

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Monika Bláhová

Vývoj a optimalizace přípravy řezových preparátů pulců
X. tropicalis pro studium migračního a diferenciačního
potenciálu testikulárních kmenových buněk

Development and optimization of sectioning technique for the
study of migration and differentiation potential of testicular stem
cells in *X. tropicalis* tadpoles

Vedoucí závěrečné práce:

doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2019

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, dne

Podpis

Poděkování

Poděkování patří mému vedoucímu práce doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D., díky jeho přehledu, spolupráci a vedení vznikla tato diplomová práce. Také chci poděkovat své kolegyni Mgr. Xuan Nguyen, Ph.D., která se nemalým podílem zasadila o vývoj nové metodiky. Dík patří též Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D., RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D., Mgr. Markétě Vegrachtové, Mgr. Janu Štundlovi, RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., Mgr. Karolíně Strnadové, Tereze Kratochvílové a Janě Dvořákové za pomoc, psychickou podporu i rady.

Abstrakt

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) díky svým vlastnostem diferencovat v jiné buněčné typy a migrovat do místa poranění našly široké využití v regenerativní medicíně. Jejich snadná dostupnost spolu se schopností modulovat imunitní systém je předurčuje k léčbě autoimunitních onemocnění nebo obnově poraněných tkání. Stejně jako MSC i Sertoliho buňky (SeC) nacházející se ve varleti mají velmi podobné vlastnosti.

V laboratoři školitele byla založena buněčná kultura testikulárních kmenových buněk z varlat juvenilních samců drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*) (XtTSC). Kvůli jejich vizualizaci *in vivo* byla tato kultura buněk vykazující vlastnosti MSC a SeC transformována plasmidovým vektorem kódujícím červený fluorescenční protein RFP. Cílem této diplomové práce bylo zkoumat chování transformovaných XtTSC v živém organismu. Z tohoto důvodu byly buňky transplantovány do pulců *X. tropicalis* ve stádiu 41. Následně byl vyhodnocen jejich migrační potenciál. Aby bylo možné studovat také diferenciační potenciál těchto buněk, bylo nezbytné zavést spolehlivou techniku přípravy řezových preparátů.

Na základě provedených experimentů se podařilo zjistit, že buněčná kultura XtTSC obsahuje prekurzory SeC a peritubulárních myoidních buněk, avšak *in vivo* buňky zřejmě přechází do dediferencovaného stavu podobného MSC, který jim umožňuje migraci po těle pulce.

Klíčová slova: testikulární kmenové buňky, *Xenopus tropicalis*, diferenciace

Abstract

Thanks to their ability to differentiate into variable cell types and migrate to the site of an injury mesenchymal stem cells (MSC) are broadly used in regenerative medicine. Their relative easy availability together with the property to control the immune system determines them as a cure of autoimmune diseases or a recovery of wounded tissues. Similar features possess Sertoli cells which take place in the seminiferous tubule of testis.

Cell culture of testicular stem cells from juvenile male testes of *X. tropicalis* (XtTSC) was established in supervisor's laboratory. This cell culture showing both MSC's and SeC's properties was transformed to carry red fluorescent protein RFP. The aim of this diploma thesis was to investigate an behavior of transformed XtTSC in living organism, therefore cells were transplanted into the *X. tropicalis* tadpoles in stage 41. Subsequently, their migration potential was explored. To study of XtTSC's differentiation potential it was necessary to introduce a reliable sectioning techniques for the subsequent immunohistochemical analysis.

Based on our experiments, we found that the XtTSC's cell culture contains precursors of SeC and peri-tubular myoid cells, however *in vivo* these cells turned into the dedifferentiated MSC-like state allowing a strong migration through the tadpole's body.

Key words: testicular stem cells, *Xenopus tropicalis*, differentiation

1. Obsah

1	Zkratky	1
2	Úvod.....	3
3	Literární přehled	4
3.1	Kmenové buňky	4
3.1.1	Mesenchymální kmenové buňky.....	4
3.1.2	Testikulární kmenové buňky	7
3.2	Samčí pohlavní ústrojí – varlata	7
3.2.1	Struktura varlete	8
3.2.2	Hlavní buněčné typy	10
3.2.2.1	Leydigovy buňky	11
3.2.2.2	Peritubulární myoidní buňky.....	12
3.2.2.3	Sertoliho buňky	12
3.2.2.4	Pohlavní buňky – Záradečné buňky.....	14
3.3	Modelový organismus – rod <i>Xenopus</i>	15
3.4	Histologické metody - příprava řezových preparátů	16
4	Cíle.....	20
4.1	Studium migračního potenciálu transfekovaných testikulárních kmenových buněk (XtTSC) u pulců <i>X. tropicalis</i>	20
4.2	Optimalizace metody pro přípravu řezových preparátů.....	20
4.3	Studium migračního a diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk (XtTSC) na řezových preparátech pulců <i>X. tropicalis</i>	20
5	Materiály.....	21
5.1	Modelové organismy	21
5.2	Roztoky	21
5.2.1	Roztoky na IVF (<i>In Vitro</i> Fertilization)	21
5.2.2	Roztoky pro transplantační experimenty.....	22

5.2.3	PBS	22
5.2.4	Fixační roztoky.....	22
5.2.5	Roztoky pro kryosekce	22
5.2.6	Roztoky pro přípravu vibratomových řezů	22
5.2.7	Blokovací roztok	23
5.2.8	Bělicí roztok (bleaching solution).....	23
5.2.9	Benzparafín	23
5.3	Chemikálie	23
5.4	Další materiály	24
5.4.1	Antibiotika	24
5.4.2	Hormony	24
5.4.3	Protilátky.....	24
5.4.4	Materiál pro přípravu řezových preparátů	24
5.4.5	Přístroje	25
6	Metody	25
6.1.1	Transgenní testikulární buněčná kultura.....	26
6.2	IVF	26
6.3	Transplantace	27
6.4	Pozorování mikroinjikovaných embryí <i>X. tropicalis</i> a řezových preparátů...28	
6.5	Optimalizace metody přípravy řezových preparátů	28
6.5.1	Parafínové řezy.....	28
6.5.2	Kryosekce.....	29
6.5.2.1	Prosycení preparátů sacharózou a želatinou	29
6.5.3	Vibratom – příprava řezových preparátů.....	30
6.6	Imunohistochemické metody.....	30
7	Výsledky.....	32

7.1	Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk <i>X. tropicalis</i>	32
7.2	Optimalizace metody přípravy řezových preparátů	33
7.2.1	Mikrotom (data nezveřejněna)	33
7.2.2	Kryořezy	34
7.2.3	Vibratom	35
7.3	Studium diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk <i>X. tropicalis</i>	38
8	Diskuze	43
8.1	Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk XtTSC u pulců <i>X. tropicalis</i>	43
8.2	Optimalizace metody pro přípravu řezových preparátů	44
8.3	Studium diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk XtTSC u řezových preparátů pulců <i>X. tropicalis</i>	47
9	Závěr	52
10	Literatura	53

1 Zkratky

ALC	Adult Leydig cells / dospělé Leydigovy buňky
APC	Antigen presenting cells / antigen prezentující buňky
APTS	γ -AminoPropylTrietoxySilan
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndol
DNA	DeoxyriboNucleic Acid / deoxyribonukleová kyselina
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetic Acid
EPO	ErythroPOetin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter / třídíč buněk aktivovaný fluorescencí
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal Bovine Serum / fetální hovězí sérum
FLC	Fetal Leydig cells / fetální Leydigovy buňky
GSC	Germ stem cells / zárodečné kmenové buňky
HEPES	2-[4-(2-HydroxyEthyl)Piperazin-1-yl]EthaneSulfonic acid
hCG	human ChorioGonadotropine / lidský choriogonadotropin
IC	Imprinting Cytology / „obtisková“ cytologie
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3 – DiOxygenase
LC	Leydig cells / Leydigovy buňky
IL-10	Interleukin - 10
IVF	<i>In Vitro</i> fertilization / umělé oplodnění
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LMA	Low melting point agarose / agaróza tající při nízkých teplotách
MHC	Major Histocompatibility Complex / Hlavní histokompatibilní komplex
MEMFA	MOPS + EGTA + Magnesium sulfate + FormAldehyde buffer
MOPS	3-(N-MORpholino)PropaneSulfonic acid
MMR	Mark's Modified Ringers buffer
MSC	Mesenchymal Stem Cell / mesenchymální kmenové buňky

MyoD	Myogenic Differentiation protein / myogenický diferenciační protein
PBS	Phosphate Buffered Saline / pufovaný fyziologický roztok
PBST	PBS + Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerázová řetězová reakce
PGC	Primordial germ cells / primordiální zárodečné buňky
PTMC	PeriTubular Myoid Cell / peritubulární myoidní buňky
RFP	Red Fluorescent Protein / červený fluorescenční protein
RLSC	Resident Liver Stem Cells / rezidentní jaterní kmenové buňky
RNA	RiboNucleic Acid / ribonukleová kyselina
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
SC	Stem Cells / kmenové buňky
SeC	Sertoli Cells / Sertoliho buňky
SMA	Smooth Muscle Actin / actin hladké svaloviny
SOX	SRY-related HMG-box / se SRY příbuzný protein z HMG skupiny
SRY	Sex-determining region Y / oblast Y rozhodující o pohlaví
SSC	Spermatogonial stem cells / spermatogoniální kmenové buňky
SPRF	Self-Pressurized Rapid Freezing / „samopřetlakové rychlomrazování“
TGFβ	Transforming Growth Factor β / transformující růstový faktor β
TNB	Tris-NaCl-Blocking buffer / tris-NaCl-blokovací pufr
TSC	Testicular Stem Cell / testikulární kmenové buňky
XtTSC	<i>Xenopus tropicalis</i> Testicular Stem Cell / testikulární kmenové buňky odvozené od <i>X. tropicalis</i>

2 Úvod

Dnes, více než kdy dříve, se lidé při zdravotních komplikacích spoléhají na poznatky klasické medicíny. Řada nových terapeutických postupů zaměřených na léčbu nejrůznějších tělesných obtíží od nádorových onemocnění až po zranění pohybového ústrojí je založena na aplikaci kmenových buněk (Mardones et al. 2017, Zhang et al. 2016). Etické normy omezují využití embryonálních kmenových buněk, a proto se v zájmu regenerativní medicíny objevily mesenchymální kmenové buňky (MSC).

Ačkoliv MSC nemají tak rozsáhlý diferenciační potenciál jako embryonální kmenové buňky, jsou díky svým poměrně snadným způsobům získání a schopnosti migrovat po těle vhodnými kandidáty pro léčebné účely. MSC je možné získat skoro ze všech orgánů a tkání dokonce i dospělého organismu (Squillaro et al. 2016). Nepřehlédnutelnou vlastností MSC je také jejich imunomodulační působení. Dokážou ovlivňovat jak specifickou, tak nespecifickou imunitu nejen pomocí parakrinního působení, ale také přímým kontaktem s imunitními buňkami (Gao et al. 2016).

Velmi podobnými mechanismy působí na imunitní systém i Sertoliho buňky (SeC) (Gong et al. 2017). V prenatálním období jedince jsou SeC klíčovými regulátory správného vývoje samčích pohlavních orgánů. Po narození SeC udržují ve varlatech homeostázi pro správný vývoj spermií a zároveň chrání vyvíjející se pohlavní buňky před imunitním systémem. Také SeC jsou využívány k léčení závažných onemocnění jako je například diabetes typu 1 (Fallarino et al. 2009).

V laboratoři školitele se podařilo vytvořit kulturu testikulárních kmenových buněk z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* (XtTSC), která *in vitro* vykazovala charakter MSC a SeC. Buněčná kultura XtTSC byla transformována nukleofekčními činidly, aby buňky exprimovaly červený fluorescenční protein RFP.

