

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Lucie Slovákova

Diferenciace progenitorů Sertoliho buněk a příprava testikulárních 3D kultur
Xenopus tropicalis

Differentiation of Sertoli cell progenitors and preparation of testicular 3D
cultures of *Xenopus tropicalis*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Tereza Tlapáková, PhD.

Praha, 2021

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

V Praze, 11.8.2021



.....

Bc. Lucie Slovák

Tento prostor bych ráda využila k poděkování mé školitelce a ostatním členům laboratoře vývojové biologie. Z upřímného srdce děkuji Mgr. Ing. Jirímu Vávrovi za podporu, pomoc a hlavně nezapomenutelné zážitky. Děkuji i členům spřátelené laboratoře buněčné imunologie.

Srdečné, výjimečné děkuji patří spřízněné duši Matoušovi, mé Karolíně, milým rodičům a celé rodině za neskutečnou podporu, která není samozřejmá a velmi si ji vážím.

“I cesta může být cíl”

- Mňága a Žďorp, 1995

Abstrakt

Sertoliho buňky jsou jediné somatické buňky nacházející se v přímém kontaktu se zárodečnými buňkami. Tyto buňky jsou významnými mediátory procesů vedoucích k vývoji testikulárního niche během embryonálního vývoje. Jejich role v postnatálních varlatech spočívá v regulaci a výživě zárodečných buněk i v tvorbě imunoprotektivní hematotestikulární bariéry. V laboratoři školitelky byla úspěšně založená kultura představující nezralé Sertoliho buňky odvozené z varlat samce *X. tropicalis* (XtiSCs). V této práci jsem se zabývala indukcí diferenciací XtiSCs v dospělé Sertoliho buňky. *In vitro* pokusy nepotvrdily diferenciaci buněk v dospělé Sertoliho buňky po stimulaci různými faktory ani po použití primární kultury z 4-letého samce *X. tropicalis*. Částečný diferenciační proces byl navozen při použití pre-pubertální myší buněčné linie TM4. Výsledky práce naznačují možný potenciál XtiSCs diferencovat v dospělé SCs. Dále byla v práci testována schopnost testikulárních buněk juvenilních samců *X. tropicalis* formovat *de novo* organoidy. *In vitro* pokusy prokázaly schopnost buněk formovat testikulární organoidy v třívrstevném matrigelu.

Klíčová slova: *Xenopus tropicalis*, Sertoliho buňky, diferenciací Sertoliho buněk, semenotvorné kanálky, testikulární organoidy, 3D kultivační systém

Abstract

Sertoli cells represent the only somatic cell type within the seminiferous tubules with direct contact to germ cells. Sertoli cells significantly contribute to the development of the testicular niche in a male embryo. Their role during postnatal life is in the regulation and nutrition of germ cells and the formation of the blood-testis barrier to protect these cells. In our laboratory, we have been successful in establishing a cell line of *X. tropicalis* immature Sertoli cells (XtiSCs) derived from juvenile testes of *X. tropicalis*. The objective of this thesis was to induce the differentiation process of XtiSCs into mature Sertoli cells. *In vitro* experiments using several factors or primary culture from adult male *X. tropicalis* did not show any mature markers in differentiated XtiSCs. Another experiment using cell culture derived from pubertal mice was partially successful in the induction of the differentiation process. These results indicate that XtiSCs do have some differentiation potential into mature Sertoli cells. Part of this work was to test the ability of testicular cells isolated from juvenile males of *X. tropicalis* to form *de novo* organoids. *In vitro* experiments were successful when these cells were cultured in a three-layer matrigel.

Keywords: *Xenopus tropicalis*, Sertoli cells, differentiation of Sertoli cells, seminiferous tubules, testicular organoids, 3D culture systems

Obsah

1. Úvod	9
2. Literární úvod	10
2.1. Struktura, funkce a vývoj varlat	10
2.2. Vnitřní prostředí varlat	11
2.2.1. Intersticiální prostor	12
2.2.2 Peritubulární prostor	14
2.2.3 Semenotvorný kanálek	15
2.3 Diferenciace a zrání Sertoliho buněk	21
2.4 Progenitory Sertoliho buněk <i>Xenopus tropicalis</i>	24
2.5 Testikulární organoidy – přístupy a potenciál	24
3. Cíle & hypotézy práce	27
4. Materiál	28
4.1. Pokusná zvířata	28
4.2 Buněčné kultury	28
4.3 Média	28
4.3.1 Kultivační média	28
4.3.2 Disociační médium	30
4.3.3 Ředící médium pro 3D kultivace	30
4.4. Roztoky a chemikálie	30
4.4.1 Roztoky pro IVF (<i>in vitro</i> fertilizace)	30
4.4.2. Analýza genové exprese	30
4.4.3. Protilátky	33
4.4.4 Další roztoky a chemikálie	33
4.4.5 Použité přístroje a materiál	34
5. Metody	35
5.1. Kultivace a příprava XtiSCs	36
5.2 Diferenciace XtiSCs v maturované SCs	36
5.3 <i>In vitro</i> fertilizace	39
5.4 Příprava testikulární suspenze	39
5.5 Metody 3D kultivace	40
5.5.1. Kultivace ve dvouvrstevné agaróze	40
5.5.2. Kultivace v matrigelu	42
5.6 Reverzní transkripce a PCR	43
5.7 Histologické barvení řezů varlat	44

5.8 Kryosekce varlat s následným imunofluorescenčním barvením	45
5.9 Duální imunocytochemické barvení	46
5.10 Imunofluorescenční barvení organoidů	46
6. Výsledky.....	47
6.1 Dynamika vývoje Sertoliho buněk u <i>Xenopus tropicalis</i>	47
6.2 Charakterizace kolonií XtiSCs	49
6.3 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky.....	51
6.4 Příprava organoidů z testikulární suspenze <i>X. tropicalis</i>	58
6.4.1 Kultivace ve dvouvrstevné agaróze	58
6.4.2 Kultivace v savčím matrigelu	61
6.5 Pilotní charakterizace testikulárních organoidů <i>X. tropicalis</i>	64
7. Diskuze.....	65
8. Závěr.....	74
9. Seznam literatury.....	75

Seznam zkratek

ABP/SHBG – *Androgen-Binding Protein* – Androgen-vázající protein

AMH – *Anti-Müllerian hormone* – Anti-Müllerianský hormon

AR – *Androgen receptor* – Androgenní receptor

BTB – *Blood-testis barrier* – Hematotestikulární bariéra

cAMP – *Cyclic adenosine monophosphate* – Cyklický adenosin monofosfát

cGMP – *Cyclic guanosine monophosphate* – Cyklický guanosin monofosfát

ECM – *Extracellular matrix* – Extracelulární matrix

ES – *Ectoplasmic specializations* – Ektoplazmatické specializace

FBS – *Fetal bovine serum* – Fetální bovinní sérum

FSH – *Follicle-stimulating hormone* – Folikulstimulující hormon

GCs – *Germ cells* – Zárodečné buňky

GDNF – *Glial cell line-derived neurotrophic factor*

– Neurotrofický růstový faktor odvozený od gliálních buněk

hCG – *Human chorionic gonadotropin* – lidský choriogonadotropin

IF – *Intermediate filament* – Intermediární filamenta

IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1* – Insulinu podobný růstový faktor 1

LCs – *Leydig cells* – Leydigovy buňky

LH – *Luteinizing hormone* – Luteinizační hormon

MSCs – *Mesenchymal stem cells* – Mesenchymální kmenové buňky

PGCs – *Primordial germ cells* – Primordiální zárodečné buňky

PTMCs – *Peritubular myoid cells* – Peritubulární myoidní buňky

RA – *Retinoic acid* – Kyselina retinová

SC – *Sertoli cells* – Sertoliho buňky

SSCs – *Spermatogonial stem cells* – Spermatogoniální kmenové buňky

TBK – *Tubulobulbar complex* – Tubulobulbární komplex

tMφ – *Testicular macrophages* – Makrofágy varlat

1. Úvod

Moderní svět přináší společnosti řadu výhod, které usnadňují a vylepšují běžný život. Ať už se jedná o nejnovější technologie v oblasti komunikace, dopravy, lékařství a farmacie nebo zemědělství a průmyslu. Všechna tato odvětví hrají významnou roli v životě jedince. S technologickým pokrokem se pojí i jeho nepříznivá stránka v podobě změn klimatu, zvyšující se UV radiace a především zvyšující se množství produkovaných polutantů v ovzduší, ve vodě i v potravinách. Životní prostředí, ve kterém se jedinec nachází ovlivňuje a alternuje jeho hormonální systém, což může vést k poškození reprodukce nebo i ztrátě fertility. Reproductivní medicína není jen velké téma na poli vědeckém, ale především společenském.

Molekulární mechanismy vedoucí ke změnám reprodukčního systému nejsou stále zcela objasněny. Velkou výhodou je vysoká evoluční konzervovanost samčího reprodukčního systému napříč obratlovci (Grier *et al.*, 2016). V posledním desetiletí dochází díky zvyšování endokrinních disruptantů v prostředí k dramatickým úbytkům populací obojživelníků (Blaustein *et al.*, 2011). Důvodem je vysoká senzibilita obojživelníků na okolní prostředí. Obojživelníci nyní představují slibný model pro studium mechanismů účinků toxických látek i pro modelaci lidských onemocnění reprodukčního systému a poruch hormonální signalizace. Kvůli komplexnímu uspořádání testikulárního niche a jeho specifické funkci tvořit spermie, je vhodnější využít pro *in vitro* studie 3D kultivační systémy. Tyto systémy umožňují tvorbu testikulárních organoidů, které mají potenciál mimikovat fyziologii varlat *in vivo*. V této práci se věnuji přípravě testikulárních organoidů z žab rodu *X. tropicalis*. Formace testikulárních organoidů jsou schopny pouze buňky izolovány z juvenilních samců, což se následně odráží i v nezralém fenotypu organoidů a v neschopnosti produkovat spermie (Alves-Lopes *et al.*, 2017; Yokonishi *et al.*, 2013). Varlata jsou jedny z mála orgánů, u kterých dochází k finální maturaci testikulárních buněk až v pozdější fázi života jedince. Je to právě kvůli spermatogenezi, kterou je potřeba pozdržet do doby, než je tělo připraveno na reprodukci. V období puberty dochází k maturačním procesům somatických buněk, které následně stimulují tvorbu spermií. Mezi nejvýznamnější buňky testikulárního niche patří Sertoliho buňky.

V laboratoři školitelky byla úspěšně založena buněčná kultura XtISC představující populaci nezralých Sertoliho buněk *X. tropicalis* odvozených z varlat juvenilního samce. Tato kultura by mohla představovat jednoduše dostupný zdroj pro produkci zralých Sertoliho buněk. Diplomová práce se věnuje indukci diferenciaci XtISCs ve zralé Sertoliho buňky působením vybraných látek a jejich charakterizaci.

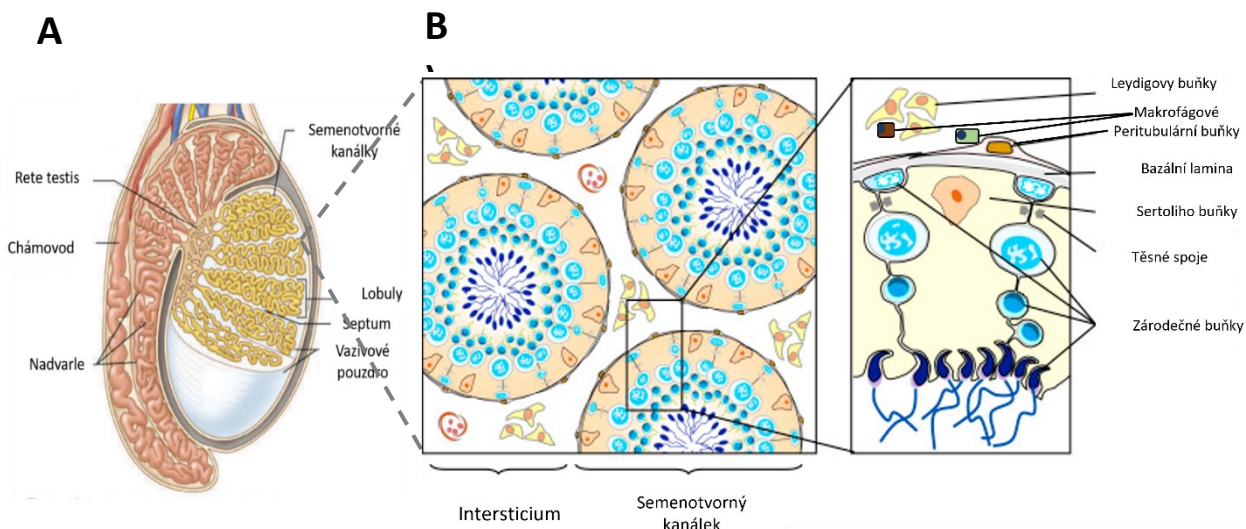
2. Literární úvod

2.1. Struktura, funkce a vývoj varlat

Gonády obratlovců se zakládají velmi časně během embryonálního vývoje. Ke vzniku gonád dochází ve chvíli, kdy populace buněk označována jako primordiální zárodečné buňky (PGCs) migruje přes mezoderm zadního střeva a usadí se v genitálních rýhách. Zde PGCs spolu s okolními somatickými epiteliálními buňkami coelomu formují zárodečný epitel a tvorbu gonád. U samců dochází k diferenciaci PGCs ve spermatogoniální kmenové buňky (SSCs). Epiteliální populace buněk záhy diferencuje do Sertoliho buněk (SCs), které bohatě proliferují a shlukují se okolo SSCs, čímž je uzavírají uvnitř tubulů (Grier *et al.*, 2016). U pulců rodu *Xenopus* jsou gonády zpočátku indiferentní. K začátku diferenciaci buněk na samčí nebo samičí typ dochází ve stádiu NF53 (Nieuwkoop-Faberovo stádium 53), plně diferencovanou strukturu varlat lze pozorovat ve stádiu NF62 (Piprek *et al.*, 2019).

Varlata (*testes*) jako samčí pohlavní orgán produkují haploidní pohlavní buňky spermie v procesu zvaném spermatogeneze. Správné uspořádání i funkce tohoto orgánu jsou zcela klíčové pro přenos genetické informace a potenciální tvorbu potomstva. Mimo jiné zde dochází i k produkci významných hormonů, především testosteronu. V průběhu embryonálního vývoje nebo krátce po narození varlata u většiny savců sestupují z dutiny břišní do vychlípeného kožního obalu – šourku. Mezi savci lze nalézt i evoluční výjimky, které mají varlata umístěná uvnitř dutiny břišní blízko ledvin (Kleisner *et al.*, 2010). U ptáků, plazů, ryb i obojživelníků varlata nesestupují a lze je nalézt v posteriorní dorsální části břišní dutiny poblíž ledvin (Yu, 1998).

Obecně je povrch varlete krytý vazivovým pouzdrém (*tunica albuginea*) (Obr. 1A). Toto pouzdro se zanořuje směrem dovnitř varlete a vytváří septa, čímž jej rozděluje na jednotlivé laloky. Uvnitř laloků se nacházejí semenotvorné kanálky, které se spojují v systém štěrbin a tubulů do *rete testis*, odkud jsou již diferencované haploidní buňky (spermatozoa) vháněny testikulární tekutinou do vývodných cest pohlavních a směřovány do nadvarlete. Při průchodu nadvarletem spermatozoa postupně dozrávají v pohyblivé a fertlní spermie, nadvarlata zároveň fungují jako uložistiště spermií. Během ejakulace jsou spermie spolu se seminální plazmou uvolněny do chámovodu a dále přes močovou trubici z těla ven.



Obr. 1 Anatomie varlat A) Schématické makroskopické zobrazení varlat (převzato a upraveno z Pearson Education, Inc., 2003) **B)** Schématické zobrazení intratestikulární organizace varlat (převzato a upraveno z Rolland et al., 2008).

2.2. Vnitřní prostředí varlat

Spermatogeneze je velmi komplexní proces. SSCs podstupují proliferaci, diferenciaci, meiotické dělení a dále transformaci, aby v závěru daly vzniknout spermii schopným oplození. Je to proces vyžadující vysoce specifické a organizované mikroprostředí (niche), které má napříč obratlovcí velice konzervovanou morfologii i funkci (Grier *et al.*, 2016). Tradičně lze niche rozdělit na dva anatomicky odlišné prostory (Obr. 1B); semenotvorné kanálky a intersticiální prostor. Spermatogeneze se odehrává výhradně ve vnitřním prostoru semenotvorných kanálků, kde je každý kanálek tvořen vnitřní vrstvou zárodečného epitelu. Vnitřní prostor kanálků obsahuje pouze zárodečné buňky (GCs) v různých stádiích diferenciaci a somatické Sertoliho buňky. Sertoliho buňky oddělují zárodečné buňky od okolního prostředí tvorbou hematotestikulární bariéry (BTB) a umožňují těmto buňkám „hladký průběh“ meiotického zrání, které musí proběhnout precizně a bez narušitelů jak tělu cizích, tak těch vlastních. Vnější vrstvu kanálků tvoří peritubulární myoidní buňky (PTMCs). Prostor mezi jednotlivými kanálky je vyplněn řídkým vazivem bohatým na fibroblasty, leukocyty a steroidogenní Leydigovy buňky (LCs), dále je protkáno sítí kapilár a nervovým zásobením (Holstein *et al.*, 2003; Propper, 2011).

Testikulární niche patří mezi jedno z imunologicky privilegovaných prostředí schopné tolerovat nejen autoantigenní zárodečné buňky ale i allo-transplantované štěpy (Head a Billingham, 1985). Díky komplexním mechanismům regulace i imunoregulace a dále mezibuněčné komunikaci celého niche je zde utvářen vsutku organizovaný orchestr procesů, který má za úkol dát vzniku jediné populaci buněk přecházející do další generace – spermii. Pro jejich vznik je struktura a fungování niche zásadní. Poškození testikulárního niche mohou vést k narušení spermatogeneze i ke kompletní ztrátě fertility samců.

2.2.1. Intersticiální prostor

Leydigovy buňky

Jak již bylo zmíněno, mezikanálkový prostor představuje zázemí pro LCs. Tyto buňky jsou charakteristické výrazným jádrem, vyšším počtem mitochondrií a četnými lipidovými kapénkami v cytoplazmě. Jejich tvar je kulovitý nebo mnohostěnný. Během vývoje varlat vznikají u savců dvě odlišné populace LC buněk. Fetální LCs, které diferencují v prenatalním období, a adultní LCs, které se objevují až postnatálně (Roosen-Runge a Anderson, 1959; Mancini *et al.*, 1963). Fetální LCs vznikají z mesenchymálních fibroblastů z oblasti mezonefros, odkud fibroblasty migrují do budoucích varlat a dochází k diferenciaci v LCs (Merchant-Larios a Moreno-Mendoza, 1998; Nishino *et al.*, 2001). Fetální LCs se zásadně podílejí na maskulinizaci plodu (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). Po narození jedince se nakrátko prudce snižuje produkce testosteronu, což způsobí masivní úbytek fetálních LCs (DeFalco *et al.*, 2013). Fetální populace je takto postupně nahrazena progenitory adultních LCs. Tyto progenitory nejdříve bohatě proliferují a s nástupem pohlavní dospělosti pak terminálně diferencují v maturované steroidogenní adultní LCs, které skrze produkci testosteronu pozitivně ovlivňují vývoj sekundárních pohlavních znaků a iniciaci i průběh spermatogeneze. Zahájení puberty je řízeno pomocí luteinizační hormonu (LH), avšak zahájení fetálního vývoje varlat se ukázalo na produkci LH nezávislé (DeFalco *et al.*, 2013).

Mezi stěžejní funkce LCs patří biosyntéza hormonu testosteronu. Testosteron je zodpovědný za vývoj varlat, rozvoj sekundárních pohlavních znaků a dále ovlivňuje množství fyziologických procesů v těle včetně spermatogeneze. Jeho produkce je regulována hypothalamo-hypofyzárně-gonadální osou. LH produkován adenohypofýzou a sekretován krevním řečištěm do varlat se zde váže na svůj receptor spřažený s G-proteinem exprimovaným

právě na povrchu LCs. Tím se stimuluje produkce cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), který dále aktivuje signální dráhy vedoucí k modulaci genové exprese, transkripci genů a následně vzniku proteinů zapojených do biosyntézy testosteronu (Duarte *et al.*, 2012). Na modulaci transkripce genů nutné pro steroidogenezi se také podílí cyklický guanosin monofosfát (cGMP) (Andric *et al.*, 2007). Kódované proteiny jsou nezbytné pro postupnou úpravu uhlíkaté kostry cholesterolu, který je obecně výchozí molekulou pro syntézu steroidních hormonů (Duarte *et al.*, 2012). Produkovaný testosteron je následně distribuován z LCs do okolních semenotvorných kanálků, kde se podílí na diferenciaci zárodečných buněk a tvorbu spermií. Zároveň je testosteron vylučován do krevního řečiště a rozváděn do ostatních cílových tkání v těle. Nedostatek testosteronu je spojován nejen se sexuální dysfunkcí mužů, ale také se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění (Kilby *et al.*, 2021), řídnutím kostí, zvýšenou obezitou a následným rozvojem Diabetu Mellitu 2. typu (Zarotsky *et al.*, 2014).

Leukocyty

Kromě steroidogenních LCs lze v mezikanálkovém prostoru pozorovat leukocyty, a to především makrofágy (tM ϕ), který zde tvoří nejpočetnější populaci ze skupiny imunitních buněk (Pöllänen a Niemi, 1987). V dospělém varletu savců byly charakterizovány dvě odlišné populace rezidentních tM ϕ . Na vnějším povrchu semenotvorných kanálků byla popsána populace peritubulárních tM ϕ , zatímco v intersticiálním prostoru poblíž cév a v kontaktu s LCs se nacházejí intersticiální tM ϕ . Obě populace vznikají z různých zdrojů, liší se morfologicky a exprimují jiné povrchové znaky (DeFalco *et al.*, 2015; Mossadegh-Keller *et al.*, 2017; Lokka *et al.*, 2020).

Během embryonálního vývoje tM ϕ přispívají k vývoji varlat skrze mediaci vaskularizace (DeFalco *et al.*, 2014). V dospělém jedinci jejich úloha spočívá nejen v zachování imunologicky privilegovaného prostředí semenotvorných kanálků (Wang *et al.*, 2017), ale i ve stimulaci steroidogeneze díky sekreci 25-hydroxycholesterolu (Nes *et al.*, 2000). Také se ukazuje, že produkcí některých faktorů, jako je kyselina retinová (RA) a kolonie-stimulující faktor 1 (CSF-1), jsou tM ϕ schopny regulovat SSCs (DeFalco *et al.*, 2015). Tyto relativně nově objevené role tM ϕ celkově naznačují jejich mnohem větší přínos v regulaci celého testikulárního niche. Nicméně recentní experimenty Emmi Lokka a jejího týmu rozporují současné paradigma a poukazují na skutečnost, že přítomnost a působení tM ϕ je esenciální pro spermatogenezi pouze v prenatálním období nikoli postnatálně (Lokka *et al.*, 2020). Významná

je role tM ϕ v imunoregulaci. Spermatogeneze je zahájena s nástupem puberty ve chvíli, kdy má tělo již plně vyvinutý imunitní systém. Vzniklé haploidní zárodečné buňky je potřeba chránit před autoimunitními reakcemi. Jeden ze způsobů ochrany je zajisté BTB formovaná dvojicemi SCs. Tato bariéra avšak není absolutní a autoantigeny meiotických zárodečných buněk unikají skrze ni do intersticia (Tung *et al.*, 2017). Zdá se, že právě peritubulární tM ϕ obepínající semenotvorné kanálky zde fungují jako antigen prezentující buňky, fagocytují tyto autoantigeny a následně je vystavují na svém povrchu (Mossadegh-Keller *et al.*, 2017). Jinou roli hrají intersticiální tM ϕ , kteří sekretují vysoké hladiny protizánětlivých cytokinů IL-10 a přispívají tak k imunosupresivnímu prostředí varlat (Mossadegh-Keller *et al.*, 2017).

2.2.2 Peritubulární prostor

Peritubulární myoidní buňky

Součástí semenotvorných kanálků jsou peritubulární myoidní buňky, které tvoří jejich vnější vrstvu. PTMCs lze pozorovat u většiny savců včetně člověka, u plazů a některých obojživelníků např. rodu *Xenopus* (Davidoff *et al.*, 1990; Maekawa *et al.*, 1996; Unsicker a Burnstock, 1975; Unsicker, 1975). Původ buněk není stále zcela jasný. Některé starší studie naznačují jejich původ v buňkách mezonefros (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios a Moreno-Mendoza, 1998). Nicméně tyto studie byly později rozporovány a ukázalo se, že migrující buňky z mezonefros diferencují pouze v populaci endoteliálních buněk varlat (Combes *et al.*, 2009). Stejní autoři dále navrhují možnost vzniku PTMCs buď diferenciací z jiných testikulárních buněk, nebo přímo z coelomových epiteliálních buněk. K podobným závěrům se přiklání i laboratoř školitelky, kde byla popsána existence společného progenitoru PTMCs a Sertoliho buněk u žáby rodu *Xenopus tropicalis*. Tyto progenitory byly pozorovány i v myších varlatech (Tlapakova *et al.*, 2016). Recentní studie savčích varlat naopak poukazují na existenci populace prepubertálních prekurzorů pro PTMCs a Leydigových buněk (Zhao *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020). Důvodem stálých nejasností ohledně původu PTMCs by mohl být nedostatek specifických genů během jejich raného vývoje, které by tyto buňky odlišily, nebo také možná existence vícero populací v rámci PTMCs.

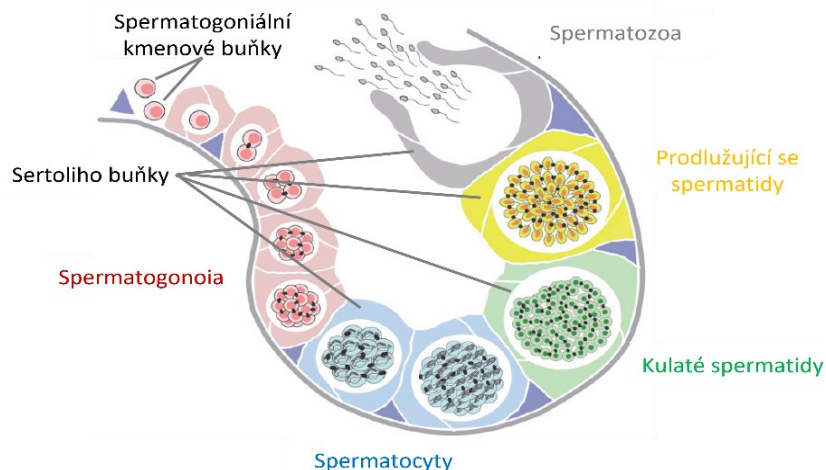
PTMCs obklopují a utvářejí okolo kanálků peritubulární stěnu složenou z jedné až šesti vrstev buněk proloženými vrstvami extracelulární matrix (ECM) (Domke a Franke, 2019). Jejich morfologie je typicky štíhlá a podlouhlá, často obsahující nahusto sbalené struktury.

PTMCs jsou podobné buňkám hladkého svalstva, což PTMCs dokazují produkcí α -aktinu hladkého svalstva (Acta2), myozinového lehkého a těžkého řetězce i dalších proteinů, které jsou součástí kontraktálního aparátu běžného svalového vlákna (Domke a Franke, 2019). Tyto buňky poskytují strukturní oporu semenotvorným kanálkům a hrají významnou roli v intratestikulárním transportu nepohyblivých spermatozoí, kdy prostřednictvím rytmických kontraktálních a uvolňovacích pohybů kanálků dochází k vypuzení spermatozoí do *rete testis*. Významnost PTMCs pro funkci varlat demonstruje snížená až zcela utlumená produkce kontraktálních proteinů u infertilních mužů (Welter *et al.*, 2012). Umístění peritubulárních buněk dále naznačuje jejich roli v sekreci signálních molekul. Jednou z významných sekretovaných molekul PTMCs je neurotrofický růstový faktor odvozený od gliálních buněk (GDNF), který je produkován také Sertoliho buňkami. Sekrece GDNF je nezbytná pro regulaci sebeobnovy SSCs a udržení spermatogeneze (Spinnler *et al.*, 2010). Ukazuje se, že produkce GDNF ze strany PTMCs je dokonce esenciální pro udržení zásoby nediferencovaných spermatogoniálních buněk (Chen *et al.*, 2016). V současnosti přibývají publikace, které potvrzují významnou roli těchto buněk v rámci testikulárního niche.

