

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Vegrichová

**Úloha proteinů BMP4 a BMP8b
na vzniku primordiálních zárodečných buněk u myši**

The Role of BMP4 and BMP8b proteins
in genesis of mouse primordial germ cells

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 14. 5. 2012

Markéta Vegrichtová

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. za pomoc a rady při psaní práce. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu a trpělivost a stejně tak svým přátelům.

Abstrakt

Primordiální zárodečné buňky jsou prekurzory pohlavních buněk u sexuálně se rozmnožujících organismů. K indukci jejich vzniku jsou nezbytné růstové faktory z extraembryonálního ektodermu. Mezi těmito faktory jsou klíčové proteiny BMP4 a BMP8b. Tyto proteiny tvoří homodimery, popřípadě heterodimery a přes komplexy receptorů a SMAD proteiny aktivují kompetentní buňky proximálního epiblastu, které dají vzniknout primordiálním zárodečným buňkám a dalším strukturám embryonálního mezodermu. Přestože proteiny BMP4 a BMP8b signalizují obdobným způsobem, jsou vzájemně nezastupitelné a k indukci primordiálních zárodečných buněk jsou proto nutné oba dva. Dosud bylo navrženo několik modelů jejich interakce, avšak žádný zatím není úplně přesný.

Klíčová slova: BMP; BMP2; BMP4; BMP8b; PGC; embryo myši; indukce

Abstract

Primordial germ cells are precursors of sexual breeding organisms. For induction of their formation are necessary growth factors from extraembryonic ectoderm. There are key proteins BMP4 and BMP8b among these factors. These proteins form both homodimers and heterodimers and through receptor complexes and SMAD proteins are indicating the competent cells of proximal epiblast, which give rise to the primordial germ cells and other structures of embryonic mesoderm. Although BMP4 and BMP8b proteins signal similarly, they are mutually indispensable and though for induction of primordial germ cells are both necessary. Up to now, it was proposed several models of their interaction, but not yet completely accurate.

Key words: BMP, BMP2; BMP4; BMP8b; PGC; mouse embryo; induction

Obsah

1.	Seznam zkratek	1
2.	Úvod	2
3.	Proteiny BMP	3
3.1.	Struktura	4
3.2.	Signalizace	6
3.3.	Role v embryonálním vývoji	7
4.	Primordiální zárodečné buňky	9
4.1.	Migrace	10
4.2.	Proliferace	12
4.3.	Pohlavní diferenciaci	13
4.4.	Imprinting	13
4.5.	Embryonální zárodečné buňky	13
5.	Vliv BMP4 a BMP8b na PGC	14
5.1.	Úloha BMP4	15
5.2.	Úloha BMP8b	20
5.3.	Společný vliv BMP4 a BMP8b na PGC	22
6.	Závěr	26
7.	Použitá literatura	28

1. Seznam zkratek

ACTrX		activin type X receptor
ADMP	anti-dorzalizující morfogenní protein	anti-dorsalizing morphogenetic protein
ALK		activin receptor-like kinase
APRT	adenin fosforibosyltransferáza	adenine phosphoribosyltransferase
BMP	kostní morfogenetický protein	bone morphogenetic protein
BMPr	receptor morfogenetického kostního proteinu	bone morphogenetic protein receptor
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor	basic fibroblast growth factor
CDMPs	morfogenní proteiny chrupavky	cartilage-derived morphogenetic proteins
CUB doména		complement-Uegf-BMP-1
<i>dpc</i>	den po oplození	<i>day post coitum</i>
EB	embryonální tělísko	embryoid body
ESC	embryonální kmenové buňky	embryonic stem cells
FGF	fibroblastový růstový faktor	fibroblast growth factor
GDF	růstový diferenciační faktor	growth differentiation factor
HPRT	hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferáza	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
KL		c-kit ligand
LIF	leukemii inhibující faktor	leukemia inhibitory factor
MEF	myší embryonální fibroblast	mouse embryonic fibroblast
MH1 a MH2	mad-homologní doména	mad-homology domain
MSX2		muscle segment homeobox 2
OCT4	na oktamer vázaný protein	octamer-binding protein 4
OP	osteogenní protein	osteogenic protein
PGCs	primordiální zárodečné buňky	primordial germ cells
POU5F1		POU domain, class 5, transcription factor 1
SCF	faktor kmenových buněk	stem cell factor
SCP		subtilisin-like proprotein convertase
SOX2	sexuálně determinovaný region na Y chromozomu-box 2	sex determining region Y-box 2
TGF-β	transformující růstový faktor β	transforming growth factor β

2. Úvod

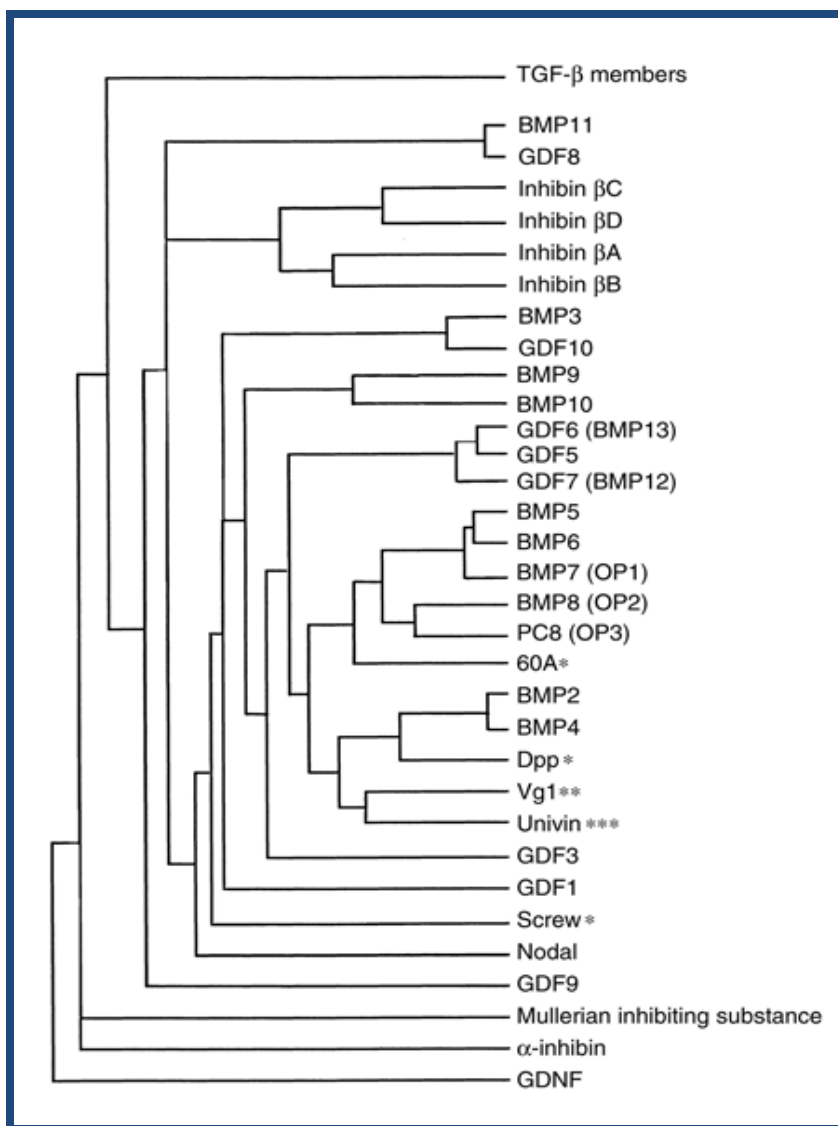
Pohlavní rozmnožování, které je zásadní pro většinu živočišných druhů, by nemohlo existovat bez pohlavních buněk. Tyto buňky jsou zodpovědné za přenos genetické informace mezi generacemi. Přestože jsou plně diferencované, musí mít určitý totipotentní potenciál, aby mohly dát vzniknout všem tkáním nového jedince. Koexistence těchto relativně protichůdných vlastností z nich činí lákavý cíl výzkumu. Kromě těchto vlastností jsou pohlavní buňky zajímavé také vlastním vývojem. Jako primordiální zárodečné buňky zakládají první specifickou buněčnou linii v savčím embryu. Po vzniku v proximálním epiblastu se oddělují od ostatních buněk a vyvíjejí se samostatně. Další vývoj buněk zahrnuje řadu fascinujících genetických, epigenetických i morfologických procesů, včetně proliferace a samozřejmě migrace do genitální rýhy vyvíjejícího se embrya, kde podstoupí meiózu a stanou se tak haploidními gametami.

Přestože je kompletní vývoj těchto buněk fascinující, tato bakalářská práce je zaměřena na vznik primordiálních zárodečných buněk u embrya myši. Dochází k němu velice záhy při vývoji embrya, aby se zabránilo přibývajícím mutacím. U některých organismů jsou za jejich vznik zodpovědné maternální RNA. Ovšem u myši, tedy savčího modelového organismu, fungují zcela jiné mechanismy. V průběhu let se podařilo objevit mnoho faktorů, které mohou ovlivňovat vznik primordiálních zárodečných buněk i jejich další vývoj. Kostní morfogenetické proteiny BMP4 a BMP8b (BMPs, bone morphogenetic proteins) byly definovány jako nepostradatelné pro všechny tyto procesy.

Cílem této bakalářské práce je shrnout nejdůležitější informace o osudu primordiálních zárodečných buněk ve vyvíjejícím se embryu myši. První část práce je věnována celé skupině růstových faktorů označovaných jako BMPs včetně jejich struktury a funkce. Další část rozebírá vliv dvou konkrétních proteinů BMPs (BMP4 a BMP8b) na vznik zárodečných buněk včetně jejich konkrétní funkce a vzájemné interakce. Přestože v této oblasti existuje stále mnoho nezodpovězených otázek, výsledky provedených experimentů již nyní naznačují, který z navržených modelů nejlépe odpovídá skutečnosti, a současně otevírají nové možnosti pro další výzkum.

3. Proteiny BMP

Růstové faktory BMPs patří do superrodiny cytokinů TGF- β (transforming growth factor β) vyjma proteinu BMP1, který se řadí mezi metaloproteázy. BMP tvoří téměř jednu třetinu TGF- β rodiny a dosud jich bylo popsáno již více než třicet členů (Obr. 1).