Výzkum této diplomové práce byl zaměřen na studium vlivu transformovaných XtTSC na živý organismus po jejich transplantaci do dorzálního peritonea pulců *X. tropicalis*. Pro další experimenty bylo nezbytné vyvinout spolehlivou metodu přípravy řezových preparátů, která by umožňovala sledovat morfologii buněk i okolních tkání a umožňovala zkoumání diferenciačního potenciálu XtSC pomocí imunohistochemického značení.

3 Literární přehled

3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (SC) zajišťují výstavbu a obnovu organismu. Mezi jejich typické rysy patří sebeobnova a možnost vyvinout se v konkrétní buněčný typ. SC se také vyznačují setrváním v tzv. G0 fázi. Je to určitý souhrn procesů, při kterém buňka udržuje nízkou buněčnou aktivitu, aby předešla poškození DNA a jiných důležitých molekul a nevystavovala se oxidativnímu stresu. V literatuře se tento stav označuje také jako *quiescentní* stav (Oulhen a Wessel 2017). Aby si zachovaly svůj kmenový charakter, musejí se dělit asymetricky. Z mateřské buňky tak vzejdou dvě dceřinné buňky, z nichž jedna zůstává kmenovou a druhá nastoupí diferenciační dráhu a dá vzniknout specifické buňce určité tkáně. Díky této schopnosti jsou kmenové buňky ve středu zájmů hlavně v oblasti regenerativní medicíny (Wei et al. 2013).

Na základě diferenciačního potenciálu se SC dělí na: totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní. Totipotentní buňky jsou pouze zygota a buňky vzniklé v prvních děleních po oplození oocyty. Ty dávají vzniknout celému embryu a také extraembryonálním tkáním. V průběhu vývoje jedince SC svůj diferenciační potenciál ztrácejí. V dospělém organismu se SC nacházejí jen na určitých místech, ze kterých se uvolňují například při regeneraci poškozených tkání nebo jejich obnově. Označují se jako dospělé SC a řadí se k multipotentním buňkám (Maleki et al. 2014).

3.1.1 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) tvarem připomínající fibroblasty jsou typem dospělých SC, to znamená, že se sebeobnovují a jsou multipotentní. Důležité je také zmínit, že MSC jsou schopny aktivně migrovat a dostat se tak například do poraněné tkáně a zahájit regenerační procesy (Qu a Zhang 2017, Lu et al. 2017). Friedenstein a jeho kolegové poprvé MSC izolovali v roce 1967 z kostní dřevě, ale časem byly MSC nalezeny i v mnoha dalších tkáních (zobrazeno v *tabulce 1*) (Wei et al. 2013, Squillaro et al. 2016).

Aby jakákoliv buňka mohla být nazvaná mesenchymální kmenovou buňkou musí splňovat určitá kritéria. Těmi jsou přichycení k plastovému podkladu za standardních

kultivačních podmínek, diferenciaci ve většinu mesenchymálních buněčných linií, nepřítomnost specifických povrchových markerů pro konkrétní buněčné linie a zároveň musí nést vybrané povrchové markery (Fregni et al. 2018).

Tabulka 1: Tabulka popisuje tkáň, ze které je možné izolovat MSC a zároveň jejich diferenciací potenciál. (Squillaro et al. 2016, Gao et al. 2016)

Místa izolace	MSC	Diferenciace v
kostní dřev, zubní dřev		myocyty, tenocyty, osteoblasty, chondrocyty, adipocyty
pupeční šňůra, placenta		
tkáň nervová, tuková, svalová, jaterní, plicní, kožní		buňky podobné neuronům, buňky epitelu
pohlavní orgány		

Pokud buňka nese na svém povrchu molekuly uvedené v *tabulce 2* zároveň má sníženou expresi MHC – I (hlavní histokompatibilní komplex I) a nese žádné proteiny komplexu MHC – II (hlavní histokompatibilní komplex II) nebo markerů hematopoetických buněk uvedených v *tabulce 2* je považována za mesenchymální kmenovou buňku (Batten et al. 2007, Squillaro et al. 2016).

Tabulka 2: Tabulka obsahuje výpis markerů MSC a hematopoetických buněk (Batten et al. 2007, Squillaro et al. 2016).

Markery MSC	Markery hematopoetických buněk
CD105 (endoglin, který je součástí receptoru transformujícího růstového hormonu β (TGF β))	CD11b (podjednotka integrinu $\alpha - M$, který se nachází na povrchu mnoha leukocytárních buněk)
CD166 (aktivovaná adhezní molekula leukocytyckých buněk – ALCAM)	CD34 (marker hematopoetických kmenových buněk)
CD73 (membránově vázaná ekto – 5' – nukleotidáza)	CD45 (běžný leukocytární antigen)
CD44 (hyaluronanový receptor)	CD14 (marker monocytů a makrofágů)
CD90 (povrchový antigen thymocytů)	CD133 (marker endoteliálních buněk nebo buněk progenitorů)
	CD31 (marker endoteliálních buněk, T – lymfocytů a makrofágů)

Asi nejdůležitější vlastností MSC je jejich schopnost ovlivňovat imunitní systém, jak specifické, tak nespecifické imunitní mechanismy. MSC ovládají imunitní buňky buď přímým kontaktem, nebo na základě uvolňování solubilních faktorů nebo-li parakrinní signalizací. Díky přímému mezibuněčnému spojení mezi MSC a T-buňkami dokážou snížit jejich aktivitu a zároveň podpořit nárůst populace regulačních T-buněk. Dendritické buňky jsou MSC podporovány v dozrávání. Dalšími buňkami specifické imunity jsou B-buňky, které pod vlivem MSC redukuje nejen svůj počet ale také svoji aktivitu. Nespecifickým NK-buňkám (tzv. přirození zabíječi) zabraňují MSC v proliferaci a snižují jejich cytotoxicitu (shrnutí v Gao et al. 2016 nebo Ma et al. 2014). MSC dokážou přeprogramovat makrofágy z prozánětlivého stavu na protizánětlivý nebo regulovat imunitní odpověď přímo v místě poškozené tkáně (Qu a Zhang 2017). Mezi hlavní molekuly sekretované MSC patří HLA-G (lidský leukocytární antigen G), TGF β (transformující růstový faktor β), PGE2 (prostaglandin E2), TNFAIP6/TSG6 (tumorový nekrotický faktor α -indukující protein 6), HO-1/HMOX1 (hemová oxygenáza 1), IL-6 a IL-10 (interleukin 6 a 10),IDO1 (indolamin-2,3-dioxygenáza 1), HGF (hepatocytární růstový faktor), LIF (leukémický inhibiční faktor), NO (oxid dusnatý), cytokiny ICAM-1 (intercelulární buněčná adhezní molekula 1), CXCL-10 (CXC chemokinový ligand 10), CCL-8 (C-C motif chemokin 8) a dva transmembránové proteiny FasL (Fas ligand) a PD-L1/2 (programmed death ligand 1 a 2) (Galland et al. 2017, Lu et al. 2017). Liu et al. (2011) dokonce zjistili, že MSC jsou schopné modulovat i rakovinné kmenové buňky produkcí IL-6.

Přestože charakteristické rysy jsou pro všechny MSC stejné je nutné brát ohled na původ MSC a jejich stáří. Například MSC získané z pupeční šňůry mají mnohem větší diferenciační potenciál než MSC z jiných tkání (Xie et al. 2015). Nebo pokud jsou mesenchymální buňky vystavené nadměrnému stresu raději než programovanou buněčnou smrt volí senescenci (trvalé zastavení buněčného cyklu (více o stárnutí lidských MSC v Turinetto et al. 2016).

Vzhledem k vlastnostem MSC a jejich poměrně snadnému získávání jsou tyto kmenové buňky velice nadějnými kandidáty nejen pro léčbu nerůznějších poranění ale i nemocí. Probíhají například už klinické pokusy o léčbu diabetu typu 2 pomocí MSC (shrnutí v Zang et al. 2017). Mardones et al. (2017) využili úspěšně MSC při léčbě osteoartritidy, když tyto buňky zavedli pomocí infúze přímo do postiženého kloubu. Jako alternativu k léčbě založené na transplantaci živých buněk

Zhang et al. (2016) provedli studii na potkanech, ve které jim injikovali do poškozené chrupavky 100 µg exosomů odvozených od lidských MSC. Injekce exosomů byla aplikována jednou týdně po dobu 12 týdnů. Na konci experimentu krysy léčené exosomálními injekcemi měly v místě poškození kompletně obnovenou chrupavku. U potkanů ošetřených roztokem PBS došlo pouze k zahojení pomocí fibroblastů.

3.1.2 Testikulární kmenové buňky

Testikulární kmenové buňky tvoří zvláštní skupinu kmenových buněk. Zahrnují totiž somatické i zárodečné kmenové buňky (GSC). GSC se ve varlatech vyskytují v podobě spermatogoniálních kmenových buněk (SSC), které jsou unipotentní s totipotentním charakterem. SSC obstarávají tvorbu spermií, které zajišťují přenos genetické informace do dalších generací (shrnutí v Fayomi a Orwig 2018). Somatickým kmenovým buňkám varlete se také říká gonadální a zajišťují obnovu somatických testikulárních buněk. Patří k nim progenitory Leydigových buněk a MSC (Gonzalez et al. 2009, Bai et al. 2018, Chikhovskaya et al. 2012).

Původ gonadálních SC byl dlouho nejasný. Chikhovskaya et al. (2014) prokázali, že se jedná o typ MSC. Ve svých experimentech pracovali se vzorky odebranými z varlat zdravých pacientů a pacientů s tzv. idiopatickým Sertoli-cell only syndromem (ve varlatech postiženého chybějí zárodečné buňky). Izolované buňky byly následně selektovány pomocí metody MACS (magnetic-activated cell sorting – rozdělení buněk na základě přiděleného magnetického náboje) a matrix, aby výsledná buněčná kultura obsahovala pouze MSC. Tyto buňky pak podrobili genové analýze, určili specifické povrchové markery a testovali *in vitro* jejich diferenciační potenciál do tří hlavních mesenchymálních linií (oste-, adipo- a chondrogenní). Získané buněčné kultury vykazovaly všechny specifikace MSC: přichycení k plastiku, exprese specifických povrchových markerů a diferenciace do tří mesenchymálních linií.

3.2 Samčí pohlavní ústrojí – varlata

U obratlovců rozlišujeme dvě možnosti určení pohlavní, environmentální a genetické. Při environmentální determinaci hraje roli prostředí v jakém se jedinec vyvíjí, obvykle je to teplota, pH prostředí nebo například koncentrace určitých chemikálií ve vodě. Tento typ určení pohlaví se objevuje hlavně u nižších obratlovců jako jsou ryby a plazi. U vyšších obratlovců je stanovení pohlaví na základě genů,

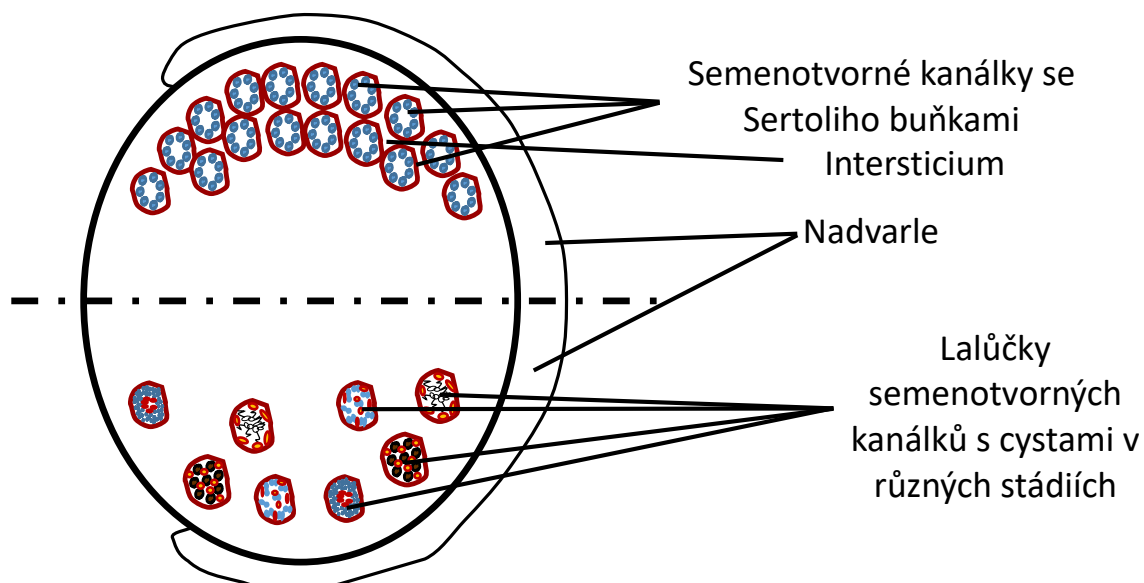
keré získal od svých rodičů, jedná se tedy o genetickou determinaci (Piprek 2010, Olmstead et al. 2010).