2.2.3 Semenotvorný kanálek

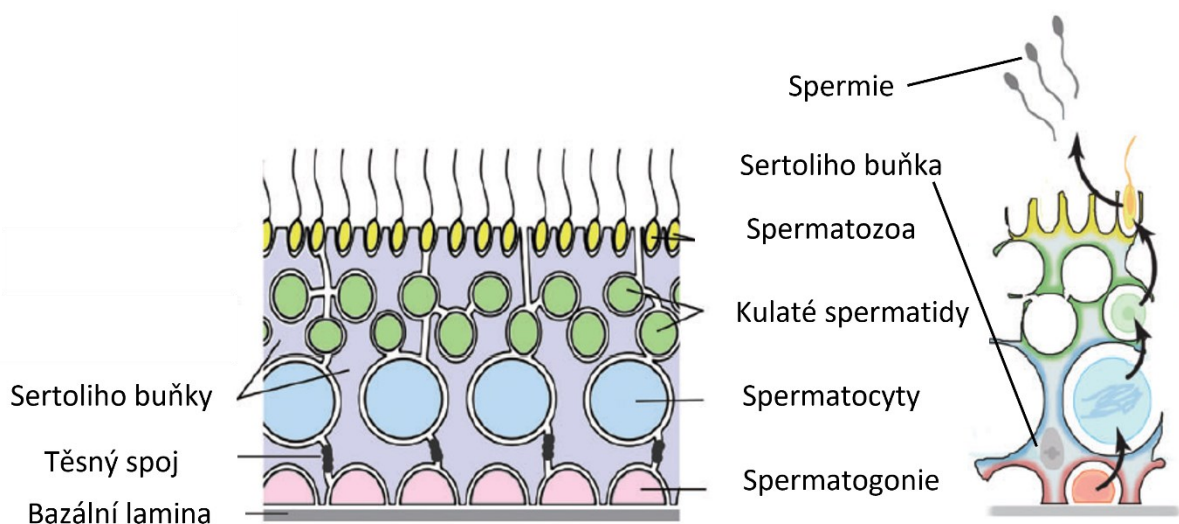
Jak již bylo zmíněno, kanálky jsou dlouhé tubulovité struktury tvořeny vnitřním zárodečným epitelem, které ve svém centru utváří lumen. Zárodečný epitel je stavební jednotkou každého tubulu složený ze Sertoliho a zárodečných buněk. Pouze zde dochází ke spermatogenezi a vzniku spermií.

U anamniotických druhů (obojživelníci, ryby) jsou zárodečné buňky uloženy v cystách a spermatogeneze se označuje jako cystická (Obr. 2). SCs obalují jednotlivé cysty, ve kterých se nachází GCs ve stejné fázi diferenciaci (Haczkiwicz *et al.*, 2017; Rozenblut-Kościsty *et al.*, 2017). Spermatogeneze v rámci cysty probíhá synchronně, což je zajištěno cytoplazmatickými můstky mezi GCs (Villagra *et al.*, 2018).



Obr. 2 Cystická spermatogeneze. Schématické znázornění cyst obklopené Sertoliho buňkami. Každá cysta obsahuje zárodečné buňky ve stejném stádiu diferenciace (převzato a upraveno z Yoshida, 2016).

Rozdílně vypadá semenotvorný kanálek u amniot – savci, plazi, ptáci (Obr. 3). GCs nejsou udržovány ve shlucích dle stejného diferenciačního stádia, ale jsou jednotlivě zanořeny do cytoplazmatických listů SCs, které hostí zároveň různá stádia vývoje GCs. Spermatogeneze probíhá ve vlnách a pouze vyspělejší stádia GCs mají se sousedními buňkami diferenciaci synchronizovanou (Yoshida, 2016). Ačkoli existují dva typy spermatogeneze, u obojživelníků i savců oba typy dodržují prakticky stejné schéma diferenciace GCs (Haczkiwicz *et al.*, 2017).



Obr. 3 Spermatogeneze u amniot. Schématické znázornění acystické formy spermatogeneze. Každá Sertoliho buňka podporuje a vyživuje více zárodečných buněk v různých stádiích vývoje (převzato a upraveno z Yoshida, 2016).

Zárodečné buňky

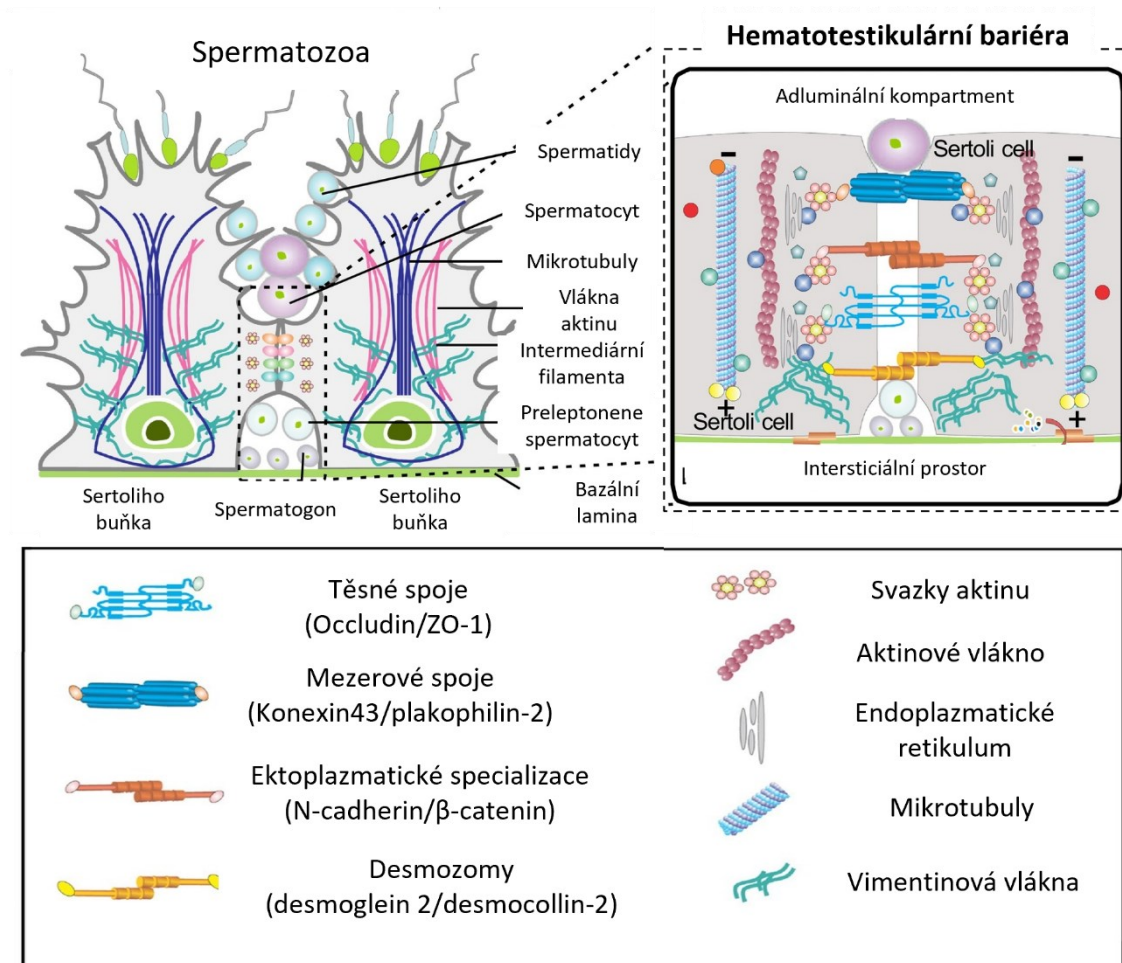
Zárodečné buňky podstupují proces spermatogeneze, který začíná dělením SSCs a končí produkcí spermii. SSCs jsou kulaté nediferencované buňky, které se nachází při bazální lamině kanálků. Tyto buňky jsou označovány jako dospělé kmenové buňky a svými vlastnostmi udržují spermatogenezi po celý dospělý život samce (De Rooij, 1973). Typické vlastnosti kmenových buněk jsou neomezené dělení a schopnost sebeobnovy a diferenciaci. U savců vznikají dělením SSCs dvě dceřiné buňky, které mohou naplnit dva možné osudy. Buď dokončí kompletní cytokinezi a stanou se novými SSCs, nebo buňky zůstanou propojené intracytoplazmatickými můstky a v dalších krocích postupně diferencují (Helsel *et al.*, 2017). V druhém případě se párované buňky následně několikrát mitoticky dělí a vytváří delší řetězce buněk, které diferencují ve spermatogonie typu A1. Významnou molekulou je zde kyselina retinová, která řídí diferenciační proces GCs (Busada *et al.*, 2015). Spermatogonie A1 dále podstupují diferenciaci postupně v další typy A2, A3, A4, intermediární a B. Spermatogonie B diferencují a stávají se primárními spermatocyty, které již zahajují meiotické dělení I. Po dokončení meiózy I. vznikají sekundární spermatocyty a záhy vstupují do druhého meiotického dělení. Výsledkem dělení sekundárního spermatocytu jsou dvě spermatidy, což jsou haploidní, mitoticky neaktivní, kulaté buňky.

Spermatidy se dále účastní procesu spermiogeneze, při kterém dochází k postupné transformaci kulaté buňky v protáhlou spermii. Úspěšný průběh spermiogeneze je závislý na produkci testosteronu (Holdcraft a Braun, 2004). Během procesu spermiogeneze se formuje bičík a k jeho bázi jsou seskupeny mitochondrie, které jsou následně spermii využívané pro generování energie k pohybu bičíku. Buňka se prodlužuje a zbavuje částí své cytoplazmy ve formě reziduálních tělísek, která jsou pohlcena a degradována SCs. Některá pohlcená reziduální tělíška mohou dále migrovat přes cytoplazmu SCs k bazální lamině kanálků, kde dochází k vylití jejich obsahu do intersticiálního prostoru. Tímto způsobem je nejspíše ustanovena tolerance vůči post-meiotickým antigenům GCs (Tung *et al.*, 2017). Během spermiogeneze také dochází k výměně histonů za protaminy a extrémní kondenzaci chromatinu. Další změnou je splynutí cisteren Golgiho aparátu a tvorba akrozomu, který hraje významnou roli později při průniku spermie do oocyty. Remodelace chromatinu i tvorba akrozomu jsou klíčovými kroky spermiogeneze (De Vries *et al.*, 2012). Morfologicky maturované spermie jsou následně uvolněny do lumen kanálků.

Sertoliho buňky

Jediné somatické buňky, které mají přímý kontakt s GCs, jsou Sertoliho buňky. Už na konci 19. století tyto výjimečné buňky poprvé pozoroval a popsal Enrico Sertoli a později byly buňky podle něj pojmenovány. SCs jsou polarizované buňky, které jsou charakteristické dobře pozorovatelným jádrem a výrazným jadérkem. Buňky se nacházejí při bazální lamině uvnitř semenotvorných kanálků, odtud se natahují až k lumen tubulů. Morfologie dospělých SCs je jedna z nejvíce komplexních v buněčné biologii, která vytváří komplikované trojrozměrné struktury. Pro SCs jsou nápadné rozpínající se výběžky cytoplazmy, kterými SCs obklopují GCs v různých fázích vývoje.

Pro komunikaci, diferenciaci a translokaci GCs je velmi významná tvorba adhezních spojů mezi SCs–GCs i SCs–SCs. V průběhu spermatogeneze dochází k dynamickým změnám v těchto interakcích, čímž je umožněn postupný přesun nepohyblivých GCs směrem k lumen. Specifická adhezní spojení mezi buňkami se nazývají ektoplazmatické specializace (ES). Tyto specializace jsou tvořeny kadheriny, které se vážou na membránový β -katenin. Na vzniku a stabilitě ES se významně podílí aktinový cytoskelet (Wen *et al.*, 2018). Dalším unikátním typem adhezních spojů vyskytující se u SCs je tubulobulbární komplex (TBK), který se nachází v apikální části zárodečného epitelu. V pozdějších fázích spermiogeneze zde v apikální oblasti TBK nahrazuje ES. Tyto komplexy jsou tubulovité evaginace jedné buňky vnořující se do přilehlé buňky druhé. Na špičce jsou ES zakončeny váčkem s četnými cisternami endoplazmatického retikula. Dřívější studie naznačovaly možnou roli TBK v zakotvení spermatid k SCs a odstraňování jejich přebytečné cytoplazmy během spermiogeneze (Russell, 1979). Studie ze současných let naopak demonstrují jejich roli v mechanismu uvolňování spermií do lumen kanálků (Young *et al.*, 2013; Zakrzewski *et al.*, 2020). TBK se vyskytují i v bazální části kanálků mezi dvojicemi SCs (Russell, 1979). Neméně významná je tvorba těsných spojů mezi dvojicemi SCs, které tvoří hlavní stavební jednotku BTB. Právě těsné spoje, ES a TBK se podílejí na formaci BTB, která rozděluje semenotvorný epitel na bazální a adluminální (apikální) kompartment. Kromě těchto se na formaci podílí mezerové spoje (*Gap junctions*) a desmozomy (Obr. 4). Díky komplexitě spojů je BTB jedna z nejtěsnějších epiteliálních bariér v těle. Při její formaci a regulaci hraje roli testosteron (Su *et al.*, 2010).



Obr. 4 Schématické znázornění morfologie hematotestikulární bariéry. Bariéra ve varleti je tvořena mezi dvojicí Sertoliho buněk, které kotví mezi sebe zárodečné buňky v různých stádiích vývoje a umožňují průběh spermatogeneze. Na její tvorbě se podílí multiproteinový komplex těsných spojů, mezerových spojů, desmozomů a specifický typ adhezních spojů zvané ektoplazmatické specializace. Na podpoře spojů se podílí aktinový, mikrotubulární cytoskelet i proteiny intermediárních filament. V závorkách jsou uvedeny příklady proteinů účinkujících při sestavování hematotestikulární bariéry (převzato a upraveno z Mao et al., 2020).

Nejdůležitějšími proteiny tvořící molekulární komplex těsného spoje v BTB jsou transmembránové proteiny claudin 11 a occludin. Tyto proteiny jsou zakotveny v cytoplazmatické membráně pomocí adaptérových proteinů z rodiny proteinů Zo (Zonula occludens), které tak komplexy zároveň propojují s aktinovým cytoskeletem. Zo rodinu tvoří tři proteiny Zo-1, Zo-2, Zo-3, které se všechny nachází na periférii při membráně buňky. Zo-1 váže claudiny i occludiny a podporuje i jejich polymeraci, což je nezbytné pro tvorbu BTB. (Umeda et al., 2006). Další stavební jednotkou jsou mezerové spoje. Obecně jsou tyto spoje důležité pro komunikaci mezi dvojicemi přilehlých buněk. Díky utvářeným průchodům v mezerovém spoji je umožněn transport malých molekul a iontů do sousedních buněk, a tím

je zajištěna určitá synchronizace a koordinace sousedících buněk. Významným proteinem mezerových spojů BTB je konexin 43. Samci myši s vyřazeným genem pro konexin 43 byly neplodné a z vývojových fází GCs byly detekovány pouze spermatogonie. Byly pozorované změny i v celkovém maturačním procesu SCs, které se svým expresním profilem podobaly spíše nezralým prepubertálním SCs (Hilbold *et al.*, 2020). Dále se ukazuje, že absence konexinu 43 nezpůsobuje poruchy ve formaci BTB jako takové, ale bariéra ztrácí svou plasticitu, díky které je umožněna postupná migrace GCs do lumen kanálků (Gerber *et al.*, 2014). Konexin 43 se projevuje jako klíčový hráč ve vývoji zralých a funkčních SCs. Za zprostředkovatele nejpevnějšího a nejstabilnějšího adhezního spojení mezi dvojicemi buněk jsou u savců považovány desmozomy. Pro své vlastnosti se často vyskytují právě v místech intenzivní mechanické zátěže, jako je v srdečním svalu, tkáni močového měchýře nebo kůži. Desmozomy jsou přítomny ve varlatech mezi sousedícími SCs a strukturálně se podílejí na formaci BTB. Pro ukotvení desmozomů v buňce jsou charakteristické proteiny intermediárních filament (IF).

Velmi důležitá schopnost BTB je její plasticita, díky níž je schopna podle potřeby degradovat stará a utvářet nová jednotlivá spojení mezi buňkami, jakmile GCs postoupí do vyšší fáze diferenciaci. Mechanismus, který je zodpovědný za dynamické změny, není stále zcela objasněn (Smith a Braun, 2012). Některé studie naznačují roli bazálních TBK (Du *et al.*, 2013). Tvorba BTB probíhá s nástupem puberty s první vlnou spermatogeneze, kdy právě pro spermatogenezi je BTB zcela esenciální (Jiang *et al.*, 2015). Její hlavní funkcí je fyzické oddělení vyvíjejících se zárodečných buněk, především zrajících spermatid a spermií, které se nacházejí v adluminální části kanálků od lymfatického a krevního zásobení. SCs tvoří imunoprivilegované prostředí kanálků nejen výstavbou BTB, ale také jejich schopností sekretovat molekuly, které modulují imunitní odpověď. Díky imunomodulačním vlastnostem SCs představují potenciální nástroj pro terapeutické účely a transplantační experimenty (Takemoto *et al.*, 2014; Porubská *et al.*, 2021).

BTB slouží jako nepropustná zeď, která chrání proti volné difúzi vody, iontů, hormonů, různých faktorů a exogenních biomolekul z buněk intersticiálního prostoru a cév. Veškeré molekuly potřebné pro správné fungování semenotvorného kanálku jsou sekretovány prostřednictvím SCs. Na dodávky nutrientů poskytované SCs jsou velmi závislé především GCs prostoupené již do adluminální části. Další funkcí SCs v testikulárním niche je sekrece signálních molekul. SCs přímo ovlivňují SSCs produkcí GDNF, který pozitivně ovlivňuje jejich proliferaci a schopnost sebeobnovy (Spinnler *et al.*, 2010). Sebeobnova SSCs je zcela zásadní pro udržování konstantního počtu kmenových buněk nutných pro spermatogenezi, čímž

je umožněno samcům produkovat spermie po celý život. Produkce GDNF je pod hormonální kontrolou. Hlavním pozitivním regulátorem je folikuly stimulující hormon (FSH), který interaguje se svým receptorem na cytoplazmatické membráně SCs a spouští cílové signální kaskády díky produkci cAMP (Tadokoro *et al.*, 2002). SCs jsou jediné buňky ve varleti, které exprimují receptor pro FSH (Rannikki *et al.*, 1995). FSH je stejně jako LH vylučován adenohypofýzou, která dostává stimul z nadřazeného hypothalamu. Správná funkce hypothalamo-hypofyzární osy hraje obecně klíčovou roli v řízení činnosti gonád. Významná role FSH je především v transportu testosteronu skrze SCs. Hormon svou vazbou na receptor stimuluje SCs k uvolnění androgen-vázajících proteinů (ABP také SHBG) do semenotvorné tekutiny, kde zprostředkovává spermatogenezi, a také do krve. Na ABP navázaný testosteron je krví rozšiřován dále po těle a do cílových orgánů. Testosteron v pozitivní smyčce reguluje koncentraci ABP inhibicí jeho degradace. Zároveň dokáže stimulovat syntézu ABP (Ma *et al.*, 2015). Nicméně produkci FSH a přenos testosteronu je potřeba regulovat, aby nedocházelo k neustálé spermatogenezi a tvorbě nadbytečného množství spermií. V SCs je v reakci na zvýšenou hladinu FSH produkován inhibin B, který je krevním řečištěm odváděn do mozku a negativně moduluje FSH sekreci. Využití inhibitorů této hormonální dráhy by mohlo přinést nové možnosti v oblasti mužské antikoncepce.

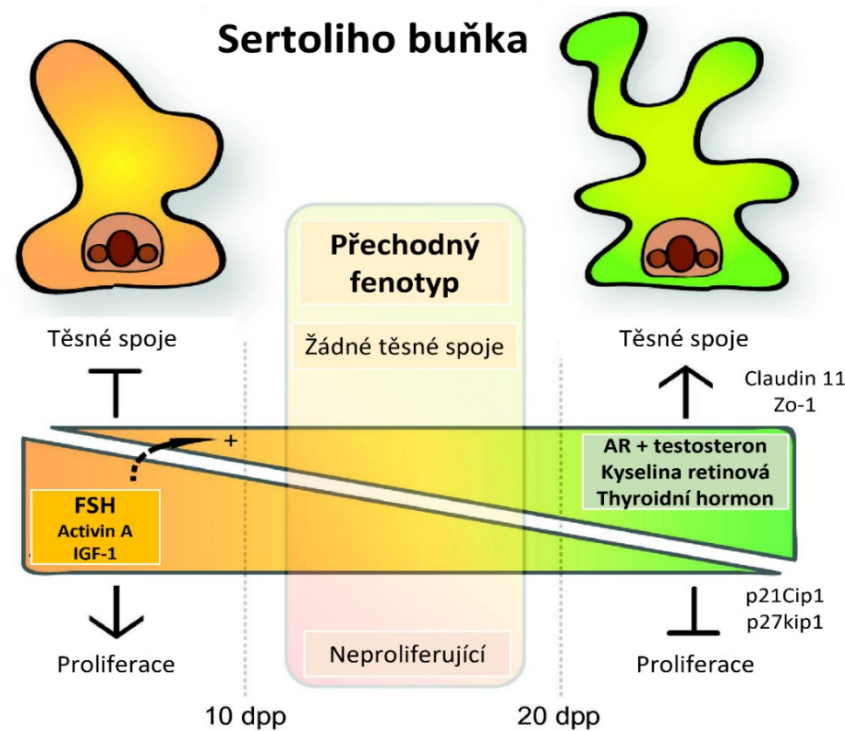
2.3 Diferenciace a zrání Sertoliho buněk

Determinace jedinců v mužské pohlaví je u savců i obojživelníků dána geneticky. Nositelem této informace je u savců pohlavní chromozom Y. SCs hrají ústřední roli během fetálního testikulárního vývoje. Jsou to první diferencované buňky, které lze během embryonálního vývoje rozpoznat v XY gonadální liště. Jejich role je regulovat diferenciační procesy lišty tak, aby došlo ke vzniku a vývoji varlat. Prvním krokem pro úspěšný vývoj varlat je diferenciace pre-SCs v SCs, které dále exprimují geny determinující pohlaví. Pre-SCs jsou původem mesenchymální buňky, proto během vývoje podstupují proces mesenchymo-epiteliální tranzice, čímž diferencují v epiteliální SCs (Albrecht a Eicher, 2001). Další nutnou událostí je migrace endoteliálních buněk z přilehlých mezonefros do oblasti genitální lišty. SCs a PGCs pak spolu formují testikulární trubici, což je embryonální forma budoucích semenotvorných kanálků. Za iniciaci událostí vedoucí k vývoji varlat u savců je zodpovědný jediný gen a to *Sry*, který se nachází na chromozomu Y. Tento gen je exprimován v SCs, ve kterých spouští signalizační kaskádu vedoucí k aktivaci genu *Sox9* a expresi transkripčního

faktoru Sox9. Mezi cílové proteiny Sox9 patří i anti-Müllerianský hormon (AMH). Tento hormon zabraňuje vývoji Müllerova vývodu ve prospěch vývoje varlat (Bhandari *et al.*, 2012). Ztrátou funkčního *Sry* i *Sox9* lze u embrya docílit přeměny ze samčího fenotypu na samičí (Koopman *et al.*, 1991). Kooperace těchto dvou genů je pro determinaci samčího pohlaví klíčová. SCs dále během fetálního vývoje produkují signální molekuly, které ovlivňují diferenciaci buněk testikulárního niche, jako jsou LCs i PTMCs. SCs jsou jediné buňky varlat produkující protein Desert hedgehog, který hraje roli v iniciaci diferenciaci obou populací LCs. Vážné mutace v tomto proteinu způsobují dysgenezi varlat a ovlivňují fertilitu (Mehta *et al.*, 2021). Důležitá role prepubertálních SCs je zabránění GCs předčasnému meiotickému dělení. Enzym Cyp26b1 produkovaný SCs katalyzuje degradaci kyseliny retinové, čímž je zajištěna blokáda diferenciaci GCs a vstupu buněk do meiózy. V případě myši postrádající gen *Cyp26b1* docházelo k předčasné meióze a zvýšené apoptóze u GCs, nicméně okolní somatické buňky varlat se vyvíjely standardně (MacLean *et al.*, 2007).

Postnatální SCs dále hojně proliferují a zvětšují objem testikulární trubice i varlat až do nástupu puberty. Maturace se u SCs projevuje zastavením proliferační aktivity, aktivací určitých funkcí a formací pravé BTB. Počet vzniklých SCs během fetálního a prepubertálního období definuje následnou produkci i finální počet spermií, jelikož schopnost jedné SeC vyživovat GCs je omezená na určitý počet (Sharpe *et al.*, 2003). Významných molekul v procesu zrání SCs je hned několik (Obr. 5). Roli v proliferaci SCs hraje již zmíněný FSH. Pozitivně reguluje dělení buněk aktivací signálních kaskád vedoucích k fosforylaci ERK 1/2 a mTOR kináz, které stimulují své cílové proteiny, jakými mohou být c-Myc a cyklin D, jakožto důležití promotéři buněčného cyklu (Riera *et al.*, 2012). Další molekuly stimulující proliferaci jsou také insulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a activin A. Během puberty dochází k terminální diferenciaci SCs. Jednou z klíčových molekul v maturační procesu je testosteron, jehož produkce je do puberty držena v nízkých hladinách. Nicméně právě během dospívání je u SCs zahájena exprese androgenního receptoru (AR), který váže testosteron. Vazbou testosteronu na AR je umožněna translokace tohoto komplexu do jádra, kde interaguje se svými příslušnými androgenními elementy (*Androgen Response Elements*) v promotorové oblasti a reguluje transkripci cílových genů. V případě předčasné exprese AR v SCs dochází k redukcii počtu mitotických buněk a tím i menšího počtu SCs v dospělosti (Hazra *et al.*, 2013). Aktivita AR je nadále konstantní a je důležitá pro správný průběh spermatogeneze. Mezi další klíčové molekuly v mužské reprodukci patří RA. Jedná se o biologicky aktivní formu vitamínu A, který je syntetizován buňkou a uložen v lipidových kapénkách v cytoplazmě. Molekulární

mechanismus je zprostředkován specifickým nukleárním receptorem pro RA (RAR). Po navázání se RAR stává transkripčním faktorem, který se páruje s dalším receptorem (RXR) a tvoří heterodimer. Pouze vazba s RXR umožní správnou konformaci RAR a možnost modulovat transkripci svých cílových genů. Proteiny p21Cip1 a p27Kip1 regulují buněčný cyklus, respektive jej přímo inhibují. Ukazuje se, že mechanismus působení RA je přes zvýšenou expresi těchto dvou inhibitorů, čímž je zastavena proliferace SCs (Buzzard *et al.*, 2003). Navíc RA podporuje lokalizaci proteinů těsných spojů do plazmatické membrány (Nicholls *et al.*, 2013). Mechanismus zvýšení exprese inhibitorů p21Cip1 i p27Kip1 uplatňují při inhibici proliferace SCs i thyroidní hormony T3 (Buzzard *et al.*, 2003). T3 jsou obecné regulátory růstu, vývoje i metabolismu u většiny tkání. Roli hrají i v maturačním procesu SCs, kde se podílí na zastavení proliferace a stimulaci exprese proteinů, jakými jsou AR a inhibin B (Arambepola *et al.*, 2001).



Obr. 5 Schématické znázornění hlavních regulátorů proliferace a diferenciaci Sertoliho buněk. V oranžovém poli jsou hormony a faktory stimulující proliferaci a omezující formaci těsných spojů. Směrem vpravo od 10. dne po narození dochází k prudkému snížení proliferační aktivity díky nárůstu koncentrace androgenního receptoru s testosteronem, kyseliny retinové a thyroidního hormonu, kteří dále stimulují diferenciaci proces a formaci těsných spojů. Po 20. dni od narození je proliferace potlačena inhibitory p21Cip1 a p27Kip1 (převzato a upraveno Nicholls *et al.*, 2013)

2.4 Progenitory Sertoliho buněk *Xenopus tropicalis*

Laboratoř školitelky se dlouhodobě zabývá diferenciačním i regeneračním potenciálem Sertoliho buněk. Pro účely zkoumání této problematiky byla úspěšně založena buněčná kultura somatických testikulárních buněk nazvána XtiSCs (dříve také XtTSC), která je odvozená z juvenilních varlat *Xenopus tropicalis*. Studium těchto buněk byla prokázána existence společného progenitoru SCs a PTMCs u *X. tropicalis*, které mají většinu znaků charakteristických pro mesenchymální kmenové buňky (MSCs). Tyto progenitory se nacházely vně semenotvorných kanálků dospělých varlat a exprimovaly geny obou buněčných typů zároveň (Tlapakova et al., 2016). Zdá se tedy, že v dospělých varlatech progenitory, které udržují homeostázu SCs, musí nejprve migrovat z intersticia dovnitř kanálků a poté diferencovat v SCs. Obdobně vznikají SCs během fetálního vývoje, kdy je diferenciace pre-SCs doprovázena migrací a následně mesenchymo-epiteliální tranzicí.

XtiSCs představují dlouhodobou kulturu těchto progenitorů (Tlapakova et al., 2016). Analýza exprese XtiSCs na úrovni RNA potvrdila silnou expresi SCs, PTMCs ale i MSCs markerů. In vitro pokusy dále odhalily potenciál XtiSCs diferencovat v některé typy mezodermy a to v adipocyty, chondrocyty i osteocyty. Tento potenciál mají i MSCs. Dalším společným znakem MSCs a XtiSCs je schopnost migrace mimo svou niku. Experimenty *in vitro* potvrdily přímou migraci buněk XtiSCs směrem k nádorovým buňkám. Experimenty *in vivo* ukázaly tendenci XtiSCs migrovat do místa poranění (Nguyen et al., 2019a) a zde se podílet na procesu regenerace. Výsledky předkládají, že XtiSCs vykazují charakteristiky podobné MSCs. Žádný z doposud provedených experimentů se však nevěnoval indukci diferenciace XtiSCs v jeho hypoteticky přirozeně preferovaný typ – dospělé Sertoliho buňky.

2.5 Testikulární organoidy – přístupy a potenciál

Globální statistiky naznačují nárůst infertility u párů až na 15 %, kde polovina případů je způsobena faktory z mužské strany. Největší příčina mužské infertility je selhání spermatogeneze. Faktorů, které negativně ovlivňují spermatogenezi, může být hned několik. Mezi ty časté se řadí polutanty, jako jsou různé pesticidy, rozpouštědla, kadmium, bisfenol A a jiné. Roli hrají i hormonální poruchy (Dohle et al., 2005). Dalšími faktory mohou být radioterapie a chemoterapie, které způsobují četné genové mutace a mají vliv na zárodečné buňky a následnou spermatogenezi (Martinez et al., 2017).