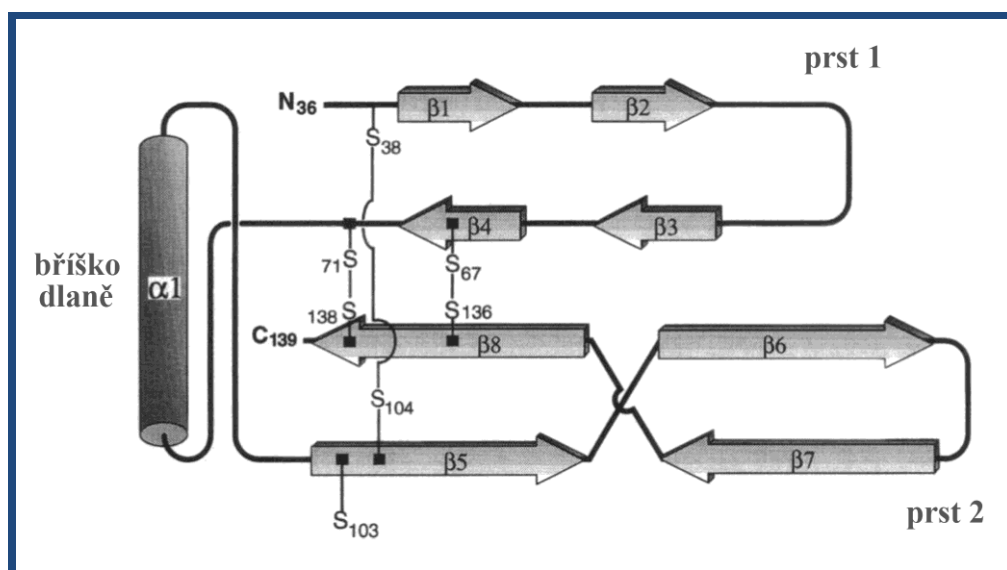
Obr. 1: Fylogenetické vztahy mezi členy BMP rodiny. *Protein nacházející se u drozofily; ** Protein nacházející se u rodu *Xenopus*; *** Protein nacházející se u ježovky; žádná hvězdička – protein nacházející se u myší/lidí (převzato z Ducey and Karsenty 2000).

Pojmenování BMP původně označovalo pouze tři proteiny, a to BMP1, BMP2 a BMP3. Tyto proteiny byly poprvé izolovány z demineralizovaného kostního preparátu, který po implantaci pod kůži hlodavců vyvolal tvorbu ektopické chrupavky a kosti (Wozney et al., 1988). Postupně bylo dokázáno, že BMPs regulují různorodé biologické procesy zahrnující buněčnou proliferaci, apoptózu, diferenciaci, determinaci a morfogenezi. BMPs obratlovců jsou také zapojeny ve vývoji téměř všech orgánů a tkání při tvorbě základního embryonálního tělního plánu (Hogan 1996). Podle funkce jsou některé jednotlivé proteiny ze skupiny BMP nazývány jako osteogenní proteiny (osteogenic proteins - OPs), morfogenní proteiny chrupavky (cartilage-derived morphogenetic proteins - CDMPs) nebo růstové a diferenciacní faktory (growth differentiation factors - GDFs) (Ducy and Karsenty 2000). Mnoho proteinů BMP je produkováno v kosti a vykazují osteogenní aktivitu (Daluisi et al. 2001). Bylo prokázáno, že vyřazení genů *Bmp* může často způsobit skeletální abnormality (Rider and Mulloy 2010). Opačným případem je například BMP3, který je fakticky antagonistou typické aktivity BMP proteinů. Zjistilo se, že generace knock-out myši *Bmp3*^{-/-} má dvakrát tolik trabekulární kosti než jejich wild-type sourozenci. Tento fakt naznačuje, že BMP3 je negativní determinantou hustoty kostí, a to i přesto, že je to nejvíce zastoupený protein BMP v kostní tkáni dospělých jedinců (Daluisi et al. 2001).

3.1. Struktura

Proteiny BMP jsou syntetizovány jako velké prekurzory, stejně jako ostatní členové TGF- β superrodiny. Tyto prekurzory pak v cytoplazmě buněk vytvoří pomocí disulfidické vazby homodimer. Po dimerizaci je odštěpena N-koncová pro-doména, která ve většině případů po odštěpení disociuje a výsledkem je konečná forma proteinu, která je sekretována z buňky ven. V některých případech (např. GDF8) zůstává pro-doména po sekreci asociovaná s proteinem a inhibuje navázání ligandu na receptor. U BMP9 ve stejné situaci ale k inhibici nedochází (Brown et al. 2005). Účinnost štěpení BMP prekurzorů může být ovlivněna pomocí členů rodiny SCP (subtilisin-like proprotein convertase) a závisí také na sekvenci sousedící s restričním místem. Identita pro-domény pak ovlivňuje délku života, respektive stabilitu proteinu (Constam and Robertson 1999).

BMPs jsou charakteristické tím, že mají sedm cysteinů v maturované části (Hogan 1996). Analýza krystalové struktury dvou členů rodiny TGF- β (TGF β 2 a BMP7) odhalila, že jádro monomeru je skupina cysteinů se třemi disulfidickými vazbami. Dvě vazby Cys-67-Cys-136 a Cys-71-Cys-138 utváří kruh, kterým prochází třetí Cys-38-Cys-104. Vzhled monomeru se připodobňuje k otevřené ruce, kde jeho jádro reprezentuje dlaň. Na jedné straně z cysteinového kruhu vychází čtyři vlákna antiparalelního β -listu, který tvoří dvě prstovité projekce. Na opačném konci kruhu pak leží kolmo k ose prstů α -helix, který představuje bříško dlaně (Griffith et al. 1996). Většina BMP proteinů dále obsahuje cystein, který tvoří mezi podjednotkami pravděpodobně jedinou intermolekulární disulfidickou vazbu (Obr. 2). V roce 1993 však byly objeveny proteiny GDF3 a GDF9, které tento cystein postrádají, což naznačuje, že kovalentní vazba k dimerizaci není nutná (McPherron and Lee 1993).



Obr. 2: Schematické zobrazení struktury monomeru MP7, který je konstrukčním vzorem pro rodinu TGF- β . β -listy jsou zobrazeny jako šipky a α -helix jako válec. Intramolekulární disulfidické vazby jsou zakresleny tenkými tahy (převzato a upraveno podle Griffith et al. 1996)

Zcela odlišná struktura byla popsána u proteinu BMP1. Tento protein nepatří do rodiny TGF- β , ale řadí se mezi metaloproteázy. BMP1 je prokolagen C-proteináza, která štěpí karboxylový konec prokolagenu I, II a III, a pro svou funkci vyžaduje přítomnost vápníku. Stejně jako ostatní BMPs je protein BMP1 nezbytný pro vývoj kosti a chrupavky, protože jejich hlavní proteinovou složkou je kolagen typu I a II (Kessler et al. 1996). Tato

endopeptidáza je multidoménová, sekretovaná a glykosilovaná a je zapojena do vytváření tělních struktur během vývoje různých organismů. Maturovaný BMP1 obsahuje metaloproteázovou doménu, následovanou EGF-like motivem a CUB doménou (complement-Uegf-BMP-1), přes kterou se zapojuje do interakcí mezi proteiny. C-koncová doména kontroluje a omezuje substrátovou specifitu BMP1 (Mac Sweeney et al. 2008). Aktivita proteinu pak může být stimulována pomocí enhanceru prokolagen C-proteinázy (Kessler et al. 1996).

3.2. Signalizace

BMPs jsou důležitými signálními molekulami, které mohou vyvolávat různé buněčné odpovědi. Stejně jako ostatní TGF- β signalizují prostřednictvím receptorových komplexů, které tvoří receptor typu I a receptor typu II. Signalizace je iniciována po navázání ligandu (TGF- β) na receptor typu II, což je transmembránový protein s cytoplazmatickou serine/threonine kinázovou doménou. Odpovědí na tuto vazbu je doplnění receptoru typu I do heterodimerického komplexu a jeho následná fosforylace. Aktivovaný receptor typu I má kinázovou aktivitu a jeho cílové molekuly jsou dalšími komponenty signalizační dráhy (Wrana 1998).

Kinázová aktivita receptoru typu II je konstitutivní, zatímco receptor typu I vyžaduje k aktivaci kinázové aktivity navázání ligandu (Ducy and Karsenty 2000). Aby došlo k signalizaci, je pro receptor typu II nutná jeho kinázová aktivita a asociace s jiným proteinem vázajícím TGF- β - receptorem typu I. Receptory typu I a II asociují jako nezávislé komponenty heterodimerického komplexu: receptor I vyžaduje receptor typu II k navázání TGF- β a receptor typu II vyžaduje receptor typu I pro signalizaci (Wrana et al. 1992). Navzdory schopnosti BMPs samostatně vázat receptory typu I a II, a následně doplnit druhou podjednotku, je pro optimální vazbu ligandu a transdukcii signálu nutná přítomnost a součinnost obou receptorů (Liu et al. 1995).

Pro další přenos signálu jsou zásadní proteiny SMADs¹. Tyto proteiny mají na amino a karboxylových koncích homologní oblasti nazvané Mad-homologní domény MH1 a MH2, které jsou navzájem spojeny sekvencí bohatou na prolin. Jsou-li domény MH1 a

¹ Název pochází od homologních proteinů drozofily (mothers against decapentaplegic – MAD) a *Caenorhabditis elegans* (smooth muscle actin – SMA). *Caenorhabditis elegans* (smooth muscle actin – SMA).

MH2 v kontaktu, pak je molekula SMAD v neaktivní formě. Signalizace receptorem typu I způsobí, že se molekula SMAD otevře a vytvoří heterooligomerní komplex. V tomto aktivním stavu dochází k translokaci SMAD do jádra a k ovlivnění transkripce cílových genů (Heldin et al. 1997).

3.3. Role v embryonálním vývoji

Kromě role při vývoji kostní tkáně a chrupavky jsou BMP proteiny důležité pro mnoho jiných orgánů, a také se angažují při tvorbě základního tělního plánu. Pro jeho vytvoření je zásadní struktura zvaná organizátor, která sekretuje dorzalizující faktory. Ty indukují ventrální buňky marginální zóny tak, že z nich vzniká axiální, paraxiální a intermediální mezoderm. Signály dorzalizujících faktorů také interferují s endogenními BMP signály, které mají ventralizující účinek (Hogan 1996).

Nejsilnějším ventralizačním faktorem by mohl být BMP4, který je exprimován ve ventrální marginální zóně embrya v průběhu gastrulace. Může účinkovat *in vivo* jako ventrální signál pro správné vytváření struktury marginální zóny a aktivně interagovat s geny dorzalizujících faktorů. Toto bylo dokázáno při experimentech s embryi ventralizovaných UV zářením a dávkami suraminu, kdy v celé marginální zóně těchto embryí probíhala exprese Bmp4 a docházelo zde k nahromadění transkriptů (Fainsod et al. 1994). Několik různých experimentů prokazuje, že BMP4 účinkuje během gastrulace podpořením diferenciace ventrálního mezodermu a tlumením signálů dorzalizujících faktorů z organizátoru. Produkce BMP4 ve stádiu časně gastruly snižuje transkripci genů specifických pro organizátor, např. gooseoid, noggin (Jones et al. 1996).

U žab rodu *Xenopus* byl identifikován ještě jeden protein z rodiny BMP, který je exprimován v organizátoru a má ventralizační aktivitu. Anti-dorzalizující morfogenetický protein (Anti-dorsalizing morphogenetic protein – ADMP) potlačuje anteroposteriorní osu a je jediný protein s touto funkcí v organizátoru (Moos 1995). V průběhu pokusů na embryích žab rodu *Xenopus* bylo prokázáno, že exprese BMP4 je regulována pomocí proteinu Noggin, ale na druhou stranu BMP4 inhibuje aktivitu proteinu Noggin. Interakce mezi těmito dvěma molekulami definuje hranici mezi dorzo-laterálním a břišním mezodermem (Re'em-Kalma et al. 1995). Další protein, který také může působit proti ventralizujícímu efektu BMP4, je Chordin. Tento protein je exprimován v dorzálním rtu

blastoporu, je homologní ke genu *sogu* drozofily a podporuje dorzální vývoj u žab *Xenopus* (Holley et al. 1995).