Každé savčí embryo, ze kterého se vyvine samec s pohlavními chromozomy XY nebo samice s pohlavními chromozomy XX na základě zděděných genů, v sobě nese základy obou pohlavních ústrojí. Do vyvíjejících se gonád migrují primordiální zárodečné buňky (PGC). V gonádách jsou tyto buňky obaleny somatickými buňkami. V případě, že jedinec nese Y chromozom, se ze somatických buněk vyvinou Sertoliho buňky (SeC), které dále řídí vývoj varlat (shrnuto v Jørgensen et al. 2015). Brzy po osídlení gonád začnou SeC exprimovat gen SRY, který následně spustí produkci transkripčního faktoru SOX9 (Hanley et al. 2000). SeC díky chemotaktickým signálům zajišťují rozvoj varlat a migraci dalších buněk (Ostrer et al. 2007).

3.2.1 Struktura varlete

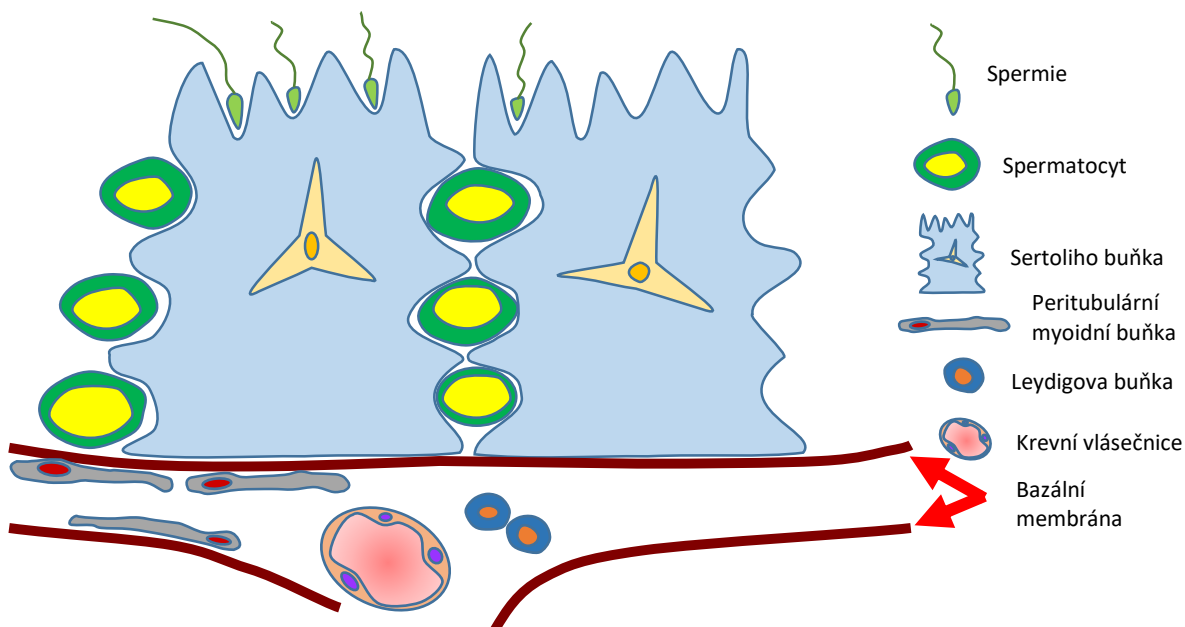
Varlata zajišťují zrání pohlavních buněk tzv. spermatogenezi. Dochází při ní k přeměně diploidních buněk spermatogonií (se dvěma sadami genů) v haploidní buňky spermie (s jednou sadou genů). Varlata jsou tedy nutně rozdělena do dvou částí. Část germinální (nebo také tubulární) je přímo odpovědná za spermatogenezi a část intersticiální (nebo-li intertubulární), která má podporující funkci. Oba kompartmenty jsou od sebe odděleny basální membránou a peritubulárními myoidními buňkami (PTMC) (Uribe et al. 2015). V germinální části varlete se nachází germinální epitel, který se skládá ze dvou typů buněk, pohlavní buňky a Sertoliho buňky. Intersticiální část obsahuje Leydigovy buňky (LC), krevní vlásečnice, makrofágy, žírné a neurální buňky a buňky pojivové tkáně (Schulz et al. 2010).

Napříč skupinou obratlovců se vyskytují dva základní typy spermatogeneze (*obrázek 1*), které určují strukturu varlete. U amniotických obratlovců, kam řadíme savce, plazy a ptáky, rozlišujeme tubulární spermatogenezi. Samčí gamety se vyvíjejí ve vlnách přímo v semenotvorných kanálcích, kde SeC tvoří tzv. hematotestikulární bariéru (*obrázek 2*) a během zrání spermií se nemění (Oatley a Brinster 2012). Druhým typem je cystická spermatogeneze, která probíhá u anamniot, či-li u obojživelníků a ryb. Při ní se germinální buňky vyvíjejí v cystách, jež vznikají v lalůčcích semenotvorných kanálků. V cystě se nachází gamety i SeC, které společně zrají.

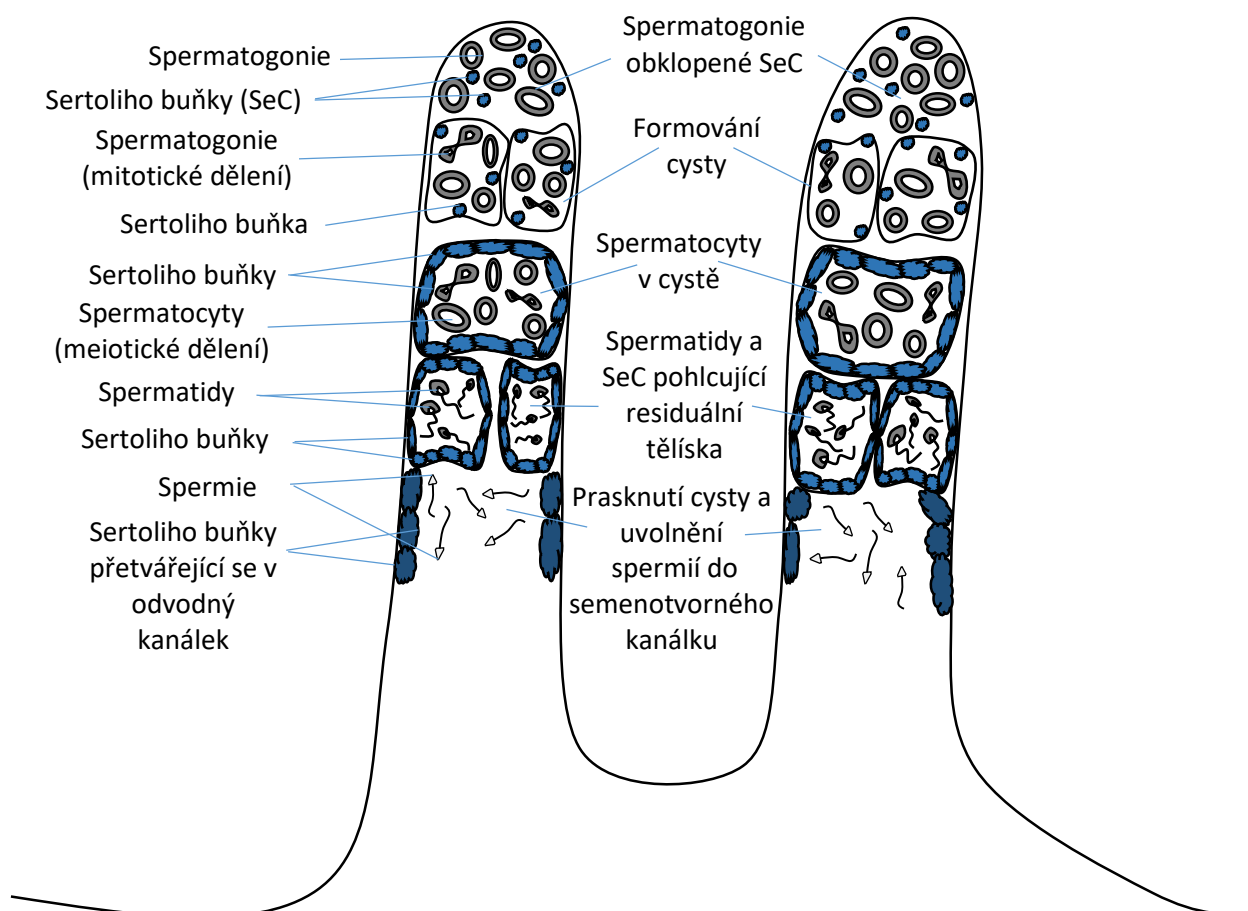


Obrázek 1: Zjednodušené schéma varlete savců a obojživelníků v příčném řezu. Nahoře: Varle savců. Ve varleti jsou uloženy stočené semenotvorné kanálky, ve kterých dochází k dozrání spermií pod ochranou Sertoliho buněk (modré tečky v kanálcích). Kanálky postupují dále do nadvarlete, z něž ústí do chámovodu. **Dole:** Varle obojživelníků. Semenotvorné kanálky obsahují lalůčky, ve kterých dozrávají cysty se zárodečnými buňkami. Po dozrání zárodečných buněk cysta praskne a spermie jsou vypuštěny do kanálků, odkud pokračují dále do nadvarlete. (převzato a upraveno z Yoshida 2016.)

Jakmile buňky v cystě dozrají, cysta praskne a spermie uvolní do semenotvorného kanálku (obrázek 3) (Alevi et al. 2015).



Obrázek 2: Schéma semenotvorného kanálku



Obrázek 3: Cystická spermatogeneze. Spermatogonie nacházející se na konci lalůčku jsou obklopeny Sertoliho buňkami (SeC). SeC vytvoří cystu, kde probíhá spermatogeneze. Volné SeC se během vývoje spermíí uchycují na membránu cysty, aby se následně po jejím prasknutí staly součástí odvodného kanálku, který vede do semenotvorného kanálku. (převzato a upraveno z Grier 1981)

3.2.2 Hlavní buněčné typy

Jak už bylo zmíněno výše pro vývoj jedince samčího pohlaví je nutné, aby buňky nesly ve své chromosomální výbavě pohlavní chromozom Y. Na něm je tzv. gen SRY, díky kterému se z nediferencovaných gonád vyvine samčí pohlavní ústrojí. Diferenciace začíná z vrstvy coelomových buněk hraničících s mesonephros (Hacker et al. 1995). Brzy po genu SRY (11,5 – 12,5 den po oplození u myši) přebírá hlavní roli regulátor morfogeneze Dhh (desert hedgehog) produkovaný Sertoliho buňkami. Parakrinním působením ovlivňuje vývoj fetálních Leydigových buněk (FLC) a peritubulárních myoidních buněk (Park et al. 2007).

3.2.2.1 Leydigovy buňky

LC během svého vývoje prochází několika stádii, která můžeme rozdělit na stádium fetálních buněk a stádia dospělých buněk (ty jsou čtyři).

