

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Bianka Porubská

Imunoprotektivne vlastnosti Sertoliho buniek

Immunoprotective properties of Sertoli cells

Bakalárska práca

Školiteľ: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2016

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala svojej školiteľke RNDr. Magdaléne Krulovej, Ph.D. za cenné rady a ochotný prístup počas písania bakalárskej práce. Taktiež patrí veľká vďaka mojej rodine a Petrovi za nekonečnú podporu a inšpiráciu pri písaní.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa 18.8.2016

Bianka Porubská

Abstrakt

Sertoliho bunky (Sertoli cells- SC) sú somatické bunky nachádzajúce sa v samčích pohlavných orgánoch, semenníkoch. Ich funkcia a rola v spermatogenéze je každým dňom ozrejmenejšia o niečo viac a niet pochyb, že bez SC by bola narušená reprodukcia druhu a teda jeho zachovanie. SC ovplyvňujú okrem už známej spermatogenézy aj imunitný systém a to na viacerých úrovniach. Bunková aj nebunková časť imunitného systému sú po aplikácii SC ovplyvnené a tak predlžujú prežitie nielen seba samých, ale aj ďalších kotransplantovaných buniek. Modulácia odpovede zložiek vrodenej aj získanej imunity sa zdá byť do budúcnosti kľúčovým nástrojom pre terapiu rady chorôb.

Kľúčové slová: Sertoliho bunky, spermatogenéza, imunoprotekcia, transplantácia

Abstract

Sertoli cells (SCs) are somatic cells located in the male reproductive organs-testes. Everyday, understanding of their function and their role in spermatogenesis becomes better elucidated and there is no doubt that reproduction and continuity of the kind would be impaired in the absence of SCs. SCs are not only able to influence spermatogenesis they also significantly modulate immune system. Both cell and humoral component of immune system are affected after SCs application and SCs thus protect not only themselves, but also other co-transplanted cells. Modulation of response of innate and adaptive component of immune system may play a key role in the treatment of several diseases.

Key words: Sertoli cell, spermatogenesis, immunoprotection, transplantation

Obsah

1	Úvod	1
2	Úloha Sertoliho buniek v organizme	3
2.1	Vplyv SC na spermatogézu.....	3
2.1.1	Hemato-semenníková bariéra- blood-testis barrier (BTB).....	3
2.1.2	GDNF (Glial cell derivated neurotrophic factor).....	5
2.1.3	Fibroblastový rastový faktor 2	6
2.1.4	Faktor kmeňových buniek.....	7
2.1.5	Nociceptín.....	7
2.1.6	Neuregulín.....	8
2.1.7	Transferín	8
3	Sertoliho bunky a imunitný systém	10
3.1	Sertoliho bunky a T-lymfocyty.....	11
3.1.1	Cielenie imunitnej odpovede na T-lymfocyty.....	11
3.1.2	Indukcia vzniku regulačných T-lymfocytov.....	13
3.1.3	Dendritické bunky	13
3.1.4	Rezistencia voči apoptóze indukovanej Fas-FasL systémom	14
3.1.5	Rezistencia voči apoptóze indukovanej granzýmom	15
3.2	Komplement.....	17
3.3	Zvýšenie adhézie buniek a zníženie migrácie leukocytov	18
4	Klinické aplikácie	21
4.1	Liečba diabetu s pomocou SC.....	21
4.2	Terapeutický proteín vnesený do SC.....	23
5	Záver	25
	Použitá literatúra	27

Zoznam skratiek

ACK	protilátka proti molekule c-kt (anti-c-kit antibody)
α Gal	galaktóza- α -1,3-galaktóza
APC	bunka prezentujújúca antigén (antigen-presenting cell)
AR	androgénový receptor
B7-H1	B7 homológ 1
Bcl6b	z anj. B-cell lymphoma memeber 6
BTB	hemato-semenníková bariéra (blood-testis barrier)
cAMP	cyklický adenzínmonofosfát (cyclic adenosinemonophosphate)
CCR	C-C chemokínový receptor (C-C chemokine receptor)
CD	klaster diferenciacie (cluster of differencitaiton)
cPLA	cytosolická fosfolipáza A (cytosolic phospholipase A)
CREB	transkripčný faktor viažúci sa na DNA sekvenciu na element odpovedajúci na cAMP (cAMP response element binding protein)
CRP	proteín regulujúci komplement (complement regulatory protein)
CXCL	C-X-C chemokínový ligand (C-X-C chemokine ligand)
CXCR	C-X-C chemokínový receptor (C-X-C chemokine receptor)
DNA	deoxyribonukleova kyselina (deoxyribonucleic acid)
DC	dendritická bunka (dendritic cell)
Erk	kináza regulovaná extracelulárnym signálom (Extracelullar-regulated kinase)
ERM	molekula prábuzná Ets (Ets related molekule)
FGF2	fibroblastový rastový faktor 2 (fibroblast growth factor 2)
FGFR4	receptor pre fibroblastový rastový faktor 4 (fibroblast growth factor 4)
Foxp3	gén aktívny v regulačných T-lymfocytoch (forkhead box P3)
FSH	folikulostimulačný hormón
GDNF	neurotrofný faktor gliových buniek (glial cell-derived neurotrophic factor)

GFR α	receptor pre molekuly z rodiny GDNF (GDNF-family receptor alpha)
ICAM-1	medzibunková adhézna molekula-1 (intercellular adhesion molecule 1)
IFN	interferón
IL	interleukín
Ig	imunoglobulín
IS	imunitný systém (immune system)
JAG1	jagged- receptor pre Notch signálnu kaskádu
JAM1	adhézna molekula medzibunkových spojov 1 (junctional adhesion molecule 1)
Lhx1	Lim homeobox 1-proteín obsahujúci LIM doménu
LPS	lipopolysacharid
MAC	komplex atakujúci membrány (membrane attack complex)
MHC	hlavný histokompatibilný komplex (major histocompatibility complex)
MPR	receptor pre proteíny glykozilované manózou-6-fosfátom (mannose-6-phosphate receptor)
MSC-1	kultivovaná línia Sertoliho buniek-1 (mouse Sertoli cell line-1)
NPSC	sertoliho bunky izolované z novonarodených prasiat (neonatal porcine sertoli cells)
OCT	transportér pre organické katióny (organic cation transporter)
OCTN	transportér pre organické katióny/karnitín (organic cation/carnitine transporter)
PI-9	proteázový inhibítor 9 (protease inhibitor 9)
PKA	proteinkináza A (proteinkinase A)
RADH	dehydrogenáza produkujúca kyselinu retinovú (retinoic acid dehydrogenase)
RAP-1	proteín príbuzný proteínu Ras, GTPáza (Ras related protein-1)
RAR	receptor pre kyselinu retinovú (retinoic acid receptor)
Rec8	proteín meiotickej rekombinácie
RET	tyrozínkinázový receptor pre GDNF

RhoA	homológ Ras proteínu, člen A (Ras homolog gene family, member A)
RTK	receptorová tyrozínkináza (receptor tyrosine kinase)
SC	Sertoliho bunka (Sertoli cell)
SCC	kmeňová spermatická bunka (spermatogonial stem cell)
SCCM	médium obohatené o proteíny SC (Sertoli cell cultured medium)
SCF	faktor kmeňových buniek (stem cell factor)
SDF-1	faktor produkovaný stromatálnymi bunkami (stromal cell derivated factor- 1)
Serpina3n	serínový proteázový inhibítor A, člen 3N (serine protease inhibitor A,, member 3N)
SMAD	sma a mad rodina proteínov (sma and mad related family)
Tc	cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-lymphocyte)
Th	pomocný T-lymfocyt (T hellper cell)
TNF	faktor nekrotizujúci nádory (tumor necrosis factor)
Treg	regulačný T-lymfocyt (regulatory T cell)
VCAM-1	adhézna molekula vaskulárnych buniek 1 (vascullar cell adhesion molecule 1)

1 Úvod

Základnou charakteristikou imunitného systému (IS) je rozpoznanie potenciálne škodlivej častice od neškodlivej a chrániť tak organizmus. Táto častica alebo štruktúra sa môže do organizmu dostať z vonkajšieho prostredia, čo väčšinou predstavujú baktérie, vírusy, eukaryotické bunky či mnohobunkové organizmy. Ďalšie častice ktoré organizmus rozpoznáva a aktivuje voči nim imunitnú odpoveď sú odumreté či mutované bunky a tkanivá. Rozpoznaním týchto štruktúr sa zbavuje už nepotrebných poprípade nefunkčných súčastí, ktoré vo väčšine prípadov nahradia nové bunky a tkanivá sa obnovia. Bunky telu vlastné, ktoré nevykazujú žiadnu anomáliu, teda bunky zdravé, aktivujú naopak v imunitnú toleranciu.

V tele je ale niekoľko priestorov, kde sa reakcia voči cudzím antigénom nevyvolá. Je to napríklad priestor v mozgu oddelený hemato-encefalickou bariérou. Podobný priestor, kde sa za fyziologických podmienok nevyvolá zápalová imunitná reakcia, je semenotvorný kanálik v semenníku samčích pohlavných orgánov. V tomto prípade sa o fyzickú bariéru starajú somatické Sertoliho bunky (SC- Sertoli Cells). Chránia pohlavné zárodočné bunky a neskôr spermatocyty (1. a 2. Rádu), spermatídy až spermie pred imunitným systémom a sprostredkujú im živiny a iné signálne látky, vďaka ktorým sú schopné správneho vývoja. Práve vlastnosť SC, modulovať odpoveď imunitného systému na vyvíjajúce sa spermatické bunky podporila hypotézy o ich schopnosti takto ovplyvňovať imunitný systém aj mimo semenníkov. Tento proces je sprostredkovaný povrchovými molekulami (kontaktom bunka-bunka) alebo molekulami vylučovanými mimo SC. Molekuly SC ovplyvňujú bunečnú aj humorálnu zložku imunitného systému (Lee et al. 2008) a zasahujú do jeho vrodenej aj získanej komponenty .