BMPs jsou důležité pro ustanovení pravolevé symetrie embrya. Protein Nodal, člen rodiny BMP, je nutný pro tvorbu primitivního proužku během gastrulace embrya myši. Účinkuje v signální dráze, která určuje pravolevou tělní osu a v embryích je exprimován asymetricky, a to zejména ve struktuře „uzlu“ (node – odtud pochází název), která má u myši funkci organizátoru. Je pravděpodobné, že účast proteinu Nodal má vliv na buněčnou migraci nebo proliferaci (Collignon et al. 1996).

BMPs jsou během vývoje myši exprimovány v mnoha orgánech a tkáních, kde ovlivňují buněčné procesy. Funkce BMP proteinů, již vděčí za své jméno, je samozřejmě spojená se vznikem, vývojem a regenerací kosti a chrupavky. Regulace jejich působení pak spočívá v expresi antagonistů. Mezi ně patří například Noggin, Sclerostin, Chordin, Follistatin nebo Gremlin, které blokují aktivitu BMPs a brání jim v signalizaci receptoru (Rosen 2006). Rovněž jsou nezbytné při vývoji centrálního a periferního nervového systému. Konkrétně při primární neurální indukci, vytváření dorzo-ventrální struktury neurální trubice, regionalizaci mozku, vývoji oka, apoptóze a determinaci buněčných linií v periferním nervovém systému. Epidermalizující a neuralizující faktory účinkují proti sobě a vyvolávají neurální indukci. BMP4 sice podporuje formování epidermis z ektodermu, ale v oblastech embrya, kde proti němu působí BMP inhibitory (např. Noggin, Chordin nebo Follistatin) se místo epidermis tvoří neurální tkáň (Hogan 1996).

K expresi BMP proteinů dochází též při vývoji zubu. Buňky, které exprimují geny Shh^2 , *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* a *Fgf4*, pravděpodobně tvoří organizační centrum zubu. U proteinu BMP2 by mohla být konkrétní funkcí inhibice proliferace a u BMP4 regulace zahájení apoptózy (Vaahtokari et al. 1996 podle Hogan 1996). Dále jsou BMPs exprimovány při vývoji ledvin, konkrétně například *Bmp7*. Mutanti v genu pro expresi *Bmp7* dokazují, že je tento protein naprosto esenciální pro vývoj ledvin myši. Tkáně, ve kterých měla probíhat exprese *Bmp7*, se nevyvíjely, docházelo k masivní apoptóze mezenchymálních buněk a mutanti umírali na selhání ledvin (Luo et al. 1995). Transkripty pro *Bmp4*, *Bmp5* a *Bmp7* byly nalezeny také při vývoji plic. Existuje model, podle kterého exprese *Bmp4* ve špičkách plicních pupenů inhibuje lokálně proliferaci endodermu. Mezi

²Shh = Sonic hedgehog

další tkáň exprimující BMPs patří střevo. Díky studii s kuřecím embryem je známo, že expresí genu *Shh* jsou indukovány transkripty *Bmp4* v okolním splachnickém mezodermu. Exprese BMPs byla také zaznamenána v kůži a ve vlasech, v zárodečných buňkách a protein BMP4 také funguje jako lateralizující faktor pro somity (Hogan 1996).

4. Primordiální zárodečné buňky

Prekurzory zárodečných buněk, které ještě nevstoupily do gonád, se nazývají primordiální zárodečné buňky (PGCs, primordial germ cells). Ze zárodečných buněk, které přežijí a z jejich potomků pak vzniknou gamety, které jsou důležité při přenosu genetické informace z generace na generaci (McLaren 2003). PGCs můžeme rozdělit na časně, střední a pozdní, které se navzájem od sebe liší fenotypem, molekulárními a epigenetickými vlastnostmi. Časně PGCs jsou lokalizovány 7,5 – 8,5 dpc (*day post coitum*) na bázi alantoisu v extraembryonálním mezodermu. Střední PGCs migrují přes endoderm zadního střeva a mezenterium zhruba 9 – 10,5 dpc. V průběhu 11 – 12,5 dpc je dokončena migrace PGCs do genitální rýhy a PGCs jsou označovány jako pozdní (De Felici et al. 2009).

PGCs mají původ v proximálním epiblastu, který se nalézá v blízkosti extraembryonálního ektodermu. Vznikají ze stejných prekurzorů jako např. alantois, a o jejich zařazení k zárodečné linii se rozhodne až po 6,5 embryonálních dni (Lawson and Hage 1994 podle Ying et al. 2001 a podle Bendel-Stenzel et al. 1998).

U myši jsou pak tyto buňky nejdříve detekovatelné v sedmidenním embryu a jsou pravděpodobně prvním mezodermálním typem buněk, který zde vzniká. PGCs se nejpozději 7. embryonální den dostávají mimo embryo a stávají se součástí extraembryonálního mezodermu. PGCs je možné identifikovat pomocí histochemického barvení alkalické fosfatázy, která se tak stala významným markerem těchto buněk. Po obarvení byl patrný shluk asi 50 buněk, který se nacházel v extraembryonálním mezodermu v blízkosti posteriorní části primitivního proužku. Zpět do embrya se PGCs vrátí až v pozdějších fázích vývoje, kdy vstupují do mezodermu primitivního proužku a potom do endodermu (Ginsburg et al. 1990).

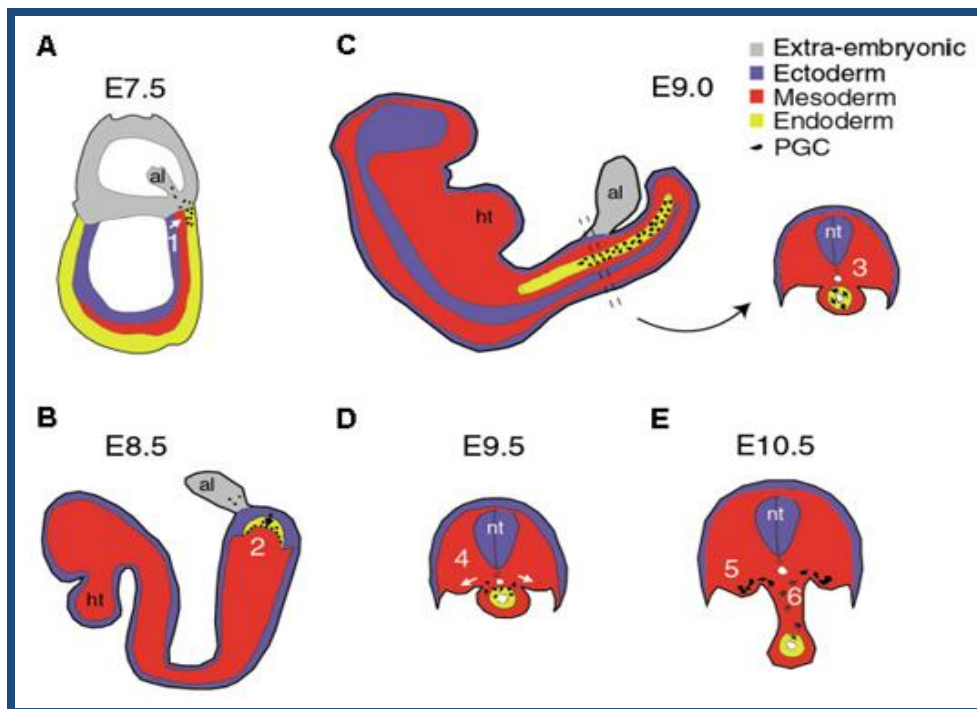
V průběhu některých transplantačních experimentů bylo zjištěno, že pro diferenciaci do PGCs jsou důležité lokálně specifické tkáňové interakce. Buňky odebrané z distální i z proximální části epiblastu diferencují vždy shodným způsobem jako buňky

oblasti, do které byly transplantovány. Buňky v distálním epiblastu diferencují v neuroektoderm a povrchový ektoderm. Naproti tomu buňky v proximálním epiblastu diferencují do extraembryonálního mezodermu a jiných mezodermálních tkání v posteriorní oblasti embrya a také do PGCs. PGCs navíc v proximálním epiblastu vzniká podobné množství (3,7 % vs. 3,9 %), ať už transplantované buňky původně pocházely z distálního nebo z proximálního epiblastu (Tam and Zhou 1996).

In vitro kultivací různých částí epiblastu z různých stádií vývoje embrya myši se zjistilo, že ke vzniku PGCs z epiblastu jsou nezbytné faktory produkované extraembryonálním ektodermem. Stejná podmínka platí i pro vývoj dalších buněčných linií, např. pro diferenciaci mezodermu. Bylo zjištěno, že PGCs nevzniknou z epiblastu, pokud byl izolován 5,5 dpc a kultivován bez extraembryonálních obalů. Ukázalo se, že kultivace proximální části epiblastu po 6 dpc, kdy zřejmě dochází k determinaci PGCs, vede k úspěšnému založení *in vitro* kultury těchto buněk (Yoshimizu et al. 2001).

4.1. Migrace

Jak již bylo výše uvedeno, časně PGCs se nachází 7,5 dpc na bázi alantoisu v extraembryonálním mezodermu (Obr. 3A). V době, kdy začíná vznikat zadní trávicí trakt procesem invaginace (8,5 dpc), se PGCs nachází v oblasti tohoto děje (Obr. 3B). Společně s invaginujícími buňkami se dostávají do stěny trávicího traktu a tudíž i dovnitř embrya (McLaren 2003) (Obr. 3C). Zhruba 9,5 dpc opouštějí PGCs stěnu trávicího traktu (Obr. 3D) a pohybují se dorzálním směrem skrz mezenchym dorzálního mezenteria do dvou vznikajících genitálních rýh (11,5 dpc). První PGCs, které putují do genitálních rýh, začínají migrovat v době, kdy ještě není vyvinuté dorzální mezenterium, čili migrují přímo do oblasti vytvářejících se genitálních rýh. Tyto buňky by mohly být důležité při určení lokalizace dalších PGCs. Buňky opouštějí stěnu trávicího traktu nezávisle, ale během migrace se spojují dlouhými výběžky a vytvářejí rozsáhlé sítě. V rozmezí 10,5 – 11,5 dpc se PGCs agregují do skupin, což pravděpodobně umožňuje zahájení signalizace mezi buňkami (Obr. 3E). Zároveň také ztrácejí svou pohyblivost, zřejmě jako následek buněčného kontaktu (Gomperts et al. 1994).



Obr. 3: Fáze migrace PGCs. A) V první fázi vznikají PGCs v proximálním epiblastu, během gastrulace putují přes primitivní proužek a začleňují se do definitivního endodermu, parietálního endodermu a alantois. B) Ve druhé fázi jsou PGCs zakomponovány do kapsy zadního střeva. C) Ve třetí fázi začíná zadní trávicí trakt formovat trubici a PGCs se volně pohybují kolem jeho epitelu. Pohyb PGCs se sice jeví jako náhodný, ale určitým způsobem respektuje tělní osu. D) Ve čtvrté fázi se PGCs objeví na dorzální straně zadního střeva a migrují k vyvíjející se genitální rýze. E) V páté fázi se PGCs začínají seskupovat a zároveň vytváří síť mezi migrujícími buňkami. Jejich pohyb se postupně zpomaluje. V šesté fázi PGCs, které nedokončily migraci a zůstaly ve středové ose, odumírají. Al – alantois, ht – srdce, nt – neurální trubice (převzato z Molyneaux and Wylie 2004).