Velmi organizované a komplexní testikulární niche je zcela esenciální pro spermatogenezi, proto běžné 2D kultivační systémy jsou nedostatečné pro diferenciaci GCs a vznik spermií *in vitro*. Výzkumy se proto soustředily na 3D metody kultivace a tvorbu testikulárních organoidů. Obecně jsou organoidy shluky orgánově specifických buněk, které proliferují a rekapituluji organogenezi *in vitro* (Edmonds a Woodruff, 2020). Generované organoidy dovolují mnohem detailnější výzkum samčího reprodukčního systému včetně výzkumu mezibuněčných komunikací mezi somatickou a zárodečnou částí varlat nebo molekulárních mechanismů regulace spermatogeneze. Tento nástroj lze využít i pro studium patogeneze a nádorového bujení. Organoidy navíc představují stabilní kultivační systém, kde je možné plně kontrolovat prostředí. Pro tyto výhody je lze využít i pro experimenty s farmaky a toxickými látkami.

Recentní studie poukazují na velkou investici energie vědců do vytvoření vhodného kultivačního systému, který bude formovat organoidy s adekvátní tubulovitou strukturou i pozicí buněk a zároveň budou schopné hostit zárodečné buňky a nejlépe i podporovat jejich spermatogenezi. Ukazuje se, že *de novo* formování testikulárního niche je však velmi závislé na věku jedince a buňky izolované ze starších samců, kteří jsou již v pubertálním a dospělém věku, postrádají schopnost tubuly zrekonstruovat (Alves-Lopes *et al.*, 2017). Nicméně vytvořené testikulární organoidy z juvenilních jedinců obsahují stále nezralé somatické buňky, které bez dozrání nejsou schopné řídit proces spermatogeneze. Další faktor, který se výrazně podílí na *de novo* tvorbu organoidů, je kultivační prostředí, ve kterém se izolované buňky nachází (Edmonds a Woodruff, 2020).

Používané kultivační systémy lze rozdělit na dva typy. Na ty, které nevyužívají tkáňových nosičů (*scaffold-free*), a ty, které jsou založené na určité formě tkáňových nosičů (*scaffold-based*). Tkáňový nosič je mechanický druh opory buňky, který může být tvořen z přírodních nebo syntetických materiálů netoxických pro buňku. Ze syntetických materiálů se často využívají polyol, polyester a polyether. Výhody těchto uměle vytvořených matic je jejich dobře definované složení i konzistentní kvalita. Velkou výhodou je také možnost optimalizace jejich mechanických vlastností. Nevýhody umělých nosičů jsou zhoršená možnost biodegradace a nižší přilnutí buněk k povrchu. Mezi tradiční biomateriály využívané pro 3D kultivační systémy patří alginát sodný, agaróza, methylcelulóza, kolagen, decelularizovaná extracelulární matrix a matrigel. Výhody a nevýhody jednotlivých systémů se více či méně vzájemně liší, ale obecně jsou přírodní materiály využívány častěji než ty syntetické pro jejich vhodnější kompatibilitu k buňkám. Jejich další výhodou je přítomnost různých endogenních

faktorů, díky kterým mají nosiče schopnost v buňkách podpořit mnoho biologických funkcí podobně jako ECM. Mezi kultivační systémy, které nevyužívají scaffold, lze zařadit kultivační nádoby s nízkou přilnavým povrchem, metodu visící kapky, rotační kultury a bioreaktory (shrnutí v Cham *et al.*, 2021). Adherentní buňky preferují agregaci a tvorbu kompaktních struktur, pokud není přítomen vhodný povrch k uchycení. Systémy bez nosičů zároveň využívají gravitace, kdy se buňky přirozeně seskupí na úzké dno a mohou agregovat. Velkou nevýhodou těchto systémů je rychlá proliferace buněk spojená s nedostatkem přísunu kyslíku a živin při dlouhodobých kultivacích a to obzvláště v buňkách, které se nacházejí uvnitř velkých organoidů (Kusumi *et al.*, 2009). Úspěšné vytvoření testikulárních organoidů se správnou buněčnou organizací a zároveň schopností rekapitulovat diferenciaci SSCs ve spermiu zůstává i nadále velkou výzvou u všech živočišných druhů.

3. Cíle & hypotézy práce

Zastřešující myšlenkou projektu laboratoře školitelky je skutečnost, že se doposud nepodařilo vytvořit testikulární organoidy z buněk varlat dospělých samců. Jak již bylo zmíněno, izolovaná testikulární suspenze z pre-pubertálních samců tyto organoidy vytváří, nicméně nedochází k formaci tubulovitých struktur a zároveň plnohodnotné spermatogenezi. Důvodem nezdaru by mohla být somatická část, která se *in vivo* podílí na tvorbě testikulárního niche, během puberty dozrává a poté reguluje spermatogenezi. Ze somatické populace testikulárních buněk tvoří jeho významnou část právě Sertoliho buňky. V laboratoři školitelky byla úspěšně založena dlouhodobá kultura progenitorů XtiSCs, která má potenciálně dva preferované osudy diferenciací SCs a PTMCs. Pro tuto diplomovou práci jsem si stanovila dílčí hypotézy a cíle:

Hypotézy

- Progenitory XtiSCs mají potenciál diferencovat v maturované Sertoliho buňky.
- Izolovaná testikulární suspenze z *X.tropicalis* je schopna ve vybraném kultivačním systému *de novo* formovat testikulární organoidy.

Cíle

- Indukce diferenciací XtiSCs v Sertoliho buňky působením vybraných látek.
- Standardizace vybraných kultivačních systémů pro *in vitro* kultivaci testikulárních organoidů s použitím myších testikulárních buněk.
- Příprava testikulárních organoidů z izolovaných buněk juvenilních varlat *X. tropicalis*.

4. Materiál

4.1. Pokusná zvířata

V diplomové práci jsem použila žáby *Xenopus tropicalis* kmene Nosek a Nigerian Strain z chovů Laboratoře vývojové biologie PřF UK a myši kmene BALB/c z chovů Laboratoře buněčné imunologie PřF UK

4.2 Buněčné kultury

- **Kultura XtiSCs** - Buněčná kultura byla izolovaná v Laboratoři vývojové biologie PřF UK a to z varlat juvenilního samce *Xenopus tropicalis* ve stáří 5 měsíců po metamorfoze z linie žab Ivory coast.
- **Kultura Xt4** - Krátkodobá kultura testikulárních buněk, kterou jsem vytvořila z varlat 4-letého samce *Xenopus tropicalis*.
- **Kultura TM4** – Imortalizovaná kultura Sertoliho buněk zakoupena od Merck Life Science s.r.o.

4.3 Média

Vzhledem k rozdílnému osmotickému tlaku v buňkách *X. tropicalis* (100 mM) v porovnání se savčími buňkami (150 mM) jsem všechna média pro pokusy s buňkami a tkáněmi *X. tropicalis* ředila deionizovanou vodou (diH₂O) na 2/3 osmolaritu.

4.3.1 Kultivační média

MYŠ

- **Savčí kultivační médium**

Veškeré myší buněčné kultury i testikulární suspenze získané z jedinců jsem kultivovala v komplexním médiu složeném z L-15 Leibovitz a RPMI 1640 média v poměru 1:1, 10% fetálního bovinního séra (FBS; Life Technologies), 2 mM L-glutaminu, 7,5% NaHCO₃, 50

$\mu\text{l/ml}$ gentamycinu (Gentaveto), 1 mM Pyruvátu sodného a 0,1 mM 2-Mercaptoethanolu (vše ostatní Merck Life Science s.r.o.). V případech 3D kultivací jsem toto médium připravila s 20% FBS.

ŽÁBA

- **Základní kultivační médium**

Pro běžnou kultivaci XtiSCs i získané testikulární buněčné suspenze z žabích varlat jsem vždy použila základní kultivační médium (zkráceně Xt médium), které obdobně jako u savčího média se skládalo z L-15 Leibovitz a RPMI 1640 média v poměru 1:1, 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, 7,5% NaHCO_3 , 50 $\mu\text{l/ml}$ gentamycinu, 1 mM pyruvátu sodného a 0,1 mM 2-Mercaptoethanolu. Toto médium bylo následně ředěno potřebným množstvím sterilizované diH_2O . V případech 3D kultivací jsem médium upravila tak, aby obsahovalo 20% FBS.

- **Diferenciační média**

Pro diferenciační experimenty jsem připravila média obsahující různé diferenciační faktory. Pro přehlednější situaci bude v následujícím textu médium pro 1. fázi diferenciace označené termínem DMI a termínem DMII diferenciace pro 2. fázi. Médium DMI se skládalo ze základního kultivačního média, které jsem doplnila o 40 ng/ml GDNF a 60 μM Putrescinu. Pro DMII jsem základní kultivační médium upravila tak, aby obsahovalo 20% FBS, 40 ng/ml GDNF, 1000 IU/ml lidský FSH, 1 mM testosteronu, 2 mM kyseliny retinové a 0,5 ng/ml IGF-1 (vše Merck Life Science s.r.o.). Použité faktory byly sterilně připraveny a rozpuštěny dle instrukcí výrobce.

- **Kondicionovaná média**

V diferenciačních experimentech jsem využila i kondicionovaných médií. Všechna kondicionovaná média jsem připravila tak, že po 2 dnech kultivace buněk bylo dané médium odstraněno z kultivovaných buněk a centrifugováno při 1000g. Supernatant byl filtrován přes 0,22 μm filtr. Jednotlivá filtrovaná média jsem dále ředila se základním kultivačním médiem. Připravila jsem a použila 2 typy kondicionovaných médií nazvány dle zdroje původu.

I. TM4 kondicionované médium

II. X74 kondicionované médium

4.3.2 Disociační médium

K přípravě testikulární suspenze z odebraných varlat myši i žab pro účely následných 3D kultur jsem ustanovila disociační médium, které se skládalo z média L-15 Leibovitz, 50 µl/ml gentamycinu, 1 mg/ml Kolagenázy 1A, 0,5 mg/ml Hyaluronidázy, 0,5 mg/ml DNázy I. (vše Merck Life Science s.r.o.). Disociační médium pro testikulární suspenze *X. tropicalis* jsem ředila potřebným množstvím diH₂O.

4.3.3 Ředící médium pro 3D kultivace

Pro naředění roztoku low-melting agarózy a zachování osmotické rovnováhy jsem připravila tzv. ředící médium, které se skládalo z 2x koncentrovaného RPMI média, 20% FBS a 50 µl/ml gentamycinu.

4.4. Roztoky a chemikálie

4.4.1 Roztoky pro IVF (*in vitro* fertilizace)

- 20× MMR (2 M NaCl; 40 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 40 mM CaCl₂; 100 mM HEPES; diH₂O; pH 7,7 – 7,8)
- 0,05× MMR (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml diH₂O; pH 7,7 – 7,8)
- 1× MMR + gentamycin (5 ml 20× MMR; 95 ml diH₂O; 100 µl gentamycinu; pH 7,7 – 7,8)
- 0,05× MMR + gentamycin (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml diH₂O; 1 ml gentamycinu; pH 7,7 – 7,8)
- 2,2% roztok L-cysteinu (0,5 ml 20× MMR; 99,5 ml diH₂O; 2,2 g L-cysteinu; pH 7,7 – 7,8)
- 1% roztok agarózy v diH₂O

4.4.2. Analýza genové exprese

- **Izolace RNA**

RNeasy[®] Mini Kit (74104; Qiagen)

RNeasy[®] Micro Kit (74004; Qiagen)

- **Příprava cDNA**

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (K1632; Thermo Scientific)

- **PCR**

H₂O pro PCR (Thermo Scientific)

10x Taq pufr s KCl (Thermo Scientific)

25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)

10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific)

Taq DNA polymeráza 5 U/μl (EP0402, Thermo Scientific)

Symbol genu	Název genu	Transkript genu	Sekvence primerů	Délka produktu (bp)
<i>acta2</i>	actin alpha 2	ENSXETT00000020391	ACTGCTGAGCGTGAAATCGT GCCAGCAGATTCATACCAA	213
<i>Amh</i>	anti-Mullerian hormone	ENSXETG00000035043	CCAGCCTGCATTTCAAGGG GCATCTTTGCTGGTCTCACC	397
<i>ar</i>	androgen receptor	ENSXETT00000011091.3	TCCACAGCTTGAGGGCTACA GATGCTGGATTGTTCTCTTG	570
<i>cd44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	ENSXETT00000016456	CCCTGGGCAATAACGATTCC ATCGGTGACCTCTCCTGGAT	572
<i>cldn11</i>	claudin 11	ENSXETT00000020222.1	AATGACTGGGTGCTGACCTG GACAGAGCCACCAAAAAGGC	441
<i>cyp11a1</i>	cytochrome P450 Family 11 subfamily A member 1	ENSXETT00000011263	GTCACCGGATTGCCCTAAAT CCTTTCCAGAGGCATCTCGT	645
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1	ENSXETT00000033323	TGCTCTTCTGAAAGCGAAGC TTTGGGAGGGGTGTAGAG	497
<i>cyp26b1</i>	cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1	ENSXETT00000046568.3	GGAAGATTCTGATGGGGGAG CTTTGCCCTGAGTGTCTGC	483
<i>dazl</i>	deleted in azoospermia-like	ENSXETT00000053944	CAGAACAGGGGTGTCCAAAG GATTGGCTCCAGAAGCAGAC	506
<i>ddx4</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	ENSXETT00000066339	TGCATGCAATGAGGGATGTTG AGATGAAGGAGCACTGACGTA	899
<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1	ENSXETT00000040139.1	GCGAGTGTGTGAACTGTGGA GAGGCTCAAAGGGATTGTCC	372
<i>itgb1</i>	integrin beta-1	ENSXETT00000048743	CAACTGACGCAGGATTCCATT TCCCCAGTTCCTTGACTC	400
<i>klf4</i>	kruppel-like factor 4	ENSXETT00000012646	TTCTCACCCTCCACCTCCT ACAGTCTCTGCCATCAGC	556
<i>krt18.1</i>	keratin 18, type I	ENSXETT00000044186.3	CACCAACGTCAGCAGAATGAA CAAGCATCTCCAGCTCCATC	443
<i>lif</i>	leukemia inhibitory factor	ENSXETT00000053337	TGTGCAACTGCTGATTCTCC CATTGACTGCTTGGTGGATG	581
<i>myc</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homology	ENSXETT00000054171	TGACCCTTCGGTGGTTTT CCGCTCTTGTGCTTCTC	454
<i>ncam1</i>	neural cell adhesion molecule 1	ENSXETT00000025521.3	ACTGGGAGACAGCACACCTT AGCAGGTCACATCCACAACC	452
<i>shbg</i>	sex hormone binding globulin	ENSXETT00000064700.1	GGAGATGTGGGAAGGGTAA AGCGTCGGTTCTCGTCTGTA	403
<i>sox9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	ENSXETT00000048344	AACTCCTCCAACACCCCC CCTCACTGCTCAGTTCACC	143
<i>tert</i>	telomerase reverse transcriptase	ENSXETT00000034113	TGACCAGCCAAAACGGGATG TCGTAGACGAATCCAAGAGCA	484
<i>thy1</i>	Thy-1 cell surface antigen	ENSXETT00000046686	AAGCCTCACTGCCTGTCTGA AAAGACTGACTCCGCCACAG	350
<i>tubb</i>	tubulin β class I	ENSXETT00000052187	GCCATCCTTGTGATCTGGAA GGGTACGGAAGCAGATGTCA	457
<i>vim</i>	vimentin	ENSXETT00000016267	CCTCTTTGGCAGTATTGACTT TCTCCTCCATTTCTCGCATTTG	411

Tab. 1 Primery použité pro RT-PCR

4.4.3. Protilátky

Primární protilátky

- α -SMA (α -smooth muscle actin; Merck Life Science s.r.o.) – 1:400
- Cytokeratin (Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:10
- Sox9 (Merck Life Science s.r.o.) – 1:300
- Zo-1 (Zonula occludens-1; Merck Life Science s.r.o.) – 1:200

Sekundární protilátky

- Alexa 488 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – 1:500
- Alexa 488 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) – 1:500
- Alexa 594 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) – 1:500
- Alexa 594 anti-goat (Thermo Fisher Scientific) – 1:500

4.4.4 Další roztoky a chemikálie

- Agaróza (Lonza)
- Agaróza (Low-melting; Merck Life Science s.r.o.)
- Blokovací roztok - 2% BSA (Merck Life Science s.r.o.) v PBS
- Blokovací pufr – 5% FBS; 0,5% Triton X-100 v PBS
- Bromfenolová modř (BFM): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM (Merck Life Science s.r.o.)
- Corning® Matrigel® Matrix for Organoid Culture, Phenol Red-free, LDEV-free (Corning)
- DMSO (Dimethyl sulfoxid; Merck Life Science s.r.o.)
- EtBr 10 mg/mL (Etidium bromid; Merck Life Science s.r.o.)
- Ethanol (EtOH; Absolutní; Penta)
- Fixační roztok - 4% paraformaldehyd (Merck Life Science s.r.o.)
- Fosfátový pufr (PBS)
 - 10x PBS: 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 2,25 mM KH₂PO₄; pH 7,35
 - ředěno na 1x PBS nebo na 2/3 PBS v diH₂O
- Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Fermentas)
- Kyselina octová (17,5 mM; Penta) v diH₂O

- Kolagen typ I. (0,2 mg/ml) v diH₂O
- Lidský choriový gonadotropní hormon (hCG; Merck Life Science s.r.o.)
- L- Poly Lysin (Merck Life Science s.r.o.)
- Montovací médium - Mowiol/DAPI (Merck Life Science s.r.o.)
- NH₄Cl (15 mM)
- O.C.TTM Compound 4583 zamrazovací médium (Tissue-Tek, SAKURA)
- Odvodňovací roztok - 20% Sacharoza v PBS
- Papain 61,25 µg/ml (Biochrom AG)
- Permeabilizační roztoky
 - 0,5% Triton X-100 (Merck Life Science s.r.o.) v PBS
 - 0,1% Triton X-100 (Merck Life Science s.r.o.) v PBS
 - 1% SDS (Merck Life Science s.r.o.) v PBS
- 5x TBE: 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H₃BO₃
 - ředěno na 1x TBE v diH₂O
- Trypanová modř (Life Technologies)
- Trypsin + EDTA 10x (Biosera)
 - ředěno na 1x trypsin v PBS
- Usmrcovací roztok - 0,4% Tricaine methanesulfonate (MS-222; Merck Life Science s.r.o.)

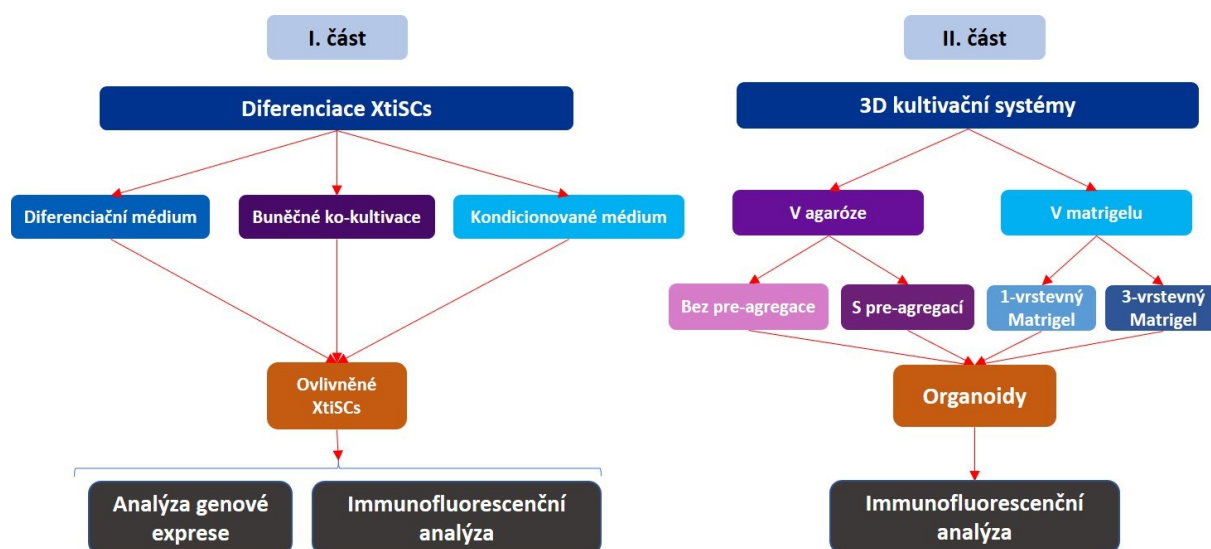
4.4.5 Použité přístroje a materiál

- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)
- Countess[®] Automated Cell Counter (Invitrogen)
- Flow box EM Box 120 (Scholler Instruments)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40 (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Inzerty do 12-ti jamkové destičky PET, 0,4-µm (VWR)
- Inzerty do 6-ti jamkové destičky PET, 1.0-µm (VWR)
- Konfokální mikroskop (Zeiss LSM880)
- Kryotom CM3050 S (Leica)
- MCO-19 AIC Sterisonic[®] UVH Incubator (Panasonic)
- Mikroskopická sklíčka (P-Lab)

- Mikroskopická Super Frost Plus sklíčka (Thermo Fisher Scientific)
- Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop)
- Preparační nástroje (pinzety, nůžky)
- Sterilní filtrační nástavec 30 mm, velikost pórů 0,22 μm (P-LAB)
- Sterilní filtrační sítko, velikost pórů 40 μm (Corning)
- Vortex Ika Works Minishaker MS1 (Ika Works)

5. Metody

Experimenty a použité metody zahrnuté v této diplomové práci jsem rozdělila do dvou částí (Obr. 6). V I. části jsem se zaměřila na indukci diferenciaci XtiSCs v maturované Sertolihovo buněk. V části II. jsem se věnovala přípravě *in vitro* testikulárních organoidů z juvenilních žab *X. tropicalis*. Pro ověření správného použití vybraných 3D kulturačních metod jsem paralelně připravila i organoidy z myších testikulárních buněk.



Obr. 6 Schématické znázornění plánu provedených experimentů diplomového projektu. Vlevo plán pro I. část pokusů zabývající se diferenciaci XtiSCs. Vpravo plán pro II. část experimentů zabývající se přípravou testikulárních organoidů.

5.1. Kultivace a příprava XtiSCs

Buněčná kultura XtiSCs je v laboratoři školitelky standardně kultivována při 29,5 °C a 5,5% atmosféře CO₂ a buňkám se mění Xt médium 2x týdně. Dle potřeby jsem buňky i s vytvořenými koloniemi pasážovala (většinou 10. dne kultivace) a to tak, že po odstranění spotřebovaného média jsem provedla oplach v 2/3 PBS. Pro disociaci XtiSCs se v laboratoři standardně používá roztok papainu. Pipetováním roztoku papainu jsem docílila kompletní disociaci buněčných kolonií. Takto vytvořenou suspenzi jsem přenesla do zkumavky s 5 ml čerstvého Xt média pro zastavení enzymatické reakce a poté centrifugovala (5 minut, 110x g, 25 °C). Vytvořenou peletu jsem resuspendovala v 1 ml Xt média, ze které jsem následně odebrala objem 10 µl a spočítala potřebné množství buněk, které jsem navrátila zpět do kultivační láhve. Takto byly XtiSCs pravidelně udržovány.

Pro diferenciační experimenty jsem použila buňky kolonií, které jsou XtiSCs schopné vytvářet při dlouhodobé kultivaci. Po odsátí spotřebovaného Xt média a promytí láhve PBS jsem použila roztok 0.025% trypsin-EDTA v PBS. Roztok uvolní buňky od povrchu láhve, ale na rozdíl od papainu není schopný kolonie disociovat. Suspenze s viditelnými koloniemi jsem následně přefiltrovala skrze sítko o velikosti pórů 40 µm. Pomocí Pasteurovy pipety a Xt média je možné uchycené kolonie ze sítka dále nabrat a přenést do nové zkumavky. Po centrifugaci (5 min., 110x g, 25 °C) jsem vzniklou peletu kolonií resuspendovala papainem, aby došlo k disociaci kolonií na jednobuněčnou suspenzi. Dále byl postup stejný jako při běžném pasážování. Takto získanou jednobuněčnou suspenzi kolonií XtiSCs jsem použila pro další experimenty.

5.2 Diferenciace XtiSCs v maturované SCs

Dno kultivačních destiček jsem před zahájením diferenciačních pokusů potáhla kolagenem I. typu a nechala 1 hodinu pod UV světlem, poté jsem dno opláchla PBS. Připravenou jednobuněčnou suspenzi buněk kolonií XtiSCs (viz kap. 5.1) jsem na jamky sadila v hustotě 4×10^3 cell/cm². Jednotlivé experimentální přístupy jsem rozdělila do skupin popsaných níže v textu. Všechny vytvořené skupiny jsem po ukončení pokusů podrobila analýze genové exprese pomocí RT-PCR a zároveň proteinové analýze s využitím duálního imunofluorescenčního barvení. Použila jsem primární protilátky proti Cytokeratin/Sox9 a dále ZO-1/Sox9. Jako sekundární protilátky jsem v obou případech barvení použila Alexa 488 anti-mouse/Alexa 594 anti-rabbit.

Skupina I.

Nasazené buňky kolonií XtiSCs jsem kultivovala týden v DMI v termostatu při standardních podmínkách. Toto médium jsem v půli týdne obměnila za nové čerstvě připravené. Po týdnu kultivace jsem DMI vyměnila za druhý typ média tedy DMII. V tomto médiu jsem buňky kultivovala opět jeden týden a v půli jsem médium obměnila za čerstvé. Kultivace trvala 14 dní, poté jsem buňky sklídila na analýzu.

Skupina II.

V tomto experimentu jsem zopakovala kultivační podmínky jako pro *Skupinu I.* V prvním týdnu kultivace jsem k buňkám XtiSCs přidala DMI, které jsem obměnila v půli týdne. V druhém týdnu kultivace jsem také vyměnila DMI za DMII, ale do jednotlivých jamek jsem vložila inzerty (1,0- μ m), do kterých jsem přidala savčí kultivační médium a nasadila 4×10^3 cell/cm² myších TM4. Buňky TM4 jsem si týden předem rozmrazila a kultivovala v láhvi. V čas experimentu jsem buňky TM4 sklídila pomocí roztoku 0.025% trypsin-EDTA v PBS, stočila (5 minut, 110x g, 25 °C), resuspendovala v savčím médiu a vhodný objem jsem přidala na připravené inzerty. Inzerty jsou propustné pro různé signální molekuly a faktory, přičemž zároveň nedochází k promíchání dvou různých buněčných kultur. Destičku jsem takto kultivovala v termostatu v podmínkách 29,5 °C a 5,5% atmosféře CO₂. V půli týdne jsem vyměnila DMII i savčí kultivační médium za čerstvé. Buňky XtiSCs jsem v takovýchto podmínkách kultivovala 14 dní, poté jsem je sklídila na další analýzu.

Skupina III.

V této skupině byly XtiSCs, které jsem ovlivnila pouze pomocí ko-kultivace s TM4 linií buněk. XtiSCs jsem připravila pro diferenciační experimenty standardně jako v předchozích případech, k nasazeným buňkám na jamky jsem přidala Xt médium. Do destičky jsem vložila inzerty (1,0- μ m) a přidala do nich savčí kultivační médium s buňkami TM4 tak, aby na inzertu bylo 4×10^3 cell/cm² buněk. Destičku jsem inkubovala v termostatu při 29,5°C. Obě média byla v půli obou týdnů vždy vyměněna za čerstvá. Kultivace trvala 14 dní, poté jsem XtiSCs sklídila pro analýzu genové exprese a imunofluorescenční barvení.

Skupina IV.

Pro tento experiment jsem z kultivovaných TM4 použila savčí médium a vytvořila TM4 kondicionované médium (kap. 4.3.1; odst. kondicionovaná média), které jsem následně použila

pro kultivaci připravených XtiSCs. Toto kondicionované médium jsem ředila 1:2 s Xt médiem. Kultivace probíhala 14 dní v termostatu při 29,5°C a použitou kombinaci médií jsem měnila každý 3 den, poté jsem XtiSCs sklídila na analýzu.

Skupina V.

V tomto experimentu jsem si připravila 6jamkovou destičku s XtiSCs s klasickým Xt médiem. Do destičky jsem připravila inzerty (1,0- μm) a přidala Xt médium. Destičku jsem vrátila do termostatu. Následně jsem připravila krátkodobou směsnou buněčnou kulturu z varlat 4-letého samce *Xenopus tropicalis*. Jedno varle jsem po vyjmutí z těla promyla v 2/3 PBS a přenesla do zkumavky s 1 ml Xt médiem. Orgán jsem sterilně homogenizovala a přefiltrovala pomocí sítka o velikosti pórů 40 μm . Buňky jsem spočítala a nasadila 4×10^3 cell/cm² na inzerty připravené v prvním kroku experimentu. Destičku jsem následně vrátila do termostatu (29,5 °C a 5,5% atmosféře CO₂) a v půli týdne vyměnila čerstvé Xt médium u obou buněčných kultur. Kultivace probíhala jeden týden, buňky XtiSC jsem poté sklídila pro další analýzu.

Skupina VI.

Druhé varle ze stejné 4-leté žáby z experimentu pro *Skupinu V.* jsem totožně homogenizovala a připravila jako v případě pro *Skupinu V.* Filtrované buňky jsem nasadila na čtyři kultivační láhve (25 cm²) doplněné 6 ml Xt média. Po dvou dnech kultivace jsem připravila Xt4 kondicionované médium (kap. 4.3.1; odst. kondicionovaná média), které jsem ředila 1:1 s Xt médiem. Dále jsem si připravila destičku s XtiSC buňkami, ke kterým jsem přidala Xt4 kondicionované médium a kultivovala v termostatu při 29,5°C. Kultivace probíhala 14 dní a použitou kombinaci médií jsem obměnila každé 3 dny. Buňky jsem sklídila pro další analýzu.