SC sú teda vďaka svojim vlastnostiam schopné prežitia mimo tieto privilegované oblasti pri auto-, alo- aj xenotransplantáciách. Preskúmanie týchto mechanizmov ktorými disponujú SC je dôležité do budúca v rade oblastí, napríklad pri pomoci s liečbou diabetu (transplantácia Langerhansových ostrovčekov spolu so SC) (Valdés-González et al. 2005), pri terapeutickom dopravení proteínu do organizmu (Halley et al. 2010) a iných klinických zásahov, pri ktorých je do dnes hlavný problém imunitná odpoveď

voči transplantátu.

Cieľom tejto práce je priblížiť dôležitú úlohu SC v spermatogenéze, ich schopnosti ovplyvňovať jednotlivé zložky IS a ozrejmiť možnosti využitia týchto buniek v klinickej praxi.

2 Úloha Sertoliho buniek v organizme

2.1 Vplyv SC na spermatogézu

Proces spermatogézy je nevyhnutnou súčasťou života a evolúcie pohlavne sa rozmnožujúcich organizmov. Celý sa odohráva v semenotvorných kanálikoch semenníkov, ktoré pozostávajú z budúcich spermatických buniek (zárodočné pohlavné bunky) a zo SC ohraničených peritubulárnymi myoidnými bunkami. V priestore medzi kanálikmi sa nachádzajú Leydigove bunky, leukocyty, fibroblasty a krvné cievy (Obr. 1.). Spermatogéza zahŕňa niekoľko štádií, ktoré sprevádzajú zmeny v metabolizme aj počte chromozómov samčích zárodočných pohlavných buniek. Z nediferencovanej spermatocytnej kmeňovej bunky (Spermatogonial Stem Cell- SSC) ($2n$) sa v troch po sebe naväzujúcich procesoch mitózy, meiózy a spermiogézy vytvorí spermatická bunka ($1n$). Pri týchto zmenách sa postupne spermatocytne bunky stávajú pre imunitný systém potenciálne viditeľnými a môžu po styku s lymfocytmi vyvolať imunitnú odpoveď. To spôsobujú antigény na povrchu dozretých spermatocytov (Ryan & Fitzpatrick 1986). Dozrievajúce spermatocytne bunky zároveň nemajú priamy prístup k živinám, signálnym a iným látkam, ktoré sú potrebné pre dokončenie spermatogézy. Ochranu pred IS, informácie od okolitých buniek aj metabolickú podporu im sprostredkujú práve SC.

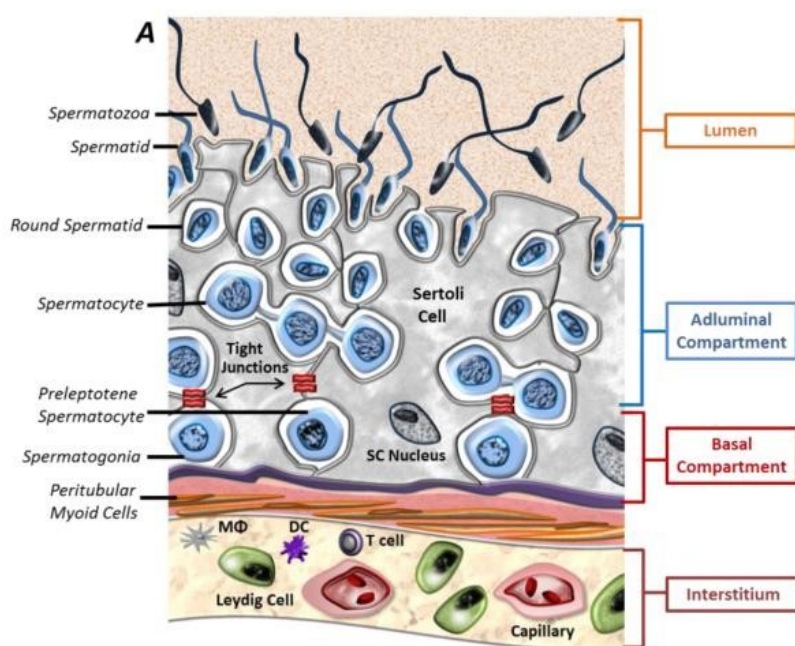
2.1.1 Hemato-semenníková bariéra- blood-testis barrier (BTB)

Tento názov nesie fyzická, chemická aj fyziologická bariéra vytváraná SC, ktorá má za úlohu oddeliť budúce spermatocytne bunky od zvyšku tela a chrániť ich pred potenciálnym nebezpečenstvom z krvi. Jej hlavnou zložkou sú tesné spoje (tight junctions) medzi SC (Dym & Fawcett 1970). Pomocou BTB je zabezpečené vytvorenie mikroprostredia pre pohlavné bunky, ktoré je nutné pre ich vývoj a dozrievanie v spermie. Cez bariéru sa dostanú len vybrané molekuly a látky, ktoré musia prejsť cez cytoplazmu SC. Ďalšia dôležitá funkcia tesných spojov je možnosť ich prerušenia a spätného vytvorenia, pomocou ktorého putujú pohlavné bunky z bazálnej strany semenotvorného kanálika do adlumínálnej časti. Bunka sa

vo fázi preleptotene oddeľuje od bazálnej laminy tubulu a vytváraním a zaníkaním spojov pred a za ňou sa pohybuje smerom k jeho lumen. Pri tomto putovaní pohľadá bunka nevykazuje améboidný pohyb (Russell 1977).

Základom podpory zárodočných buniek je sekrécia proteínov s rôznymi funkciami, ktoré sa delia do štyroch kategórií: (Griswold 1998)

- Transportné a ochranné proteíny sekretované v relatívne vysokých hladinách (napr. transferin, celuroplazmin)
- Proteázové inhibítory, remodelácia tkaniva pri pohybe spermatocytov do adluminálnej časti semenotvorného kanálika
- Glykoproteíny podieľajúce sa výstavbe bazálnej membrány medzi SB a peritubulárnymi bunkami
- Regulačné glykoproteíny, napr. fungujú ako parakrinné alebo rastové faktory



Obr. 1 A) Morfológia semenníka- semenotvorný kanálik. Adluminálny kompartment: Sertolihových buniek, budúce spermatické bunky. Bazálny kompartment: $2n$ spermatogonie a preleptotene spermatocyty. Intersticiu: T-lymfocyty, makrofágy, Leydigove bunky, bunky kapilár. Prevzaté a upravené z - Kaur, Thompson & Dufour 2014.

2.1.2 GDNF (Glial cell derivated neurotrophic factor)

SSC, ktoré stoja na začiatku spermatogenézy si po celú dobu života organizmu musia zachovať schopnosť obnoviť sa. Po každom rozdelení SSC sa jedna z buniek stáva časom spermatickou bunkou a druhá si musí zachovať schopnosť deliť sa. Transkripčný faktor ERM (Ets Related Molecule, Ets= E26 transformation-specific), ktorý je nevyhnutný pre toto obnovovanie je produkovaný SSC a SC (Oatley et al. 2007; Chen et al. 2005). Ďalší dôležitý faktor je transkripčný represor Bcl6b (B-cell lymphoma member 6 B). Znížením hladiny mRNA kódujúcej Bcl6b v SSC ich približne polovica vstúpila do apoptózy (Oatley et al. 2006). *In vivo* štúdia navyše ukázala, že potlačenie transkripcie Bcl6b viedlo k abnormalitám v morfológii semenotvorných kanálikov, ktoré obsahovali pohlavné bunky v degeneratívnych fázach alebo obsahovali len SC. Taktiež veľkosť semenníkov bola zredukovaná (Oatley et al. 2006). Pri cielenom poškodení transkripčného faktoru ERM sa v myších semenníkoch rapídne znížila expresia génov špecifických pre spermatogónie. Naopak expresia génov charakteristických pre bunky v neskorších fázach spermatogenézy sa nezmenila. Prvá vlna spermatických buniek sa u myší objavila, ale kvôli neschopnosti SSC obnoviť sa sa ďalšie spermie v semenníkoch neobjavili. Absencia transkripčného faktoru ERM nijak neovplyvnila proces dozrievania spermatických buniek (Chen et al. 2005).

Gény špecifické pre ERM a Bcl6b sú exprimované pri dostatku rastového faktoru GDNF. Na povrchu pohlavných buniek, ktoré sa nachádzajú v skorej fáze spermatogenézy je exprimovaný tyrozinkinázový receptor RET a koreceptor GFR α 1 (GDNF-family Receptor α 1). Mutácie vedúce k zastaveniu expresie génov Gdnf, Gfra1 aj Ret spôsobili znížený počet spermií kvôli neschopnosti SSC udržať sa v nediferencovanom štádiu a zníženej schopnosti pohlavných buniek deliť sa (Naughton et al. 2006). Pri narušení produkcie GDNF Sertoliho bunkami aplikáciou lipopolysacharidu (LPS) ku kultúre SC a SSC *in vitro*, sa znížila schopnosť SSC seba obnovy v dôsledku zníženej expresie ERM- Etv5 (Ets variant gene 5) (Zhang et al. 2014). Spolu s týmto transkripčným faktorom sa znížila aj produkcia Bcl6b a Lhx1 (Lim homeobox 1). Produkcia GDNF SC sa mení cyklicky v závislosti na štádiu,

v ktorom sa SSC nachádzajú. Najvyššia hladina GDNF je vo fázy, kedy sa SSC delia a následný pokles im umožní diferenciáciu (Johnston et al. 2011).

