

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Karolína Strnadová**

Indukce diferenciací testikulárních kmenových buněk u savců

Induction of testicular stem cell differentiation in mammals

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Praha, 2014

## **Prohlášení**

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

V Praze, 16. 05. 2014

Podpis

## **Poděkování**

Mé poděkování patří RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## **ABSTRAKT**

Kmenové buňky představují unikátní zdroj buněk s potenciálním využitím v oblasti regenerační medicíny a orgánové transplantace. Jak je známo, spermatogoniální kmenové buňky jsou unipotentní, dávají tedy vzniknout jedinému buněčnému typu, a sice spermii. Izolací a kultivací těchto testikulárních kmenových buněk bylo v řadě výzkumů docíleno pluripotentního stavu. Takto získané pluripotentní kmenové buňky z varlat, podobně jako embryonální kmenové buňky, diferencovaly v *in vitro* podmínkách na deriváty všech tří zárodečných listů. Cílem této bakalářské práce je charakterizovat kmenové buňky a shrnout poznatky zejména o testikulárních kmenových buňkách. Hlavní důraz je pak kladen na studie kultivovaných pluripotentních kmenových buněk odvozených z varlat myši a člověka a jejich schopnosti diferencovat za určitých podmínek na buňky ektodermu, mezodermu a endodermu.

**Klíčová slova:** kmenová buňka, embryonální kmenová buňka, diferenciace, pluripotence, spermatogoniální kmenová buňka, testikulární kmenová buňka

## **ABSTRACT**

Stem cells represent a unique cell source with potential usage in regenerative medicine and organ transplantation. As is known, spermatogonial stem cells are unipotent giving rise to a single cell type, which is sperm. Pluripotency was achieved by isolation and cultivation of these testicular stem cells in a number of researches. Testicular pluripotent stem cells differentiated in conditions *in vitro* to derivatives of all three germ layers identically as embryonic stem cells. The aim of this thesis is to characterize stem cells and summarize the findings of testicular stem cell research. The main focus of this thesis is on studies of cultivated pluripotent stem cells derived from mouse and human testes and their ability to differentiate under determinate conditions into the cells of ectoderm, mesoderm and endoderm.

**Keywords:** stem cell, embryonic stem cell, differentiation, pluripotency, spermatogonial stem cell, testicular stem cell

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	KMENOVÉ BUŇKY.....	2
2.1	Rozdělení na základě diferenciačního potenciálu .....	3
2.1.1	Totipotentní kmenová buňka .....	3
2.1.2	Pluripotentní kmenová buňka.....	3
2.1.3	Multipotentní kmenová buňka.....	3
2.1.4	Unipotentní kmenová buňka.....	4
2.2	Embryonální kmenové buňky (ESCs) .....	4
2.3	Kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie .....	5
2.3.1	Embryonální zárodečné buňky (EGCs).....	5
2.3.2	Embryonální buňky karcinomu (ECCs).....	6
2.3.3	Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs).....	6
3	SOMATICKÉ BUŇKY VARLAT .....	7
4	TESTIKULÁRNÍ KMENOVÉ BUŇKY .....	8
4.1	Charakteristika .....	8
4.2	Proliferace.....	8
4.2.1	$A_s$ model a $A_0/A_1$ model spermatogeneze u „neprimátních“ savců .....	8
4.2.2	$A_p/A_d$ model spermatogeneze u primátů .....	9
4.3	Regulace TSCs .....	10
4.3.1	Regulace sebeobnovy.....	10
4.3.2	Regulace diferenciace .....	10
4.3.3	Regulace apoptózy.....	14
5	INDUKCE DIFERENCIACE TESTIKULÁRNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK IN VITRO .....	14
5.1	Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs).....	15
5.2	Multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie (maGSCs) .....	15
5.3	Pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie (gpSCs).....	16
5.4	Lidské adultní kmenové buňky zárodečné linie (haGSCs).....	18
5.5	Lidské multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (hMGSCs) .....	19
5.6	Lidské pluripotentní buňky podobné ESCs.....	20
6	ZÁVĚR.....	22
7	SEZNAM ZKRATEK.....	23
8	SEZNAM LITERATURY.....	25

# 1 ÚVOD

Kmenové buňky jsou schopny diferencovat na odvozenější buněčný typ a zároveň si zachovat svoji vlastní populaci v nediferencovaném stavu. Díky těmto vlastnostem představují kmenové buňky významný zdroj buněk potenciálně využitelný v oblasti lidské regenerační medicíny a orgánové transplantaci. Kmenové buňky lze dělit podle jejich diferenciačního potenciálu na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Z kmenových buněk v rané fázi embryogeneze vzniká více buněčných typů, nežli je tomu u kmenových buněk v pozdním fetálním období či v dospělosti. V současné době jsou nejlépe prozkoumanými buňkami embryonální kmenové buňky odvozené z vnitřní pluripotentní buněčné masy blastocyst savců. Tyto buňky byly předmětem zkoumání v mnoha studiích díky jejich potenciálu diferencovat na buněčné typy všech tří zárodečných listů a jejich snadné propagaci v *in vitro* systému.

Nicméně hned z několika důvodů je velmi žádoucí nalézt alternativní zdroj pluripotentních kmenových buněk. Zaprvé by bylo vhodné rozšířit zdroje kmenových buněk a tím zlepšit přínos klinické buněčné terapie. Zadruhé je nutné získat takový zdroj kmenových buněk, který by byl imunologicky identický s příjemcem, aby se případně zabránilo jejich odmítnutí při léčbě a transplantacích. Posledním důvodem jsou pak morální, etické a politické spory ohledně manipulace s embryonálními kmenovými buňkami, pocházejícími z lidských embryí, což omezuje jejich použití pro výzkum a klinické aplikace.

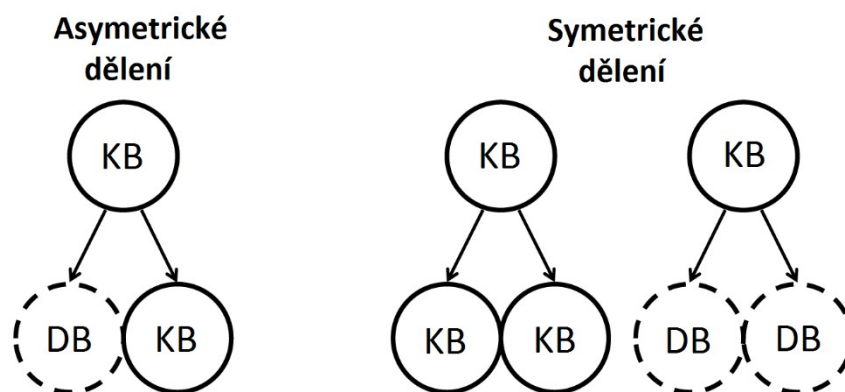
Takovými buňkami, které by se experimentálně přeprogramovaly a získaly tak vlastnosti embryonálních kmenových buněk, mohou být právě testikulární kmenové buňky zárodečné linie. Vzhledem k tomu, že testikulární kmenové buňky nabízí nejen klinicky významné možnosti pro zachování mužské plodnosti, je nezbytné porozumět jejich základní biologii (Goossens and Tournaye 2006; Kee *et al.* 2010).

Předkládaná bakalářská práce nejdříve shrnuje základní charakteristiku kmenových buněk včetně jejich dělení podle diferenciačního potenciálu a původu. V druhé části práce jsou pak popisovány somatické buňky varlat, které slouží jako podpůrné buňky testikulárním kmenovým buňkám. Třetí část popisuje charakteristiku testikulárních kmenových buněk a jejich základní mechanismy proliferace, diferenciace a regulace sebeobnovy, diferenciace a apoptózy. Poslední část bakalářské práce je pak zaměřena na indukci diferenciace testikulárních kmenových buněk v *in vitro* podmínkách.

## 2 KMENOVÉ BUŇKY

Kmenové buňky jsou charakteristické svou schopností sebeobnovy a diferenciací do různých buněčných typů (pluripotence, multipotence) či jedné specifické buněčné linie (unipotence). Podle původu je lze dělit na tři hlavní typy: embryonální kmenové buňky (ESCs – embryonic stem cells), kmenové buňky zárodečné linie a somatické kmenové buňky dospělých jedinců. Kmenové buňky s různým diferenciacním potenciálem jsou nadějí pro regenerační terapii a léčbu genetických poruch (Liu *et al.* 2009).

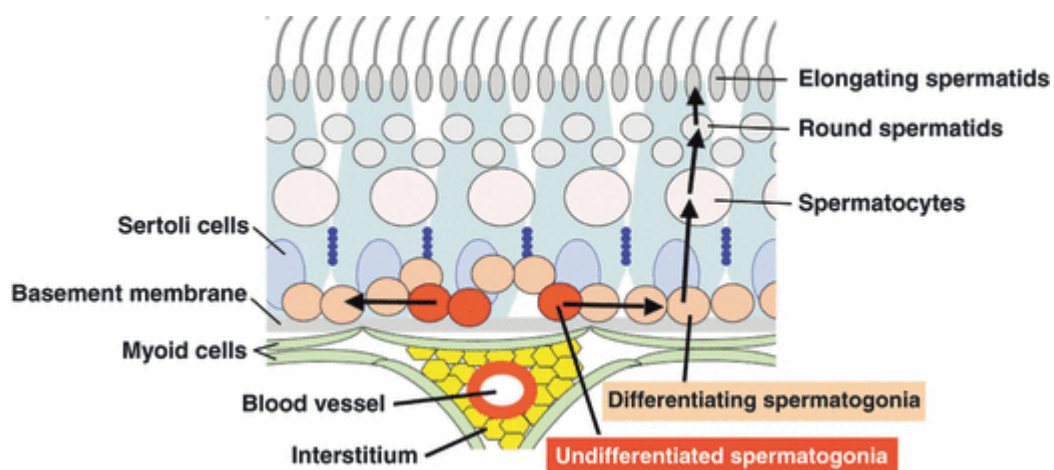
Specifickým znakem kmenových buněk je způsob, jakým je udržován jejich stálý počet. V zásadě je využíváno dvou mechanismů, asymetrického buněčného dělení (Obr. 1) a „niche“. Asymetrickým dělením je zajišťován proces sebeobnovy a diferenciací kmenových buněk, kdy jedna dceřiná buňka zůstává v nediferencovaném stavu a u druhé dochází k diferenciaci na příslušný buněčný typ (Yamashita *et al.* 2010). Tento typ buněčného dělení není nezbytný pro zachování identity kmenových buněk, ale je nástrojem pro udržení jejich dostatečně velké populace v organismu (Morrison and Kimble 2006).



**Obr. 1 Symetrické a asymetrické dělení kmenových buněk.** V modelu asymetrického dělení je vytvořena jedna buňka kmenová (KB) a jedna buňka diferencovaná (DB), zatímco v modelu symetrického dělení kmenová buňka produkuje buď dvě kmenové či dvě diferencované buňky (převzato a upraveno dle Morrison and Kimble 2006).

Niche je typ tkáňového mikroprostředí v organismu, jehož pomocí je udržována a regulována populace kmenových buněk (Morrison and Spradling 2008). Výzkum prováděný na varlatech myši ukázal, že se nediferencované spermatogoniální buňky nachází preferenčně v oblastech bazální membrány semenotvorných kanálků, které jsou v blízkosti krevních cév a intersticia. Po přechodu do diferencovaného stavu se spermatogonie rozptýlí po celém bazálním kompartmentu. Tyto vyhrazené oblasti lze považovat za niche (Obr. 2) (Yoshida *et al.* 2007).





**Obr. 2 Model mikroenvironmentálního niche nediferencovaných spermatogonií.** Přestože je semenotvorný kanálek ve svém obvodu a délce uniformní, objevují se zde zvláštní oblasti spojené s krevními cévami a intersticiem, které mohou regulovat spermatogoniální buňky (převzato z Yoshida 2010).

## 2.1 Rozdělení na základě diferenciačního potenciálu

### 2.1.1 Totipotentní kmenová buňka

Totipotence je schopnost buněk diferencovat do všech buněčných typů organismu včetně extraembryonálních tkání. Totipotentní jsou zygoty a časná embrya (Seydoux and Braun 2006). Extraembryonální tkáně u savců vznikají během embryonálního vývoje z trofoektodermy, primitivního endodermu a epiblastu u preimplantačních embryí ve stádiu 4,5 dpc (day post coitum) (Hudson *et al.* 2010).

### 2.1.2 Pluripotentní kmenová buňka

Pluripotentní buňky diferencují do buněk všech tří zárodečných listů. Příkladem takových buněk jsou ESCs. Tento vývojový potenciál může být experimentálně pozorován během normálního i nádorového růstu nebo při mikroinjekci ESCs do hostitelské blastocysty (Beddington and Robertson 1989; Seydoux and Braun 2006).

### 2.1.3 Multipotentní kmenová buňka

Multipotentní kmenové buňky diferencují na všechny typy buněk v konkrétní buněčné linii, např. kmenová buňka hematopoetická (Jaenisch and Young 2008). Většina tkání u savců je multipotentní, tudíž jsou schopné produkovat buněčné typy odpovídající svému umístění. Malé střevní kmenové buňky mohou tvořit čtyři původní linie (Panethovy buňky, pohárkové buňky, enterocyty a enteroendokrinní buňky), zatímco kmenové buňky centrální nervové soustavy jsou tripotentní a produkují neurony, oligodendrocyty a astrocyty (Alison and Islam 2009).

