

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Helena Fuxová**

Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk  
u *Xenopus tropicalis*  
Study of migration potential of testicular stem cells  
in *Xenopus tropicalis*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2013

**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, 13.08.2013

Podpis

### **Poděkování:**

Poděkování patří mému vedoucímu práce RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D., za hodnotné rady, ochotu, trpělivost a odbornou pomoc při vypracovávání této práce. Dík patří též RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D., Mgr. Monice Flachsové, Bc. Markétě Vegrichtové a Janě Dvořákové za pomoc i rady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za neustálou podporu, protože bez ní by tato práce nemohla vzniknout.

## Abstrakt

Problematika kmenových buněk díky svému možnému terapeutickému potenciálu představuje jednu z nejperspektivnějších oblastí biologie. Náplní této diplomové práce bylo studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk *Xenopus tropicalis*, jejichž kultura byla založena z varlat juvenilních samců v laboratoři školitele. Díky vnějšímu oplození a embryonálnímu vývoji představuje *Xenopus* ideální modelový organismus pro transplantační a mikroinjekční experimenty *in-vivo*. Transplantace vitálně (PKH26) označených testikulárních kmenových buněk do blastul a peritonea pulců prokázala jejich široký migrační potenciál čítající střevo (entoderm), srdce, pronefros, genitální rýhu (mezoderm), epidermis a nervová soustava (ektoderm). Na základě mých experimentů jsem zjistila, že ideální množství transplantovaných buněk se pohybuje v rozmezí mezi 250-500 na jednoho pulce. Pro účely další charakterizace těchto kmenových buněk jsem zkonstruovala plazmidový vektor nesoucí gen pro červený fluorescenční protein. Tento plazmid byl posléze použit k přípravě žab celotělně exprimujících Katushka RFP pod kontrolou CAG promotoru. Po křížení transgenních jedinců s divokým typem bude v rámci jejich potomstva možné použít RFP pozitivní samce k založení kultury testikulárních kmenových buněk stabilně exprimujících reportérový gen. Tímto způsobem bude možné studovat nejen horizontální distribuci transplantovaných buněk v rámci organismu, ale také potenciální vertikální přenos do dalších generací.

**Klíčová slova:** migrační potenciál, testikulární kmenové buňky, *Xenopus tropicalis*

## **Abstract**

Because of their possible therapeutic potential stem cells are one of the most promising fields of study in biology. The aim of this thesis was to study the migration potential of testicular stem cells of *Xenopus tropicalis*, whose culture was established from the testes of juvenile males in the laboratory of my supervisor. Due to external fertilization and embryonic development *Xenopus* represents an ideal model organism for transplantation and microinjection experiments *in-vivo*. Transplantation of vital marked (PKH26) testicular stem cells into blastula and peritoneum of tadpoles showed their wide migratory potential including intestine (entoderm), heart, pronephros, genital groove (mesoderm) and epidermis (ectoderm). Based on my experiments, I found that the ideal number of cells for transplantation ranges between 250-500 per tadpole. To further characterize the stem cells, I constructed a plasmid vector carrying a gene for a red fluorescent protein. This plasmid was then used for preparation of frogs with whole-body expression of Katushka RFP under control of CAG promoter. The next aim is to gain the RFP positive offspring by crossing the transgenic individuals with the wild type. Male offspring can be used for establishing culture of testicular stem cells stably expressing the reporter gene. In this way it will be possible to study not only the distribution of the transplanted cells in the body, but also the potential transmission to subsequent generations.

**Key words:** migration potential, testicular stem cells, *Xenopus tropicalis*

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>4</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>6</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>7</b>
3.1 Xenopus – modelový organismus.....	7
3.1.1 Systematické zařazení a evoluce rodu.....	9
3.1.2 Časný embryonální vývoj <i>X. tropicalis</i> .....	10
3.1.3 Experimentální přístupy použitelné u <i>X. tropicalis</i> .....	11
3.1.3.1 Morpholino oligonukleotidy.....	11
3.1.3.2 Transgeneze.....	12
3.1.3.3 Transplantace .....	13
3.1.4 Vznik a diferenciacce pohlavních orgánů u <i>Xenopus</i> .....	13
3.2 Vznik zárodečné linie .....	14
3.2.1 Germinální kmenové buňky .....	16
3.2.1.1 PGC.....	16
3.2.1.1.1 Využití PGC v rámci biomedicínského výzkumu .....	17
3.2.1.2 Testikulární kmenové buňky .....	19
<b>4 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>21</b>
4.1 Materiál.....	21
4.1.1 Živý materiál.....	21
4.1.1.1 Pokusná zvířata .....	21
4.1.1.2 Bakterie .....	22
4.1.1.3 TSC .....	22
4.1.2 Neživý materiál.....	22
4.1.2.1 Plazmidy.....	22
4.1.2.2 Primery .....	22
4.1.2.3 Chemikálie .....	23
4.1.2.4 Roztoky .....	23
4.1.2.4.1 Roztoky pro konstrukci plazmidu.....	23
4.1.2.4.2 Roztoky pro IVF.....	23

4.1.2.4.3	Roztoky pro transplantaci a transgenezi .....	24
4.1.2.4.4	Roztoky pro fixaci, prosycení a následnou kryopreservaci pulců.....	24
4.1.2.4.5	Další roztoky .....	24
4.1.2.5	Kity.....	25
4.1.2.6	Antibiotika.....	25
4.1.2.7	Hormony.....	25
4.1.2.8	Média a séra .....	25
4.1.2.9	Restrikční endonukleázy a jejich pufry .....	26
4.1.2.10	Polymerázy a jejich pufry od TopBio.....	26
4.1.2.11	Další materiál .....	26
4.1.2.12	Přístroje .....	27
<b>4.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>27</b>
4.2.1	Konstrukce plazmidového vektoru.....	27
4.2.1.1	PCR amplifikace Katushka RFP .....	27
4.2.1.2	Restrikční reakce .....	28
4.2.1.3	Zatupení konců plazmidového vektoru a inseru.....	28
4.2.1.4	Defosforylace plazmidového vektoru.....	29
4.2.1.5	Ligace .....	29
4.2.1.6	Transformace bakterií plazmidovou DNA .....	29
4.2.1.7	Izolace plazmidového vektoru z bakteriální kultury .....	29
4.2.1.7.1	Izolace plazmidové DNA z velkého objemu bakteriální kultury.....	29
4.2.1.7.2	Izolace plazmidové DNA pro sekvenční a restrikční analýzy .....	30
4.2.1.8	Sekvence vektoru.....	30
4.2.2	IVF.....	30
4.2.3	Transgeneze .....	31
4.2.4	Transplantace TSC.....	32
4.2.5	Analýza transgenních a transplantovaných embryí <i>X. tropicalis</i> .....	33
4.2.6	Příprava řezových preparátů .....	33
4.2.6.1	Preparáty pro kryosekci.....	33
4.2.6.1.1	Materiál zaléváný a mražený v O.C.T. ....	34
4.2.6.1.1.1	Preparáty neprosycené sacharózou .....	34
4.2.6.1.1.2	Preparáty prosycené sacharózou .....	34
4.2.6.1.2	Preparáty zalévané do želatiny .....	35
4.2.6.2	Kryosekce.....	35
4.2.6.2.1	Deželatinizace.....	35
4.2.6.3	Preparáty zalévané do parafínu .....	36
4.2.6.4	Řezání na mikrotomu .....	36
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>

5.1	Konstrukce plazmidu .....	37
5.2	Příprava transgenních jedinců <i>X. Tropicalis</i> celotělně exprimujících Katushka-RFP.....	40
5.3	Transplantace TSC do blastul a pulců <i>X. tropicalis</i> .....	43
5.4	Histologické preparáty raných vývojových stádií <i>X. tropicalis</i> .....	49
<b>6</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>57</b>

## Seznam zkratek

Amp	ampicilin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
bp	base pare
BFM	bromfenolová modř
CAG	cytomegalovirus (CMV) early enhancer element a chicken beta-actin promotor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMV	cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAZ	deleted in azoospermia
DAZL	DAZ-like
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
ECC	embryonic carcinoma cell
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGC	embryonic germ cell
EGF	epidermal growth factor
ESC	embryonic stem cells
F1	první filiální generace
FBS	fetal bovine serum
FISH	fluorescent in situ hybridization
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GPSC	germline cell-derived pluripotent cell
hCG	human chorionic gonadotropin
ICM	inner cell mass
iPSC	induced pluripotent stem cell
IVF	in vitro fertilizace
klf	kruppel-like factor 4
LIF	leukemia inhibitory factor
MMR	Marc's Modified Ringer's
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS-222	tricaine methanesulfonate
O.C.T.	optimal cutting temperature compound
oct	octamer-binding transcription factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
p.c.	post coitum
PGC	primordial germ cell
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger
pPGC	presumptive primordial germ cells
rDNA	ribosomal DNA
REMI	restriction enzyme mediated integration

RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SCF	stem cell factor
sox	SRY-related HMG-box
SRY	sex-determining region on the Y chromosome
SSC	spermatogonial stem cells
TBE	Tris-borate-EDTA puf <sub>r</sub>
TSC	testicular stem cells
UTR	untranslated region
Xdazl	Xenopus DAZ-like
Xklp	Xenopus kinesin-like protein
Xpat	Xenopus primordial germ cell associated transcript
XVLG	Xenopus vasa-Wke gene
Xwnt	Xenopus Wnt
Zoo-FISH	cross-species fluorescence in situ hybridization

# 1 Úvod

Kmenové buňky jsou fenoménem nového tisícletí a jsou předmětem zájmu jak odborné, tak i laické veřejnosti. Jejich potenciál spočívá v schopnosti sebeobnovy a diferenciaci do různého počtu typů buněk a tkání. Z tohoto důvodu se kmenové buňky stále více uplatňují v rámci regenerativní medicíny.

Testikulární kmenové buňky jsou krucální pro tvorbu samčích pohlavních orgánů a samčí plodnost. Diferenciací těchto buněk vznikají, mimo jiných buněčných typů, spermie, a proto mají tyto buňky velký potenciál při léčbě chorob spojených s neplodností. Navíc, po reprogramaci můžeme získat buňky, které jsou svým charakterem podobné embryonálním kmenovým buňkám, a mohou tedy dát vzniknout všem třem zárodečným listům (ektoderm, mezoderm a entoderm).

K plnému využití kmenových buněk je kromě *in-vitro* testů zapotřebí zapojit tzv. *in-vivo* studie, které jsou zaměřeny na sledování jejich migrace a diferenciaci po transplantaci do embryí či dospělců v rámci celé řady živočichů. K takovýmto studiím je velmi vhodné využít organismy, které mají vnější oplození, a je tudíž možné studovat osud kmenových buněk od časného embrya až po dospělé. Těmto kritériím plně vyhovují obojživelníci, resp. drápatky druhu *Xenopus laevis* či *Xenopus tropicalis*. Jejich výhodou je relativně nenáročný chov a značný počet (stovky až tisíce) poměrně vekých oocytů i embryí (1-1,2 mm) v rámci jedné snůšky a v neposlední řadě i podobné vnitřní orgány a kostra jako u savců (Kashiwagi et al., 2010). Tyto aspekty mimo jiné předurčily drápatky pro studium buněčného cyklu a vývojově biologických procesů.

## 2 Cíle práce

V laboratoři školitele - Laboratoř vývojové biologie, katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, se podařilo založit kulturu testikulárních kmenových buněk (TSC) odvozenou z varlat juvenilních samců *X. tropicalis*. Primárním cílem diplomové práce bylo studium migračního potenciálu výše uvedených buněk pomocí jejich mikroinjekce do blastul či coelomové dutiny a peritonea pulců *X. tropicalis*. Sekundárním cílem, který má úzký vztah k řešené problematice byla příprava transgenních jedinců *X. tropicalis*

celotělně exprimujících červený fluorescenční protein Katushka RFP. Po křížení zakladatelské generace s divokým typem budou tito potomci použiti pro založení buněčné kultury TSC stabilně exprimující RFP. Transplantace takto označených buněk do embryí či pulců pak umožní účinně sledovat jejich migraci a v případě stabilního osídlení základů gonád i vertikální přenos do další generace. Pro účely této diplomové práce jsem pro vizualizaci injikovaných testikulárních kmenových buněk využívala časově omezené fluorescenční značení pomocí vitální barvičky PKH26.

### **3 Literární přehled**

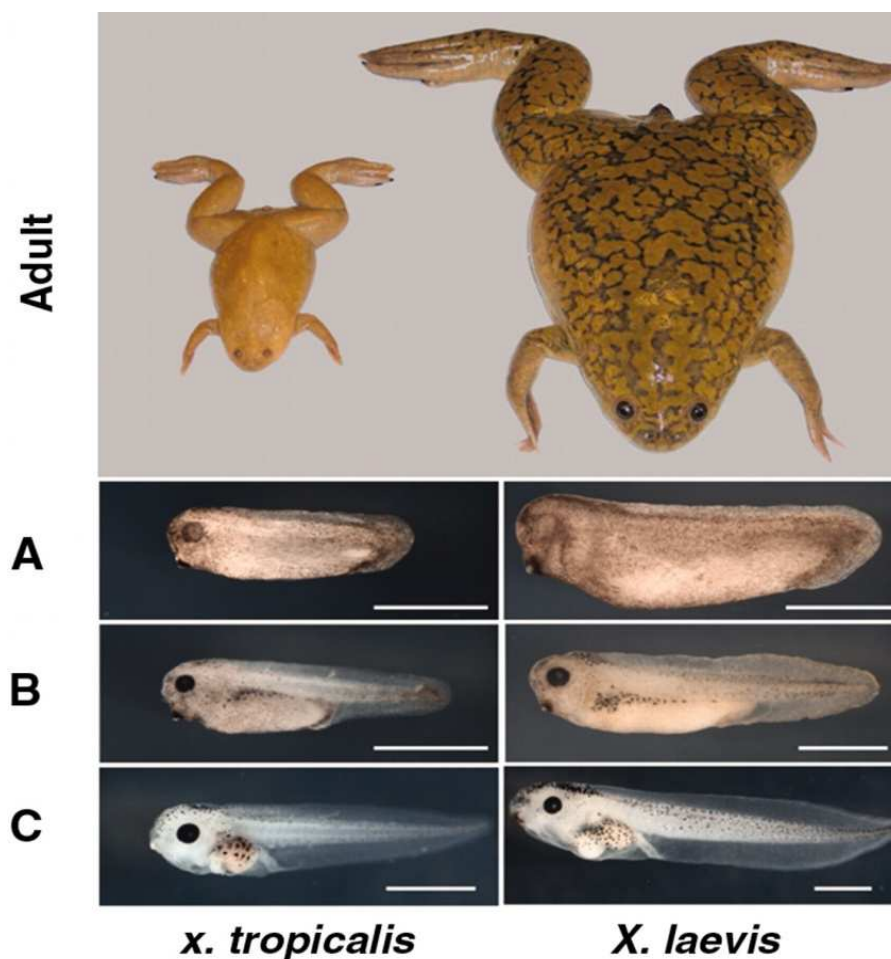
#### **3.1 Xenopus – modelový organismus**

Obojživelníci vždy představovali zásadní skupinu obratlovců pro studium vývojových a fyziologických procesů. Už Aristoteles zmiňoval žáby ve svých anatomických studiích a v 18. století Luigi Galvani demonstroval na žabím svalu význam elektřiny v živočišné fyziologii (Smith a Stoskopf, 2007). Následný výzkum směřoval k zmapování jednotlivých oblastí časného embrya, indukujících vývoj dalších struktur v ontogenezi. Tyto pokusy vyústily v objev organizátoru na zárodku mloka. Původci objevu, Hans Spemann a Hilde Mangoldová, získali v roce 1935 za tento mimořádný vědecký přínos Nobelovu cenu (Lenhoff, 1991). Mezi další zásadní objevy týkající se obojživelníků patří například možnost studia jednotlivých iontových kanálů, protože poprvé byla tato technika použita Neherem a Sakmannem na žabím svalu (Neher a Sakmann, 1976) a za tento objev jim byla též udělena Nobelova cena.

Mnoho raných experimentů, které se týkaly hlavně regenerativní medicíny, bylo prováděno na skokanech a čolcích (Amaya et al., 1998, Smith a Stoskopf, 2007). Tito obojživelníci však stále nesplňovali kritéria ideálního modelového organismu, a to hlavně kvůli obecně nízké toleranci k měnícímu se prostředí, často polyploidním gonomu (Amaya et al., 1998) a špatné možnosti přizpůsobovat životní cyklus experimentům.

Rod *Xenopus* (drápatky) představuje ve vývojové biologii zásadní posun. Na počátku 20. století se chov těchto žab velmi rozšířil díky možnosti jejich využití v

medicině. Bylo zjištěno, že injekcí moči těhotné ženy do lymfatického vaku *Xenopus laevis* je možné způsobit ovulaci žáby (díky lidskému choriogonadotropnímu hormonu - hCG), a tudíž se jednalo o rychlý test gravidity (Shapiro a Zwarenstein, 1934), stejný postup pro získání snůšky můžeme využít i u *Xenopus tropicalis*. Dalšími výhodami rodu *Xenopus* na rozdíl od jiných obojživelníků je vyšší tolerance k výkyvům prostředí, schopnost žít se i na mrtvém organickém materiálu a poměrně snadný chov v laboratorních podmínkách (Amaya et al., 1998). Díky velkému počtu i velikosti vajíček (1000-9000 v rámci jedné snůšky) a značné odolnosti embryí vůči mechanickým zásahům je možné využívat drápatky pro mikroinjekční a transplantační experimenty (Hirsch et al., 2002). Hlavně díky možnosti vyvolat jednoduše ovulaci v jakékoli roční fázi, se *Xenopus* stal ideálním modelovým organismem pro studium vývojových procesů (O'Rourke, 2007).



Obr. 1 – *X. laevis* vpravo a *X. tropicalis* vlevo. Nahoře: dospělec. Dole: (A) Stádium ocasního pupene (B) Aktivně plovoucí pulec (C) Aktivně se živící pulec. Měřítko: 1 mm (převzato z Hellsten et al., 2010).

Dospělý *X. tropicalis* měří 4-5 cm a oproti *X. laevis* má poměrně krátkou generační dobu 4-6 měsíců (Amaya et al., 1998, Hirsch et al., 2002) (viz srovnání obou druhů obr. 1). Genom *X. tropicalis* je na rozdíl od všech ostatních zástupců rodu *Xenopus* diploidní ( $2n = 20$  chromozómů) a celkově patří k jednomu z nejmenších v rámci obojživelníků ( $1.7 \times 10^9$ bp) (Kobel a Graf, 1991, Amaya et al., 1998, Hirsch et al., 2002).

V roce 2011 byla ve spolupráci s laboratoří školitele publikována genetická mapa *X. tropicalis* (Wells et al., 2011). Podobně probíhá v současné době konstrukce vazebné a fyzické mapy také u modelu *X. laevis*.

Akumulace velkého množství poznatků o genetice, vývoji a fyziologii *X. laevis* a *X. tropicalis* vyvolalo potřebu sjednotit všechny tyto informace a poskytnout je vědecké veřejnosti pomocí jednoho informačního zdroje. Tímto zdrojem se stal internetový portál Xenbase <http://www.xenbase.org/common/>, obsahující informace o jednotlivých genech, úsecích cDNA, ale i anatomii a vývoji výše zmíněných zástupců rodu *Xenopus* (Bowes et al., 2007).

### 3.1.1 Systematické zařazení a evoluce rodu

Rozlišujeme tři recentní řády patřící do třídy Amphibia (obojživelníci): Anura (žáby), Caudata (ocasatí) a Gymnophiona (červoři). Anura dále řadíme mezi Ecaudata (bezocasí) (Callery, 2005).

Zástupci rodu *Xenopus* spadají do třídy Amphibia, podtřídy Ecaudata (bezocasí), řádu Anura (žáby), čeledi Pipidae (pipovití), podčeledi Xenopodinae (Cannatella a de Sa, 1993, Callery, 2005). Další systematické členění procházelo v posledních několika desetiletích dramatickými změnami. Dřívější morfologické studie docházely k závěrům, že *Xenopus (Silurana) tropicalis* patří do podčeledi Siluraninae, což měla být sesterská skupina k Xenopodinae (kam byl řazen např. *X. laevis*) a Pipinae (Cannatella, Trueb, 1988). Další studie, zahrnující analýzu rDNA, však ukázaly, že rod *Silurana* je s rodem *Xenopus* natolik fylogeneticky příbuzný, že není potřeba rozlišovat dvě podčeledi (Siluraninae a Xenopodinae) pro zachování monofyletismu podčeledi Xenopodinae, bylo tedy navrženo členění na rody *Silurana* a *Xenopus* v rámci podčeledi Xenopodinae (de Sa, Hillis, 1990). Díky velké fylogenetické příbuznosti je možné používat označení jak *Xenopus* -,

tak *Silurana - tropicalis*. Pro účely této práce budu používat dnes častější označení *Xenopus tropicalis*.

Rod *Xenopus* se vyznačuje tím, že jeho zástupci mají zpravidla polyploidní genom, což je způsobeno genomovými duplikacemi v evoluci (Bisbee et al., 1977). I u jiných taxonomických skupin v třídě obojživelníků se setkáváme s polyploidními genomy, nicméně v případě rodu *Xenopus* se jednalo nejméně o 4 polyploidizační procesy, což z tohoto rodu činí zcela unikátní skupinu (Cannatella, de Sa, 1993). *Xenopus Laevis* má 36 chromozomů a díky tomu, že při mitóze vytváří bivalenty a jeho karyotyp má spíše diploidní charakter, byl tento druh považován za diploidní (Amaya et al., 1998). Nicméně fylogenetické studie albuminu u rodu *Xenopus* ukázaly, že i při evoluci tohoto druhu došlo ke genomové duplikaci, a tudíž se jedná vlastně o druh tetraploidní (Bisbee et al., 1977). Tento poznatek potvrdily i experimenty využívající metodu Zoo-FISH (mezidruhovú fluorescenční in situ hybridizace) (Krylov et al., 2010).