Stejně jako u ostatních buněk, které jsou odvozené od epiblastu, dochází na počátku migrace u PGCs embryí samic k náhodné inaktivaci X chromozomu. Nicméně po dosažení genitálních rýh se u PGCs X chromozóm opět aktivuje. Je to jediný známý případ, kdy u savců dochází k reaktivaci X chromozómu. Fungování X chromozómu lze sledovat pomocí poměru mezi aktivitou HPRT a APRT, kde HPRT je enzym kódovaný X chromozómem a APRT je autozomální enzym. Poměr sledovaný u XX, XO a XY stejně starých embryí (11,5 dpc) byl u všech shodný. To znamená, že v této době je exprimován pouze jeden X chromozóm. V případě 12,5 dpc starých embryí myši, je poměr u XX embryí mnohem větší než u XY embryí, což znamená, že došlo k reaktivaci X chromozómu a jsou exprimovány oba dva. Kdy přesně dochází k reaktivaci nelze říci, ale můžeme se domnívat, že je spojena s nástupem meiózy (Monk and McLaren 1981).

4.2. Proliferace

Kolonizace genitálních rýh je dokončena 13,5 dpc. Do té doby počet PGCs vzroste z původních cca 100 buněk (145 ± 17) na konečných cca 20 000 (25791 ± 2276). Buňky proliferují během migrace a ještě následujících pár dní poté (2 ± 3), co dorazí do genitálních rýh. Během této doby proběhne zhruba 8 replikačních cyklů s časem zdvojení přibližně 16 hodin (Tam and Snow 1981). Migrující a proliferující PGCs jsou ovlivňovány faktory, které u embrya myši o stáří 10,5 dne vylučují genitální rýhy. Tyto faktory zvyšují počet PGCs a směřují je ke genitálním rýhám (Godin et al. 1990). V *in vitro* podmínkách byl u mnoha růstových faktorů dokázán vliv na růst PGCs. Nicméně zatím pouze v případě interakce KL-Kit lze prohlásit, že stejný vliv má také *in vivo*. Interakce mezi tyrosin kinázovým receptorem Kit a jeho ligandem KL, který je znám také jako faktor kmenových buněk (SCF, stem cell factor), je vyžadována pro přežití a proliferaci PGCs (De Felici et al. 2004).

Regulační mechanismus PGCs odpovídá za proliferaci těchto buněk a její ukončení (12,5 – 13,5 dpc), ale také za morfologické změny. Vzhledem k tomu, že nebyl zjištěn žádný efekt somatických buněk na PGCs, se zdá být tento mechanismus autonomní. V dnešní době je již známo několik způsobů, kterými by si mohly buňky čas odměřovat. V případě PGCs je nejpravděpodobnější, že se jedná o náhodně regulovaný děj, který přímo nesouvisí s počtem prodělaných buněčných dělení.

Morfologické změny pozorované na kultivovaných PGCs jsou závislé na jejich věku. Pro tento experiment byly PGCs rozděleny do tří kategorií a počítány zvlášť. První typ buněk vykazoval polarizaci, buňky byly 2x delší než širší a dobře se šířily po substrátu, proto jsou označovány jako „polarizované“ (polarized). Druhý typ byl pojmenován jako „šířící se“ (spread), protože se buňky sice dobře rozptýlovaly po substrátu, ale nevykazovaly žádnou polarizaci. Třetí typ buněk, tzv. „kulaté“ (round), se zakulacovaly, postrádaly lamellipodia a neadherovaly k podkladovým buňkám. Třetí den došlo ke snížení množství „polarizovaných“ buněk, ale naproti tomu množství „šířících se“ a „kulatých“ vzrostlo. V této chvíli populace buněk nevykazovala známky buněčné smrti, z čehož vyplývá, že změna poměru mezi jednotlivými typy byla nejpravděpodobněji způsobena přeměnou jednoho typu buněk na druhé dva. Tato přeměna by mohla odpovídat vývoji PGCs v genitálních rýhách, kde dochází k jejich diferenciaci do nepohyblivých zárodečných buněk (Ohkubo et al. 1996).

4.3. Pohlavní diferenciacie

Po ukončení proliferace a migrace PGCs do gonád je zahájena pohlavní diferenciacie. Samčí a samičí PGCs, které nebyly do této chvíle rozeznatelné, se začínají vyvíjet odlišným způsobem. Buňky ve vaječnících, které se mají vyvinout v oocyty, vstupují do profáze prvního meiotického dělení. Dokončí se fáze leptotene, zygotene a pachytene, ale ve fázi diplotene se meióza zastaví. Další vývoj samičích zárodečných buněk pokračuje až po narození. Zárodečné buňky, které se nacházejí ve varlatech, se dál nemnoží, zůstanou zastaveny v G1 fázi buněčného cyklu a stanou se z nich prospermatogonie. Po narození jedince je u těchto buněk, které se označují jako spermatogonie, opět spuštěna mitóza a dochází k produkci spermatocytů. Zda se zárodečné buňky začnou vyvíjet v oocyty či spermie nezávisí na jejich pohlavních chromozomech, ale na prostředí, ve kterém se nalézají (McLaren 1984 podle McLaren 1995; McLaren 1995).

Ne všechny PGCs se dostanou do genitálních lišt, některé skončí v blízkých vyvíjejících se ledvinách nebo nadledvinách. V samičím embryu je nicméně osud všech PGCs shodný, po 13,5 dpc vstoupí do meiózy. Odlišná situace je u samčích embryí, kde některé PGCs nacházející se mimo genitální lišty vstupují do meiózy, přestože jejich chromozómy jsou XY a PGCs by se tedy měly zastavit v G1 fázi buněčného cyklu a vyvíjet se jako prospermatogonie (McLaren 1995). Podobně PGCs vstoupily do meiózy i při pokusu, kdy byly obklopeny plicními somatickými buňkami (McLaren and Southee 1997). Z těchto pokusů můžeme usuzovat, že všechny PGCs se budou vyvíjet jako oocyty, pokud nebudou vystaveny inhibitoru meiózy, který je produkován samčími genitálními lištami (McLaren 2003).

4.4. Imprinting

U některých genů dochází během vývoje k imprintingu, tzn. gen se exprimuje jen z jedné alely podle toho, jestli pochází od otce nebo od matky, druhá alela je umlčena. U zárodečných buněk je původní imprinting vymazán a v závislosti na pohlaví jedince vzniká nový. Tento jev byl prokázán sledováním exprese čtyř genů, u kterých dochází k imprintingu. Geny H19 a Igf2r³ se v somatických buňkách přepisují pouze z alely

³ H19 je gen pro dlouhou nekódující RNA; gen Igf2r kóduje receptor inzulinového růstového faktoru 2 (Insulin-like growth factor 2 receptor)

zděděné po matce, zatímco geny *Igf2* a *Snrpn*⁴ z otcovy alely. U PGCs, které právě skončily v cílové lokalizaci, byly tyto geny exprimovány z obou alel. To naznačuje, že buď během migrace, nebo krátce po jejím dokončení, dochází k vymazání zděděného imprintingu (Szabó and Mann 1995).

Geny jsou při imprintingu umlčovány pomocí methylace. Sledováním methylace paternálně imprintovaného genu *H19* během vývoje zárodečných buněk byla zjištěna doba vymazání a znovu ustanovení imprintingu. V samčích i samičích PGCs je paternální alela methylovaná částečně, zatímco maternální alela methylovaná není. K neúplnému odstranění této methylace dochází zhruba v 12,5 a 13,5 dpc. V samičích zárodečných buňkách je pak methylace odstraněna úplně, a to 16,5 dpc, kdy se dělení těchto buněk zastaví v profázi prvního meiotického dělení. Paternální imprinting genu *H19* se odehrává v samčích pohlavních buňkách před začátkem meiózy, nejpozději však v primárních spermatocytech, a methylovány jsou obě alely. Z toho vyplývá, že paternální imprinting je vytvořen u samců a vymazán u samic (Ueda et al. 2000).

V rámci *in vitro* experimentů se během 5,5 denní kultivace podařilo získat PGCs se schopností vymazání imprintingu. I přestože u těchto buněk nedošlo k úplnému vymazání imprintingu, tak uvedené pokusy naznačují, že tento jev je řízen autonomně buňkou, a to bez jakýchkoli podnětů z genitálních rýh (Ohinata et al. 2009).

4.5. Embryonální zárodečné buňky

PGCs mají mnoho společných charakteristik s embryonálními kmenovými buňkami (ESCs, embryonic stem cells) a současně se od nich v mnoha ohledech liší. Zásadní podobnost je ve schopnosti sebeobnovy a možnosti diferenciaci do buněk a tkání všech tří zárodečných listů. ESCs jsou tedy pluripotentní, v případě PGCs se jedná o totipotenci. Tato vlastnost je ovšem u PGCs během jejich vývoje potlačena a projeví se až po oplození, popřípadě partenogenezi. Schopnost sebeobnovy je navíc u PGCs omezená a pouze přechodná. Především se ale PGCs odlišují od ESCs typickými znaky zárodečné linie. Vše se projevuje v expresi povrchových molekul, které jsou specifické buď pro ESCs nebo pro zárodečnou linii. Společné rysy PGCs a ESCs jsou pravděpodobně důsledkem jejich

⁴ gen *Igf2* kóduje inzulínový růstový faktor 2 (Insulin-like growth factor 2); gen *Snrpn2* kóduje Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N

společného původu a také exprese mnoha transkripčních faktorů zajišťujících pluripotenci (OCT4, Nanog, SOX2...), přičemž umožňují fenomén zaměnitelnosti. Pomocí signalizace určitých růstových faktorů mohou být PGCs odchýleny od jejich normální diferenciaci a přeměněny do pluripotentní linie ESC-like buněk. Zásadní úlohu při tom má současné působení leukémii inhibujícího faktoru (LIF, leukemia inhibitory factor), fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF2, fibroblast growth factor 2) a SCF. Stejně tak ESCs mohou spontánně diferencovat do zárodečných buněk (De Felici et al. 2009).

Přeměna PGCs v pluripotentní ESC-like buňky je způsob, jak PGCs dlouhodobě kultivovat *in vitro*. Použití SCF, LIF a bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF, basic fibroblast growth factor) podporuje proliferaci a růst PGCs. Takto kultivované buňky jsou pak nazývány jako embryonální zárodečné buňky (EG cells, embryonic germ cells). Některé jejich vlastnosti jsou shodné s PGCs (např. přítomnost alkalické fosfatázy) a zároveň se podobají nediferencovaným ESCs, protože jsou neomezeně pluripotentní (Matsui et al. 1992).

5. Vliv BMP4 a BMP8b na PGC

Víme už, že k vytvoření PGCs z epiblastových buněk jsou nutné faktory pocházející z extraembryonálního ektodermu. Těmito faktory jsou BMP4 a BMP8b, jejichž funkcí je indukovat vznik PGCs a dalších mezodermálních struktur (alantois). Zdá se, že BMP4 navíc figuruje v okamžiku získávání kompetence epiblastových buněk a na rozdíl od BMP8b spolupracuje také s BMP2. BMP4 i BMP8b nemají tedy úplně totožnou funkci, ale při vývoji PGCs je nutná přítomnost obou a jejich vzájemná spolupráce.