#### 2.1.4 Unipotentní kmenová buňka

Posledním typem diferenciačního potenciálu je unipotence. Tyto kmenové buňky jsou schopné tvořit pouze jeden specifický buněčný typ (Alison and Islam 2009). Mezi unipotentní (progenitorové) kmenové buňky patří i spermatogoniální kmenové buňky (SSCs - spermatogonial stem cells) tvořící spermie (Jaenisch and Young 2008).

### 2.2 Embryonální kmenové buňky (ESCs)

Embryonální kmenové buňky (ESCs) jsou pluripotentní buňky odvozené z kultivovaných buněk embryoblastu preimplantačních blastocyst u savců. Po injekci do embryí diferencují do všech somatických linií včetně funkčních gamet (Stewart *et al.* 1994).

Rok 1981 znamenal v buněčné biologii převrat díky ustanovení kultury myších ESCs (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Pro udržení myších ESCs v nediferencovaném stavu je používána standardní kultivační metoda, kdy se ESCs kultivují na podkladové výživové vrstvě embryonálních fibroblastů či na želatině a médium je obohaceno o fetální hovězí sérum (FBS – fetal bovine serum) a leukemický inhibiční faktor (LIF – leukemia inhibitory factor). Nevýhodou tohoto způsobu kultivace je právě použití podkladové vrstvy buněk a ne zcela definovaných podmínek (FBS), které mohou vyvolat spontánní diferenciaci a omezit reprodukovatelnost výsledků. Z tohoto důvodu bylo v posledních letech publikováno několik nových kultivačních metod s použitím lépe vymezených podmínek. Byla také publikována komparativní studie srovnávající tuto standardní metodu se dvěma novějšími. V prvním případě se používají semiadherentní myší ESCs, které obsahují geny pro dva malé molekulární inhibitory: inhibitor glykogen syntázy kinázy 3 (GSK3) CHIR99021 a inhibitor signální dráhy MAPK/ERK PD0325901. V druhém případě se ESCs kultivují ve formě sféroidní suspenzní kultury v definovaném médiu obsahujícím LIF a bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF – basic fibroblast growth factor). Výsledky experimentů ukázaly, že myší ESCs rostoucí adherentně proliferovaly mnohem rychleji než, když byly kultivovány ve sféroidní suspenzi. Při všech zmiňovaných kultivačních metodách byl zachován pluripotentní stav buněk. Médium obsahující inhibitory vytvářelo ve srovnání se standardní metodou čistší kulturu kmenových buněk. Znamky spontánní diferenciaci byly zanedbatelné (Tamm *et al.* 2013).

V roce 1998 byly poprvé definovány ESCs odvozené z lidských blastocyst, které přinesly naději na jejich možné využití při různých terapiích, např. při traumatických poraněních míchy (Thomson *et al.* 1998). Vzbudily však také bouřlivou diskuzi o etické stránce výzkumu, jelikož ESCs pocházely z „nadbytečných“ embryí připravených pro *in vitro* fertilizaci, ze kterých se může vyvinout lidská bytost (Watt and Driskell 2010).

## 2.3 Kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie

Kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie pochází ze tří zdrojů a zahrnují embryonální zárodečné buňky (EGCs – embryonic germ cells), embryonální buňky karcinomu (ECCs – embryonal carcinoma cells) a multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs – multipotent germ line stem cells). EGCs jsou odvozené z primordiálních zárodečných buněk (PGCs – primordial germ cells), které vznikají v pozdním embryonálním a časném fetálním vývoji z totipotentních prekurzorových buněk. ECCs pochází z testikulárních nádorů dospělého, zatímco mGSCs vznikají kultivací SSCs z juvenilních i dospělých jedinců. Kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie se vyznačují pluripotencí a jejich kultury byly ustanoveny s mírnými odlišnostmi u mnoha druhů obratlovců (Kerr *et al.* 2006).

### 2.3.1 Embryonální zárodečné buňky (EGCs)

Vývoj zárodečné linie u obratlovců je nepřetržitým procesem od okamžiku, kdy lze rozpoznat PGCs během raného vývoje, do doby, než u dospělců vznikají gamety. PGCs mají původ v proximálním epiblastu, který se nalézá v blízkosti extraembryonálního ektodermu. Vznikají ze stejných prekurzorů jako např. alantois, a o jejich zařazení k zárodečné linii se rozhodne až po 6,5 embryonálním dni (Lawson and Hage 1994). U myši jsou pak tyto buňky nejdříve detekovatelné v sedmidenním embryu a jsou pravděpodobně prvním mezodermálním typem buněk, který zde vzniká. 7,5 dpc je možno na základě detekce přítomnosti endogenní alkalické fosfatázy pozorovat PGCs blízko báze alantoisu v extraembryonálním mezodermu, kde jsou uloženy posteriorně vůči primitivnímu proužku. Během 9 – 12,5 dpc, dochází k migraci PGCs přes endoderm zadního střeva a mezenterium ke genitální rýze a ke zvyšování jejich počtu až na 25 000 buněk. Jejich proliferace ustává zhruba 13,5 dpc. Poté PGCs vstupují do fáze pohlavní diferenciací následovanou fází gametogeneze (Wylie and Heasman 1993; Xin *et al.* 1999).

Neúspěchy při kultivacích PGCs *in vitro* dlouhou dobu bránily pochopení, jak se savčí zárodečná linie vyvíjí (Xin *et al.* 1999). Poté výsledky některých výzkumů ukázaly, že přidání faktoru kmenových buněk (SCF - stem cell factor, ligand *c-kit*) a LIF do kultivačního média synergisticky podporuje přežití a v některých případech i proliferaci myších PGCs *in vitro* (Matsui *et al.* 1992). Později byla také prokázána role bFGF v regulaci proliferace PGCs (Resnick *et al.* 1992). V přítomnosti čtyř růstových faktorů, bFGF, membránově asociovaného SCF, solubilního SCF a LIF docházelo u PGCs k proliferaci a k tvorbě kolonií buněk podobajících se nediferencovaným pluripotentním ESCs (Matsui *et al.* 1992). Díky této konverzi PGCs na EGCs, tedy buňky morfologicky a vývojově podobné ESCs, se tyto kultury staly novým zdrojem pluripotentních buněk (Xin *et al.* 1999; Tsung *et al.* 2003).

Později byly připraveny kultury EGCs za výše uvedených kultivačních podmínek i z lidské tkáně (Shamblott *et al.* 1998), z prasat (Shim *et al.* 1997; Piedrahita *et al.* 1998; Mueller *et al.* 1999; Tsung *et al.* 2003) a kuřat (Park and Han 2000; Kerr *et al.* 2006).

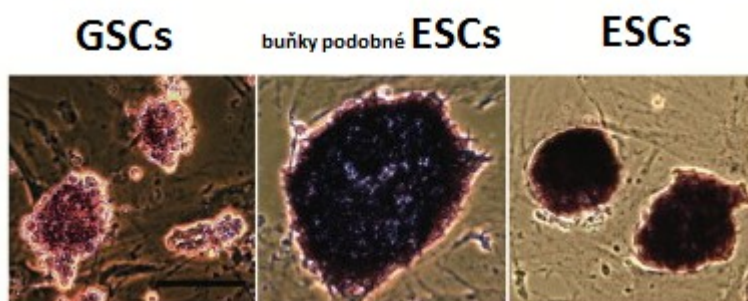
### 2.3.2 Embryonální buňky karcinomu (ECCs)

Stabilita diferenciací PGCs se může v embryu měnit a mohou vznikat, jak benigní nádory (teratomy), tak maligní nádory (teratokarcinomy). Teratomy se vyvíjí v semenotvorných kanálcích samčích embryí zhruba 15,5 dpc jako malé shluky rychle proliferujících nediferencovaných buněk. Tyto buňky se označují jako embryonální buňky karcinomu (ECCs) (Stevens 1966; Donovan 1998).

Diferencující nádorové buňky pak mohou tvořit různé buněčné typy odvozené ze všech tří zárodečných listů (endoderm, ektoderm a mesoderm). Genetické, morfologické a imunologické důkazy naznačují, že tyto nádory pochází z PGCs (Stevens 1967; Donovan 1998).

### 2.3.3 Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs)

Kanatsu-Shinohara *et al.* (2004) úspěšně založili kulturu buněk z varlat juvenilní myši, které vykazovaly podobné vlastnosti jako embryonální kmenové buňky. Buňky této kultury se podobaly ESCs/EGCs kromě jejich genomického imprintingu. Vykazovaly také silnou pozitivitu na přítomnost alkalické fosfatázy podobně jako ESCs/EGCs (Resnick *et al.* 1992; Matsui *et al.* 1992) (Obr. 3).



**Obr. 3 Fenotypická charakterizace buněk podobných ESCs.** Barvení alkalickou fosfatázou ukazuje, že GSCs jsou slabě pozitivní, zatímco buňky podobné ESCs a ESCs jsou silně pozitivní (převzato a upraveno dle Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004).

Tyto buňky se za podmínek používaných k indukci diferenciací ESCs (viz kapitola 5.1) diferencovaly do různých typů somatických buněk a po přenesení do myši kmene „nude mice“ (holé myši) produkovaly teratomy. Buňky po transplantaci formovaly nádory u všech příjemců už po 4 týdnech. Tumory obsahovaly deriváty všech tří embryonálních zárodečných listů a to: dlaždicovitý epitel, neurální epitel a sval. Podobné výsledky byly získány od tří odlišných klonů a i u myši s knock-out v genu *p53*. Naproti tomu nebyl prokázán vývoj tumorů po transplantaci zárodečných kmenových

buněk (GSCs – germ stem cells). Kromě toho buňky podobné ESCs tvořily po transplantaci do blastocysty myši chiméry zárodečných linií.

Na základě těchto výsledků byly tyto buňky pojmenovány jako multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs), aby se odlišily od GSCs, které diferencují pouze na buňky zárodečné linie (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2003).

Předpokladem je, že původem jsou mGSCs odvozeny z SSCs, a že schopnost stát se multipotentní buňkou je jedna z obecných vlastností buněk zárodečné linie (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004).

### 3 SOMATICKÉ BUŇKY VARLAT

Somatické testikulární buňky jsou oproti spermatogoniím, které v dospělém jedinci podstupují proliferaci a diferenciaci, relativně klidové. Hlavními somatickými buněčnými typy jsou Sertoliho buňky, Leydigovy buňky a peritubulární myoidní buňky, které vznikají ve fetálním období. Jejich proliferace je zřídka pozorována u sexuálně zralých jedinců (Liu *et al.* 2009).

Sertoliho buňky jsou nezbytné pro utváření morfologie varlat a pro spermatogenezi u obratlovců a jsou jedinými buňkami, které jsou v těsném kontaktu s buňkami kmenovými. Regulace zárodečných buněk se pak pravděpodobně odehrává přímým kontaktem skrz velké oblasti desmozomálních a vodivých spojů (gap junctions). Tyto kontaktní oblasti jsou však vzácně viděny jen u spermatogonií typu A, a proto se předpokládá, že umožňují vznik spermií spíše kontrolou prostředí semenotvorných kanálků a sekrecí parakrinních faktorů (Goossens and Tournaye 2006).

Sertoliho buňky obsahují receptory pro folikuly stimulující hormon (FSH – follicle-stimulating hormone) produkovaný předním lalokem hypofýzy a pro testosteron. Zárodečným buňkám oba tyto receptory chybí. Je tedy pravděpodobné, že FSH a testosteron ovlivňují zárodečné buňky tím, že modulují funkci Sertoliho buněk. Testosteron je nezbytný zejména pro pozdější fáze zrání spermatid. FSH stimuluje mitózu Sertoliho buněk během vývoje varlat, a může tak ovlivnit spermatogenní buňky varlat dospělých jedinců (McLachlan *et al.* 1995).

Vzhledem k tomu, že jsou spermatogoniální buňky v přímém kontaktu s bazální membránou semenotvorných kanálků, mohou reagovat i na difúzní parakrinní faktory sekretované Leydigovými nebo myoidními buňkami, jež jsou přítomny v intersticiálním prostoru. Myoidní buňky obklopující semenotvorné kanálky pak ovlivňují funkci Sertoliho buněk sekrecí různých látek, včetně růstových faktorů či komponentů extracelulární matrix (Maekawa *et al.* 1996; Goossens and Tournaye 2006).

Leydigovy buňky mají mezenchymální původ a produkují testosteron. Jejich vývoj je dělen do čtyř stádií: kmenové, progenitorové, nezralé a zralé. Z kmenových nediferencovaných buněk vznikají progenitorové Leydigovy buňky. Mají receptor pro luteinizační hormon (LH – luteinizing hormone), vysokou mitotickou aktivitu a produkují spíše metabolity testosteronu. Postupně vznikají zralé

Leydigovy buňky, které jsou plně diferencované a produkují již velké množství tohoto steroidního hormonu (Chen *et al.* 2009).