Zeměpisně pocházejí drápatky z afrického kontinentu. Vyvinuly se ve střední nebo východní Africe dávno poté, co se od původního superkontinentu oddělila Jižní Amerika (Evans et al., 2004). Dnes se zástupci vyskytují v oblastech jižně od Sahary (Trueb et al., 2000). Habitatem je stojatá nebo pomalu tekoucí voda (Evans et al., 2004).

### 3.1.2 Časný embryonální vývoj *X. tropicalis*

Oocyty drápatky jsou mesolecitální, rýhování je holoblastické radiální a už po prvním dělení je stanovena pravá a levá polovina budoucího těla. U *X. laevis* byl vývoj od oplození až po konec metamorfózy rozdělen do 66 stádií (Nieuwkoop, Faber, 1956 citováno podle Kelly, 1996), později bylo toto rozdělení aplikováno i na *X. tropicalis*. Toto rozdělení používám i pro popis jednotlivých stádií vývoje *X. tropicalis* v této práci. Vývoj zahrnuje vytvoření stádia ocasního pupenu a dále plovoucího pulce, ze kterého se později stává aktivní filtrátor. Poté, co pulec projde metamorfózou, se z něj stává žába, která je po 4-6 měsících schopná vlastní reprodukce (Amaya et al., 1998).

### 3.1.3 Experimentální přístupy použitelné u *X. tropicalis*

V první řadě můžeme na *X. tropicalis* provádět stejný nebo podobný typ experimentů, jako na *X. laevis* s využitím molekulárních dat nashromážděných dlouholetým studiem *X. laevis* (O'Rourke, 2007). Mezi metody použitelné u obou modelových organismů patří mikrochirurgie časných embryonálních stádií, transgeneze a biosyntéza požadovaného proteinu v oocytu pomocí injekce mRNA (Kashiwagi et al., 2010). Dále jsou u tohoto organismu zavedeny cytogenetické techniky zahrnující pruhování chromozomů (banding) (Uno et al., 2008), fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a metody založené na komparativní hybridizaci (Zoo-FISH) (Krylov et al. 2007, Krylov et al. 2010). Většina známých sond, které se využívají u *X. laevis*, může být použita u *X. tropicalis* beze změny protokolu (Khokha et al., 2002). Ve speciálních případech může být potřeba prodloužit časy barvení u *X. tropicalis* pro získání kvalitnějších výsledků (Khokha et al., 2002). Pro imunohistochemické účely můžeme zpravidla využít protilátky fungující u *X. laevis* na *X. tropicalis*.

#### 3.1.3.1 Morpholino oligonukleotidy

Při knock-down genů u *X. tropicalis* se často využívá morpholino oligonukleotidů (Kashiwagi et al., 2010). U morpholino oligonukleotidu je ribózový zbytek nahrazen morpholinovým kruhem (Summerton, 1999). Díky této vlastnosti může tento oligomer působit jako vysoce specifický antisense agens, který vazbou na 5'UTR oblast či exon-intronové nebo intron-exonové rozhraní u hnRNA, může zablokovat její translaci, resp. sestřih. (Summerton a Weller, 1997, Summerton, 1999, Khokha et al., 2002). Následně lze pozorovat fenotypický efekt. Určitou nevýhodou použití morpholino oligonukleotidů je i přes vysokou specifitu možnost umlčení více (nežádoucích) genů najednou (side efekt). Mezi další možné problémy patří špatná schopnost inhibice translace genů s komplexními promotory (Ekker, 2000).

### 3.1.3.2 Transgeneze

Transgeneze je používána k vytváření geneticky modifikovaných organismů. Touto metodou je možné studovat regulaci genové aktivity, roli morfogenních faktorů při vývoji (Hartley et al., 2001) a dále je v kombinaci s gene trap nebo promotor trap metodou využíván k inserční mutagenезi (Bronchain et al., 1999). V neposlední řadě můžeme transgenezi využít pro tvorbu organismu, který celotělově exprimuje reportérový gen. Z jakékoliv tkáně takto modifikovaného organismu pak můžeme založit kulturu buněk stabilně produkující fluorescenční protein. Tyto buňky je pak možné využít například pro transplantační experimenty.

Prvním významným experimentem byla transplantace jádra spermie nesoucí cizorodou DNA do vajíčka *X. laevis*. Tato metoda je založena na vnesení plazmidu do dekonzenzovaného jádra spermie za využití restrikčního enzymu (metoda známá jako REMI) (Kroll a Amaya, 1996). Stejná metoda byla využita o 4 roky později u *X. tropicalis*, kdy byly odchovány linie stabilně exprimující GFP reportérový protein v  $\gamma$ 1-crystallin promotorových elementech (Offield et al., 2000). Problém této metody je, že koncentrace restrikčního enzymu musí být přísně kontrolována, jinak může dojít k fragmentaci genomu, další možnou překážkou je samotná transplantace jádra spermie, která může výrazně ovlivnit výsledky (Pan et al., 2006).

Mezi moderní technologie patří využití I-SceI meganukleázy. Jedná se o endonukleázu, způsobující dvouvláknové zlomy DNA. I-SceI byla izolována z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kde je kódována mitochondriální mobilní skupinou I intronů (Thierry et al., 1991). Sekvence rozpoznávaná I-SceI meganukleázou je velmi dlouhá (18 bp) s minimální tolerancí degenerace rozpoznávané sekvence, díky čemuž je endonukleázová aktivita meganukleázy vzácná (Colleaux et al., 1988), což umožňuje vysokou specifitu transgeneze. Studie na rybím modelu ukázaly, že I-SceI zprostředkovaná transgeneze umožňuje stabilní integraci transgenů do genomu hostitele a výrazně snižuje efekt mozaikové exprese (Thermes et al., 2002). U *Xenopa* byla tato metoda použita o čtyři roky později. Byl vytvořen vektor, kde studovaný promotor a reportérový gen (GFP) byly z obou stran ohraničeny I-SceI rozpoznávacími místy. Plazmidová DNA byla naštěpena a následně vpravena spolu s I-SceI meganukleázou do zygoty. Byla pozorována

rovnoměrná exprese, mnohem větší účinnost transgeneze, než při jiných metodách a zároveň i úspěšná integrace transgenů do germinální linie (Pan et al., 2006).

### 3.1.3.3 Transplantace

Metoda transplantace u obojživelníků dopomohla k objevení organizátoru na začátku minulého století a i dnes je tato metoda často využívána ve výzkumu. U ocasatých obojživelníků sloužily transplantací experimenty k získání poznatků o náhradách kůže, srdce a dalších orgánů, stejně jako o regeneraci převážně končetinových struktur (Cohen, 1971, Brockes, 1997). Od poloviny minulého století byly časté transplantace jader do enukeovaných oocytů *X. laevis* (Elsdale et al., 1960, Chan a Gurdon, 1996). Metoda single-cell transplantace (transplantace jedné buňky) byla využita ke studiu buněčné interakce a indukce při vývoji svalu v časném embryonálním vývoji (Kato a Gurdon, 1993). Průkopnické studie v oblasti vývoje pohlavní soustavy byly u *Xenopa* prováděny v 60. letech minulého století, a to transplantací primordiálních zárodečných buněk (PGCs) mezi různými embryi ve stádiu neuruly. Následně byl sledován další vývoj a schopnost obnovy embrya (Blackler a Fischberg, 1961).

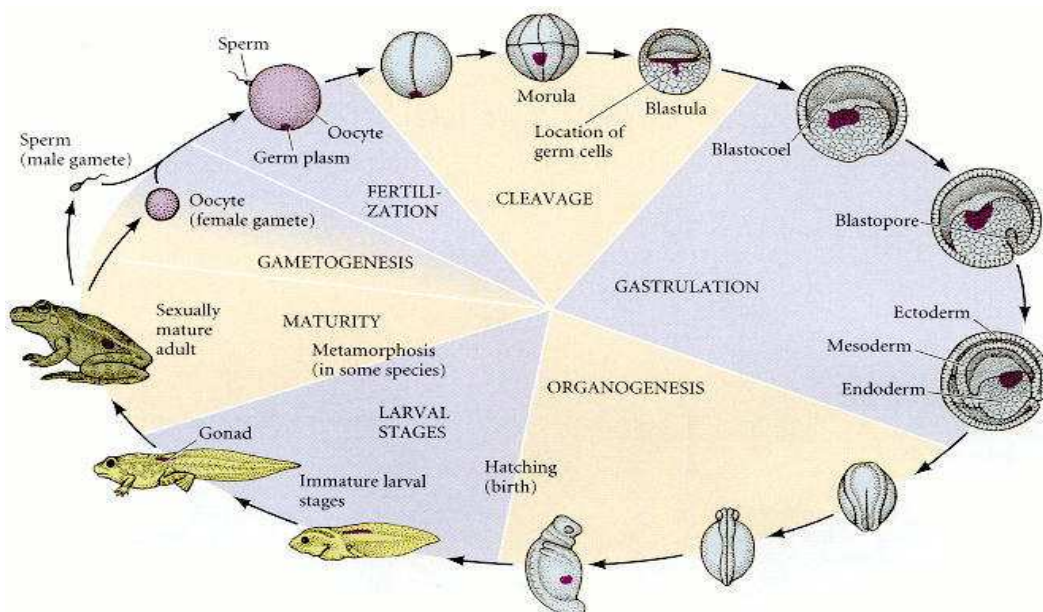
### 3.1.4 Vznik a diferenciací pohlavních orgánů u *Xenopus*

Vývoj pohlavního ústrojí u drápatky sdílí mnohé charakteristické rysy tohoto procesu s jinými organismy, člověka nevyjímaje. Obecně je pohlaví určeno buď vlivem prostředí, nebo geneticky. U obojživelníků byly prováděny studie, v nichž prostředí mělo vliv na určení pohlaví, nicméně dané prostředí bylo umělé s nefyziologickými teplotami pro dané druhy (Hayes, 1998). Ačkoliv u většiny obojživelníků nejsou cytologicky rozlišitelné sex chromozomy, tak stejně jako u savců je pohlaví u *Xenopa* určeno primárně chromozomálně. U savců je homogametické pohlaví samičí s dvěma X chromozomy a heterogametické samčí s XY chromozomy. Zvláštní charakteristikou vývoje pohlavních orgánů je jejich indiferentní podoba v raném embryonálním vývoji (Lillie, 1917). Z této indiferentní gonády, která má jak Wolffův, tak Müllerův vývod, vzniká konkrétní typ pohlavních orgánů velmi záhy, a to díky produkci pohlavně specifických hormonů. Sertoliho buňky fetálních varlat sekretují anti-Müllerův hormon, který brání rozvoji samičího

pohlavního ústrojí a časem způsobí zánik Mülerova vývodu. Leydigovy buňky produkují klíčový maskulinizační hormon, testosteron, díky kterému je stabilizován Wolffův vývod, který pak dává vzniknout charakteristickým strukturám samčího pohlavního ústrojí (Haseltine a Ohno, 1981, Münsterberg a Lovell-Badge, 1991, Cupp a Skinner, 2005). Při formování ovárií zaniká Wolffův kanál a v genitální rýze dochází k aktivaci kortexu, naopak při vzniku testes se aktivují buňky dřeně (Münsterberg a Lovell-Badge, 1991). U samic se na konci metamorfózy prapohlavní buňky obklopí buňkami folikulárními a vznikají oocyty vstupující do profáze, u samců se vyvinou semenotvorné kanálky a později se z prekurzorových buněk vytvoří spermatogonie (Kelly, 1996). Sekundární sexuální diference pohlaví závisí na přítomnosti konkrétních typů steroidních hormonů. Chromozomálně je pohlaví u *X. laevis* určeno jako ZZ/ZW, kdy heterogametické pohlaví je samičí (Mikamo a Witschi, 1966 citováno podle Cannatella a de Sa, 1993). U *X. tropicalis* je genomová oblast určující pohlaví zatím neznámá (Bewick et al., 2013).

### 3.2 Vznik zárodečné linie

U celé řady organismů (háďatko, octomilka, drápatka aj) hraje při vzniku zárodečné linie buněk zásadní roli tzv. zárodečná plazma (Ikenishi, 1998) (viz obr. 2).



Obr. 2. Životní cyklus obojživelníků. Fialově je vyznačen pohyb zárodečné plazmy v průběhu vývoje jedince (Převzato z Gilbert, 2006).

Jedná se o specificky lokalizované ribonukleoproteinové komplexy přítomné v cytoplazmě buněk, které později dají vzniknout pohlavní linii. U savců vzniká zárodečná linie jiným způsobem, a to přes interakce s okolními tkáněmi a buňkami v počátečních stádiích gastrulace (Matsui a Okamura, 2005). Buňky dávající základ pohlavní linii jsou PGCs.

U *Xenopa* je lokalizace zárodečné plazmy omezena na vegetální stranu embrya a ještě ve čtyřbuněčném stádiu je mezi buňky rozdělena rovnoměrně (Whittington a Dixon, 1975). Součástí zárodečné plazmy jsou i tzv. germinální granula (obdobně jako pólová granula u drozofily), která obsahují specifické RNA a proteiny důležité pro vznik zárodečných buněk (Wilye, 1999, MacArthur et al., 1999). Pro přesnou lokalizaci a agregaci zárodečné plazmy jsou zásadní mikrotubuly (Ressom a Dixon, 1988). Od 3. dělení je zárodečná plazma rozdělována asymetricky mezi dceřiné buňky, protože je lokalizována vždy jen na jednom pólu dělicího vřeténka, a tudíž nevzrůstá signifikantně počet pPGCs (prsumptivní primordiální zárodečné buňky). Pro přesnou lokalizaci a agregaci zárodečné plazmy jsou zásadní mikrotubuly (Ressom a Dixon, 1988). Od 3. dělení je zárodečná plazma rozdělována asymetricky mezi dceřiné buňky, protože je lokalizována vždy jen na jednom pólu dělicího vřeténka, a tudíž nevzrůstá signifikantně počet pPGCs (prsumptivní primordiální zárodečné buňky). Po dosažení stádia gastruly se pPGCs nacházejí v oblasti dna archenteronu a mezi stádiem gastruly a vývojovým stádiem 38-41 migrují pPGCs z oblasti entodermu (Whittington a Dixon, 1975). V této době se rovnoměrně dělí a výrazně zvyšují svůj počet. Již ve stádiu pozdního ocasního pupene (stádium 31) začínají pPGCs migrovat do oblasti budoucích genitálních rýh. V dalším vývoji gonocyty dosahují oblasti dorzálního entodermu a ve stádiu 46 dosahují téměř všechny buňky párových genitálních rýh (Kamimura et al., 1976).

Molekulární podstata vzniku a diferenciacie zárodečné linie u *Xenopa* je stále předmětem intenzivního studia. Mezi nejdůležitější RNA a proteiny uplatňující se při tomto ději patří Vg1, VegT, XVLG 1, Xwnt11, Xdazl, Xklp1, Xpat a Xcat2 (Kloc et al., 2001 citováno podle Machado et al., 2005). Xpat protein pomáhá při lokalizaci a formování zárodečné plazmy (Machado et al., 2005). Xklp1 se uplatňuje při agregaci zárodečné plazmy na vegetálním pólu embrya (Robb et al., 1996). Xcat2 je také součástí zárodečné plazmy, translace RNA je v průběhu oogeneze reprimována a k její aktivaci dochází až v časných embryonálních

stádiích, protein pak plní svou funkci při proliferaci germinálních kmenových buněk (MacArthur et al., 1999). *XVLG 1* je *vasa* homologní gen (Ikenishi a Tanaka, 1997). *Vasa* gen je exprimován v PGC většiny významných modelových organismů od drozofily až po myš (Raz, 2000) a je přítomen též u člověka. Pro lokalizaci PGCs je zásadní *Xdazl*. U lidí je *DAZ* gen lokalizovaný na Y chromozomu a při jeho delecii dochází k azoospermii (nepřítomnost zralých spermií v ejakulátu) (Reijo et al., 1995). *Xdazl* RNA, stejně jako *Xcat2*, je v oocytu přítomna ještě před oplozením. Po oplození se *Xdazl* RNA přesouvá, jako součást zárodečné plazmy, do vegetální části embrya, kde je specificky lokalizována až do čtyřbuněčného stádia (Houston et al., 1998). *Xdazl* protein je exprimován v zárodečné plazmě od blastuly až po raná stádia ocasního pupenu a patří mezi klíčové faktory v rámci diferenciaci Xenopích PGCs (Houston a King, 2000). *Xdazl* RNA byla nalezena nejen v embryonálních stádiích, ale i ve varlatech juvenilních a dospělých samců, a proto se jedná o skvělý selekční marker pro lokalizaci samčích premeioitických spermatogónií a spermatocytů (Houston et al., 1998).

### **3.2.1 Germinální kmenové buňky**

Kmenové buňky charakterizuje možnost sebeobnovy a diferenciaci. U časného embrya lze nalézt totipotentní blastomery časného embrya. Ve stádiu blastocysty je přítomna vnitřní buněčná masa (ICM). Kultivované buňky z této masy mají pluripotentní charakter a mohou dát vzniknout všem třem zárodečným listům (Martin, 1981). V dalším vývoji se tyto buňky specializují a ztrácí svou pluripotenci. V dospělém organismu se setkáváme s uni-, případně multipotentními kmenovými buňkami schopnými diferencovat pouze v omezený počet tkání. Výjimečné postavení mají buňky zárodečné linie, které si musí zachovat svou schopnost totipotence, aby mohly později dát vzniknout novému organismu (MacArthur et al., 1999).

#### **3.2.1.1 PGC**

Primordiální germinální buňky jsou unikátní svým charakterem, protože předávají svou genetickou výbavu dalším generacím. U většiny organismů se

zárodečná linie oddělí od ostatních buněk již v časných embryonálních stádiích (Wylie, 1999). PGCs vznikají zpravidla mimo oblast budoucích gonád a teprve migrací dosahují místa svého určení (Houston a King, 2000). U myši jsou mezi 7,75-8 dnem po oplození (p.c. – post coitum) PGCs přítomny na posteriorním konci primitivního proužku a u báze alantoisu. 8,5 dnů p.c. jsou buňky přítomny v raném entodermu, dále putují přes mezenterium do genitálních rýh, které jsou plně kolonizovány 13,5 dnů p.c. (Tam a Snow, 1981). Faktory, které se uplatňují při diferenciaci PGCs z buněk epiblastu jsou BMP2, BMP4 a BMP8B (Tournaye a Goossens, 2006).

PGCs je možné charakterizovat expresním profilem, který zahrnuje alkalickou fosfatázu, Oct4, *vasa*, SSEA1, EMA1, F9 a receptor tyrosin kinázy c-kit (Bendel-Stenzel et al., 1998, Tournaye a Goossens, 2006). Pro migraci a proliferaci jsou dále zásadní genové lokusy c-kit, *tiar* a *steel* (Sutton, 2000).

V okamžiku, kdy se PGCs dostanou do oblasti budoucích gonád, dochází k jejich obklopení somatickými buňkami a PGCs se mohou začít diferencovat v definitivní gamety (Houston a King, 2000). U většiny živočichů mají tyto buňky v raných stádiích potenciál diferencovat v buňky jak samčích, tak samičích pohlavních orgánů (Wylie, 1999). Až v pozdějším vývoji se vlivem mnoha různých diferenciačních faktorů ustanovuje, jakého typu pohlavní orgány vzniknou.

### **3.2.1.1.1 Využití PGCs v rámci biomedicínského výzkumu**

V posledních letech se zvláště rozvinula metoda transplantace PGCs. Tento typ experimentu byl prve použit na kuřecím modelu. Transplantací PGCs do oběhu recipientního embrya byly získány chiméry, které po zpětném zkřížení měly potomky pocházející jak z původních, tak z transplantovaných PGC (Tajima et al., 1993). U myši byl podobný typ transplantace proveden o rok později. TSC (včetně Sertoliho buněk) byly vpraveny do recipientního neplodného samce a byla pozorována kolonizace semenotvorného kanálku těmito buňkami a následné obnovení plodnosti myšího samce (Brinster a Avarbock, 1994). Dalším významným transplantačním pokusem bylo vnesení GFP (zelený fluorescenční protein) značených spermatogoniálních kmenových buněk diferencovaných z kultury teratokarcinomálních buněk do myšího samce. U recipientního samce se formovala ve varlatech viditelná populace kmenových buněk (díky značení GFP),

kteře iniciovaly spermatogenezi a dávaly vzniknout zralým spermii (Nayernia et al., 2004).

Pro biomedicínské účely byla zásadní transplantace germinálních kmenových buněk do primáta. Tento experiment byl proveden na makaku jávském (*Macaca fascicularis*), kdy po ozáření varlat, které vyvolalo poškození spermatogeneze, byly germinální kmenové buňky vpraveny pouze do jednoho varlete a byl pozorován efekt této transplantace. Výsledkem bylo, že varle s transplantovanými buňkami vykazovalo větší regeneraci a později i přítomnost spermatogonií u některých jedinců (Shlatt et al., 2002).

U nižších obratlovců byla poprvé provedena transplantace PGCs na rybím modelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Záródečné buňky byly specificky značené GFP, protože exprese byla pod kontrolou *vasa*-like genových regulačních oblastí (Okutsu et al., 2006). Značení bylo specifické proto, že *vasa* se vyskytuje v zárodečných buňkách (Raz, 2000), a tudíž i regulační genové oblasti tohoto genu jsou aktivní specificky v PGCs. Tyto značené PGCs byly vneseny do peritoneální dutiny rybího embrya a následně byla pozorována jejich migrace do genitálních rýh recipienta, kde tyto buňky dále proliferovaly a vznikaly z nich funkční pohlavní buňky (Okutsu et al., 2006). Důležitým poznatkem je, že transplantované PGC nevyvolají u příjemce imunitní odpověď, což mohlo být způsobeno tím, že buňky jsou transplantovány do recipienta v raném embryonálním stádiu nejspíše ještě před aktivací jeho buněčné imunity (Takeuchi et al., 2003).