5.1. Úloha BMP4

BMP4 je hlavní signální molekulou extraembryonálního ektodermu, která je zodpovědná za indukci diferenciaci zárodečných buněk. V buňkách epiblastu indukuje expresi genů *Blimp1* a *Prdm14*⁵, což jsou klíčové transkripční regulátory ve vývoji zárodečných buněk (Ohinata et al. 2009). Před začátkem gastrulace je *Bmp4* exprimován v extraembryonálním ektodermu, konkrétně nejvíce v buňkách ležících blízko

⁵ gen *Blimp1* kóduje B lymphocyte induced maturation protein 1 také známý jako PRDM1; gen *Prdm14* kóduje protein PRDM14 - PR domain containing 14

proximálnímu epiblastu. Později během gastrulace byla exprese zaznamenána (pomocí β -galaktosidázy) v buňkách extraembryonálního mezodermu (kam patří také alantois) a v buňkách, které se nacházely v blízkosti PGCs, ale nikoliv v PGCs samotných (Lawson et al. 1999).

BMP4 protein je nutný pro specifikaci zárodečných buněk, což dokazuje řada studií. Lawson et al. (1999) vytvořili myší mutanty s nefunkčními geny pro tvorbu BMP4. Embrya homozygotů (nefunkční byly obě alely) postrádala PGCs a alantois. U heterozygotů (jedna funkční alela) bylo PGCs podstatně méně než u wild-type embryí, ačkoliv alantois se vytvořil. Pro vznik alantoisu by tedy mohla stačit nižší minimální dávka BMP4 než pro vznik PGCs. Pomocí regresních analýz se dospělo k závěru, že to byl důsledek vytvoření menší původní populace PGCs a nikoliv nižší proliferace PGCs. Mutantům bez produkce BMP4 byly posléze injikovány ESCs z wild-type embryí. Vzniklé chiméry vykazovaly mutantní fenotyp jak u homozygotů, tak i u heterozygotních jedinců. Kromě toho, stejný efekt byl pozorován u různých stupňů chimerismu. BMP4 je tedy produktem extraembryonálního ektodermu a je nezbytným faktorem při diferenciaci PGCs a alantoisu z buněk epiblastu (Lawson et al. 1999). Jak na buňky epiblastu účinkuje, se sledovalo u embrya o stáří 5,5-6 dpc. Nejdříve byly fragmenty epiblastu dva dny kultivovány v přítomnosti BMP4. Po disociaci byly buňky z fragmentů kultivovány další dva dny na podpůrné vrstvě STO fibroblastů (De Felici 1998 podle Pesce et al. 2002) v přítomnosti BMP4 a bez něj. Překvapivě přítomnost BMP4 v tomto druhém kroku kultivace nehrála žádnou roli, PGCs vznikaly i bez BMP4. Pokud ovšem BMP4 chyběl na počátku kultivace, vzniklo PGCs jen velmi málo. BMP4 faktor je tedy nezbytný pro předurčení buněk epiblastu pro vznik PGCs, ale není nutný pro jejich další existenci (Pesce et al. 2002). Tyto výsledky souhlasí s předchozím tvrzením výzkumné skupiny Lawson et al. (1999), že BMP4 je nutné pro vznik zakládající populace PGC, ale ne pro jejich budoucí proliferaci.

Vznik fenotypu PGC je tedy pravděpodobně dvoufázový proces. V první fázi je nutná přítomnost BMP4 a buňky epiblastu se determinují k tvorbě PGCs (před 6 dpc). Pozdější fáze, kdy se PGCs diferencují, je už na BMP4 nezávislá (Pesce et al. 2002). Tato varianta byla podpořena experimentem, při kterém dodávali BMP4 knock-out embryím $Bmp4^{-/-}$ o stáří 6 – 6,25 dpc, ale ke vzniku PGCs přesto nedošlo (Ying et al. 2001). Aby mohlo dojít k determinaci buněk epiblastu do fenotypu PGCs, musí nejdříve buňky

epiblastu získat kompetenci, neboli schopnost reagovat na BMP4. Tuto schopnost získávají mezi 5,25 až 5,5 dpc pomocí extraembryonálního ektodermu, což bylo zjištěno sledováním účinku rekombinantního lidského (rh) BMP4 na různá stádia epiblastu. Ke vzniku PGCs došlo pouze tehdy, pokud byly buňky epiblastu (o stáří 5,25 dpc) kultivovány s extraembryonálním ektodermem, pouhá přítomnost BMP4 nestačila. Při kultivaci může mít pro získání kompetence podpůrnou funkci také vrstva STO buněk, ale rozhodující vliv má extraembryonální ektoderm. Další faktor související se vznikem kompetence epiblastu je vzrůstající exprese Smad5 a Smad1. Ta je zahájena opět přes extraembryonální ektoderm mezi 5,25 a 5,5 dpc a úzce koreluje právě se vznikem kompetence. Naopak ztráta kompetence koreluje s ukončením exprese Smad5 a snížením exprese Smad1. K udržení této kompetence je nutný stálý kontakt s extraembryonálním ektodermem. Schopnost reagovat na BMP4 a tedy tvořit PGCs získává a udržuje si pouze proximální epiblast. Je to důsledek exprese Smad5, která je specifická právě pro proximální epiblast. Geny Smad možná indukují sekreci faktoru z extraembryonálního ektodermu, který difunduje v epiblastu jen do krátké vzdálenosti. Takto by mohlo vznikat proximálně specifické mikroprostředí (Okamura et al. 2005).

Důležitý je také výzkum *in vitro* diferenciaci ESCs do zárodečné linie. Přidání BMP4 do kultivačního systému podpořilo vytváření PGCs z ESCs, což podporuje výsledky předchozích studií a BMP4 se zdá být žádaný specificky pro diferenciaci zárodečných buněk. Původně se předpokládalo, že v kultuře jsou nutné růstové faktory a podpůrná vrstva buněk. V této studii byl zkoumán konkrétně růstový faktor BMP4 a také podpůrná vrstva z myších embryonálních fibroblastů (MEFs; mouse embryonic fibroblasts). U myších ESCs kultivovaných na vrstvě MEFs nebylo pozorováno zvýšení exprese genů specifických pro zárodečnou linii, z čehož vyplývá, že pravděpodobně MEFs nemají vliv na diferenciaci PGCs. ESCs ovšem vykazovaly vyšší životaschopnost a proliferaci. Zřejmě došlo spíše k zabránění diferenciaci myších ESCs reakcí na LIF, který je sekretován mitoticky inaktivovanými fibroblasty. Naopak přidáním BMP4 se podpořila diferenciaci ESCs do zárodečných buněk. Analýza genové exprese pak odhalila expresi genů Vasa a Stra8⁶, které jsou charakteristické pro zárodečnou linii. VASA byl detekován také imunocytochemicky. Tento výsledek byl v souladu s očekáváním získaným z ostatních

⁶ VASA protein je ATP-dependentní RNA helikáza; gen Stra8 kóduje protein STRA8 (stimulated by retinoic acid 8)

experimentů. Mimoto exprese genu *Cdh1*⁷, která probíhá specificky u premeiotických zárodečných buněk, byla detekována jen u malého množství buněk, což naznačuje, že diferencované zárodečné buňky byly ve většině případů PGCs. BMP4 tedy indukuje diferenciaci ESCs do PGCs (Makoolati et al. 2011). Sledováním diferenciaci zárodečných buněk se dá odhalit jistě mnoho dalších informací. V roce 2009 byl navržen způsob, jak studovat diferenciaci zárodečných buněk v reprogramovaných somatických buňkách. Buňky HESS2 byly vytvořeny spojením ESCs s diferencovanou somatickou buňkou. Morfologie těchto buněk je stejná jako u ESCs, jsou téměř diploidní a exprimují markery pluripotence a „somatického“ X chromozómu. HESS2 buňky mohou diferencovat *in vitro* do zárodečných buněk, čemuž předchází vytvoření embryonálního tělíska (EB; embryoid body). Tyto buňky exprimují mnoho genů specifických pro pluripotentní buňky a podobají se embryonálním kmenovým buňkám. Diferenciaci zárodečných buněk se podařilo urychlit přidáním kyseliny retinové do média. Buňky již po dvou dnech exprimovaly geny typické pro zárodečnou linii (*Vasa*, *Stella*, *Dazl*, *Piwil2*, *Tex14*, *Bmp8b*, *Tdrd1* a *Rnf17*). U některých došlo i k redukci chromozómů. Docházelo jak k samčí, tak k samičí diferenciaci. Občas vznikaly buňky podobné oocytům, které exprimovaly geny specifické pro oocyty (*ZP2* a *ZP3*). Samičí diferenciaci ovšem proběhla pouze u časných vývojových stádií (Lavagnolli et al. 2009).

Po zjištění, že BMP4 je nezbytné pro vývoj PGCs a alantoisu, byly navrhovány různé funkční hypotézy. Nejjednodušší hypotéza tvrdí, že po sekreci BMP4 v extraembryonálním ektodermu jsou buňky proximálního epiblastu ovlivňovány v závislosti na přijaté dávce. Buňky, které v určité době získají dostatečnou dávku BMP4 se budou dále vyvíjet v PGCs. Naproti tomu buňky vystavené menší dávce BMP4 se vyvinou v alantois anebo v jiné části extraembryonálního mezodermu. Jiná hypotéza zase tvrdí, že BMP4 vysílá buňkám signál, aby se staly prekurzorovými jak pro PGCs, tak pro alantois. O další diferenciaci rozhoduje druhý signál z extraembryonálního mezodermu (Ying et al. 2000).