## 4 TESTIKULÁRNÍ KMENOVÉ BUŇKY

### 4.1 Charakteristika

Testikulární kmenové buňky (TSCs - testicular stem cells) jsou nediferencované buňky původem z PGCs. Jakmile se PGCs objeví v genitální rýze, jsou uzavřeny Sertolihovými buňkami a stávají se buňkami označovanými jako prospermatogonie či gonocyty. Gonocyty jsou po několikadenní proliferaci zastaveny v  $G_0/G_1$  fázi. Po narození jedince gonocyty opět zahájí proliferaci a po pár dnech osídlí bazální membránu semenotvorných kanálků a stávají se nediferencovanými spermatogoniemi typu A, tedy samčími kmenovými buňkami zárodečné linie, tzn. TSCs. Jsou odpovědné za zachování komplexního procesu spermatogeneze z konstantně se obnovující malé populace těchto buněk (Sapsford 1962 podle Goossens and Tournaye 2006 ; Kluin and de Rooij 1981; Kanatsu-Shinohara *et al.* 2003; Goossens and Tournaye 2006).

TSCs, jejichž podmnožinou jsou SSCs, jsou jednoduché buňky s vejcovitým tvarem jádra, které má jadérko blízko nukleární membrány. Densní cytoplazma obsahuje malý Golgiho aparát, několik mitochondrií a mnoho volných ribozomů. Jsou lokalizovány na bazální membráně semenotvorných kanálků varlat (Keros *et al.* 2005).

### 4.2 Proliferace

Proces sebeobnovy TSCs se nepatrně liší u „neprimátních“ savců a u primátů (Goossens and Tournaye 2006).

#### 4.2.1 $A_s$ model a $A_0/A_1$ model spermatogeneze u „neprimátních“ savců

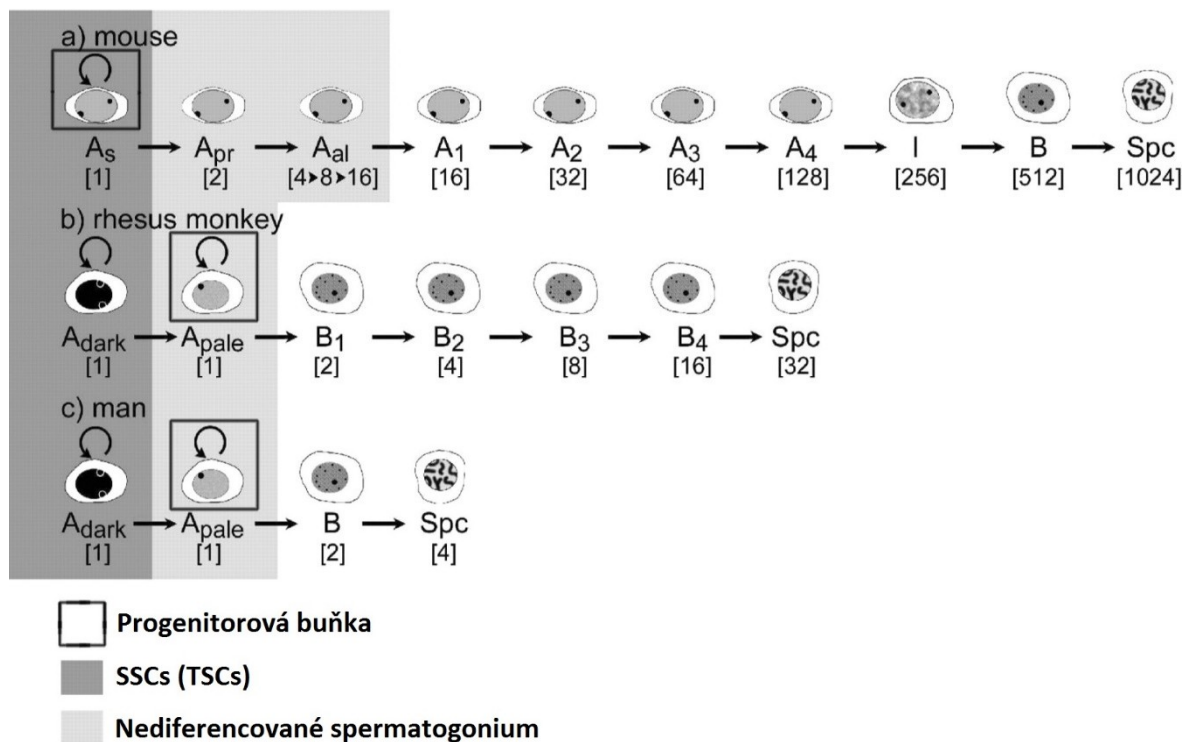
$A_s$  model navržený roku 1971 je dosud nejvíce používaným modelem sebeobnovy TSCs. Vzhledem k topografickému uspořádání byly klasifikovány tři skupiny nediferencovaných spermatogoniálních buněk typu A: oddělené (isolated), párové ( $A_{pr}$  - paired) a uspořádané ( $A_{al}$  - aligned). Předpokládá se, že oddělené spermatogonie jsou skupinou funkčních kmenových buněk, jelikož jsou vždy přítomny v epitelu semenotvorného kanálku. Byly tudíž označeny jako  $A_s$  (s - stem, single). Dvojice buněk spojené cytoplazmatickými můstky označované jako  $A_p$  se dále dělí a vytváří stále delší řetězce  $A_{al}$  spermatogonií. Ve chvíli kdy proliferací kompartment dosáhne své konečné velikosti, mitotická aktivita ustane a celá populace se morfologicky přemění na spermatogonie typu

$A_1$ . Skupina spermatogonií typu  $A_1$  vstoupí do diferenciačního kompartmentu a začne tak spermatogoniální zrání. Morfologická diferenciace ze spermatogoniální buňky typu  $A_1$  na typ B je doprovázena postupnou akumulací heterochromatinu a redukcí velikosti jádra (Huckins 1971).

V druhém  $A_0/A_1$  modelu se SSCs dělí na dvě skupiny: rezervní kmenové buňky ( $A_0$ ) a obnovující se kmenové buňky ( $A_1 - A_4$ ).  $A_0$  spermatogonie se v normálních varlatech potkanů dělí jen vzácně, zatímco obnovující se skupina kmenových buněk současně tvoří nové kmenové buňky ( $A_1$ ) a diferencované spermatogonie, z kterých pak vznikají spermatoocyty (Clermont and Bustos-Obregon 1968; Dym and Clermont 1970).

#### 4.2.2 $A_p/A_d$ model spermatogeneze u primátů

U primátů se vyskytují dva typy spermatogonií A, tmavé ( $A_{dark}$ ;  $A_d$ ) a světlé ( $A_{pale}$ ;  $A_p$ ) (Clermont and Leblond 1959). U makaka rhesus vznikají následně diferenciací čtyři typy spermatogonií a to,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  a  $B_4$ .  $A_{pale}$  spermatogoniální buňky zajišťují sebeobnovu a jsou tedy progenitory, zatímco  $A_{dark}$  jsou TSCs a jejich funkce je regenerační. Před vznikem spermatoocytů se u člověka vyskytuje pouze jediná generace spermatogonií typu B (Obr. 4) (Ehmcke *et al.* 2006).



**Obr. 4** Schéma premeiotických kroků spermatogeneze u a) myši, b) makaka rhesus a c) muže. Číslo pod buňkou udává počet dceřiných buněk odvozených z jedné progenitorové buňky, u které dojde k diferenciaci. I – přechodný typ mezi spermatogoniemi A a B; Spc – spermatoocyt (převzato a upraveno dle Ehmcke *et al.* 2006).

### 4.3 Regulace TSCs

TSCs se mohou vyvíjet třemi různými směry: mohou se sami obnovovat, mohou se diferencovat nebo směřují do apoptózy. Mechanismy, které rozhodují, jakou cestou se tyto buňky vydají, jsou předmětem intenzivního zkoumání (Goossens and Tournaye 2006).

#### 4.3.1 Regulace sebeobnovy

Výsledky studie zabývající se regulačními dráhami u normálních varlat prokázaly, že neexistuje mechanismus, který by udržoval lokální hustoty kmenových buněk nebo nediferencovaných spermatogonií (de Rooij and Janssen 1987). Na druhou stranu, degenerace diferencujících se spermatogonií je na těchto změnách hustoty naopak závislá. V epitelu semenotvorného kanálku varlete se zřejmě může vyvíjet jen omezený počet spermatogenních buněk (de Rooij and Lok 1987).

V případě velké ztráty buněk, např. cytotoxickými látkami nebo ozářením, preferují kmenové buňky proces sebeobnovy před diferenciací (van Keulen and de Rooij 1975; van Beek *et al.* 1990).

Další roli v regulaci přežití a možná i proliferace spermatogonií typu A hrají SCF a granulocytový-makrofágový faktor stimulující kolonie (GM-CSF – granulocyte macrophage-colony stimulating factor). Spermatogonie typu A prasete byla dlouho kultivována v médiu bohatého na draslík a ukázalo se, že vysoké koncentrace SCF či nízké koncentrace GM-CSF podporují přežití buněk. Naopak vysoké koncentrace GM-CSF buněčné přežití snižuje. Různé kombinace SCF a GM-CSF neprokázaly významnější vliv na přežívání spermatogonií typu A (Dirami *et al.* 1999).

Neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie (GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor) produkovaný Sertoliho buňkami se také účastní regulace proliferace nediferencovaných spermatogonií. V případě snížené exprese GDNF docházelo k vyčerpání rezervních kmenových buněk, zatímco při zvýšené expresi GDNF se nediferencované spermatogonie hromadily (Meng *et al.* 2000). Buněčná signalizace indukovaná GDNF hraje tedy zásadní roli v sebeobnově SSCs (Kubota *et al.* 2004).

#### 4.3.2 Regulace diferenciaci

Zásadní roli v proliferaci diferencujících se spermatogonií u prepubertálních myší hraje gen *c-kit*. Mechanismy, které regulují nástup spermatogeneze a expresi *c-kit*, jsou však těžko srozumitelné. V *in vitro* studii byl v buňkách varlat prepubertálních myší identifikován nový systém signální transdukce, který tuto událost reguluje. Součástí tohoto systému je kostní morfogenetický protein 4 (BMP4 – bone morphogenetic protein 4) a jeho transdukční mechanismus. BMP4 je produkován Sertoliho buňkami v raném období po narození a postupně je downregulován. Jeho receptory jsou Alk3 a Smad5, které jsou exprimovány v proliferujících PGCs a v postnatálních spermatogoniích. Pokud jsou kultivované spermatogonie stimulovány BMP4, dochází k nukleární translokaci Smad4/5 a



k tvorbě DNA-vázacího komplexu s transkripčním koaktivátorem p300/CBP. Výzkum na myších prokázal nezbytnou roli tohoto koaktivátoru pro embryonální růst, vývoj orgánů a buněčnou homeostázi. Mitogenní a diferenciační účinky exprese genu *c-kit* byly sledovány pomocí metody využívající inkorporaci  $^3\text{H}$  thymidinu do DNA. Bylo zjištěno, že přítomnost BMP4 v *in vitro* podmínkách vyvolá expresi tohoto genu u nediferencovaných spermatogoniálních buněk. Metabolické začlenění  $^3\text{H}$  thymidinu do DNA je stále široce používaná metoda pro sledování rychlosti syntézy DNA a buněčné proliferace. Současně se ale hromadí důkazy prokazující jeho schopnost zastavit buněčný cyklus a navodit apoptózu. Důsledkem exprese receptoru *c-kit* získají *c-kit*- negativní spermatogonie citlivost na SCF. Dráha BMP4/Alk3/Smad5 funguje v postnatálních varlatech a je tedy zapojena do regulace diferenciace spermatogonií (Yao *et al.* 1998; Hu *et al.* 2002; Pellegrini *et al.* 2003).

Výše zmíněný proto-onkogen *c-kit* je transmembránový tyrozinkinázový receptor, který společně se svým ligandem SCF hraje důležitou roli v regulaci raných stádiích spermatogeneze. Bylo prokázáno, že *c-kit* receptor je ve vazbě s lokusem dominantní bílé strakatosti (W – white spotting locus). Mutace právě v tomto W místě ovlivňují různé aspekty hematopoézy, stejně tak jako proliferaci či migraci PGCs a melanoblastů během vývoje (Nocka *et al.* 1989; Koshimizu *et al.* 1991). Růstový faktor SCF je naopak ve vazbě se Steel (Sl) lokusem. Transplantací testikulárních zárodečných buněk z GFP (green fluorescent protein) transgenních myší do semenotvorných kanálků W mutantních myší bylo prokázáno, že SCF je prerekvizitou pro zachování *c-kit* pozitivních diferencovaných zárodečných buněk, ale ne pro proliferaci nediferencovaných spermatogonií typu A. Delece nebo mutace v genu kódující *c-kit* nebo jeho ligand SCF způsobuje sterilitu v důsledku ztráty zárodečných buněk. Zkoumáním těchto mutantů bylo objasněno, jak důležitá je interakce mezi *c-kit* a SCF pro normální vývoj PGCs a spermatogonií (Koshimizu *et al.* 1991; Ohta *et al.* 2000).