Za zvláštních podmínek se PGCs mohou podobat ESCs, protože mohou dát vzniknout pluripotentní buněčné linii. Mezi faktory, které jsou zásadní pro tuto transformaci, patří GDNF, LIF, EGF, bFGF (Resnick et al., 1992, Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Když byly neonatální buňky varlat kultivovány s těmito faktory, bylo možné založit stabilní buněčnou kulturu, která logaritmicky proliferovala po dobu 5 měsíců. Po aplikaci těchto buněk do neplodného samce došlo ke kolonizaci semenotvorných kanálků těmito buňkami a následně k normální spermioogenezi (Kanatsu-Shinohara et al. 2003, Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Další odvětví výzkumu se zaměřilo na diferenciaci germinálních buněk z ESC, případně iPSC (indukované pluripotentní kmenové buňky). Výsledkem přelomové studie byla úspěšná transformace oocytů z ESC u myši (Hübner et al., 2003). Dalším krokem bylo vytvoření kultury myších PGCs a spermatogoniálních kmenových buněk (SSC) z iPSC pomocí kultivace s retinovou kyselinou. Exprese

Oct4, markeru ESC a iPSC, se výrazně snížila, a naopak se zvýšila exprese *vasa* genu, buňky ztratily svůj pluripotentní charakter a diferencovaly v SSC (Zhu et al., 2012).

### 3.2.1.2 Testikulární kmenové buňky

Základní charakteristikou TSCs je, že mohou kolonizovat oblast vyvíjející se nebo již vzniklé samčí gonády a diferencovat ve funkční pohlavní orgán nebo jeho část. Díky této vlastnosti nabízí TSC řadu možností pro jejich využití v regenerativní medicíně. Mezi nejzajímavější oblasti výzkumu a následné terapie, patří léčba neplodnosti.

Testikulární kmenové buňky (TSCs) vznikají z PGCs. Klíčovou roli v této transformaci mají Sertoliho buňky, jenž obklopují PGCs, které dosáhly genitální rýhy. Dochází k proliferaci PGCs a k vytvoření prvních semenotvorných kanálků. PGCs diferencují v gonocyty, které jsou mitoticky neaktivní až do narození, kdy z nich vznikají SSCs. Sertoliho buňky sekretují anti- Müllerův hormon, který brání rozvoji samičího pohlavního ústrojí (Manova et al., 1993 citováno podle Tournaye a Goossens, 2006, Griswold, 1998, Tournaye a Goossens, 2006).

Podmnožinou TSC jsou SSC. Tyto buňky se buď dále mitoticky dělí, a tím zachovávají svou kmenovost, nebo podstoupí diferenciační kroky, jejichž výsledkem je vytvoření funkční spermie. Tento krok je kontrolován Sertoliho buňkami. Díky kombinaci přímého kontaktu se zárodečnými buňkami a sekrecí různých signálních molekul, mezi které patří například SCF a GDNF, mohou za další diferenciaci TSCs. GDNF je jedním z klíčových faktorů, jehož nízká koncentrace umožní diferenciaci SSC, a naopak vysoká koncentrace podporuje mitotické dělení spermatogónií (Meng et al., 2000). Mezi významné markery charakterizující TSCs, resp. SSCs patří Plzf, který umožňuje sebeobnovu a zachování populace TSCs, dále faktor Oct4, přítomný v nediferencovaných SSC, a marker Thy1 (viz tab. 1).

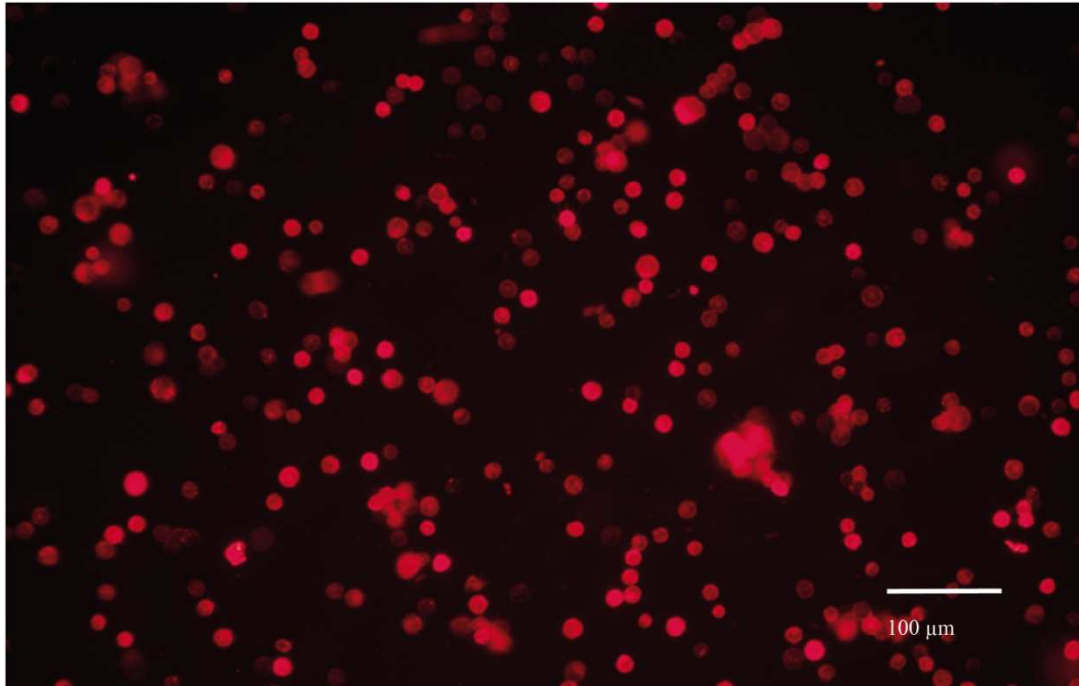
Pro účely této práce jsem využívala buňky kultury TSC, která byla založena v laboratoři školitele. Testikulární kmenové buňky byly získány desintegrací izolovaných varlat juvenilních samců *X. tropicalis*. Prvním typem buněk migrujících z testikulární tkáně byly pre-Sertoliho buňky. Po dlouhodobé kultivaci buněk bez výměny média byl pozorován výskyt kmenových buněk v kolonii.

Kultura buněk obsahovala jak pre-Sertoliho podpůrné buňky, tak testikulární kmenové buňky, které bylo nutné oddělit pro získání čisté kultury TCSs. Pro udržování proliferace a nediferencovaného stavu kmenových buněk byl ke kultuře přidán LIF (leukemický inhibiční faktor), který umožňuje udržení kmenového charakteru kultury (Williams et al., 1998).

TSCs buňky (viz obr. 3) jsou velké 14  $\mu\text{m}$  a vykazují pozitivní reakci na alkalickou fosfatázu, mají aktivní *vasa* gen a produkují růstové faktory jako například Oct4, který patří mezi klíčové faktory při zachování kmenovosti buněk. Dále byla pomocí metody RT PCR v TSC zjištěna exprese významných markerů kmenových buněk, jako např. *klf4*, *sox2*, *oct25*, *scf* a *lif*.

Marker	Místo exprese	Buněčný typ exprimující daný marker
Oct4	Jádro	ESCs (vysoká exprese) nediferencované SSC (snížená exprese)
c-kit	Cytoplazmatická membrána	ESCs, PGCs, neonatální TSCs, diferencované SSC
Thy1	Cytoplazmatická membrána	TSCs
$\alpha 6$ -integrin	Cytoplazmatická membrána	Nediferencované SSC, ESCs
$\beta 1$ -integrin	Cytoplazmatická membrána	Nediferencované SSC
CD9	Cytoplazmatická membrána	SSC, ESC
MHC-I	Cytoplazmatická membrána	Jaderné buňky kromě TSCs a ESCs
GFR $\alpha 1$	Cytoplazmatická membrána	Typ A spermatogónií
c-ret	Transmembránový	TSCs
Daz(1)	Jádro	ESCs, PGCs, SSCs
Plzf	Jádro	TSCs
Stra8	Cytoplazma	Premeiotické germinální buňky
TAF4b	Jádro	SSC

Tab.1. Významné markery exprimované v TSCs (testikulární kmenové buňky), resp. SSC (spermatogoniální kmenové buňky) a ESCs (embryonální kmenové buňky). Převzato a upraveno podle Tournaye a Goossens, 2006.



Obr. 3. TSCs z varlat *X. tropicalis* nabarvené vitální barvičkou PKH 26.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Živý materiál

##### 4.1.1.1 Pokusná zvířata

V této práci jsem k pokusům používala jedince druhu *Xenopus tropicalis*, kteří jsou chováni na PřF UK. V experimentech jsem využívala kmene Nosek PřF UK, Ivory Coast (inbrední kmen) a Nigerian Strain (outbrední kmen). Kmen Nosek PřF UK je kmen, který byl vyšlechtěn na Fakultě. Jedinci z kmene Ivory Coast i Nigerian Strain byli získáni od European Xenopus Resource Centre (Portsmouth). Pro účely transgeneze byli primárně používáni jedinci kmene Ivory Coast a Nigerian Strain a pro účely transplantace TSC byli primárně používáni jedinci kmene Nosek PřF UK.

V místních chovech je teplota místnosti udržována okolo 26°C. Žáby jsou chovány ve velkých plastových kádích po 60-80 kusech. Voda pro chov je používána kohoutková s přidavkem mořské soli (25 g na 100 l vody). Pro chov

pulců a juvenilních žab jsou používány kádě o menších rozměrech. Krmení žab i pulců a čištění kádí probíhá každý všední den.

#### 4.1.1.2 Bakterie

- ❖ TOP 10 One Shot® Chemically Competent *E. coli* C404010 (Invitrogen)

#### 4.1.1.3 TSC

- ❖ Kmenové buňky pocházejí z izolovaných desintegrovaných varlat juvenilních samců *X. tropicalis*, kultura založená na PřF UK, v laboratoři vývojové biologie.

### 4.1.2 Neživý materiál

#### 4.1.2.1 Plazmidy

- ❖ pTurboFP653-C FP721 (Evrogen)
- ❖ pCAGGS plazmidová sbírka (CDB, Riken)
- ❖ ISpBS2SK+TurboFPGAL4FF, plazmidová sbírka L. Zimmermana, (NIMR)

#### 4.1.2.2 Primery

- ❖ KATUSBAM\_F (IDT)
- ❖ KATUSXBA\_R (IDT)

Sekvence primerů viz tab. 2.

Primer	Sekvence
KATUSBAM_F	5' - TTGGATCCACCATGGTGGGTGAGGATA - 3'
KATUSXBA_R	5' - AATCTAGATTAAGATCTGAGTCCGGAGCTGT - 3'

Tab. 2. Sekvence primerů KATUSBAM\_F a KATUSXBA\_R.

#### 4.1.2.3 Chemikálie

- ❖ 38% Formaldehyd 30251 (Lach-Ner)
- ❖ 6X DNA Loading Dye R0611 (Fermentas)
- ❖ Agaróza 50004 (Lonza)
- ❖ Benzen10720-11000 (Penta)
- ❖ Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)
- ❖ DAPI DES1000L (Intimex)
- ❖ Etanol absolutní 71250-11000 (Penta)
- ❖ Ficoll F4375 (Sigma-Aldrich)
- ❖ MS222 A5040 (Sigma-Aldrich)
- ❖ Parafín Paraplast Plus 502004 (McCormick Scientific)
- ❖ PKH26 PKH26GL (Sigma Aldrich)
- ❖ Sacharóza 84100G1000(Penta)
- ❖ Želatina 1040781000 (Emprove)

#### 4.1.2.4 Roztoky

##### 4.1.2.4.1 Roztoky pro konstrukci plazmidu

- ❖ 1% Agaróza v TBE
- ❖ BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM (Sigma Aldrich)
- ❖ 5×TBE (Tris-borate-EDTA pufr): 200mM Tris; 10 MM EDTA; 450 mM  $H_3BO_3$

##### 4.1.2.4.2 Roztoky pro IVF

- ❖ 20×MMR: 2M NaCl; 40mM KCl; 20mM  $MgCl_2$ ; 40mM  $CaCl_2$ ; 100 mM HEPES; deionizovaná  $H_2O$ ; pH upraveno na 7,7-7,8
- ❖ 0,05×MMR: 2,5 ml 20×MMR; doplněno deionizovanou  $H_2O$  do 1000 ml; pH 7,7-7,8
- ❖ 0,05×MMR + Gentamycin: 2,5 ml 20×MMR; doplněno deionizovanou  $H_2O$  do 1000 ml; 1 ml Gentamycinu; pH 7,7-7,8

- ❖ 1×MMR + Gentamycin: 5 ml 20×MMR; doplněno deionizovanou H<sub>2</sub>O do 100 ml; 100μl Gentamycinu; pH 7,7-7,8
- ❖ 2,2% roztok cysteinu: 0,5 ml 20×MMR; doplněno deionizovanou H<sub>2</sub>O do 100 ml; 2,2 g L-cysteinu; pH 7,7-7,8
- ❖ 1% roztok agarózy v 0,05×MMR

#### **4.1.2.4.3 Roztoky pro transplantaci a transgenezi**

- ❖ Ficoll: 0,5 ml 20×MMR, 0,1 ml Gentamycinu; 6g Ficoll; doplněno deionizovanou H<sub>2</sub>O do 100 ml; pH 7,7-7,8
- ❖ 0,2% MS-222, uspávací roztok: 0,2 g MS-222; 0,2 g NaHCO<sub>3</sub>; 100 ml destilované H<sub>2</sub>O
- ❖ 0,4% MS-222, usmrcovací roztok: 2 g MS-222; 2 g NaHCO<sub>3</sub>; 500 ml destilované H<sub>2</sub>O

#### **4.1.2.4.4 Roztoky pro fixaci, prosycení a následnou kryopreservaci pliců**

- ❖ PBS (phosphate buffered saline): 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,35
- ❖ 2/3 PBS: 2 díly PBS: 1 díl H<sub>2</sub>O
- ❖ 3,8% formaldehyd v 2/3 PBS: 40 ml formaldehydu; 26 ml 10×PBS; 333 ml destilované vody
- ❖ 4% sacharóza v 2/3 PBS
- ❖ 7,5% sacharóza v 2/3 PBS
- ❖ 15% sacharóza v 2/3 PBS
- ❖ 7,5% želatina v 15% sacharóze
- ❖ 15% želatina v 15% sacharóze
- ❖ 20% želatina v 15% sacharóze
- ❖ 30% sacharóza ve 2/3 PBS
- ❖ 30% sacharóza v H<sub>2</sub>O

#### **4.1.2.4.5 Další roztoky**

- ❖ Benzparafín: 1 díl parafínu ku třem dílům benzenu

- ❖ Deželatinizující roztok: 3% želatina v 38% etanolu (vodný roztok)
- ❖ DMSO 41640 (Sigma-Aldrich)
- ❖ Triton X-100 36324N (BDH)

#### **4.1.2.5 Kity**

- ❖ DNA Dephos and Ligation kit (Roche)
- ❖ Fast DNA End Repair kit (Fermentas)
- ❖ GeneJET Gel extraction kit (Fermentas)
- ❖ GeneJET PCR Purification kit (Fermentas)
- ❖ NuclioBond Xtra Maxi kit (Machery Nagel)
- ❖ PureYield Plazmid Miniprep (Promega)

#### **4.1.2.6 Antibiotika**

- ❖ Ampicilin sodium salt 0339 (Amresco)
- ❖ Gentamycin - Gentaveto - 5 (V.M.D.)

#### **4.1.2.7 Hormony**

- ❖ Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)

#### **4.1.2.8 Média a séra**

- ❖ FBS (Fetal Bovine Serum) 10270-106 (Life Technologies)
- ❖ L15 Leibovitz L5520 (Sigma-Aldrich)
- ❖ Médium s LIF faktorem: L-15 Leibovitz (Sigma- Aldrich) 33,3%, RPMI 1640 HEPES mod. (Sigma- Aldrich) 33,3%, FBS (Sigma-Aldrich), L- glutamin (200 mM) (Sigma- Aldrich) 0,66%, 7,5% NaHCO<sub>3</sub> (Sigma- Aldrich) 0,13%, Na pyruvát (100 mM) (Sigma- Aldrich) 0,66%, β- merkaptoetanol (50 mM) (Sigma- Aldrich) 0,3%, myší LIF (Merck 10<sup>7</sup>U/ml) 0,01%, gentamycin (50 mg/ml) (Veter. Lek.) 0,05%, deionizovaná H<sub>2</sub>O 16,59%

#### 4.1.2.9 Restrikční endonukleázy a jejich pufrů

Restrikční endonukleázy a pufrů Fermentas viz tab. 3.

<b>Restrikční endonukleáza</b>	<b>Pufr</b>
BamHI	BamHI pufr
EcoRI	EcoRIpufr
NcoI	Tango yellow
SacI	SacI pufr
SalI	Orange
SmaI	Tango yellow
XbaI	Tango yellow

Tab. 3. Použité restrikční endonukleázy a jejich pufrů značky Fermentas a jejich pufrů.

Restrikční endonukleázy a pufrů BioLabs viz tab. 4.

<b>Restrikční endonukleáza</b>	<b>Pufr</b>
BsaXI	CutSmart™ Buffer
I-SceI	CutSmart™ Buffer

Tab. 4. Použité restrikční endonukleázy a jejich pufrů značky BioLabs.

#### 4.1.2.10 Polymerázy a jejich pufrů od TopBio

- ❖ LA polymeráza L072 LA DNA Polymerases Mix (TopBio)
- ❖ LA pufr L072 LA DNA Polymerases Mix (TopBio)

#### 4.1.2.11 Další materiál

- ❖ Adhezivní skla Polysine Adhesion Slides 10143265 (Thermo scientific)
- ❖ dNTP R0192 (Fermentas)
- ❖ Objektívový mikrometr (Meopta)
- ❖ O.C.T.™Compound 4583 (Tissue-Tek)®
- ❖ Polysciences destička 23258-1 (Polysciences)
- ❖ Zamrazovací bločky Cryomold Biopsy 4565 (Tissue-Tek®)

#### 4.1.2.12 Přístroje

- ❖ Binolupa Stemi 2000 (Zeiss)
- ❖ Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- ❖ Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)
- ❖ Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen)
- ❖ Cycler PTC-100 (MJ Research)
- ❖ Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)
- ❖ Fluorescenční binolupa Olympus SZX16 (Olympus Optical)
- ❖ Fluorescenční mikroskop Olympus BX40 (Olympus Optical)
- ❖ Kryostat CM3050 S (Leica)
- ❖ Mikroinjektor IM 300 (Narisige)
- ❖ Mikrotom HM 310 (Microm)
- ❖ Nahřívací ploténka VD-1 (Vezas)
- ❖ NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop)
- ❖ Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette (Techne)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Konstrukce plazmidového vektoru

#### 4.2.1.1 PCR amplifikace Katushka RFP

Templátem pro PCR amplifikaci sekvence Katushka RFP byl komerčně dostupný plazmidový vektor TurboFP635-C (Evrogen) (viz obr. 5). Pipetáž pro PCR reakci byla následující (viz tab. 5), celkem byly připraveny tři reakce po 50  $\mu$ l.

LA pufr (10 $\times$ )	5,0 $\mu$ l
DMSO	1,0 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2,5 $\mu$ l
forward primer - KATUSBAM_F (25 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ l
reverse primer - KATUSXBA_R (25 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ L
pTurboFP635-C (1 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ L
LA polymerase mix	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	36 $\mu$ l

Tab. 5. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci Katushka RFP genu.

Časy pro amplifikační reakci v cyklu byly zvoleny podle tabulky:

94 °C	1 minuta	
94 °C	30 sekund	
60 °C	1 minuta	} 30×
68 °C	1 minutu	
68 °C	5 minut	

Tab. 6. Časy pro amplifikační reakci v cyklu.

Produkty byly spojeny do jedné zkumavky do objemu 150  $\mu$ l. K amplifikátu bylo přidáno 25  $\mu$ l 6 $\times$  Krystal violet buffer. Amplifikát byl elektroforeticky přečištěn na 1% agarózovém gelu a plazmidová DNA byla následně extrahována pomocí kolonky Gel extraction kitu (Fermentas). Délka přečištěného PCR amplifikátu byla zkontrolována pomocí elektroforézy s 1% agarózovým gelem. Ke vzorku byla před nanesením do gelu přidána 1/6 objemu 6 $\times$  Loading Dye (Fermentas).

#### 4.2.1.2 Restrikční reakce

Restrikční reakce byly standardně připraveny tak, aby obsahovaly 5 U příslušné restrikční endonukleázy na 1  $\mu$ g plazmidové DNA a objem 10 $\times$ pufru činil 1/10 reakce, zbylý objem tvořila voda pro injekce. Restrikční reakce byly inkubovány 1,5 hodiny při 37°C ve vodní lázni. Pro přečištění restrikce byla používána kolonka GeneJET PCR Purification kit (Fermentas) podle instrukcí výrobce. Elektroforetická analýza byla provedena na 1% agaróze.

#### 4.2.1.3 Zatupení konců plazmidového vektoru a inseru

Zatupení konců bylo provedeno s využitím Fast DNA End Repair kitu (Fermentas) podle instrukcí výrobce. Zatupený vektor pCAGGS i insert, gen pro Katushka RFP, byly přečištěny na 1% agaróze s krystal violet pomocí kolonek GeneJET Gel extraction kitu (Fermentas) podle instrukcí výrobce.

Výsledné reakce byly posléze přečištěny pomocí kolonky GeneJET PCR purification kitu (Fermentas) podle instrukcí výrobce.