2.1.3 Fibroblastový rastový faktor 2

Fibroblastový rastový faktor 2 (Fibroblast Growth Factor 2- FGF2) je ďalší faktor, ktorý je potrebný k udržaniu stáleho počtu SSC. Ak bol pridaný do média ku SSC spolu s GDNF, dlhodobo sa zlepšila schopnosť SSC obnovovať sa (Kubota et al. 2004). U ľudských buniek sa po pridaní FGF2 ku kolóniám SSC zväčšil ich priemer, čo tiež naznačuje jeho rolu v podpore proliferácie spermatických kmeňových buniek (Mirzapour et al. 2012). Transkripčný faktor ERM (Etv5), spomínaný pri odpovedi na signalizáciu rastového faktoru GDNF, je exprimovaný aj pri odpovedi na FGF2. Na FGF2 ale odpovedajú samotné SC a to cez tyrozinkinázový receptor FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4) (Yoon et al. 2009). Vyradenie génu kódujúceho Erm z funkcie viedlo k zníženiu hladiny SDF-1 (Stromal cell Derived Factor 1/CXCL12) v SC (Yoon et al. 2009). V tomto prípade je ERM člen kaskády, ktorá aktivuje expresiu génu Sdf-1. Imunohistochemická analýza prítomnosti receptora SDF-1, CXCR4, na bunkách semenníkov odhalila jeho expresiu na spermatogóniách, SC a intersticiálnych bunkách, čo naznačuje dôležitú úlohu molekuly SDF-1 vo funkcii semenníkov (Yoon et al. 2009). FGF2 pôsobí cez svoj receptor aj priamo na SSC.

Molekula SDF-1 je exprimovaná SC a jej receptor CXCR4 (C-X-C motif receptor 4) je na povrchu nediferencujúcich sa spermatogónií (Yang et al. 2013). Inhibícia receptora pre SDF-1 má za následok rapídne zníženie počtu SSC z dôvodu redukcie proliferujúcich buniek a kvôli prechodu ostatných buniek do fázy diferenciácie (Yang et al. 2013). Po transplantácii SSC s nefunkčným CXCR4 do nefertilnej myši sa neobnovila jej fertilita, pretože sa narušila schopnosť týchto buniek migrovať k bazálnej lamine semenotvorného tubulu. Ak mali SSC normálnu funkciu CXCR4 fertilita sa obnovila (Yang et al. 2013). Vyššie uvedené fakty naznačujú rolu molekuly SDF-1 v udržiavaní stáleho počtu SSC a v migrácii buniek na správne miesto semenotvorného kanálíku po transplantácii. Produkciu tohto faktoru ovplyvňuje

GDNF aj FGF2 signalizácia (Yang et al. 2013) čo naznačuje ich podobnú až synergickú rolu v udržiavaní stálej spermatogenézy.

FGF2 a GDNF zdieľajú napríklad medzičlánok signalizačných kaskád alebo ich samotné produkty (ERM, Bcl6b, SDF-1), čo naznačuje ich spoluprácu v udržiavaní stáleho počtu SSC. Dá sa o nich hovoriť ako o dvoch najdôležitejších faktoroch ovplyvňujúcich priebeh a stále udržanie spermatogenézy.

2.1.4 Faktor kmeňových buniek

SC exprimujú faktor kmeňových buniek (Stem Cell Factor- SCF), transmembránový alebo solubilný rastový faktor (Tajima et al. 1991). Podobne ako pri GDNF sa hladina SCF mení v závislosti na štádiu, v ktorom sa budúce spermatické bunky nachádzajú (Hakovirta 1999). U mužov s normálnym počtom spermíí bola vyššia hladina SCF v tekutine semenotvorného tubulu ako u mužov so zníženým počtom spermíí (oligospermia) (Fujisawa et al. 1998). Diferencujúce sa spermatogónie a spermatocyty vo fázy pachytene exprimujú jeho receptor, c-kit (Manova et al. 1990), konkrétne u diferencujúcich sa spermatíd bol c-kit situovaný do miesta akrozomálnych granúl a u spermíí v akrozomálnom vačku (Sandlow et al. 1996). Taktiež Leydigove bunky sa ukázali byť pozitívne na c-kit (Sandlow et al. 1996). Narušenie funkcie tohto tyrozinkinázového receptora (RTK- Receptor Tyrosine Kinase) pomocou ACK2 (Anti-c-kit monoclonal antibody 2) viedlo k zníženiu počtu diferencujúcich sa spermatogónií. Nediferencujúce sa spermatogónie na túto zmenu vo funkcii receptora pre SCF nereagovali (Yoshinaga et al. 1991), čo naznačuje, že rola systému SCF/c-kit je kľúčová pri dozrievaní zárodočných pohlavných buniek na spermie. Faktor, ktorý ovplyvňuje produkciu SCF Sertoliho bunkami je folikulostimulačný hormón (FSH) (Rossi et al. 1993), ktorý do procesu spermatogenézy zasahuje cez SC aj inými molekulami.

2.1.5 Nociceptín

FSH, glykoproteín produkovaný hypofýzou, je dôležitým hormónom ovplyvňujúcim spermatogézu (Simoni et al. 1997). U myši sa počas prvej vlny

spermatogenézy zvýšila v sére hladina FSH (Barakat et al. 2008). Jedinými bunkami v semenníku, ktoré majú receptor pre FSH sú SC (Rannikki et al. 1995). SC odpovedajú na FSH cez signalizačnú kaskádu cAMP/PKA/CREB (cyclic adenosine monophosphate- cyklický adenozinmonofosfát/Proteinkináza A/cAMP Response Element-Binding protein), ktorá končí expresiou prenociceptínu a následnou produkciou nociceptínu (Eto et al. 2012). Spermatocyty exprimujú na plazmatickej membráne receptor pre nociceptín (Eto et al. 2013). Hladina nociceptínu kolíše v závislosti na hladine FSH, čo odráža jeho úlohu v spermatogenéze. Konkrétne v spermatocytoch indukuje fosforyláciu Rec8 a tým napomáha správne mu priebehu meiózy vďaka regulácii dynamiky chromozómov (Eto et al. 2013). Nociceptín umožňuje prechod v meiotickom delení bunky z fázy leptotene do zygotene a zo zygotene do pachytene (Eto et al. 2013). Použitím nocistatínu, inhibítora nociceptínu, sa narušil proces meiózy a tým pádom celej spermatogenézy (Eto et al. 2013). Nociceptín produkovaný výhradne SC sa dá považovať za kľúčový faktor meiotického delenia pohlavných buniek a za ďalší z proteínov sekretovaných Sertoliho bunkami, ktorý sa významne podieľa na udržaní fertility.

2.1.6 Neuregulín

SC aj pohlavné bunky exprimujú receptory pre kyselinu retinovú (aktívny metabolit vitamínu A), čo naznačuje jej úlohu v spermatogenéze (Akmal 1997). SC produkujú napríklad poväčšine cytoplazmatické RAR α , RAR β a RAR γ (Retinoic Acid Receptor) a miera ich expzie je závislá od veku jedinca (Dufour 1999). Kyselinu retinovú sú SC schopné produkovať pomocou RADH (RetinAldehydDeHydrogenáza) a ak bol gén pre dehydrogenázu vyradený, bol poškodený proces už prvej vlny spermatogenézy (Raverdeau et al. 2012).

2.1.7 Transferín

Transferín je jeden z najviac prebádaných glykoproteínov sekretovaných SC. Tie pomocou neho transportujú železo do lumen semenníkov (teda cez BTB= blood-testis barrier) alebo do medzibunkového priestoru medzi SC a zárodočné bun-

ky (Morales 1987). Tam poskytuje transferín zdroj železa pre vyvíjajúce sa zárodočné pohlavné bunky. SC taktiež exprimujú transportné systémy pre katióny na bazálnej aj apikálnej strane svojho povrchu. Sú to u potkana napríklad OCT1,3 (Organic Cation Transporter) alebo OCTN2 (Organic Cation/Carnitin Transporter) (Maeda et al. 2007).

3 Sertoliho bunky a imunitný systém

Vďaka BTB sa cez zárodočný epitel nedostáva k pohlavným bunkám rada molekúl, či už dôležitých pre spermatogézu a prežitie spermatických buniek, alebo potenciálne nebezpečných. Pomocou tesných spojov SC vytvárajú 2 priestory v semenotvornom tubule: 1. Bazálny kompartment- medzi SC a bazálnou laminou, obsahuje spermatogónie a spermatocyty vo fázy preleptotene, 2. Adluminálny kompartment- za tesnými spoji smerom do lumen tubulu, predstavuje priestor určený pre bunky vo všetkých nasledujúcich štádiách spermatogézy (Dym & Fawcett 1970). Dozrievajúce spermatické bunky exprimujúce na svojom povrchu molekuly „viditeľné“ pre imunitný systém (O’Rand & Romrell 1977) potrebujú fyzickú aj fyziologickú ochranu, ktorú im sprostredkuje BTB. Myš s vyradeným génom pre androgénový receptor mala BTB narušenú z dôvodu menšieho počtu tesných spojov, čo vyústilo v jej zvýšenú permeabilitu (Meng et al. 2011). V semenníku takejto myši bola zvýšená hladina imunoglobulínu G (IgG) proti pohlavným bunkám v posledných fázach spermatogézy (Meng et al. 2011). Taktiež penetrácia leukocytov a teda zápalová imunitná odpoveď bola identifikovaná po narušení BTB (Meng et al. 2011), čo naznačuje jej významnú rolu v ochrane pohlavných buniek pred imunitným systémom (IS). Avšak boli prevedené aj štúdie, pri ktorých narušená BTB neovplyvnila konečný počet spermií a teda plodnosť jedinca. Napríklad u norka, cicavca so sezónnym rozmnožovaním, sa BTB stáva počas života permeabilnou a následne nadobúda priepustnosť pre niektoré molekuly. Permeabilita BTB, ale nie je časovaná spolu s vývojom autoantigénnych pohlavných buniek (Pelletier 1986), takže tie sa na istý časový úsek dostávajú do prostredia, ktoré nie je fyzicky oddelené od zvyšku tela. Zmena vo funkcii BTB u norka nevedla k poškodeniu spermatogézy, naopak tieto cyklické zmeny sa dejú u zdravých jedincov. Bunky IS by mali na autoantigénne pohlavné bunky reagovať, poprípade vyvolať zápal počas permeability BTB, čo sa ale v prípade norka nestalo. Tieto fakty naznačujú ďalšie faktory, ktoré sa zúčastňujú modulácie odpovede imunitného systému na autoantigény v semenníku, poprípade modulácie IS

všeobecne. Tieto molekuly sú produkované SC. Xenogénne SC izolované z novorodených ošpaných transplantované do potkanov bez použitia imunosupresív sa v organizme príjemcu delili po dobu 3 mesiacov. Potom sa delenie zastavilo ale bunky ďalej prežívali, čím sami predišli nežiaducemu bujneniu (Dufour et al. 2003). SC izolované zo semenníka potkana po transplantácii do myši prežívali a takto ošetrované myši prijali kožný transplantát z potkana bez známok systémovej rejekcie (Shamekh et al. 2006). To naznačuje, že SC exprimujú solubilné alebo membránové proteíny, ktorými menia očakávanú odpoveď IS na SC a sú tak schopné sa vyhnúť zápalovému odhojeniu, poprípade ochrániť aj iné bunky transplantované spolu s nimi. V nižšie uvedených kapitolách sa zameriam na bunky a komponenty IS, ktoré sú ovplyvňované SC.