Kontrola

Současně s ovlivněnými buňkami jsem jako kontrolu kultivovala buňky kolonií XtiSCs pouze v běžném Xt médiu bez použití jakéhokoli způsobu ovlivnění. Podmínky kultivace kontrolních XtiSCs jsem nastavila stejné pro všechny experimentální skupiny. Dno kontrolní jamky jsem pokryla kolagenem I., počet nasazených buněk byl 4×10^3 cell/cm², kultivace probíhala 14 dní, buňky byly kultivovány v termostatu při 29,5 °C, médium jsem měnila v půli každého týdne. Jako další kontrolu jsem XtiSC kultivovala v Xt médiu doplněné o rozpouštědla EtOH abs. (pro rozpuštění testosteronu) a DMSO (pro rozpuštění RA) ve stejném množství, v

jakém byly použity v případě DMII. V tomto případě jsem podmínky také nastavila totožné jako pro všechny skupiny. Po uplynutí 14 dnů jsem kontrolní skupiny sklídila a analyzovala změny.

5.3 *In vitro* fertilizace

Den před IVF byly samice *X. tropicalis* injikovány 30 IU lidským choriogonadotropinem (hCG) pro navození ovulace. Injekce byly opakovány samicím i ráno následujícího dne o zvýšené dávce 300 IU hCG. Stimulované samice kladou oocyty cca 4-6 hodin po aplikaci zvýšené dávky hormonu. Pro získání spermií jsem usmrtila samce *Xenopus tropicalis* pomocí MS-222 s následnou dekapitací hlavy a odebrala varlata. Ty jsem přenesla do zkumavky s 500 μ l Xt média a homogenizovala, aby se spermie uvolnily ze semenotvorných kanálek. Supernatant byl dále využit pro oplození oocytů.

Oocyty byly samicemi naklady do roztoku 1x MMR + gentamycin v Petriho misce. Tento roztok zajišťuje synchronizaci vývoje oocytů. Do této masy oocytů byl rovnoměrně přidán homogenizát obsahující spermie a oocyty byly rozloženy do jedné vrstvy. Pro přichycení spermií na oocyty byla nutná 5 min inkubace, poté jsem vyměnila 1x MMR za fertilizační roztok 0,05x MMR, ve kterém oocyty setrvaly 20 min. Poté byl fertilizační roztok vyměněn za 2,2% roztok L-cysteinu, který odstraňuje gelovitý sekundární obal oocytů. V L-cysteinu byly oocyty občasné promíchány v čase 5 min, poté následovalo 4x promytí v 0,05 MMR. Takto připravené oocyty jsem přenesla na plotnu s agarózovým dnem proti přichycení a zalila 0,05 MMR + gentamycinem. Následoval kvalitativní výběr pouze správně se vyvíjejících embryí. Vybraná embrya se dále kultivovala na agarózových plotnách s 0,05x MMR + gentamycinem pro zabránění bakteriální infekce. Ve 3. dnu vývoje jsem roztok vyměnila za 0,05x MMR už bez gentamycinu, aby bylo umožněno embryím získat vlastní mikrobiom. Pohyblivá stádia s ocáskem byla do chovné nádoby s vodou, kde se pulci mohli dál vyvíjet do vyšších stádií. Na přípravu organoidů jsem použila žáby do 4 měsíců života po metamorfóze.

5.4 Příprava testikulární suspenze

V případě myšího i *X.t.* modelu probíhala příprava testikulární suspenze pro 3D kultivace totožně. Po usmrcení samců jsem vyjmula obě varlata. Ta jsem krátce promyla v PBS a následně jsem je přesunula do zkumavky se 100 μ l disociačního média obsahujícího enzymy. Pomocí nůžek a ustřížené špičky jsem varlata sterilně homogenizovala na co nejmenší

fragmenty. Po inkubaci 5 min v termostatu jsem obsah znovu homogenizovala s cílem provzdušnit homogenizát. Tyto kroky byly opakovány 3x pro dosažení kompletní disociace buněk. Enzymatickou reakci jsem zastavila přidáním 1 ml kultivačního média. Následně jsem tuto suspenzi filtrovala pomocí sítka o velikosti pórů 40 μm do nové zkumavky. Zkumavku s buňkami jsem centrifugovala (5 min, 110x g, 25 °C) a odstranila supernatant. Takto připravenou testikulární suspenzi jsem dále použila pro experimenty s vybranou 3D kultivační metodou.

5.5 Metody 3D kultivace

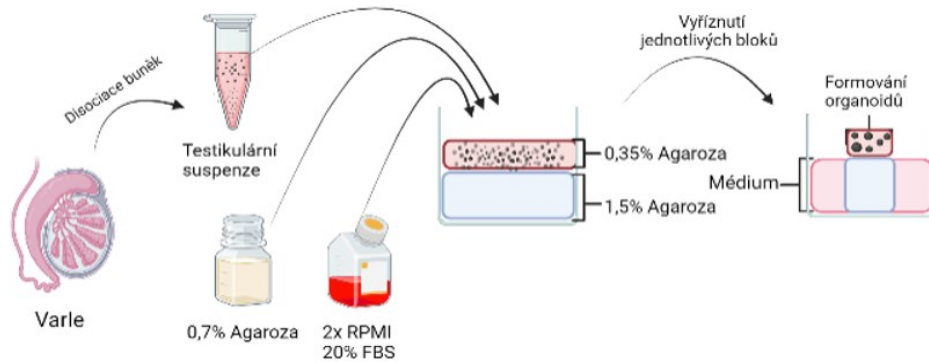
Za účelem vytvoření testikulárních organoidů z varlat *X. tropicalis* jsem vybrala na základě literatury dva typy kultivačních systémů využívající podkladové matrice agarózy nebo matrigelu. Tyto systémy jsou často používány pro 3D kultivaci u vyšších obratlovců, Část protokolu s agarózovým systémem jsem v průběhu projektu upravila a přidala pre-agregační fázi. Testikulární suspenzi jsem kultivovala ve visuté kapce s předpokladem vylepšení podmínek pro vznik agregátů. Veškeré experimenty jsem provedla jak s *X. t.* testikulární suspenzí, tak s myší testikulární suspenzí.

5.5.1. Kultivace ve dvouvrstevné agaróze

Bez pre-agregační fáze ve visuté kapce

Tento systém sestává ze dvou vrstev různě koncentrovaného (1,5%; 0,35%) roztoku agarózy (Obr. 7). Den před zahájením experimentu bylo nutné připravit první základovou vrstvu z 1,5% agarózy v diH₂O. Sterilně v laminárním boxu jsem přesunula 3 ml 1,5% agarózového roztoku do každé z 6-ti jamek kultivační destičky a nechala 2 hodiny zatuhnout. K této podkladové vrstvě jsem po ztuhnutí gelu přidala základní kultivační médium a destičku inkubovala přes noc v termostatu, aby se gel nasál médiem namísto původní vody. Veškerou tekutinu jsem následující den odsála. Pro druhou vrchní vrstvu jsem připravila 0,7% roztok low-melting agarózy v diH₂O. Po jejím rozpuštění jsem roztok temperovala na 37 °C nebo 30 °C kvůli snížení tepelného šoku pro savčí nebo *X.t.* buňky. Mezitím jsem připravila testikulární suspenzi (viz kap. 5.4), kterou jsem resuspendovala v ředícím médiu obsahující 2x RPMI, 20% FBS, 50 $\mu\text{l/ml}$ gentamycinu a temperovala na potřebnou teplotu. Obě složky vrchní vrstvy, tedy 0,7% low-melting agaróza a buněčná suspenze v ředícím médiu, jsem sterilně smíchala v poměru 1:1. 1 ml směsi jsem přidala do každé jamky obsahující již základní vrstvu (1,5% agaróza). Destičku jsem následně přesunula na 10 min do 4 °C pro zatuhnutí. Sterilním

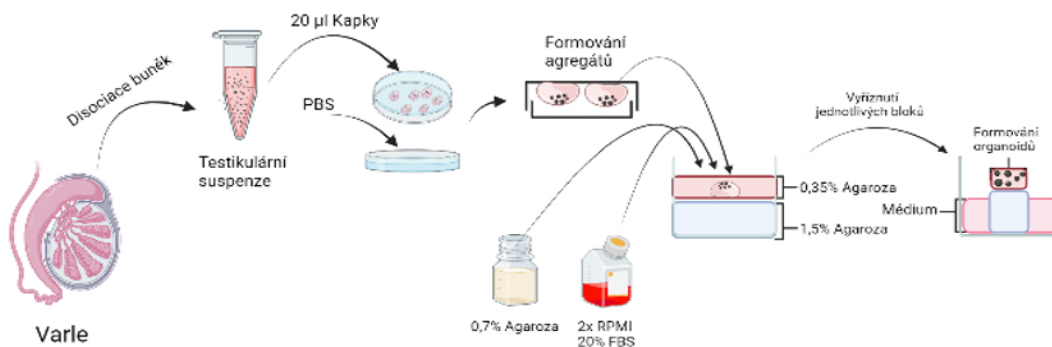
skalpelem jsem dále vyřízla z každé jamky čtverce přibližně 5x5 mm a ty umístila do nové jamky, kterou jsem vyplnila čerstvým základním kultivačním médiem tak, aby médium dosahovalo výšky pouze spodní vrstvy a vzniklo rozhraní vzduch/médium. Destičku s buňkami jsem inkubovala v termostatu ve standardních podmínkách, médium jsem měnila co 3 dny.



Obr. 7 Schématické znázornění přípravy organoidů v agarózovém kultivačním systému. Schéma znázorňující kultivaci testikulární suspenze v blocích dvojrstevné agarózy. Vytvořeno v BioRender.com.

S pre-agregační fází ve visuté kapce

Pro vytvoření kompaktních organoidů jsem testikulární suspenzi nechala nejprve agregovat ve visuté kapce a poté jsem jednotlivé agregáty přenesla do agarózy pro dlouhodobou kultivaci (Obr. 8). Kultivaci ve visuté kapce jsem provedla tak, že připravenou testikulární suspenzi (viz kap. 5.4) jsem resuspendovala v základním kultivačním médiu a na vnitřní stranu víčka Petriho misky jsem vytvořila kapky o objemu 20 μ l. Víčko s kapkami jsem následně otočila o 180° a do misky jsem doplnila PBS pro zachování vlhkosti. Visuté kapky jsem kultivovala ve standardních podmínkách, a to 2-3 dny v případě myší suspenze a 5-7 dnů v případě suspenze *X. tropicalis*. Poté jsem agregáty opatrně přenesla pomocí Pasteurovy pipety



Obr. 8 Schématické znázornění přípravy organoidů v agarózovém kultivačním systému. Schéma znázorňující kultivaci testikulární suspenze nejprve ve visuté kapce a následně přenesení formovaných agregátů do bloků dvojrstevné agarózy. Vytvořeno v BioRender.com.

a dál kultivovala ve dvouvrstevné agaróze dle stejného postupu jako v případě *kultivace bez agregace*.

5.5.2. Kultivace v matrigelu

Jednovrstevný matrigel

Nejméně hodinu před zahájením experimentu jsem nechala zvolna rozmrazit při 4 °C poměrnou část matrigelu (skladován při -20 °C). Manipulace s matrigelem probíhala vždy na ledu a pouze s vychlazenými špičkami, aby se zamezilo předčasné polymeraci.

Testikulární suspenzi jsem připravila viz kap. 5.4 a vzniklý supernatant co nejdůkladněji odstranila (Obr. 9). Zkumavku s peletou jsem ponořila do ledu a dále resuspendovala ve 100 µl matrigelu. Na předem předeřátou 12 jamkovou destičku jsem připravila 10 µl kapky matrigelu s buňkami a destičku inubovala 10 min v inkubátoru (29 °C v případě *X. t.*) pro rychlejší polymeraci matrigelu. Všechny jamky jsem následně zalila 500 µl základního kultivačního média. Buňky jsem kultivovala dle standardních podmínek a každé 3 dny měnila médium.

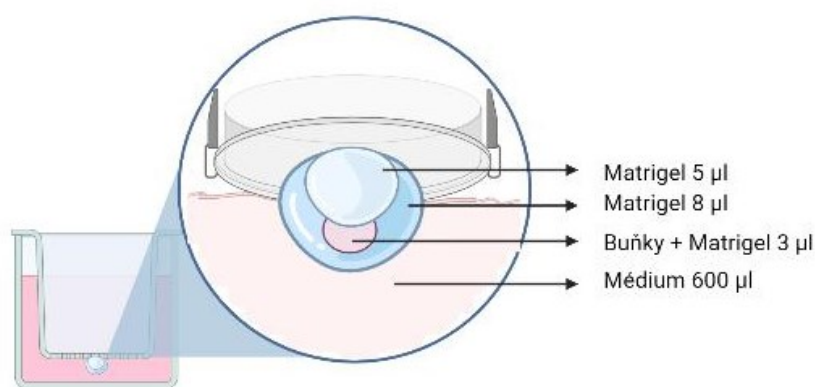


Obr. 9 Schématické znázornění přípravy organoidů v savčím matrigelu. Schéma znázorňuje kultivaci testikulární suspenze v jedné kapce matrigelu. Vytvořeno v BioRender.com.

Třívrstevný matrigel

Metoda třívrstevného matrigelu zahrnuje kultivaci s možností agregace i dlouhodobé kultivace zároveň bez dalších manipulací navíc (Obr. 10). Před zahájením experimentu jsem nejméně na 1 h vložila alikvót matrigelu do 4 °C, vychladila špičky a nachystala led. Připravila jsem si sterilizovanou uzavíratelnou nádobu s víkem, sterilní pinzetu a 12 jamkovou destičku s inzerty (0,4-µm).

Inzerty jsem vložila membránou vzhůru do nádoby a na každý přidala kapku matrigelu o objemu 5 μ l. Uzavřenou nádobu jsem inkubovala v termostatu minimálně 15 min pro zatuhnutí matrigelu. Mezitím jsem připravila testikulární suspenzi (kap. 5.4) a vzniklou peletu buněk resuspendovala v základním kultivačním médiu a matrigelu v poměru 1:1. Na první 5 μ l kapku jsem přidala 3 μ l této směsi buňky/matrigel a opět inkubovala v termostatu do zatuhnutí. Obě kapky jsem na závěr překryla vrstvou matrigelu o objemu 8 μ l. Tuhnoucí proces trval 20 min a inzerty jsem následně přenesla do 12 jamkové destičky s připravenými 600 μ l základního kultivačního média v každé jamce. Buňky jsem kultivovala při standardních podmínkách po dobu 14 dnů a médium měnila každé 3 dny.



Obr. 10 Schématické znázornění přípravy organoidů v savčím matrigelu. Schéma znázorňuje kultivaci testikulární suspenze v třívrstevném matrigelu. Vytvořeno v BioRender.com.

5.6 Reverzní transkripce a PCR

Pro analýzu genové exprese jsem zvolila metoda reverzní transkripce s následným PCR (RT-PCR). K izolaci RNA z buněk a tkání jsem použila sady RNeasy[®] Mini Kit a RNeasy[®] Micro Kit a izolaci jsem provedla dle instrukcí výrobce doplněno o působení DNázy I. po dobu 15 min kvůli eliminaci kontaminace vzorku genomovou DNA. Pro vytvoření komplementární DNA (cDNA) jsem použila RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Synthesis Kit a provedla reverzní transkripci dle instrukcí výrobce. Vstupní koncentrace RNA do reakce byla pro všechny použité vzorky 200 ng/ μ l. Ke každému vzorku jsem vytvořila i negativní kontrolu, která ve své směsi neobsahovala reverzní transkriptázu, a to pro odhalení možné kontaminace genomickou DNA ve vzorku.

Pro analýzu vzorků jsem vybrala na základě literatury vhodné geny a provedla návrh primerů (Tab. 1). PCR byla provedena pro všechny vzorky dle následujícího složení i programu (Tab. 2).

Složení reakční směsi:

37,5 μ l H₂O
 5 μ l 10x Taq pufru s KCl
 3 μ l 25 mM MgCl₂
 1 μ l 10 μ M předního primeru (F)
 1 μ l 10 μ M zadního primeru (R)
 1 μ l 10 mM dNTP Mix
 1 μ l templátu (ss cDNA)
 0,5 μ l Taq DNA polymerázy 5 U/ μ l

Teplota	Čas	Opakování
94°C	1 min	1
94°C	30 s	35
60°C	1 min	
72°C	1,5 min	
72°C	5 min	1

Tab. 2 Jednotlivé kroky PCR

Vzorky jsem po ukončení PCR obarvila BFM v poměru 3 μ l BFM/10 μ l vzorku. Detekci přítomnosti amplifikátů jsem provedla pomocí elektroforetické separace v 1,2% agarozovém gelu obsahující EtBr, zalitém v TBE pufru.

5.7 Histologické barvení řezů varlat

Varlata vyjmuta z juvenilního (5 měsíců) a dospělého (3 roky) samce *X. tropicalis* jsem opláchl v 2/3 PBS a fixovala v 4% PFA přes noc při 4 °C. Vzorky jsem promyla 3x5 min v 2/3 PBS a dále vzorky dehydratovala v EtOH:

- * 30% na 10 min
- * 50% na 10 min
- * 80% na 10 min
- * 96% na 10 min
- * absolutní EtOH – 3x na 10 min

Vzorky jsem následně přenesla do benzenu a promyla 2x5 min, kvůli nemísitelnosti parafinu s EtOH. Po odstranění benzenu jsem přidala směs benzen:parafin (1:1) a inkubovala v termostatu při 58 °C po dobu 20 min. V termostatu byla varlata dále přenesena do čistého parafinu na 1 h. Mezitím jsem si připravila keramickou nádobu, kterou jsem pokryla vrstvou parafinového oleje. Nádobu jsem vyhřála na 58 °C a poté vyplnila čistým parafinem. Do takto připravené nádoby jsem vhodně vložila varlata a nechala přes noc inkubovat při 58 °C. Další den jsem vzorky přesunula na 30 min do 4 °C, aby parafin rychle zatuhl. Vzorky v parafinu

jsem vyřezala do bloků vhodné velikosti a připevnila k dřevěnému nástavci. Na mikrotomu jsem připravila řezy o tloušťce 8 μm , které jsem instalovala na mikroskopická sklíčka.

Barvení hematoxylinem a eosinem (H&E) jsem provedla dle standardního protokolu. Nejprve jsem preparáty deparafinovala pomocí xylenu 3x10 min. Dále byly preparáty inkubovány v absolutním EtOH po dobu 5 min a poté v sestupné řadě EtOH (96%, 80%, 50%) 3 min v každé řadě. Preparáty jsem následně promývala proudem vody po dobu 5 min a poté přenesla do hematoxylinu po dobu 30 min. Řezy jsem poté promývala vodou nejméně 10 min. Preparáty jsem barvila Eosinem 30 s a poté promyla v tekoucí vodě po dobu 1 min. Následovaly dehydratační kroky v 96% EtOH po dobu 5 min a v absolutním EtOH 2x5 min. Sklíčka jsem na závěr inkubovala v xylenu 3x5 min a poté montovala do zalévacího média Entellan. Pro snímání obrázku jsem použila mikroskop Olympus BX40.

5.8 Kryosekce varlat s následným imunofluorescenčním barvením

Vyjmutá varlata 4ročního (dospělec) a 4měsíčního (juvenil) samce *X. tropicalis* jsem opláchla v 2/3 PBS a dále fixovala ve 4% PFA přes noc při 4 °C. Poté jsem varlata promyla 3x5 min v 2/3 PBS a následně prosycovala roztokem 20% sacharózy – opět přes noc při 4 °C. Další den jsem vzorky montovala do O.C.TTM Compound 4583 média a skladovala při -80 °C.

Pro přípravu řezových preparátů varlat byla teplota v komoře kryotomu nastavena na -20 °C a tloušťka řezů na 10 μm . Jednotlivé řezy jsem přenesla na mikroskopická skla Super Frost Plus, jejichž povrch je speciálně upraven poly-L-lysinem, řezy tedy lépe drží při dalších manipulacích. Takto připravené řezové preparáty je možné dlouhodobě uchovávat při -80°C.

Imunofluorescenční barvení připravených řezů jsem provedla následovně. Sklíčka s řezy jsem nejdříve promyla 3x5 min v PBS a fixovala na 5 minut ve 4% PFA. Sklíčka jsem znovu promyla 3x5 min v PBS, dále permeabilizovala roztokem 1% SDS v PBS po dobu 5 min a opět promyla 3x5 min v PBS. Pro blokování nespecifických vazebných míst jsem použila 2% BSA v PBS po dobu 60 min. Poté jsem vzorky inkubovala 60 min v roztoku 2% BSA v PBS s primárními protilátkami ve vlhké komůrce. Vzorky jsem dále promyla 3x5 min v 0,1% roztoku Triton X-100 v PBS a inkubovala v sekundárních protilátkách (opět v 2% BSA v PBS) po dobu 45 minut ve vlhké komůrce. Od tohoto bodu jsem sklíčka vystavovala co nejméně světlu. Po inkubaci jsem sklíčka promyla 3x5 min v PBS a montovala do média Mowiol/DAPI. Obrázky jsem snímala pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX40.

5.9 Duální imunocytochemické barvení

Povrch krycích sklíček použitých pro imunofluorescenční barvení jsem nejprve před nasazením buněk pokryla 100 μ l poly-L-lysinu. Ošetřená sklíčka jsem nechala při 37 °C po dobu 30 min a poté opláchla PBS. Na takto upravená sklíčka jsem nasadila ovlivněné i kontrolní skupiny XtiSCs. Následná kultivace probíhala po dobu dvou dnů.

Krycí sklíčka s buňkami jsem fixovala ve 4% PFA po dobu 15 min a dále promyla 3x5 min v PBS. Permeabilizaci jsem provedla 0,1% Tritonu X-100 v PBS po dobu 30 min. Buňky byly opět promyty 3x5 min v PBS. Následovala blokace nespecifických míst pomocí 2% BSA v PBS 45 min. Sklíčka s buňkami jsem poté inkubovala přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C s primárními protilátkami v roztoku v 2% BSA, 0,025 % Tritonu a PBS. Následující den jsem sklíčka promyla 5x5 min v PBS a přesunula do roztoku sekundárních protilátek s 2% BSA, 0,025% Tritonu X-100 a PBS. Od tohoto kroku jsem vzorky skrývala co nejvíce před expozicí světla. Inkubace sekundárními protilátkami probíhala 60 min ve vlhké komůrce. Následovalo promytí 5x5 min v PBS. Dále jsem jednotlivá sklíčka s buňkami montovala na podložní skla do roztoku Mowiol/DAPI a skladovala při 4 °C ve tmě. Snímky buněk jsem fotila pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX40.

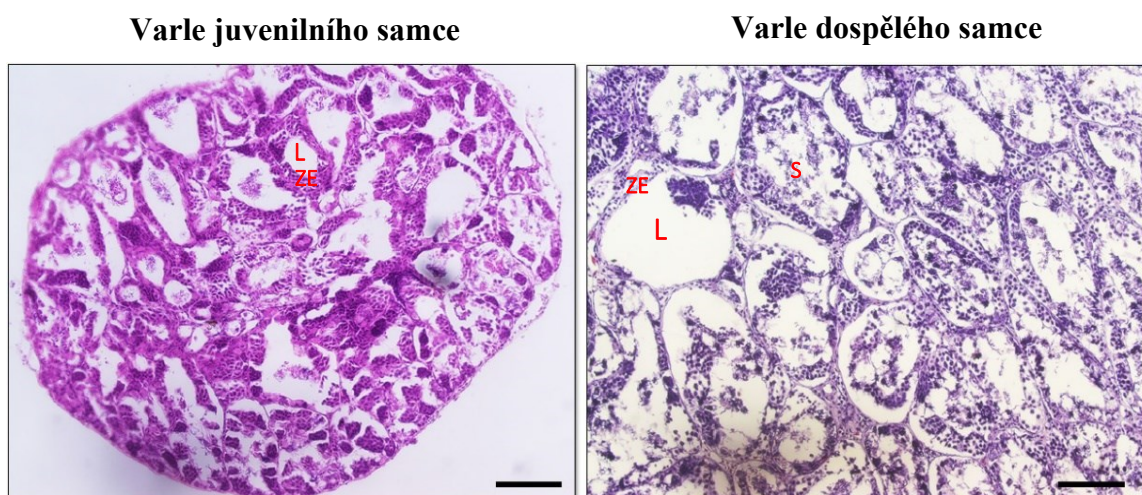
5.10 Imunofluorescenční barvení organoidů

Pro imunofluorescenční barvení jsem použila organoidy po 14denní kultivaci v matrigelu. Nejprve jsem odsála médium a kapky matrigelu jsem promyla 1x v PBS. Následovalo promývání v 4% PFA, ve kterém je matrigel rozpustný. Dle potřeby jsem průběžně s obsahem vířila, aby se organoidy uvolnily. Organoidy jsem dále fixovala po dobu 45 min v nově přidaném 4% PFA při pokojové teplotě. Po fixaci jsem organoidy 5x5 min promývala v PBS. Následně jsem organoidy přenesla na podložní sklo s vyhloubenou jamkou, kam jsem přidala blokovací pufr, a organoidy permeabilizovala 4 h při pokojové teplotě. Po odstranění blokovacího pufru jsem na každou jamku s organoidy přidala 100 μ l roztoku čerstvého blokovacího pufru obsahujícího primární protilátku a inkubovala přes noc při 4 °C. Následující den jsem organoidy promyla 3x15 min v PBS a připravila nový roztok blokovacího pufru obsahujícího sekundární protilátku. Do každé jamky jsem poté přidala 100 μ l tohoto roztoku a inkubovala přes noc při 4 °C. Po inkubaci jsem organoidy promyla 3x15 min v PBS. Organoidy jsem následně montovala do Mowiol/DAPI. Takto připravené vzorky jsem snímala na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM880.

6. Výsledky

6.1 Dynamika vývoje Sertoliho buněk u *Xenopus tropicalis*

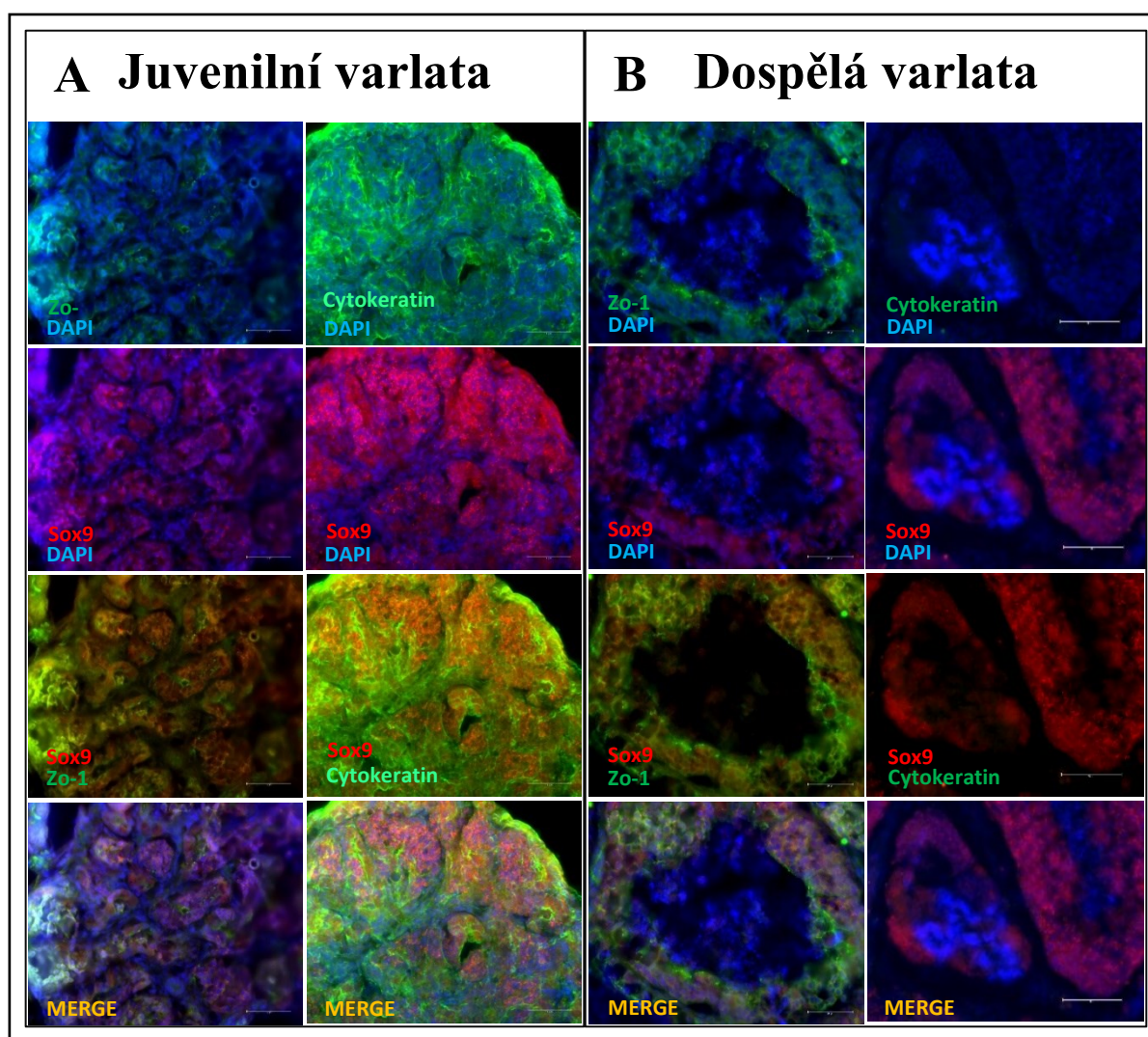
Pro ověření a analýzu dynamiky vývoje SCs v různých časových obdobích života žáby druhu *X. tropicalis* jsem odebrala varlata juvenilního samce ve stáří 5 měsíce a z dospělého samce ve stáří 3 roky. Histochemické barvení hematoxylinem a eosinem ukazuje zformované semenotvorné kanálky u obou různě starých jedinců (Obr. 11). U juvenila dochází stále k vývoji a proliferaci somatických buněk varlat, jeho semenotvorné kanálky jsou tedy výrazně menší a lumen kanálků není příliš expandované. Naopak u dospělého samce lze pozorovat tenký zárodečný epitel oproti rozsáhlému lumen kanálků, ve kterých jsou již diferencované spermatidy.