Po zatupení a přečištění byla prováděna elektroforetická analýza plazmidového vektoru a insertu.

#### **4.2.1.4 Defosforylace plazmidového vektoru**

Defosforylace přečištěného vektoru byla provedena pomocí Rapid DNA Dephos and Ligation kitu (Roche). Reakce byla inkubována 10 min při 37°C, inaktivace enzymu probíhala při 75°C po dobu 2 minut.

#### **4.2.1.5 Ligace**

Pro ligaci insertu do vektoru byl použit Rapid Dephos and Ligation kit (Roche), při ligaci bylo postupováno dle instrukcí výrobce. Následně byla provedena transformace TOP10 bakterií ligační směsí. Bakterie byly vysety na agarové misky s ampicilinem (Amp).

#### **4.2.1.6 Transformace bakterií plazmidovou DNA**

Transformace One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) bakterií byla prováděna ligační směsí vytvořeného plazmidového vektoru. Bakterie byly vysety na agarové misky s Amp a byly inkubovány v termostatu při 37 °C. Další den bylo vybráno 14 kolonií a byla provedena inokulace 3 ml tryptosofosfátového tekutého média bakteriemi z kolonií.

#### **4.2.1.7 Izolace plazmidového vektoru z bakteriální kultury**

Pro bakteriální amplifikaci všech vektorů byly používány bakterie One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen).

##### **4.2.1.7.1 Izolace plazmidové DNA z velkého objemu bakteriální kultury**

Izolace plazmidové DNA byla provedena z 300 ml bakteriální kultury pomocí NucleoBondXtra Maxi kitu (MacheryNagel) dle instrukcí výrobce. K elučnímu objemu 15 ml v 50 ml kónické zkumavce bylo přidáno 10,5 ml

isopropanolu a po krátkém zamíchání následovala 30-ti minutová centrifugace při 10.000 g.

. Supernatant byl slit a bylo a přidáno 5 ml 70% etanolu. Následná centrifugace probíhala při 10.000 g 5 minut. Supernatant byl slit a peleta byla ponechána sušit 10 min. Následně byla peleta resuspendována v 500  $\mu$ l EB pufru (z kitu gel extraction kit, Fermentas). Stanovení koncentrace plazmidové DNA bylo provedeno na přístroji Nanodrop při vlnové délce 260 nm.

#### **4.2.1.7.2 Izolace plazmidové DNA pro sekvenační a restriční analýzy**

Pro izolace menších množství plazmidové DNA určené pro restriční či sekvenační analýzy byl použit PureYield Plazmid Miniprep kit. Z 3 ml CAGGS-Katushka kultury bylo odebráno 1000  $\mu$ l, bakterie byly centrifugovány, médium slito a bakterie resuspendovány v 600  $\mu$ l vody. Z 3 ml ISpBS2SK-CAG-Katushka kultury bylo odebráno 1500  $\mu$ l, bakterie byly centrifugovány, médium slito a bakterie resuspendovány v 600  $\mu$ l vody, vlastní izolace byla provedena podle návodu výrobce.

Eluční objem činil 30  $\mu$ l. Stanovení koncentrace plazmidové DNA bylo provedeno na přístroji Nanodrop při vlnové délce 260 nm

#### **4.2.1.8 Sekvence vektoru**

Vzorky určené pro sekvenaci plazmidové DNA byly připraveny dle instrukcí Laboratoře sekvenace DNA (PřF UK).

#### **4.2.2 IVF**

1 $\times$ MMR s Gentamycinem se díky své vysoké iontové síle používá v rámci IVF k inhibici aktivace oplozených oocytů. 0,05 $\times$ MMR se používá po nanesení spermií na oocyty pro vlastní oplození. 2% cystein je používán pro odstranění želatinózního obalu vyvíjejících se embryí.

1-3 dny před experimentem byly připraveny roztoky 0,05 $\times$ MMR, 1 $\times$ MMR s Gentamycinem a 0,05 $\times$ MMR s Gentamycinem. 0,05 $\times$ MMR byl použit k přípravě 1% roztoku agarózy, kterým se následně vylévaly Petriho misky. Zpravidla večer

před IVF bylo školitelem dvěma samicím *X. tropicalis* aplikováno 15 U hCG (Sigma-Aldrich), dalších 150 U bylo aplikováno ráno v den pokusu.

Krátce před IVF (1-2 hodiny) byl namíchan 2,2 % roztok cysteinu. Poté, co samice začaly snášet vajíčka (zpravidla 4-5 hodin po aplikaci druhé dávky hCG) byl školitelem usmrcen samec v 0,4% roztoku MS-222 a byla jím vyjmuta varlata a vložena do misky s médiem L15 (Sigma-Aldrich) s 10% FBS (Sigma-Aldrich). Do 9cm Petriho misky bylo vneseno pomocí pasterky malé množství 1×MMR s Gentamycin a do této kapky byly vykladeny obě samice. Varle bylo homogenizováno v 500  $\mu$ l média L15 s 10% FBS. Výsledný homogenát byl nanesen na oocyty rozprostřené v jedné vrstvě. Po krátké době docházelo k navázání spermií na povrch oocytu. Po dvou minutách bylo do misky nalito 0,05×MMR (čas 0), jehož doba působení byla 10 minut. Po odstranění MMR byl na 5 minut k oplozeným vajíčkům přidán 2,2 % roztok cysteinu. Následně byla vajíčka přenesena na misku vylitou agarózou s 0,05×MMR s Gentamycinem, kde byla provedena selekce kvalitních a životaschopných zygot (přítomnost tmavší oblasti po vniku spermie, velikost 0,9 - 1,0 mm, rovnoměrně zbarvená cytoplazma s jasně vizuálně oddělenou animální a vegetativní polovinou). Vyselektované zygoty byly dále použity v rámci transgenních a transplantačních experimentů.

### 4.2.3 Transgeneze

Transgeneze se využívá k tvorbě geneticky modifikovaných organismů. Principem je přenesení cizorodého genu do zkoumaného organismu. Součástí vektorů jsou často reportérové geny (GFP, RFP atp.). Agens nesoucí cizorodý gen bývá vir nebo plazmid. Při zabudování vneseného genu do germinální linie recipienta je možné po dalších kříženích získat jedince, kteří exprimují daný gen ve všech buňkách svého těla. Takové buňky, stabilně exprimující žádaný gen, se pak mohou používat pro transplantační experimenty.

Pro vnesení plazmidové DNA nesoucí gen pro Katushka RFP do genomu recipienta byla používána I-SceI meganukleáza.

Před IVF byla namíchána reakce námi vytvořeného plazmidového vektoru s I-SceI meganukleázou. Zásobní plazmidová DNA o koncentraci 1987 ng/ $\mu$ l byla 20× zředěna do vody pro injekce. Do 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bylo přidáno 4  $\mu$ l ředěné plazmidové DNA, 2  $\mu$ l I-SceI pufru a 2  $\mu$ l I-SceI meganukleázy. Reakce byla

přenesena do vodní lázně, kde probíhala při 37°C po dobu 45 minut. Po doběhnutí časového limitu byla mikrozkumavka s reakcí vyjmuta z lázně a ihned umístěna na led. Po upravení požadovaného průměru skleněné kapiláry bylo 5 µl reakční směsi umístěno na parafilm a roztok byl aspirován do kapiláry pomocí mikroinjektoru. Injekční tlak činil cca 8,5 psi. Objem vpravované směsi byl upraven na objektivovém mikrometru v kapce parafínového oleje tak, aby byly do zygot vnášeny 4 nl reakční směsi (40pg plazmidové DNA).

Následná mikroinjekce byla prováděna v roztoku ficollu. Kapilára penetrovala zygotu na animální straně v úhlu mezi 30° - 50° a reakční směs byla vpravena lehce pod povrch jednobuněčného embrya. Po transgenezi byla embrya přenesena na misku vylitou agarózou s 0,05×MMR s Gentamycinem a ponechána k dalšímu vývoji.

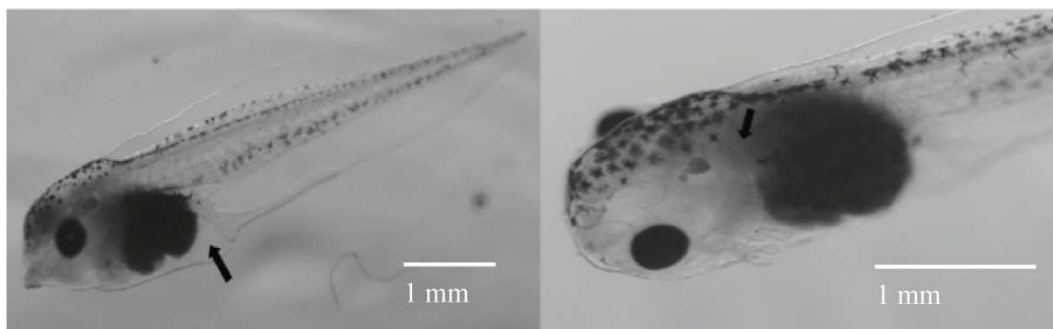
#### **4.2.4 Transplantace TSC**

Transplantace byla prováděna obdobným způsobem jako transgeneze za využití mikroinjektoru (viz kapitola 4.2.3). Transplantace probíhala v miskách vylitých agarózou s roztokem 0,05×MMR. Místo plazmidu však byly do embrya vpravovány TSC buňky označené vitální barvičkou PKH26. Tato barvička se váže do membrány buněk a po určité době se vyředí (v tomto případě by v ideálních podmínkách měla být fluorescence patrná až 100 dní). Omezená doba fluorescence je nevýhoda oproti buňkám stabilně exprimujícím reportérový protein. Kvůli lepší charakterizaci nabarvených TSCs byla změřena jejich viabilita 10 minut po vyjmutí z termostatu.

Transplantace byla prováděna do několika vývojových stádií, a to do stádia blastuly, stádia 41 a stádia 46. Koncentrace buněk vpravovaných do embrya byla volena podle vývojového stádia embrya a podle místa, kam byly buňky mikroinjikovány. Buňky byly ředěny v médiu s LIF faktorem.

Do blastul byly buňky vpravovány do blastocoelu, a to v počtu cca 100 buněk. Do ventrálního peritonea (viz Obr 4.) pulce stádia 46 bylo mikroinjikováno také 100 buněk. Z objemových důvodů byla transplantace většího počtu buněk prováděna pouze do dorzálního peritonea (viz Obr 4.). Ventrální část peritonea i blastula jsou pro tak velké počty injikovaných buněk příliš malé. Do dorzálního peritonea pulců stádia 41 bylo injikováno 100, 250, 500 a 1000 značených buněk.

Pro snadnou manipulaci s pulci bylo do 0,05×MMR přidáno několik kapek uspávacího roztoku MS-222.



Obr. 4. Vlevo: pulec, stádium 46, šipka označuje místo vpichu do oblasti ventrálního peritonea. Vpravo: Pulec, stádium 46, šipka označuje místo vpichu do oblasti dorzálního peritonea.

#### 4.2.5 Analýza transgenních a transplantovaných embryí *X. tropicalis*

Analýza pulců *in-vivo* nebo následných řezových preparátů byla prováděna pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX40 (Olympus Optical) a fluorescenční binolupy Olympus SZX16 (Olympus Optical). K živým pulcům se pro účely analýzy přidávalo několik kapek roztoku MS-222.

#### 4.2.6 Příprava řezových preparátů

Pro přípravu všech typů preparátů byly blastuly a pulci ve stádiu 41, stádiu 46, i starší nejdříve umístěni přes noc do 3,8% formaldehydu v 2/3 PBS.

##### 4.2.6.1 Preparáty pro kryosekci

Metoda kryosekce se používá pro řezání vzorků bez použití parafínu. Kvalita řezů je zpravidla nižší, než u parafínových, ale díky tomu, že vzorek není prosycován alkoholovou řadou, je tato metoda vhodná při technikách využívajících vitální barvení barvičkou PKH26.

Princip je založen na řezání tkání či celého embrya při teplotě pod bodem mrazu (zpravidla mezi  $-15^{\circ}\text{C}$  až  $-25^{\circ}\text{C}$ ). Kryostat je vybaven chlazenou komorou, nožem a ploténkami, na které se upevňuje vzorek pomocí O.C.T.. Pro různé tkáně

je možné zvolit variabilní teplotu chlazené komory i objektu samotného a různou tloušťku řezu.

#### **4.2.6.1.1 Materiál zaléváný a mražený v O.C.T.**

O.C.T. je speciální médium gelového charakteru, které obsahuje ve vodě rozpustné glykoly a pryskyřice. Poskytuje vhodnou oporu pro řezání vzorků při teplotách nižších, než  $-10^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.2.6.1.1.1 Preparáty neprosycené sacharózou**

Tato metoda byla používána hlavně v počátečních stádiích mé diplomové práce a později pouze pro vytvoření preparátů sloužících k další vazbě RNA sond.

Pulci byli ráno vyjmuti z formaldehydu a následně přeneseni na hodinu do 0,1% Tritonu ve 2/3 PBS a poté promývání 1 hodinu v 2/3 PBS. Pak byli pulci přeneseni do bločků TissueTek a umístěni do mrazáku  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Pro vytvoření preparátů, které mají být určeny pro aplikaci RNA sond na řezu, byli pulci po vyjmutí z formaldehydu promývání 15 minut v 2/3 PBS. Poté byli pulci přeneseni do bločků TissueTek a umístěni do mrazáku  $-70^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.2.6.1.1.2 Preparáty prosycené sacharózou**

Sacharóza se využívá jako kryoprotektant zabraňující tvorbě krystalů při mrznutí tkání. Ponoření celého embrya do sacharózy umožní proniknutí roztoku do organismu a při následném řezání zaručí lepší kompaktnost řezů.

Pulci byli umístěni do 40 ml 2/3 PBS, kde byli promývání 1 hodinu při pokojové teplotě. Pulci byli přeneseni do 40 ml 4% sacharózy v 2/3 PBS, v tomto roztoku byli 3×15 minut promyti. Následně byli pulci přeneseni do 30% sacharózy v PBS, kde byli ponecháni přes noc v chladničce. Po vyjmutí z chladničky byli pulci 3×15 minut promyti v 40 ml 30% roztoku sacharózy v destilované vodě. Pulci byli následně osušeni papírovým kapesníčkem a umístěni do 1 ml roztoku 30% sacharózy ve vodě/OCT (1:1). Takto byli pulci inkubováni 2 hodiny při pokojové teplotě, pak vyjmuti z roztoku a na hladké desce převrstvení OCT, vyjmuti, vloženi

a napolohování v zamrazovacích bločcích TissueTek s čerstvým OCT a zamrazení v mrazáku při  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.6.1.2 Preparáty zalévané do želatiny**

Tuto metodu jsme začali používat pro lepší soudržnost řezů. Želatina lépe vyplní dutiny embrya a řezy pak nejsou tolik potřhané jako při zamražení v O.C.T..

Pulci byli  $2 \times 5$  minut promyti v  $2/3$  PBS. Následně byli přemístěni do 7,5% sacharózy v  $2/3$  PBS do chladničky na 2,5 h. Poté byli přeneseni do 15% sacharózy v  $2/3$  PBS do chladničky na 2,5 h. Po vyjmutí z chladničky byli přeneseni do 7,5% želatiny v 15% sacharóze, kde byli inkubováni ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) přes noc. Další den byli pulci přeneseni do 15% želatiny v 15% sacharóze, kde byli inkubováni ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) přes noc. Následující den byli pulci přeneseni do 20% želatiny v 15% sacharóze, kde byli inkubováni ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) přes noc. Pulci byli přeneseni a napolohováni v želatině v Polysciences destičce a následně zamrazení v  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.6.2 Kryosekce**

Teplota chladicí komory byla volena zpravidla kolem  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bločky se zamraženým embryem byly nejdříve ořezány nožem od přebytečné výplně tak, aby vlastní embryo vyplňovalo co největší plochu řezu. Zmrzlý vzorek byl upevněn na chlazenou ploténku pomocí O.C.T., ponechán zatuhnout a následně nařezán. Řezy byly umístěny na speciální podložní sklo s adhezivní úpravou (Thermo scientific). Síla řezů byla variabilní, a to  $8\text{-}30\mu\text{m}$ , v závislosti na typu řezaného objektu i typu prosycení. Blastuly byly řezány na  $25\text{-}30\mu\text{m}$ , pulci mražení do O.C.T. na  $12\text{-}16\mu\text{m}$  a pulci zamražení do želatiny na  $10\text{-}14\mu\text{m}$ . Nařezané vzorky byly umístěny do mrazáku o  $-20^{\circ}\text{C}$  (O.C.T. řezy) nebo do chladničky (želatinové řezy).

##### **4.2.6.2.1 Deželatinizace**

Tato metoda se používá pro odstranění želatiny z již nařezaných preparátů.

Byl připraven deželatinizující roztok, který byl následně ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) rozehřát. Sklíčka se vzorky byla též nahřata na nahřívací ploténce ( $37^{\circ}\text{C}$ ) a

následně ponořena do teplého deželatinizujícího roztoku. Poté byla sklíčka omyta v destilované vodě a usušena na nahřívací ploténce.

#### **4.2.6.3 Preparáty zalévané do parafínu**

Klasickou metodou užívanou pro vytvoření preparátu pro řezání je zalévání tkáně nebo celého organismu do parafínu.

Po vyjmutí pulců (blastul) z formaldehydu byli asi 1 hodinu promýváni ve vodovodní vodě (voda byla šestkrát měněna). Následovalo jejich odvodnění ve vzestupné řadě etanolu (30, 50 a 80%), vždy 3×5 minut v každé koncentraci. V 100% etanolu byli pulci (blastuly) ponecháni pouze 1×5 minut. Následně byli pulci (blastuly) přeneseni do benzenu na 2×10 minut (v případě blastul pouze 2×5 minut). Následně byly vzorky přeneseny do benzparafínu a umístěny do termostatu, kde byly ponechány po dobu 20 minut. Po těchto 20 minutách byly vzorky přeneseny do parafínu a opět dány do termostatu na 1 hodinu, pak do čerstvého parafínu ve formičce a napoložovány. Další den byly vzorky vyklopeny z formičky a vyříznuty. Takové vzorky byly připravené pro řezání na mikrotomu.

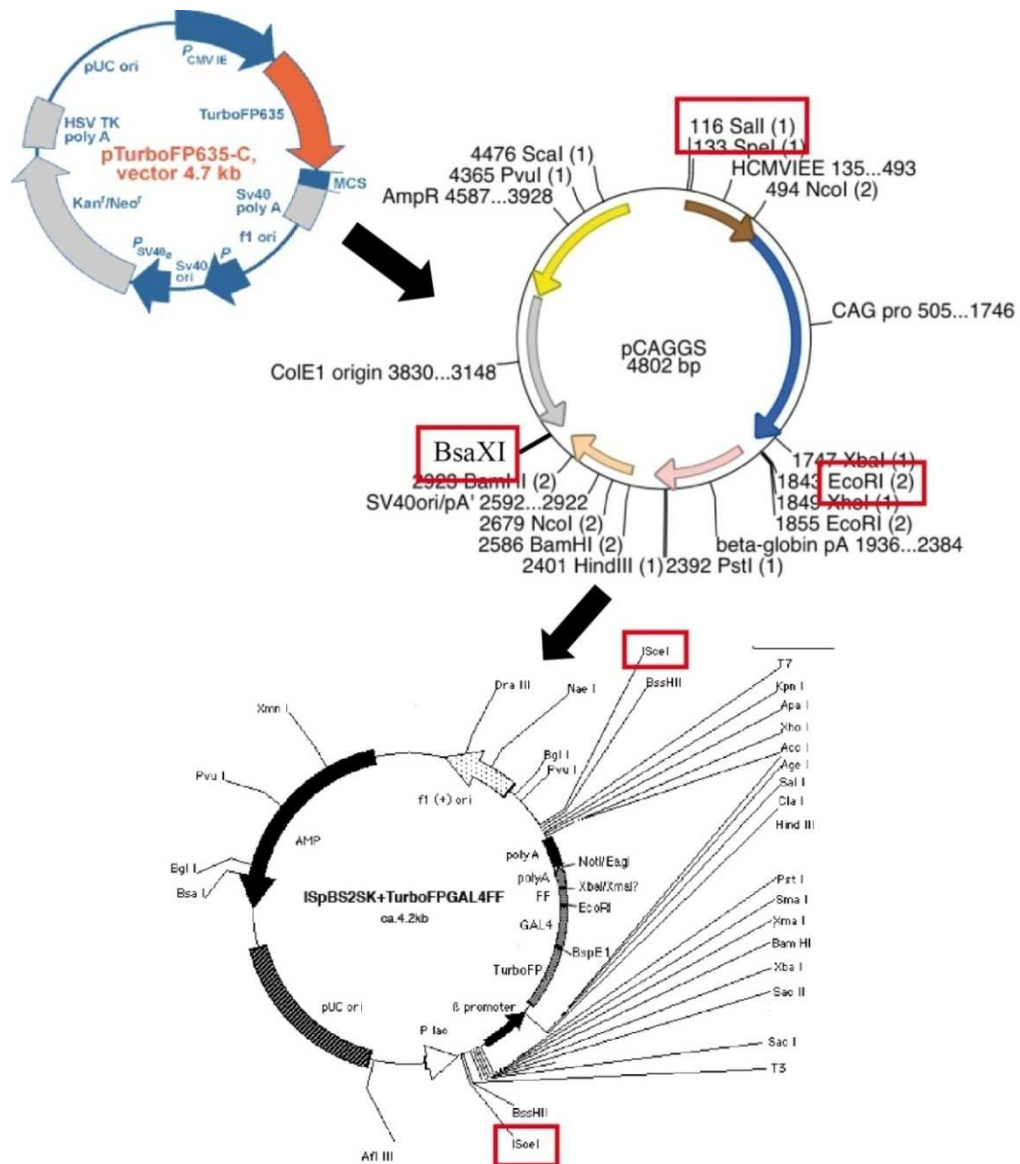
#### **4.2.6.4 Řezání na mikrotomu**

Parafínové bločky byly nejdříve ořezány nožem od přebytečného parafínu tak, aby embryo vyplňovalo co největší plochu řezu. Následně byl bloček upevněn na mikrotom a řezán na tloušťku 6-10  $\mu\text{m}$ . Po přenesení řezů na sklo byla na řezy aplikována destilovaná voda, díky které se řezy napnuly. Poté byla skla ponechána na vyhřívání ploténce do dalšího dne.