3.1 Sertoliho bunky a T-lymfocyty

T-lymfocyty sú bunky imunitného systému potrebné pri antigénne špecifickej imunitnej reakcii. V súvislosti so SC sú najdôležitejšie subpopulácie cytotoxických, pomocných (T helper- Th) a regulačných (regulatory T cell- Treg) T-lymfocytov. Cytotoxické T-lymfocyty sprostredkujú ničenie cieľových buniek degranuláciou. Pomocné lymfocyty produkujú cytokíny, ktorými modulujú imunitnú odpoveď na patogén a sú nutné pri aktivácii cytotoxických T-lymfocytov (Moyers & Droege 1983). Rozdeľujú sa na viacero podtried, ktoré sa navzájom ovplyvňujú a inhibujú, takže IS vždy reaguje vo väčšej miere cez jeden alebo druhý typ. Treg indukujú toleranciu imunokompetentných buniek voči vlastným tkanivám a bunkám. Vývoj všetkých týchto buniek sa odohráva v thýmuse za prítomnosti ďalších buniek a dôležitých signálnych molekúl, či už cytokínov, rastových faktorov alebo antigénov na antigén-prezentujúcich bunkách (Antigen presenting cell- APC).

3.1.1 Cielenie imunitnej odpovede na T-lymfocyty

SC vykazujú schopnosť inhibovať proliferáciu T-lymfocytov *in vitro* (Selawry et al. 1991). Inhibícia delenia týchto buniek bola sprevádzaná zníženou produkciou IL-2 (interleukin-2) a zároveň sa znížila schopnosť Tc odpovedať na IL-2 doda-

ný umelo do kultúry (Selawry et al. 1991). Lee a kol. popísali migráciu injekovaných SC do lymfatických uzlín. Zvýšením expresie chemokínového receptora 7 (chemokine receptor 7- CCR7) autori výrazne zvýšili migráciu SC do lymfatických uzlín a následne došlo k značnému predĺženiu prežitia kožného transplantátu (Lee et al. 2007). Migrácia SC do lymfatických orgánov naznačuje ich schopnosť indukovať toleranciu voči štepu priamou interakciou s imunokompetentnými bunkami príjemcu. Lymfocyty izolované zo sleziny myši, ktorej boli injektované SC vykazovali zníženú proliferáciu po alo- alebo xenogénnom stimule. Spolu so zníženou schopnosťou T-lymfocytov deliť sa bol pomer cytokínov charakteristických pre Th1/Th2 odpoveď naklonený k Th2 (Lim et al. 2009). Podobná štúdia transplantácie SC ukázala hladiny IL-10 a IL-12 nezmenené alebo skôr znížené oproti kontrolnej skupine, ale hladiny IL-2 a IL-6 boli markantne znížené (Shamekh et al. 2006). Aktivácia Th2 odpovede imunitného systému bola spojená s nízkou mierou odpovede imunitného systému na transplantovaný štep (Lim et al. 2009). Ďalším faktorom produkovaným SC, ktorý zasahuje do odpovede imunitného systému na transplantáciu je TGF β 1 (Transforming Growth Factor-beta1). Pri súčasnej transplantácii SC a β buniek produkujúcich inzulín bolo 64% myší normoglykemických 2 mesiace po operácii. V tomto prípade bola hladina TGF β 1 signifikantne zvýšená. Po pridaní anti-TGF β 1 sa zvýšila hladina buniek produkujúcich IFN γ (Interferon- γ) a znížila hladina buniek produkujúcich IL-4, čo malo za následok zápalové odhojenie štepu (Suarez-Pinzon et al. 2000). Molekula B7-H1 exprimovaná na povrchu SC je taktiež dôležitá pri znížení proliferácie efektorových T-lymfocytov. V prípade deregulácie produkcie tejto molekuly bola pozorovaná zvýšená proliferácia týchto buniek (Dal Secco et al. 2008). Produkcia TGF β 1, B7-H1 SC a ďalšie fakty popísané vyššie naznačujú, že SC sú schopné chrániť iné bunky pri transplantáciách prešmykom imunitnej odpovede do proti-zápalovej Th2 namiesto pro-zápalovej Th1.

3.1.2 Indukcia vzniku regulačných T-lymfocytov

Regulačné T-lymfocyty (Foxp3⁺) hrajú hlavnú úlohu v indukcii tolerancie imunitného systému voči vlastným aj cudzím, ale neškodným antigénom. Potlačujú odpovede T-lymfocytov na tieto faktory a predchádzajú tak zápalovej reakcii, ktorá by bola pre organizmus nebezpečná (Josefowicz et al. 2012). Treg sú schopné vzniku mimo thymu priamo v tkanivách z naivnej populácie T-lymfocytov, v tomto prípade sa nazývajú iTreg (indukované T lymfocyty) (Bilate & Lafaille 2012). Prijatie alotransplantátu je možné predĺžiť podávaním TGFβ, ktorý indukuje vznik Treg (Fan et al. 2009). SC indukujú vznik novej generácii Foxp3⁺ Treg a to práve vďaka produkcii TGFβ. Pri inhibícii receptora pre TGFβ sa znížil počet indukovaných Treg z približne 52% na 2% (Campese et al. 2014), čo vylučuje možnosť, že by táto konverzia bola nezávislá na TGFβ. Inhibícia signálnej molekuly SMAD3 mala za následok zníženie hladiny indukovaných Treg (Campese et al. 2014) takže sa pravdepodobne čiastočne zúčastňuje na tejto signálnej dráhe. Solubilný faktor JAG1, produkovaný SC, je ďalšou molekulou, ktorá pozitívne ovplyvňuje vznik Treg. Neutralizačná protilátka proti JAG1 bola pridaná do média so SC a naivných T-lymfocytov. Indukcia Treg bola aj v tomto prípade znížená (Campese et al. 2014). Po inkubácii SC s IFNγ sa objavili na ich povrchu molekuly hlavného histokompatibilného komplexu druhej triedy (Major Histocompatibility Complex class II- MHC II) (Dal Secco et al. 2008). Táto informácia podporuje fakt že SC sú schopné ovplyvňovať CD4⁺ T-lymfocyty kontaktom bunka-bunka a vďaka tomu fungovať ako APC.

TGFβ1 a Jagged1 sú dvomi základnými molekulami sekretovanými SC, ktoré indukujú *in vitro* aj *in vivo* v naivných T lymfocytoch expresiu Foxp3. Zmena fenotypu na Treg ovplyvňuje ďalej odpoveď imunitného systému na aloantigény, ktoré boli prítomné pri ich indukcii a nastoluje voči nim špecifickú toleranciu (Fan et al. 2009).

3.1.3 Dendritické bunky

Bunkami, ktoré prepájajú antigénne špecifickú a nešpecifickú zložku IS sú dendritické bunky (Dendritic cell- DC). Ako hlavné bunky prezentujúce antigén sú

klúčové pre aktiváciu naivných T lymfocytov a ich premenu na efektorové lymocyty. Pri tejto aktivácii sú dôležité kostimulačné molekuly na povrchu DC. V neprítomnosti týchto molekúl na DC sa v T lymfocytoch môže vyvinúť stav anergie alebo Th2 imunitná odpoveď (Thompson et al. 1995). Kostimulácia T lymfocytov cez CD40 na DC je jedným z kľúčových faktorov, ktorý rozhoduje o tom, či sa vyvinie imunitná odpoveď, alebo tolerancia (Hänninen et al. 2002). SC v kokultúre s DC neindukovali ich aktiváciu a prítomnosť CD40 bola výrazne nižšia ako u kontroly (Lee et al. 2008). Tieto fakty naznačujú, že SC sekretujú proteíny, ktoré potlačujú produkciu faktoru na DC dôležitého pre kostimuláciu lymfocytov a tým znižujú pravdepodobnosť aktivácie imunitnej odpovede.