Obr. 11 Histochemické barvení H&E parafinových řezů varlat *Xenopus tropicalis*. Vlevo juvenilní varle samce ve stáří 5 měsíce, vpravo dospělé varle samce ve stáří 3 roky. ZE - zárodečný epitel, L - lumen, S - spermatidy. Měřítka reprezentují 100 µm.

U obou skupin varlat jsem dále prověřila expresi vybraných proteinů – Zo-1, cytokeratin, Sox9. SCs, které se již nacházejí uvnitř tubulů, ustávají v proliferaci a vytvářejí mezi sebou těsné spoje. Tímto způsobem vzniká hemato-testikulární bariéra. Protein Zo-1 je membránový protein, který se obecně podílí na tvorbě těsných spojů. Jeho exprese hraje roli ve vývojových stádiích SCs a ve schopnosti SCs vytvářet hemato-testikulární bariéru. Pro nematurované SCs je u mnoho druhů typická exprese cytokeratinu, což je IF protein běžně se vyskytující u epitelálních buněk. Sox9 je transkripční faktor, který je produkován SCs nezávisle na jejich vývojovém stádiu a je tedy ideálním markerem pro SCs. Řezy juvenilních i dospělých varlat jsem barvila pomocí imunofluorescenčního barvení protilátkami proti

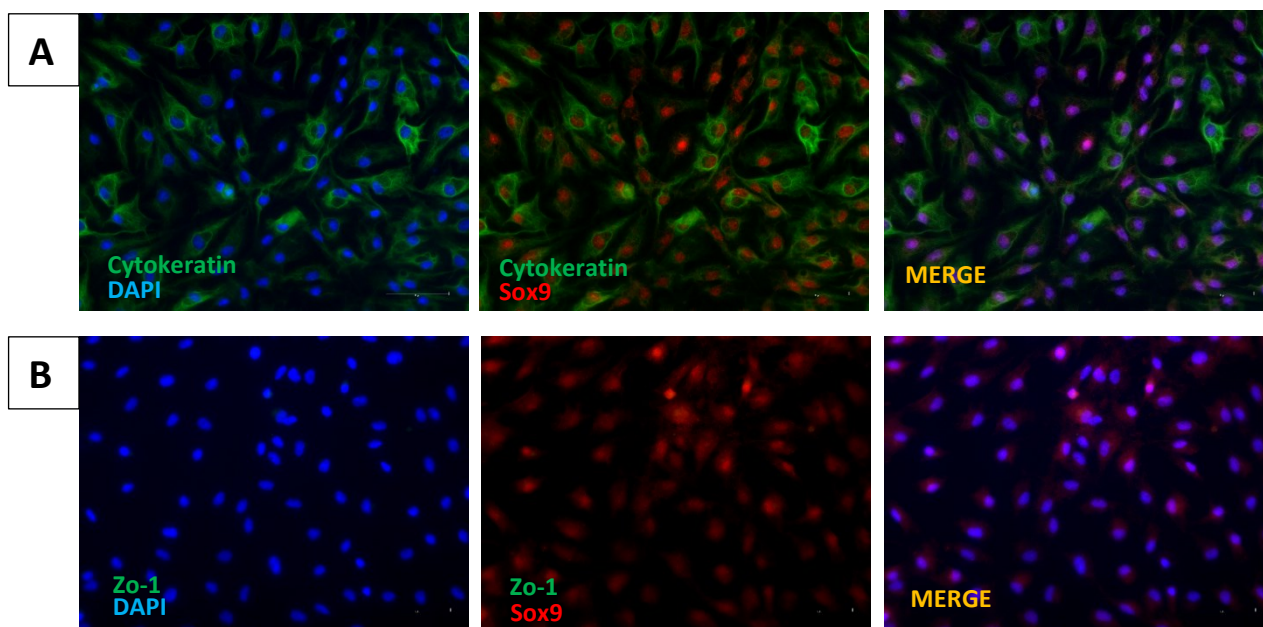
Zo-1/Sox9 a Cytokeratin/Sox9 (Obr. 12). Pozitivní signál u barvení proti Zo-1 i Sox9 u obou různě starých varlat *Xt* poukazuje na přítomnost těsných spojů v hemato-testikulární bariéře již od mladého věku samce. Naopak velmi dynamická je změna exprese cytokeratinu, který je bohatě přítomen u mladých varlat, avšak v dospělých varlatech není exprimován. Z těchto výsledků vyplývá, že cytokeratin lze použít jako marker nematurovaných Sertoliho buněk i u druhu *X. tropicalis*. Expresce Zo-1 lze použít jako marker SCs nacházejících se již uvnitř semenotvorných kanálků.



Obr. 12 Imunohistochemické barvení řezů varlat *Xenopus tropicalis*. Při dvojitém imunologickém barvení byly použity protilátky Zo-1 (zeleně)/Sox9 (červeně) nebo Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). **A)** Testikulární řezy juvenilního samce *X. tropicalis*. **B)** Testikulární řezy dospělého samce *X. tropicalis*. Měřítka reprezentují 50 μm .

6.2 Charakterizace kolonií XtiSCs

Jak bylo již zmíněno XtiSCs reprezentují společného progenitora pro peritubulární myoidní buňky i Sertoliho buňky (Tlapakova *et al.*, 2016). V rámci další charakterizace těchto buněk jsem provedla dvojité imunofluorescenční barvení protilátkami proti Cytokeratinu/Sox9 a dále proti Zo-1/Sox9, abych ověřila schopnost XtiSCs tvořit těsné spoje (Obr. 13). Jednotlivá barvení prokázala pozitivní signál proti Cytokeratinu/Sox9. Zajímavý je výsledek barvení proti Zo-1/Sox9, kde lze pozorovat pozitivní signál pouze pro Sox9, Zo-1 nebyl detekován. Výsledky barvení ukazují, že XtiSCs nevytváří těsné spoje. Exprese Cytokeratinu potvrzuje nematurovaný fenotyp buněk.



Obr. 13 Imunocytochemická analýza kolonií XtiSCs. Charakterizace XtiSCs pomocí dvojitého barvení protilátkami proti Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9 (marker Sertoliho buněk) A) Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně) B) Barvení proti Zo-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 µm. Všechna barvení byla 3x zopakována nezávisle na sebe

Analýza genové exprese na úrovni mRNA XtiSCs (Tab. 3) souhlasí s předchozími výsledky z laboratoře školitelky (Tlapakova *et al.*, 2016) a jsou pozitivní pro expresi genů specifických pro Sertoliho buňky (*Sox9*, *Vim*, *Lif*), peritubulární myoidní buňky (*Acta2*, *Lif*) i pro mesenchymální buňky (*Itgb1*, *Cd44*, *Thy-1*). Markery pro zárodečné buňky (*Dazl*, *Ddx4*) a Leydigovy buňky (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*) nebyly detekovány. Další charakterizace XtiSCs zahrnovala geny soustředěné na SCs a jejich zrání. Ze zvolených genů specifických pro nezralé SCs nebyl detekován pouze *Amh*, dále byla snížena exprese genu *Cyp26b1*. Kódovaný protein

Symbol genu <i>X. tropicalis</i>	Název genu	Expresse genu							
		Varle (4 roky)	XtiSCs	XtiSC + DM	XtiSCs + TM4	XtiSCs + DM + TM4	XtiSCs + TM4 KM	XtiSc + Xt 4.roky	XtiSc + Xt 4.roky KM
Markery Sertoliho buněk									
<i>sox9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9								
<i>vim</i>	vimentin								
Markery nematurovaných Sertoliho buněk									
<i>amh</i>	anti-Mullerian hormone								
<i>krt18.1</i>	keratin 18, type I								
<i>cyp26b1</i>	cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1								
<i>ncam1</i>	neural cell adhesion molecule 1								
Markery maturovaných Sertoliho buněk									
<i>ar</i>	androgen receptor								
<i>cldn11</i>	claudin 11								
<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1								
<i>shbg</i>	sex hormone binding globulin								
Markery Peritotubulárních myoidních buněk									
<i>lif</i>	leukemia inhibitory factor								
<i>acta2</i>	actin alpha 2, smooth muscle α-actin								
Markery Leydigových buněk									
<i>cyp11a1</i>	cytochrome P450 Family 11 subfamily A member 1								
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1								
Markery zárodečných buněk									
<i>dazl</i>	deleted in azoospermia-like								
<i>ddx4</i>	DEAD-Box Helicase 4								
Markery mesenchymálních kmenových buněk									
<i>itgb1</i>	integrin beta-1								
<i>cd44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)								
<i>thy1</i>	Thy-1 cell surface antigen								
Pozitivní kontrola									
<i>tubb</i>	tubulin								

Tab. 3 Celkové srovnání změn v genové expresi XtiSCs po ovlivnění. RT PCR analýza ze vzorků zleva varlat *X. tropicalis*, XtiSCs, XtiSCs ovlivněné DM, XtiSCs ovlivněné ko-kultivací s TM4, XtiSCs ovlivněné DM a ko-kultivací s TM4, XtiSCs ovlivněné kondicionovaným médiem TM4, XtiSCs ovlivněné ko-kultivací s testikulární kulturou Xt (4 roky), XtiSCs ovlivněné kondicionovaným médiem Xt (4 roky).

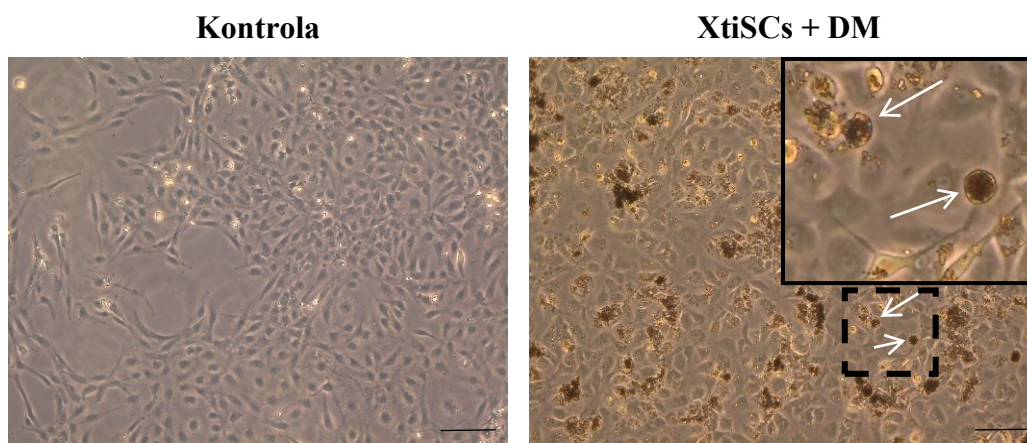
Cyp26b1 se účastní degradace RA, která hraje významnou roli v zahájení meiózy u zárodečných buněk. U genů specifických pro zralé SCs jsem prokázala expresi pro *Ar* (Androgenní receptor) a *Cld11* (Claudin 11). Ostatní geny pro maturovaný stav nevykazovaly pozitivní expresi. Celkově z výsledků z imunofluorescenčního barvení i z RT-PCR analýzy vyplývá, že kolonie XtiSCs představují nematurované testikulární buňky somatického původu.

6.3 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky

V rámci této práce jsem vyzkoušela hned několik postupů, které by mohly mít na proces diferenciace XtiSCs vliv. Všechny přístupy byly zopakovány ve třech biologických opakování, které jsou reprezentovány následujícími výsledky.

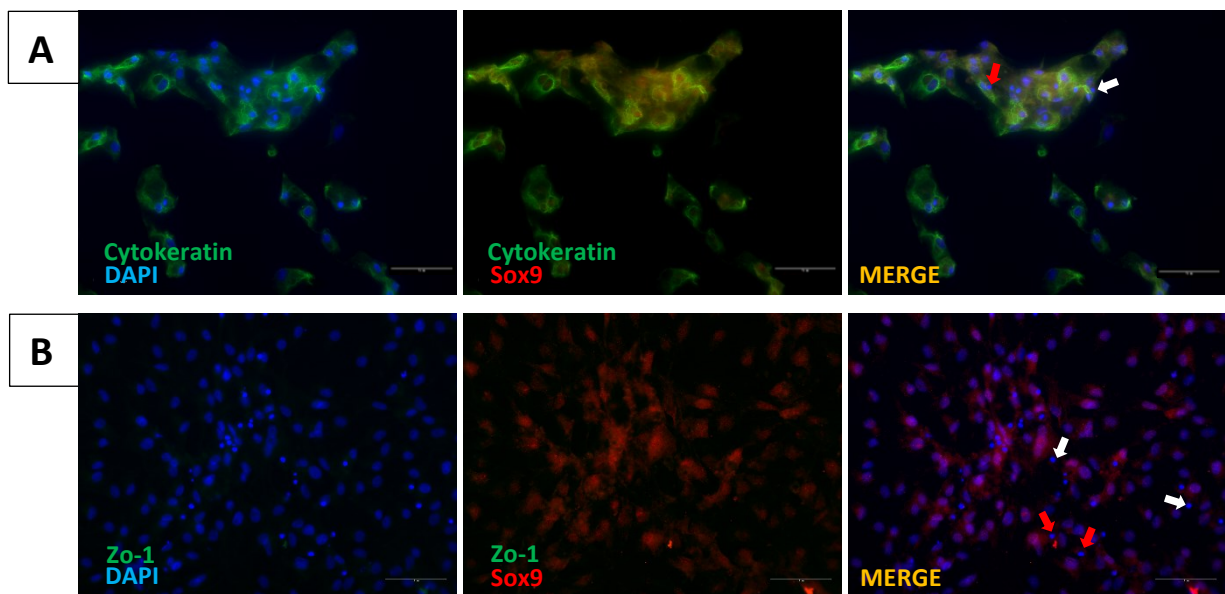
Skupina I.

Pro indukci diferenciace XtiSCs jsem v experimentech pro *Skupinu I.* použila a upravila protokol dle Shlush *et al.* (2017). Tento protokol kombinuje dvě diferenciální média, která svým obsahem mimikují fyziologii vývoje testikulárního niche (Shlush *et al.*, 2017). Již během kultivace byly patrné změny v morfologii některých buněk (Obr. 14). Tyto buňky byly oproti většině výrazně tmavé a tvarově kulaté.



Obr. 14 Indukce diferenciace XtiSCs v Sertoliho buňky pomocí diferenciálního média. Vlevo XtiSCs bez ovlivnění. Vpravo XtiSC ovlivněné diferenciálním médiem. Bílé šipky označují tmavé kulaté buňky. Měřítka reprezentují 100 μm .

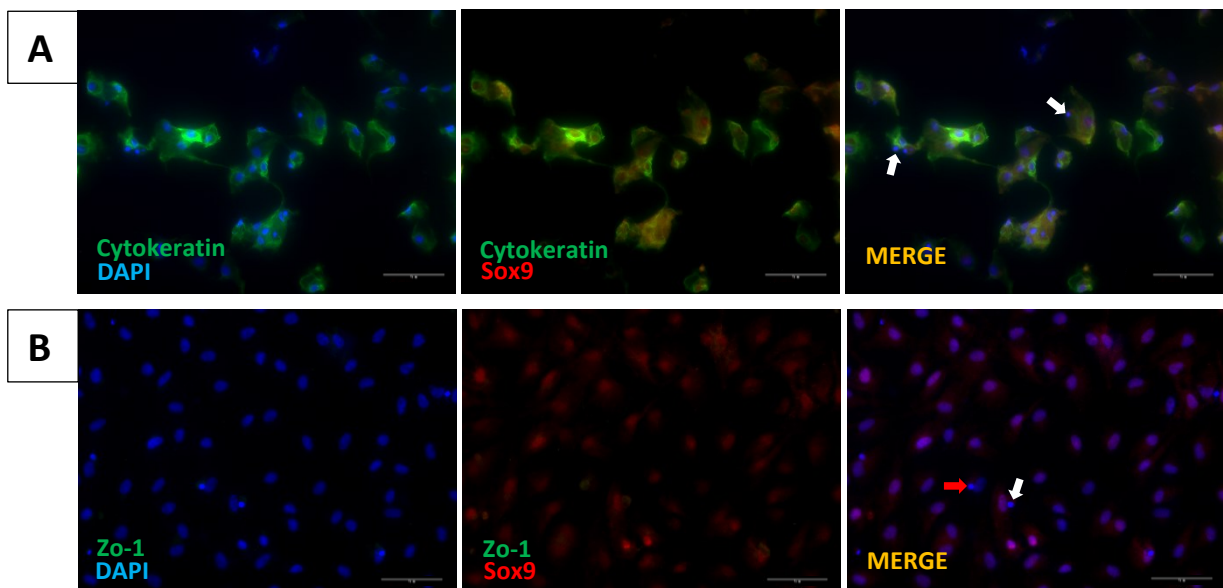
Další analýza pomocí imunofluorescenčního barvení (Obr. 15) prokázala pozitivní barvení protilátkami proti Cytokeratin/Sox9 u většiny buněk. Malé kulaté buňky ukázaly velmi nízkou a v některých případech i žádnou expresi pro oba zmíněné proteiny. Protein Zo-1 nebyl protilátkou detekován. Analýza genové exprese pomocí RT-PCR oproti negativní kontrole XtiSCs neprokázala výrazné změny v expresi pro většinu genů (Tab. 3). K relativnímu zvýšení exprese došlo u genu *Cyp26b1*, ke snížení exprese došlo u genu pro *Ar* oproti kontrole. Za zmínku stojí i nápadné snížení exprese pro gen *Acta2* (marker PTMCs). Zajímavým výsledkem je nicméně pozitivní exprese genů pro *Cyp11a1* a *Cyp17a1*, tyto geny jsou typické pro Leydigovy buňky a hrají roli ve steroidogenezi. Celkově z dosažených výsledků vyplývá, že pod vlivem tohoto diferenciačního média nedošlo u XtiSCs k diferenciaci do zralého, Sertoliho buňkám podobného stavu. Výsledky dále ukazují, že došlo u některých buněk k diferenciaci směrem k jinému buněčnému typu než SCs a že tyto buňky exprimují některé ze steroidogenních enzymů.



Obr. 15 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí diferenciačního média. Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami proti Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. **A)** Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně) **B)** Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Červené šipky ukazují na malé kulaté buňky s velmi nízkou expresí Cytokeratinu nebo Sox9. Bílé šipky ukazují na malé kulaté buňky bez exprese Sox9. Měřítka reprezentují 50 μm . Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

Skupina II.

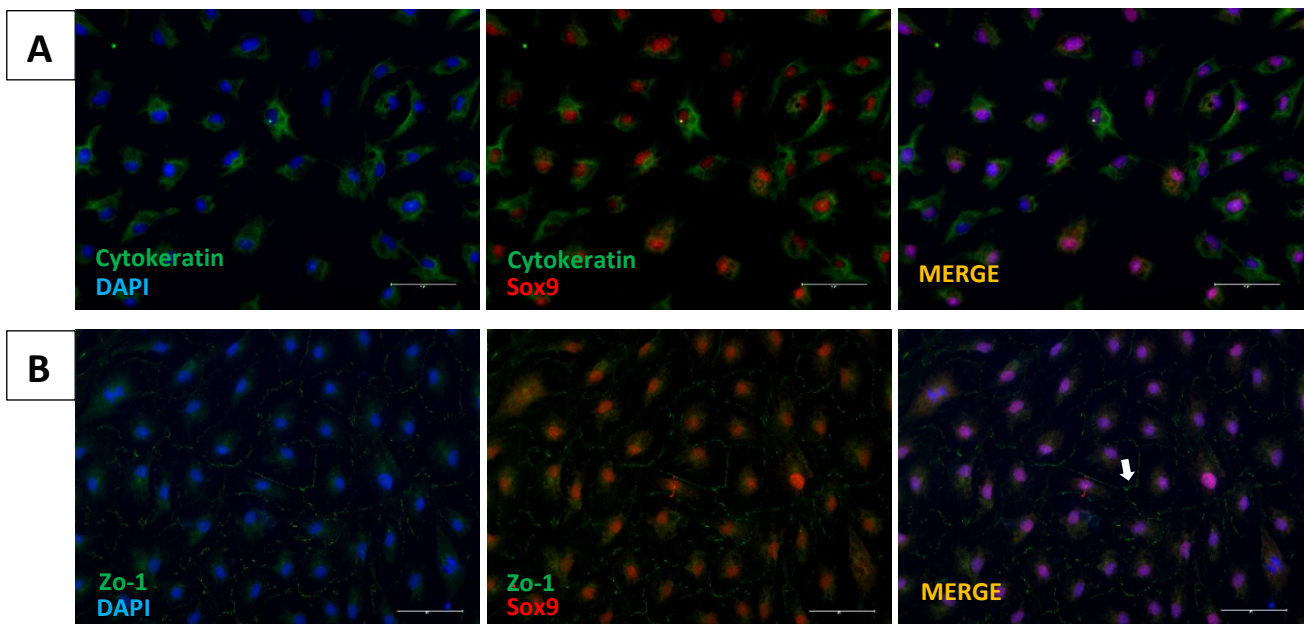
Pro tyto pokusy jsem opět využila upravený protokol podle Shlush *et al.* (2017) a spolu s diferenciačním médiem jsem použila i ko-kultivaci XtiSCs s imortalizovanou myší buněčnou linií Sertoliho buněk (TM4). Během kultivace se buňky rozlišily na dva morfologicky odlišné typy stejně jako v případě *Skupiny I*. Imunofluorescenční barvení (Obr. 16) opět neprokázalo expresi Zo-1 a pozitivní bylo barvení pouze pro Sox9. Pozitivní bylo i barvení proti Cytokeratin/Sox9. V případě skupiny buněk s kulatou morfologií byla exprese Cytokeratin/Sox9 snížena stejně jako u *Skupiny I*. Analýza genové exprese neprokázala žádné velké změny oproti *Skupině I* (Tab. 3). Výjimkou je výsledek RT-PCR pro gen *Cyp17a1*, který nebyl detekován. Druhý sledovaný gen účastníci se steroidogeneze (*Cyp11a1*) byl detekován. Další změnou byla relativně snížená exprese *Lif* oproti *Skupině I* i neovlivněných XtiSCs. Z hodnocení vyplývá, že se výsledky výrazně neliší od prvního přístupu použitého u *Skupiny I* a diferenciaci XtiSCs ve zralé Sertoliho buňky se nepodařilo prokázat ani v tomto případě.



Obr. 16 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí Diferenciačního média a ko-kultivace s TM4. Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami proti Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. **A)** Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně) **B)** Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Bílé šipky ukazují malé kulaté buňky s velmi nízkou expresí Cytokeratinu i Sox9. Červená šipka ukazuje na kulatou buňku bez exprese Sox9. Měřítka reprezentují 50 μm . Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

Skupina III.

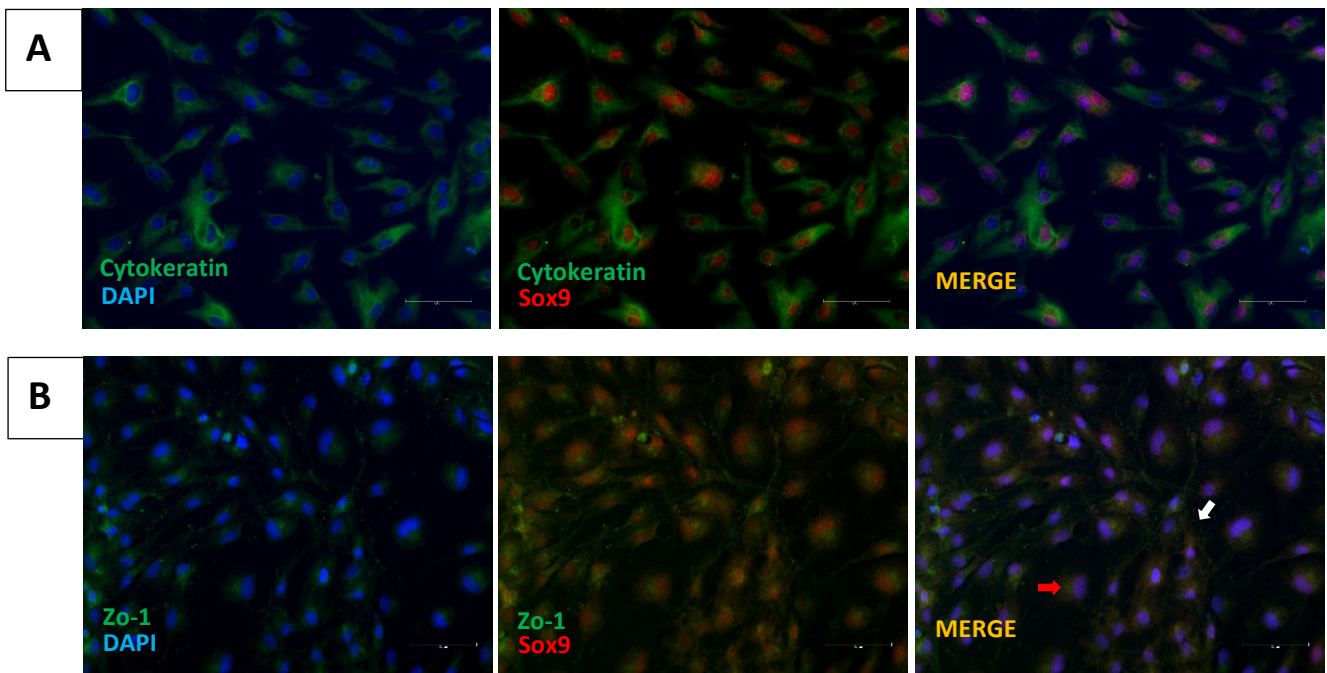
U této skupiny jsem testovala vliv samotných buněk TM4 na XtiSCs po společné kultivaci. Během experimentu jsem nezaznamenala žádné viditelné změny v morfologii. Následné imunofluorescenční barvení (Obr. 17) proti Cytokeratin/Sox9 bylo pozitivní, nicméně cytokeratinová síť se zdála být méně expandovaná oproti negativní kontrole XtiSCs. Velmi zajímavý je výsledek druhého barvení protilátkami proti Zo-1/Sox9, který prokázal přítomnost Zo-1 v ovlivněných buňkách. Další analýza pomocí RT-PCR odhalila změny i v expresi vybraných genů oproti neovlivněným XtiSCs (Tab. 3). Za zmínku rozhodně stojí gen *Cyp26b1*, který nebyl na úrovni mRNA u *Skupiny III.* detekován. Další změnou je relativně lehce zvýšená exprese zvolených genů maturovaných SCs (*Gata1*, *Shbg*), ostatní geny pro zralé SCs (*Ar*, *Cldn11*) nevykazovaly viditelných změn oproti kontrole. Další změna je v expresi pro *Lif*, která byla utlumena. Exprese *Lif* je přítomna v XtiSCs ale nikoli v dospělých varlatech *X. tropicalis*. Relativně snížena byla i exprese genu *Acta2* v porovnání s expresí genu u XtiSCs. Pro ostatní sledované geny jsem nepozorovala změny vůči neovlivněným XtiSCs. Shrnutí výsledků indikuje, že v případě ko-kultivace s TM4 dochází k určitému posunu buněk XtiSCs směrem k maturovanému SCs podobnému stavu.



Obr. 17 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí ko-kultivace s TM4. Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. **A)** Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně). **B)** Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Bílá šipka označuje místo pozitivního barvení proti Zo-1. Měřítka reprezentují 50 μm . Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

Skupina IV.