3.2.2.1.1 Fetální Leydigovy buňky

Původ FLC je ve vrstvě buněk coelomového epitelu migrujících do gonád během raného vývoje embrya (Hacker et al. 1995). Coelomový epitel je jednovrstevná masa buněk, která pokrývá coelomovou dutinu (spolu s počátkem pohlavních žláz) (Karl a Capel 1998). Tato masa buněk se dále rozdělí na dvě části, z nichž se později vyvinou semenotvorné kanálky a interticiem se somatickými progenitory. Buňky progenitorů, které exprimují transkripční faktor SF-1 (steroidogenic factor 1) dají vzniknout populaci FLC a SeC (Chen et al. 2010).

Hlavní funkcí FLC je syntéza androgenů (testosteron a 5 α -dihydrotestosteron) a Insl3 (insulin-like factor 3), který je klíčový pro sestup varlat (Teerds a Huhtaniemi 2015).

3.2.2.1.2 Dospělé Leydigovy buňky

Dlouhou dobu se spekulovalo o tom, odkud dospělé Leydigovy buňky (ALC) pocházejí. Mezi nejvíce pravděpodobné tkáně patřil coelomový epitel a/nebo mesonefros. Práci DeFalco et al. (2011) byl prokázán původ ALC buněk v coelomovém epitelu. Stejný původ FLC a ALC vyvolává domněnku, že obě populace sdílejí stejnou ontogenezi, která je běžná u kmenových buněk. Tuto hypotézu podporuje fakt, že obě populace syntetizují stejné regulační molekuly a markery. Expres Couptf-II (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II), jakožto markeru progenitorových buněk, byla zjištěna již ve fetálních kmenových Leydigových buňkách, jež daly vzniknout ALC (Kilcoyne et al. 2014). Proti tomu stojí například práce Zhang et al. (2001) poukazující na rozdíly mezi funkčními vlastnostmi obou skupin LC. Přestože jsou obě skupiny ovlivňovány působením luteinizačního hormonu, FLC jsou na jeho hladinu pouze citlivé, kdežto ALC jsou přímo závislé na jeho množství v krvi.

V posledních letech se objevilo několik prací, které pomocí imunologických barvení a sekvenování prokázaly rozdílný vývojový plán FLC a ALC (Stévant et al. 2018). Liu et al. (2016) zjistili, že progenitory FLC a ALC jsou

oddělenými populacemi buněk ještě předtím, než se usídlí v testikulárním intersticiu, tedy dříve než se vůbec začnou rozvíjet samčí pohlavní orgány.

Vývoj ALC se dělí do čtyř stádií: kmenové, progenitorové, nevyzrálé a vyzrálé podrobně shrnuto v Chen et al. (2010) a jejich hlavní funkcí je syntéza testosteronu podílejícího se na správném vývoji spermií a rozvoji sekundárních pohlavních znaků (Teerds a Huhtaniemi 2015).

3.2.2.2 Peritubulární myoidní buňky

Peritubulární myoidní buňky (PTMC) jsou velmi tenké buňky pravděpodobně pocházející z mesenchymu. Nejsou tedy migrujícím typem buněk, který by se podílel na embryonálním základu varlete, ale jejich prekurzory se nachází zřejmě v intersticiálních progenitorových buňkách (Cool et al. 2008, Wen et al. 2016). Jelikož se PTMC nachází vně semenotvorných kanálků, obklopují je dvě bazální membrány, jedna směřuje do intersticia a k endoteliálním buňkám a druhá je bazální membrána germinálního epitelu (Losinno et al. 2012). V myších varlatech tvoří PTMC jen jednu vrstvu, kdežto u člověka se nachází několik vrstev (Spinnler et al. 2010).

Jejich hlavním úkolem je stah semenotvorných kanálků a tím vypuzení zralých spermií ve spolupráci se SeC. Velmi podstatné jsou také tzv. PModS (peritubulární faktory, kterými jsou ovlivňovány SeC). Parakrinním působením PTMC modulují uvolňování některých důležitých faktorů ze SeC jako jsou například transferrin, inhibin nebo androgen vážící proteiny. PTMC také sekretují různé cytokiny, růstové faktory a proteiny extracelulární matrix (laminin, fibronectin, kolagen typu I a VI a proteoglycany), čímž se podílejí na výstavbě bazální membrány (Rebourcet et al. 2014, Thompson et al. 1995).

Za hlavní marker PTMC se považuje α -aktin hladké svaloviny (α -Sma), který je spolu s PMC-myosinem (isotyp myosinu II, syntetizovaný buňkami PTMC) nutný pro smrštění buněk (Fernández et al. 2008, Losinno et al. 2012). Kontrakce semenotvorných kanálků je řízena SeC a endoteliálními buňkami pomocí peptidu endotelin-1 (Et-1) (Losinno et al. 2016).

3.2.2.3 Sertoliho buňky

SeC jsou jediné buňky somatického původu, které se nacházejí uvnitř semenotvorných kanálků. Speciální těsné spoje mezi jednotlivými buňkami rozdělují semenotvorné kanálky na část luminální a bazální (Iliadou et al. 2015). Stejně jako

FLC mají SeC původ v coelomovém epitelu. Mezi 10,5 a 12,5 dnem po oplození (u myši) pre-Sertoliho buňky vlivem transkripčního faktoru Sry spustí expresi Sox9, čímž se spustí kaskáda morfogenetických změn důležitých pro správný fetální vývoj varlat (Karl a Capel 1998, Liu et al. 2016, Stévant et al. 2018, Díaz-Hernández et al. 2012). Sox9 je také odpovědný za zrání SeC. Krátce po jeho aktivaci se pre-SeC začnou hromadit okolo zárodečných buněk. Proliferují tak dlouho, než obklopí masu zárodečných buněk a vzniknou tak kanálky. Tehdy se z pre-SeC stanou nematurované SeC, které se dále množí a utužují mezi sebou spoje. Optimálního počtu SeC na kanálek je zřejmě dosaženo na základě mechanických signálů (Svingen a Koopman 2013). K dozrání SeC dochází až během puberty, kdy se mezi jednotlivými buňkami vytvoří těsné spoje. Poté se SeC již dále nedělí (Iliadou et al. 2015).

SeC jsou hlavním a nezbytným organizátorem správného vývoje varlat, ale zároveň zabraňují rozvoji ženských pohlavních orgánů (Stévant et al. 2018). Zralé SeC vytváří hematotestikulární bariéru. U nesavčích obratlovců dochází k vytvoření bariéry jakmile je dokončena meióza u pohlavních buněk. Tato bariéra vytváří rozhraní mezi krví a vnitřní částí semenotvorného kanálku (tzv. imunoprivilegovaným místem). V tělech živočichů se nacházejí místa, která musejí být chráněna před přístupem určitých látek nebo imunitních buněk, aby nebyla vyvolána imunitní reakce. Mohou se v nich totiž nacházet buňky, které mají na svých membránách antigeny, jenž by mohly být rozeznány jako cizorodé. Je tak nutné vytvořit bariéru mezi krví a určitou tkání. Nejznámějšími bariérami mezi krví a těmito imunoprivilegovanými místy jsou hematoencefalická, hematotestikulární, hematothymická či placentární bariéra. Tyto bariéry nejsou jen fyzickými překážkami, ale zároveň se v nich nacházejí buňky, které dokážou uvolňovat látky, jimiž modulují reakci okolních buněk a tedy i těch imunitních (Kaur et al. 2014, Chui et al. 2011). SeC zajišťují nejen ochranu pohlavních buněk, ale také napomáhají jejich proliferaci a během puberty řídí jejich množení a diferenciaci, přičemž pohlcují odloučenou cytoplazmu vzniklou během zrání spermií a senescentní pohlavní buňky (Baazm et al. 2017). Aby SeC mohly být těmito všestrannými iniciátory musí vylučovat řadu molekul, kterými komunikují s ostatními buňkami. Patří mezi ně různé hormony (inhibin B, anti-Müllerian hormon), růstové faktory (transformující růstové faktory α a β , insulin-like růstový faktor 1) transportní proteiny a enzymy (transferrin, ceruloplasmin), cytokiny (interleukin 10) nebo také

FasL (Fas ligand) aIDO (indolamin-2,3-dioxygenáza) důležité pro modulaci zejména T-lymfocytů (Iliadou et al. 2015, Meinhardt a Hedger 2011).

Díky svým imunoprotektivním vlastnostem jsou přirovnávány k mesenchymálním buňkám (Gong et al. 2017). Často jsou využívány při allo- a xenotransplantacích, kdy je třeba, aby hostitelský organismus nevyvíjel imunitní reakci s vloženým tkáňovým či buněčným štěpem (vyžití SeC při transplantacích je shrnuto například v Mital et al. 2010).

Markery zralých SeC jsou hlavně vimentin a Sox9 (Chen et al. 2017, Baazm et al. 2017, Chui et al. 2011).

3.2.2.4 Pohlavní buňky – Zárodečné buňky

Zárodečné buňky zajišťují přenos genetické informace do dalších generací. Mezi obratlovci jsou dva různé způsoby určení zárodečných buněk: zděděním maternálních determinant zárodečné linie nebo indukci signálními molekulami (Mochizuki et al. 2018). Prekurzory zárodečných buněk jsou nazývány primordiální zárodečné buňky (PGC). U žab jsou PGC odvozeny od blastomer s mateřskými determinantami v cytoplazmě. Determinanty jsou známé také jako zárodečná plazma a jejím úkolem je zabránit transkripci a translaci genů předurčujících buňku k somatickému osudu. Zároveň brání odpovědi na indukční signály okolních buněk. Inhibice somatických vlivů přetrvává až do stádia gastruly (Johnson a Alberio 2015). Zárodečná plazma je rozeznatelná i pod světelným mikroskopem a její součástí je tzv. mitochondriální mrak, který vzniká po oplození na vegetálním pólu. Odtud se pak samovolně přesunou do centra endodermu, z něhož dále migrují do genitální rýhy (Kerr a Dixon 1974, Saito et al. 2014).

U savců jsou PGC určeny pomocí signálních molekul. Nejvíce prostudováno je to u modelu myši. PGC se nejdříve objevují kolem 6,25 dne po oplození (u myši) v epiblastu, poté migrují do genitální rýhy, kde mezi 12,5 a 14,5 dnem diferencují do pohlavních buněk (Scaldeferri et al. 2015). Než dosáhnou PGC gonád je nutné inhibovat jejich transkripční aktivitu. Zásadními inhibitory jsou *Blimp1* a *Prdm14*, jež zajišťují represi somatických genů zejména modifikací histonů a zároveň podporují expresi genů nutných pro obnovu PGC (například protein *Stella*) (Irie et al. 2015, Hayashi et al. 2011, Mochizuki et al. 2018). Jakmile se PGC dostanou do prostředí pohlavních orgánů je nutné inhibiční faktory vypnout. Na tom se podílejí

především proteiny z rodiny BMP nebo také molekuly microRNA (Marlow 2015, Donoughe et al. 2014).

Přestože jsou PGC považovány za unipotentní buňky, jsou často zkoumány kvůli jejich schopnosti přeměny v pluripotentní buněčné linie. Hlavní význam pro konverzi PGC má zřejmě koktejl růstových faktorů SCF (faktor kmenových buněk), LIF (leukemický inhibiční faktor) a bFGF (bazický fibroblastový růstový faktor) (Leitch et al. 2013).

3.3 Modelový organismus – rod *Xenopus*

Obojživelníci z rodu *Xenopus* jsou ve výzkumu i medicíně velmi známými a významnými modelovými organismy. Koncem 30. let 20. století se začali používat pro testování gravidity. Umožňovala to jejich citlivost k lidskému choriogonadotropinu (hCG – lidský choriogonadotropin), který se vyskytuje v moči těhotných žen. Injekce malého množství moči s obsahem hCG u samic drápatky vodní (*Xenopus laevis*) stimuluje kladení oocytů do 8-12 hodin (Gurdon a Hopwood 2000). Díky tomu, že oplození i vývoj jedinců probíhá mimo tělo samice a oocyty jsou veliké (1,5 – 2 mm), je možné jednoduše pozorovat morfologické změny na embryích či s nimi manipulovat. Žabí zárodky jsou velmi odolné vůči vnějším chirurgickým zákrokům. Do oocytů drápatek je možné injikovat roztoky nukleových kyselin či jiných, například radioaktivně značených látek. Do časných zárodků (blastula) či pulců je možné transplantovat buňky a pozorovat jejich migraci a diferenciaci (Tlapakova et al. 2016).