3.1.4 Rezistencia voči apoptóze indukovanej Fas-FasL systémom

Molekula Fas sa nachádza na povrchu aktivovaných buniek v organizme. Po naviazaní FasL na receptor Fas sa v bunke, ktorá má na sebe receptor začne kaskáda vedúca k aktivácii kaspáz a apoptóze. Cytotoxické T lymfocyty sa týmto spôsobom zaslúhajú o zabíjanie buniek transplantovaných tkanív. Apoptózou umierajúce T lymfocyty produkovali IL-10, jeden z cytokínov dôležitých pri Th2 imunitnej odpovedi (Gao et al. 1998) a mohli sa tak vyhnúť zápalovej reakcii. Bunky semenníka exprimujúce FasL prežili alogénnu transplantáciu, zatiaľ čo bunky bez funkčného ligandu boli prudko odhojené (Bellgrau et al. 1995). Transplantácia alogénnych SC s bunkami produkujúcimi inzulín viedla u diabetického potkana k normoglykémii. 100 dní po transplantácii boli prítomné bunky produkujúce inzulín aj SC pozitívne na FasL a infiltrácia lymfocytov bola rapídne znížená oproti kontrole, zatiaľ čo štepy transplantované bez SC boli odhojené cca do 10 dní po operácii. To naznačuje, že molekula FasL na povrchu SC môže hrať určitú rolu v prijatí transplantátu (Korbitt et al. 1997). V podobnom prípade boli u myši detekované molekuly Fas v transplantáte obsahujúcom SC. Receptor Fas bol prítomný a taktiež bola zistená vysoká hladina apoptotických buniek, zatiaľ čo v kontrole bez SC bola apoptotická smrť lymfocytov zistená minimálne (Takeda et al. 1998). Naopak v myši s autoimunitným diabetom bola expresia FasL na SC spojená

s mierne vyššou zápalovou reakciou ako v prípade kde sa použila protilátka proti FasL (Suarez-Pinzon et al. 2000). Rozdiely v týchto dvoch prípadoch môžu byť spôsobené tým, že zatiaľ čo v prvom prípade bol diabetes indukovaný, v druhom prípade bol vyvinutý prirodzene na základe autoimunitného ochorenia. Molekula Fas produkovaná SC, môže mať solubilnú formu, ktorá má antiapoptotické účinky. V prípade, že kultúra SC bola inkubovaná s nízkou hladinou faktoru nekrotizujúceho nádory α (Tumor Necrosis Factor α - TNF α) a IFN γ , bola aktivovaná expresia solubilného Fas. Naopak pri vyššej hladine týchto faktorov bola indukovaná produkcia membránovej formy tohto proteínu, ktorá viedla k apoptóze SC. (Riccioli et al. 2000). Signalizáciou v SC po aktivácii FasL sa spúšťa kaskáda cez medzičlánky Erk/cPLA₂ (kinázy regulované extracelulárnym signálom – Extracellular regulated kinases/ cytozolická fosfolipáza 2- cytosolic Phospholipase 2), ktorá končí zvýšenou expresiou solubilnej formy tohto ligandu. Inhibíciou oboch faktorov sa po indukcií znížila expresia solubilného FasL oproti kontrole, čo malo za následok nižšiu hladinu apoptotických buniek (Ulisse et al. 2000). Sekretovaná forma FasL je dôležitým faktorom, ktorý pomáha SC účinnejšie a rýchlejšie zabiť apoptózou okolité bunky .

Funkcia systému Fas-FasL v ochrane SC pred apoptózou hrá určite svoju rolu, ale to do akej miery a akými spôsobmi sa na ich ochrane podieľa zatiaľ nie je prebádané. Dá sa konštatovať, že na účinnosti tohto systému sa zúčastňuje mnoho faktorov, ktoré sa navzájom ovplyvňujú. Je to napríklad miesto, kde v tele sa SC nachádzajú a s akými bunkami a molekulami prichádzajú do styku.

3.1.5 Rezistencia voči apoptóze indukovanej granzýmom

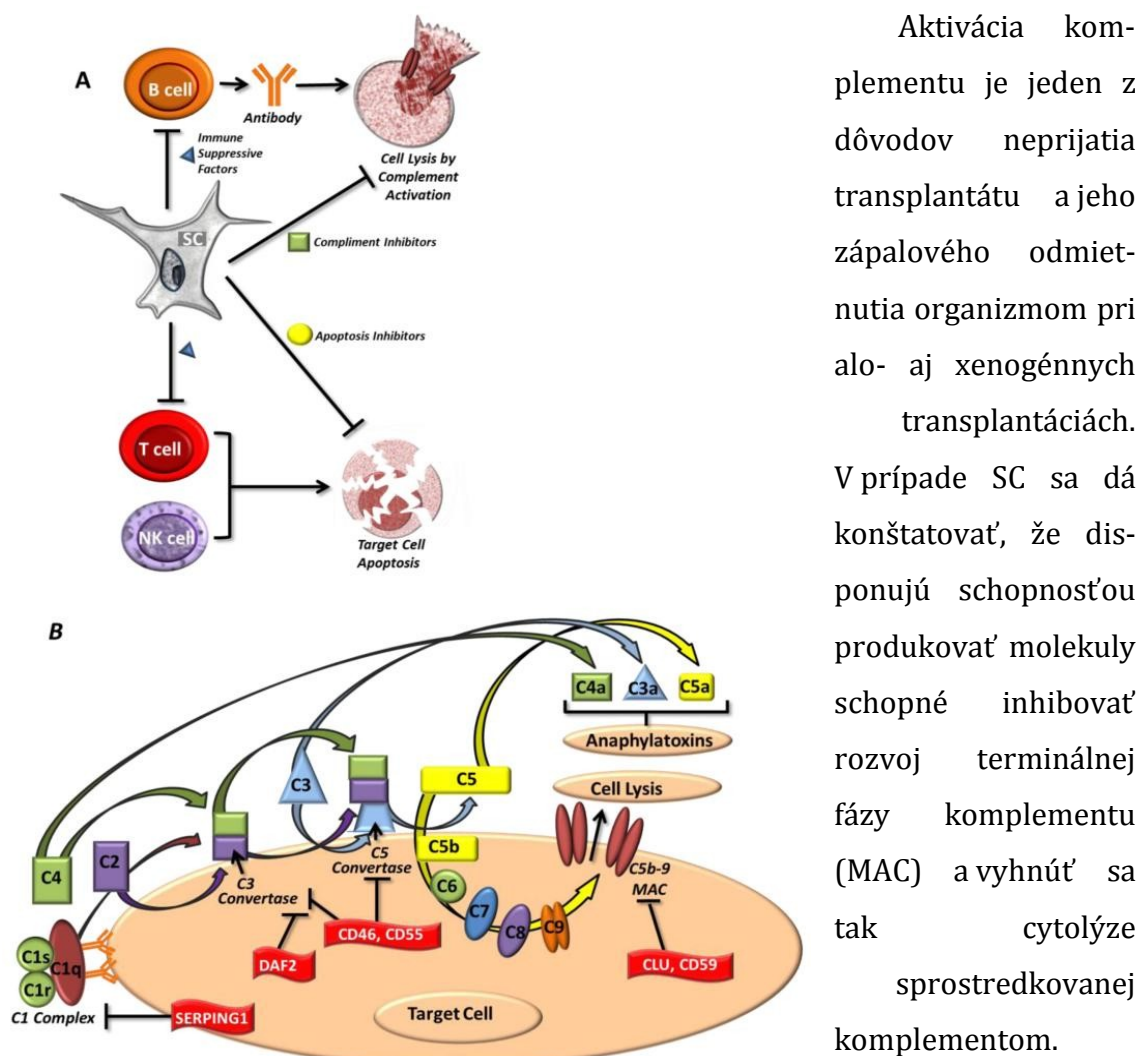
Cytotoxické T-lymfocyty zabíjajú cieľové bunky pomocou Fas-FasL systému, ale taktiež degranulácia a uvoľnenie molekúl ako sú napríklad perforíny a granzým B, je jedným z hlavných mechanizmov aktivujúcich apoptózu. Granzým B, serínová proteáza, sa do cieľovej bunky dostáva endocytózou sprostredkovanou receptorm MPR (Mannose 6-Phosphate Receptor). Inhibícia tohto receptora viedla k zníženiu počtu apoptotických buniek, čo naznačuje úlohu fosforylovaného gran-

zýmu v apoptóze (Motyka et al. 2000). Inhibícia samotnej proteázy by mala teda zastaviť apoptotickú smrť buniek vystavených jej aktivite. Expresia serpínu, proteázového inhibítora 9 (Protease Inhibitor 9- PI-9), bola preukázaná v tkanivách ľudských semenníkov, najviac v SC (Bladergroen et al. 2001). Tento proteín je membránový a teda je schopný ochrániť len SC. Serpíny sú inhibítory proteáz, ktoré tvoria so svojou proteázou ireverzibilný stabilný komplex a tým znemožňujú ich aktivitu (Potempa et al. 1994). K myším bunkám lymfocytickej leukémie (L1210) boli pridané cytotoxické T-lymfocyty, ktoré zapríčinili apoptotickú smrť L1210 buniek. Ak bolo v kultúre médium obohatené o proteíny sekretované SC (Sertoli cell cultured medium- SCCM), počet apoptotických buniek sa rapídne znížil. Pridanie externého granzýmu B nevedlo k fragmentácii DNA a smrti buniek, ale v prípade bez SCCM bola fragmentácia a apoptóza vysoká (Sipione et al. 2006). Je zrejmé, že SC produkujú solubilný proteín, ktorý je schopný inhibovať aktivitu granzýmu B. Sérový serínový proteázový inhibítor klád A, člen 3N (Serine Protease Inhibitor A, member 3N- serpin3n), sekretovaný SC tvorí kovalentný komplex s granzýmom B a tým inhibuje jeho aktivitu. Transgénne bunky produkujúce serpin3n boli schopné zastaviť apoptózu buniek L1210 podobne ako SC (Sipione et al. 2006).

SC sú schopné vyhnúť sa obom indukciám apoptotickej smrti, ktorú v nich aktivujú efektorové T-lymfocyty. V prípade degranulácie je pri ochrane dôležitá inhibícia granzýmu B. SC produkujú membránovú aj solubilnú formu serpínov, inhibítorov proteázy, ktorá stojí za ich apoptotickou smrťou. Ochraňujú pred T-lymfocytmi seba aj prípadné susediace bunky, ktoré sú od nich v dostatočnej blízkosti.