Dále byly také zkoumány Steel-Dickie ( $\text{Sl}^d$ ) mutace a jejich vliv na testikulární zárodečné buňky s využitím kryptorchidních varlat u myší. Kryptorchismus je stav, kdy jedno nebo obě varlata nesešoupila do šourku. U kryptorchidních varlat mutantních myší byl průběh spermatogeneze narušen, a to hlavně během přechodu ze spermatogonií typu A do spermatogonií typu B a při meiotickém dělení. Zároveň došlo ke snížení jejich počtu. Na druhou stranu proliferační aktivita spermatogonií typu A byla během buněčného cyklu normální. Po operačním zákroku, kdy byl kryptorchismus zvrácen, došlo k regeneraci a diferenciaci zralých zárodečných buněk varlat u wild-type myší, zatímco u mutantních myší zotavení nebylo pozorováno (Tajima *et al.* 1991; Paulozzi 1999).

Byly popsány i další faktory a mechanismy způsobující zastavení spermatogoniální diferenciace, a tím pádem zvýšení populace kmenových buněk v semenotvorných kanálkách (Goossens and Tournaye 2006). Jedním z takových mechanismů je nedostatek vitamínu A. U varlat potkanů deficitních na vitamín A (VAD – vitamin A-deficient) byla zkoumána proliferační aktivita spermatogonií typu A před a po podání vitamínu A. Ve většině kanálků VAD varlat se nacházely

pouze Sertoliho buňky a spermatogonie typu A, v menší míře pak spermatocyty ve fázi preleptotene. Očividně došlo ke ztrátě a degeneraci zárodečných buněk. I mezi zbývajícími spermatogoniemi typu A byly nalezeny oslabené buňky. Pomocí značení 5- bromodeoxyuridinem (BrdU), který je svou inkorporací do DNA schopen označit proliferující buňky, bylo zjištěno, že spermatocyty ve fázi preleptotene u VAD varlat byly zastaveny v S fázi buněčného cyklu, aby nedocházelo k zahájení profáze meiózy. Spermatogonie typu A byly u VAD varlat zastaveny již ve fázi G<sub>0</sub> či G<sub>1</sub> stejně jako nediferencované spermatogonie typu A. Po podání vitamínu A došlo k opětovnému nastartování spermatogeneze. Zpočátku byla aktivita spermatogonií typu A na nízké úrovni, pak se ale začaly diferencovat na spermatogonie typu A<sub>1</sub>. Po 24 hodinách došlo k proliferaci těchto buněk v S fázi. Po 48 hodinách se většina začala dělit na spermatogonie typu A<sub>2</sub>. U spermatocytů ve fázi preleptotene docházelo spíše k jejich degeneraci, ale u některých buněk vývoj pokračoval. Vzhledem k tomu, že semenotvorné kanálky obsahovaly jen málo těchto spermatocytů, nejsou zřejmě rozhodujícím buněčným typem pro opětovné zahájení spermatogeneze (van Pelt *et al.* 1995; Lehner *et al.* 2011).

Možností jak obnovit spermatogenezi u varlat VAD myši je i podávání kyseliny retinové (RA – retinoic acid), i když se zpočátku zdálo, že její působení žádný efekt nemá. RA silně stimuluje proliferativní aktivitu spermatogonií typu A. Po několika dnech léčby RA byly ve většině semenotvorných kanálků viděny spermatogonie typu B, spermatocyty ve fázi preleptotene a byly přítomny i spermatocyty ve fázi zygotene. RA je tedy schopna indukovat synchronní proliferaci a diferenciaci spermatogonií typu A na spermatocyty. Opakované podávání RA pak podpořilo vývoj spermatogenních buněk v prodloužené spermatidy (van Pelt and de Rooij 1991).

Další mechanismus regulace diferenciaci byl popsán u dospělých samců myši, kteří byli mutantní v genu pro juvenilní spermatogoniální depleci v homozygotním stavu (*jsd/jsd* – juvenile spermatogonial depletion). U těchto jedinců se prokázala azoospermie a jejich varlata měřila třetinu normální velikosti. Na rozdíl od samců, *jsd/jsd* samice plodné jsou. Pomocí histologických metod bylo u *jsd/jsd* myši ve věku 3-10 týdnů zjištěno, že u nich proběhla jedna vlna spermatogeneze, ale nedošlo k proliferaci spermatogonií typu A na bazální membráně. Následkem toho se v semenotvorných kanálkách objevil malý počet Sertoliho buněk s občasným výskytem buněk spermatogoniálních. Výše zmíněná léčba retinolem (vitaminem A) nebyla u těchto myši úspěšná (Beamer *et al.* 1988). Později byla vyzkoušena léčba antagonistou gonadotropin-releasing hormonu (GnRH-Ag – gonadotropine-releasing hormone antagonist), která způsobila snížení váhy varlat a seminálních váčků a pokles koncentrací intratestikulárního testosteronu. Úbytek váhy byl nejspíše způsoben redukcí Leydigových buněk a ztrátou fluidní sekrece Sertoliho buňkami, které ovlivňují váhu varlete. Ačkoliv léčba GnRH-Ag obnovila u *jsd/jsd* myši spermatogoniální diferenciaci a spermatocyty se mohly dále vyvíjet, nebyly objeveny žádné spermatidy. Tato studie však předpokládala, že spermatogoniální diferenciaci u *jsd/jsd* myši je citlivá na vysoké intratestikulární koncentrace testosteronu a může pokračovat pouze v případě potlačení produkce testosteronu (Matsumiya *et al.* 1999).

Další mechanismus regulace byl zkoumán na potkanech. Jednotliví jedinci byli intoxikováni 2,5-hexanedionem, který jim byl podáván buď v pitné vodě, nebo intraperitoneální injekcí. Drtivá většina histologických řezů varlat ukázala, že došlo k postupnému vyčerpání diferencujících se zárodečných buněk v semenotvorných kanálcích. Nekrózou byly pak nejvíce postiženy prodloužené spermatidy, ale také spermatocyty a kruhové spermatidy. Nejstálejším typem diferencujících se buněk byly spermatogoniální buňky (Boekelheide 1988).

I pozdější studie prokázala, že 2,5-hexanedion indukuje ireverzibilní atrofii varlat, při které zůstávají pouze Sertoliho buňky a spermatogoniální kmenové buňky. Právě po vystavení 2,5-hexanedionem se některé spermatogoniální buňky aktivně dělily a zbývající kmenové buňky zůstaly buď v klidovém stádiu, nebo u nich pomalu probíhal buněčný cyklus. Touto metodou se tedy ověřila přítomnost aktivně se dělící populace kmenových buněk u nevratně poškozených varlat (Allard *et al.* 1995).

Poslední mechanismus regulace diferenciací byl zaznamenán u Lewis x Brown Norway F1 (LBNF1) kmene hybridních potkanů, kteří byli vystaveni gamma záření v dávkách od 2,5 do 6,5 grayů (Gy – jednotka absorbované dávky záření v soustavě SI). V důsledku ozáření došlo k usmrcení radiosenzitivních diferencujících se spermatogonií, a tím k vyčerpání zárodečných buněk. K částečnému obnovení spermatogeneze došlo 4 až 6 týdnů po ozáření, kdy proběhlo obnovení populace zárodečných buněk z přeživších kmenových spermatogonií v semenotvorných kanálcích. Při dávce 2,5 Gy se spermatogeneze udržovala po dobu 60 týdnů, avšak při zvýšených dávkách od 3,5 do 6,5 Gy míra obnovení populace zárodečných buněk klesala. Jádra Sertoliho buněk se po iradiaci morfologicky změnila. Jejich tvar byl cylindrický až trojúhelníkovitý a průměr jader byl významně menší než u kontrolních potkanů. Jedinými spermatogenními buňkami v semenotvorných kanálcích varlat byly spermatogonie typu A, které byly pozorovány jako jednotlivé buňky nebo jako kolonie. Obnova spermatogeneze nebyla úspěšná. Toto selhání ale nebylo způsobeno nedostatkem hormonů, jelikož koncentrace gonadotropinu po ozáření vzrostla a koncentrace testosteronu zůstala stejná jako u kontrolní skupiny potkanů (Kangasniemi *et al.* 1996).

Na LBNF1 potkanech byla také ukázána úspěšná stimulace obnovy spermatogeneze po ozáření pomocí hormonální léčby, konkrétně účinkem GnRH – Ag a testosteronu (Meistrich and Kangasniemi 1997).

V současné době není příliš jasné, jak je diferenciací spermatogoniálních buněk regulována, ale pravděpodobně hrají nejvýznamnější roli Sertoliho buňky. Při všech zmíněných experimentech byla funkce těchto buněk poškozena, což mělo za následek nedostatečnou spermatogenezi. Pouze u W/W myši postrádajících *c-kit* receptor byl problém v odpovědi spermatogoniálních buněk na SCF sekretovaný Sertoliho buňkami (Goossens and Tournaye 2006).

### 4.3.3 Regulace apoptózy

Nádorový supresorový protein *p53* s apoptotickou funkcí a schopností zastavit buněčný cyklus brání replikaci DNA u buněk, které vykazují poškozenou DNA (Bates and Vousden 1996). Tento protein hraje roli v proliferaci spermatogonií a v odpovědi na ozáření. Bylo zjištěno, že během normální spermatogeneze nedochází k expresi *p53* u spermatogoniálních buněk, avšak po dávce 4 Gy rentgenového záření se *p53* ve spermatogoniích prokazatelně vyskytoval. Výsledky experimentů u myši s knock-out v genu *p53* naznačily, že tento protein je důležitý při produkci normálních spermatogoniálních buněk a při odstranění letálně poškozených spermatogonií, stejně tak jako při regulaci apoptózy po poškození DNA ozářením (Beumer *et al.* 1998).

V průběhu normální spermatogeneze je důležitá vlna apoptózy, která udržuje poměr mezi buňkami zárodečné linie a Sertoliho buňkami. U transgenních myši byly zkoumány dopady exprese antiapoptických proteinů Bcl-x<sub>L</sub> či Bcl-2, které způsobily abnormální průběh spermatogeneze doprovázené sterilitou (Rodriguez *et al.* 1997). Dalším antiapoptickým členem genové rodiny Bcl-2 je Bcl-w, který tvoří komplexy s proapoptickými faktory Bax a Bak. Právě poměry mezi Bax/Bcl-w a Bak/Bcl-w jsou rozhodující pro přežití Sertoliho buněk, spermatogonií a spermatocytů (Yan *et al.* 2000).

## 5 INDUKCE DIFERENCIACE TESTIKULÁRNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK *IN VITRO*

Testikulární kmenové buňky s multipotentním či dokonce pluripotentním charakterem byly izolovány u myši a později i u člověka, viz Tab. 1 (Kee *et al.* 2010).

**Tabulka 1/ Výzkum kmenových buněk varlat** (převzato a upraveno dle Kee *et al.* 2010)

Výzkum	Buněčný typ
<i>Myš</i>	
(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> 2004)	Multipotentní kmenová buňka zárodečné linie (mGSC)
(Guan <i>et al.</i> 2006)	Multipotentní adultní kmenová buňka zárodečné linie (maGSC)
(Ko <i>et al.</i> 2009)	Pluripotentní kmenová buňka odvozená ze zárodečné linie (gPSC)
<i>Člověk</i>	
(Conrad <i>et al.</i> 2008)	Lidská adultní kmenová buňka zárodečné linie (haGSC)
(Kossack <i>et al.</i> 2009)	Lidská multipotentní kmenová buňka zárodečné linie (hMGSC)
(Golestaneh <i>et al.</i> 2009)	Lidská pluripotentní buňka podobná ESCs

## 5.1 Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (mGSCs)

Jak již bylo dříve zmíněno, kultura mGSCs založená z varlat juvenilní myši, se v *in vitro* podmínkách dokázala diferencovat do různých linií somatických buněk. Při experimentech byla použita jedna z metod indukce diferenciaci ESCs *in vitro*, kdy se ESCs kokultivují se stromální buněčnou linií OP9. U linie OP9 nedochází k expresi funkčního faktoru stimulujícího kolonie u makrofágů (M-CSF – macrophage colony-stimulating factor), jehož přítomnost inhibuje diferenciaci ESCs v krevní buňky kromě makrofágů. Tato metoda je účinným systémem, jak indukovat diferenciaci ESCs v mezodermální buňky, jako jsou krevní buňky erytroidní, myeloidní a B buněčné linie (hematopoetické) či buňky svalové (Nakano *et al.* 1994).

Nejdříve tedy byly mGSCs přeneseny na OP9 stromální výživnou vrstvu. V průběhu 10 dnů byly pozorovány různé buněčné typy včetně hematopoetických i vaskulárních buněk a spontánně kontrahujících myocytů. K indukci hematopoézy došlo také v případě, kdy byly mGSCs kultivovány v polotekutém médiu z metylcelulózy pro vytvoření embryoidních tělísek. Embryoidní tělíska (EBs – embryoid bodies) jsou trojrozměrná uskupení buněk, která vznikají z kultivovaných ESCs *in vitro* a jsou schopné diferencovat na buňky všech tří zárodečných listů (Dang *et al.* 2002; Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004).