Rod *Xenopus* se vyznačuje poměrně nenáročnými podmínkami chovu, ať již z hlediska krmení či prostředí. Mezi další klady těchto obojživelníků také patří velké množství potomků, kteří se relativně rychle vyvíjejí. Výhodou je také značná podobnost některých orgánů s člověkem, například v případě plic, brzlíku nebo slinivky (Harland a Grainger 2011; Kashiwagi et al. 2010).

Nejčastějšími druhy užívanými jako modelové organismy v laboratořích jsou *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis*. Přestože *X. laevis* je déle využíván pro výzkumné účely, v poslední době je více upřednostňován *Xenopus tropicalis*, jehož genom je na rozdíl od tetraploidní drápatky vodní diploidní. Srovnání obou druhů je možné shlédnout v *tabulce 3*. V laboratořích se dnes nejvíce užívá pět linií *Xenopus tropicalis*, linie Nigerian, Ivory Coast, Yasuda, Asashima a Golden (Kashiwagi et al. 2010).

Tabulka 3: Porovnání *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* (Kashiwagi et al. 2010)

	<u><i>X. laevis</i></u>	<u><i>X. tropicalis</i></u>
Genom	allotetraploid	diploid
Velikost oocytů	≈1,2 mm	≈0,7 mm
Počet oocytů na jedno naklazení	1 000-9 000	300 – 1 000
Dosažení pohlavní dospělosti (po metamorfóze):		
samice	10 – 24 měsíců	30 týdnů
samec	6 měsíců	22 týdnů

3.4 Histologické metody - příprava řezových preparátů

Pro identifikaci buněk v těle jedince se nejběžněji používají histologické metody. Z těla jedince se odebere vzorek, z něhož jsou vytvořeny řezové preparáty, které jsou pak následně značeny. Značení umožňuje rozlišovat nejen jednotlivé typy buněk ale i metabolity či proteiny, jež buňky vytvářejí či je produkují. Tkáň z organismu se může odebrat dvěma způsoby a to buď z živého jedince, čemuž se říká *biopsie*, nebo z mrtvého těla, což je označováno jako *nekropsie*. Po odběru tkáně je nutné vzorek fixovat, aby nedocházelo k degradaci buněk díky vlastním enzymům a působením vnějších vlivů.

Fixace vzorku může být provedena v zásadě dvěma způsoby či použitím kombinace obou přístupů. Prvním typem fixace je tzv. *fyzikální metoda*. Využívá se při ní vysoká či naopak nízká teplota. Fixace teplem je často využívána v mikrobiologii, kdy se na podložní sklíčko nanese bakterie a sklíčko je protaženo nad plamenem kahanu. Pro fixaci tkáně se v laboratořích využívá řízený ohřev v mikrovlnné troubě při teplotě kolem 50°C. Problémem často bývá degradace různých proteinů v buňkách. Ve studii z roku 2015 ověřovali účinnost tepelné fixace při 95°C po dobu 30 vteřin. Tento způsob fixace je efektivní proti jednořetězcovým RNA virům a Gram-negativním bakteriím, ale zároveň je také možné takto fixované vzorky tkáně využít pro proteinovou/peptidickou či lipidickou analýzu (Cazares et al. 2015).

Při pěstování buněčných kultur se často využívá fixace mrazem a vzorky se poté dlouhodobě uskladňují. Nevýhodou je, že při zamrazování dochází k tvorbě mikrokystalů vody uvnitř tkáně či buněk, které mohou vzorek poškodit. Aby se vzniku krystalů předešlo, užívají se tzv. kryoprotektiva. Ta jsou ale pro buňky toxická, což snižuje celkovou životaschopnost rozmrazených buněk. Huebinger et al. (2016)

dokázali techniku kryofixace vylepšit díky optimalizaci metody SPRF (Self-Pressurized Rapid Freezing / „samopřetlakové rychlozmrazování“), založené na vytvoření vnitřního přetlaku díky expanzi vody a hexagonálního ledu, což vede k vitrifikaci (jev, při kterém se látka přemění na nekystalickou amorfní pevnou látku). Za těchto okolností není nutné užívat kryoprotektiva a vzorek je možné rozmrazit a běžně užívat.

Druhý typ fixace, tzv. *chemická metoda*, je založena na užití fixační tekutiny, do které je vzorek ponořen nebo je (v případě živočichů) tekutina vstříknuta do těla organismu. Mezi nejčastěji užívané fixační tekutiny patří formaldehyd či methanol. V publikaci Lerch et al. (2017) autoři sledovali průběh fixace vzorku formaldehydem. Při experimentu sledovali dva typy fixace formaldehydem. První byla založena na šestihodinové inkubaci tkáně ve fixační tekutině při 4°C následované 1 hodinou fixace při 45°C. Druhý způsob obnášel fixaci za pokojové teploty po 24 hodin. K analýze použili 34 druhů zdravé lidské tkáně a 12 typů poškozených tkání. Zjistili, že difúze tekutiny je pro každou tkáň specifická, a liší se dokonce i zdravá tkáň od nemocné, přestože pocházejí ze stejného orgánu.

Po fixaci je nutné vzorky připravit na krájení, nejčastěji se vzorky zalévají do parafínu a poté se krájí na mikrotomu. Vzniklé řezy mají tloušťku 6-10 µm. Výhodou takto připravených preparátů je jejich dlouhá životnost. Vzorky mohou při správném provedení postupu a skladování vydržet i několi desítek let. Toho se dá využít především při sledování vývoje pacientova stavu, například při biopsiích nádorových tkání, nebo jako učebních pomůcek při vyučování studentů. Dlouho se myslelo, že tkáně fixované ve formalínu a zalité do parafínu se nedají již dále používat pro další diagnostické metody jako je sekvenování DNA či PCR (polymerázová řetězová reakce). Díky rozvoji technologií však byla tato domněnka vyvrácena.

Ve studii Einaga et al. (2017) podrobili parafínové řezy srovnání s čerstvě odebranou a zmrazenou tkání. Zjistili, že vzorky připravené parafínovou metodou jsou stejně vhodné pro další sekvenování jako vzorky z čerstvé tkáně. Ve studii používali převážně tkáň odebranou z potkanů, ale také lidská játra. Navíc popsali postup, jak nejlépe ošetřit odebranou tkáň, aby se co nejméně poničila struktura DNA. Zaměřili se také na vzorky, které už byly imunohistochemicky obarveny. Zkoumali jejich kvalitu pro další použití, a dokonce se snažili odhalit, kde v průběhu postupu barvení dochází k největšímu poničení DNA v buňkách. K tomu dochází při ošetření vzorku citrátovým puforem, který se používá k odhalení epitopů, jež by mohly být v důsledku fixace skryty.

V obdobné studii podrobovali zkoumání vzorky připravené formalínovou fixací a zalité do parafínu (Iddawela et al. 2017). Tentokrát se výzkumníci zaměřili na kvalitu vzorků z hlediska studia molekulárních markerů. Soustředili se na rakovinové markery a to zejména na markery rakoviny prsu. I oni dospěli ke zjištění, že parafínové řezy mají mnohostranné využití. Z 63 testovaných pacientek proběhla úspěšná extrakce DNA u 43 a v případě RNA získali 52 vzorků. Odebrané vzorky pak byly testovány na genovou expresi a analýzu počtu kopií v genomu.

I přes výše zmíněné studie není nejlepším řešením pro různé tkáně. Alternativní přístup představuje metoda kryosekce, při níž se využívá přístroj kryomikrotom (kryostat). Fixované vzorky jsou zality do speciálního media, po jehož zatuhnutí je možné vytvářet řezy o velikosti kolem 10 μm v prostředí od -10 do -25°C .

Preparáty zpracované pomocí kryosekce jsou vhodné pro rychlou diagnostiku. Výhodou je, že se odebraná tkáň nemusí fixovat a odpadá i nutnost několika denní přípravy preparátů, jak je tomu u standardních parafínových řezů. Je však nutné podotknout, že kryorezy jsou více náchylné na poškození, a jelikož nejsou fixované, jejich životnost je značně snižena. Stává se také, že při špatném postupu přípravy se při zamrznání vzorku vytvoří v tkáni krystalky, které mohou vzorek poničit. Navíc je tato metoda náchylnější na vznik artefaktů.

Studie Mahadevappa et al. (2017) zkoumala efektivitu stanovení diagnózy právě pomocí kryorezů a tzv. metody Imprinting Cytology (IC)¹. Na 62 případech pacientek s rakovinou prsu ukázali, že senzitivita (hodnota určující pravděpodobnost pozitivního výsledku testu u osoby s rakovinou), specificita (určuje pravděpodobnost negativního výsledku u osoby bez rakoviny) a přesnost obou metod přesahuje ve všech případech 95 %. Pro ověření správnosti dosažených výsledků používali klasické parafínové řezy vytvořené z odebraných tkání. Rozdíl mezi kryorezy a IC je v rychlosti stanovení diagnózy a v získaných poznatcích. Metodou IC je možné stanovit pouze to, zda-li se jedná o maligní nebo benigní nádor. Kryorezy jsou schopné rozlišit i mezi jednotlivými stádii nádoru. Ale v porovnání s IC je jejich příprava časově náročnější. Nicméně obě tyto metody jsou proveditelné během operace, což umožňuje lékařům v některých případech řešit zdravotní komplikace pacienta již během daného zákroku.

¹ Na sklíčko je nanesen malý řez tkáně, u které chce chirurg zjistit, zda je maligní či nikoli. Tento řez je poté fixován v 95% ethanolu po dobu 5-6 s a následně obarven standardním hemaxylín-eosinovým barvením. Vše se děje při operaci pacienta, který je v anestezii.

Přestože se metoda kryosekce využívá i při experimentech s žábami rodu *Xenopus* (Tam et al. 2015), ukázala se jako nevhodná pro naše účely.

Třetí technikou užitou k přípravě řezových preparátů byly vibratomové řezy. Příprava vzorků pro řezání zahrnuje zalití do agaru či speciálních médií. Po zatuhnutí jsou bločky s tkání vloženy do vaničky s neutrálním roztokem (například PBS). Samotné řezání je prováděno velmi rychle se kmitající žiletkou. Ačkoliv je známo, že vibratomové řezy hůře zachovávají morfologii a zanechávají na preparátech stopy řezání, jsou využívány především v imunohistochemických technikách (Ward et al. 2007).

Ulmer et al. (2017) použili vibratomové řezy ke zkoumání genu *Gooseoid* a jeho vliv na vývoj jedince. Na myších a žábách (*Xenopus*) embryích potvrdili jeho zásadní roli jakožto embryonálního organizátora a nově objevili jeho novou funkci v inhibici Wnt/PCP (planar cell polarity) dráhy, která reguluje tzv. konvergentní extenzi (proces, při kterém buňky cíleně migrují, a dochází tak k restrukturalizacím tkání). Médium na zalévání histologických vzorků obsahovalo směs želatiny a albuminu, vytvořené řezy měly pak tloušťku 30 μm .

Také Lau et al. (2017) těžili z výhod, které poskytuje technika vibratomových řezů, ke studiu neurovaskulárního systému u pulců *X. laevis*. Ve svých experimentech pomohli objasnit, jak je udržována neurovaskulární nika ve vyvíjejícím se mozku. Pulci ve stádiích 40 až 47 (to odpovídá stáří zhruba 2 až 5 dní po oplození) byli fixováni ve 4% paraformaldehydu, aby jim bylo možné odebrat mozky. Ty byly následně zality do média obsahujícího opět albumin a želatinu s přísadkou glutaraldehydu. Z preparátů byly po zatuhnutí vytvářeny řezy o tloušťce 40 μm .