## 5 Výsledky

### 5.1 Konstrukce plazmidu

Finální plazmid ISpBS2SK-CAG-Katushka byl zkonstruován podle následujícího schématu:



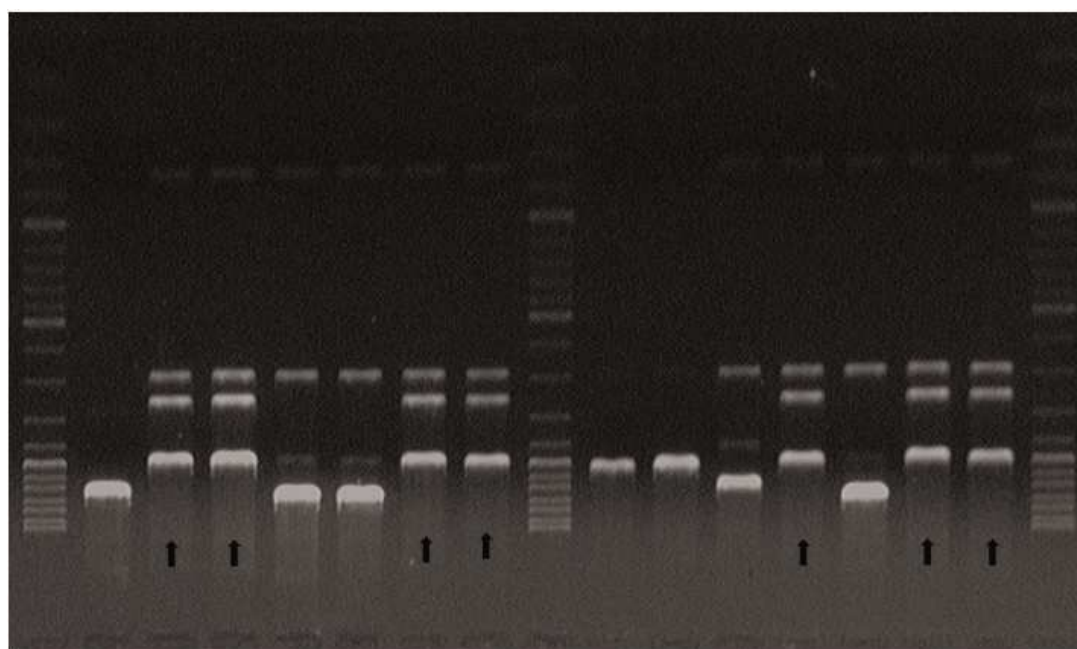
Obr. 5. Schéma konstrukce plazmidového vektoru. pTurboFP635-C vektor byl použit pro PCR amplifikaci Katushka RFP. Amplifikát byl vložen za CAG promotor vektoru pCAGGS a výsledná kazeta CAG-Katushka RFP pak byla vyjmuta a vložena do finálního vektoru ISpBS2SK mezi dvě I-SceI místa. Červeně jsou vyznačena důležitá restrikční místa. U pCAGGS vektoru jsou vyznačená místa Sall, BsaXI a EcoRI (otevření plazmidu pro vložení Katushka RFP), u ISpBS2SK vektoru jsou označeny I-SceI místa.

Pro PCR amplifikaci genu pro Katushka RFP byl použit pTurboFP635-C a k tomu odpovídající primery KATUSBAM\_F a KATUSXBA\_R.

Kvůli ověření správnosti sekvence získaného vektoru pCAGGS byla provedena restrikční analýza, a to restrikčními endonukleázami SallI, BsaXI a EcoRI – pro otevření vektoru a restrikční endonukleázou NcoI pro analýzu správné orientace vektoru. Pro otevření plazmidu pCAGGS za účelem vložení genu pro Katushka RFP byla použita EcoRI. Následným zatupením, defosforylací a ligací byl vytvořen plazmid obsahující CAG promotor a gen pro Katushka RFP. Restrikční analýza CAGGS-Katushka byla provedena SallI a BamHI enzymy.

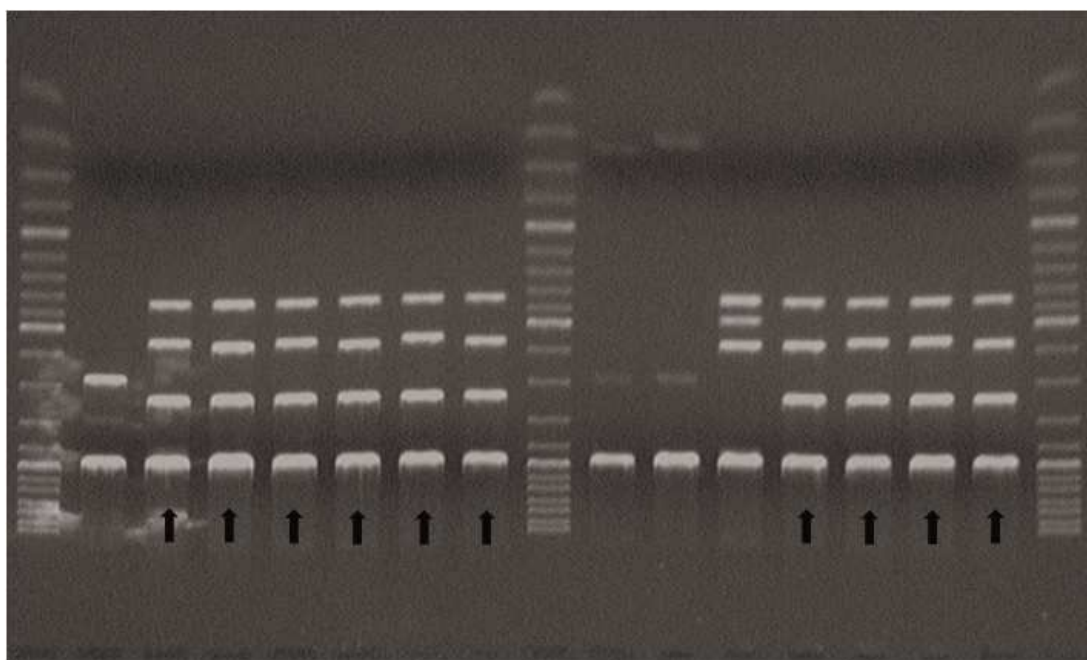
Otevření vektoru ISpBS2SK bylo provedeno SmaI restrikční endonukleázou. Pro vyštěpení kazety CAG-Katushka byly použity enzymy BsaXI a SallI. Ligací CAG-Katushka do otevřeného vektoru ISpBS2SK byl získán plazmid obsahující náš konstrukt mezi dvěma I-SceI místy.

Restrikční analýza pomocí BamHI měla potvrdit správnou orientaci kazety CAG-Katushka RFP v rámci finálního vektoru ISpBS2SK-CAG-Katushka, a to při získání úseků o délce 834, 1130, 1651 a 2980 bp. Elektroforetická analýza ukázala, že správnou orientaci vykazují vzorky číslo 2,3,6,7, 11, 13 a 14 (viz obr. 6).



M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 M  
Obr. 6. Výsledky restrikční analýzy BamHI. M - marker, 1-14 - vzorky. Černé šipky označují klony se správnou orientací insertu.

Restrikční analýza pomocí XbaI měla potvrdit správnou orientaci finální kazety CAG-Katushka RFP v rámci finálního vektoru ISpBS2SK-CAG-Katushka, a to získáním úseků o délce 834, 1130, 1651 a 2980 bp. Elektroforetická analýza ukázala, že úseky o správné velikosti byly vyštěpeny u vzorku 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14 (viz obr. 7).



Obr. 7. Výsledky restrikční analýzy štěpení restriktázou XbaI. M – marker, 1-14 – vzorky. Černé šipky ukazují správnou velikost vyštěpeného insertu.

Ze získaných dat bylo zřejmé, že správnou orientaci a velikost vykazují vzorky 2, 3, 6, 7, 11, 13 a 14.

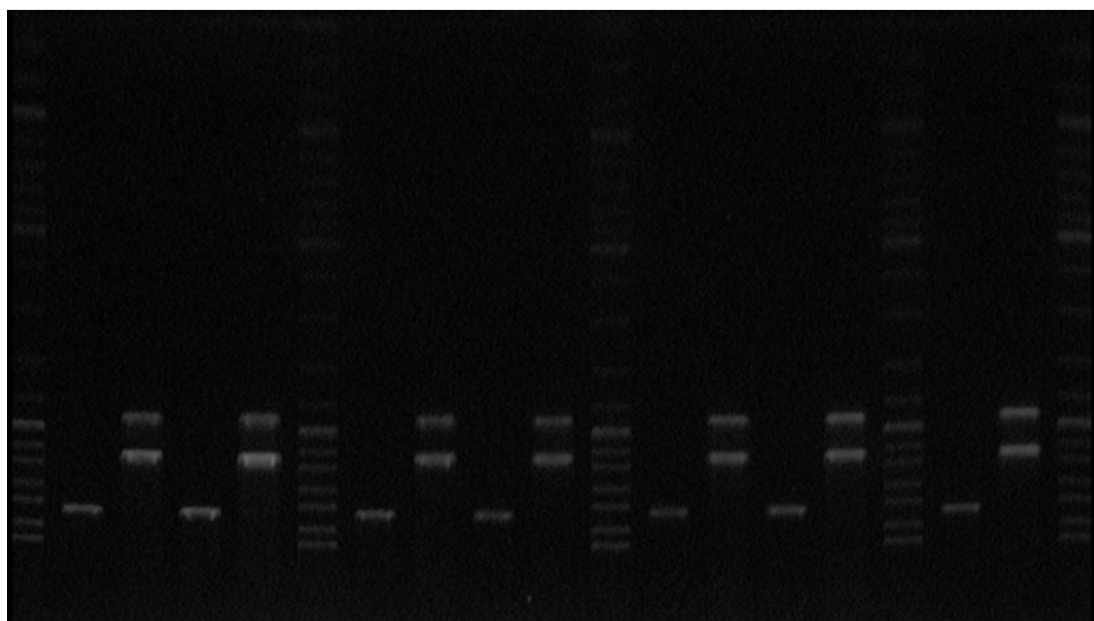
U vybraných klonů byla stanovena koncentrace DNA (viz tab. 7).

klon č. 2	306 ng/μl
klon č. 3	406 ng/μl
klon č. 6	249 ng/μl
klon č. 7	222 ng/μl
klon č. 11	255 ng/μl
klon č. 13	281 ng/μl
klon č. 14	215 ng/μl

Tab. 7. Koncentrace DNA u vybraných klonů vykazujících správnou orientaci.

Následná restrikce SacI měla vektor otevřít za vzniku fragmentu dlouhého 6595 bp. I-SceI meganukleáza měla vyštěpit insert o velikosti 3795 bp. Restrikce byla provedena u vybraných klonů 2, 3, 6, 7, 11, 13 a 14 (viz obr. 8).

Všechny analyzované plazmidové DNA vykazovaly očekávané délky restrikčních fragmentů. Pro sekvenační reakci byly vybrány klony 3, 6 a 13. Správná sekvence inzertu byla zjištěna u klonu 13. Tento klon byl vybrán pro maxi izolaci plazmidové DNA, poté byla stanovena koncentrace DNA na 1987 ng/μl.



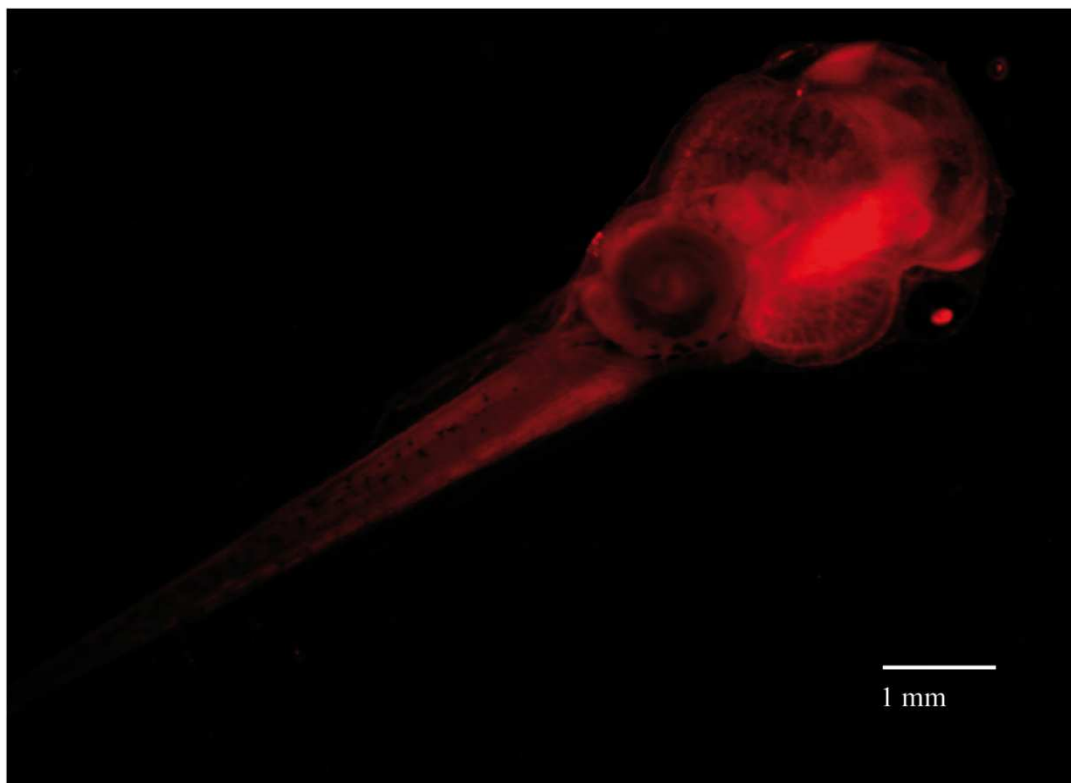
M S I S I M S I S I M S I S I M S I M  
Obr. 8. Výsledky restrikční analýzy SacI a I-SceI u sedmi vybraných klonů. M – marker, S – vzorky štěpené SacI, I – vzorky štěpené I-SceI.

## 5.2 Příprava transgenních jedinců *X. tropicalis* celotělně exprimujících Katushka-RFP

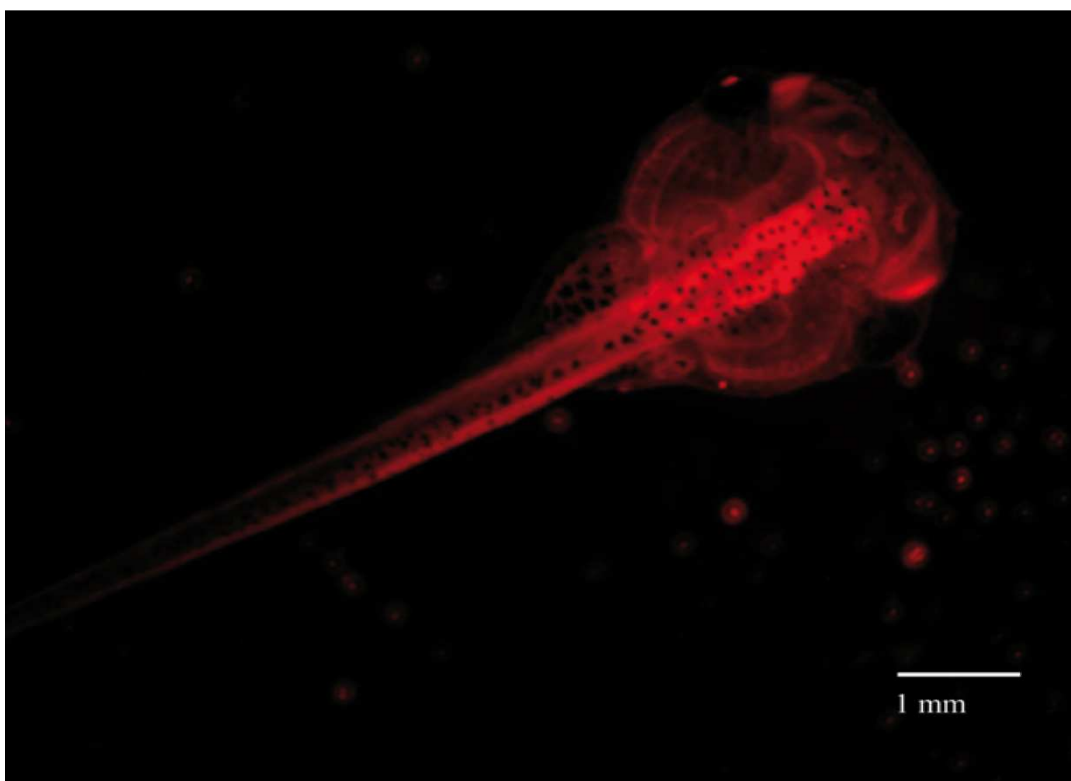
Metodou I-SceI zprostředkované transgeneze byl vnesen gen pro Katushka-RFP do recipientního embrya v jednobuněčném stádiu. Jedinci, u kterých byla transgeneze úspěšná, následně exprimovali červený fluorescenční protein.

Exprese byla buď celotělová, když se gen zaintegroval do jedné blastomery v rámci dvoubuněčného embrya (viz obr. 9, 10), na jedné polovině těla, když se gen zaintegroval do genomu v dvoubuněčném stádiu (viz. obr. 11), nebo mozaiková. Bohužel vzhledem k nízké viabilitě pulců (viz graf 1, tab. 8) v pozdějším vývoji se

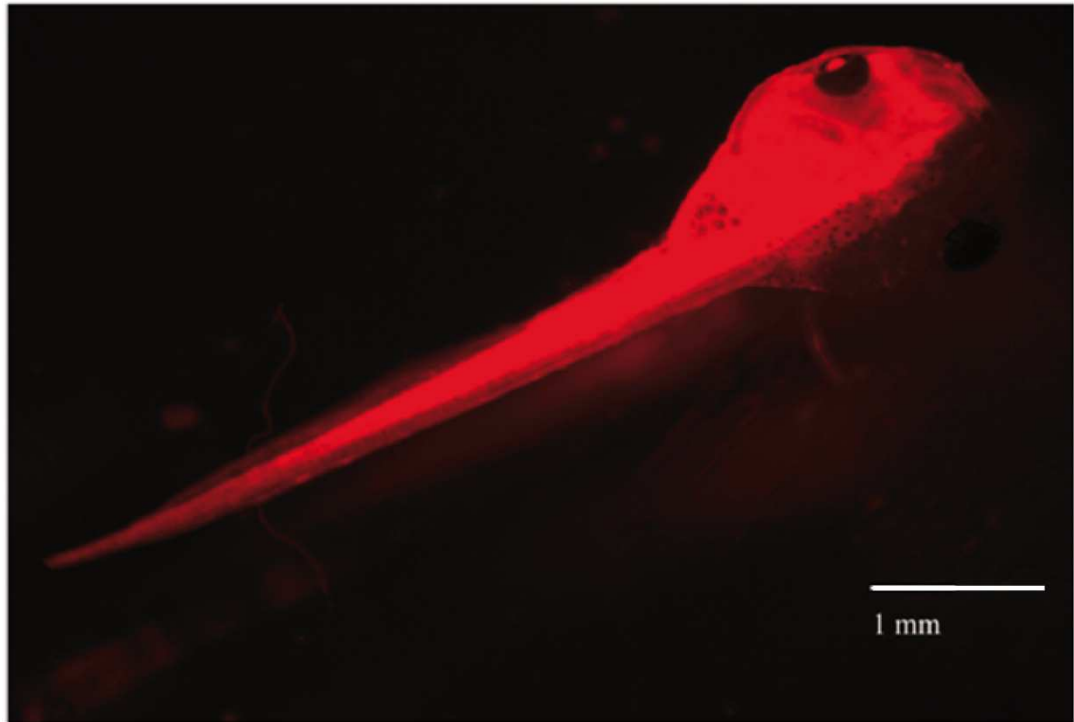
mi nepodařilo odchovat dospělou žábu, která by exprimovala reportérový gen a mohla jej předat do další generace.