V případě, že byl použit postup pro diferenciaci na buňky neurální linie, mGSCs tvořily neurony a gliové buňky. V menší míře byly nalezeny i dopaminergní neurony. Multipotentní kmenové buňky zárodečné linie byly podobně jako nediferencované ESCs přeneseny na želatinou potažené kultivační misky s N2B27 médiem. N2B27 médium se skládá z média DMEM/F12 a neurobazálního média v poměru 1:1 s přísadou komponenty B27 (směs proteinů, hormonů a vitaminů) a N2 (směs inzulinu, apotransferinu, progesteronu, putrescinu, seleničitanu sodného a hovězího sérového albuminu). K indukci diferenciaci buněk na neurony došlo po použití FGF. Kultury byly nejdříve kultivovány 24 h v médiu N2B27 s přidáním LIF, aby byly poté zjištěny účinky FGF na vznik neurálních prekurzorů.

Ve srovnání s ESCs, kultura mGSCs tvořila více gliových buněk a i významně více kolonií cévních a svalových buněk. Podle předpokladu mGSCs diferencovaly na všechny očekávané buněčné linie (Ying *et al.* 2003; Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004).

## 5.2 Multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie (maGSCs)

V roce 2006 se podařilo izolovat SSCs i z varlat dospělých samců myši, které po kultivaci vykazovaly vlastnosti ESCs. Byly pojmenovány jako multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie (maGSCs – multipotent adult germline stem cells). Jako důkaz, že jsou schopny diferencovat *in*

*in vitro* na deriváty všech tří zárodečných listů, byla pro indukci diferenciaci použita tzv. technika visících kapek (hanging drops technique).

Pomocí této metody, která je standardně používaná pro indukci diferenciaci myších ESCs, byly maGSCs kultivovány jako embryoidní tělíska ve visících kapkách s použitím standardního média doplněného o 20% FBS, L-glutamin, neesenciální aminokyseliny (NEAA – non-essential amino acids) a  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$  - ME).

Kultura maGSCs byla standardně kultivována v médiu bez LIF a 2 x pasážována. Poté bylo asi 400 buněk v 20  $\mu$ l diferenciačního média umístěno na víčka Petriho misek naplněných PBS pro zachování humidity a inkubovány jako visící kapky po dobu 2 dnů. Následně byly buňky v kapkách přeneseny do média v Petriho miskách určených pro bakterie (zabránění adheze buněk k plastu) a kultivovány po dobu dalších 3 dnů. Pátý den byla jednotlivá EBs přenesena na různé druhy kultivačních nádob, jejichž povrch byl vždy potažený želatinou a následovala série analýz jako morfologická analýza, imunocytochemie a nakonec polymerázová řetězová reakce spjatá s reverzní transkripcí (RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcription).

Pomocí RT-PCR byla potvrzena diferenciaci maGSCs v mezodermální linii zahrnující srdeční a kosterní svalové buňky či vaskulární buňky, kdy byly zjištěny exprese raného mezodermálního markeru *brachyury*.

V případě, že došlo k neuroektodermální diferenciaci, byla pozitivní exprese nestinu, markeru pro neuroepiteliální prekuzory, a dále markerů pro neurony: synaptofysinu, tyrosin hydroxylázy a dopaminového receptoru 2 (*Drd2*). Během diferenciaci EBs byly viděny dokonce i buňky s fenotypem charakteristickým pro hepatocyty (Guan *et al.* 2006).

### **5.3 Pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie (gPSCs)**

Možnost odvodit pluripotentní buňky z unipotentních GSCs (SSCs) varlat dospělých myší byla nezávisle potvrzena v roce 2009. Tyto buňky byly nazvány jako pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie (gPSCs – germline-derived pluripotent stem cells) a jejich výzkum u nich prokázal vlastnosti ESCs, tedy *in vitro* a *in vivo* diferenciaci, tvorbu teratomů a chimér zárodečných linií nebo expresi specifických genových markerů pluripotence.

Pro *in vitro* diferenciaci gPSCs v kardiomyocyty a neurální buňky byla použita EBs z gPSCs, která byla dále kultivována.

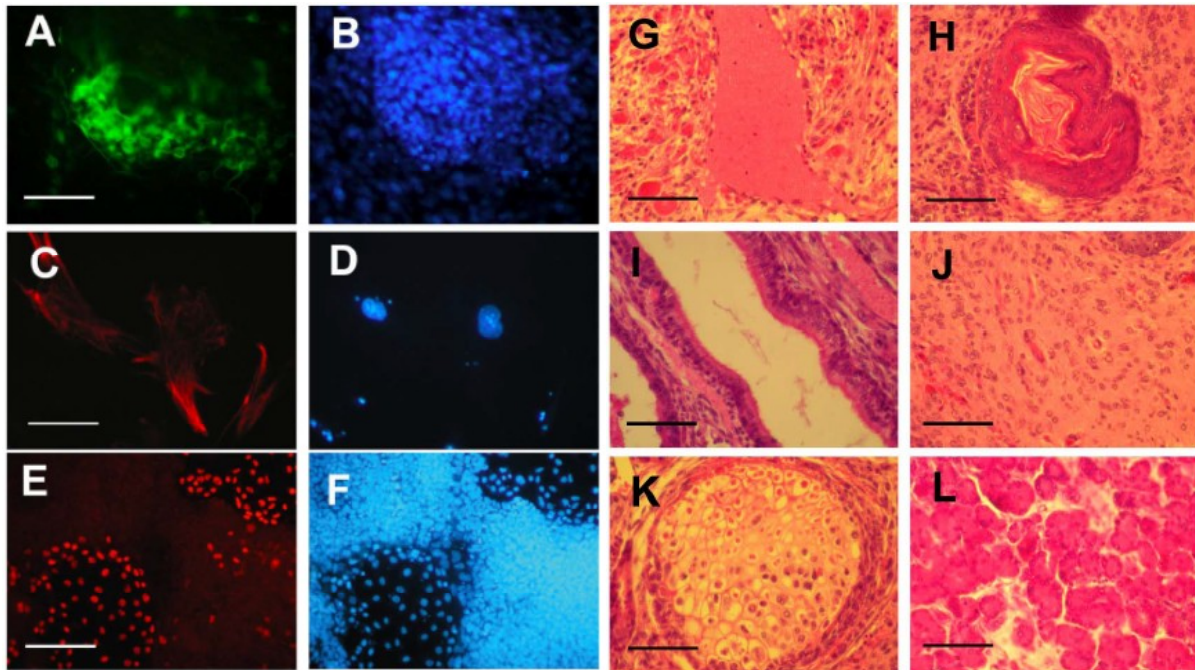
Při neurální diferenciaci byly gPSCs přeneseny do definovaného média pro přežití neurálních prekuzorů odvozených z ESCs, tudíž byly kultivovány na  $\gamma$ -ozářených embryonálních fibroblastech v DMEM médiu (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium) obsahující 20% FBS,  $\beta$  – ME, nukleosidy, NEAA a lidský rekombinantní LIF. Poté byly přeneseny na kultivační misky potažené želatinou, kde se shlukovaly a v nepřítomnosti LIF vytvořily EBs. Čtyřdenní EBs byly kultivovány po

dobu 5 dní v médiu ITSFn (DMEM/F12 doplněný o inzulin, transferin, chlorid seleničitý a fibronectin). Buňky byly poté disociovány pomocí trypsinu, přeneseny na misky potažené polyornithinem a kultivovány v médiu DMEM/F12 doplněným o inzulin, transferin, progesteron, putrescin, chlorid seleničitý, bFGF a laminin. Po 5 dnech byly buňky seškrábány v HBSS (Hank's balanced salt solution) zbaveného vápníku a hořčíku a resuspendovány na jednobuněčnou suspenzi.

Neurální prekurzory odvozené z gPSCs byly poté kultivovány v přítomnosti bFGF a epidermálního růstového faktoru (EGF – epidermal growth factor) a následně 4 dny v přítomnosti bFGF a růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (PDGF – platelet-derived growth factor). Druhá zmíněná kombinace růstových faktorů je známa svým účinkem na proliferaci prekurzorů gliových buněk. Diferenciace v oligodendrocyty a astrocyty byla indukována odstraněním růstových faktorů a přidáním trijódthyroninu a kyseliny askorbové (Brüstle *et al.* 1999; Ko *et al.* 2009).

Experimenty pro diferenciaci v kardiomyocyty byly opět zahájeny produkcí EBs z gPSCs, které byly kultivovány metodou visících kapek v médiu DMEM doplněného o 20% FBS, 1% minimální esenciální médium (MEM – minimal essential medium), glutamax, penicilin, streptomycin a  $\beta$  – ME. Embryoidní tělíska pak byla přenesena na želatinou potažené kultivační misky a mikroelektrodová pole pro extracelulární snímání, dále do kultivačních destiček pro metodu terčíkového zámku (patch-clamp) a na skleněná krycí sklíčka pro konfokální mikroskopii.

V kultuře byly pozorovány buňky pozitivní na Flk1, marker mezodermální buněčné linie, na Tuj1, neuronální marker a také na  $\alpha$ -fetoprotein, marker specifický pro hepatocyty. Po injekci gPSCs do 6 týdenní atymické myši gPSCs tvořily teratomy, které obsahovaly buňky všech tří zárodečných listů (Obr. 5) (Igelmund *et al.* 1999; Ko *et al.* 2009).



**Obr. 5** *In vitro* a *in vivo* diferenciacie gPSCs. **A a B**) Neuronální diferenciacie gPSCs. Neurony pozitivní na Tuj1 (A) s barvením jader pomocí DAPI (B). **C a D**) Imunofluorescenční barvení markeru raných mezodermálních buněčných prekursorů Flk1 (C) s DAPI (D). **E a F**) Buňky v kultuře gPSCs pozitivní na  $\alpha$ -fetoprotein (E) s DAPI (F). **G - L**) Teratomy obsahující buňky všech tří zárodečných listů: mezoderm (krev a sval: G), endoderm (pankreat: L a respirační epitel: I) a ektoderm (mazová žláza: K, kůže: H a mozek: J) (převzato a upraveno dle Ko *et al.* 2009)

#### 5.4 Lidské adultní kmenové buňky zárodečné linie (haGSCs)

Úspěšně byly izolovány i spermatogoniální buňky z lidské testikulární tkáně, které po kultivaci vykazovaly vlastnosti lidských ESCs a byly označeny jako lidské adultní kmenové buňky zárodečné linie (haGSCs – human adult germline stem cells). K indukci diferenciacie haGSCs *in vitro* byly použity metody pro myogenní, osteogenní, pankreatickou a neurální diferenciaci lidských ESCs.

Pro myogenní diferenciaci byla použita technika visících kapek, která ukázala po imunofluorescenčním barvení pozitivní buňky na  $\alpha$ -aktinin a  $\alpha$ -aktin hladké svaloviny (ASMA –  $\alpha$ -smooth-muscle actin). Pomocí RT-PCR byla poté prokázána exprese myoD, Gata4, cTNT a ASMA, tzn. genů typických pro buňky svaloviny (Maltsev *et al.* 1993).

Při pokusech o osteogenní diferenciaci byla také vytvořena EBs a médium bylo doplněno o  $\beta$ -glycerofosfát a dexametazon. Konkrétně dexametazon měl velký vliv na expresi transkripčního faktoru runx2, který je nezbytný pro diferenciaci v osteoblasty, a dále i na expresi proteinů kostní tkáně osteokalcin a osteopontin (Bielby *et al.* 2004).

I když má slinivka břišní a centrální nervový systém odlišný původ a funkce, jejich vývoj je regulován podobnými mechanismy. Na základě těchto podobností vznikla hypotéza, že způsob,



kterým jsou indukovány neurální buňky z ESCs, je možno adaptovat na endokrinní pankreatické buňky. Proto byla exprese endokrinních pankreatických genů zkoumána na buněčných populacích pozitivních na nestin. Tímto způsobem byla indukována diferenciaci i haGSCs *in vitro*. Nejdříve byly nestin-pozitivní buňky pocházející z EBs kultivovány v médiu ITSFn, ve kterém většina jiných buněk odumírá. Poté bylo médium doplněno o N2, B27 a bFGF a byla snížena koncentrace glukózy. Poté byl bFGF odebrán a naopak byl do média přidán nikotinamid, který způsobil zvýšení počtu pankreatických endokrinních buněk. Výsledkem byla produkce shluků buněk exprimujících inzulin. Pomocí RT-PCR byla posléze v diferencovaných buňkách prokázána zvýšená exprese genů specifických pro  $\beta$ -buňky, jako jsou např. inzulin a *Isl1*, glukagon či neurogenin 3 (Ngn3) (Lumelsky *et al.* 2001; Segev *et al.* 2004).

