

## Abstrakt

Sertoliho buňky (SCs) produkují celou řadu molekul klíčových pro determinaci samčího pohlaví a pro regulaci spermatogeneze v dospělosti. Poruchy diferenciaci Sertoliho buněk vedou u člověka ke sterilitě. Před nástupem puberty hrají důležitou roli v udržení spermatogoniálních buněk v kmenovém stavu a zajišťují tak jejich dostatečný počet. Zajímavým znakem odlišujícím nezralé a zralé Sertoliho buňky je dočasná přítomnost cytokeratinu, který byl u těchto buněk popsán u celé řady modelových organismů. V rámci této disertační práce jsme se zabývali rozdílnou genovou expresí proteinů spojených s regulací cytokeratinu u nezralých a zralých Sertoliho buněk odvozených z varlat Drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*). Imunohistochemické řezy varlat z juvenilních jedinců a imunocytochemická analýza buněčné kultury odvozené ze stejného zdroje, obsahující nezralé progenitory Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk (XtiSC) ukázaly na společnou expresi cytokeratinu a membránového  $\beta$ -kateninu. V případě vzorku z dospělých jedinců nebyla detekována přítomnost ani jednoho z nich. Dále pak podobný fenotyp vykazovaly i migrující Sertoliho buňky (pre-SCs), které se nacházely mimo semenotvorné kanálky. I zde byla exprese obou proteinů potlačena. Přidání inhibitoru glykogen syntázy kinázy 3, CHIR99021, k buněčné kultuře XtiSC vedlo k dediferenciaci přítomných buněk do kmenového stavu a k rozšíření jejich diferenciacního potenciálu.

Role cytokeratinu a dalších proteinů zahrnujících  $\beta$ -katenin a Sox9, marker Sertoliho buněk, na diferenciaci Sertoliho buněk nebyla dosud prozkoumána. V rámci předložené disertační práce jsme se zabývali vztahem mezi cytokeratinem a membránovým  $\beta$ -kateninem včetně příslušných mezibuněčných spojů (cell junctions) u nezralých Sertoliho buněk. Reverzibilní destrukce cytokeratinové sítě pomocí akrylamidu vedla u XtiSC buněk ke ztrátě membránového  $\beta$ -kateninu. F-aktin,  $\beta$ -tubulin nebo proteiny buněčné adheze (kináza fokálních adhezí - FAK a integrin  $\beta$ 1) nebyly akrylamidem ovlivněny. Na druhou stranu narušení membránového  $\beta$ -kateninu pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  chelatačního činidla EGTA nezpůsobilo vážnější dezintegraci cytokeratinové sítě. Výsledky ukazují na novou roli cytokeratinu pro stabilizaci

mezibuněčných spojů závislých na  $\beta$ -kateninu v nezralých Sertoliho buňkách. Tato stabilizace je klíčová pro udržení spermatogonií ve stavu dělících se buněk bez meiotického zrání v rámci pre-pubertálních varlat a dále pak pro správné formování semenotvorných kanálků.

Epitelo-mezenchymální tranzice (EMT) a mezenchymo-epiteliální tranzice (MET) patří mezi základní buněčné procesy v zárodečném vývoji. EMT je charakterizovaná jako přeměna adhezivních buněk epiteliálního typu na mezenchymální typ schopný migrace. MET pak představuje obrácený proces. Nezralé Sertoliho buňky (XtiSC) vykazují mezenchymální fenotyp. Za fyziologických *in vivo* podmínek musí tyto buňky podstoupit MET a diferencovat se ve zralé Sertoliho buňky. V laboratoři školitele se podařilo založit dlouhodobou buněčnou kulturu odvozenou z varlat juvenilních jedinců *X. tropicalis*. Expresní profil buněk obsahoval markery nezralých Sertoliho buněk jako Sox9, vimentin, cytokeratin a  $\beta$ -katenin. V první publikaci, která je součástí disertační práce byly tyto buňky zkracovány jako XtTSC (*Xenopus tropicalis* Testicular Somatic Cells). V dalších dvou rukopisech jsou popisovány jako nezralé Sertoliho buňky, XtiSC (*Xenopus tropicalis* immature Sertoli Cells). Cílem předložené disertační práce byla identifikace faktorů odpovědných za indukci epitelo-mezenchymální tranzice u XtiSC a nalezení tzv. “kmenového okna” (stemness window), ve kterém buňky vykazují nejširší diferenciační potenciál. K tomuto účelu jsme zvolili GSK-3 inhibitor (CHIR99021) a dále pak FGF2 a/nebo TGF- $\beta$ 1 ligandy. Třídenní ošetření XtiSC buněčné kultury GSK-3 inhibitorem vedlo ke kompletní EMT. FGF2 vedl pouze k částečné tranzici do mezenchymálního fenotypu. Na druhou stranu TGF- $\beta$ 1 měl vliv na senescenci nikoliv na EMT. Působení CHIR99021 bylo patrné jak na úrovni změny buněčné morfologie (vřetenovitý tvar buněk), ale také na zvýšené expresi mezenchymálních proteinů jako je fibronectin, integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, Snai1 a Zeb1 a na snížené expresi epiteliálního markeru, cytokeratinu. Navíc ošetření buněk GSK-3 inhibitorem vedlo ke zvýšení markerů typických pro kmenové buňky, jako např. Sox2 a *cd44*. To mělo za následek schopnost XtiSC diferencovat do chondrocytů *in vitro* a kardiomyocytů *in vivo* po jejich mikroinjekci do peritoneálního prostoru pulců *X. tropicalis*. XtiSC buňky po EMT tranzici migrovaly k nádorovým buňkám cervikálního karcinomu a do místa po

indukovaném poranění. Výsledky této disertační práce umožní lepší pochopení mezibuněčné signalizace, která stojí za přípravou kmenových buněk odvozených z varlat. Navíc XtiSC buňky představují nový model pro studium epitel-mezenchymální tranzice v rámci zrání Sertoliho buněk a spermatogeneze.