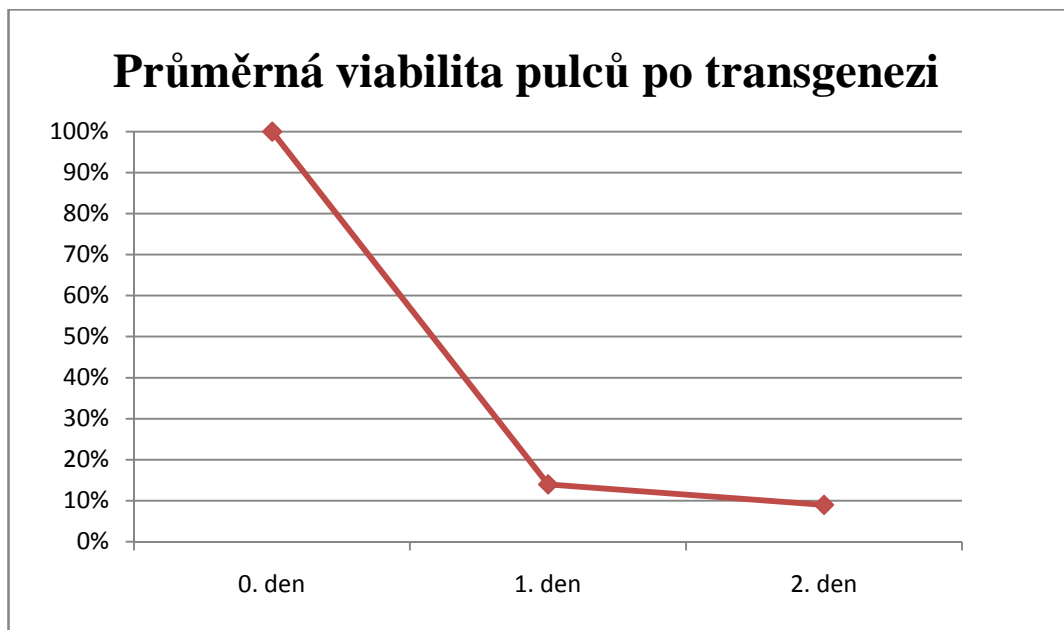
Obr. 9. Pulec, stádium 47, exprimující celotělově Katushka RFP, pohled z ventrální strany.



Obr. 10. Pulec, stádium 47, exprimující celotělově Katushka RFP, pohled z dorzální strany.



Obr. 11. Pulec, stádium 46, exprimující Katushka RFP v polovině svého těla, pohled z dorzální strany.



Graf 1. Procenta přežívajících embryí první tři dny po transgenezi. Data celkem ze 7 transgenezí.

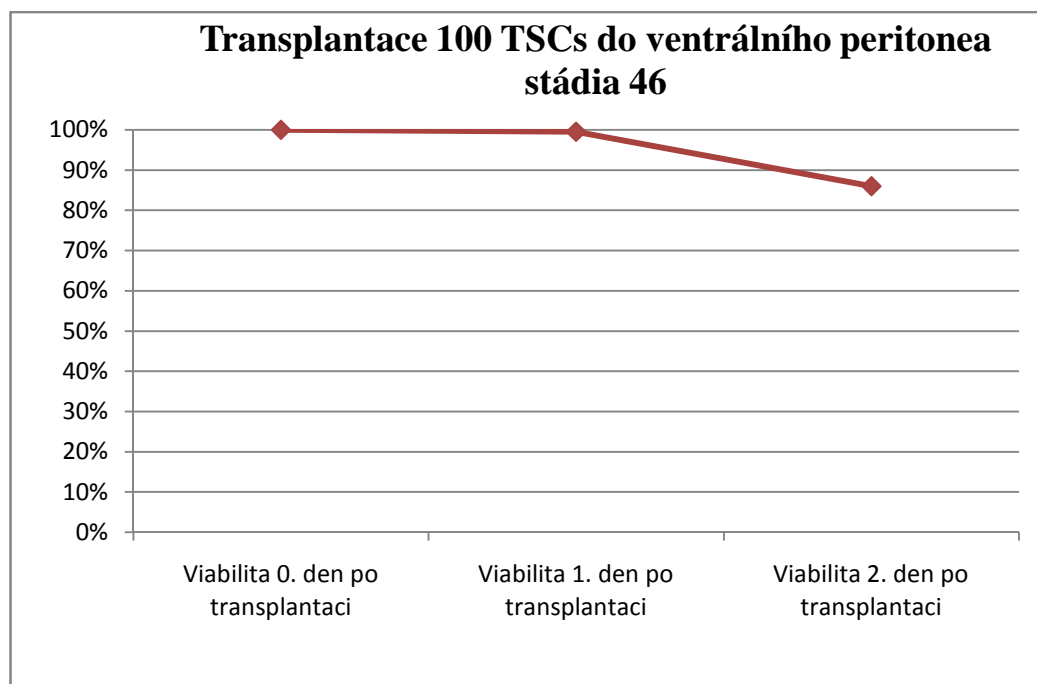
	0. den	1. den	2. den
Průměrná viabilita absolutně	222,86±3,37	30,14±2,41	19,43±1,08
Průměrná viabilita procentuelně	100%	14%	9%

Tab. 8. Průměrná viabilita embryí první tři dny po transgenezi. Data celkem ze 7 transgenezí.

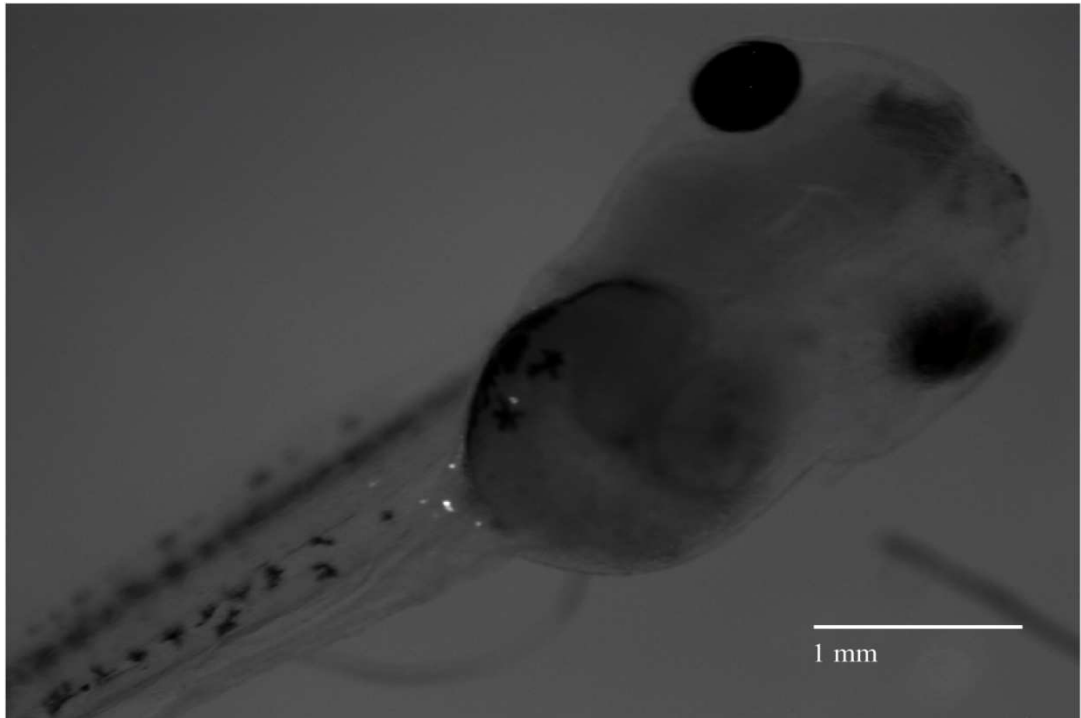
### 5.3 Transplantace TSC do blastul a pulců *X. tropicalis*

Před transplantací značených TSC do embryí či pulců *X. tropicalis* byla změřena jejich viabilita pomocí přístroje Countess Cell Counter (Invitrogen). Životaschopnost buněk se pohybovala kolem 96%.

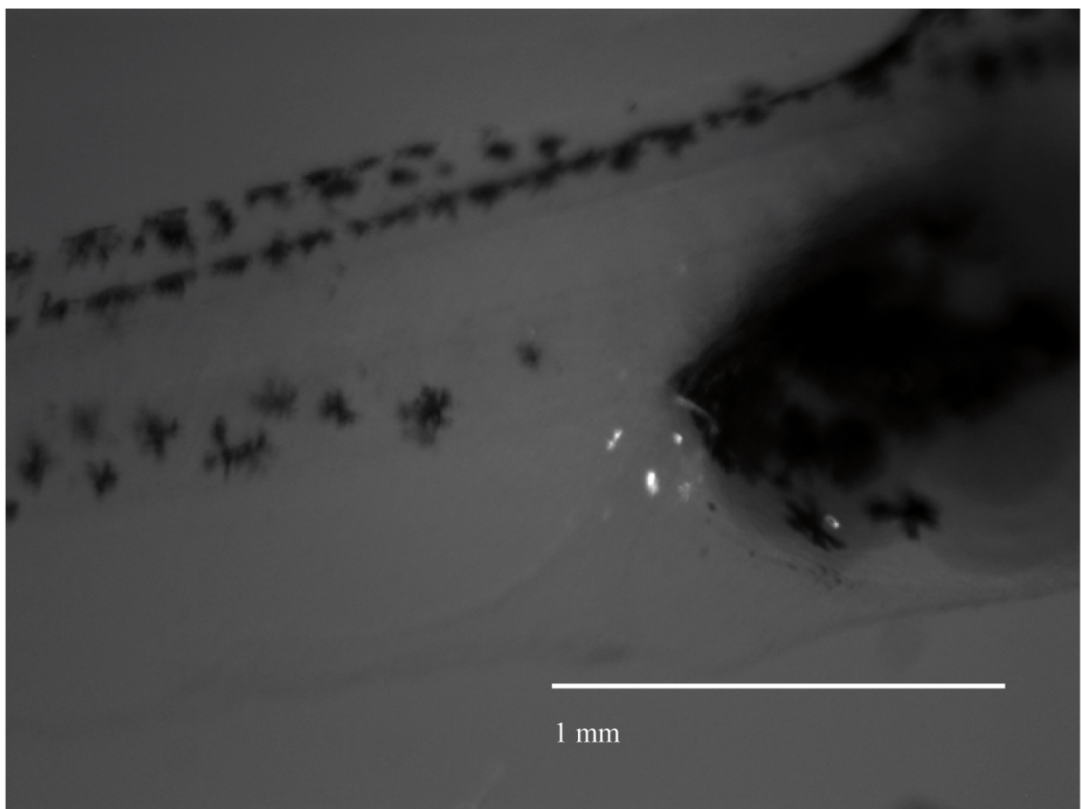
Transplantační experimenty byly zpočátku prováděny u pulců ve stádiu 46 do oblasti peritonea (viz obr. 9.). Do pulců bylo vpravováno 100 TSCs, které byly nabarveny vitální barvičkou PKH26. Následně byla pozorována migrace značených buněk v embryu. Buňky migrovaly převážně do oblasti střeva a ocasu (viz obr. 12. 13). Viabilita pulců 2. den po transplantaci byla 86% (viz graf 2).



Graf 2. Vyjádření viability pulců po transplantaci 100 TSCs do ventrálního peritonea stádia 46.

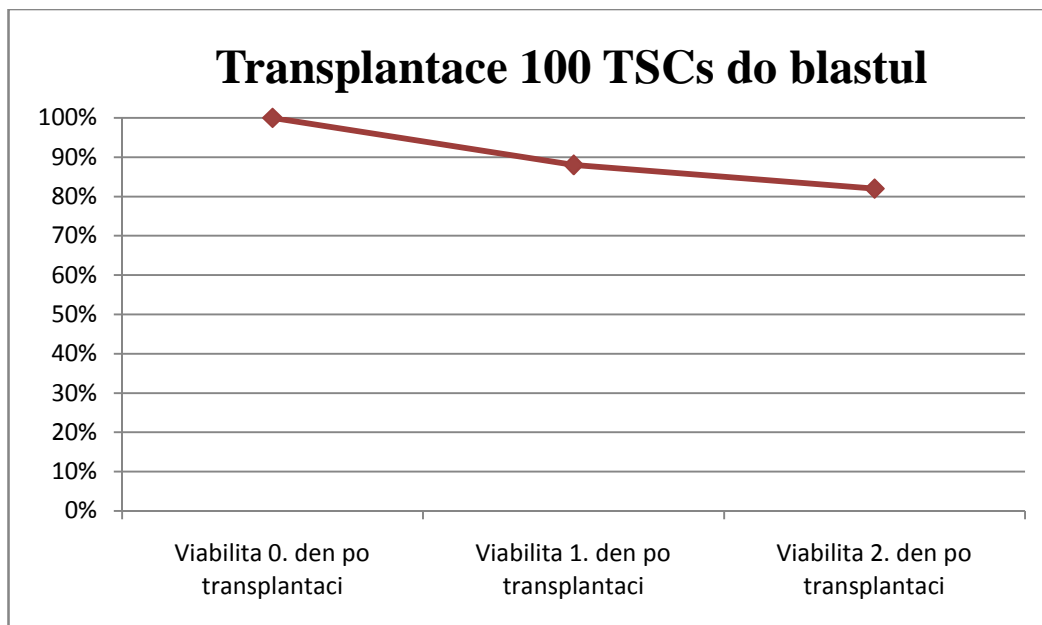


Obr. 12. Po transplantaci TSCs do ventrálního peritonea pulce st. 46 migrovaly buňky dorzálně a do oblasti střeva. (Pulec, stádium 47, pohled na ventrální stranu).

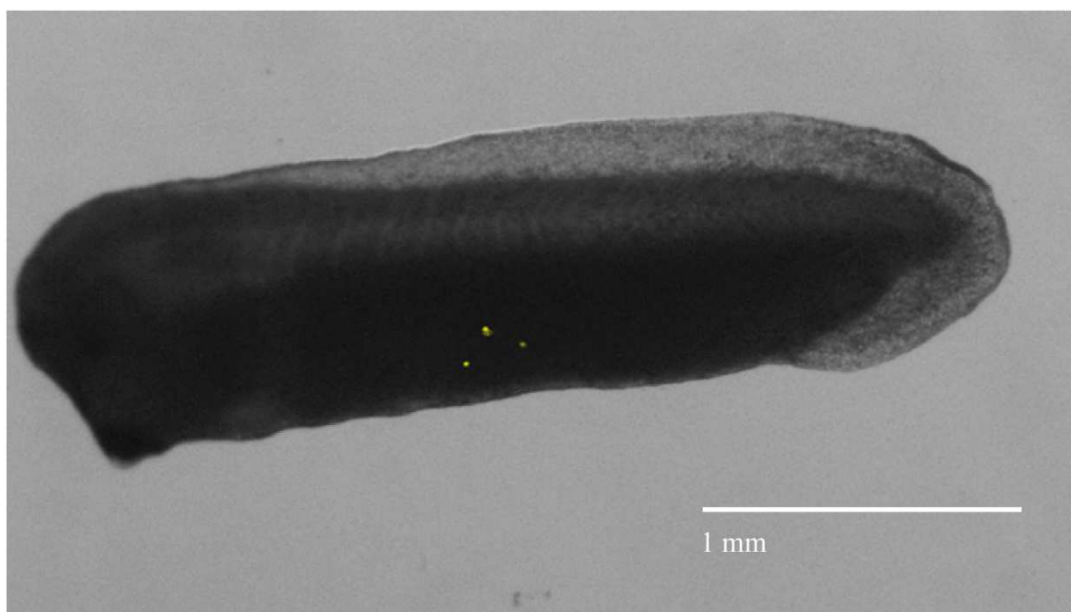


Obr. 13. Po transplantaci TSCs do ventrálního peritonea pulce st. 46 migrovaly buňky dorzálně a do oblasti střeva. (Pohled na ventrální stranu, stádium 47, detail).

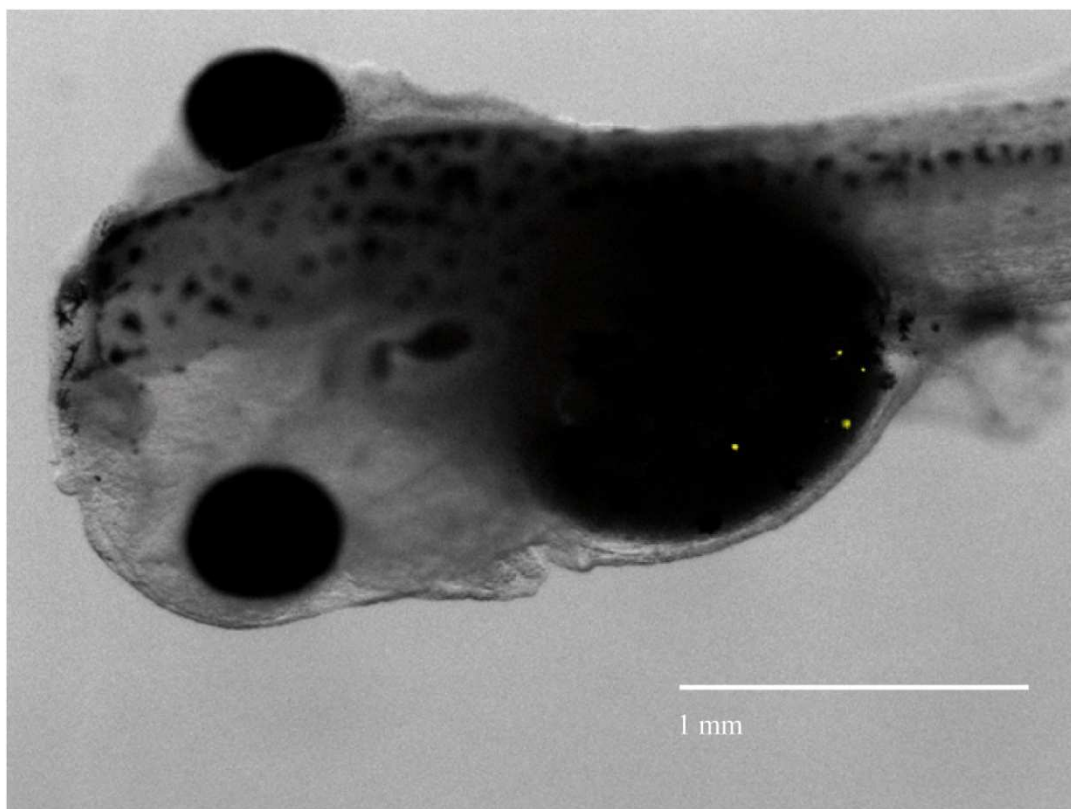
V dalších experimentech byly jako recipienti využívány blastuly *X. tropicalis*. Do blastocoelu bylo vpravováno 100 buněk. Následně byla pozorována migrace buněk převážně do oblasti střeva (viz obr. 14, 15). Průměrná viabilita 2. den po transplantaci byla 82%.



Graf 3. Vyjádření viability pulců po transplantaci 100 TSCs do blastul.



Obr. 14. Po transplantaci do blastuly migrovaly TSCs do oblasti střeva. (Stádium 30).

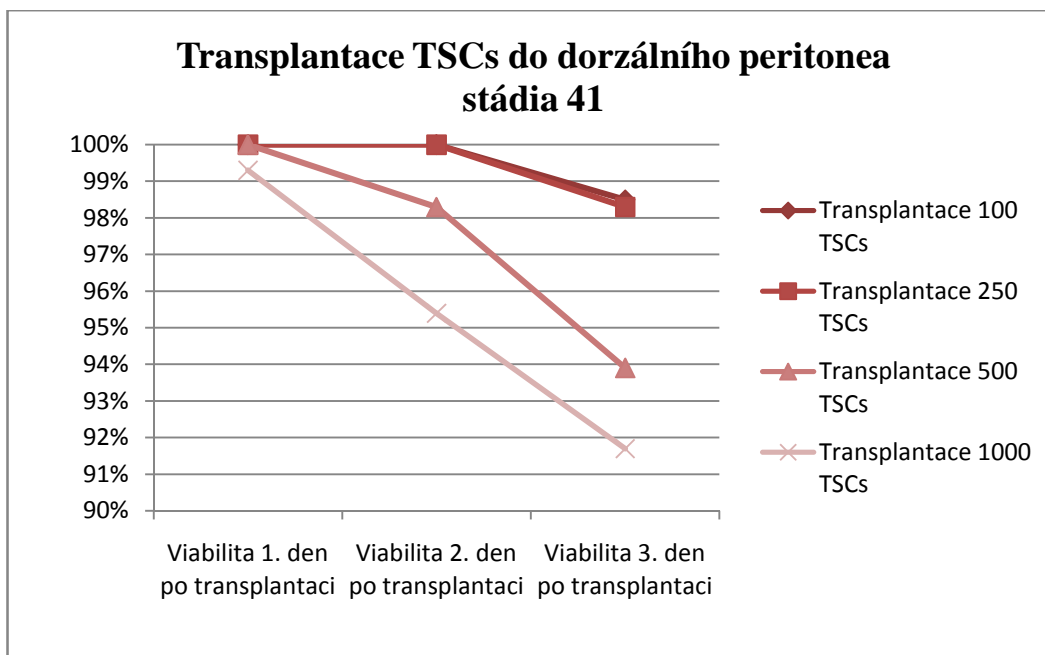


Obr. 15. Třetí den po transplantaci TSC do blastuly byla pozorovány migrace značených buněk převážně do oblasti střeva. (Pulec, stádium 46, dorzální strana).