Podobnou strukturu jako protein BMP4 má i BMP2, jehož účinky v *in vitro* podmínkách na buňky epiblastu se velmi podobají účinkům BMP4. Díky strukturní podobnosti obou proteinů by teoreticky mohla signalizace probíhat stejným způsobem a funkce BMP2 v *in vivo* systému by mohla být dodatečná k BMP4 tak, aby míra signalizace

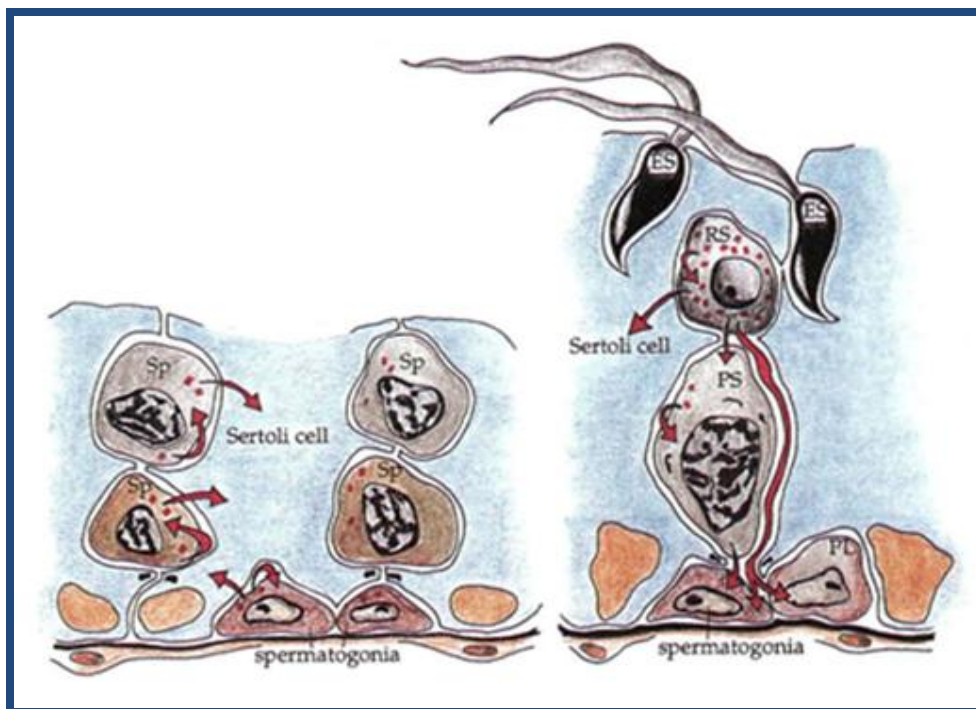
⁷ CDH1 je adhezní molekula E-kadherin

byla dostatečná. Signalizace pravděpodobně probíhá přes ALK3 (nebo ALK6) komplex a přes jeden z receptorů typu II (nejpravděpodobněji BMPRII). Kaskáda pokračuje přes SMAD1 a SMAD5, které buď přímo, nebo nepřímo ovlivňují expresi Blimp1 a Prdm14. Takové buňky pak mají vlastnosti zárodečných buněk, a to včetně epigenetické reprogramace (Ohinata et al. 2009). Další informace o BMP signalizaci se podařilo získat použitím lidského fetálního vaječníku. Vzhledem k tomu, že se PGCs během experimentu nalézaly ve svém přirozeném prostředí, bylo možné vyvodit, jak probíhají procesy spojené s diferenciací PGCs v podmínkách *in vivo*. V průběhu těhotenství je exprese BMP proteinů regulována a vypadá to, že BMP2 a BMP4 mají ve fetálním vaječníku odlišnou funkci. S postupující diferenciací PGCs se totiž zvyšuje exprese Bmp2, zatímco exprese Bmp4 se snižuje. Ke změně v expresi dochází také u intracelulárních SMAD proteinů, které přenášejí BMP signalizaci do jádra. Cílem této signalizace v lidském fetálním vaječníku jsou zárodečné buňky, které během 14. týdne těhotenství jako jediné exprimují BMP receptory, konkrétně BMPRIa (ALK3) a BMPRIb (ALK6). PGCs však mohou BMP signalizaci samy regulovat, a to přemístěním fosforylovaných SMAD proteinů z jádra do cytoplazmy buněk (Childs et al. 2010).

Zdá se, že BMP4 má ještě více účinků. Kromě indukce vzniku PGCs a navození kompetence buňkám epiblastu k nim patří i vliv na růst a apoptózu PGCs. U embryí starých 11,5 dpc byl zjištěn vliv BMP4 na PGCs, který podporuje jejich růst. Došlo ke zjevnému zvýšení počtu PGCs v S fázi. BMP4 tedy podporuje u takto starých PGCs proliferaci (Pesce et al. 2002), což je ale v rozporu se studií z roku 1999 výzkumné skupiny Lawsona et al. Nicméně podle další studie pracující s použitím lidského fetálního vaječníku, nemá BMP4 vliv na proliferaci, ale reguluje počet postmigratorních PGCs podporováním apoptózy. Tato indukce apoptózy je často spojena s expresí genu *Msx2* (muscle segment homeobox). V průběhu těhotenství genová exprese *Msx* koreluje s průběhem hlavní vlny apoptózy. *Msx2* specificky reaguje na BMP4 a je tedy možné, že tento gen funguje jako efektor apoptózy indukované pomocí BMP. Pro získávání zárodečných buněk diferencovaných z ESCs je tedy nutné se při kultivaci vyhnout trvalé expozici BMP, která by mohla mít negativní vliv na přežití buněk (Childs et al. 2010).

5.2. Úloha BMP8b

BMP8b je člen Gbb-60A třídy BMP superrodiny, který je exprimován extraembryonálním ektodermem. Podle několika studií je nutný k vytvoření zárodečné linie. Vznikla tedy komplexnější hypotéza, kde v osudu PGCs hrají roli oba proteiny BMP4 i BMP8b (Ying et al. 2000). Kvůli sekvenční podobnosti a podobnosti v intron/exonovém uspořádání Bmp8b s Bmp8a se usuzuje, že vznikl genovou duplikací. Jejich lokusy se navíc u myši nacházejí v těsné blízkosti na chromozómu 4. V samčích zárodečných buňkách je Bmp8b exprimován hlavně ve spermatidách a pak také ve spermatocytech. Na rozdíl od Bmp8a není exprimován v mateřské části placenty, ale v trofoblastu. Exprese Bmp8b navíc koreluje s postupem spermatogeneze. Před pubertou velká část gonocytů podstoupí apoptózu. Po dosažení stadia spermatid vzroste exprese Bmp8b a počet buněk podstupujících apoptózu klesne. BMP8b tedy pravděpodobně podporuje přežití zárodečných buněk inhibicí apoptózy. Zdá se, že tento protein je důležitý spíše pro proliferaci, přežití nebo diferenciaci buněk, než pro vývoj embrya. Navíc je zajímavé, že je Bmp8b exprimován nikoliv v somatických, ale v zárodečných buňkách a v buňkách trofoblastu (Zhao and Hogan 1996). Právě proto se další výzkumy zabývaly tím, jakou má BMP8b roli při vytváření zárodečné linie a při reprodukci se zaměřením na působení BMP8b během spermatogeneze. Z výsledků vyplynulo, že BMP8b je nutný pro proliferaci a přežití zárodečných buněk, stejně jako pro iniciaci a udržení spermatogeneze. Tento fakt byl vyvozen z fenotypů, které vznikly u myši homozygotně mutantních pro Bmp8b. První defekty se objevily u pubertálních myší, jejichž zárodečné buňky měly sníženou proliferaci a zpožděnou diferenciaci. U dospělých myší později docházelo k nadměrné apoptóze spermatocytů i přesto, že nebyl objeven žádný problém ve funkci Sertoliho nebo Leydigových buněk. Tyto podpůrné buňky jsou sice důležité pro funkci zárodečných buněk, ale nepodílejí se na jejich proliferaci ani diferenciaci. Je pravděpodobnější, že BMP8b účinkuje spíše autokrinně nebo parakrinně na krátké vzdálenosti než ve větším rozsahu (Obr. 4). Tato skutečnost byla potvrzena i expresí domnělých Bmp8b receptorů (ACTRIIA a ACTRIIB) v semenotvorných kanálcích (Zhao et al. 1996).



Obr. 4: Schematické znázornění autokrinního/parakrinního účinku BMP8b. Vlevo je průřez semenotvorným kanálkem varlat jedince v časně pubertě, vpravo dospělého jedince. Lumen kanálku se nalézá nahoře. Sertoliho buňky jsou znázorněny modře. Sp – primární spermatocyty, PS – pachytene spermatocyty, RS – kulaté spermatidy, ES – protáhlé spermatidy. Červené čtverečky znázorňují BMP8b a červené šipky označují autokrinní nebo parakrinní působení BMP8b na zárodečné buňky a parakrinní působení BMP8b na Sertoliho buňky.

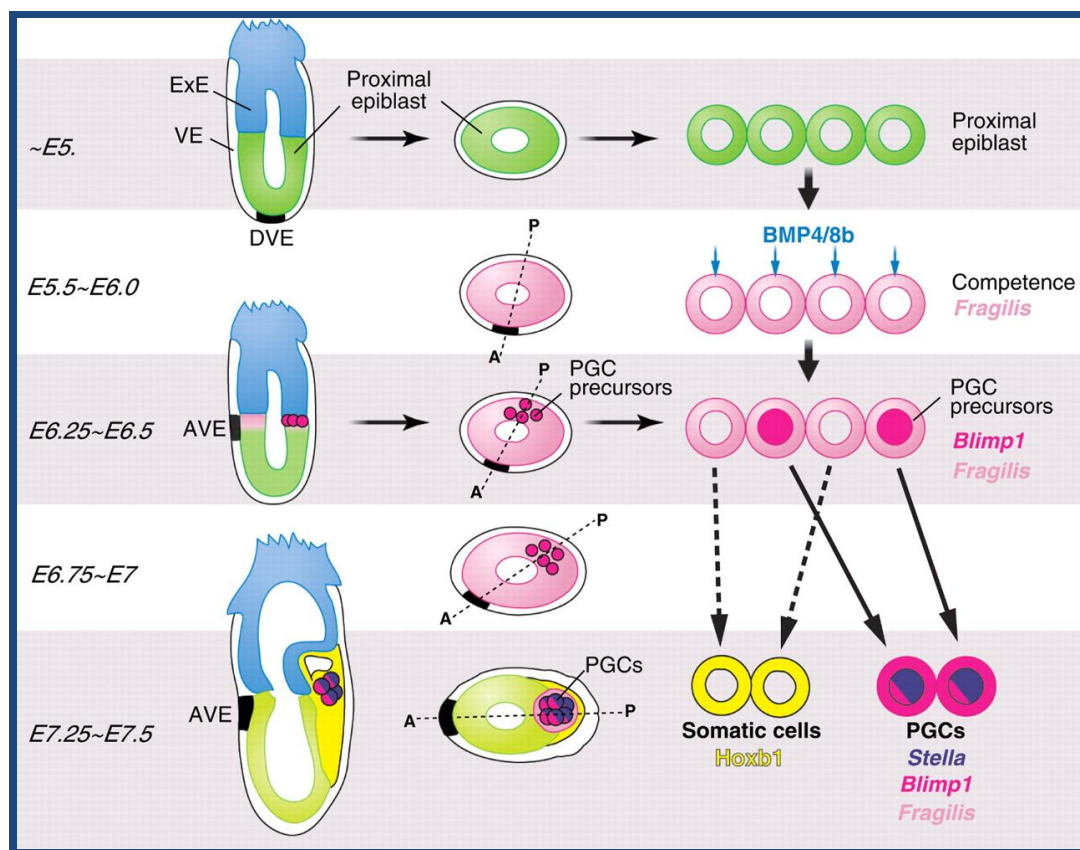
Zárodečné buňky jsou během diferenciace do primárních spermatocytů v období časně puberty a během diferenciace do pachytene spermatocytů, kulatých spermatid a protáhlých spermatid v dospělosti, zakotveny mezi Sertoliho buňkami. V období časně puberty je BMP8b produkován v malém množství všemi zárodečnými buňkami (nezbytné pro proliferaci a diferenciaci zárodečných buněk). V dospělosti BMP8b produkují kulaté spermatidy (ve velkém množství) a pachytene spermatocyty (v malém množství). Množství produkované kulatými spermatidami je nutné pro diferenciaci a přežití zárodečných buněk (převzato a upraveno podle Zhao et al. 1996).