3.2 Komplement

Komplementový systém pozostáva z viac ako 30 sérových a membránových proteínov. Po jeho aktivácii rôznymi podnetmi dôjde ku kaskáde reakcií medzi proteínmi navzájom a s inými zložkami imunitného systému. SC exprimujú proteíny, ktoré ovplyvňujú komplement a sú schopné sa vyhnúť lýze. SC izolované z novorodených prasiat (Neonatal Porcine Sertoli Cells- NPSC) boli vystavené ľudskému séru a králičiemu komplementu. Sérum obsahovalo protilátky proti povrchovým molekulám SC a po detekcii boli na povrchu SC zistené IgM a IgG (Dufour 2005). NPSC majú na sebe antigény schopné indukovať v ľudskom tele protilátkovú imunitnú odpoveď. Jedným z týchto antigénov je α Gal, ktorý bol ale na NPSC exprimovaný vo výrazne nižšej hladine oproti kontrole, endoteliálnym bunkám aorty prasaťa. Prítomnosť molekuly C4 na povrchu týchto buniek značí aktiváciu klasickej cesty komplementu. Detekcia prítomnosti komplexu atakujúceho membrány (membrane attack complex- MAC) ale mala negatívny výsledok, čo naznačuje, že NPSC sú schopné inhibovať formáciu tohto komplexu a teda sa vyhnúť následnej lýze bunky (Dufour 2005). U myši bola po alotransplantácii SC zistená vyššia hladina CD59 (Cluster of Differentiation 59), ktorý patrí do skupiny proteínov, ktoré regulujú komplement (Complement Regulatory protein- CRP) (Lee, Oh, et al. 2007). Je to transmembránová molekula inhibujúca inzerciu molekuly C9 do póru vznikajúceho po aktivácii komplementu (Meri et al. 1990). Touto inhibíciou sa bunka vyhýba formácii MAC-u na svojom povrchu a jej následnej lýze. Proteín tiež zodpovedný za inhibíciu MAC-u je klusterín, ktorý bol SC produkovaný vo výrazne vyššej hladine oproti kontrole (Yin et al. 2010). Vyššie spomenutá expresia α Gal na povrchu SC, ktorá vykazovala nižšie hladiny ako u kontroly, sa objavila aj u NPSC vystavených ľudskému komplementu (Yin et al. 2010). Proti tejto molekule boli v oboch prípadoch protilátky IgG a IgM v sérach prítomné a opsonizovali SC. Keďže klasická cesta aktivácie komplementu sa odvíja od prítomnosti protilátok na cieľovej bunke, znížená expresia tohto antigénu na SC viedla aj k menšej prítomnosti proteínov komplementu na ich povrchu (Yin et al. 2010).



Obr. 2 A) Cesty akými SC ovplyvňujú IS. B) Komplementová kaskáda a proteíny schopné ju inhibovať. Prevzaté z Kaur, Thompson & Dufour 2014.

3.3 Zvýšenie adhézie buniek a zníženie migrácie leukocytov

Migrácia buniek do miesta zápalu je sprevádzaná zmenami aktínového cytoskeletu a sprostredkovaná povrchovými molekulami na endotelových bunkách ciev. Tieto molekuly taktiež sprostredkujú interakcie medzi APC a T-lymfocytmi. Gény zodpovedné za tieto deje boli identifikované a exprimované v SC. Vyššia hladina expresie mRNA pre *Icam1*, *Vcam1* a *Itgae* bola nameraná v primárnych SC oproti kultivovaným myším SC (Doyle et al. 2012). Po stimulácii myších SC IL-1, TNF α ,

LPS alebo IFN γ bola zvýšená produkcia medzibunkovej adhézneho molekuly-1 (intercellular adhesion molecule-1 – ICAM-1) a adhézneho molekuly vaskulárnych buniek-1 (vascular cell adhesion molecule-1 – VCAM-1) na ich povrchu. Najviac zvýšila expresiu týchto dvoch molekúl TNF α . Pro-zápalové cytokíny, okrem IFN γ , indukovali a expresiu IL-6 SC. Zvýšením produkcie adhézných molekúl sa zvýšila aj adhézia lymfocytov na povrch SC. Použitie protilátok anti-ICAM-1 a anti-VCAM-1 inhibovalo viazanie lymfocytov na SC (Riccioli et al. 1995). To naznačuje, že SC sú schopné interagovať s bunkami imunitného systému a ovplyvňovať ich pohyb. Gény pre α -catenin a adhéznou molekulu medzibunkových spojov 1 (junctional adhesion molecule 1- JAM1) boli exprimované v primárnych SC v relatívne nízkej hladine oproti kontrolným bunkám (myšie SC línia 1 – MSC-1) (Doyle et al. 2012). Tieto dve molekuly boli definované ako dôležité pri transendoteliálnej migrácii lymfocytov (van Buul et al. 2009; Johnson-Léger et al. 2002). Taktiež bola v primárnych SC zvýšená aktivácia RAP1, čo znížilo dynamiku aktínového cytoskeletu (Doyle et al. 2012). Znížená aktivita RhoA GTPázy, ovplyvňujúcej aktínový cytoskelet aj stabilitu medzibunkových spojov, viedla k ich porušeniu spojov medzi bunkami (Katayama et al. 2011). Tieto fakty naznačujú, že imobilizácia aktínových vlákien spolu so zmenami v medzibunkových spojoch môžu viesť k zníženej migrácii leukocytov do miesta zápalu. Histologická analýza štruktúry primárnych SC po transplantácii ukázala ich usporiadanie do tubulárnych štruktúr, zatiaľ čo MSC-1 boli náhodne rozmiestnené a netvorili tubulárne štruktúry (Doyle et al. 2012). Už vyššie spomínaná ablácia androgénového receptora (AR), ktorá v konečnom dôsledku narušila BTB, vyústila v narušenie funkcie semenníkov ako miesta zvýhodneného imunitným systémom (Meng et al. 2011).

V kontexte s uvedenými faktami o funkcii samotných molekúl podieľajúcich sa na bunkových spojoch sa dá konštatovať, že SC pôsobia na IS komplexne. BTB teda pravdepodobne funguje ako fyzická bariéra, ktorá svojimi zložkami zasahuje do schopnosti imunokompetentných buniek dostať sa do adluminálneho kompartmentu znížením ich mobility. Taktiež transplantované SC tvoria tubulárne štruktúry, ktoré im pravdepodobne pomáhajú lepšie modifikovať imunitnú odpoveď cez

molekuly bunčných spojov a tým znížiť migráciu leukocytov. Možnosť SC v príjemcovi vytvoriť ich prirodzenú štruktúru teda napomáha modulácii IS. Mnoho z týchto informácií je ale odvodených na základe génovej expresie SC, nie na základe priamej detekcie daného proteínu a jeho produkcie SC. Téma membránových molekúl v SC a ich funkcii v ochrane SC, poprípade buniek transplantovaných spolu s nimi ešte vyžaduje hlbšie preskúmanie.

4 Klinické aplikácie

SC disponujú významným potenciálom v oblasti transplantačnej imunológie. Ich schopnosť ochrániť po alogénnej aj xenogénnej transplantácii nielen seba, ale aj iné kotransplantované bunky je kľúčová predovšetkým kvôli možnosti vynechať imunosupresívne látky.

4.1 Liečba diabetu s pomocou SC

Doposiaľ bola rozsiahlejším výskumom podrobená možná liečba diabetu 1. typu. Táto liečba spočíva v transplantácii ostrovčekov obsahujúcich β -bunky alebo samotné β -bunky spolu so SC. Transplantácia alogénnych SC spolu s ostrovčkami produkujúcimi inzulín prežili a zvrátili diabetický stav po dobu viac ako 95 dní u každého z recipientných potkanov (Korbitt et al. 1997). V tomto a aj v ďalších prípadoch transplantácií sa uplatňuje schopnosť SC uchrániť okrem seba aj iné bunky, ktoré sú spolu s nimi transplantované. Dôležité je najmä to, že β -bunky pokračujú v produkcii inzulínu v príjemcovi a dokážu tak udržať normoglykémiu. V ďalších štúdiách bola testovaná aj účinnosť metód, ktorými boli SC s bunkami ostrovčekov upravované pred transplantáciou. SC pomohli predĺžiť prežitie a produkciu inzulínu β -buniek konzervovaných pred transplantáciou zmrazením. Zotavenie kultúry ostrovčekov so SC sa po 9 dňoch po rozmrazení zvýšilo o 50% oproti kontrole bez SC. Takto ošetrované bunky po alogénnej transplantácii prežili v príjemcoch po dobu približne 31 dní. V kontrolných skupinách bolo prežitie buniek bez SC dlhé cca 11 dní (Li et al. 2012). Kultivačná metóda „visiacej kvapky“ bola vyskúšaná pri príprave agregátov SC spolu s bunkami ostrovčekov. Agregáty mali sférický tvar a SC boli v jadre zhlukov, zatiaľ čo bunky ostrovčekov boli na periférii týchto útvarov. V takto pripravených agregátoch sa vlastnosti SC nezmenili a β -bunky boli po stimule schopné produkovať inzulín. Po alogénnej transplantácii do pečene diabetických myší vykazovali príjemcovia koagregátov so SC normoglykémiu po dobu 1 dňa a zníženú hladinu glukózy približne 100 dní. Príjemcovia ostrovčekov bez SC mali zníženú hladinu glukózy len po dobu 10 dní. Infiltrácia lymfocytov

bola masívna v oboch prípadoch, ale zatiaľ čo v prípade bez SC došlo k odhojeniu štepu už po 14 dňoch po operácii, v prípade koagregátov so SC boli 120 dní po transplantácii prítomné bunky produkujúce inzulín aj SC a zápalová reakcia nebola aktivovaná. V žiadnom z týchto prípadov neboli používané imunosupresívne látky (Takemoto et al. 2014). Metódy akými sú bunky pred transplantáciami upravené určite hrajú rolu v úspešnosti a v dobe prežitia štepov. V každej z metód ale použitie SC indukovalo ochranu buniek transplantovaných spolu s nimi, predĺžilo ich prežitie oproti skupinám bez SC a pomohlo dosiahnuť na určitú dobu zníženie hladiny glukózy alebo normoglykemický stav. SC sú ochranným faktorom pre kotransplantované bunky ostrovčekov produkujúcich inzulín a preto sú potenciálnym riešením transplantácií bez imunosupresív.