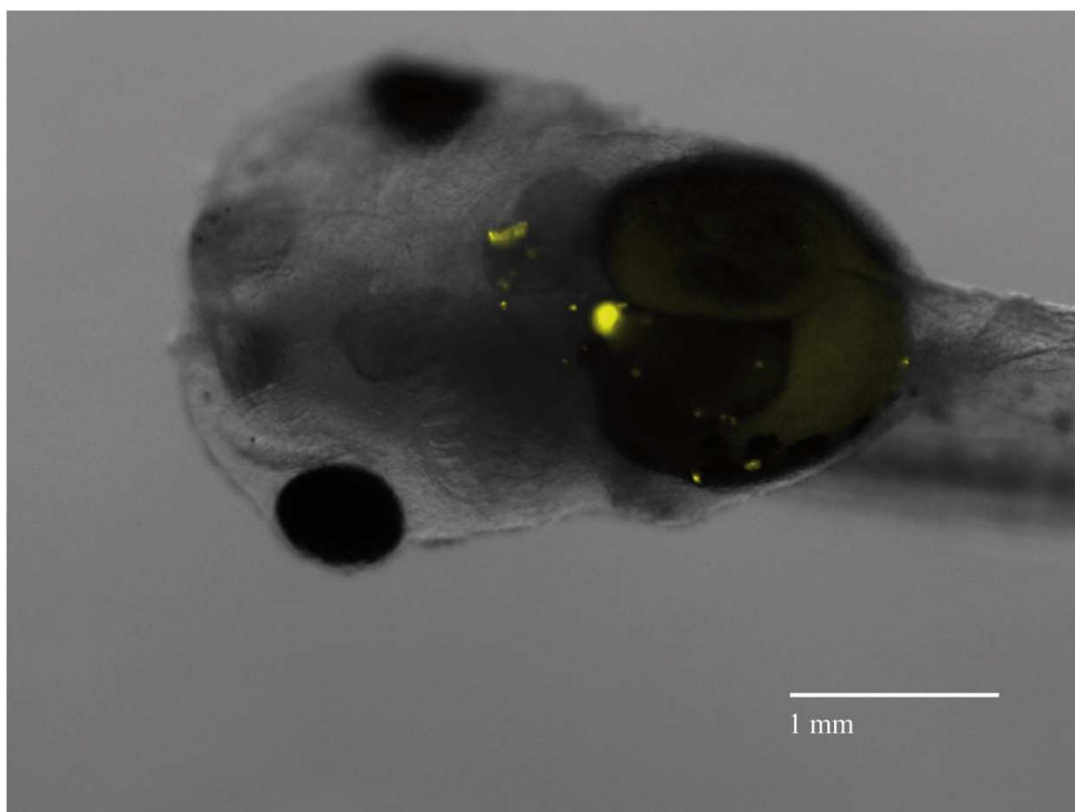
Při transplantaci buněk do oblasti dorzálního peritonea pulců stádia 41 byla následně pozorována migrace TSCs do oblasti srdce, pronefros, hlavy a střeva (viz obr. 16, 17, 18, 19, 20). Viabilita 3. den po transplantaci byla při počtu: 100 buněk 98,5%, 200 buněk 98,3%, 500 buněk 93,9%, 1000 buněk 91,7%.



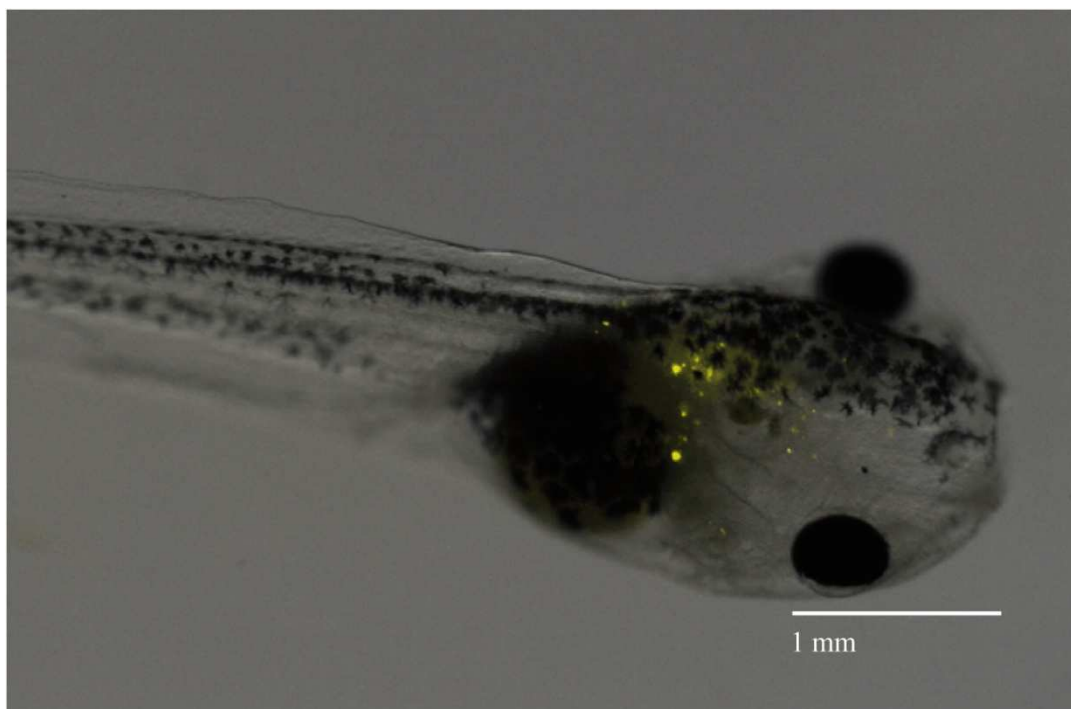
Obr. 16. Mikroinjekce TSCs v počtu 100 ks byla prováděna do pulce stádia 41 do oblasti dorzálního peritonea. Druhý den byla patrná migrace buněk do oblasti pronefros. (Pulec, stádium 46)



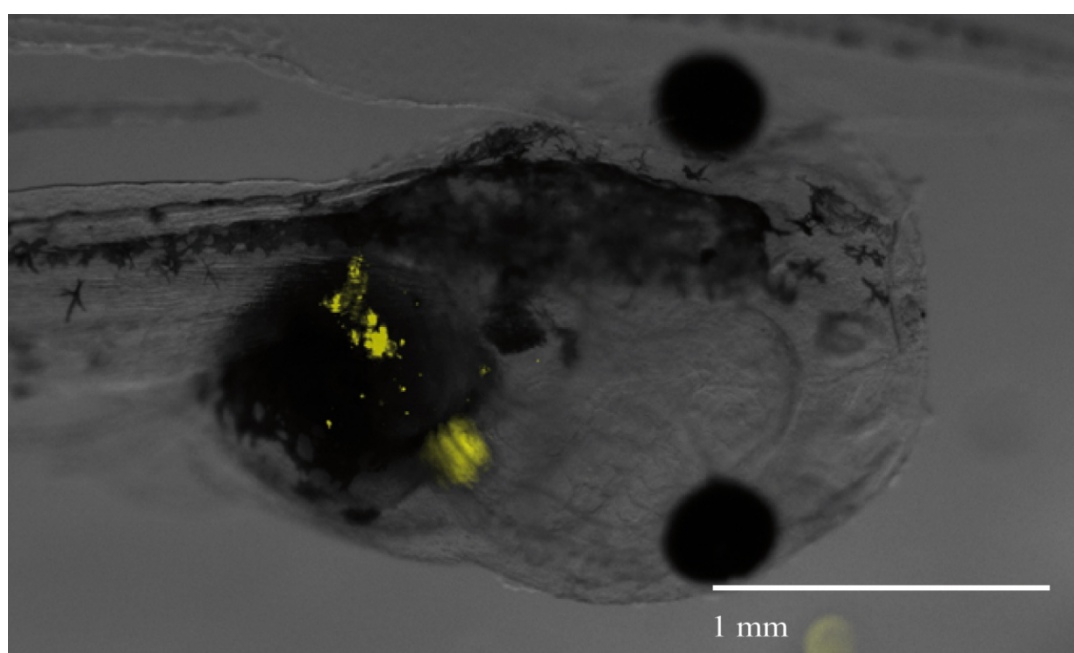
Graf 4. Vyjádření viability pulců první tři dny po transplantaci TSCs do dorzálního peritonea. Srovnání různých počtů mikroinjikovaných buněk.



Obr. 17. Mikroinjekce 500 TSCs byla prováděna do pulce stádia 41 do oblasti dorzálního peritonea. Druhý den byla patrná migrace buněk do oblasti srdce a střeva. (Pulec, stádium 46, ventrální strana).

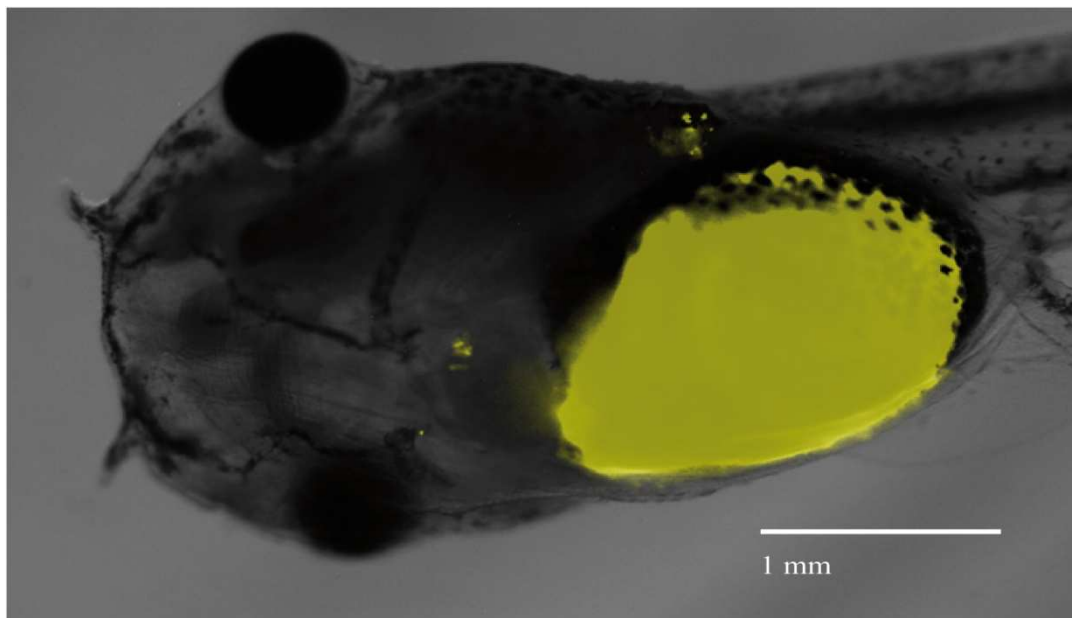


Obr. 18. Mikroinjekce 500 TSCs byla prováděna do pulce stádia 41 do oblasti dorzálního peritonea. Druhý den po transplantaci buňky migrovaly do oblasti pronefros a hlavy. (Pulec, stádium 46 dorzální strana).



Obr. 19. Mikroinjekce 500 TSCs byla prováděna do pulce stádia 41 do oblasti dorzálního peritonea. Druhý den po transplantaci migrovaly buňky do oblasti genitálních rýh. (Pulec, stádium 46, dorzální strana).

14 dní po transplantaci do dorzálního peritonea bylo patrné, že došlo k redukci počtu buněk, ale zároveň bylo možné pozorovat stabilní obsazení příslušných orgánů ustanovenými populacemi buněk.



Obr. 20. Mikroinjekce 250 TSCs byla prováděna do pulce stádia 41 do oblasti dorzálního peritonea. Po 14 dnech bylo možné rozlišit populace buněk v pronefros a srdci, ve střevě je již patrná silná autofluorescence. (Pulec, stádium 50, ventrální strana).

Analýza pulců po 14 dnech od transplantace ukázala, že TSCs nejčastěji migrovaly do oblasti pronefros a srdce (viz tab. 9).

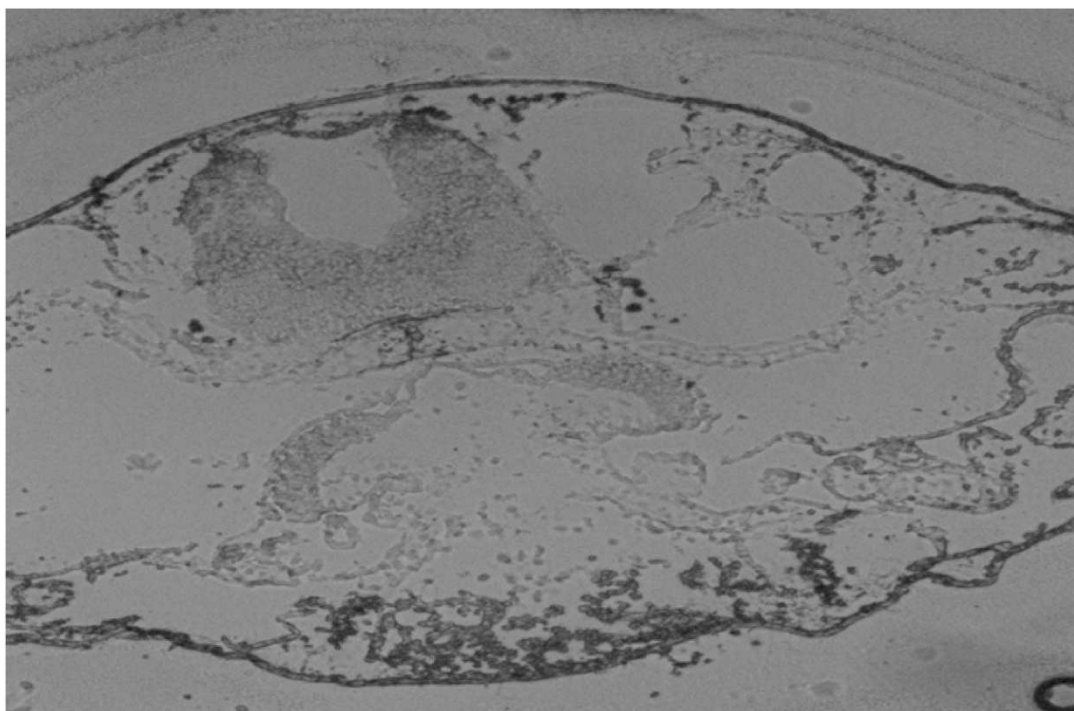
Oblast pronefros	69,20%
Oblast srdce	38,50%
Oblast střeva	23%
Oblast hlavy	23%
Epidermis	7,70%
Genitální rýha	7,70%

Tab. 9. Výskyt TSCs 14 dní po transplantaci 250-1000 buněk u pozitivních jedinců.

#### 5.4 Histologické preparáty raných vývojových stádií *X. tropicalis*

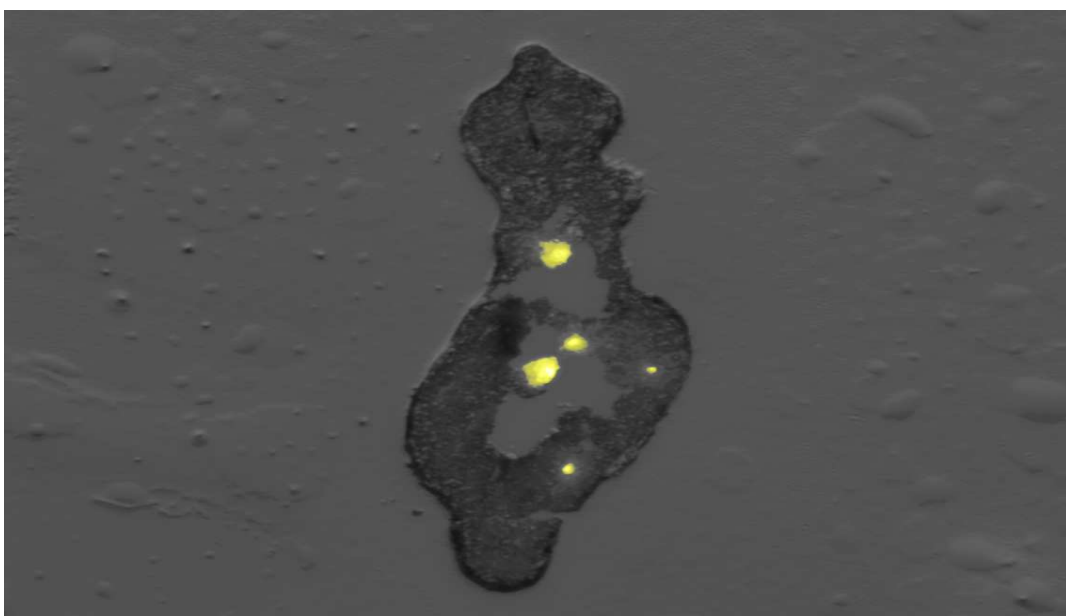
Kvalita řezových preparátů se výrazně lišila. Pro účely analýzy bylo zásadní, aby byly na řezech zachovány utvářející se gonády. Původní vzorky, které byly zalévány do O.C.T. bez prosycování sacharózou byly na řezech značně

potrhané a většina struktur uvnitř řezu chyběla, protože se vydrolila v průběhu řezání. Často byly patrné útržky tkání uvnitř řezů (viz obr. 21).



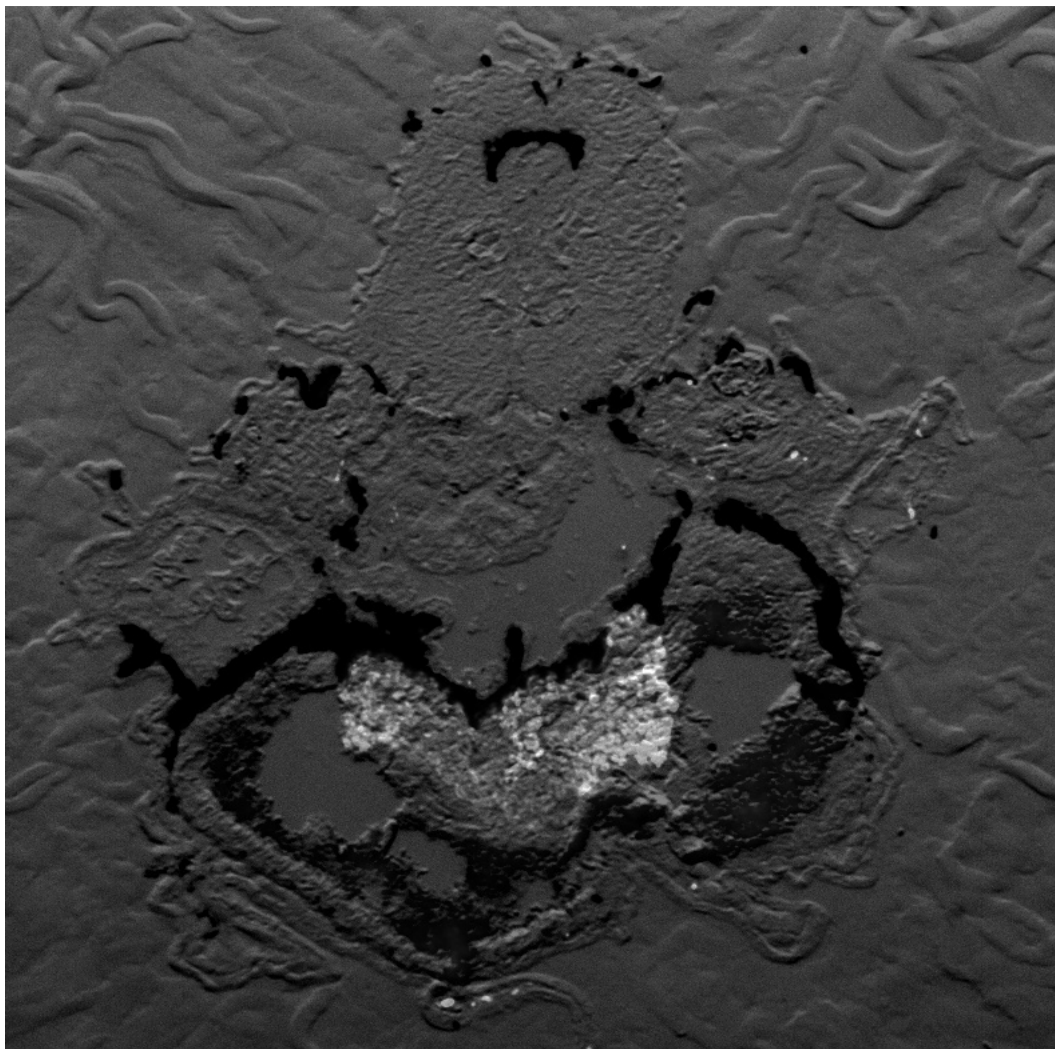
Obr. 21. Řez pulcem, který byl bez prosycení zamražen v O.C.T. Zvětšení 400×.

Vzorky prosycované sacharózou a zalévané do O.C.T. byly zachovalejší a bylo na nich možné sledovat více vnitřních struktur embrya (viz obr. 22).



Obr. 22. Řez pulcem (stádium 41) prosycovaným v sacharóze a následně zamraženým v O.C.T. Na obrázku jsou patrné žlutě zvýrazněné TSC, které byly transplantovány ve stadiu blastuly. Zvětšení 115×.

Histologické řezy z embryí, která byla prosycována želatinou, přenesly nejlepší výsledky, co se kompaktnosti týče. Na řezech byla zachována většina vnitřních struktur embrya (viz obr. 23).



Obr. 23. Řez pulcem, který byl prosycován želatinou a mražen v želatině. V oblasti střeva je patrná autofluorescence. Zvětšení 115×.

V průběhu testování jednotlivých metod přípravy histologických řezů bylo zjištěno, že etanol má velmi negativní vliv na stabilitu fluorescence vitální barvičky PKH26. Vzhledem k tomu, že etanol je používán jako činidlo v rámci deželatinizace a v rámci přípravy parafinových řezů lze shrnout, že jako nejvhodnější pro přípravu histologických řezů se jeví dva postupy: 1) prosycení časného embrya či pulce v sacharóze s následným zamražením v O.C.T., nebo 2) příprava želatinových preparátů bez finální deželatinizace.

## 6 Diskuse

Studium migrace a diferenciacie PGCs a SSCs jsou hlavně prováděny na myším modelu (například Anderson et al., 2000, Brinster, 2002). I přes nesporný význam experimentů na myších pro aplikovanou medicínu, s sebou tyto experimenty nesou často metodologické problémy kvůli vývoji embryí podmíněnému v těle matky. Těmto problémům nemusí čelit experimenty s organismy ze skupin nižších obratlovců, ryb a obojživelníků. U nižších obratlovců byly studie na PGCs a SSCs prováděny hlavně na rybím modelu. V roce 2008 byla publikována studie na daniu (*Danio rerio* a *Danio albolineatus*), ve které byla mezidruhově transplantována pouze jediná PGC. U příjemce byl uměle zastaven fyziologický vývoj gonády pomocí antisense *dead end* morpholino oligonukleotidu - *dead end* protein je součástí zárodečné plazmy a jeho knock down způsobí neschopnost PGCs migrovat do genitálních rýh, což vede k zániku pohlavní linie (Weidinger et al., 2003). Byla pozorována migrace transplantované buňky do genitálních rýh, kde se množila a dala vzniknout funkční gonádě (Saito et al., 2008). Zjištění, že pouze jediná buňka stačí k vytvoření funkční gonády, má zásadní význam pro možné terapeutické využití a také komerční využití v rámci asistované reprodukce hospodářsky významných ryb.