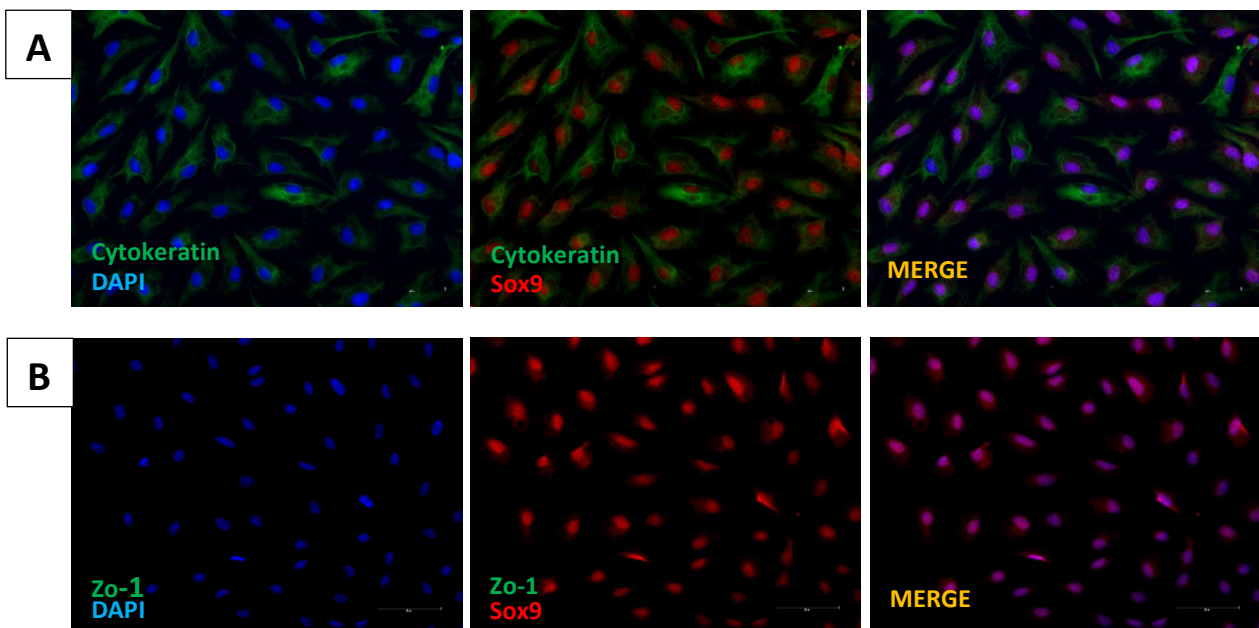
Kvůli rozdílným podmínkám kultivace savčích a žabích buněk, které můžou modifikovat chování přidaných TM4 buněk, jsem zvolila využití kondicionovaného média TM4. Kondicionované médium bylo nutné ředit 1:2 kvůli zvýšené úmrtnosti oproti obvyklému ředění 1:1. Zvýšenou úmrtnost lze přikládat rozdílné osmolaritě žabích buněk oproti savčím. Během kultivace jsem nepozorovala žádné viditelné změny morfologie. Výsledky imunofluorescenčního barvení (Obr. 18) nezaznamenaly změny v expresi pro Cytokeratin ani Sox9 a oba proteiny byly bohatě exprimovány. I v těchto experimentech se prokázala mírná exprese Zo-1. Přestože protein není pozorován na membránách všech buněk, jeho přítomnost je znatelná v endoplazmatickém retikulu buněk ve srovnání s kontrolou XtiSCs. Analýza genové exprese neprokázala výrazné změny oproti neovlivněné kontrole ve vybraných genech (Tab. 3). Výjimkou je gen *Lif*, který nebyl detekován. Výsledky celkově nepotvrzují úspěšnou diferenciaci XtiSCs do zralých SCs, nicméně lze pozorovat určitou změnu exprese ve prospěch genů pro SCs.



Obr. 18 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí kondicionovaného TM4 média. Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. A) Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně). B) Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Bílá šipka ukazuje na formující se těsný spoj. Červená šipka označuje pozitivní barevné proti Zo-1 v endoplazmatickém retikulu. Měřítka reprezentují 50 μ m. Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

Skupina V.

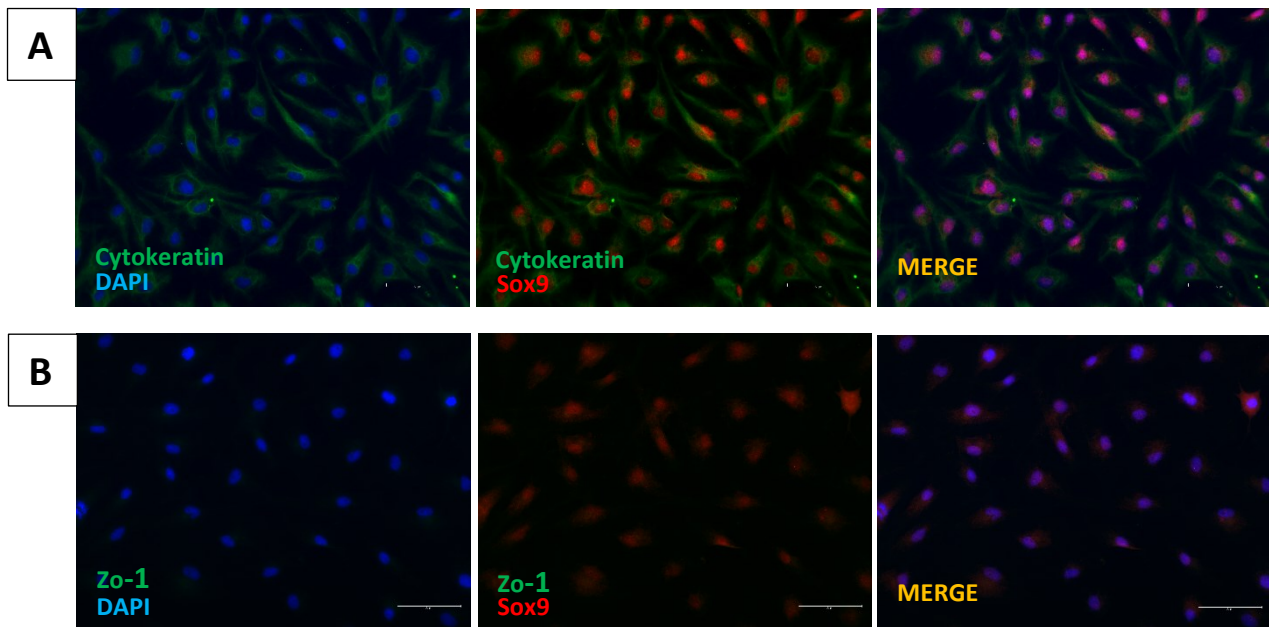
Pro tyto pokusy jsem vyzkoušela ko-kultivaci s testikulární suspenzí *X. tropicalis* izolované z žab starých 4 roky. Testikulární suspenze z dospělé žáby velmi rychle odumírala, což je u primárních kultur izolovaných z dospělců obvyklé. Signální molekuly produkované umírajícími buňkami zřejmě ovlivňovaly i kulturu XtiSCs, které následně vykazovaly vyšší úmrtnost oproti kontrole. Další problém byla častá kontaminace plísněmi, jelikož suspenzi z žab jsem připravovala semisterilně. Pro všechny tyto důvody jsem zkrátila dobu kultivace na jeden týden oproti ostatním postupům. Během kultivace i po ukončení ovlivnění jsem nepozorovala žádné změny v morfologii buněk. Výsledky imunofluorescenčního barvení (Obr. 19) prokázaly pozitivní signál pro Cytokeratin i Sox9. Protein Zo-1 nebyl protilátkou detekován. Při srovnání změn v expresi vybraných genů (Tab. 3) nedošlo téměř k žádným změnám oproti kontrole XtiSCs u většiny z nich. Výjimkou je relativně zvýšená exprese *Cyp26b1* a naopak zcela utlumena exprese *Lif*. Shrnutím výsledků u Skupiny V. lze říct, že u buněk nedošlo k diferenciaci směrem k SCs. Zároveň nebyly pozorovány větší změny v expresi oproti kontrole, což lze přikládat i právě zkrácené době kultivace.



Obr. 19 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí ko-kultivace s buňkami z *X. tropicalis* (4 roky). Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami proti Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. **A)** Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně) **B)** Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 μ m. Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

Skupina VI.

Vzhledem ke komplikacím u experimentů *Skupiny V.* jsem pro tyto experimenty vyzkoušela kondicionované médium Xt4. Médium jsem ředila běžně 1:1 a ovlivněné buňky XtiSCs vykazovaly standardní chování i přežití. Během kultivace jsem nepozorovala žádné změny v morfologii oproti kontrole. Imunofluorescenční barvení (Obr. 20) potvrdilo pozitivní signál pro Cytokeratin/Sox9. Exprese proteinu Zo-1 se neprokázala. Výsledky exprese na úrovni mRNA (Tab. 3) se ukázaly téměř nezměněné oproti negativní kontrole XtiSCs. Diferenciace buněk směrem k maturovaným SCs nebyla prokázána.



Obr. 20 Diferenciace XtiSCs v maturované Sertoliho buňky pomocí kondicionovaného Xt4 média. Imunofluorescenční dvojité barvení protilátkami proti Zo-1 nebo Cytokeratin a Sox9. **A)** Barvení proti Cytokeratin (zeleně)/Sox9 (červeně) **B)** Barvení proti ZO-1 (zeleně)/Sox9 (červeně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují 50 μm . Barvení bylo provedeno pro A i B u všech biologických replikátů nejméně 3x.

6.4 Příprava organoidů z testikulární suspenze *X. tropicalis*

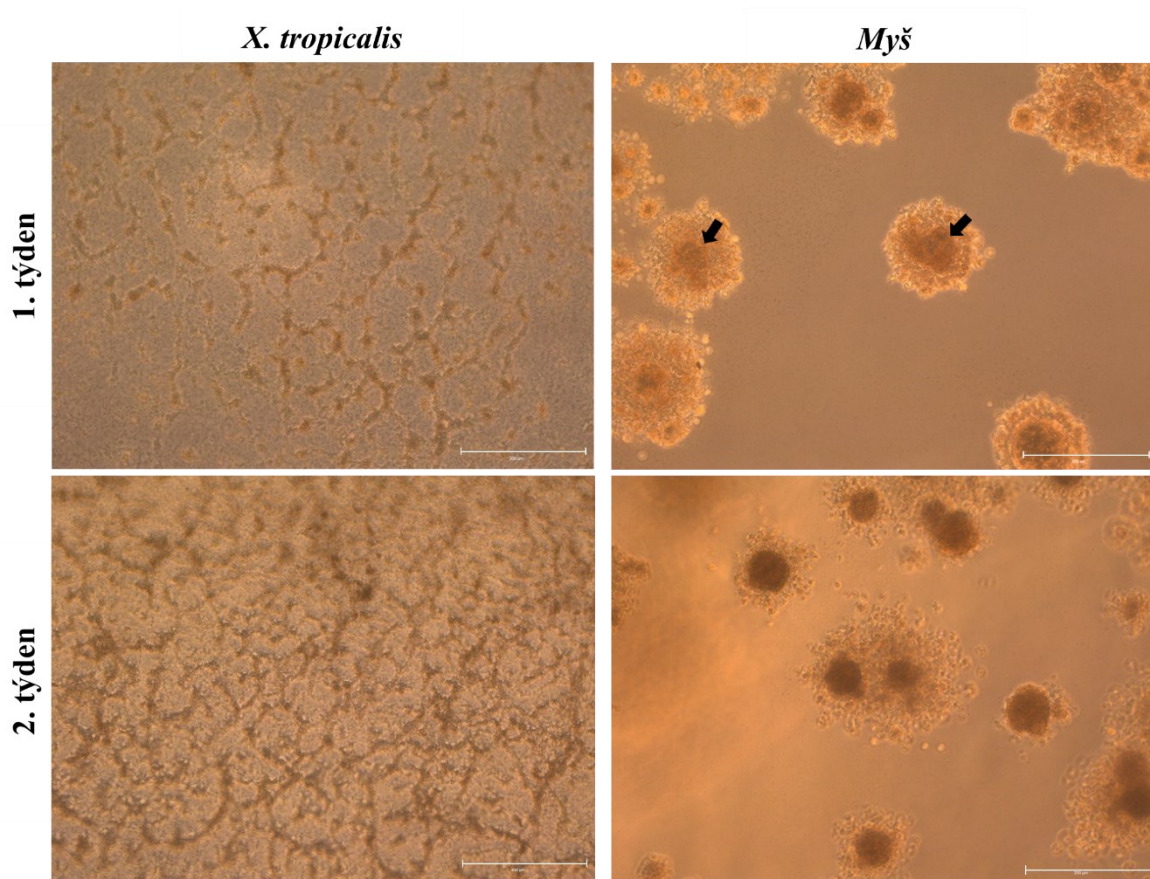
V následující části se věnuji výsledkům přípravy testikulárních organoidů z buněk samců *X. tropicalis* s použitím dvou kultivačních materiálů (agaróza, matrigel). Ve výsledcích hodnotím schopnost testikulárních buněk *X. tropicalis* tvořit kompaktní organoidy ve srovnání s myším modelem. Testovala jsem celkově čtyři přístupy, které jsem do laboratoře školitelky nově zavedla a dále optimalizovala pro kultivaci myších nebo žabích testikulárních buněk v organoidy. Veškeré experimenty jsem opakovala ve třech nezávislých replikátech pro oba druhy, v rámci každého takového opakování jsem použila vždy nejméně 3 samce daného druhu. V rámci následné charakterizace organoidů *X. tropicalis* jsem připravila tyto vzorky pro hodnocení pomocí konfokální mikroskopie.

6.4.1 Kultivace ve dvouvrstevné agaróze

Bez pre-agregační fáze ve visuté kapce

Jako první jsem zvolila metodu kombinující dvě vrstvy různě koncentrované agarózy (Obr. 21). Experimenty nejprve s myšími testikulárními buňkami ukázaly již v 1. týdnu kultivace tendenci buněk vytvářet kompaktní organoidy. Ve 2. týdnu kultivace této myší suspenze jsem pozorovala zvyšující se počet kolonií. Buňky i po 2. týdnu nadále proliferovaly a nejevily známky většího odumírání.

Jinou situaci jsem pozorovala u experimentů s testikulárními buňkami *X. tropicalis*. Buňky v 1. týdnu kultivace zaručeně proliferovaly, nicméně jsem nepozorovala žádnou tvorbu kolonií oproti myšimu modelu. Ani po 2. týdnu kultivace tyto *X.t.* buňky nevytvářely organoidy ani se neshlukovali. Tuto standardní metodu jsem tedy vyhodnotila jako nedostačující pro tvorbu organoidů u druhu *X. tropicalis*.



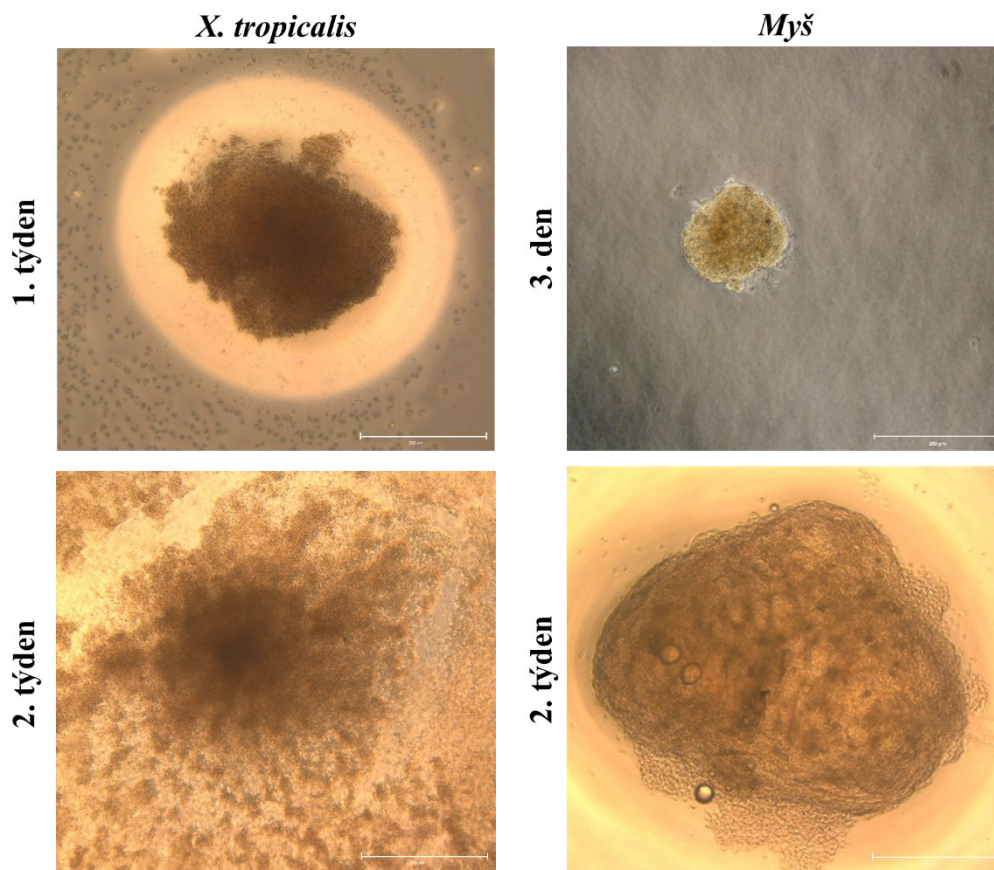
Obr. 21 Příprava testikulárních organoidů ve dvouvrstevné agaróze bez předchozí agregace. Srovnání dvoutýdenní kultivace v agarózovém systému s použitím *X.t.* nebo myši testikulární suspenze. Vlevo kultivace žabí testikulární suspenze. Vpravo kultivace myši testikulární suspenze s pozorovatelnými organoidy. Černé šipky ukazují na agregující buňky. Měřítka reprezentují 200 μm .

S pre-agregační fází ve visuté kapce

Po předchozím nezdaru vytvořit kompaktní organoidy u modelu *X. tropicalis* jsem navrhla postup, který by umožnil buňkám bližší vzájemný kontakt pro usnadnění mezibuněčné komunikace a tendenci agregovat. Metodu dvouvrstevné agarózy jsem doplnila o fázi pre-agregace ve visuté kapce, která se běžně používá pro tvorbu embryoidních tělísek z embryonálních kmenových buněk. V kapce o malém objemu média buňky visí proti gravitaci, což jim umožňuje se koncentrovat do určitého místa. Kultivace ve visuté kapce tradičně probíhá 2-3 dny a závisí na počtu nasazených buněk (Ohnuki a Kurosawa, 2013). Tímto se eliminuje odumírání buněk z důvodu nízkého přísunu živin v kapce média. Dlouhodobější kultivace ve visuté kapce není vhodná i kvůli chybějícímu „scaffold“. U myších experimentů docházelo do 3 dnů k vytvoření kompaktních kolonií (Obr. 22), které jsem následně byla schopna přenést celistvé do dvouvrstevné agarózy a dále v tomto systému kultivovat až 2. týdny. Vytvořené

myší organoidy byly po 2. týdnech kultivace znatelně větší oproti předchozí standardní metodě bez pre-agregační fáze. Nicméně takto vytvořené organoidy byly při delší (déle než 2.týdny) kultivaci náchylnější k postupnému odumírání z důvodu hypoxie uvnitř velkých kolonií.

Tento postup jsem vyzkoušela i pro model *X. tropicalis*. Kultivaci buněk ve visuté kapce jsem prodloužila na 1. týden kvůli pomalejší proliferaci oproti myším buňkám. I pro pomalejší růst buněk se zdálo, že visutá kapka netvořila pro žabí buňky příznivé podmínky. Navíc agregáty nebyly zcela kompaktní a ve většině případů se při následném přenesení do agarózy rozpadaly. V agarózovém systému jsem po přenesení nepozorovala žádnou formaci organoidů ani po 2. týdnů a při dlouhodobější kultivaci buňky odumíraly. Z provedených experimentů jsem prokázala, že agarózová matrice neposkytuje dostatečnou podporu a podmínky pro vytvoření a kultivaci testikulárních organoidů *X. tropicalis*.



Obr. 22 Příprava testikulárních organoidů ve dvouvrstevné agaróze s pre-agregací ve visuté kapce. Srovnání dvoutýdenní kultivace v agarózovém systému s použitím *X.t.* nebo myší testikulární suspenze. Vlevo kultivace žabí testikulární suspenze. Vpravo kultivace myší testikulární suspenze. 1 týden nebo 3 dny představují časy, kdy byly agregáty přemístěny z visuté kapky do agarózové vrstvy. Měřítka reprezentují 200 μm

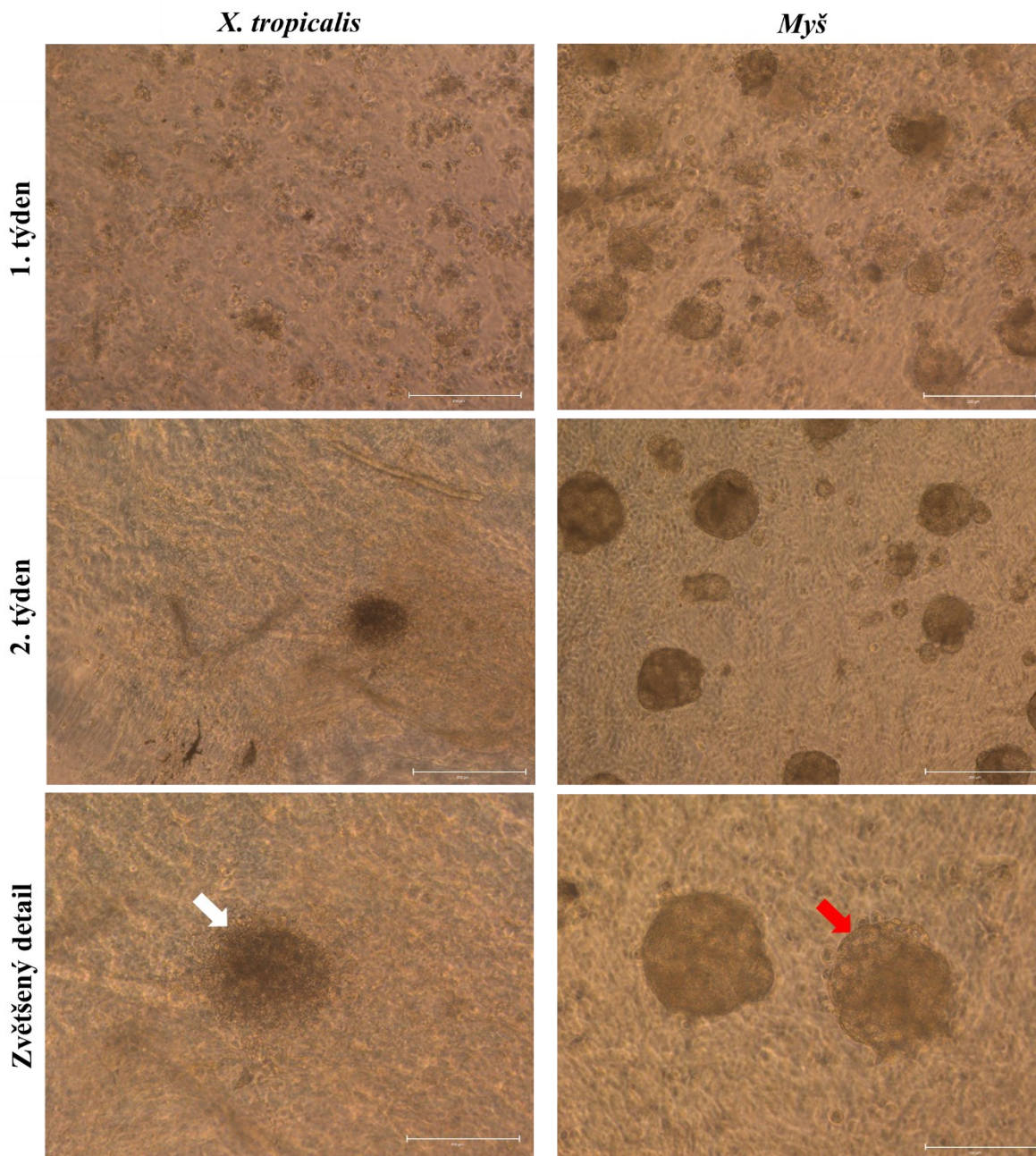
6.4.2 Kultivace v savčím matrigelu

Z důvodů předchozích neúspěchů přípravy *X.t.* organoidů v agaróze jsem v dalších experimentech použila při kultivaci buněk matrigel. Jedná se o proteinový extrakt produkovaný myšími nádorovými buňkami, které jsou bohaté na proteiny extracelulární matrix (kolagen IV., laminin, heparan sulfát, proteoglykany) a růstové faktory. Matrigel polymeruje při pokojové teplotě do gelovitých kapek, ve kterých buňky úspěšně proliferují a ochotněji utvářejí 3D struktury.

Jednovrstevný matrigel

V rámci této metody je vytvořena jednoduchá vrstva/kapka matrigelu, do které jsou buňky vmíchány a relativně velmi rychle vloženy s médiem do termostatu. Oproti agarózovému kultivačnímu systému je při přípravě s buňkami méně manipulováno, což má vliv na jejich prospívání. V případě myšího modelu jsem již v 1.týdnu kultivace pozorovala seskupování buněk a místy i formace organoidů (obr. 23). Tyto organoidy proliferovaly i po 2. týdnu kultivace a při srovnání s prvním přístupem kultivace v agaróze dosahovaly v matrigelu i větší velikosti. Myší organoidy přežívaly i déle než 2 týdny.

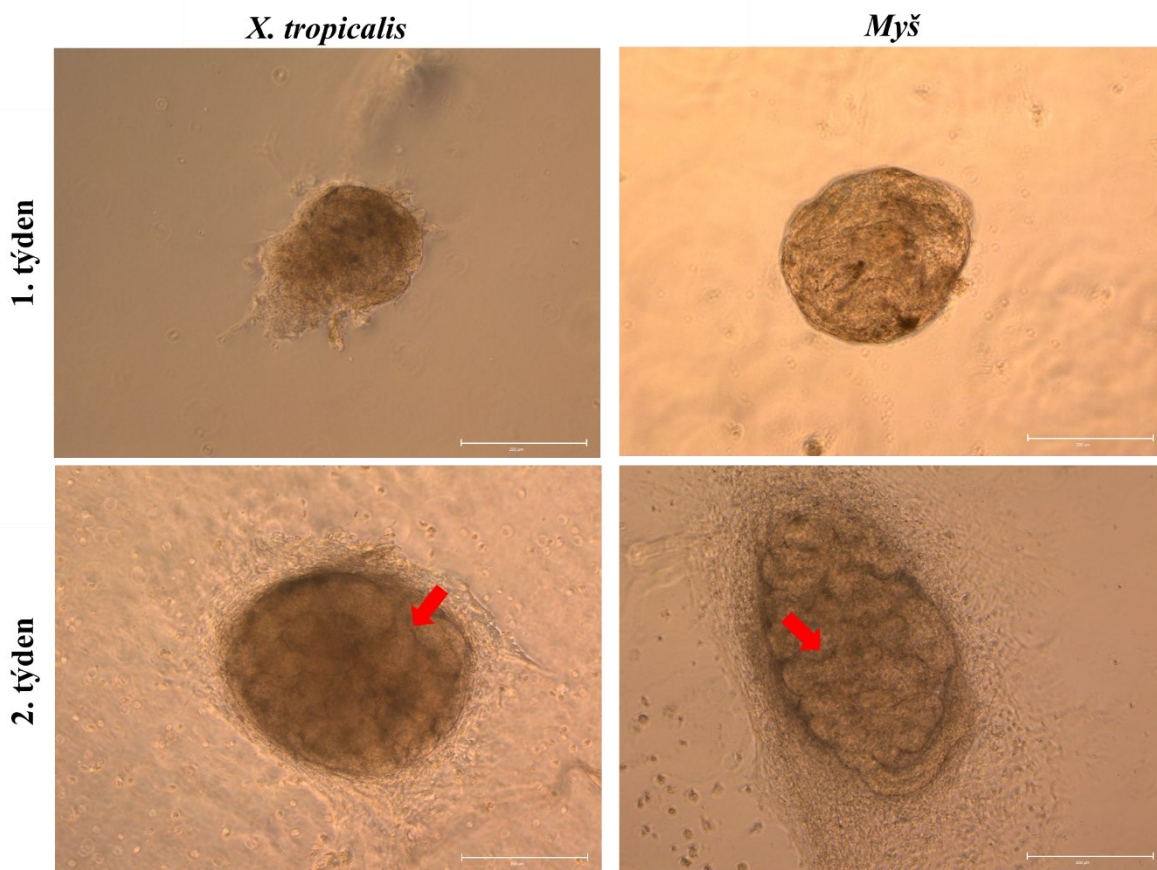
Postup jsem zopakovala i pro testikulární suspenzi *X. tropicalis*. Po 1. týdnu kultivace buňky prorůstaly matrigel a zdálo se, že místy buňky agregují. Po 2. týdnu bylo možné v některých místech matrigelu pozorovat shluky buněk, nicméně při bližším zobrazení stále nedocházelo k vytvoření kompaktních, oddělených organoidů. Důvodem by mohla být nepřítomnost nebo odumření některého z buněčných typů testikulárního niche nebo nedostatečná difúze signálních molekul, které by mohly být potřebné k vytvoření mezibuněčných spojů. Jako v prvním případě kultivace v agaróze jsem usoudila, že buňky mohou být v první fázi kultivace příliš vzdálené od sebe. Tato metoda se ukázala jako nevhodná pro tvorbu testikulárních organoidů *X. tropicalis*.



Obr. 23 Příprava testikulárních organoidů v jednovrstvném matrigelu. Srovnání dvoutýdenní kultivace v matrigelu s použitím *X.t.* nebo myší testikulární suspenze. Vlevo kultivace *X.t.* testikulární suspenze. Vpravo kultivace myší testikulární suspenze. Bílá šipka ukazuje na shlukující se buňky u *X.t.* kultivace bez pozorovatelné hranice oddělení. Červená šipka ukazuje na jednoznačné oddělení buněk a formaci organoidu. Měřítka 1. týden, 2. týden reprezentují 200 μm . Měřítka zvětšeného detailu reprezentují 100 μm .