Tato zjištění vedla k detailnějším výzkumům pomocí mutantů v genu pro Bmp8b. Mutantní embrya dokazují, že BMP8b je stejně jako BMP4 nezbytný ke vzniku PGCs. U homozygotních mutantů (na smíšeném genetickém pozadí), které netvořily BMP8b, bylo výrazně méně PGCs než u wilde-type embryí. 43 % těchto mutantů dokonce PGCs postrádalo úplně. U heterozygotů byl však počet PGCs s wilde-type embryi srovnatelný. Mutanti také vykazovali zpoždění při tvorbě alantoisu. Do testování byli také zahrnuti mutanti na širokém genetickém C57BL/6 pozadí. U homozygotů netvořících BMP8b nevznikly žádné PGCs a malý nebo vůbec žádný alantois. Větší defekty v PGC populaci ve srovnání s alantoisem jsou v souladu s tvrzením skupiny Lawsona et al. (1999), že budoucí PGCs jsou k BMP signálům citlivější než buňky budoucího alantoisu.

Od chvíle, kdy začíná formování PGCs, je další vývoj nezávislý na BMP8b. Poloha regresní přímky počtu PGC na počet somitů je u heterozygotů níže položená, kdežto její sklon se neliší. Z toho vyplývá, že BMP8b má vliv na velikost zakládající populace PGCs a nikoliv na její další proliferaci nebo přežití (Ying et al. 2000). Stejný výsledek byl zmíněn i v případě studií zabývajících se BMP4.

5.3. Společný vliv BMP4 a BMP8b na PGC

Oba proteiny, BMP4 a BMP8b, jsou tedy nutné při tvorbě PGCs. Jejich exprese v extraembryonálním ektodermu se časově překrývá, oba účinkují na stejné buňky a jejich mutanti mají podobné defekty. Přirozeně se pak nabízí otázka, jak spolu BMP4 a BMP8b spolupracují a jak navzájem interagují (Obr. 5).



Obr. 5: Vývoj embrya zachycující vznik PGCs v proximálním epiblastu. Signály z extraembryonálního ektodermu (BMP4 a BMP8b) indukují expresi genu *Fragilis* v buňkách epiblastu a genu *Blimp1* v prekurzorech PGCs. Exe – extraembryonální ektoderm, VE – viscerální endoderm, AVE – anteriorní VE, DVE – dorzální VE (převzato z Hayashi et al. 2007).

Teoreticky je možné, že BMP4 reguluje expresi Bmp8b a nebo že BMP8b reguluje expresi Bmp4. Tato hypotéza byla ovšem vyvrácena pomocí *in situ* hybridizace. V Bmp8b mutantních embryích byly použity sondy pro Bmp4 a naopak. Úroveň exprese sledovaného proteinu však byla pokaždé stejná u homozygotů, heterozygotů i u wild-type embryí.

Další možností je, že po sekreci z extraembryonálního ektodermu BMP4 vytváří s BMP8b heterodimery. Pokud by tomu tak bylo, potom by měli mít homozygotní mutanti v Bmp4 stejné defekty jako homozygotní mutanti v Bmp8b. Až 57 % Bmp8b mutantů však mělo na rozdíl od mutantů Bmp4 PGCs.

Jednoduchý model spolupráce BMP4 s BMP8b předpokládá, že oba proteiny mohou tvořit pouze homodimery, které se pak váží na různé komplexy receptorů. Spolupráce probíhá až na úrovni signálních drah. Tato hypotéza požaduje od cílových buněk, aby tvořily jeden receptorový komplex pro BMP4 a další pro BMP8b. Zároveň ale nevysvětluje výsledek pokusu, při kterém byli vytvořeni tzv. dvojité mutanti – heterozygoti v genu pro Bmp4 i v genu pro Bmp8b. Tato embrya měla stejný fenotyp jako embrya heterozygotní pouze v Bmp4. Z toho se dá vyvodit, že účinek BMP4 a BMP8b se nesčítá. Přesněji to vystihuje následující model, který předpokládá, že BMP4 a BMP8b fungují jako heterodimery i jako homodimery. Tento model navíc pracuje s předpokladem, že biologická aktivita těchto homodimerů a heterodimerů není stejně silná. Heterodimer BMP4/BMP8b má větší aktivitu než BMP4 homodimer, který má větší aktivitu než BMP8b homodimer. Tento model relativně dobře vysvětluje všechny fenotypy vzniklé různými mutacemi v proteinech BMP. A to konkrétně embrya, u nichž nedochází k expresi Bmp4 vždy postrádají PGCs i alantois, protože aktivita BMP8b homodimeru je nedostatečná. Podobně vypadá situace u Bmp8b^{-/-} embryí, kde se může tvořit pouze BMP4 homodimer. U tohoto homodimeru, který má větší biologickou aktivitu než BMP8b homodimer, bylo zaznamenáno u 57 % embryí snížení počtu PGC zhruba na 10 %. U 43 % embryí nebyly žádné PGCs a došlo ke zpoždění iniciace alantoisu (smíšené genetické pozadí embryí) nebo byla pozorována kompletní absence PGCs a relativně kratší nebo někdy chybějící alantois (embrya kmene myši C57BL/6). Jak již bylo zmíněno výše, embrya dvojité mutace mají shodný fenotyp jako embrya heterozygotní pouze v Bmp4. Tato skutečnost se dá vysvětlit tím, že heterozygotnost pro BMP8b vychýlí rovnováhu k tvorbě

více BMP4 homodimerů. Homodimery i heterodimery by navíc teoreticky mohly signalizovat přes totožný receptor typu I (Ying et al. 2000).

Vzhledem k tomu, že v *in vitro* podmínkách jsou účinnější heterodimery než homodimery, mluví se o možnosti, že mohou fungovat jako hlavní BMP signál i v systému *in vivo*. Otázkou tedy je, jestli BMP tvoří heterodimery nebo homodimery a v případě druhé možnosti ještě, jestli oba BMP proteiny signalizují přes stejný komplex receptorů. Logicky tedy lze vyvodit tři možnosti, jak by to mohlo být. První teorie (an equal homodimer model) říká, že BMP tvoří homodimery a fungují podobně přes stejné receptory. Podle druhého modelu (heterodimer model) tvoří BMPs heterodimery a fungují přes jeden receptorový komplex a podle třetího modelu (two-pathway model) BMPs tvoří homodimery, které ale fungují přes dva různé receptorové komplexy.

Na základě všech tří modelů byly provedeny experimenty s buňkami epiblastu z myších embryí o stáří 6 – 6,25 dpc. Tyto buňky byly kultivovány s COS buňkami, které produkovaly velké množství BMP4 a BMP8b proteinů. Vzhledem k tomu, že k dimerizaci dochází během syntézy proteinů, nemohly v tomto případě heterodimery vzniknout, protože BMP4 a BMP8b proteiny byly produkovány různými buňkami. Výsledkem bylo zjištění, že BMP4 a BMP8b fungují jako homodimery a pro indukci PGCs je nutná jejich kombinace. To, že jsou nutné obě BMP dráhy, odpovídá spíše modelu „two-pathway“ a ve hře jsou tedy dva samostatné receptorové komplexy (Ying et al. 2001). Mimo to tento model signalizace by mohl fungovat také u drozofily (Dorfman and Shilo 2001). Do hypotézy byl dále zapojen protein BMP2, který by měl teoreticky fungovat přes stejný komplex receptorů jako BMP4, tzn. tedy přes jiný než BMP8b (Ying et al. 2001). Tím by se vysvětlil fakt, že pouze BMP4 s BMP2 mají aditivní efekt (Young et al. 2010). Další zjištění vycházelo z výsledků pokusů, kdy bylo zjištěno, že BMP8b homodimery mohou předejít defektům u mutantů *Bmp8b^{-/-}*. V případě proteinu BMP4 a *Bmp4^{-/-}* mutantů tomu tak nebylo. Pokusy byly prováděny u embryí o stáří 6 – 6,25 dpc a zdá se tedy, že BMP4 je nutný pro získání kompetence buněk epiblastu také v dřívějším stádiu. Tato kompetence navíc není omezená jen na proximální část epiblastu, ale na všechny jeho buňky, protože lze všechny přimět produkovat PGCs (Ying et al. 2001).

Proteiny BMP4 a BMP8b jsou nezbytné pro specifikaci myších PGCs *in vivo*, protein BMP2 pak funguje jako doplněk k BMP4. Společně iniciují signální kaskádu, která indukuje specifikaci buněk proximálního epiblastu. Tento jejich účinek byl zkoumán *in vitro*

kultivací ESCs jako EBs. Kultivační prostředí mělo co nejvíce napodobovat *in vivo* podmínky a docílit tak diferenciaci ESCs do pohlavní linie. Byla sledována exprese genu Pou5f1⁸, která je specifická pro PGCs. POU5F1 pozitivní buňky se tvořily po kultivaci EBs s přidáním BMP4 a BMP2 v médiu. Pokud se do média přidal protein BMP8b, potom buňky s expresí Pou5f1 vznikaly velmi vzácně. Byly zkoumány i kombinace BMP4 + BMP2 a také BMP4 + BMP8B, ale množství POU5F1 pozitivních buněk nebylo výrazně větší než při kultivaci v samotném BMP4. Proteiny BMP4 a BMP2 mají při kultivaci stejný význam a zdá se, že se mohou v signální dráze navzájem zastupovat. Oba totiž fungují prostřednictvím ACVR1⁹ receptoru. Platí to ovšem pouze pro experimentální podmínky, v *in vivo* podmínkách tato zastupitelnost nefunguje. Během experimentů se také předpokládalo, že kultivací v médiu s BMP4 + BMP8b vzroste množství diferencujících buněk více než při kultivaci v samotném BMP4. K tomu ale nedošlo a není jasné proč. Odpověď buněk kultivovaných s proteinem BMP4 je závislá na jeho koncentraci – nejvyšší odpověď byla pozorována u dávek 50 ng/ml, 100 ng/ml a 200 ng/ml. Jako standard pak byla vybrána koncentrace 100 ng/ml. Při kultivaci s touto standardní dávkou buňky exprimovaly téměř stejné geny jako diferencující PGCs a to Prdm1, Ifitm3, a Dppa3¹⁰ (časné faktory určující PGC). Poté byla zahájena i exprese genů Pou5f1, nanog, Ddx4 a Dazl¹¹, které jsou specifické pro pozdější stadia PGCs. Z těchto výsledků je nejdůležitější, že pomocí BMP4 a BMP2 společně či zvlášť, se zvyšuje exprese genů specifických pro zárodečné linie. Ukázalo se, že samotný protein BMP8b zřejmě nemá žádný výrazný účinek na kulturu. Další zásadní poznatek je, že období důležité pro diferenciaci EBs je 3 až 5 den (Young et al. 2010).