Hlavní náplní mé práce bylo studium migračního potenciálu TSCs *X. tropicalis* z kultury založené v laboratoři školitele. Testikulární kmenové buňky *X. tropicalis* vykazují mnoho znaků kmenovosti: *in-vitro* tvoří charakteristické shlukové struktury, vykazují pozitivní reakci na alkalickou fosfatázu a exprimují různé transkripční faktory charakteristických pro kmenové buňky (*klf4*, *oct4* atp.).

Jak bylo uvedeno, jedním z cílů mé diplomové práce byla konstrukce plazmidového vektoru, který by u transgenních jedinců umožňoval celotělní expresi červeného fluorescenčního proteinu včetně pohlavní linie. Těmto podmínkám nejlépe vyhovuje CAG promotor. Geny pod kontrolou CAG (CMV enhancer/chicken $\beta$ actin) promotoru vykazují stabilní a silnou expresi ve všech tkáních, včetně buněk zárodečné linie a je možné tento promotor využít i u obojživelníků (Sakamaki et al., 2005). Proto byl tento promotor využít i při konstrukci plazmidového vektoru.

Jako reportérový gen byl zvolen Katushka fluorescenční protein (Katushka-RFP). Tento jen gen byl použit proto, že se jedná o velice stabilní protein a v porovnání s jinými červenými proteiny vykazuje stabilnější expresi a menší toxický efekt (Shcherbo et al., 2007).

REMI (restriction enzymemediated integration) byla dříve často používanou metodou pro transgenezi u *Xenopa*. Tato metoda sice znamenala výrazné zefektivnění transgeneze, avšak přinášela komplikace v podobě poškození chromozómů a zabudování mnohonásobných kopií konstruktů do genomu (Kroll a Amaya, 1996, Hartley et al., 2001). Těmto zásadním problémům při transgenezi jsme předešli použitím I-SceI meganukleázy. Jedná se o vysoce specifickou restriktázu, neštěpí akceptorovou DNA a navíc pomáhá při integraci exogenního genu do hostitelského genomu (Plessis et al., 1992, Choulíka et al., 1995, Therems et al., 2002). I-SceI meganukleázová aktivita byla úspěšně využita při transgenezi u rybího modelového organismu *dania* pruhovaného. Bylo zjištěno, že k silné expresi vneseného genu dochází už v F0 generaci, a to díky rychlému zabudování genu do akceptorového genomu v jednobuněčném stádiu. Navíc docházelo k vysoce efektivní integraci vneseného genu do zárodečné linie příjemce (Therems et al., 2002). K podobným poznatkům jako u *dania* došly i experimenty s I-SceI transgenezí u *Xenopa*. Bylo potvrzeno, že exprese reportérového genu je nejen rovnoměrná, ale i míra přežití transgenů je vysoká (Pan et al., 2005). Díky výše zmíněným poznatkům byla I-SceI meganukleáza využita při vložení kazety obsahující CAG-Katushka do genomu příjemce.

V rámci transgenních experimentů se mi podařilo získat několik pulců celotělně exprimujících červených fluorescenční protein. Nicméně díky nízké viabilitě těchto pulců, průměrně 9% z mikroinjikovaných jedinců 2. den po transgenezi, žádný z nich nedosáhl stádia pohlavně dospělého jedince. Toto se však podařilo školiteli, který odchoval dospělé žáby, celotělně exprimující Katushka-RFP. Po dosažení pohlavní dospělosti bude cílem zkřížení těchto žab s wild-type jedincem získání F1 generace exprimující RFP. Tím bude dokázáno, že daný rodič exprimuje reportérový gen i v zárodečné linii buněk. Linie testikulárních kmenových buněk, založená z varlat těchto F1 jedinců poslouží pro studium migrace a diferenciací TSCs u *X. tropicalis*. Díky stabilní expresi reportérového genu buněk, bude moci studium probíhat po celou dobu vývoje jedince.

Transplantace PGCs do peritoneální dutiny byla zavedena na rybím modelu, kdy byla následně pozorována migrace buněk do genitálních rýh (Takeuchi et al., 2003, Okutsu et al., 2006). Metodu transplantace do peritonea jsem použila i ve své práci, kdy jsem za místo mikroinjekce volila standardní ventrální peritoneum jako u transplantací u ryb, i oblast dorzální peritoneální dutiny (viz obr. 4). Dále jsem pro transplantační experimenty používala stádium blastuly, kdy byly buňky vpravovány do blastocoelu. Bylo zjištěno, že TSCs jsou schopné migrovat do entodermálních (střevo), mezodermálních (srdce, pronefros), i ektodermálních (epidermis, nervová soustava) struktur vyvíjejícího se embrya. Při transplantaci vitálně označených TSCs do blastuly byla následně pozorována migrace těchto buněk hlavně do oblasti střeva. Stejně jako u rybího modelu transplantace do tak raného stádia tedy nevedla k migraci buněk do genitálních rýh (Takeuchi et al., 2003). Buňky transplantované do ventrálního peritonea pulce stádia 46, migrovaly převážně do oblasti střeva, dorzálně nad střevo a do ocasu. Transplantace buněk do dorzálního peritonea pulce stádia 41 vedla k nejrozsáhlejším migracím buněk v rámci většiny orgánových struktur a osvědčila se jako nejefektivnější metoda transplantace. Buňky migrovaly do oblasti pronefros, srdce, střeva, hlavy a genitálních rýh. U čerstvě vylíhnutých rybích embryí byl počet transplantovaných PGC 90 ks (Okutsu et al., 2006), já jsem experimentovala u transplantací do dorzálního peritonea s různými počty mikroinjikovaných buněk. Podle očekávání byla viabilita pulců nejnižší při nejvyšším množství injikovaných buněk (1000 ks). V porovnání se skupinou se 100 transplantovanými buňkami byl však 3. den po transplantaci rozdíl ve viabilitě pouze 6,8 %. Pro transplantační experimenty se jeví jako nejideálnější množství transplantovaných buněk 250-500 ks, kdy je úmrtnost pulců nízká a množství buněk dostatečné pro vytváření viditelných populací ve vyvíjejícím se embryu. Nízká úmrtnost pulců po transplantaci, i přes extrémní počty transplantovaných buněk se dá interpretovat tak, že transplantované buňky nejsou pro embrya nijak rizikovým faktorem.

Pluripotentní buňky jsou z hlediska biomedicíny nejzajímavější skupinou kmenových buněk, protože mohou dát vzniknout orgánům a tkáním všech třech zárodečných listů. Mezi pluripotentní buňky řadíme ESCs z preimplantovaných embryí, iPSC a dále buňky odvozené z PGC (Donovan a Gearhart, 2001, Donovan a de Miguel, 2003, Takahashi a Yamanaka, 2006). Další pluripotentní buňky byly odvozeny z kultury SSCs, kdy můžeme mluvit o kultuře pluripotentních

kmenových buněk odvozených od germinální linie (GPSCs). Tyto buňky vznikají z kultury SSCs spontánně po 4-7 týdnech bez potřeby genetické modifikace. GPSCs mají potenciál regenerovat nervovou, srdeční, hematopoetickou tkáň a další tkáně (Fagoonee et al., 2011). Podle mých výsledků je z hlediska migrace tato charakteristika vlastní i TSCs odvozených z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* PřF UK, a je tedy možné usuzovat, že mají pravděpodobně pluripotentní charakter a jedná se o GPSCs. Vzhledem k novým poznatkům o TSCs je třeba tuto kulturu dále charakterizovat a prozkoumat možnost jejího dalšího využití. V současné době v laboratoři školitele zjišťován expresní profil TSC pomocí RT-PCR a v nejbližší době také pomocí Solexa Illumina a paralelnímho cDNA sekvenování. Cílem dalších experimentů bude vytvořit embrya, která nebudou mít vlastní pohlavní linii buněk. K tomuto účelu bude využito morpholino oligonukleotidů proti *Xenopus* Dead end mRNA, která je specificky lokalizována v zárodečné plazmě (Horvay et al., 2006). Po transplantaci značených TSCs do takových embryí se očekává, že dojde ke kolonizaci pohlavních rýh těmito buňkami a k vytvoření funkčních pohlavních orgánů. Zdokonalená technika získání kvalitních histologických preparátů bude využívána pro účely imunohistochemického barvení a aplikaci RNA sond pro lokalizaci genitální rýhy na řezech. Jestliže spolu s migračním potenciálem bude i prokázána schopnost TSCs diferencovat v struktury všech třech zárodečných listů, bude možné tyto buňky používat jako náhradu za ESCs při experimentech.

Výsledky této práce, a to jak z metodologické, tak z experimentální části, poslouží k získávání dalších poznatků o kultuře TSCs *Xenopus tropicalis*. Pokud se potvrdí pluripotentní charakter těchto buněk, bude to další krok k možnosti využití kmenových buněk v základním i aplikovaném výzkumu.

## 7 Závěr

- ❖ Byl vytvořen vektor nesoucí gen pro Katushka RFP s CAG promotorem. Konstrukt byl ohraničen I-SceI místy pro možnost využití I-SceI meganukleázy při transgenezi.
- ❖ Úspěšně byla zavedena metoda transgeneze s využitím I-SceI meganukleázy a byli získáni pulci celotělově exprimující Katushka RFP.
- ❖ Transplantačními experimenty bylo zjištěno, že TSCs mají potenciál migrovat do orgánových struktur odvozených ze všech třech zárodečných listů, a tedy mají patrně pluripotentní charakter.
- ❖ Transplantace buněk do dorzálního peritonea pulce stádia 41 vedla k nejrozsáhlejší migraci buněk v rámci většiny orgánových struktur a osvědčila se jako nejefektivnější metoda transplantace.
- ❖ Viabilita pulců po transplantaci buněk je mnohem vyšší, než při transgenezi, a to i při vysokém množství transplantovaných buněk.
- ❖ Bylo zjištěno, že nevhodnější metodou pro tvorbu histologických preparátů je prosycování embryí sacharózou nebo želatinou a následná kryosekce.

## 8 Seznam literatury

- Amaya E, Offield MF, Grainger RM. Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet.* 1998 Jul;14(7):253-255.
- Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev.* 2000 Mar 1;91(1-2):61-68.
- Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):393-400.
- Bewick AJ, Chain FJ, Zimmerman LB, Sesay A, Gilchrist MJ, Owens ND, Seifertova E, Krylov V, Macha J, Tlapakova T, Kubickova S, Cernohorska H, Zarsky V, Evans BJ. A large pseudoautosomal region on the sex chromosomes of the frog *Silurana tropicalis*. *Genome Biol Evol.* 2013;5(6):1087-1098.
- Bisbee CA, Baker MA, Wilson AC, Haji-Azimi I, Fischberg M. Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science.* 1977 Feb 25;195(4280):785-7.
- Blackler, AW, Fischberg M. Transfer of primordial germ-cells in *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1961 9.4: 634-641.
- Bowes JB, Snyder KA, Segerdell E, Gibb R, Jarabek C, Noumen E, Pollet N, Vize PD. Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D761-67.
- Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science.* 2002 Jun 21;296(5576):2174-2176.
- Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11303-11307.
- Brockes JP. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):81-87.
- Bronchain OJ, Hartley KO, Amaya E. A gene trap approach in *Xenopus*. *Curr Biol.* 1999 Oct 21;9(20):1195-1198.
- Callery EM. There's more than one frog in the pond: a survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2006 Feb;17(1):80-92.
- Chan AP, Gurdon JB. Nuclear transplantation from stably transfected cultured cells of *Xenopus*. *Int J Dev Biol.* 1996 Apr;40(2):441-451.
- Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1995 Apr;15(4):1968-1973.

- Cannatella, DC., De Sá OR. *Xenopus laevis* as a model organism. *Systematic Biology* 1993 42.4: 476-507.
- Cannatella, DC., Trueb L. Evolution of pipoid frogs: morphology and phylogenetic relationships of *Pseudhymenochirus*. *Journal of Herpetology* 1988: 439-456.
- Cohen, N. Amphibian transplantation reactions: a review. *American Zoologist* 1971 11.2: 193-205.
- Colleaux L, D'Auriol L, Galibert F, Dujon B. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(16):6022-6026.
- Cupp A., Skinner M. Embryonic Sertoli cell differentiation. *Sertoli Cell Biology* 1 2005: 43-70.
- de Sá RO, Hillis DM. Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol*. 1990 Jul;7(4):365-376.
- Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Oct;13(5):463-471.
- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):92-97.
- Ekker SC. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast*. 2000 Dec;17(4):302-306.
- Elsdale TR, Gurdon JB, Fischberg M. A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*. 1960 Dec;8:437-444.
- Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Mol Phylogenet Evol*. 2004 Oct;33(1):197-213.
- Fagoonee S, Pellicano R, Silengo L, Altruda F. Potential applications of germline cell-derived pluripotent stem cells in organ regeneration. *Organogenesis*. 2011 Apr-Jun;7(2):116-122.
- Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998 Aug;9(4):411-416.

Hartley KO, Hardcastle Z, Friday RV, Amaya E, Papalopulu N. Transgenic *Xenopus* embryos reveal that anterior neural development requires continued suppression of BMP signaling after gastrulation. *Dev Biol*. 2001 Oct 1;238(1):168-84.

Haseltine FP, Ohno S. Mechanisms of gonadal differentiation. *Science*. 1981 Mar 20;211(4488):1272-1278.

Hayes TB. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool*. 1998 Aug 1;281(5):373-399.

Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, Hendrix D, Jurka J, Kapitonov V, Ovcharenko I, Putnam NH, Shu S, Taher L, Blitz IL, Blumberg B, Dichmann DS, Dubchak I, Amaya E, Detter JC, Fletcher R, Gerhard DS, Goodstein D, Graves T, Grigoriev IV, Grimwood J, Kawashima T, Lindquist E, Lucas SM, Mead PE, Mitros T, Ogino H, Ohta Y, Poliakov AV, Pollet N, Robert J, Salamov A, Sater AK, Schmutz J, Terry A, Vize PD, Warren WC, Wells D, Wills A, Wilson RK, Zimmerman LB, Zorn AM, Grainger R, Grammer T, Khokha MK, Richardson PM, Rokhsar DS. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*. 2010 Apr 30;328(5978):633-636.

Hirsch N, Zimmerman LB, Grainger RM. *Xenopus*, the next generation: *X.tropicalis* genetics and genomics. *Dev Dyn*. 2002 Dec;225(4):422-433.

Horvay K, Claussen M, Katzer M, Landgrebe J, Pieler T. *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev Biol*. 2006 Mar 1;291(1):1-11.

Houston DW, King ML. A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development*. 2000 Feb;127(3):447-456.

Houston DW, Zhang J, Maines JZ, Wasserman SA, King ML. A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* *boule*. *Development*. 1998 Jan;125(2):171-180.

Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Schöler HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003 May 23;300(5623):1251-1256.

Ikenishi K. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev Growth Differ*. 1998 Feb;40(1):1-10.

Ikenishi K, Tanaka TS. Involvement of the protein of *Xenopus* *vasa* homolog (*Xenopus vasa*-like gene 1, *XVLG1*) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev Growth Differ*. 1997 Oct;39(5):625-633.

Kamimura M, Ikenishi K, Kotani M, Matsuno T. Observations on the migration and proliferation of gonocytes in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*. 1976 Aug;36(1):197-207.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):1001-1012.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*. 2003 Aug;69(2):612-616.
- Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, Takase M, Yaoita Y. *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim*. 2010;59(4):395-405.
- Kato K, Gurdon JB. Single-cell transplantation determines the time when *Xenopus* muscle precursor cells acquire a capacity for autonomous differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Feb 15;90(4):1310-1314.
- Kelley, DB. 9 Sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Symposia of the Zoological Society of London*. 1996 No. 68. London: The Society, 1960-1999.
- Khokha MK, Chung C, Bustamante EL, Gaw LW, Trott KA, Yeh J, Lim N, Lin JC, Taverner N, Amaya E, Papalopulu N, Smith JC, Zorn AM, Harland RM, Grammer TC. Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev Dyn*. 2002 Dec;225(4):499-510.
- Graf JD, Kobel HR. Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol*. 1991;36:19-34.
- Kroll KL, Amaya E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development*. 1996 Oct;122(10):3173-3183.
- Krylov V, Kubickova S, Rubes J, Macha J, Tlapakova T, Seifertova E, Sebkova N. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosome Res*. 2010 Jun;18(4):431-439.
- Krylov V, Tlapakova T, Macha J. Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res*. 2007;116(1-2):110-112.
- Lillie, FR. Sex-determination and sex-differentiation in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1917 3.7: 464.
- Lenhoff, HM. Ethel Browne, Hans Spemann, and the discovery of the organizer phenomenon. *The Biological Bulletin*. 1991 181.1 : 72-80.

- MacArthur H, Bubunenko M, Houston DW, King ML. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev*. 1999 Jun;84(1-2):75-88.
- Machado RJ, Moore W, Hames R, Houliston E, Chang P, King ML, Woodland HR. *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning. *Dev Biol*. 2005 Nov 15;287(2):289-300.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-7638.
- Matsui Y, Okamura D. Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. *Bioessays*. 2005 Feb;27(2):136-43.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1489-1493.
- Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*. 1991 Oct;113(2):613-624.
- Nayernia K, Li M, Jaroszynski L, Khusainov R, Wulf G, Schwandt I, Korabiowska M, Michelmann HW, Meinhardt A, Engel W. Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. *Hum Mol Genet*. 2004 Jul 15;13(14):1451-1460.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976 Apr 29;260(5554):799-802.
- O'Rourke, DP. Amphibians used in research and teaching. *ILAR Journal* 2007 48.3: 183-187.
- Offield MF, Hirsch N, Grainger RM. The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development*. 2000 May;127(9):1789-1797.
- Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, Shikina S, Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev*. 2006 Dec;52(6):685-93.
- Pan FC, Chen Y, Loeber J, Henningfeld K, Pieler T. I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus*. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):247-252.
- Plessis A, Perrin A, Haber JE, Dujon B. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*. 1992 Mar;130(3):451-460.

- Raz E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol.* 2000;1(3):1017.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet.* 1995 Aug;10(4):383-393.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1992 Oct 8;359(6395):550-551.
- Ressom RE, Dixon KE. Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development.* 1988 Jul;103(3):507-518.
- Robb DL, Heasman J, Raats J, Wylie C. A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell.* 1996 Nov 29;87(5):823-831.
- Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, Yamaha E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod.* 2008 Jan;78(1):159-166.
- Sakamaki K, Takagi C, Yoshino J, Yokota H, Nakamura S, Kominami K, Hyodo A, Takamune K, Yuge M, Ueno N. Transgenic frogs expressing the highly fluorescent protein venus under the control of a strong mammalian promoter suitable for monitoring living cells. *Dev Dyn.* 2005 Jun;233(2):562-569.
- Shapiro, HA., Zwarenstein H. A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature* 1934;133:May 19: 762.
- Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zaraisky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods.* 2007 Sep;4(9):741-746.
- Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum Reprod.* 2002 Jan;17(1):55-62.
- Smith SA, Stoskopf MK. Introduction: the art of amphibian science. *ILAR J.* 2007;48(3):179-182.
- Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 10;1489(1):141-158.
- Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997 Jun;7(3):187-195.
- Sutton KA. Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev Reprod.* 2000 May;5(2):93-98.

- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*. 1993 Sep;40(3):509-519.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-676..
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod*. 2003 Oct;69(4):1142-1149.
- Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1981 Aug;64:133-147.
- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev*. 2002 Oct;118(1-2):91-8. Erratum in: *Mech Dev*. 2003 Feb;120(2):267.
- Thierry A, Perrin A, Boyer J, Fairhead C, Dujon B, Frey B, Schmitz G. Cleavage of yeast and bacteriophage T7 genomes at a single site using the rare cutter endonuclease I-Sce I. *Nucleic Acids Res*. 1991 Jan 11;19(1):189-90.
- Tournaye H, Goossens E. Adult stem cell population in the testis. *Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential* (2006): 79.
- Trueb L, Púgener LA, Maglia AM. Ontogeny of the bizarre: an osteological description of *Pipa pipa* (Anura: pipidae), with an account of skeletal development in the species. *J Morphol*. 2000 Jan;243(1):75-104.
- Uno Y, Nishida C, Yoshimoto S, Ito M, Oshima Y, Yokoyama S, Nakamura M, Matsuda Y. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. *Chromosome Res*. 2008;16(7): 999-1011.
- Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, Dumstrei K, Wise C, Lovell-Badge R, Thisse C, Thisse B, Raz E. dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol*. 2003 Aug 19;13(16):1429-1434.
- Wells DE, Gutierrez L, Xu Z, Krylov V, Macha J, Blankenburg KP, Hitchens M, Bellot LJ, Spivey M, Stemple DL, Kowis A, Ye Y, Pasternak S, Owen J, Tran T, Slavikova R, Tumova L, Tlapakova T, Seifertova E, Scherer SE, Sater AK. A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol*. 2011 Jun 1;354(1):1-8.

Whittington PM, Dixon KE. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*. 1975 Feb;33(1):57-74.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 1988 Dec 15;336(6200):684-687.

Wylie C. Germ cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 Aug;10(4):410-413.

Zhu Y, Hu HL, Li P, Yang S, Zhang W, Ding H, Tian RH, Ning Y, Zhang LL, Guo XZ, Shi ZP, Li Z, He Z. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian J Androl*. 2012 Jul;14(4):574-579.