.
- De Santa, B. P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P.(1998): Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* **18**: 6653-6665.

De Santa, B. P., Moniot, B., Poulat, F., Berta, P.(2000): Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* **217**: 293-298.

DiNapoli, L., Batchvarov, J., Capel, B.(2006): FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development* **133**: 1519-1527.

Duellman WE, Trueb L: Biology of Amphibians. (McGraw-Hill Book Co, New York., 1986).

Eberhart, C. G., Maines, J. Z., Wasserman, S. A.(1996): Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* **381**: 783-785.

Ffrench-Constant, C., Hollingsworth, A., Heasman, J., Wylie, C. C.(1991): Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development* **113**: 1365-1373.

Fostel, J., Narayanswami, S., Hamkalo, B., Clarkson, S. G., Pardue, M. L.(1984): Chromosomal location of a major tRNA gene cluster of *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **90**: 254-260.

Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kowk, G., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., .(1994): Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**: 525-530.

Ginsburg, M., Snow, M. H., McLaren, A.(1990): Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110**: 521-528.

Godin, I., Wylie, C., Heasman, J.(1990): Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* **108**: 357-363.

- Graf, J. D.(1989): Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. *Genetics* **123**: 389-398.
- Graf, J. D., Kobel, H. R.(1991): Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol* **36**: 19-34.
- Gurdon, J. B.(1975): Attempts to analyse the biochemical basis of regional differences in animal eggs. *Ciba Found Symp* **0**: 223-239.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., Marbaix, G.(1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**: 177-182.
- Gurdon, J. B., Laskey, R. A., Reeves, O. R.(1975): The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol* **34**: 93-112.
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R.(1995): Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121**: 1603-1614.
- Hahnel, A. C., Rappolee, D. A., Millan, J. L., Manes, T., Ziomek, C. A., Theodosiou, N. G., Werb, Z., Pedersen, R. A., Schultz, G. A.(1990): Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* **110**: 555-564.
- Hamilton, L.(1963): An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* **11**: 267-278.
- Hammes, A., Guo, J. K., Lutsch, G., Leheste, J. R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M. C., Schedl, A.(2001): Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* **106**: 319-329.

Heasman, J., Hynes, R. O., Swan, A. P., Thomas, V., Wylie, C. C.(1981): Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* **27**: 437-447.

Heasman, J., Wylie, C. C.(1981): Contact relations and guidance of primordial germ cells on their migratory route in embryos of *Xenopus laevis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **213**: 41-58.

Houston, D. W., King, M. L.(2000): A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* **127**: 447-456.

Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A. N., Bartley, J.(1999): Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet* **87**: 349-353.

Hummel, S., Meyerhof, W., Korge, E., Knochel, W.(1984): Characterization of highly and moderately repetitive 500 bp Eco RI fragments from *Xenopus laevis* DNA. *Nucleic Acids Res* **12**: 4921-4938.

Jamrich, M., Warrior, R., Steele, R., Gall, J. G.(1983): Transcription of repetitive sequences on *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3364-3367.

Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., de Rooij, D. G., Themmen, A. P., Behringer, R. R., Parker, K. L.(2004): Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* **18**: 1610-1619.

Karamysheva, A. F.(2008): Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* **73**: 751-762.

Karl, J., Capel, B.(1998): Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* **203**: 323-333.

- Kay, B. K., Jamrich, M., Dawid, I. B.(1984): Transcription of a long, interspersed, highly repeated DNA element in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **105**: 518-525.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., Koopman, P.(1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* **122**: 2813-2822.
- Khokha, M. K., Chung, C., Bustamante, E. L., Gaw, L. W., Trott, K. A., Yeh, J., Lim, N., Lin, J. C., Taverner, N., Amaya, E., Papalopulu, N., Smith, J. C., Zorn, A. M., Harland, R. M., Grammer, T. C.(2002): Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev Dyn* **225**: 499-510.
- Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B., Pelletier, J.(1999): The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol* **19**: 2289-2299.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K. L., Lovell-Badge, R., Capel, B.(2007): Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16558-16563.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M. C., Poulat, F., Behringer, R. R., Lovell-Badge, R., Capel, B.(2006): Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* **4**: e187.
- Kirilenko, P., Weierud, F. K., Zorn, A. M., Woodland, H. R.(2008): The efficiency of *Xenopus* primordial germ cell migration depends on the germplasm mRNA encoding the PDZ domain protein Grip2. *Differentiation* **76**: 392-403.
- Kloc, M., Dougherty, M. T., Bilinski, S., Chan, A. P., Brey, E., King, M. L., Patrick, C. W., Jr., Etkin, L. D.(2002): Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol* **241**: 79-93.
- Kloc, M., Spohr, G., Etkin, L. D.(1993): Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* **262**: 1712-1714.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R.(1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**: 117-121.

Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., Lovell-Badge, R.(1990): Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **348**: 450-452.

Krylov, V., Macha, J., Tlapakova, T., Takac, M., Jonak, J.(2003): The c-SRC1 gene visualized by in situ hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet Genome Res* **103**: 169-172.

Krylov, V., Tlapakova, T., Macha, J.(2007): Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res* **116**: 110-112.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., Hogan, B. L.(1999): *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* **13**: 424-436.

Lawson, K. A., Hage, W. J.(1994): Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* **182:68-84; discussion 84-91.**: 68-84.

MacGregor, G. R., Zambrowicz, B. P., Soriano, P.(1995): 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* **121**: 1487-1496.

Malki, S., Berta, P., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B.(2005a): Cytoplasmic retention of the sex-determining factor *SOX9* via the microtubule network. *Exp Cell Res* **309**: 468-475.

Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Mejean, C., Berta, P., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B.(2005b): Prostaglandin D2 induces nuclear import of

the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* **24**: 1798-1809.

Malone, J. H., Hawkins, D. L., Jr., Michalak, P.(2006): Sex-biased gene expression in a ZW sex determination system. *J Mol Evol* **63**: 427-436.

Martinez-Lopez, M. J., Alcantara, S., Mascaro, C., Perez-Branguli, F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E., Buesa, C.(2005): Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Mol Cell Neurosci* **28**: 599-612.

Matsuyama, M., Mizusaki, H., Shimono, A., Mukai, T., Okumura, K., Abe, K., Shimada, K., Morohashi, K.(2005): A novel isoform of Vinexin, Vinexin gamma, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells* **10**: 421-434.

McClive, P. J., Sinclair, A. H.(2003): Type II and type IX collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biol Reprod* **68**: 1742-1747.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H.(2000): Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**: 1489-1493.

Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., Buehr, M.(1993): The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* **37**: 407-415.

Mikamo, K., Witschi, E.(1964): Masculinization and breeding of the WW *Xenopus*. *Experientia* **20**: 622-623.

Morais, d. S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R.(1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* **14**: 62-68.

Morrish, B. C., Sinclair, A. H.(2002): Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* **124**: 447-457.

Muller, W. P.(1974): The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Chromosoma* **47**: 283-296.

Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., Zabel, B.(1993): Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* **119**: 1329-1341.

Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D., Ingraham, H. A.(1998): Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**: 445-454.

Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., Milbrandt, J.(2006): Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* **74**: 314-321.

Ohe, K., Lalli, E., Sassone-Corsi, P.(2002): A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1146-1151.

Oka, M., Kubota, S., Kondo, S., Eguchi, T., Kuroda, C., Kawata, K., Minagi, S., Takigawa, M.(2007): Gene expression and distribution of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) during secondary ossification center formation. *J Histochem Cytochem* **55**: 1245-1255.

Pardue, M. L., Brown, D. D., Birnstiel, M. L.(1973): Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **42**: 191-203.

Park, S. Y., Tong, M., Jameson, J. L.(2007): Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development.

*Endocrinology* **148**: 3704-3710.

Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A. J., Rogers, A., Haber, D. A., Housman, D.(1991): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* **5**: 1345-1356.

Pesce, M., Farrace, M. G., Piacentini, M., Dolci, S., De Felici, M.(1993): Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* **118**: 1089-1094.

Pierucci-Alves, F., Clark, A. M., Russell, L. D.(2001): A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod* **65**: 1392-1402.

Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., .(1990): The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* **346**: 194-197.

Puglianiello, A., Campagnolo, L., Farini, D., Cipollone, D., Russo, M. A., Siracusa, G.(2004): Expression and role of PDGF-BB and PDGFR-beta during testis morphogenesis in the mouse embryo. *J Cell Sci* **117**: 1151-1160.

Quaas, J., Wylie, C.(2002): Surface contraction waves (SCWs) in the *Xenopus* egg are required for the localization of the germ plasm and are dependent upon maternal stores of the kinesin-like protein Xklp1. *Dev Biol* **243**: 272-280.

Reijo, R. A., Dorfman, D. M., Slee, R., Renshaw, A. A., Loughlin, K. R., Cooke, H., Page, D. C.(2000): DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod* **63**: 1490-1496.

Ressom, R. E., Dixon, K. E.(1988): Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development* **103**: 507-518.