Stejně jako ve studii Blackinton et al. (2010) byla v této diplomové práci využita agaróza k vytvoření řezových preparátů pulců. Agaróza představuje levnější a bezpečnější variantu zalévacího média oproti médiím obsahujícím glutaraldehyd, který je toxický.

4 Cíle

- 4.1 Studium migračního potenciálu transfekovaných testikulárních kmenových buněk (XtTSC) u pulců *X. tropicalis***
- 4.2 Optimalizace metody pro přípravu řezových preparátů**
- 4.3 Studium migračního a diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk (XtTSC) na řezových preparátech pulců *X. tropicalis***

5 Materiály

5.1 Modelové organismy

V diplomové práci byli k pokusům užití jedinci druhu *Xenopus tropicalis*, kteří jsou chováni na PŘF UK. Konkrétně se jednalo o kmeny Nosek PŘF UK, Ivory Coast (imbrední kmen) a Nigerian Strain (outbrední kmen). Kmen Nosek PŘF UK je kmen vyšlechtěný přímo na Přírodovědecké fakultě. Pokusní živočichové z kmene Ivory Coast a Nigerian Strain laboratoř obdržela od European Xenopus Resource Centre (Portsmouth).

K transplantacím testikulárních kmenových buněk z *X. tropicalis* (XtTSC) byli primárně používáni jedinci kmene Nosek PŘF UK.

V chovech na fakultě se udržuje teplota místnosti okolo 26°C. Do plastových kádí je vždy rozděleno 60-80 jedinců, kteří jsou chováni v pitné vodě s přídavkem mořské soli (25 g na 100 l). Žabí embrya, pulci a mladé žáby jsou chováni odděleně v menších plastových nádobách. Pravidelná údržba nádob a krmení se uskutečňuje každý pracovní den.

5.2 Roztoky

5.2.1 Roztoky na IVF (*In Vitro* Fertilization)

20x MMR: 2M NaCl; 40mM KCl; 20mM MgCl₂; 40mM CaCl₂; 100mM HEPES; deionizovaná H₂O; pH upraveno na 7,7-7,8

0,05x MMR: 2,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 1000 ml; pH 7,7-7,8

0,05x MMR + Gentamycin: 2,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 1000 ml; 1 ml Gentamycinu; pH 7,7-7,8

1x MMR + Gentamycin: 5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; 100μl Gentamycinu; pH 7,7-7,8

2,2% roztok cysteinu: 0,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; 2,2 g L-cysteinu; pH 7,7-7,8

1% roztok agarózy v 0,05x MMR

5.2.2 Roztoky pro transplantační experimenty

Ficoll: 0,5 ml 20x MMR, 0,1 ml Gentamycinu; 6g Ficoll; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; pH 7,7-7,8

0,2% MS-222, uspávací roztok: 0,2 g MS-222; 0,2 g NaHCO₃; 100 ml destilované H₂O

0,4% MS-222, usmrcovací roztok: 2 g MS-222; 2 g NaHCO₃; 500 ml destilované H₂O

5.2.3 PBS

10x PBS (phosphate buffered saline): 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 2,25 mM KH₂PO₄; pH 7,35

1x PBS: 1 díl 10x PBS, 9 dílů destilované vody

2/3 PBS: 2 díly PBS, 1 díl destilované vody

5.2.4 Fixační roztoky

3,8% formaldehyd v 1x PBS: 40 ml formaldehydu; 36 ml 10x PBS; 324 ml destilované vody

10x MEMFA: 20,926 g 1M MOPS; 7,608g 20mM EGTA, 2,465 g 10mM MgSO₄ rozpustit ve 100 ml destilované vody (pomocí NaOH upravit pH na 7,8)

Fixační MEMFA: 1 díl 10x MEMFA, 1 díl 38% formaldehydu, 8 dílů destilované vody

5.2.5 Roztoky pro kryosekce

7,5% sacharóza ve 2/3 PBS

15% sacharóza ve 2/3 PBS

30% sacharóza ve 2/3 PBS

7,5% želatina v 15% sacharóze ve 2/3 PBS

15% želatina v 15% sacharóze ve 2/3 PBS

20% želatina v 15% sacharóze ve 2/3 PBS

5.2.6 Roztoky pro přípravu vibratomových řezů

3% agaróza 1x PBS

PBST: 100 ml 1x PBS; 0,1 ml Tween 20

5.2.7 Blokovací roztok

TNB: 0,1M Tris-HCl; 0,15M NaCl; 0,5% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim GmbH)

5.2.8 Bělící roztok (bleaching solution)

5 ml: 3,5 ml 100% metanol; 0,5 ml 30% H₂O₂; 1 ml deionizované vody

5.2.9 Benzparafín

1 díl parafínu ku třem dílům benzenu

5.3 Chemikálie

38% Formaldehyd 30251 (Lach-Ner)

Agaróza 50004 (Lonza)

Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)

DAPI DES1000L (Intimex)

Ficoll F4375 (Sigma-Aldrich)

MS222 A5040 (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 36324N (BDH)

Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Parafín Paraplast Plus 502004 (McCormick Scientific)

Sacharóza 84100G1000 (Penta)

Želatina 1040781000 (Emprove)

Mowiol/DAPI

Metanol (Penta)

Etanol (Penta)

MOPS (Sigma-Aldrich)

MgSO₄ (Penta)

Benzen10720-11000 (Penta)

Etanol absolutní 71250-11000 (Penta)

5.4 Další materiály

5.4.1 Antibiotika

Gentamycin - Gentaveto - 5 (V.M.D.)

5.4.2 Hormony

Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)

5.4.3 Protilátky

Primární protilátky:

1E12 (anti-actinin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – ředění 1:4

14h7 (anti-vimentin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – ředění 1:40

D7F2 (anti-MyoD; Developmental Studies Hybridoma Bank) - ředění 1:20

TBX20 (marker progenitorů kardiomyocytů; Aviva Systems Biology) – ředění 1:300

Zn12 (povrchový marker neurálních buněk; Developmental Studies Hybridoma Bank)

- ředění 1:500

anti-Sma (Sigma-Aldrich) – ředění 1:400

anti-Sox9 (Sigma-Aldrich) – ředění 1:300

Sekundární protilátky:

Alexa 488 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – ředění 1:500

Alexa 555 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – ředění 1:500

Alexa 488 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) – ředění 1:500

5.4.4 Materiál pro přípravu řezových preparátů

Podložní skla Superfrost (Thermo scientific)

Podložní skla (P-Lab)

Žiletky (Astra Superior Platinum)

Zamrazovací bločky Cryomold Biopsy 4565 (Tissue-Tek®)

Zamrazovací médium: O.C.T.™ Compound 4583 (Tissue-Tek®)

Kultivační destičky (P-Lab)

Petriho misky (P-Lab)

5.4.5 Přístroje

Binolupa Stemi 2000 (Zeiss)

Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)

Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)

Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen)

Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)

Fluorescenční binolupa Olympus SZX16 (Olympus Optical)

Fluorescenční mikroskop Olympus BX40 (Olympus Optical)

Mikroinjektor IM 300 (Narishige)

Mikrotom HM 310 (Microm)

Kryostat CM3050 S (Leica)

Vibratom VT 1200S (Leica)

Nahřívací ploténka VD-1 (Vezas)

Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette (Techne)

Hybridizační pec HO - 10 (Stovall Life Science)

6 Metody

V laboratoři vývojové biologie byla založena buněčná kultura z varlat juvenilních samců *Xenopus tropicalis* z linie Ivory Coast (Tlapakova et al. 2016). Primární kultura byla vytvořena z varlat odebraných jedincům šest měsíců po metamorfóze. Explantáty byly uchovávány 5 dní při 29,5°C a 5,5% CO₂ atmosféře bez jakéhokoli zásahu. Primární kultura byla připravena celkem třikrát, pokaždé z jiného jedince, ale všechny kultury vykazovaly stejné morfologické a molekulární biologické vlastnosti při dlouhodobé kultivaci a následných experimentech.

Pro kultivaci testikulárních buněk z *X. tropicalis* bylo vyvinuto speciální RPMI médium obohacené o pyruát sodný, 2-merkaptoetanol a rekombinantní myší leukemický inhibiční faktor. Médium se mění každé tři dny a buňky se pasážují jednou za dva týdny.

6.1.1 Transgenní testikulární buněčná kultura

Do testikulárních kmenových buněk byl nukleofekcí zaveden plazmidový vektor ISpBSIISK-CAG-Katushka RFP. Po měsíci kultivace byly buňky pozitivní na expresi Katushka RFP vyselektovány metodou FACS na základě fluorescenčního signálu.

6.2 IVF

Při *in vitro* fertilizaci (smíchání oocytů se spermiovou suspenzí v Petriho misce) bylo důležité vývoj aktivovaných a oplozených oocytů pozastavit (synchronizovat). K tomu byl využit roztok o vysoké iontové síle, 1x MMR. Gentamycin sloužil pro ochranu vyvíjejících se zárodků před bakteriální infekcí. Po 3-5 minutách od aplikace spermiové suspenze k oocytům byla Petriho miska zalita roztokem 0,05x MMR, jehož nízký obsah iontů umožnil znovuzahájení embryonálního vývoje. Oocyty drápatek měly na svém povrchu relativně silný gelový obal, který bylo nutné po 20-25 minutách od oplození odstranit roztokem 2,2% L-cysteinu, ten byl připravován vždy čerstvý, max. 2 hodiny před oplozovací procedurou. Roztoky MMR byly připravovány zpravidla 1-2 dny před pokusem. V této době byly také chystány Petriho misky, jejichž dno se pokrývalo 1% roztokem agarózy rozmíchané v 0,05x MMR.

Den před samotným IVF bylo dvěma až čtyřem samicím *X. tropicalis* injikováno 15 IU hCG (později navýšeno na 30 IU) do lymfatického vaku. Ráno v den experimentu dostaly samice další injekci s hormonem, tentokrát 150 IU (později zvýšeno na 300 IU). Zhruba čtyři až pět hodin po podání druhé dávky hormonu samice započaly klást oocyty. V této době byl také zabit samec (vložením do 0,4% roztoku MS-222), dekapitován a byla mu odebrána varlata, která byla uložena do misky obsahující médium L15 s 10% FBS (fetální hovězí sérum).

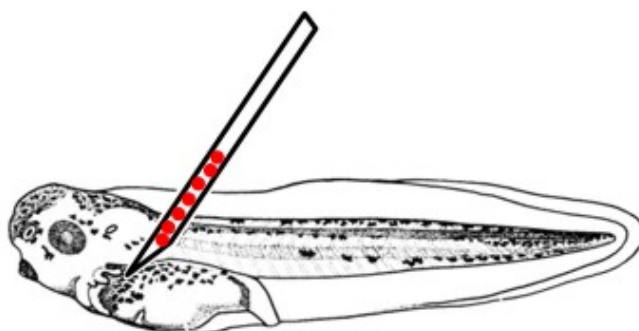
Samice pak byly vykladeny do větší Petriho misky s několika mililitry 1x MMR + Gentamicin. Pro uvolnění spermií byl z varlete vytvořen homogenát v 500 μ l média L15 s 10% FBS, který se přidal k oocytům rozvrstveným po dně misky. Spermie se za krátko navázaly na oocyty. Dvě minuty poté byl do misky přidán roztok 0,05x MMR, který se nechal účinkovat 10 minut a následně byl odstraněn. Oplozené oocyty byly ponořeny do roztoku 2,2% L-cysteinu. Vzápětí byly oocyty převedeny na misku s agarózou, kde proběhl výběr správně se vyvíjejících zygot a časných embryí (hodnocené znaky: průměr zhruba 1 mm, zřetelně oddělená animální a

vegetální polovina se stejnoměrně zbarvenou cytoplazmou, výskyt tmavší zóny v místě vniknutí spermie). Tato embrya se buď nechala dále vyvíjet nebo byla použita pro transplantační pokusy.