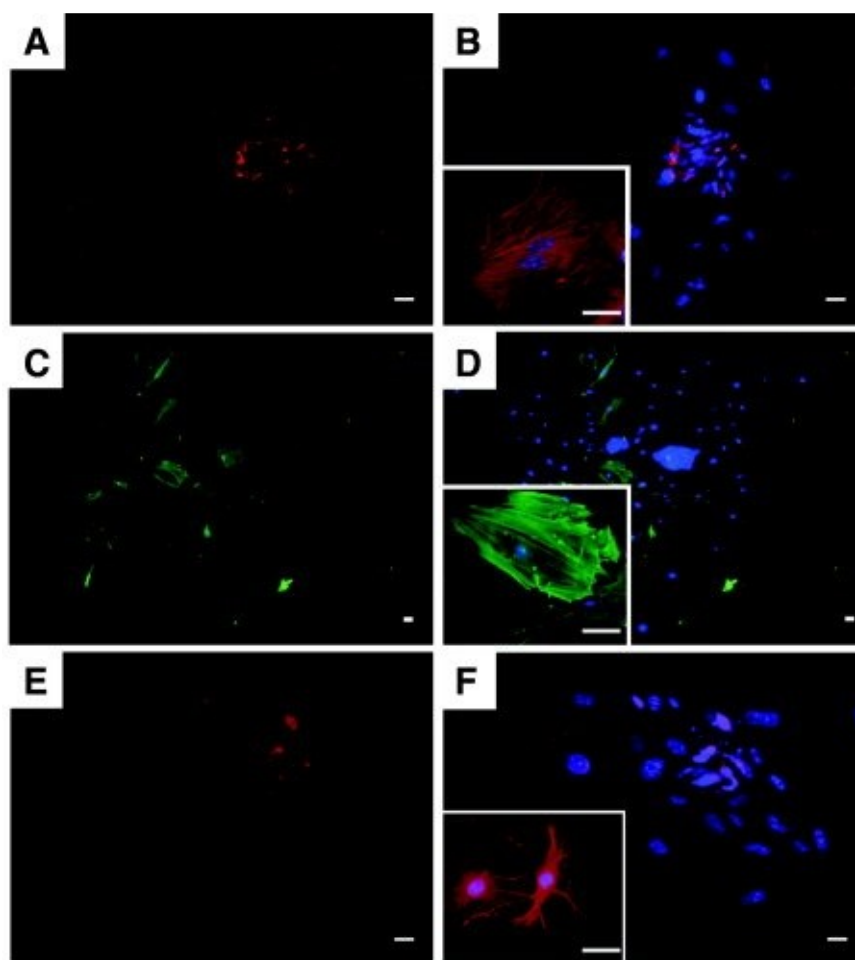
V experimentech o neurální diferenciaci byla vytvořena EBs poté, co haGSCs byly přeneseny na neadherentní povrch misek určených pro bakterie se standardním médiem pro ESCs, které však bylo bez LIF a obsahovalo pouze 10% FBS. Takto byly buňky inkubovány 10 dní a médium bylo měněno každé 2 dny. Po 4 dnech byla do média přidána kyselina retinová. EBs byly poté odděleny a buňky přeneseny na destičky potažené poly-D-lysinem a lamininem v N2 médiu. V tomto stádiu měla většina prekurzorových buněk vřetenovitý tvar. Po 48 hodinách bylo přidáno diferenciacní médium DMEM se suplementy. Pomocí RT-PCR pak byla prokázána exprese neurálního markeru NF (neurofilament), map-2 a GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Bibel *et al.* 2004; Conrad *et al.* 2008).

## 5.5 Lidské multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (hMGSCs)

Lidské kmenové buňky s pluripotentním charakterem byly také získány derivací SSCs z biopsie varlat. Byly označeny jako lidské multipotentní kmenové buňky zárodečné linie (hMGSCs – human multipotent germline stem cells).

Pro vytvoření EBs byly hMGSCs, před přenesením na misky disociovány pomocí trypsinu, následně neutralizovány KSR médiem (knockout DMEM médium doplněné o 20% FBS, L-glutamin, NEAA,  $\beta$  – ME a rekombinantní lidský bFGF) a třikrát promyty diferenciacním médiem (knockout DMEM doplněný o 20% FBS, L-glutamin, NEAA a  $\beta$  – ME). Analýzou exprese specifických genů a proteinů pro ektoderm, endoderm a mezoderm byla prokázána schopnost hMGSCs spontánně diferencovat *in vitro* v deriváty všech tří zárodečných listů. S postupující diferenciací se exprese pluripotentního markeru *OCT4* snižovala, zatímco se zvyšovala exprese somatických markerů *MSI1* (ektodermální marker), *GATA4* (endodermální marker) a *KDR* (mezodermální marker). Ve srovnání s kontrolní populací lidských ESCs se naopak snižovala exprese běžně užívaného ektodermálního markeru *NCAM*. I když byl zpočátku tento jev nečekaný, bližší zkoumání ukázala, že *NCAM* je exprimován v buňkách samčí zárodečné linie a u SSCs může fungovat jako receptor pro GDNF.

Vzhledem k tomu, že byla zjištěna exprese specifických genů na úrovni mRNA, dalším krokem byla analýza exprese markerů na úrovni proteinů pomocí imunofluorescenčního barvení (Obr. 6). Po 7 dnech diferenciaci *in vitro* byly hMGSCs pozitivní na von Willebrandův faktor (VWF) specifický pro endoderm, ASMA, který je typický pro buňky hladké svaloviny (mezoderm), a na nestin (NES), který je exprimován v raných embryonálních neuroepiteliálních kmenových buňkách (ektoderm) (Kossack *et al.* 2009).



**Obr. 6** Imunofluorescenční barvení hMGSCs po 7 dnech diferenciaci *in vitro*. EBs byly hodnoceny pro expresi proteinů (A) von Willebrand faktor (VWF) (B) VWF s barvením jader pomocí DAPI (C)  $\alpha$ -aktin hladké svaloviny (ASMA) (D) ASMA s DAPI (E) nestin (NES) (F) NES s DAPI (převzato a upraveno dle Kossack *et al.* 2009).

## 5.6 Lidské pluripotentní buňky podobné ESCs

Golestaneh *et al.* (2009) izolovali lidské zárodečné buňky z testikulární tkáně a po 4 dnech kultivace získali malé kolonie buněk podobných ESCs. Z každého gramu tkáně obdrželi zhruba

250 000 pluripotentních buněk. Pro zahájení *in vitro* diferenciaci byly tyto pluripotentní buňky nejdříve disociovány trypsinem a poté byla použita k tvorbě EBs opět technika visících kapek. Buňky byly tedy kultivovány v DMEM médiu s vysokým obsahem glukózy doplněného o 20% FBS, L-glutamin, NEAA, penicilin/streptomycin a  $\beta$  – ME.

Při experimentech o diferenciaci v endodermální linii byla EBs nejdříve přenesena do destiček obsahujících médium ITSFn s glutaminem. Po 7 dnech kultivace byla EBs přemístěna na krycí sklíčka potažená želatinou a byla kultivována v přítomnosti média N2B27 doplněného o glutamin a bFGF. Vznikající shluky buněk byly poté kultivovány 12 h v médiu N2B27 doplněného o glukózu, glutamin a nikotinamid. Krycí sklíčka s buňkami byla posléze použita na imunofluorescenční barvení s použitím protilátek proti inzulinu. Diferenciaci v endodermální linii byla potvrzena expresí raného endodermálního markeru cytokeratinu-18 a také produkcí inzulinu pankreatickými endodermálními buňkami odvozenými z EBs po 25 dnech od zahájení diferenciaci *in vitro*.

Pro diferenciaci v mezodermální srdeční buňky byla EBs přenesena po 2 dnech kultivace z visících kapek do suspenzní kultury v Petriho miskách určených pro bakterie, které obsahovaly diferenciacní médium. Po 5 denní kultivaci byla EBs přemístěna na krycí sklíčka kultivována v DMEM médiu s přídatkem 20% FBS a cardiogenu-C. Mezodermální buněčná linie byla potvrzena expresí *BMP4*, myoglobinu a transkripčních faktorů specifických pro srdeční svalovinu *GATA4*, *NKX2.5* a *MEF2C*. Dále byl také exprimován transkripční faktor specifický pro kosterní svalovinu *MYOD1*. Diferenciaci na buňky hladké svaloviny a vaskulární endoteliální buňky byla potvrzena expresí *ASMA* (*ACTA2*), adhezní molekulou endoteliálních buněk a krevních destiček 1 (*PECAMI* – platelet-endothelial-cell adhesion molecule 1) a *VWF*.

Pro diferenciaci v ektodermální neurální linii byla EBs opět přenesena z visících kapek do suspenzní kultury kultivované v bakteriologických Petriho miskách s médiem DMEM/F12 obohaceného o 15% FBS, lidský rekombinantní bFGF,  $\beta$  – ME a RA. Diferencující se EBs byla poté přemístěna do destiček a kultivována v přítomnosti média DMEM/F12 doplněného o 15% FBS, bFGF, EGF. Po 2 denní kultivaci byla z média odstraněna RA a buňky byly kultivovány další 2 týdny. Neuroektodermální diferenciaci EBs byla charakterizována expresí genů *NES*, *SYP* a *DRD2*.

Lidské pluripotentní buňky podobné ESCs byly schopny se shlukovat a tvořit EBs technikou visících kapek i v suspenzní kultuře. EBs podrobená analýze exprese specifických genů a proteinů během *in vitro* diferenciaci potvrdila schopnost diferencovat v deriváty všech tří zárodečných listů (Golestaneh *et al.* 2009).

## 6 ZÁVĚR

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se indukce diferenciac testikulárních kmenových buněk *in vitro* u savců.

Testikulární kmenové buňky jsou nediferencované buňky odpovědné za vznik buněk spermatogenních a je důležité zmínit, že jejich podskupinou jsou spermatogoniální kmenové buňky zachovávající spermatogenezi v průběhu reprodukčního období jedince.

Výzkumy, které se zabývají indukcí diferenciac testikulárních kmenových buněk *in vitro*, poukázaly na možnost izolovat spermatogoniální kmenové buňky z varlat a indukovat u nich pluripotentní či multipotentní potenciál. Takto kultivované buňky vykazovaly vlastnosti embryonálních kmenových buněk jako např. expresi pluripotentních markerů *Oct4 (Pou5f1)* a *Nanog*, které jsou nezbytné pro zachování nediferencovaného stavu embryonálních kmenových buněk. Výjimkou byly pouze studie o gPSCs a hMGSCs, u kterých tato exprese nebyla detekována a tudíž lze předpokládat, že se jedná o multipotentní kmenové buňky. Vlastnosti testikulárních kmenových buněk umožnily jejich diferenciaci na buňky ektodermu, mezodermu a entodermu za podmínek výše uvedených diferenciacních technik.

Výzkumy posledních let přinesly některé další výsledky. V roce 2013 byla zkoumána expanze a diferenciac gPSCs na speciálních biomateriálech, které mohou inhibovat, podporovat nebo navodit proliferaci či diferenciaci kmenových buněk. Prokázalo se například, že jeden ze syntetických polymerů podporuje kardiomyogenní diferenciaci *in vitro* (Hoss *et al.* 2013). V roce 2014 byla také potvrzena indukce diferenciac *in vitro* u izolovaných kmenových buněk zárodečné linie odvozených z dospělých myších varlat (Kim *et al.* 2014). V témže roce došlo též k vytvoření hepatických buněk z kultury maGSCs (Streckfuss-Bömeke *et al.* 2014).

Vytvořením nového zdroje pluripotentních kmenových buněk umožňuje předejít kontroverznímu použití lidských embryonálních kmenových buněk v buněčných terapiích a také zamezit imunologickým problémům spojenými s autotransplantacemi. *In vitro* diferenciac testikulárních kmenových buněk na různé buněčné typy všech tří zárodečných listů otevírá nové možnosti, jak ve výzkumu kmenových buněk, tak v možnostech léčby sahajících od diabetu přes traumata páteřní míchy.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

<b>A<sub>al</sub></b>	type A-aligned spermatogonium	uspořádané spermatogonium typu A
<b>A<sub>dark</sub>; A<sub>d</sub></b>	type A-dark spermatogonium	tmavé spermatogonium typu A
<b>A<sub>pale</sub>; A<sub>p</sub></b>	type A-pale spermatogonium	světlé spermatogonium typu A
<b>A<sub>pr</sub></b>	type A-paired spermatogonium	párové spermatogonium typu A
<b>A<sub>s</sub></b>	type A-stem spermatogonium	kmenové (oddělené) spermatogonium typu A
<b>ACTA2</b>	$\alpha$ -smooth-muscle actin	$\alpha$ -aktin hladké svaloviny
<b>ASMA</b>	$\alpha$ -smooth-muscle actin	$\alpha$ -aktin hladké svaloviny
<b><math>\beta</math> - ME</b>	$\beta$ - mercaptoethanol	$\beta$ - merkaptoetanol
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor	bazický fibroblastový růstový faktor
<b>BMP4</b>	bone morphogenetic protein 4	kostní morfogenetický protein 4
<b>DAPI</b>	4,6 – diamidino-2-phenylindole	4,6 – diamidin-2-fenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium	
<b>dpc</b>	day post coitum	den po oplození
<b>Drd2</b>	dopamine receptor 2	dopaminový receptor 2
<b>EBs</b>	embryoid bodies	embryoidní tělíska
<b>ECCs</b>	embryonal carcinoma cells	embryonální buňky karcinomu
<b>EGCs</b>	embryonic germ cells	embryonální zárodečné buňky
<b>EGF</b>	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
<b>ESCs</b>	embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
<b>FBS</b>	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
<b>FSH</b>	follicle-stimulating hormone	folikuly stimulující hormon
<b>GDNF</b>	glial cell line-derived neurotrophic factor	neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein	gliální fibrilární acidický protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
<b>GM-CSF</b>	granulocyte macrophage-colony stimulating factor	granulocytový-makrofágový faktor stimulující kolonie
<b>GnRH-Ag</b>	gonadotropine-releasing hormone antagonist	antagonista gonadotropin-releasing hormonu
<b>gPSCs</b>	germline-derived pluripotent stem cells	pluripotentní kmenové buňky odvozené ze zárodečné linie
<b>GSK3</b>	glycogen synthase kinase 3	glykogen syntáza kináza 3
<b>Gy</b>	gray	gray - jednotka absorbované dávky záření v soustavě SI
<b>haGSCs</b>	human adult germline stem cells	lidské adultní kmenové buňky zárodečné linie
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution	
<b>hMGSCs</b>	human multipotentnt germline stem cells	lidské multipotentní kmenové buňky zárodečné linie