- Robb, D. L., Heasman, J., Raats, J., Wylie, C.(1996): A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell* **87**: 823-831.
- Ruggiu, M., Speed, R., Taggart, M., McKay, S. J., Kilanowski, F., Saunders, P., Dorin, J., Cooke, H. J.(1997): The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* **389**: 73-77.
- Saitou, M., Barton, S. C., Surani, M. A.(2002): A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* **418**: 293-300.
- Savage, R. M., Danilchik, M. V.(1993): Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **157**: 371-382.
- Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J. S., Ornitz, D. M., Capel, B.(2004): Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* **131**: 3627-3636.
- Schmid, M., Steinlein, C.(1991): Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **101**: 123-132.
- Sekido, R., Bar, I., Narvaez, V., Penny, G., Lovell-Badge, R.(2004): SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* **274**: 271-279.
- Sekido, R., Lovell-Badge, R.(2008): Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**: 930-934.
- Sekizaki, H., Takahashi, S., Tanegashima, K., Onuma, Y., Haramoto, Y., Asashima, M.(2004): Tracing of *Xenopus tropicalis* germ plasm and presumptive primordial germ cells with the *Xenopus tropicalis* DAZ-like gene. *Dev Dyn* **229**: 367-372.

Sette, C., Dolci, S., Geremia, R., Rossi, P.(2000): The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* **44**: 599-608.

Shapiro, H. A., Zwarenstein, H.(1934): A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature* **133**: 762.

Shen, W. H., Moore, C. C., Ikeda, Y., Parker, K. L., Ingraham, H. A.(1994): Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**: 651-661.

Shimamura, R., Fraizer, G. C., Trapman, J., Lau, Y., Saunders, G. F.(1997): The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* **3**: 2571-2580.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N.(1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **19;346**: 240-244.

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., Nishimune, Y.(2002): Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* **113**: 29-39.

Thiebaud, C. H., Fischberg, M.(1977): DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **59**: 253-257.

Tilmann, C., Capel, B.(1999): Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* **126**: 2883-2890.

- Tlapakova, T., Krylov, V., Macha, J.(2005): Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res* **13**: 699-706.
- Tran, D., Muesy-Dessole, N., Josso, N.(1977): Anti-Mullerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature* **269**: 411-412.
- Tres, L. L., Rosselot, C., Kierszenbaum, A. L.(2004): Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol Reprod Dev* **68**: 1-4.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y.(2003): Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* **301**: 1239-1241.
- Tymowska, J.(1973): Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet Cell Genet* **12**: 297-304.
- Tymowska, J., Fischberg, M.(1973): Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **44**: 335-342.
- Tymowska, J., Kobel, H. R.(1972): Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin), Pipidae. *Cytogenetics* **11**: 270-278.
- Venables, J. P., Ruggiu, M., Cooke, H. J.(2001): The RNA-binding specificity of the mouse *Dazl* protein. *Nucleic Acids Res* **29**: 2479-2483.
- Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., Schedl, A.(2001): Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* **28**: 216-217.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., .(1994): Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**: 1111-1120.

Waimey, K. E., Cheng, H. J.(2006): Axon pruning and synaptic development: how are they per-plexin? *Neuroscientist* **12**: 398-409.

Whittington, P. M., Dixon, K. E.(1975): Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* **33**: 57-74.

Wilhelm, D., Englert, C.(2002): The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* **16**: 1839-1851.

Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A. N., Kanai, Y., Koopman, P.(2007): SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J Biol Chem* **282**: 10553-10560.

Willerton, L., Smith, R. A., Russell, D., Mackay, S.(2004): Effects of FGF9 on embryonic Sertoli cell proliferation and testicular cord formation in the mouse. *Int J Dev Biol* **48**: 637-643.

Wu, Z., Templeman, J. L., Smith, R. A., Mackay, S.(2005): Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on isolated developing mouse Sertoli cells in vitro. *J Anat* **206**: 175-184.

Yao, H. H., Whoriskey, W., Capel, B.(2002): Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* **16**: 1433-1440.

Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., Zhao, G. Q.(2000): Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* **14**: 1053-1063.

Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., Nishimune, Y.(2003): Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod* **69**: 1303-1307.

Younglai, E. V., Chui, D. H.(1973): Testicular function in sterile Steel mice. *Biol Reprod* **9**: 317-323.

Zhao, L., Bakke, M., Hanley, N. A., Majdic, G., Stallings, N. R., Jeyasuria, P., Parker, K. L.(2004): Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* **215**: 89-94.

## 9. PŘÍLOHY

### Poster:

Tereza Tlapáková, Jaroslav Mácha, Vladimír Krylov, **Jana Ševčíková Jonáková**,  
Nataša Šebková, Monika Šídová, Paul Richardson

*Xenopus tropicalis* pre-Sertoli cells support growth of germinal stem cells with  
cocktail of growth factors.

12<sup>th</sup> International *Xenopus* Conference (8.-12.9.2008), Leiwen/Trier/Mosel,  
Německo.