6.3 Transplantace

K transplantaci XtTSC byly použity tenké skleněné kapiláry, jejichž hrot byl upraven těsně před mikroinjekcemi. Aby se s transplantovanými buňkami lépe manipulovalo a bylo zajištěno přesné množství injikovaných buněk, byla suspenze buněk (5 μ l) napipetována na kousek parafilmu a poté nasáta do kapiláry. Buňky byly rozředěny v médiu obsahujícím LIF. Do blastul bylo injikováno 10 nl směsi, jež obsahovala zpravidla 100 buněk (vypočteno z objemu připravené směsi a změřeného počtu buněk), do embryí ve stádiu 41 (stádia se určovala podle Nieuwkoop a Faber 1994) bylo transplantováno 40 nl což odpovídá zhruba počtu 1000 buněk.

Samotná transplantace se uskutečnila v Petriho miskách s agarózou v roztoku Ficollu, aby se zamezilo úniku buněk z vytvořeného vpichu. Při mikroinjekcích pulců bylo do roztoku Ficollu přidáno 10-15 kapek imobilizačního agens (0,2% MS222 v 0,2% NaHCO_3). Tlak v kapiláře byl nastaven na asi 8,5 psi. Injikovaná embrya byla po transplantaci přenesena do nové misky vylité agarózou a s roztokem 0,05x MMR s přidaným Gentamycinem. Schéma provádění vpichu je znázorněno na *obrázku 4*.



Obrázek 4: Schéma mikroinjikace do dorzálního peritonea.

6.4 Pozorování mikroinjikovaných embryí *X. tropicalis* a řezových preparátů

Zkoumání řezových preparátů nebo živých embryí (při analýze se pulci uspávali uspávacím roztokem MS-222) probíhala na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX40 (Olympus Optical) a na fluorescenční binolupě Olympus SZX16 (Olympus Optical).

6.5 Optimalizace metody přípravy řezových preparátů

Před zavedením protokolu pro novou metodu přípravy řezových preparátů byly všechny preparáty fixovány ve 4% formaldehydu do dobu 24 hodin při teplotě 4 °C. Po vytvoření stálého protokolu k nové metodě se začala embrya fixovat v MEMFA roztoku, ten by měl být k vzorkům obojživelníků šetrnější. Pokud není řečeno jinak, probíhaly všechny pokusy při pokojové teplotě.

6.5.1 Parafínové řezy

Fixování pulci (v roztoku formaldehydu) byli šestkrát promyti kohoutkovou vodou. Poté odvodnění ve vzestupné řadě etanolu (30% -> 50% -> 80%), pokaždé třikrát po 5 minutách pro každou z koncentrací, vše při pokojové teplotě. Následovala 5 minut dlouhá inkubace ve 100% etanolu a další dvakrát opakované 10-minutové promývání v benzenu. Potom byly preparáty zality benzparafínem a ponechány v termostatu při 60 °C na 20 minut. Vzorky se pak přesunuly do misky s parafínem a poté byly opět vráceny do termostatu při stejné teplotě tentokrát na 1 hodinu. Následně byl každý pulec umístěn do středu každé formy, a takto pulci zůstali při pokojové teplotě až do druhého dne, kdy se vložili na 30 minut do lednice. Po zchlazení byl ze vzorku připraven bloček na řezání tak, aby samotná tkáň vyplňovala co největší prostor v bločku.

Z řádně připevněného bločku byly vytvářeny řezy o síle $\approx 8 \mu\text{m}$. Ty byly následně přeneseny na podložní sklíčka na kapku destilované vody. Sklíčka byla předem vyhřátá na ploténce.

6.5.2 Kryosekce

Příprava preparátů pomocí kryostatu nezajišťuje většinou takovou kvalitu vytvořených řezů jak je tomu u zalévání do parafínu, je však vhodná pro řezání tkání značených vitálními fluorescenčními barvičkami.

Tkáň je řezána při teplotách okolo -20°C (teplotu je možné přizpůsobit typu vzorku). Vytvořené řezy byly poté přeneseny na ploténku. Pro kryosekce jsou vyráběna speciální sklíčka, která mají upravený povrch poly-L-lysinem, aby na nich preparáty lépe držely. Tkáně zalité v O.C.T. médiu byly připevněny pomocí stejného média k disku na vzorky, ten byl vložen do držáku na vzorky. Po zatvrdnutí byl opět vytvořen bloček a ten byl následně řezán na plátky libovolné velikosti (od cca $5\ \mu\text{m}$ po $300\ \mu\text{m}$). V tomto případě byly vytvářeny řezy o tloušťce $5\text{-}15\ \mu\text{m}$.

6.5.2.1 Prosyčení preparátů sacharózou a želatinou

Aby se zabránilo vytvoření krystalů vody, byly vzorky prosycovány vzestupnou řadou sacharózy. Pulci byli umístěni do 50ml zkumavek s kónickým dnem, do kterých se roztoky přidávaly i odebíraly pomocí tenké Pasteurovy pipety. Nejprve se vzorek promýval od formaldehydu pětkrát po 3 minutách v 2/3 PBS. Následovala inkubace v 7,5% sacharóze asi 2,5 hodiny (než se pulec ponořil) v lednici. Poté byl vzorek zalit 15% sacharózou a opět uchováván v lednici, po zhruba 2,5 hodinách (zase do ponoření pulce) byla sacharóza odstraněna a přidána 7,5% želatina, v níž vzorek zůstával přes noc (12 hodin) ve vodní lázni ohřáté na 37°C . Další krok zahrnoval zalití 15% želatinou a opět 12hodinová inkubace ve vodní lázni. Posledním krokem bylo přidání 20% želatiny a následné ponechání vzorku ve vodní lázni po 12 hodin. Prosyčení želatinou bylo později zcela vynecháno a nahrazeno inkubací vzorků v 30% sacharóze přes noc.

Takto připravené vzorky byly zastřiženou plastovou pipetou přeneseny do zamrazovacích bločků a pomocí jehly byly umístěny na střed každého bločku. Vzorek byl přemístěn do mrazáku nebo rovnou do kryostatu (-20°C) a čekalo se až sacharóza zatuhne, což trvalo asi 1-2 hodiny. Tyto vzorky nebylo dále nutné zalévat do O.C.T. média. Pomocí média se pouze připevnily k disku na vzorky v kryostatu.

6.5.3 Vibratom – příprava řezových preparátů

Bloček s pulci byl přichycen na speciální disk pomocí vteřinového lepidla. Disk se vzorkem byl poté vložen do vaničky s vyvýšeným podstavcem na dně, kde byl disk upevněn díky magnetům jak v disku tak ve vaničce. Do vaničky byl poté nalit roztok, nejčastěji 1x PBS. V případě poloautomatického vibratomu (který byl užit v experimentech v rámci této práce) byla uživatelem nastavena poloha žiletky, rychlost pohybu ramena se žiletkou a amplitudu kmitu žiletky. Taktéž byla nastavena i síla řezů nebo poloha celého stolečku se zmíněnou vaničkou. Před řezáním bylo vždy nutné nakalibrovat celý přístroj pomocí VibroChecku.

Pulci byli fixováni v MEMFA roztoku při 4°C přes noc, ale ne déle jak 24 hodin (při pokojové teplotě stačila 2hodinová fixace). Následovalo několikanásobné promytí ve 100% metanolu. Takto připravené vzorky se mohly uchovávat v mrazáku (-20°C) minimálně rok (avšak aby nevznikaly nežádoucí artefakty, skladovali jsme embrya nejdéle po dobu půl roku). Vzorek v metanolu bylo nutné rehydratovat v sestupné metanolové řadě (90 % -> 75 % -> 50 % -> 25 %), kdy metanol byl ředěn roztokem PBST. Poslední v řadě bylo promytí v 1x PBS. Každý krok byl opakován třikrát po dobu 5 minut. Rehydratovaný vzorek byl přenesen do 15ml zkumavky s kónickým dnem obsahující asi 10 ml 3% roztoku agarózy. Zkumavka byla vložena do hybridizační pece vyhřáté na 48°C a ponechána v ní přes noc při mírných otáčkách. Druhý den byl pulec přesunut do 24jamkové nebo 12jamkové kultivační destičky tak, aby byl celý zalit v agaróze, a byl umístěn na střed jamky. Destička byla vložena na 5-10 minut do mrazáku, ze kterého byla následně vyjmuta a přesunuta do lednice, kde se vzorek uchovával do samotného řezání (ne však déle jak 1 den).

Po upevnění preparátu na disk, byla vanička naplněna vychlazeným 1x PBS. Podle typu tkáně v pulci se rychlost pohybu žiletky udržovala mezi 0,18 – 0,3 mm/s a amplituda byla nastavena na 0,45 mm při síle řezů 30 – 40 µm. Vytvořené řezy se z roztoku přenášely pomocí skleněné pipety buď na sklíčko, nebo do 6jamkové kultivační destičky. Po výměně použitého PBS za nový roztok mohly řezy být takto uchovávány po dobu jednoho týdne.

6.6 Imunohistochemické metody

Parafínové preparáty byly připravovány klasickým způsobem, kdy se řezy deparafinovaly a následně obarvily pomocí DAPI, která značí jádra buněk.

Kryořezy nebyly nijak obarveny. Pro pozorování bylo využito vlastní fluorescence exprimovaného RFP proteinu v transplantovaných buňkách.

Řezy z vibratomu byly vloženy do 0,1% roztoku Tritonu X-100 ředěného 1x PBS na 1 hodinu. Následovalo promývání v 1x PBS třikrát po 5 minutách. Aby byla zablokována nespecifická vazebná místa, na která by se mohly navázat protilátky, byly řezy přesunuty do blokovacího roztoku TNB na 1 hodinu. Poté se řezy nechaly inkubovat s roztokem primární protilátky (ředěným na daný poměr roztokem TNB) přes noc při 4°C. Dále se řezy opět promývaly v 1x PBS třikrát pokaždé 5 minut. Sekundární protilátka se s řezy inkubovala 1,5 hodiny zakrytá při pokojové teplotě, aby se zabránilo vysvícení fluoroforu. Sekundární protilátka se také ředila pomocí roztoku TNB. Po inkubaci se řezy opět promyly 1x PBS třikrát po 5 minutách. Pokud se řezy obarvovaly v kultivační destičce, přenesly se následně na podložní sklíčko. Rozprostřené řezy byly poté potaženy tenkou vrstvou mountovacího média Mowiol s fluorescenční barvou DAPI a byly zakryty krycím sklíčkem.