<b>ITSFn</b>	DMEM/F12 supplemented with insulin, transferrin, selenium choride and fibronectin	DMEM/F12 doplněný o inzulin, transferin, chlorid seleničitý a fibronektin
<b><i>jsd/jsd</i></b>	juvenile spermatogonial depletion	juvenilní spermatogoniální deplece
<b>LH</b>	luteinizing hormone	luteinizační hormon
<b>LIF</b>	leukemia inhibitory factor	leukemický inhibiční faktor
<b>maGSCs</b>	multipotent adult germline stem cells	multipotentní adultní kmenové buňky zárodečné linie
<b>M-CSF</b>	macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie u makrofágů
<b>MEM</b>	minimal essential medium	minimální esenciální médium
<b>mGSCs</b>	multipotent germ line stem cells	multipotentní kmenové buňky zárodečné linie
<b>NEAA</b>	non-essential amino acids	neesenciální aminokyseliny
<b>NES</b>	nestin	nestin
<b>NF</b>	neurofilament	neurofilament
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor	růstový faktor odvozený z krevních destiček
<b>PECAM1</b>	platelet-endothelial-cell adhesion molecule 1	adhezní molekula endoteliálních buněk a krevních destiček
<b>PGCs</b>	primordial germ cells	primordiální zárodečné buňky
<b>RA</b>	retinoic acid	retinová kyselina
<b>RT-PCR</b>	polymerase chain reaction with reverse transcription	polymerázová řetězová reakce spjatá s reverzní transkripcí
<b>SCF</b>	stem cell factor	faktor kmenových buněk, ligand <i>c-kit</i>
<b>SSCs</b>	spermatogonial stem cells	spermatogoniální kmenové buňky
<b>SYP</b>	synaptophysin	synaptofysin
<b>TSCs</b>	testicular stem cells	testikulární kmenové buňky
<b>VAD</b>	vitamin A-deficient	Deficitní na vitamin A
<b>VWF</b>	von Willebrand factor	von Willebrandův faktor
<b>W</b>	white spotting locus	lokus dominantní bílé strakatosti

## 8 SEZNAM LITERATURY

- Alison, MR, and S Islam. 2009. "Attributes of Adult Stem Cells." *The Journal of Pathology* (November 2008): 144–160.
- Allard, Elizabeth K, Susan J Hall, and Kim Boekelheide. 1995. "Stem Cell Kinetics in Rat Testis after Irreversible Injury Induced by 2,5-Hexanedione." *Biology of Reproduction* 53 (1): 186–92.
- Bates, Stewart, and Karen H. Vousden. 1996. "p53 in Signaling Checkpoint Arrest or Apoptosis." *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (1) (February): 12–18.
- Beamer, Wesley G, Terrie L Cunliffe-Beamer, Kathryn L Shultz, Stephen H Langley, and Thomas H Roderick. 1988. "Juvenile Spermatogonial Depletion (jsd): A Genetic Defect of Germ Cell Proliferation of Male Mice." *Biology of Reproduction* 38 (4): 899–908.
- Beddington, R S P, and E J Robertson. 1989. "An Assessment of the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo." *Development (Cambridge, England)* 105 (4) (April): 733–7.
- Beumer, Tim L, Hermien L Roepers-Gajadien, Iris S Gademan, Paul P W van Buul, Gabriel Gil-Gomez, Derek H Rutgers, and Dirk G de Rooij. 1998. "The Role of the Tumor Suppressor p53 in Spermatogenesis." *Cell Death and Differentiation* 5 (8) (August): 669–77.
- Bibel, Miriam, Jens Richter, Katrin Schrenk, Kerry Lee Tucker, Volker Staiger, Martin Korte, Magdalena Goetz, and Yves-Alain Barde. 2004. "Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into a Defined Neuronal Lineage." *Nature Neuroscience* 7 (9) (September): 1003–9.
- Bielby, Robert C, Aldo R Boccaccini, Julia M Polak, and Lee DK Buttery. 2004. "In Vitro Differentiation and in Vivo Mineralization of Osteogenic Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells." *Tissue Engineering* 10 (9): 1518–1525.
- Boekelheide, Kim. 1988. "Rat Testis during 2, 5-Hexanedione Intoxication and Recovery: I. Dose Response and the Reversibility of Germ Cell Loss." *Toxicology and Applied Pharmacology* 92 (1) (January): 18–27.
- Brüstle, Oliver, Kimberly N Jones, Randall D Learish, Khalad Karram, Khalid Choudhary, Otmar D Wiestler, Ian D Duncan, and Ronald D G McKay. 1999. "Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants." *Science* 285 (5428): 754–756.
- Clermont, Yves, and Eduardo Bustos-Obregon. 1968. "Re-Examination of Spermatogonial Renewal in the Rat by Means of Seminiferous Tubules Mounted 'in Toto.'" *American Journal of Anatomy* 122 (2) (March 1): 237–247.
- Clermont, Yves, and CP Leblond. 1959. "Differentiation and Renewal of Spermatogonia in the Monkey, Macacus Rhesus." *American Journal of Anatomy* 104 (2): 237–273.
- Conrad, Sabine, Markus Renninger, Jörg Hennenlotter, Tina Wiesner, Lothar Just, Michael Bonin, Wilhelm Aicher, *et al.* 2008. "Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Testis." *Nature* 456 (7220) (November 20): 344–9.

- Dang, Stephen M, Michael Kyba, Rita Perlingeiro, George Q Daley, and Peter W Zandstra. 2002. "Efficiency of Embryoid Body Formation and Hematopoietic Development from Embryonic Stem Cells in Different Culture Systems." *Biotechnology and Bioengineering* 78 (4): 442–453.
- De Rooij, D G, and J M Janssen. 1987. "Regulation of the Density of Spermatogonia in the Seminiferous Epithelium of the Chinese Hamster: I. Undifferentiated Spermatogonia." *The Anatomical Record* 217 (2) (February): 124–30.
- De Rooij, D G, and D Lok. 1987. "Regulation of the Density of Spermatogonia in the Seminiferous Epithelium of the Chinese Hamster: II. Differentiating Spermatogonia." *The Anatomical Record* 136: 131–136.
- Dirami, Ghenima, Neelakanta Ravindranath, Vernon Pursel, and Martin Dym. 1999. "Effects of Stem Cell Factor and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on Survival of Porcine Type A Spermatogonia Cultured in KSOM." *Biology of Reproduction* 61 (1): 225–30.
- Donovan, Peter J. 1998. "The Germ Cell - the Mother of All Stem Cells." *The International Journal of Developmental Biology* 42 (7) (January): 1043–50.
- Dym, Martin, and Yves Clermont. 1970. "Role of Spermatogonia in the Repair of the Seminiferous Epithelium Following X-Irradiation of the Rat Testis." *The American Journal of Anatomy* 128 (3): 265–82.
- Ehmcke, Jens, Joachim Wistuba, and Stefan Schlatt. 2006. "Spermatogonial Stem Cells: Questions, Models and Perspectives." *Human Reproduction Update* 12 (3): 275–82.
- Evans, M J, and M H Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292: 154–6.
- Golestaneh, Nady, Maria Kokkinaki, Disha Pant, Jiji Jiang, David DeStefano, Carlos Fernandez-Bueno, Janice D Rone, Bassem R Haddad, G Ian Gallicano, and Martin Dym. 2009. "Pluripotent Stem Cells Derived from Adult Human Testes." *Stem Cells and Development* 18 (8) (October): 1115–26.
- Goossens, E., V Frederickx, G De Block, A C Van Steirteghem, and H Tournaye. 2003. "Reproductive Capacity of Sperm Obtained after Germ Cell Transplantation in a Mouse Model." *Human Reproduction* 18 (9) (September 1): 1874–1880.
- Goossens, Ellen, and Herman Tournaye. 2006. "Testicular Stem Cells." *Seminars in Reproductive Medicine* 24 (5): 370–378.
- Guan, Kaomei, Karim Nayernia, Lars. S. Maier, Stefan Wagner, Ralf Dressel, Jae Ho Lee, Jessica Nolte, *et al.* 2006. "Pluripotency of Spermatogonial Stem Cells from Adult Mouse Testis." *Nature* 440 (27): 1199–1203.
- Hoss, Mareike, Tomo Šarić, Bernd Denecke, Gabriel Peinkofer, Manfred Bovi, Jürgen Groll, Kinarm Ko, *et al.* 2013. "Expansion and Differentiation of Germline-Derived Pluripotent Stem Cells on Biomaterials." *Tissue Engineering. Part A* 19 (9-10): 1067–1080.
- Hu, Valerie W, Gavin E Black, Armida Torres-Duarte, and Fred P Abramson. 2002. "3H-Thymidine Is a Defective Tool with Which to Measure Rates of DNA Synthesis." *The FASEB Journal* 16 (11): 1456–1457.



- Huckins, Claire. 1971. "The Spermatogonial Stem Cell Population in Adult Rats. I. Their Morphology, Proliferation and Maturation." *The Anatomical Record* 169 (3) (March 1): 533–557.
- Hudson, QJ, TM Kulinski, SP Huetter, and DP Barlow. 2010. "Genomic Imprinting Mechanisms in Embryonic and Extraembryonic Mouse Tissues." *Heredity* 105 (1): 45–56.
- Chen, Haolin, Ren-Shan Ge, and Barry R Zirkin. 2009. "Leydig Cells: From Stem Cells to Aging." *Molecular and Cellular Endocrinology* 306 (1-2) (July 10): 9–16.
- Igelmund, Peter, Bernd K Fleischmann, Ivo R Fischer, Julia Soest, Oleksii Gryshchenko, Michaela M Böhm-Pinger, Heinrich Sauer, Qinghua Liu, and Jürgen Hescheler. 1999. "Action Potential Propagation Failures in Long-Term Recordings from Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Tissue Culture." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 437 (5) (April): 669–79.
- Jaenisch, Rudolf, and Richard Young. 2008. "Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming." *Cell* 132 (4) (February 22): 567–82.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Kimiko Inoue, Jiyoung Lee, Momoko Yoshimoto, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Shiro Baba, *et al.* 2004. "Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis." *Cell* 119 (7) (December 29): 1001–12.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Hiromi Miki, Atsuo Ogura, Shinya Toyokuni, and Takashi Shinohara. 2003. "Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells." *Biology of Reproduction* 69 (2) (August): 612–6.
- Kangasniemi, Marko, Ilpo Huhtaniemi, and Marvin L Meistrich. 1996. "Failure of Spermatogenesis to Recover despite the Presence of a Spermatogonia in the Irradiated LBNF1 Rat." *Biology of Reproduction* 54 (6) (June): 1200–8.
- Kee, Kehkooi, Renee A Reijo-Pera, and Paul J Turek. 2010. "Testicular Germline Stem Cells." *Nature Reviews. Urology* 7 (2) (February): 94–100.
- Keros, Victoria, Björn Rosenlund, Kjell Hultenby, Lusine Aghajanova, Lev Levkov, and Outi Hovatta. 2005. "Optimizing Cryopreservation of Human Testicular Tissue: Comparison of Protocols with Glycerol, Propanediol and Dimethylsulphoxide as Cryoprotectants." *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (6) (June): 1676–87.
- Kerr, Candace L, Michael J Shambloott, and John D Gearhart. 2006. "Pluripotent Stem Cells from Germ Cells." *Methods in Enzymology* 419 (January): 400–26.
- Kim, Bang-Jin, Yong-An Lee, Yong-Hee Kim, Ki-Jung Kim, Mi-Seon Jung, Seung-Jung Ha, Hyun-Gu Kang, *et al.* 2014. "Establishment of Adult Mouse Testis-Derived Multipotent Germ Line Stem Cells and Comparison of Lineage-Specific Differentiation Potential." *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11 (2) (February 22): 121–130.
- Kluin, Ph M, and D G de Rooij. 1981. "A Comparison between the Morphology and Cell Kinetics of Gonocytes and Adult Type Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse." *International Journal of Andrology* 4 (4) (August): 475–93.