Třívrstevný matrigel

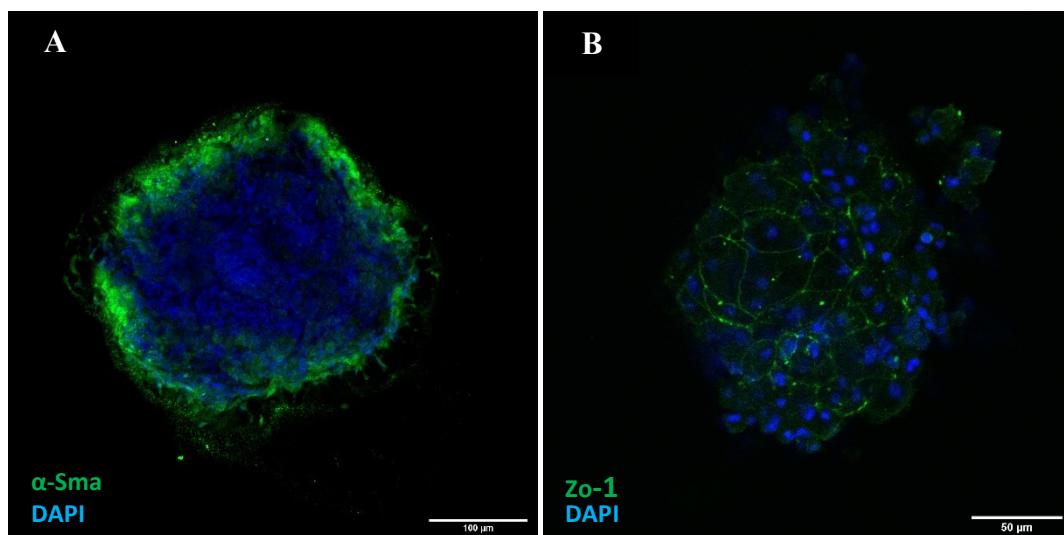
Pro další experimenty jsem použila třívrstevný gradientní systém, který byl vyvinutý a použitý pro kultivaci potkaních organoidů. U těchto organoidů byla pozorována zformovaná hematotestikulární bariéra a proliferující zárodečné buňky (Alves-Lopes *et al.*, 2017). Tento systém nese výhody matrigelu i visité kapky a zároveň v něm vznikají dva volné prostory bez buněk. Zde může docházet k výměně faktorů a buněčných metabolitů mezi vrstvami a buňkami (Alves-Lopes *et al.*, 2017). Kultivaci v třívrstevném matrigelu jsem vyzkoušela pro oba druhy (Obr. 24). U myšičího i žabího modelu jsem již po 1. týdnu kultivace pozorovala formování solidních organoidů. Po dalším týdnu kultivace organoidy tvořily pozorovatelné tubulovité struktury. Tento kultivační systém se ukazuje jako vhodný pro přípravu testikulárních organoidů *X. tropicalis*, které jsou schopné přežít i více než 2. týdny *in vitro*.



Obr. 24 Příprava testikulárních organoidů v třívrstevném matrigelovém systému. Srovnání dvoutýdenní kultivace v třívrstevném matrigelu s použitím *X.t.* nebo myšičí testikulární suspenze. Vlevo kultivace *X.t.* organoidu s pozorovatelnými tubulům podobnými strukturami. Vpravo kultivace myšičí testikulární suspenze s výraznými tubuly. Červené šipky znázorňují tubulovité struktury. Měřítka reprezentují 200 μm

6.5 Pilotní charakterizace testikulárních organoidů *X. tropicalis*

Po úspěšném zavedení vhodné metody pro kultivaci testikulárních organoidů *X. tropicalis*, jsem dále navrhla postup pro jejich nutnou charakterizaci. Tato část výsledků je pilotní a bude potřeba provést další optimalizace i další metody analýzy. První pokusy zahrnovaly krájení organoidů pomocí kryotomu i mikrotomu. Obě techniky obsahují kroky, při kterých je potřeba manipulovat se vzorky a přenášet je. To může vést ke zbytečným ztrátám vzorků. Další problém je viditelnost vzorků při krájení kvůli jejich velikosti a barvě, která splývá s montovacími roztoky. Ani v jednom případě metody krájení se testikulární organoidy nepodařilo nakrájet. Přesunula jsem se k metodě imunofluorescenčního barvení organoidu. V této prvotní analýze žabích organoidů jsem se zaměřila na přítomnost i pozici buněk. Pro detekci jsem zvolila dva nejvíce *in vivo* zastoupené buněčné typy ve varlatech – PTMCs a SCs. Imunofluorescenční barvení bylo provedeno protilátkami proti α -Sma jako marker PTMCs a proti Zo-1 jako marker těsných spojů u SCs. Výsledky z konfokální mikroskopie potvrdily přítomnost obou buněčných typů (Obr. 25). V případě barvení protilátkou proti α -Sma byl signál pozitivní především v periferních oblastech testikulárních organoidů. I ve varleti se PTMCs vyskytují na periferii kanálků, kde tvoří kontraktilní vrstvu. To by mohlo značit tendenci buněk v organoidu zaujímat podobnou pozici, jako buňky zaujímají *in vivo*. Pozitivní signál byl i pro Zo-1, který je *in vivo* exprimován SCs. Výsledky naznačují, že v rámci organoidu buňky tvoří mezi sebou těsné spoje. V obou případech barvení je však potřeba více opakování.



Obr. 25 Pilotní charakterizace testikulárních organoidů *X. tropicalis* pomocí imunofluorescenčního barvení. **A)** Pozitivní signál proti anti- α -Sma (zeleně), který je především na periferii testikulárního organoidu. **B)** Pozitivní signál proti anti-Zo-1 (zeleně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Měřítka reprezentují pro A) 100 μ m a B) 50 μ m.

7. Diskuze

Indukce diferenciacce XtiSCs

Pohlavní dospívání je velmi komplexní proces, ve kterém jedinec prochází nutnými změnami v růstu, fyziologii i hormonální signalizaci. Tyto důležité změny se z velké části týkají především testikulárního niche, kde dochází k morfologické a funkční maturaci somatických buněk tak, aby bylo umožněno spuštění spermatogeneze. Velkou úlohu v zahájení spermatogeneze hrají SCs, které jsou jediné v přímém kontaktu se zárodečnými buňkami. Robustní analýza genové exprese lidských SCs ukázala velkou dynamiku změn mezi nezralými a zralými SCs během puberty. Také se ukázalo, že k maturačnímu procesu buněk v rámci jednoho kanálku dochází asynchronně (Guo *et al.*, 2021). SCs jsou velmi komplexní buňky s četnými funkcemi, kterými se významně podílí na fungování varlat. Specifické vlastnosti SCs v dané fázi života jedince jdou ruku v ruce s expresí specifických genů. K tomu je potřeba přihlídnout při sledování diferenciacních fází SCs. Některé specifické geny pro SCs mohou být exprimovány pouze v určitém období samce, jiné mohou být exprimovány konstantně. V diplomové práci jsem se zabývala indukcí diferenciacce progenitorů XtiSCs v dospělé SCs *in vitro*. Pro prokázání úspěšné diferenciacce buněk jsem zvolila kombinaci specifických genů pro nematurovaný i maturovaný stav SCs, a poté detekovala jejich expresi pomocí RT-PCR u všech vytvořených *Skupin*.

Gen pro transkripční faktor Sox9 je často používán jako obecný marker SCs. U savců je Sox9 exprimován již během embryonálního vývoje a podílí se významně na determinaci pohlaví jedince. Jeho exprese je přítomna i v dospělých varlatech, kde zabraňuje reprogramaci SCs v samičí granulózní buňky (Barrionuevo *et al.*, 2016). Prověřila jsem expresi Sox9 ve varlatech *X. tropicalis*. Výsledky ukazují, že Sox9 je stabilně exprimován v juvenilní i dospělé fázi života *X. tropicalis* (Obr. 12). Exprese Sox9 lze považovat za marker všech vývojových stádií SCs i u druhu *X. tropicalis*. Dále jsem prověřila expresi Sox9 v ovlivněných buňkách jednotlivých *Skupin*. Většina buněk exprimovala Sox9, což znamená, že u nich nedošlo po ovlivnění k transdiferenciaci v jiný buněčný typ, než jsou SCs. Výjimka se vyskytla u určité populace buněk v rámci *Skupiny I. a II.* (Obr. 15, Obr. 16). Obě populace buněk se lišily rozdílnou morfologií i expresí Sox9. Další analýza genové exprese *Skupiny I. i II.* odhalila pozitivní expresi genů *cyp11a1* i *cyp17a1*. Tyto geny kódují enzymy *cyp11a1* a *cyp17a1*, což jsou proteiny exprimované pouze LCs *in vivo*. Jejich exprese je stimulována vazbou LH na receptor, který se ve varlatech nachází pouze na cytoplazmatické membráně LCs. Vazba

stimuluje signální kaskádu, která vede k zahájení exprese proteinů včetně *cyp11a1* a *cyp17a1* důležitých pro biosyntézu testosteronu. Ukazuje se, že u zebřičky dochází ke stimulaci steroidogeneze i pomocí FSH signalizace (Baudiffier *et al.*, 2012; García-López *et al.*, 2010). V případě *Skupiny I.* i *Skupiny II.* bylo FSH součástí použitého diferenciálního média. Je tedy možné, že i v případě buněčné kultury *X. tropicalis* by FSH mohlo stimulovat expresi steroidogenních enzymů. Nicméně jelikož analýza genové exprese byla provedena z celého objemu buněk dané *Skupiny*, nelze s určitostí říct, že právě kulaté buňky byly zdrojem exprese *cyp11a1* i *cyp17a1*. Výsledky shrnutím však naznačují, že u této populace došlo k transdiferenciaci do jiného buněčného typu, nejspíše podobnému LCs. Diferenciace SCs do LCs byla prokázána u myši, ve kterých byl deletován gen *WT1* (*Wilms' Tumor Gene 1*). V této studii byla provedena také transfekce konstruktů obsahujících gen *WT1* do LCs, která naopak způsobila transformaci buněk do fenotypu podobnému SCs (Zhang *et al.*, 2015). Experimenty dokazují vzájemně možnou reprogramaci obou buněčných typů, která je pod kontrolou genu *WT1*. Otázkou zůstává, proč došlo k transdiferenciaci pouze u některých buněk v rámci *Skupiny*. Možným vysvětlením je, že XtiSCs představují smíšenou kulturu buněk. Bylo již publikováno, že XtiSCs se v dlouhodobé kultivaci při standardních podmínkách oddělují na dvě rozdílné populace. Prvním typem jsou buňky, které vytvářejí podpůrnou vrstvu, a druhým typem jsou buňky vytvářející kolonie. Analýza genů pomocí RT-PCR odhalila odlišnou expresi ve vybraných genech mezi těmito populacemi (Tlapakova *et al.*, 2016). To dokazuje, že buňky nejsou konzistentní a při následném ovlivnění se mohou chovat odlišně. V této práci byly použity buňky kolonií. Nicméně při oddělovacím procesu mohlo dojít ke smíšení kolonií s podpůrnou vrstvou. Další otázkou zůstává, které molekuly v použitém diferenciálním médiu ve *Skupině I.* a *II.* spustily reprogramační proces XtiSCs. Použité faktory v diferenciálním médiu mimikovaly fyziologii testikulárního niche. Tento protokol pro diferenciaci byl vybrán na základě studie podle Shlush *et al.* (2017), která se věnuje diferenciaci MSCs izolovaných z pupečníku v SCs i GCs. V této studii prokázali úspěšnou diferenciaci buněk v SCs. Důležité je však zmínit, že publikovaná analýza získaných diferencovaných SCs se nezabývala jejich vývojovou fází (Shlush *et al.*, 2017). Nelze tedy říct, že v této studii došlo k diferenciaci buněk v SCs s dospělým fenotypem. Vhodné by bylo prověřit působení jednotlivých složek použitého diferenciálního média na XtiSCs. Zajímavé by bylo otestovat účinky thyroidních hormonů, které nebyly v experimentech této diplomové práce vyzkoušeny, ale jejich pozitivní účinky na diferenciální proces SCs *in vitro* byly potvrzeny (Buzzard *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2015).

Jeden z často používaných znaků pro nematurované SCs je produkce enzymu Cyp26b1. Tento enzym hraje roli v degradaci RA. Součástí maturačního procesu SCs během puberty je právě aktivace produkce a stabilizace RA, která je potřebná pro zahájení meiózy v GCs a k tvorbě spermií. Exprese *Cyp26b1* je zahájena v myších embryonálních varlatech a pokračuje až do zahájení puberty, kdy je utlumena (Edelsztein *et al.*, 2019). Rozhodla jsem se otestovat přítomnost genu v XtiSCs i v ovlivněných *Skupinách*. Transkripty testovaného *Cyp26b1* byly přítomny v negativní kontrole, což potvrzuje nematurovaný fenotyp těchto buněk. Detekce byla pozitivní i ve všech ovlivněných *Skupinách* kromě *Skupiny III*. Ve *Skupině III* nebyl gen zcela detekován. K relativnímu snížení oproti XtiSCs došlo i ve *Skupině IV*. V obou těchto *Skupinách* byla využita kultura myších SCs zvaná TM4. Tato imortalizovaná kultura byla izolována z prepubertálních myší. Zdá se však, že tyto buňky jsou schopny produkovat určité molekuly ovlivňující expresi řady genů včetně *Cyp26b1* i u XtiSCs. Mechanismus, který způsobuje utlumení exprese *Cyp26b1 in vivo* není stále zcela objasněn. Nedávná studie na myších pouze potvrdila, že mechanismus je nezávislý na androgenním působení (Edelsztein *et al.*, 2019). Jedním z unikátních genů SCs je gen *Amh*. Exprese tohoto genu je přítomna u savců již během fetálního vývoje a pokračuje i po narození. S nástupem puberty je jeho exprese zcela potlačena. Za patologických podmínek, jako jsou například testikulární atrofie a rakovina varlat, lze *Amh* detekovat i v dospělých SCs (Giudice *et al.*, 2014). *In vitro* studie ukázaly regulační funkci *Amh*, který při standardních koncentracích stimuloval proliferaci SCs. Naopak vysoké koncentrace *Amh* spustily negativní zpětnou smyčku a došlo k inhibici proliferace a aktivaci programované buněčné smrti SCs (Rehman *et al.*, 2017). Studie dokazují, že exprese *Amh* hraje významnou roli při vývoji SCs. Navíc kvůli jeho transientní expresi, je přítomnost *Amh* v SCs využívána jako indikátor nematurovaného fenotypu buněk. V této práci jsem prověřila expresi *Amh* pomocí RT-PCR i u ovlivněných buněk XtiSCs. Ve všech *Skupinách* včetně negativní kontroly XtiSCs nebyla exprese *Amh* detekována. U žab druhu *X. tropicalis* byla potvrzena exprese *Amh* ve varlatech i čtyři týdny po metamorfóze. Ve srovnání s dřívějšími vývojovými stádii byla úroveň mRNA pro *Amh* ve čtyřech týdnech po metamorfóze relativně nízká (Jansson *et al.*, 2016). XtiSCs byly izolovány z výrazně starších jedinců (5 měsíců), je tedy možné, že v tomto věku samce *X. tropicalis* je exprese *Amh* již zcela utlumena. U savců dochází k utlumení produkce *Amh* díky působení androgenů (testosteronu), které se váží do promotérové oblasti genu *Amh* a inhibují jeho expresi (Edelsztein *et al.*, 2018). Jak již bylo zmíněno, testosteron je nepostradatelný pro maturaci SCs i maturaci celého testikulárního niche a jeho produkce se zvyšuje během puberty. Jeho působení je skrze AR a pouze SCs, které exprimují AR, jsou schopny reagovat na zvýšené dávky testosteronu. Navíc myši s vyřazeným

AR v SCs nebyly schopné zahájit meiózu a formovaly defektní BTB (Willems *et al.*, 2010). AR je významný pro maturační procesy SCs a jeho exprese je často považovaná za marker maturovaných SCs. Výsledky této práce prokázaly expresi genu *AR* u XtiSCs i v některých ovlivněných *Skupinách*. Je důležité zmínit, že ačkoli je exprese spojována s maturovanými SCs, první známky AR se u mnoha druhů objevují ještě před zahájením puberty a před zastavením proliferace SCs (Sharpe *et al.*, 2003). To by souhlasilo i s detekovanou expresí *AR* u XtiSCs, které jsou izolované z juvenilů *X. tropicalis*, ale zřejmě se samci už nacházeli v určité fázi blížící se období dospívání, a tudíž je exprese AR u XtiSCs aktivní. Je jisté, že právě exprese AR spolu s produkovaným testosteronem jsou aktivními spouštěči některých zracích procesů. V těchto výsledcích došlo ke kompletní ztrátě signálu *AR* u *Skupiny I.* a *II.* Tyto obě *Skupiny* nejspíše pod vlivem diferenciačního média inhibovaly expresi AR. Otázkou zůstává, která molekula způsobila tuto inhibici. Zajímavé je, že v *in vivo* podmínkách je AR běžně exprimován dospělými SCs, LCs i PTMCs, tedy všemi hlavními somatickými buňkami varlat (O'Hara *et al.*, 2015). Mezi dalšími prověřenými geny důležitými pro maturované SCs byly geny pro transkripční faktor Gata1 a ABP. Expese obou těchto genů je spuštěna během puberty a jsou důležité pro maturační proces SCs. Při analýze ovlivněných *Skupin* i negativní kontroly nebyl v žádné z nich prokázán pozitivní signál. Velmi slabou expresi pro oba geny jsem pozorovala pouze u *Skupiny III.* To je v souladu i s ostatními výsledky v rámci *Skupiny III.*, které dále potvrzují určitou diferenciaci XtiSCs v buňky podobné SCs s dospělým fenotypem. Dalším zajímavým genem je *Lif*, který je důležitý pro normální vývoj varlat u hlodavců a jeho hlavním zdrojem jsou primárně dospělé PTMCs. *Lif* je přítomen i v prepubertálních SCs a v dospělých SCs je možné detekovat pouze jeho receptor Lifr (Curley *et al.*, 2018). *Lif* je exprimován i v XtiSCs, ale v dospělých varlatech *X. tropicalis* jeho exprese nebyla detekována. To souhlasí i s předchozími výsledky laboratoře školitelky (Tlapakova *et al.*, 2016). Produkce *Lif* stimuluje proliferaci a tvorbu kolonií v XtiSCs. V případě ovlivněných *Skupin* nebyl *Lif* detekován ve *Skupinách III. IV* a *V.* Kokultivace s buňkami TM4 a primární kulturou ze 4-letého samce *X. tropicalis* nejspíše způsobila aktivní průnik některých signalizačních molekul, které inhibovaly expresi *Lif*.

Finální maturace SCs se pojí se zvýšenou produkcí proteinů BTB. Výstavba BTB je jedním z důležitých milníků pro zahájení spermatogeneze. Jedním z nejvíce zastoupených proteinů BTB je claudin 11, který je součástí molekulárního komplexu těsných spojů. U člověka je jeho exprese konstantní v průběhu života a transientně začíná od útlého věku jedince (de Michele *et al.*, 2018). Obdobně tomu je i u myši, u které jeho exprese začíná velmi brzy po

narození a dále je konstantně přítomen v průběhu života nehlédě na pohlavní zralost (Morrow *et al.*, 2010). Jeho exprese neznačí maturovaný stav SeCs, ale lze jej využít pro detekci správné funkce SCs. V této práci jsem detekovala gen *cldn11* ve všech pozorovaných *Skupinách* včetně kontroly. Jako vhodnější marker maturace SCs se jeví claudin 3, který je exprimován až s nástupem puberty a účastní se remodelace BTB během transportu GCs směrem k lumen (Smith a Braun, 2012). Nicméně tento protein byl ve varleti detekován pouze u myši, nikoli u člověka ani potkana (Stammler *et al.*, 2016). U *X. tropicalis* existuje gen pro claudin 3 (Regnault *et al.*, 2016), v literatuře však nebylo nalezeno, že by se claudin 3 nacházel přímo v SCs. Jako další marker správné funkce SCs je považována exprese Zo-1, který je součástí komplexu BTB, kde kotví proteiny těsných spojů k aktinovému cytoskeletu uvnitř buňky. Ukazuje se však, že Zo-1 interaguje i s konexinem 43 a reguluje tak integritu mezerových spojů, respektive reguluje distribuci a velikost konexinu 43 (Schimenti *et al.* 2013). Bylo prokázáno, že právě absence konexinu 43 u myši způsobuje u SCs přetrvávající proliferující stav (Sridharan *et al.*, 2007). Roli v proliferaci SCs hraje i claudin 11, který je také regulován Zo-1. Dospělé myši SCs, které byly deficientní pro claudin 11, vykazovaly stálou proliferaci (Mazaud-Guittot *et al.*, 2010). Zo-1 může mít nepřímý vliv na proliferaci SCs. Zo-1 byl u myši lokalizován i ve spojení s ES, což jsou specifické spoje tvořené pouze dospělými SCs (Byers *et al.*, 1991). Kvůli své významné roli v testikulárním niche, byl pro tuto diplomovou práci zvolen Zo-1 jako marker SCs, jehož exprese je nezbytná v rámci maturačního procesu SCs a správné formaci BTB. Roli při výběru hrál i fakt, že existuje komerčně vyráběná spolehlivá protilátka vhodná k použití pro rod *Xenopus*. U dvou jedinců *X. tropicalis* v různých fázích reprodukčního života byla nejprve prověřena přítomnost tohoto adaptérového proteinu. Pomocí imunofluorescenčního barvení řezů z juvenilních (3 měsíce) a dospělých (4 roky) varlat byl Zo-1 detekován u obou různě starých vzorků. Zdá se tedy, že exprese Zo-1 není závislá na pohlavní zralosti jedince a protein je přítomen již během prepubertálního období. Stejný výsledek se ukázal i při experimentech skupiny Byers *et al.* (1991) s juvenilními (5 dní) i pubertálními (15 dní) myšmi, u kterých také pozorovali přítomnost Zo-1 již od útlého věku jedince. V těchto studiích byla zajímavá dynamika lokalizace Zo-1 během vývoje a zrání varlat, kdy byl protein nejprve distribuován na apikolaterální membráně SCs a během puberty docházelo k jeho rekrutaci do bazální části, konkrétně do míst, kde se nacházely komplexy těsných spojů (Byers *et al.*, 1991). U našich pozorování žabích varlat byla distribuce Zo-1 pozitivní i na některých místech apikálního konce dospělého kanálku. Důvodem rozdílné distribuce mezi myším a žabím modelem varlat by mohl být odlišný způsob spermatogeneze, kdy žáby využívají cystickou spermatogenezi. Při tomto typu spermatogeneze je celá cista obsahující

diferencované spermie otevřena na adluminálním konci a spermie jsou uvolněny do lumen. Dalším hojně zastoupeným proteinem podílejícím se na tvorbě BTB v savčích SCs je IF vimentin. Bylo prokázáno, že selhání v tvorbě vimentinu vede k porušení testikulární fyziologie a k apoptóze GCs (Alam a Kurohmaru, 2014). Jeho exprese v kanálcích je stabilní v průběhu postnatálního života jedince, a proto není vhodným markerem pro určení dospělých SCs. Přechodně lze v SCs pozorovat jiný protein IF – cytokeratin. Obecně jsou cytokeratiny v ostatních tkáních (kůže, neurony, střeva) stále přítomny. V případě savčích varlat dochází pouze k jeho transienční expresi, kdy je cytokeratin detekovatelný pouze do období pohlavní zralosti. Přítomnost cytokeratinu je spojována s nezralým fenotypem SCs (Giudice *et al.*, 2014). V diplomové práci jsem detekovala transienční exprese cytokeratinu u řezů varlat *X. tropicalis*. Ve spojení s přítomností stabilně exprimovaného markeru pro SCs, lze cytokeratin využít jako ukazatel nematurovaného stavu SCs i u žab. Transienční exprese cytokeratinu se zdá být evolučně konzervovaná napříč obratlovci. Nicméně funkce tohoto IF v rámci diferenciačního procesu SCs není stále zcela objasněna. Recentní studie naznačuje jeho roli v udržování adherentních spojů mezi nezralými SCs, právě cytokeratin zde interaguje a kotví β -catenin v membránách (Nguyen *et al.*, 2019b). V jiných studiích provedených na primátech navrhuje funkci cytokeratinu v regulaci ERK 1/2 signální dráhy (Zhang *et al.*, 2006). Je známo, že tato dráha je aktivována pod vlivem FSH a je potřebná pro proliferaci prepubertálních SCs. V této práci jsem prověřila přítomnost Zo-1 a cytokeratinu v ovlivněných *Skupinách* i negativní kontrole. Nejprve XtiSCs potvrdily pozitivní signál při barvení protilátkami proti cytokeratinu. Pozitivní barvení proti Zo-1 nebylo u XtiSCs detekováno. Oba tyto výsledky doplňují další charakteristiku těchto buněk a potvrzují jejich nematurovaný fenotyp. Proteiny byly detekovány i v ovlivněných *Skupinách*. Expese cytokeratinu se ukázala být přítomna ve všech diferenciačních pokusech jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Detekce Zo-1 byla potvrzena u *Skupiny III.* a *IV.* V těchto dvou *Skupinách* byly při analýze genové exprese pozorovány geny ve prospěch maturovaných znaků SCs. Z celkového hodnocení výsledků lze tedy říct, že kompletní maturační proces nebyl spuštěn u žádné z vytvořených *Skupin*. Nicméně *Skupina III.* prokázala expresi některých důležitých genů účastnících se maturačního procesu SCs (*AR*, *ABP*, *Gata1*, *Zo-1*) a zároveň sníženou expresi genů významných pro fázi prepubertální (*Amh*, *Cyp26b1*, *Lif*). Podobná *Skupina IV.*, která také využila buněk TM4, se v expresi lišila oproti *Skupině III.*, a to i přestože prokázala v expresi Zo-1 pozitivní signál. Důvodem rozdílů mezi oběma *Skupinami* by mohl být aktivní přispívání živých buněk a vzájemná komunikace obou typů buněk, která byla buňkám umožněna při ko-kultivaci u *Skupiny III.* Důvodem celkového úspěšnějšího navození diferenciačních pochodů u těchto

experimentů s TM4 by mohl být fakt, že TM4 představují kulturu izolovanou z myších samců, kteří se nacházeli ve fázi života před zahájením puberty. Oproti *Skupinám I., II., V. i VI.* mohly být v těchto buňkách spuštěny signální dráhy a aktivní exprese molekul připravující buňky na zahájení puberty. Tyto molekuly mohly ovlivnit i buňky XtiSCs.

Testikulární organoidy X. tropicalis

Obojživelníci jsou zástupci nižších obratlovců a jsou evolučně relativně vzdáleni od člověka. Nicméně poptávka po žábách jako modelu pro studium genů, molekulárních mechanismů a buněčných interakcí v souvislosti s modelováním lidských onemocnění stoupá na popularitě (DeLay *et al.*, 2019; Popov *et al.*, 2019). Díky relativně novým technologiím pro editování genomů byl připraven i žabí model pro studium lidské rakoviny (Nieuwenhuysen *et al.*, 2015). Jednou z důležitých vlastností, který tento model má, je zvýšená sensibilita na prostředí, ve kterém se nacházejí. To z obojživelníků činí velmi vhodný model pro *in vivo* i *in vitro* studie účinků farmako-toxikologických látek a endokrinních disruptantů (Regnault *et al.*, 2018). Dramatický úbytek populací obojživelníků souvisí se zvýšenou koncentrací těchto látek. Pro obojživelníky je larvální období kritické pro diferenciaci orgánu ale i pohlaví, kdy je toto období úzce spjato s působením thyroidních a steroidních hormonů. Další kritickou fází je reprodukční období, kdy plození u většiny druhů, i těch terestriálních, probíhá ve vodě. Expozice živočichů chemicky aktivním látkám může způsobit poruchy ve vývoji a uvolňování fertálních gamet (Säfhholm *et al.*, 2014). Další výhodou modelu obojživelníků je jejich možné využití pro testování toxických látek vypuštěných do vodního, ale i terestrického ekosystému. Polutanty vypouštěné do prostředí ovlivňují hormonální systém a tím i reprodukci. Reprodukční systém je u většiny obratlovců velice konzervovaný (Grier *et al.*, 2016). Pro všechny zmíněné výhody by model žabích testikulárních organoidů mohl představovat slibný nástroj pro studium mechanismů účinku toxických látek i modelace onemocnění reprodukčního systému. Testikulární a organoidy obecně představují *in vitro* platformu, která snižuje počet použitých zvířat na experimenty v souvislosti s konceptem 3R (*replacement, reduction, refinement*) pro ochranu pokusných zvířat.