Xenogénne SC sú schopné podporiť prijatie alogénnych ostrovčekov. NPSC transplantované pod obličkovú kapsulu diabetického potkana spolu s alogénnymi bunkami ostrovčekov prežili po dobu cca 8-9 dní. Po 2 dňoch po transplantácii vykazovali potkani normoglykémiu. Ak bol počet kotransplantovaných NPSC zvýšený o jeden rád, bol čas prežitia transplantovaných buniek v príjemcovi predĺžený na približne 15-18 dní. Po histologickej analýze sa ukázala nízka infiltrácia lymfocytov oproti kontrolným príjemcom bez SC. Pri odhojení transplantátov sa v každom z prípadov, či už so SC alebo bez, detekovala masívna infiltrácia lymfocytov, naznačujúca zápalovú rejekciu štepov (Yin et al. 2009). Použitie xenogénnych SC na ochranu xenogénne transplantovaných buniek v tele bolo v 4 ročnej štúdii skúmané aj na človeku. Prasacie Langerhansove ostrovčeky kultivované so SC obalenými kolagénovou kapsulou boli transplantované do 12 pacientov trpiacich diabetom 1. typu v priemernom veku 14,7 roka bez použitia imunosupresív. Po dobu 4 rokov boli monitorované ich potreby na dodávanie inzulínu, hladinu glukózy v krvi a hladinu glykozilovaného hemoglobínu v krvi. Polovica pacientov vykazovala o 50% nižšiu potrebu exogénneho inzulínu po 1. a 2. roku po transplantácii. 1 pacient vykazoval produkciu prasacieho inzulínu po dobu 28 mesiacov a dvaja z pacientov po dobu 4 rokov. Táto štúdia ukázala schopnosť SC predĺžiť prežitie SC aj Langerhansových ostrovčekov po kotransplantácii a zaistiť tak produkciu inzu-

línu a glukagónu po dobu 3-4 rokov od prvých transplantácií. V kontrolnej skupine, ktorá nepodstúpila transplantáciu sa požiadavky na externé dodanie inzulínu nezmenili, možno mierne zvýšili (Valdés-González et al. 2005).

Liečba diabetu 1. typu za pomoci SC u ľudí a jej zaradenie do praxe je síce otázka vzdialenej budúcnosti, ale vyššie uvedené výsledky štúdií naznačujú túto možnosť. SC sú schopné pomôcť bunkám produkujúcim inzulín prežiť v príjemcovi alogénnu aj xenogénnu transplantáciu a tieto bunky si po operácii po určitú dobu udržiavajú schopnosť znížiť hladinu glukózy v krvi príjemcu, poprípade udržiavať normoglykémiu.

4.2 Terapeutický proteín vnesený do SC

Imunomodulačné schopnosti SC sa dajú použiť aj v prípade, že sa aplikuje jednoduchšia stratégia a fakt, že SC ochraňujú po transplantácii samé seba. Pozmeniť expresiu proteínov alebo vnieť do SC proteín podľa vlastnej potreby, je jedna z možností ako liečiť napríklad Parkinsonovu chorobu alebo diabetes.

SC izolované z transgéennej myši produkujúcej zelený fluorescenčný proteín (Green Fluorescence Protein- GFP) boli transplantované do myší bez funkčného IS a do myší s funkčným IS. Skúmaná bola schopnosť SC prežiť v týchto dvoch recipientných skupinách a ich produkcia proteínu GFP. Obe skupiny po transplantácii boli pozitívne na SC a nimi produkovaný GFP. V myši s funkčným IS bolo 50% štepov pozitívnych na GFP a na proteín charakteristický pre SC a infiltrácia lymfocytov bola nízka (Dufour et al. 2004). To naznačuje, že SC sú schopné prežiť alogénnu transplantáciu aj po zásahu do ich genómu a produkovať vnesený proteín v príjemcovi. Gén pre terapeuticky významný proteín, inzulín, bol vnesený do SC pomocou cDNA adenovírusového vektora. Takto upravené prasacie SC boli xenogénne transplantované do diabetickej myši so závažnou kombinovanou imunodeficienciou (Severe Combined Immunodeficiency- SCID). Tieto bunky produkovali a sekretovali inzulín a znížili tak u diabetickej myši hladinu glukózy v krvi už prvý deň po transplantácii. Vyšší počet transplantovaných NPSC vyústil v predĺženie doby udržania nízkej hladiny glukózy na 5 dní. Povaha adenovírusového vektora

a fakt, že SC sa v príjemcoch množili zapríčinilo zníženie produkcie inzulínu a návrat do diabetického stavu do 15 dní (Halley et al. 2010). SC si teda udržujú po transplantácii schopnosť produkovať biologicky aktívny proteín v tele príjemcu po xenogénnej transplantácii. Je ale dôležité pripomenúť, že v tejto štúdii boli použité myši bez funkčného IS a že odhojenie transplantátu alebo narušenie funkcie SC činnosťou IS bolo vylúčené. Pre otestovanie rizika odhojena v príjemcovi s funkčným IS, boli SC alogénne transplantované do diabetickej myši s funkčným IS bez použitia imunosupresív. SC produkovali inzulín vďaka lentivírusovému vektoru a 50 dní po transplantácii prežilo 75% štepov. Myši ale ostali po operácii diabeticke a inzulín bol detekovaný v minimálnych množstvách, zatiaľ čo jeho mRNA bola produkovaná počas celej štúdie (Kaur, Thompson, Pasham, et al. 2014).

Transgénne SC sú schopné prežiť xeno- aj alotransplantáciu a v príjemcoch produkovať minimálnu alebo vyššiu hladinu vloženého proteínu. Problém je hlavne v udržaní stálej produkcie daného proteínu. Expresia proteínu je ovplyvnená povahou vektora a pravdepodobne aj IS príjemcu, ktorý možno ovplyvňuje činnosť a produkciu proteínov SC. V prípade aplikácie SC do klinickej praxe je ešte potreba vykonať mnoho štúdií. Doterajšie poznatky zatiaľ avšak nijak nevylúčili možnosť používania SC v budúcnosti pri liečbe niektorých chorôb.

5 Záver

SC sú významnými somatickými bunkami podieľajúcimi sa na správnom priebehu spermatogenézy. Sekretujú molekuly, ktoré ovplyvňujú budúce spermatické bunky a bez ktorých by neprebehol správny vývoj spermií. Sú teda bunkami dôležitými pre fertilitu samcov a udržanie kontinuity druhu.

SC produkujú aj molekuly, ktoré neovplyvňujú spermatogézu, ale zasahujú do funkcie IS. Cez dendritické bunky SC ovplyvňujú aktiváciu cytotoxických T-lymfocytov. Po styku so SC z naivných T-lymfocytov vzniknú regulačné lymfocyty, zabezpečujúce imunitnú toleranciu. Po aktivácii imunitnej odpovede voči SC sa angažujú ďalšie proteíny a molekuly, ktoré smerujú imunitnú odpoveď na protizápalový typ Th2. SC sa taktiež bránia voči zložkám komplementu. Inhibujú tvorbu MAC a vyhýbajú sa tak cytolýze. Apoptóza aktivovaná granzýmom B alebo systémom Fas-FasL je taktiež zastavená a SC sú voči nej rezistentné. Indukcia zápalu je sprevádzaná diapedézou imunokompetentných buniek, ktorú SC pravdepodobne tiež ovplyvňujú a sú schopné spomaliť alebo zastaviť extravazáciu leukocytov cez endotel ciev. Spolu tieto fakty naznačujú komplexnú sieť membránových aj solubilných proteínov a dejov, ktoré vedú k ovplyvneniu IS, zmene imunitnej odpovede a protekcii SC a s nimi transplantovaných buniek pri styku s IS.

Bunky transplantované do príjemcu spolu so SC sú nimi ochraňované a ponechávajú si pôvodné vlastnosti. Tento fakt môže byť využívaný pri liečbe chorôb, kde boli pôvodné bunky zlikvidované IS. Sľubná je možnosť takto liečiť diabetes 1.typu a to transplantáciou buniek produkujúcich inzulín spolu so SC. Aplikovateľnosť tejto možnosti bola vyskúšaná aj u človeka, kde sa podarilo u 2 detí po dobu 4 rokov znížiť nároky na inzulín. Podobne sa dá využiť, že transgénne SC po transplantácii do príjemcu pokračujú v produkcii vloženého proteínu. Takýmto spôsobom budú možno v budúcnosti liečené choroby, pri ktorých je porucha tvorby proteínu a je dôležité udržať napríklad jeho bazálnu sekréciu.

Schopnosti SC boli spoľahlivo dokázané, ale ich aplikácia a uplatnenie v klinickej praxi si žiada ešte rozsiahle štúdie. Dúfam, že moja naväzujúca diplomová prá-

ca, skúmanie modulačných vlastností SC medzi druhmi, aspoň čiastočne dopomôže k tomuto cieľu.