- Ko, Kinarm, Natalia Tapia, Guangming Wu, Jeong Beom Kim, Marcos J Araúzo Bravo, Philipp Sasse, Tamara Glaser, *et al.* 2009. "Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells." *Cell Stem Cell* 5 (1) (July 2): 87–96.
- Koshimizu, Uichi, Ken Sawada, Youichi Tajima, Daisuke Watanabe, and Yoshitake Nishimune. 1991. "White-Spotting Mutations Affect the Regenerative Differentiation of Testicular Germ Cells: Demonstration by Experimental Cryptorchidism and Its Surgical Reversal." *Biology of Reproduction* 648: 642–648.
- Kossack, Nina, Juanito Meneses, Shai Shefi, Ha Nam Nguyen, Shawn Chavez, Cory Nicholas, Joerg Gromoll, Paul J Turek, and Renee A Reijo-Pera. 2009. "Isolation and Characterization of Pluripotent Human Spermatogonial Stem Cell-Derived Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (1) (January): 138–49.
- Kubota, Hiroshi, Mary R Avarbock, and Ralph L Brinster. 2004. "Growth Factors Essential for Self-Renewal and Expansion of Mouse Spermatogonial Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47) (November 23): 16489–94.
- Lawson, K. A., and W. J. Hage. 1994. "Clonal Analysis of the Origin of Primordial Germ Cells in the Mouse." *Germline Development* 165: 68–84.
- Lehner, Bernadette, Beatrice Sandner, Julia Marschallinger, Christine Lehner, Tanja Furtner, Sebastien Couillard-Despres, Francisco J Rivera, *et al.* 2011. "The Dark Side of BrdU in Neural Stem Cell Biology: Detrimental Effects on Cell Cycle, Differentiation and Survival." *Cell and Tissue Research* 345 (3) (September): 313–28.
- Liu, Chia-feng, Ivraym Barsoum, Rupesh Gupta, Marie-Claude Hofmann, and Humphrey Hung-chang Yao. 2009. "Stem Cell Potential of the Mammalian Gonad." *Frontiers in Bioscience, Elite* 1E (2): 510–518.
- Lumelsky, Nadya, Olivier Blondel, Pascal Laeng, Ivan Velasco, Rea Ravin, and Ron McKay. 2001. "Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets." *Science (New York, N.Y.)* 292 (5520) (May 18): 1389–94.
- Maekawa, Mamiko, Kyoko Kamimura, and Toshio Nagano. 1996. "Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function." *Archives of Histology and Cytology* 59 (1): 1–13.
- Maltsev, Victor A, Jürgen Rohwedel, Jürgen Hescheler, and Anna M Wobus. 1993. "Embryonic Stem Cells Differentiate in Vitro into Cardiomyocytes Representing Sinusnodal, Atrial and Ventricular Cell Types." *Mechanisms of Development* 44 (1) (November): 41–50.
- Martin, Gail R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12) (December): 7634–8.
- Matsui, Yasuhisa, Krisztina Zsebo, and Brigid L M Hogan. 1992. "Derivation of Pluripotential Embryonic Stem Cells from Murine Primordial Germ Cells in Culture." *Cell* 70 (5) (September): 841–847.
- Matsumiya, Kiyomi, Marvin L Meistrich, Gunapala Shetty, Kayoko Dohmae, Akira Tohda, Akihiko Okuyama, and Yoshitake Nishimune. 1999. "Stimulation of Spermatogonial Differentiation in Juvenile Spermatogonial Depletion (jsd) Mutant Mice by Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist Treatment." *Endocrinology* 140 (10): 4912–4915.

- McLachlan, R I, N G Wreford, D M Robertson, and D M de Kretser. 1995. "Hormonal Control of Spermatogenesis." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 6 (3) (April): 95–101.
- Meistrich, Marvin L, and Marko Kangasniemi. 1997. "Hormone Treatment after Irradiation Stimulates Recovery of Rat Spermatogenesis from Surviving Spermatogonia." *Journal of Andrology* 18 (1): 80–87.
- Meng, Xiaojuan, Maria Lindahl, Mervi E Hyvönen, Martti Parvinen, Dirk G de Rooij, Michael W Hess, Anne Raatikainen-Ahokas, *et al.* 2000. "Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF." *Science* 287 (5457) (February 25): 1489–1493.
- Morrison, Sean J, and Judith Kimble. 2006. "Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer." *Nature* 441 (7097) (June 29): 1068–74.
- Morrison, Sean J, and Allan C Spradling. 2008. "Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life." *Cell* 132 (4) (February 22): 598–611.
- Mueller, Sigrid, Katja Prella, Norman Rieger, Helga Petznek, Caro Lassnig, Uwe Luksch, Bernhard Aigner, *et al.* 1999. "Chimeric Pigs Following Blastocyst Injection of Transgenic Porcine Primordial Germ Cells." *Molecular Reproduction and Development* 54 (3): 244–254.
- Nakano, Toru, Hiroaki Kodama, and Tasuku Honjo. 1994. "Generation of Lymphohematopoietic Cells from Embryonic Stem Cells in Culture." *Science* 265 (5175): 1098–1101.
- Nocka, K, S Majumder, B Chabot, P Ray, M Cervone, a Bernstein, and P Besmer. 1989. "Expression of c-Kit Gene Products in Known Cellular Targets of W Mutations in Normal and W Mutant Mice--Evidence for an Impaired c-Kit Kinase in Mutant Mice." *Genes & Development* 3 (6) (June 1): 816–826.
- Ohta, Hiroshi, Kentaro Yomogida, Kayoko Dohmae, and Yoshitake Nishimune. 2000. "Regulation of Proliferation and Differentiation in Spermatogonial Stem Cells: The Role of c-Kit and Its Ligand SCF." *Development (Cambridge, England)* 127 (10) (May): 2125–31.
- Park, Tae Sub, and Jae Yong Han. 2000. "Derivation and Characterization of Pluripotent Embryonic Germ Cells in Chicken." *Molecular Reproduction and Development* 56 (4) (August): 475–82.
- Paulozzi, Leonard J. 1999. "International Trends in Rates of Hypospadias and Cryptorchidism." *Environmental Health Perspectives* 107 (4) (April): 297–302.
- Pellegrini, Manuela, Paola Grimaldi, Pellegrino Rossi, Raffaele Geremia, and Susanna Dolci. 2003. "Developmental Expression of BMP4/ALK3/SMAD5 Signaling Pathway in the Mouse Testis: A Potential Role of BMP4 in Spermatogonia Differentiation." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 16) (August 15): 3363–72.
- Piedrahita, J A, K Moore, B Oetama, C K Lee, N Scales, J Ramsoondar, F W Bazer, and T Ott. 1998. "Generation of Transgenic Porcine Chimeras Using Primordial Germ Cell-Derived Colonies." *Biology of Reproduction* 58 (5) (May 1): 1321–1329.
- Resnick, James L, Lynn S Bixler, Linzhao Cheng, and Peter J Donovan. 1992. "Long-Term Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture." *Nature* 359 (6395) (October 8): 550–1.

- Rodriguez, Ivan, Christiane Ody, Kimi Araki, Irene Garcia, and Pierre Vassalli. 1997. "An Early and Massive Wave of Germinal Cell Apoptosis Is Required for the Development of Functional Spermatogenesis." *The EMBO Journal* 16 (9) (May 1): 2262–70.
- \*Sapsford, C S. 1962. "Changes in the Cells of the Sex Cords and Seminiferous Tubules during the Development of the Testis of the Rat and Mouse." *Australian Journal of Zoology* 10 (2) (January 1): 178–192.
- Segev, Hanna, Bettina Fishman, Anna Ziskind, Margarita Shulman, and Joseph Itskovitz-Eldor. 2004. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Insulin-producing Clusters." *Stem Cells* 22: 265–274.
- Seydoux, Geraldine, and Robert E Braun. 2006. "Pathway to Totipotency: Lessons from Germ Cells." *Cell* 127 (5) (December 1): 891–904.
- Shamblott, Michael J, Joyce Axelman, Shunping Wang, Elizabeth M Bugg, John W Littlefield, Peter J Donovan, Paul D Blumenthal, George R Huggins, and John D Gearhart. 1998. "Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23) (November 10): 13726–31.
- Shim, H, a Gutiérrez-Adán, L R Chen, R H BonDurant, E Behboodi, and G B Anderson. 1997. "Isolation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Porcine Primordial Germ Cells." *Biology of Reproduction* 57 (5) (November): 1089–95.
- Stevens, Leroy C. 1966. "Development of Resistance to Teratocarcinogenesis by Primordial Germ Cells in Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 37 (6): 859–867.
- Stevens, Leroy C. 1967. "Origin of Testicular Teratomas from Primordial Germ Cells in Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 38 (4): 549–552.
- Stewart, Colin L, Inder Gadi, and Harshida Bhatt. 1994. "Stem Cells from Primordial Germ Cells Can Reenter the Germ Line." *Developmental Biology* 161 (2) (February): 626–8.
- Streckfuss-Bömeke, Katrin, Jörg Jende, I-Fen Cheng, Gerd Hasenfuss, and Kaomei Guan. 2014. "Efficient Generation of Hepatic Cells from Multipotent Adult Mouse Germ-Line Stem Cells Using an OP9 Co-Culture System." *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")* 16 (1): 65–76.
- Tajima, Y, K Sakamaki, D Watanabe, U Koshimizu, T Matsuzawa, and Y Nishimune. 1991. "Steel-Dickie Mutation Affects Both Maintenance and Differentiation of Testicular Germ Cells in Mice." *Journals of Reproduction and Fertility* 91 (2): 441–449.
- Tamm, Christoffer, Sara Pijuan Galitó, and Cecilia Annerén. 2013. "A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing." *PLoS One* 8 (12) (January): e81156.
- Thomson, James A, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, and Jeffrey M Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391) (November 6): 1145–1147.
- Tsung, Hsiao Chien, Zhong Wei Du, Rong Rui, Xiu Lan Li, Lin Ping Bao, Jun Wu, Shi Min Bao, and Zhen Yao. 2003. "The Culture and Establishment of Embryonic Germ (EG) Cell Lines from Chinese Mini Swine." *Cell Research* 13 (3) (June): 195–202.

- Van Beek, M E A B, M L Meistrich, and D G de Rooij. 1990. "Probability of Self-Renewing Divisions of Spermatogonial Stem Cells in Colonies, Formed after Fission Neutron Irradiation." *Cell and Tissue Kinetics* 23 (1) (January): 1–16.
- Van Keulen, C J G, and D G de Rooij. 1975. "Spermatogenetic Clones Developing from Repopulating Stem Cells Surviving a High Dose of an Alkylating Agent." *Cell Proliferation* 8 (6): 543–551.
- Van Pelt, Ans M M, and Dirk G de Rooij. 1991. "Retinoic Acid Is Able to Reinitiate Spermatogenesis in Vitamin A-Deficient Rats and High Replicate Doses Support the Full Development of Spermatogenic Cells." *Endocrinology* 128 (2) (February): 697–704.
- Van Pelt, Ans M M, Federica M F van Dissel-Emiliani, Ingrid C Gaemers, Marja J M van der Burg, Hans J Tanke, and Dirk G de Rooij. 1995. "Characteristics of A Spermatogonia and Preleptotene Spermatocytes in the Vitamin A-Deficient Rat Testis." *Biology of Reproduction* 53 (3) (September): 570–8.
- Watt, Fiona M, and Ryan R Driskell. 2010. "The Therapeutic Potential of Stem Cells." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1537) (January 12): 155–63.
- Wylie, C C, and Janet Heasman. 1993. "Migration, Proliferation and Potency of Primordial Germ Cells." *Seminars in Developmental Biology* 4 (3) (June): 161–170.
- Xin, Xu, Yong Shen Yu, Hsiao Chien Tsung, Sumio Sugano, and Yuang Chang Yan. 1999. "The Developmental Fate of Green Fluorescent Mouse Embryonic Germ Cells in Chimeric Embryos." *Cell Research* 9 (3) (September): 201–8.
- Yamashita, Yukiko M, Hebao Yuan, Jun Cheng, and Alan J Hunt. 2010. "Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1) (January): a001313.
- Yan, Wei, Michel Samson, Bernard Jégou, and Jorma Toppari. 2000. "Bcl-W Forms Complexes with Bax and Bak, and Elevated Ratios of Bax/Bcl-W and Bak/Bcl-W Correspond to Spermatogonial and Spermatocyte Apoptosis in the Testis." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14 (5) (May): 682–99.
- Yao, Tso-Pang, Suk P Oh, Miriam Fuchs, Nai-Dong Zhou, Lian-Ee Ch'ng, David Newsome, Roderick T Bronson, En Li, David M Livingston, and Richard Eckner. 1998. "Gene Dosage-Dependent Embryonic Development and Proliferation Defects in Mice Lacking the Transcriptional Integrator p300." *Cell* 93 (3) (May 1): 361–72.
- Ying, Qi-Long, Marios Stavrdis, Dean Griffiths, Meng Li, and Austin Smith. 2003. "Conversion of Embryonic Stem Cells into Neuroectodermal Precursors in Adherent Monoculture." *Nature Biotechnology* 21 (2) (February): 183–6.
- Yoshida, Shosei. 2010. "Stem Cells in Mammalian Spermatogenesis." *Development, Growth & Differentiation* 52 (3) (April): 311–7.
- Yoshida, Shosei, Mamiko Sukeno, and Yo-Ichi Nabeshima. 2007. "A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5845) (September 21): 1722–6.

\*sekundární zdroj