⁸ také známý jako OCT4

⁹ také známý jako ALK2 receptor

¹⁰gen Ifitm3 kóduje Interferon-induced transmembrane protein 3; gen Dppa3 kóduje Developmental pluripotency-associated protein 3

¹¹DDX4 (DEAD box protein 4) je homolog proteinu VASA v drozofile; gen dazl kóduje Deleted in azoospermia-like protein

6. Závěr

Předkládaná bakalářská práce popisuje proteiny BMP a primordiální zárodečné buňky, shrnuje nejdůležitější poznatky a studie o nich. Je zřejmé, že BMPs mají různorodé funkce, ovlivňují buněčnou proliferaci, apoptózu, diferenciaci i morfogenezi buněk. Jejich vliv na vývoj PGCs se ukázal být nesporný a je pozoruhodné, jak složitým regulacím se musí PGCs při svém vzniku a vývoji podrobit. Situaci komplikuje fakt, že není snadné tyto procesy zkoumat a sledovat PGCs uvnitř embrya, zvláště u savců. Podařilo se však objevit způsoby, jak PGCs kultivovat a jejich vznik sledovat v *in vitro* podmínkách. Je otázkou, jaký je rozdíl mezi funkcí růstových faktorů *in vitro* a *in vivo*. Logickým krokem je tedy snaha o co největší napodobení přirozeného mikroprostředí PGCs. Provedené experimenty podporují hypotézu, že faktory BMP4 a BMP8b jsou těmi faktory z extraembryonálního ektodermu, které indukují vznik PGCs. Je ovšem zřejmé, že celý proces indukce PGCs je komplexnější a složitější než se původně předpokládalo. Navíc je možné, že minimálně BMP4 protein má další funkce spojené se získáváním kompetence buněk epiblastu, další proliferací PGCs a dokonce je v určitých procesech zaměnitelný s proteinem BMP2. Zdá se, že při vzniku PGCs může hrát roli více faktorů, včetně zmiňovaného BMP2. Klíčové jsou však stále BMP4 a BMP8b. V současné době je navrženo několik modelů popisujících možné interakce mezi těmito proteiny, které řeší dvě stěžejní otázky: zda proteiny vytvářejí homodimery, heterodimery nebo obé a kolik komplexů receptorů je potřeba k signalizaci. Ze všech možných variant se zdají být nejpravděpodobnější dvě, které ale nejsou plně slučitelné.

Pokusy v roce 2001 odhalily, že pokud jsou vytvořeny pouze homodimery BMP4 a BMP8b, tak PGCs vznikají, přičemž je nutná existence obou homodimerů. Každý BMP pak signalizuje přes vlastní komplex receptorů. Ze starších prací se ovšem zdá, že BMPs tvoří biologicky různě aktivní heterodimery i homodimery. Samotná tvorba heterodimeru nemusí nutně popírat předchozí model. Problém je v tom, že tento model předpokládá existenci pouze jednoho komplexu receptorů. Buď dojde ke sloučení obou zmíněných modelů do jednoho složitějšího, kde budou vznikat heterodimery i homodimery signalizující přes dva komplexy receptorů, nebo se ukáže jako konečný „two-pathway“ model.

Získané vědomosti o vzniku PGCs jsou velmi užitečné při jejich kultivacích *in vitro* a jejich přeměně v embryonální zárodečné buňky. Na rozdíl od embryonálních kmenových buněk jsou tyto pluripotentní buňky zajímavým zdrojem pro možné buněčné terapie u člověka bez etických a imunologických omezení.

7. Použitá literatura

- Bendel-Stenzel M., Anderson R., Heasman J., Wylie C. (1998) The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9, 393-400.
- Brown M. A., Zhao Q. H., Baker K. A., Naik C., Chen C., Pukac L., Singh M., Tsareva T., Parice Y., Mahoney A., Roschke V., Sanyal I., Choe S. (2005) Crystal structure of BMP9 and functional interactions with pro-region and receptors. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25111-25118.
- Childs A. J., Kinnell H. L., Collins C. S., Hogg K., Bayne R. A. L., Green S. J., McNeilly A. S., Anderson R. A. (2010) BMP Signaling in the Human Fetal Ovary is Developmentally Regulated and Promotes Primordial Germ Cell Apoptosis. *Stem Cells* 28, 1368-1378.
- Collignon J., Varlet I., Robertson E. J. (1996) Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 381, 155-158.
- Constam D. B., Robertson E. J. (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *Journal of Cell Biology* 144, 139-149.
- Daluiski A., Engstrand T., Bahamonde M. E., Gamer L. W., Agius E., Stevenson S. L., Cox K., Rosen V., Lyons K. M. (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature Genetics* 27, 84-88.
- De Felici M. (1998) Isolation and culture of germ cells from the mouse embryo. In: Celis, J. (Ed.). *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, Academic Press, New York, NY, pp. 72–85.*
- De Felici M., Farini D., Dolci S. (2009) In or Out Stemness: Comparing Growth Factor Signalling in Mouse Embryonic Stem Cells and Primordial Germ Cells. *Current Stem Cell Research and Therapy* 4, 87-97.
- De Felici M., Scaldaferrri M. L., Lobascio M., Iona S., Nazzicone V., Klinger F. G., Farini D. (2004) Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Human Reproduction Update* 10, 197-206.
- Dorfman R., Shilo B. Z. (2001) Biphasic activation of the BMP pathway patterns the Drosophila embryonic dorsal region. *Development* 128, 965-972.
- Ducy P., Karsenty G. (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International* 57, 2207-2214.
- Fainsod A., Steinbeisser H., Derobertis E. M. (1994) On the function of BMP4 in patterning the marginal zone of the Xenopus embryo. *Embo Journal* 13, 5015-5025.
- Ginsburg M., Snow M. H. L., 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 effect on mouse primordial germ cell-numbers and direction of migration in culture. *Development* 108, 357-363.
- Gomperts M., Garciacastro M., Wylie C., Heasman J. (1994) Interactions between primordial germ-cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120, 135-141.
- Griffith D. L., Keck P. C., Sampath T. K., Rueger D. C., Carlson W. D. (1996) Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural

- paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 878-883.
- Hayashi K., Lopes S., Surani M. A. (2007) Germ cell specification in mice. *Science* 316, 394-396.
- Heldin C. H., Miyazono K., ten Dijke P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Hogan B. L. M. (1996) Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development* 10, 1580-1594.
- Holley S. A., Jackson P. D., Sasai Y., Lu B., Derobertis E. M., Hoffmann F. M., Ferguson E. L. (1995) A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 376, 249-253.
- Jones C. M., Dale L., Hogan B. L. M., Wright C. V. E., Smith J. C. (1996) Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* 122, 1545-1554.
- Kessler E., Takahara K., Biniaminov L., Brusel M., Greenspan D. S. (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase. *Science* 271, 360-362.
- Lavagnoli T. M. C., Fonseca S. A. S., Serafim R. C., Pereira V. S., Santos E. J. C., Abdelmassih S., Kerkis A., Kerkis I. (2009) Presumptive germ cells derived from mouse pluripotent somatic cell hybrids. *Differentiation* 78, 124-130.
- Lawson K. A., Dunn N. R., Roelen B. A. J., Zeinstra L. M., Davis A. M., Wright C. V. E., Korving J., Hogan B. L. M. (1999) BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development* 13, 424-436.
- Lawson K. A., Hage W. J. (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ-cells in the mouse. *Germline Development* 182, 68-84.*
- Liu F., Ventura F., Doody J., Massague J. (1995) Human type-II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs) - extension of the 2-kinase receptor model to the BMPs. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3479-3486.
- Luo G., Hofmann C., Bronckers A., Sohocki M., Bradley A., Karsenty G. (1995) BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & Development* 9, 2808-2820.
- Mac Sweeney A., Gil-Parrado S., Vinzenz D., Bernardi A., Hein A., Bodendorf U., Erbel P., Logel C., Gerhartz B. (2008) Structural Basis for the Substrate Specificity of Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-like Metalloproteases. *Journal of Molecular Biology* 384, 228-239.
- Makoolati Z., Movahedin M., Forouzandeh-Moghadam M. (2011) Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 47, 391-398.
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B. L. M. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem-cells from murine primordial germ-cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- McLaren A. (1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Controlling events in meiosis*, 38th Symposium of the Society of Experimental Biologists, pp. 7-23. Cambridge: Company of Biologists*
- McLaren A. (1995) Germ cells and germ cell sex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 350, 229-233.
- McLaren A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology* 262, 1-15.

- McLaren A., Southee D. (1997) Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology* 187, 107-113.
- McPherron A. C., Lee S. J. (1993) GDF-3 and GDF-9 - 2 new members of the transforming growth-factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry* 268, 3444-3449.
- Molyneaux K., Wylie C. (2004) Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology* 48, 537-544.
- Monk M., McLaren A. (1981) X-chromosome activity in fetal germ-cells of the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 63, 75-84.
- Moos M., Wang S. W., Krinks M. (1995) Anti-dorsalizing morphogenetic protein is a novel TGF-beta homolog expressed in the Spemann organizer. *Development* 121, 4293-4301.
- Ohinata Y., Ohta H., Shigeta M., Yamanaka K., Wakayama T., Saitou M. (2009) A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* 137, 571-584.
- Ohkubo Y., Shirayoshi Y., Nakatsuji N. (1996) Autonomous regulation of proliferation and growth arrest in mouse primordial germ cells studied by mixed and clonal cultures. *Experimental Cell Research* 222, 291-297.
- Okamura D., Hayashi K., Matsui Y. (2005) Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm. *Molecular Reproduction and Development* 70, 20-29.
- Pesce M., Klinger F. G., De Felici M. (2002) Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by BMP4 signalling. *Mechanisms of Development* 112, 15-24.
- Re'em-Kalma Y., Lamb T., Frank D. (1995) Competition between noggin and bone morphogenetic protein 4 activities may regulate dorsalization during Xenopus development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12141-12145.
- Rider C. C., Mulloy B. (2010) Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochemical Journal* 429, 1-12
- Rosen V. (2006) BMP and BMP inhibitors in bone. *Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease, and Aging* 1068, 19-25.
- Szabó P. E., Mann J. R. (1995) Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ-line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting. *Genes & Development* 9, 1857-1868.
- Tam P. P. L., Snow M. H. L. (1981) Proliferation and migration of primordial germ-cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64, 133-147.
- Tam P. P. L., Zhou S. X. (1996) The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Developmental Biology* 178, 124-132.
- Ueda T., Abe K., Miura A., Yuzuriha M., Zubair M., Noguchi M., Niwa K., Kawase Y., Kono T., Matsuda Y., Fujimoto H., Shibata H., Hayashizaki Y., Sasaki H. (2000) The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes to Cells* 5, 649-659.

- Vahtokari A., Aberg T., Jernvall J., Keranen S., Thesleff I. (1996) The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development* 54, 39-43.*
- Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whitters M. J., Kriz R.W., Hewick R. M., Wang E. A. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
- Wrana J. L. (1998) TGF-beta receptors and signalling mechanisms. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 24, 120-130.
- Wrana J. L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X. F., Massague J. (1992) TGF-beta signals through a heteromeric protein-kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003-1014.
- 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. *Molecular Endocrinology* 14, 1053-1063.
- Ying Y., Qi X. X., Zhao G. Q. (2001) Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8b signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7858-7862.
- Yoshimizu T., Obinata M., Matsui Y. (2001) Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* 128, 481-490.
- Young J. C., Dias V. L., Loveland K. L. (2010) Defining the window of germline genesis in vitro from murine embryonic stem cells. *Biology of Reproduction* 82, 390-401.
- Zhao G. Q., Deng K., Labosky P. A., Liaw L., Hogan B. L. M. (1996) The gene encoding bone morphogenetic protein BMP8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes & Development* 10, 1657-1669.
- Zhao G. Q., Hogan B. L. M. (1996) Evidence that mouse BMP8a (Op2) and BMP8b are duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development. *Mechanisms of Development* 57, 159-168.

* Originální citace převzatá ze sekundárního zdroje.