Použitá literatúra

- Akmal, K.M., 1997. Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biology of Reproduction*, 56(2), s.549–556
- Barakat, B. et al., 2008. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction*, 136(3), s.345–359
- Bellgrau, D. et al., 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, 377(6550), s.630–632
- Bilate, A.M. & Lafaille, J.J., 2012. Induced CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annual Review of Immunology*, 30(1), s.733–758
- Bladergroen, B.A. et al., 2001. The Granzyme B Inhibitor, Protease Inhibitor 9, Is Mainly Expressed by Dendritic Cells and at Immune-Privileged Sites. *The Journal of Immunology*, 166(5), s.3218–3225
- van Buul, J.D., van Alphen, F.P. & Hordijk, P.L., 2009. The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes. *International journal of biological sciences*, 5(7), s.695–705
- Campese, A.F. et al., 2014. Mouse Sertoli cells sustain de novo generation of regulatory T cells by triggering the notch pathway through soluble JAGGED1. *Biology of reproduction*, 90(3), s.53
- Dal Secco, V. et al., 2008. Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. *Biology of reproduction*, 78(2), s.234–42
- Doyle, T.J. et al., 2012. Immunoprotective Properties of Primary Sertoli Cells in Mice: Potential Functional Pathways that Confer Immune Privilege. *Biology of Reproduction*, 86(1), s.1–14
- Dufour, J.M., 1999. Cellular and Subcellular Localization of Six Retinoid Receptors in Rat Testis During Postnatal Development: Identification of Potential

- Heterodimeric Receptors. *Biology of Reproduction*, 61(5), s.1300–1308.
- Dufour, J.M. et al., 2004. Genetically engineered Sertoli cells are able to survive allogeneic transplantation. *Gene Therapy*, 11(8), s.694–700
- Dufour, J.M. et al., 2003. Long-term survival of neonatal porcine Sertoli cells in non-immunosuppressed rats. *Xenotransplantation*, 10(6), s.577–586.
- Dufour, J.M., 2005. Neonatal Porcine Sertoli Cells Inhibit Human Natural Antibody-Mediated Lysis. *Biology of Reproduction*, 72(5), s.1224–1231
- Dym, M. & Fawcett, D.W., 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction*, 3(3), s.308–26
- Eto, K. et al., 2012. Nociceptin is upregulated by FSH signaling in Sertoli cells in murine testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(4), s.678–683
- Eto, K., Shiotsuki, M. & Abe, S., 2013. Nociceptin Induces Rec8 Phosphorylation and Meiosis in Postnatal Murine Testes. *Endocrinology*, 154(8), s.2891–2899.
- Fan, H. et al., 2009. Induction of antigen-specific immune tolerance by TGF-beta-induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2(3), s.212–20
- Fujisawa, M. et al., 1998. Stem cell factor in human seminal plasma as a marker for spermatogenesis. *Urology*, 51(3), s.460–463
- Gao, Y. et al., 1998. Antiinflammatory Effects of CD95 Ligand (FasL)-induced Apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(5), s.887–896
- Griswold, M.D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(4), s.411–416
- Hakovirta, H., 1999. Function of Stem Cell Factor as a Survival Factor of Spermatogonia and Localization of Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Seminiferous Epithelium. *Endocrinology*, 140(3), s.1492–1498
- Halley, K. et al., 2010. Delivery of a therapeutic protein by immune-privileged sertoli cells. *Cell Transplantation*, 19(12), s.1645–1657
- Hänninen, A. et al., 2002. Transient blockade of CD40 ligand dissociates pathogenic

- from protective mucosal immunity. *The Journal of clinical investigation*, 109(2), s.261–7
- Chen, C. et al., 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 436(7053), s.1030–1034
- Johnson-Léger, C.A. et al., 2002. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*, 100(7), s.2479–86
- Johnston, D.S. et al., 2011. Stage-Specific Changes in GDNF Expression by Rat Sertoli Cells: A Possible Regulator of the Replication and Differentiation of Stem Spermatogonia. *Biology of Reproduction*, 85(4), s.763–769
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30(1), s.531–564.
- Katayama, K. et al., 2011. Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), s.7607–12
- Kaur, G., Thompson, L.A., Pasham, M., et al., 2014. Sustained expression of insulin by a genetically engineered sertoli cell line after allotransplantation in diabetic BALB/c mice. *Biology of reproduction*, 90(5), s.109
- Kaur, G., Thompson, L.A. & Dufour, J.M., 2014. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, s.36–44
- Korbitt, G.S., Elliott, J.F. & Rajotte, R. V, 1997. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression. *Diabetes*, 46(2), s.317–22
- Kubota, H., Avarbock, M.R. & Brinster, R.L., 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), s.16489–16494
- Lee, H.-M. et al., 2008. Mechanism of humoral and cellular immune modulation provided by porcine sertoli cells. *Journal of Korean medical science*, 23(3), s.514–20

- Lee, H.-M., Oh, B.C., et al., 2007. Role of complement regulatory proteins in the survival of murine allo-transplanted Sertoli cells. *Journal of Korean medical science*, 22(2), s.277–82
- Lee, H.-M., Lim, H.-G., et al., 2007. Systemic immune modulation using chemokine receptor 7 expressing porcine Sertoli cells. *Xenotransplantation*, 14(6), s.619–626
- Li, Y. et al., 2012. Decreasing Loss of Cryopreserved-Thawed Rat Islets by Coculture with Sertoli Cells. *Transplantation Proceedings*, 44(5), s.1423–1428
- Lim, H.-G. et al., 2009. Cell-mediated Immunomodulation of Chemokine Receptor 7-expressing Porcine Sertoli Cells in Murine Heterotopic Heart Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 28(1), s.72–78
- Maeda, T. et al., 2007. Transport of Organic Cations across the Blood–Testis Barrier. *Molecular Pharmaceutics*, 4(4), s.600–607
- Manova, K. et al., 1990. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), s.1057–69
- Meng, J. et al., 2011. Sertoli Cell-Specific Deletion of the Androgen Receptor Compromises Testicular Immune Privilege in Mice. *Biology of Reproduction*, 85(2), s.254–260
- Meri, S. et al., 1990. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*, 71(1), s.1–9
- Mirzapour, T. et al., 2012. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia*, 44, s.41–55
- Morales, C., 1987. Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. *Biology of Reproduction*, 37(4), s.995–1005.
- Motyka, B. et al., 2000. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell-Induced Apoptosis. *Cell*, 103(3), s.491–500.

- Moyers, C. & Droege, W., 1983. Antigenically activated helper T cells are required as stimulator cells for optimal activation of cytotoxic T lymphocytes under conditions of limiting helper factors. *Cellular Immunology*, 75(1), s.1–12.
- Naughton, C.K. et al., 2006. Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate. *Biology of Reproduction*, 74(2), s.314–321
- O’Rand, M.G. & Romrell, L.J., 1977. Appearance of cell surface auto- and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Developmental Biology*, 55(2), s.347–358
- Oatley, J.M. et al., 2006. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), s.9524–9
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R. & Brinster, R.L., 2007. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Regulation of Genes Essential for Self-renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells Is Dependent on Src Family Kinase Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), s.25842–25851
- Pelletier, R.-M., 1986. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *American Journal of Anatomy*, 175(1), s.91–117
- Potempa, J., Korzus, E. & Travis, J., 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 269(23), s.15957–60
- 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), s.199–208
- Raverdeau, M. et al., 2012. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), s.16582–16587
- Riccioli, A. et al., 1995. Inflammatory mediators increase surface expression of

- integrin ligands, adhesion to lymphocytes, and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), s.5808–5812
- Riccioli, A. et al., 2000. TNF- and IFN- Regulate Expression and Function of the Fas System in the Seminiferous Epithelium. *The Journal of Immunology*, 165(2), s.743–749
- Rossi, P. et al., 1993. Follicle-Stimulating Hormone Induction of Steel Factor (SLF) mRNA in Mouse Sertoli Cells and Stimulation of DNA Synthesis in Spermatogonia by Soluble SLF. *Developmental Biology*, 155(1), s.68–74.
- Russell, L., 1977. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 148(3), s.313–328
- Ryan, P.C. & Fitzpatrick, J.M., 1986. Experimental testicular torsion: Do spermatozoal autoantigens cause immunological activation? *World Journal Of Urology*, 4(2), s.92–99
- Sandlow, J.I. et al., 1996. Expression of c-KIT and Its Ligand, Stem Cell Factor, in Normal and Subfertile Human Testicular Tissue. *Journal of Andrology*, 17(4), s.403–408.
- Selawry, H.P. et al., 1991. Production of a factor, or factors, suppressing il-2 production and t cell proliferation by sertoli cell-enriched preparations. *Transplantation*, 52(5), s.846–850
- Shamekh, R. et al., 2006. Sertoli Cells Induce Systemic Donor-Specific Tolerance in Xenogenic Transplantation Model. *Cell Transplantation*, 15(1), s.45–53.
- Simoni, M., Gromoll, J. & Nieschlag, E., 1997. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology 1. *Endocrine Reviews*, 18(6), s.739–773
- Sipione, S. et al., 2006. Identification of a Novel Human Granzyme B Inhibitor Secreted by Cultured Sertoli Cells. *The Journal of Immunology*, 177(8), s.5051–5058
- Suarez-Pinzon, W. et al., 2000. Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from

- autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. *Diabetes*, 49(11), s.1810–1818
- Tajima, Y. et al., 1991. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cells and is defective in SId mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 113(3), s.1031–5
- Takeda, Y. et al., 1998. Protection of islet allografts transplanted together with Fas ligand expressing testicular allografts. *Diabetologia*, 41(3), s.315–321.
- Takemoto, N. et al., 2014. Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet cells into liver without immunosuppression. *Transplantation*, 97(3), s.287–93.
- Thompson, C.B. et al., 1995. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell*, 81(7), s.979–82
- Ulisse, S. et al., 2000. Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(10), s.916–924
- Valdés-González, R.A. et al., 2005. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 153(3), s.419–27.
- Yang, Q.-E. et al., 2013. CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *Journal of cell science*, 126(Pt 4), s.1009–20.
- Yin, Z. et al., 2009. Cotransplantation With Xenogenetic Neonatal Porcine Sertoli Cells Significantly Prolongs Islet Allograft Survival in Nonimmunosuppressive Rats. *Transplantation*, 88(3), s.339–345.
- Yin, Z. et al., 2010. Resistance of neonatal porcine Sertoli cells to human xenoantibody and complement-mediated lysis is associated with low expression of α -Gal and high production of clusterin and CD59. *Xenotransplantation*, 17(3), s.215–223
- Yoon, K.-A., Chae, Y.-M. & Cho, J.-Y., 2009. FGF2 stimulates SDF-1 expression through the *Erm* transcription factor in Sertoli cells. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), s.245–256

Yoshinaga, K. et al., 1991. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development (Cambridge, England)*, 113(2), s.689–99

Zhang, X. et al., 2014. Lipopolysaccharide inhibits the self-renewal of spermatogonial stem cells in vitro via downregulation of GDNF expression in Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, 45, s.87–93