Součástí této diplomové práce byla příprava organoidů z testikulární jednobuněčné suspenze odebrané žabím samcům rodu *X. tropicalis*. Na základě dosavadního vyhledávání v literatuře nebylo vytvoření žabích testikulárních organoidů publikováno. První řešenou otázkou bylo, jaký kultivační systém pro formaci žabích organoidů zvolit. Mezi klasické

kultivační systémy patří takzvaná kultivace v rozhraní vzduchu a média (*Gas/liquid interphase*). Kultivace na rozhraní vylepšuje podmínky pro tvorbu a růst organoidů, protože buňky mají přístup k výživě v médiu a zároveň netrpí hypoxií. Tento kultivační systém lze jednoduše připravit a jeho výhodou je snadné vnesení potenciálních modifikací. Jednou z takových modifikací může být výběr báze, a to tkáňového nosiče. V této diplomové práci jsem vyzkoušela dva typy nosičů. Prvním z nich byla agaróza, která se již v předchozích studiích kultivace myších i lidských testikulárních organoidů osvědčila (Yokonishi *et al.*, 2013; Gholami *et al.*, 2018a; Gholami *et al.*, 2018b). Vyzkoušela jsem kultivaci testikulárních buněk z juvenilních myší i *X. tropicalis* ve dvouvrstevné agaróze podle upraveného protokolu Gholami *et al.* (2018b). Výsledek u myších organoidů potvrdil, že tento systém indukuje v buňkách schopnost tvořit kompaktní organoidy. Tvorba těchto myších útvarů byla pozorovatelná již v prvním týdnu kultivace a nadále rostla až do konce druhého týdne. Výsledky u buněk *X. t.* ukázaly pouze růst ve 2D směru. Důvodem neschopnosti buněk tvořit organoidy může být nízký počet buněk v suspenzi a velká vzdálenost mezi jednotlivými buněčnými typy v agarózovém systému. Zahrnula jsem pre-agregační fázi do experimentů s testikulárními buňkami. Jako agregační metodu jsem zvolila kultivaci ve visuté kapce, která zamezuje buňkám kontakt s povrchem, a tím jsou buňky více odkázány na sousední buňky a tvorbu mezibuněčných kontaktů. Tato metoda byla nedávno použita pro formaci lidských testikulárních organoidů za účelem studia vlivu gonadotoxických látek *in vitro* (Pendergraft, *et al.* 2017). Výsledky v diplomové práci potvrdily schopnost tvorby testikulárních organoidů u myši. V případě experimentů s *X.t.* měly buňky ve visuté kapce problém formovat kompaktní agregáty. Problém přetrvával i po přenesení, kdy se slabé agregáty často rozpadaly a dále rostly ve 2D vrstvě buněk. Nepříznivé kultivační podmínky visuté kapky pro buňky *X. tropicalis* demonstrovala i pomalejší proliferace buněk oproti myšímu modelu, u kterých kultivace probíhala maximálně 3 dny a poté bylo kompaktní organoidy již možné přenést do dvouvrstevné agarózy. Ve studiích na myších byla použita kultivace v destičkách s dnem do tvaru V (Yokonishi *et al.* 2013). Takto docházelo ke shlukování buněk díky gravitaci na jedno místo. Dno destičky ve tvaru V umožnilo buňkám určitý kontakt s povrchem kultivační nádoby, ale zároveň neporušilo tvorbu mezibuněčných spojů. To by mohlo přinést řešení pro agregaci testikulárních buněk *X.t.* Pro další experimenty jsem se přesunula k druhému zvolenému tkáňovému nosiči, a to matrigelu. Výsledky kultivací v jednovrstevném a třívrstevném matrigelu prokázaly formování testikulárních organoidů u myšího modelu v obou případech a pouze u třívrstevného docházelo k formaci organoidů i u buněk *X. tropicalis*. Autoři studie zabývající se formací potkaních testikulárních organoidů diskutují výhody tohoto třívrstevného

systému, ve kterém vzniká koncentrační gradient látek mezi jednotlivými vrstvami (Alves-Lopes *et al.*, 2017). Výhody jsou i ve využití matrigelu, který je velmi bohatý na některé proteiny extracelulární matrix potřebné pro formaci testikulární trubice *in vivo* (Van Der Wee a Hofmann, 1999), což z matrigelu činí naprosto jedinečný tkáňový nosič pro *in vitro* rekonstrukce semenotvorných kanálků.

Pro charakterizaci *in vitro* organoidů by měla být demonstrována funkčnost a přítomnost BTB. Prvotní analýza *X.t.* organoidů ukázala pozitivní expresi Zo-1 mezi sousedními buňkami přítomných SCs. Nicméně je nutné provést další opakování barvení proti Zo-1 a ostatním proteinům BTB. Také barvení organoidů například v Evansově modři by ukázalo propustnost zformované BTB, jelikož molekuly modři jsou nepropustné ve zdravé BTB *in vivo* (Alves-Lopes *et al.*, 2017). V rámci charakterizace jsem provedla barvení proti α -Sma, což je marker PTMCs. Pilotní výsledek ukázal pozitivní signál při barvení proti α -Sma v organoidech *X.t.* Exprese proteinu byla pozorovatelná především na periférii organoidu, což může souviset s přirozenou pozicí PTMCs v testikulárním niche, kde obklopuje kanálky. Přítomnost PTMCs byla pozorována i u potkaních testikulárních organoidů kultivovaných v třívrstevném matrigelu, kde PTMCs vytvářely síť okolo formovaných tubulovitých struktur (Alves-Lopes *et al.*, 2017). Oba výsledky barvení naznačují, že v testikulárních organoidech *X. tropicalis* se vyskytovaly SCs i PTMCs. Dále bude nutné provést detekci přítomnosti ostatních somatických buněk varlat a jednotlivých stádií GCs. Zajímavé by bylo prověřit *in vitro* produkci testosteronu a schopnost organoidu reagovat na stimulaci LH a FSH. Rozhodně bude nutné prověřit i působení vhodných kombinací médií a suplementů, které by měly potenciál zefektivnit formování testikulárních organoidů a zvýšily by i přežívání jednotlivých buněčných typů. Jedním z těchto příkladů by mohlo být použití tzv. knock-out serum replacement namísto FBS. Použití náhrady séra se ukázalo jako klíčové pro úspěšnou produkci funkčních spermatozoa *in vitro* (Sato *et al.*, 2011). V budoucnu bude potřeba prověřit působení různých růstových faktorů a hormonů stimulujících fungování testikulárního niche *in vivo*, jako jsou RA, testosteron a GDNF.

8. Závěr

- Byla prokázána transientní exprese Cytokeratinu u *X. tropicalis* jako marker nematurovaných SCs.
- Bylo potvrzeno, že XtiSCs představují kulturu nematurovaných SCs.
- Nebyla prokázána indukce diferenciaci XtiSCs v dospělé SCs pomocí vybraných látek ani s využitím primární kultury *X. tropicalis*.
- Bylo potvrzeno, že TM4 mají schopnost indukovat částečnou diferenciaci XtiSCs v buňky podobné dospělým SCs.
- Standardizovala jsem vybrané kultivační systémy pro formaci *in vitro* testikulárních organoidů myši.
- Připravila jsem *in vitro* testikulární organoidy z buněk *X. tropicalis*.
- Pilotní analýza *in vitro* organoidů *X.t.* ukázala na přítomnost dvou nejběžnějších typů testikulárního niche, a to SCs a PTMCs.

9. Seznam literatury

- Alam M. S., Kurohmaru M.** 2014. Disruption of Sertoli cell vimentin filaments in prepubertal rats: An acute effect of butylparaben in vivo and in vitro. *Acta Histochemica* 116 (5), 682–687
- Albrecht K. H., Eicher E. M.** 2001. Evidence That Sry Is Expressed in Pre-Sertoli Cells and Sertoli and Granulosa Cells Have a Common Precursor. *Developmental Biology* 240, 92–107
- Alves-Lopes J. P., Söder O., Stukenborg J.-B.** 2017. Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system. *Biomaterials* 130, 76-89
- Andric S.A., Janjic M.M., Stojkov N.J., Kostic T.S.** 2007. Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 293, 1399–1408
- Barrionuevo F. J., Hurtado A., Kim G. J., Real F. M., Bakkali M., Kopp J. L., Sander M., Scherer G., Burgos M., Jiménez R.** 2016. *Sox9* and *Sox8* protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *Elife* 5
- Baudiffier D., Hinfray N., Vosges M., Creusot N., Chadili E., Porcher J.-M., Schulz R. W. Brion F.** 2012. A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish. *Toxicology* 298, 30–39
- Bhandari R. K., Haque M. M., Skinner M. K.** 2012. Global Genome Analysis of the Downstream Binding Targets of Testis Determining Factor SRY and SOX9. *Plos one* 7 (9)
- Blaustein A. R., Han B. A., Relyea R. A., Johnson P. T. J., Buck J. C., Gervasi S. S., Kats L. B.** 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223, 108–111
- Buehr M., Gu S., McLaren A.** 1993. Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse. *Development* 117 (1), 273–81
- Busada J. T., Chappell V. A., Niedenberger B. A., Kaye E. P., Keiper B. D., Hogarth C. A., Geyer C. B.** 2015. Retinoic acid regulates *Kit* translation during spermatogonial differentiation in the mouse. *Developmental Biology* 397, 140–149

- Buzzard J.J., Wreford N. G., Morrison J. R.** 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 144, 3722–3731
- Byers S., Graham R., Dai H. N., Hoxter B.** 1991. Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 in the mouse testis. *American Journal of Anatomy* 191 (1), 35–47
- Cham T.-C., Chen X., Honaramoo A.** 2021. Current progress, challenges, and future prospects of testis organoids. *Biology of Reproduction* 104 (5), 942–961 (Review)
- Chen L.-Y., Willis W. D., Eddy E. M.** 2016. Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *PNAS* 113 (7), 1829–1834
- Combes A. N., Wilhelm D., Davidson T., Dejana E., Harley V., Sinclair A. Koopman P.** 2009. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology* 326, 112-120
- Curley M., Milne L., Smith S., Atanassova N., Rebourcet D., Darbey A., Hadoke P. W. F., Wells S., Smith L. B.** 2018. Leukemia Inhibitory Factor-Receptor is Dispensable for Prenatal Testis Development but is Required in Sertoli cells for Normal Spermatogenesis in Mice. *Scientific Reports* 8
- Davidoff, M. S., Breucker, H., Holstein, A. F., Seidl, K.** 1990. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell and Tissue Research*, 262 (2), 253–261
- De Michele F., Poels J., Giudice M. G., De Smedt F., Ambroise J., Vermeulen M., Gruson D., Wyns C.** 2018. In vitro formation of the blood–testis barrier during long-term organotypic culture of human prepubertal tissue: comparison with a large cohort of pre/peripubertal boys, *Molecular Human Reproduction* 24 (5), 271–28
- De Rooij D. G.** 1973. Spermatogonial Stem Cell Renewal In The Mouse I. Normal Situation. *Cell Tissue Kinetic* 6, 281–287
- De Vries M., Ramos L., Housein Z., De Boer P.** 2012. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biology Open* 1 (5), 446–457
- DeFalco T., Saraswathula A., Briot A., Iruela-Arispe M. L., Capel B.** 2013. Testosterone Levels Influence Mouse Fetal Leydig Cell Progenitors Through Notch Signaling. *Biology of Reproduction* 88 (4), 1–12

- DeFalco T., Bhattacharya I., Williams A. V., Sams DM, Capel B.** 2014. Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (23)
- DeFalco T., Potter S. J., Williams A. V., Waller B., Kan M. J., Capel B.** 2015. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Reports* 12, 1107–1119
- DeLay B. D., Baldwin T. A., Miller R. K.** 2019. Dynamin Binding Protein Is Required for *Xenopus laevis* Kidney Development. *Frontiers in Physiology* 10, 143
- Dohle G.R., Colpi G.M., Hargreave T.B., Papp G.K., Jungwirth A., Weidner W.** 2005. EAU Guidelines on Male Infertility. *European Urology* 48 (5), 703–711
- Domke L. M., Franke W. W.** 2019. The cell–cell junctions of mammalian testes: II. The lamellar smooth muscle monolayer cells of the peritubular wall are laterally connected by vertical adherens junctions—a novel architectonic cell–cell junction system. *Cell and Tissue Research* 375, 451–482
- Du M., Young J., De Asis M., Cipollone J., Roskelley C., Takai Y., Nicholls P. K., Stanton P. G., Deng W., Finlay B. B., Vogl A. W.,** 2013. A Novel Subcellular Machine Contributes to Basal Junction Remodeling in the Seminiferous Epithelium. *Biology of Reproduction* 88, 1–17
- Duarte A., Poderoso C., Cooke M., Soria G., Maciel F. C., Gottifredi V., Podestá E. J.** 2012. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. *Plos one* 7 (9), e45829
- Edelsztein N. Y., Racine C., di Clemente N., Schteingart H. F., Rey R. A.** 2018. Androgens downregulate anti-Müllerian hormone promoter activity in the Sertoli cell through the androgen receptor and intact steroidogenic factor 1 sites. *Biology of Reproduction* 99, 1303–1312
- Edelsztein N. Y., Kashimada K., Schteingart H. F., Rey R. A.** 2019. CYP26B1 declines postnatally in Sertoli cells independently of androgen action in the mouse testis. *Molecular Reproduction and Development* 87, 66–77
- Edmonds M. E., Woodruff T. K.** 2020. Testicular organoid formation is a property of immature somatic cells, which self-assemble and exhibit long-term hormone-responsive endocrine function. *Biofabrication* 12, 045002
- García-López Á., de Jonge H., Nóbrega R. H., de Waal P. P., van Dijk W., Hemrika W., Taranger G. L., Bogerd J., Schulz R. W.** 2010. Studies in Zebrafish Reveal Unusual Cellular

Expression Patterns of Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in the Testis and Unexpected Functional Differentiation of the Gonadotropins. *Endocrinology* 151, 2349–2360

Gerber J., Weider K., Hambruch N., Brehm R. 2014. Loss of connexin43 (CX43) in Sertoli cells leads to spatio-temporal alterations in occludin expression. *Histology and Histopathology* 29, 935–948

Gholami K., Pourmand G., Koruji M., Sadighilani M., Navid S., Izadyar F., Abbasi M. 2018a. Efficiency of colony formation and differentiation of human spermatogenic cells in two different culture systems. *Reproductive Biology* 18, 397–403

Gholami K., Pourmand G., Koruji M., Ashouri S., Abbasi M. 2018b. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system. *Stem cell research & Therapy* 9

Grier H. J., Uribe M. C., Lo Nostro F. L., Mims S. D., Parenti L. R. 2016. Conserved Form and Function of the Germinal Epithelium Through 500 Million Years of Vertebrate Evolution. *Journal of Morphology* 277, 1014–1044, (Review)

Giudice C., Banco B., Veronesi M. C., Ferrari A., Di Nardo A., Grieco V. 2014. Immunohistochemical Expression of Markers of Immaturity in Sertoli and Seminal Cells in Canine Testicular Atrophy. *Journal of Comparative Pathology* 150, 208–215

Guo J., Nie X., Giebler M., Mlcochova H., Wang Y., Grow E. J., Kim R., Tharmalingam M., Matilionyte G., Lindskog C., Carrell D. T., Mitchell R. T., Goriely A., Hotaling J. M., Cairns B. R. 2020. The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human Puberty. *Cell Stem Cell* 26 (2), 262–276

Haczkiwicz K., Rozenblut-Kościsty B., Ogielska M. 2017. Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. *Zoology* 122, 63–79

Hazra R., Corcoran L., Robson M., McTavish K. J., Upton D., Handelsman D. J., Allan C. M. 2013. Temporal Role of Sertoli Cell Androgen Receptor Expression in Spermatogenic Development. *Molecular Endocrinology* 27 (1), 12–24

Head J. R., Billingham R. E. 1985. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 40 (3), 269–75

Helsel A. R., Yang Q.-E., Oatley M. J., Lord T., Sablitzky F., Oatley J. M. 2017. ID4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia. *Development* 144 (4), 624–634

- Hilbold E., Distl O., Hoedemaker M., Wilkening S., Behr R., Rajkovic A., Langeheine M., Rode K., Jung K., Metzger J., Brehm R. H. J.** 2020. Loss of Cx43 in Murine Sertoli Cells Leads to Altered Prepubertal Sertoli Cell Maturation and Impairment of the Mitosis-Meiosis Switch. *Cells* 9 (3), 1–37
- Holdcraft R. W., Braun R. E.** 2004. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131 (2), 459–467
- Holstein A.-F., Schulze W., Davidoff M.** 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 (107) (Review)
- Jansson E., Mattsson A., Goldstone J., Berg C.** 2016. Sex-dependent expression of *anti-Müllerian hormone (amh)* and *amh receptor 2* during sex organ differentiation and characterization of the Müllerian duct development in *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 229, 132–144
- Jiang X., Ma T., Zhang Y., Zhang H., Yin S., Zheng W., Wang L., Wang Z., Khan M., Sheikh S. W., Bukhari I., Iqbal F., Cooke H. J., Shi Q.** 2015. Specific Deletion of Cdh2 in Sertoli Cells Leads to Altered Meiotic Progression and Subfertility of Mice. *Biology of Reproduction* 92 (3), 1–12
- Kilby E. L., Kelly D. M., Jones T. H.** 2021. Testosterone stimulates cholesterol clearance from human macrophages by activating LXR α . *Life Sciences* 269
- Kleisner K., Ivell R., Flegr J.** 2010. The Evolutionary History Of Testicular Externalization And The Origin Of The Scrotum. *Journal of Biosciences* 35, 27–37
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R.** 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117–121
- Kusumi T., Ishihara K., Mizumoto H., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T.** 2009. Evaluation of a bioreactor with stacked sheet shaped organoids of primary hepatocytes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (5), 552–555
- Lokka E., Lintukorpi L., Cisneros-Montalvo S., Mäkelä J.-A., Tyystjärvi S., Ojasalo V., Gerke H., Toppari J., Rantakari P., Salmi M.** 2020. Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nature Communications* 11

- Ma Y., Yang H.-Z., Xu L.-M., Huang Y.-R., Dai H.-L., Kang X.-N.** 2015. Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat Sertoli cells. *Scientific Reports* 5
- MacLean G., Li H., Metzger D., Chambon P., Petkovich M.** 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 148 (10), 4560–4567
- Maekawa M., Kamimura K., Nagano T.** 1996. Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function. *Archives of Histology and Cytology* 59, 1–13 (Review)
- Mancini R. E, Vilar O., Lavieri J. C., Andrada J. A., Heinrich J. J.** 1963. Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *American Journal of Anatomy* 112, 203–214
- Mao B., Bu T., Mruk D., Li C., Sun F., Cheng C. Y.** 2020. Modulating the Blood–Testis Barrier Towards Increasing Drug Delivery. *Trends in Pharmacological Science* 41 (10), 690–700 (Review)
- Martinez G., Walschaerts M., Le Mitouard M., Borye R., Thomas C., Auger J., Berthaut I., Brugnion F., Daudin M., Moinard N.** 2017. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertility Sterility* 107, 341–350
- Mazaud-Guittot S., Meugnier E., Pesenti S., Wu X., Vidal H., Gow A., Le Magueresse-Battistoni B.** 2010. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biology of Reproduction* 82 (1), 202–213
- Mehta P., Singh P., Gupta N. J., Sankhwar S. N., Chakravarty B., Thangaraj K., Rajender S.** 2021. Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in the disorders of sexual differentiation and male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 38, 1871–1878
- Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N.,** 1998. Mesonephric Stromal Cells Differentiate into Leydig Cells in the Mouse Fetal Testis. *Experimental Cell Research*, 244, 230 – 238
- Mossadegh-Keller N., Gentek R., Gimenez G., Bigot S., Mailfert S., Sieweke M. H.** 2017. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *Journal of Experimental Medicine* 214, 2829–2841

- Nieuwenhuysen T. V., Naert T., Tran H. T., Imschoot G. V., Geurs S., Sanders E., Creybens D., Roy F. V., Vleminckx K.** 2015. TALEN-mediated *apc* mutation in *Xenopus tropicalis* phenocopies familial adenomatous polyposis. *Oncoscience* 2 (5), 555–66
- Nes W. D., Lukyanenko Y. O., Jia Z. H., Quideau S., Howald W. N., Pratum T. K., West R. R., Hutson J. C.** 2000 Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 141, 953–958
- Nguyen T. M. X., Vegrichtova M., Tlapakova T., Krulova M., Krylov V.** 2019a. Epithelial-mesenchymal transition promotes the differentiation potential *Xenopus tropicalis* of immature Sertoli cells. *Stem Cell International*, 2019
- Nguyen T. M. X., Vegrichtova M., Tlapakova T., Krulova M., Krylov V.** 2019b. The interconnection between cytokeratin and cell membrane-bound β -catenin in Sertoli cells derived from juvenile *Xenopus tropicalis* testes. *Biology Open* 8 (12)
- Nicholls P. K., Harrison C. A., Rainczuk K. E., Vogl A. W., Stanton P. G.** 2013. Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 377, 33–43
- Nishino, K., Yamanouchi, K., Naito, K., Tojo, H.** 2001. Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation. *Experimental Cell Research* 267, 225–232
- O'Hara L., McInnes K., Simitsidellis I., Morgan S., Atanassova N., Slowikowska-Hilczer J., Kula K., Szarras-Czapnik M., Milne L., Mitchell R. T., Smith L. B.** 2015. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *The FASEB Journal* 29 (3), 894–910
- Ohnuki Y., Kurosawa H.** 2013. Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *Journal of bioscience and bioengineering* 115 (5), 571–574
- Pendergraft S. S., Sadri-Ardekani H., Atala A., Bishop C. E.** 2017 Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biology of Reproduction* 96, 720–732

- Piprek R. P., Damulewicz M., Tassan J.-P., Kloc M., Kubiak J. Z.** 2019. Transcriptome profiling reveals male- and female-specific gene expression pattern and novel gene candidates for the control of sex determination and gonád development in *Xenopus laevis*. *Development Genes and Evolution* 229, 53–72
- Pöllänen P., Niemi M.** 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *International Journal of Andrology* 10, 37–42
- Popov I. K., Hiatt S. M., Whalen S., Keren B., Ruivenkamp C., van Haeringen A., Chen M.-J., Cooper G. M., Korf B. R., Chang C.** 2019. A YWHAZ Variant Associated With Cardiofaciocutaneous Syndrome Activates the RAF-ERK Pathway. *Frontiers in Physiology* 10
- Porubska B., Vasek D., Somova V., Hajkova M., Hlaviznova M., Tlapakova T., Holan V., Krulova M.** 2021. Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*
- Propper C. R.** 2011. Testicular Structure and Control of Sperm Development in Amphibians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates* 2 (Review)
- Rannikki A. S., Zhang F. P., Huhtaniemi I. T.** 1995. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 107 (2), 199–208
- Regnault C., Willison J., Veyrenc S., Airieau A., Méresse P., Fortier M., Fournier M., Brousseau P., Raveton M., Reynaud S.** 2016. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* 155, 519–527
- Regnault C., Usal M., Veyrenc S., Couturier K., Batandier C., Bulteau A.-L., Lejon D., Sapin A., Combourieu B., Chetiveaux M., May C. L., Lafond T., Raveton M., Reynaud S.** 2018. Unexpected metabolic disorders induced by endocrine disruptors in *Xenopus tropicalis* provide new lead for understanding amphibian decline. *PNAS* 115 (19), E4416-E4425
- Rehman Z. U., Worku T., Davis J. S., Talpur H. S., Bhattarai D., Kadariya I., Hua G., Cao J., Dad R., Farmanullah, Hussain T., Yang L.** 2017. Role and mechanism of AMH in the regulation of Sertoli cells in mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 174, 133–140

- Riera M. F., Regueira M., Galardo M. N., Pellizzari E. H., Meroni S. B., Cigorraga S. B.** 2012. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 302 (8), 914–923
- Roosen-Runge E. C., Anderson D.** 1959. The development of the interstitial cells in the testis of albino rat. *Acta Anatomica* 37, 125–137
- Rozenblut-Kościsty B., Piprek, R., Pecio, A., Bartmańska J., Szymura J. M., Ogielska M.** 2017. The structure of spermatogenic cysts and number of Sertoli cells in the testes of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Bombinatoridae, Anura, Amphibia). *Zoomorphology* 136, 483–495
- Russell L. D.** 1979. Spermatid-sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *The Anatomical Record* 194 (2), 233–246
- Säfholm M., Ribbenstedt A., Fick J., Berg C.** 2014. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 369
- Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Kubota Y., Ogawa T.** 2011. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504–507
- Schimenti K. J., Feuer S. F., Griffin L. B., Graham N. R., Bovet C. A., Hartford S., Pendola J., Lessard C., Schimenti J. C., Ward J. O.** 2013. AKAP9 Is Essential for Spermatogenesis and Sertoli Cell Maturation in Mice. *Genetics* 194 (2), 447–457
- Sharpe R. M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J. S.** 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769–784 (Review)
- Shlush E., Maghen L., Swanson S., Kenigsberg S., Moskovtsev S., Barretto T., Gauthier-Fisher A., Librach L. C.** 2017. In vitro generation of Sertoli-like and haploid spermatid-like cells from human umbilical cord perivascular cells. *Stem cell research & Therapy* 8
- Smith B. E., Braun R.E.** 2012. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science* 338, 798–802

- Spinnler K., Köhn F.-M., Schwarzer U., Mayerhofer A.** 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction* 25 (9), 2181–2187
- Sridharan S., Simon L., Meling D. D., Cyr D. G., Gutstein D. E., Fishman G. I., Guillou F., Cooke P. S.** 2007. Proliferation of Adult Sertoli Cells Following Conditional Knockout of the Gap Junctional Protein GJA1 (Connexin 43) in Mice, *Biology of Reproduction* 76 (5), 804–812
- Stammler A., Lüftner BU, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M, Middendorff R., Konrad L.** 2016. Highly Conserved Testicular Localization of Claudin-11 in Normal and Impaired Spermatogenesis. *PLoS ONE* 11(8)
- Su L., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng C. Y.** 2010. Differential effects of testosterone and TGF- β 3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood–testis barrier. *Experimental Cell Research* 316, 2945–296
- Sun Y., Yang W., Luo H., Wang X., Chen Z., Zhang J., Wang Y., Li X.** 2015. Thyroid hormone inhibits the proliferation of piglet Sertoli cell via PI3K signaling pathway. *Theriogenology* 83, 86–94
- Tadokoro Y., Yomogida K., Ohta H., Tohda A., Nishimune Y.** 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of Development* 113 (1), 29–39
- Takemoto N., Liu X., Takii K., Teramura Y., Iwata H.** 2014. Transplantation of Co-aggregates of Sertoli Cells and Islet Cells Into Liver Without Immunosuppression. *Transplantation Journal* 97 (3), 287–293
- Tlapakova T., Nguyen T. M. X., Vegrichtova M., Sidova M., Strnadova K., Blahova M., Krylov V.** 2016. Identification And Characterization Of *Xenopus Tropicalis* Common Progenitors Of Sertoli And Peritubular Myoid Cell Lineages. *Biology Open* 5, 1275–1282
- Tung K.S., Harakal J., Qiao H., Rival C., Li J.C., Paul A.G., Wheeler K., Pramoonjago P., Grafer C.M., Sun W., Sampson R.D., Wong E.W., Reddi P.P., Deshmukh U.S., Hardy D.M., Tang H., Cheng C.Y., Goldberg E.** 2017. Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *The Journal of Clinical Investigation* 127, 1046–1060

- Umeda K., Ikenouchi J., Katahira-Tayama S., et al.** . ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*. 2006;126:741–754
- Unsicker K.** 1975. Fine structure of the male genital tract and kidney in the anura *Xenopus laevis* Daudin, *Rana temporaria* L. and *Bufo bufo* L. under normal and experimental conditions. *Cell and Tissue Research*, 158 (2)
- Unsicker K., Burnstock G.** 1975. Myoid cells in the peritubular tissue (*lamina propria*) of the reptilian testis. *Cell and Tissue Research* 163, 545–560
- Van Der Wee K., Hofmann M.-C.** 1999. An in vitro tubule assay identifies HGF as a morphogen for the formation of seminiferous tubules in the postnatal mouse testis. *Experimental Cell Research* 252 175–185
- Villagra L. I., Ramos I., Cisint S., Crespo C. A., Fernández S. N.** 2018. Electron microscopy observations on testis and spermatozoa of *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). *Micron* 105, 35–46
- Wang, M., Fijak M., Hossain H., Markmann M., Nüsing R. M., Lochnit G., Hartmann M. F., Wudy S. A., Zhang L., Gu H., Konrad L., Chakraborty T., Meinhardt A., Bhushan S.** 2017. Characterization of the micro-environment of the testis that shapes the phenotype and function of testicular macrophages. *The Journal of Immunology* 198, 4327–4340
- Welter H., Kampfer C., Lauf S., Feil R., Schwarzer J. U., Köhn F.-M., Mayerhofer A.** 2012. Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology* 1, 318–324
- Wen, Q., Li, N., Xiao, X., Lui W., Chu D. S., Wong C. K. C., Lian Q., Ge R., Lee W. M., Silvestrini B., Cheng Y.** 2018. Actin nucleator Spire 1 is a regulator of ectoplasmic specialization in the testis. *Cell Death & Disease* 9 (2)
- Willems A., Batlouni S. R., Esnal A., Swinnen J. V., Saunders P. T. K., Sharpe R. M., Franca L. R., De Gendt K., Verhoeven G.** 2010. Selective Ablation of the Androgen Receptor in Mouse Sertoli Cells Affects Sertoli Cell Maturation, Barrier Formation and Cytoskeletal Development. *Plos One* 5 (11)

- Yokonishi T., Sato T., Katagiri K., Komeya M., Kubota Y., Ogawa T.** 2013. In Vitro Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. *Biology of Reproduction* 89, 1–6
- Yoshida S.** 2016. From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *WIREs Developmental Biology* 5, 119–131 (Review)
- Young J. S. De Asis M. Guttman J., Vogl A. W.** 2012. Cortactin depletion results in short tubulobulbar complexes and spermiation failure in rat testes. *Biology Open* 1 (11), 1069–1077
- Yu Z. H.** 1998. Asymmetrical Testicular Weights In Mammals, Birds, Reptiles And Amphibia. *International Journal of Andrology* 21 (1), 53–55
- Zakrzewski P., Suwińska A., Lenartowski R., Rędowicz M. J., Buss F., Lenartowska M.** 2020. Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis. *Biology of Reproduction* 102 (4), 863–875
- Zarotsky V., Huang M.-Y., Carman W., Morgentaler A., Singhal P. K., Coffin D., Jones T. H.** 2014. Systematic literature review of the risk factors, comorbidities, and consequences of hypogonadism in men. *Andrology* 2, 819–834 (Review)
- Zhang L., Chen M., Wen Q., Li Y., Wang Y., Wang Y., Qin Y., Cui X., Yang L., Huff V., Gao F.** 2015. Reprogramming of Sertoli cells to fetal-like Leydig cells by Wt1 ablation. *PNAS* 112 (13), 4003–4008
- Zhang X.-S., Zhang Z.-H., Jin X., Wei P., Hu X.-Q., Chen M., Lu C.-L., Lue Y.-H., Hu Z.-Y., Hikim A. P. S., Swerdloff R. S., Wang C., Liu Y.-X.** 2006. Dedifferentiation of Adult Monkey Sertoli Cells through Activation of Extracellularly Regulated Kinase 1/2 Induced by Heat Treatment. *Endocrinology* 147 (3), 1237–1245
- Zhao X., Wen X., Ji M., Guan X., Chen P., Hao X., Chen F., Hu Y., Duan P., Gea R.- S., Chen H.** 2021. Differentiation of seminiferous tubule-associated stem cells into leydig cell and myoid cell lineages. *Molecular and Cellular Endocrinology* 525