7 Výsledky

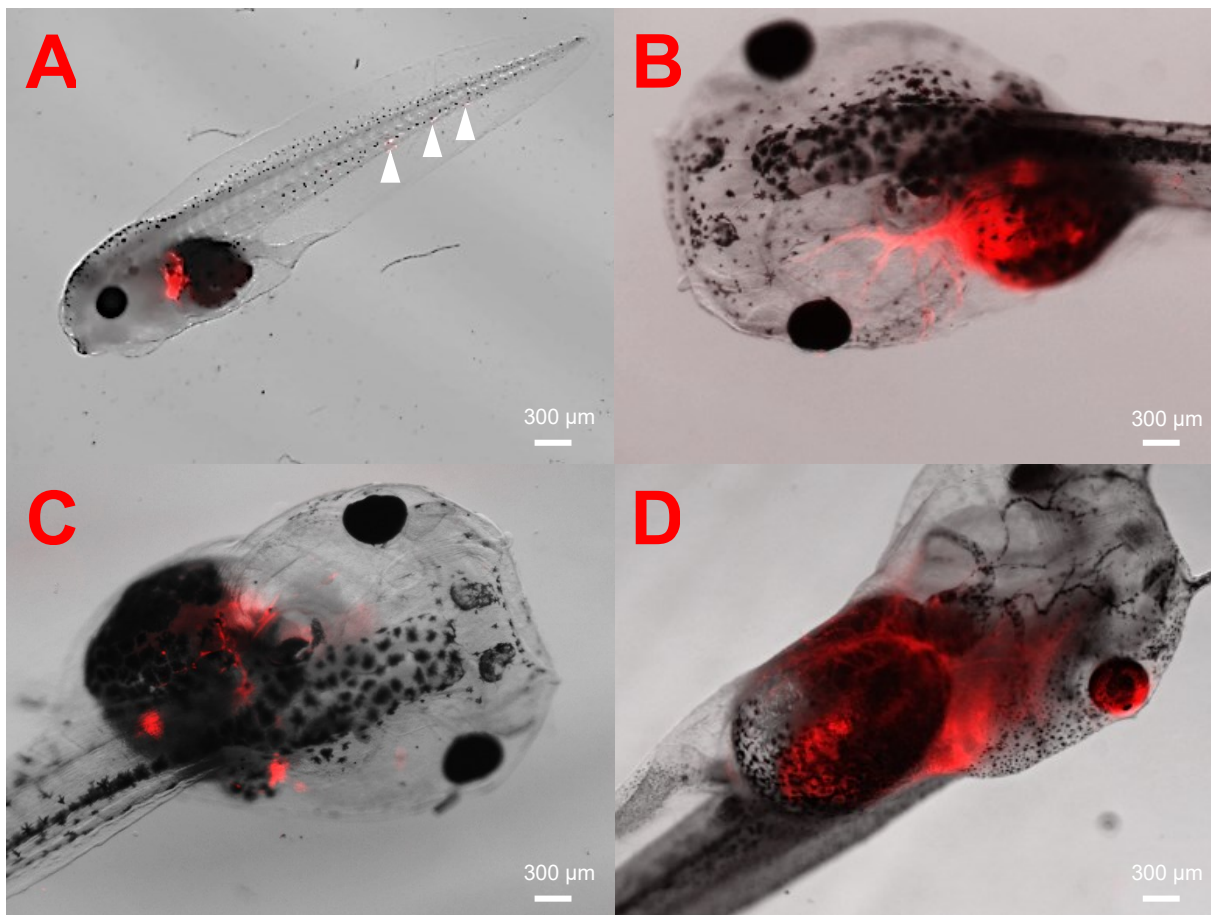
Veškerá fotodokumentace vznikla ve spolupráci s vedoucím laboratoře doc. RNDr. Ing. Vladimírem Krylovovem, Ph.D. a s Mgr. Xuan Nguyen, Ph.D.

7.1 Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk *X. tropicalis*

Při transplantacích byly testikulární kmenové buňky z buněčné kultury juvenilních samců *X. tropicalis* (XtTSC) injikovány do pulců pocházejících z IVF. Mikroinjekce byly aplikovány do peritoneí pulců ve stádiu 41, kterého dosáhne embryo dva dny po oplození. Toto stádium bylo vybráno hned z několika důvodů. Vzhledem ke svému mírně zploštělému tvaru bylo snazší do embryí zavádět kapiláry. Navíc se v tomto stádiu teprve začíná utvářet trávicí soustava, což znamená, že při injikaci do peritonea je riziko poškození vyvíjejícího se pulce minimální. V neposlední řadě tato dutina umožňuje XtTSC snadný přístup do ostatních částí těla, kam následně migrují.

Do peritonea se zavádělo 40 nl suspenze buněk, tedy 1000 buněk na jednoho pulce. Na *obrázku 5* jsou nejčastější i méně časté oblasti migrace XtTSC po jejich transplantaci. Nejvíce se buňky stahovaly do oblasti střeva a srdce, poměrně frekventovaně byly buňky také pozorovány v oblasti hlavy (někdy přímo v oku), řidčeji se pak objevovaly v ocasní části, konkrétně v genitální rýze. Je patrné, že buňky po vpichu ihned začaly migrovat po těle pulce, na *obr. 5A* je pulce necelý den po transplantaci XtTSC. Pulci byli následně fixováni ve stádiích 41, 45, 48, 52, což odpovídá stáří dvou dnů, pěti dnů, jednoho týdne a jednoho měsíce (Nieuwkoop a Faber 1994).

Pouze několik pulců se dožívalo jednoho měsíce a více. Mnoho jedinců bylo odebíráno v dřívějších stádiích pro přípravu řezových preparátů. Menší část embryí odumírala po transplantacích XtTSC a v průběhu jejich dalšího vývoje.



Obrázek 5: Výsledky studia migračního potenciálu XtTSC po transplantaci do dorzálního peritonea pulců *X. tropicalis* ve stádiu 41. A – pulec den po transplantaci, buňky se drží v oblasti pronefros, ale jsou patrné také v ocasní části (zvýrazněno bílými trojúhelníčky). B – pulec 3 dny po transplantaci, buňky se vyskytují kolem pronefros a objevují se i v hlavové části. C – pulec 3 dny po transplantaci, buňky se vyskytují v oblasti střeva a pronefros. D – pulec 20 dní po transplantaci, buněčná síť mikroinjikovaných buněk se táhne od střeva až k hlavě, buňky se nachází v oku, srdci, střevě a pronefros (převzato a upraveno z Tlapakova et al. 2016). Měřítka na každém obrázku odpovídá 300 µm.

7.2 Optimalizace metody přípravy řezových preparátů

V rámci optimalizace přípravy řezových preparátů byly postupně otestovány tři přístupy: 1) zalití preparátu do parafínu s následným řezáním na mikrotomu, 2) kryosekce a 3) řezání agarózou zalitého preparátu na vibratomu.

7.2.1 Mikrotom (data nezveřejněna)

Jako první byla zvolena klasická metoda přípravy řezových preparátů pomocí mikrotomu, tedy příprava parafínových řezů. Předchozí experimenty zavedené minulou diplomantkou Helenou Fuxovou byly založené na prosycování fixovaných pulců roztoky sacharózy a želatiny, avšak dosahovaly neuspokojivých výsledků.

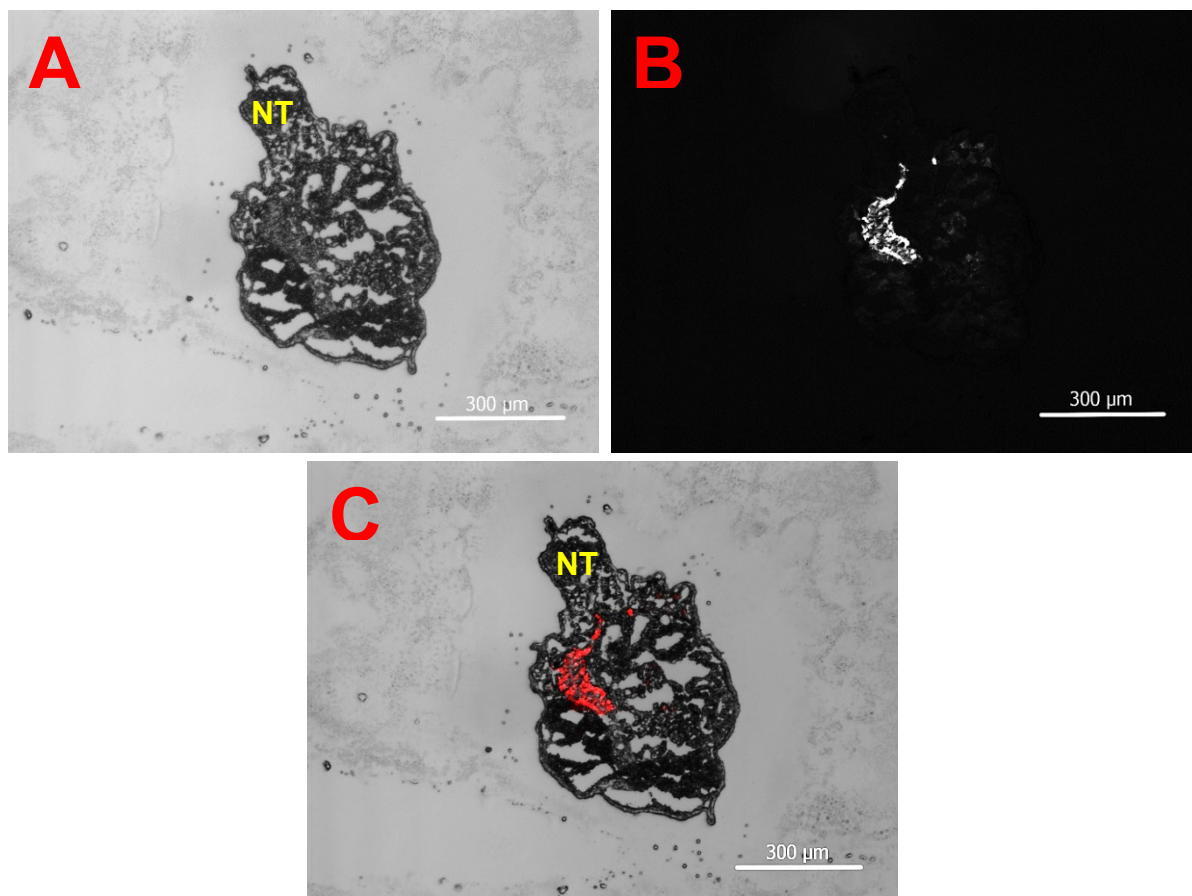
Tkáň na řezech byla zdeformovaná, potrhaná, anebo vypadávala. Data z řezů zalitých do parafínu bohužel nejsou k dispozici, protože jejich kvalita byla na stejné úrovni, nebo ještě horší, než v předcházejících pokusech uskutečněných v laboratoři.

Domnívali jsme se, že problém s vypadáváním kusů tkáně z řezů je způsoben špatnou přilnavostí preparátu ke sklíčku. Proto jsme zkusili použít různé typy sklíček nebo upravit jejich povrch. V prvním experimentu jsme zkoušeli 4 typy: sklíčka určena pro kryorezy, sklíčka ošetřena 2% roztokem APTS (γ -aminopropyltriethoxysilan), sklíčka pokrytá 1,5% želatinou a sklíčka s 1,5% želatinou s přídavkem $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$. Došli jsme k závěru, že nejlepších výsledků jsme dosáhli s oběma roztoky želatiny. Na druhou stranu se nám nepodařilo úplně odstranit problémy s vypadáváním částí tkání a nebylo možné přistoupit k následným krokům nutných pro identifikaci buněk. Zaměřili jsme se proto na přípravu preparátů pomocí kryostatu.

7.2.2 Kryorezy

Metodika vycházela z postupu zavedeného v laboratoři Helenou Fuxovou, který, jak bylo zmíněno výše, spočíval v prosycování fixovaných pulců roztoky sacharózy a želatiny. Tento přístup byl zdoluhavý a nedosahovali jsme uspokojivých výsledků. Části tkání i nadále z řezů vypadávaly, a proto jsme celý postup upravili. Inkubaci v želatině jsme nahradili dalším roztokem sacharózy, který byl dvakrát koncentrovanější než ten předchozí. Postup zahrnoval inkubaci v 7,5% sacharóze asi 2,5 hodiny (než se pulec ponořil) v lednici. Následně byl vzorek zalit 15% sacharózou a opět uchovávan v lednici, než se pulec ponořil (tedy zhruba 2,5 hodiny). Jako poslední se pulec nechal prosytit 30% sacharózou v lednici přes noc. Následující den byla embrya zastřiženou plastovou pipetou přenesena do zamrazovacích bločků, které byly uloženy do mrazáku nebo rovnou do kryostatu ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Po jejich zatuhnutí (1-2 hodiny) byly vzorky upevněny na držák kryostatu a řezány na 5-10 mikrometrové řezy.

Nejlepší výsledky jsou znázorněny na *obrázku 6*. Tato technika nám umožňovala vytvořit řezy bez ztráty tkání. Během zdokonalování této metody jsem zjistila, že každé stádium vyžaduje jinou teplotu při řezání. Tedy čím starší pulec byl, tím nižší teplota objektu (držáku se vzorkem) v komoře kryostatu se musela nastavit. Problém však byl v rozeznávání morfologie tkání a typů buněk. Mohli jsme pozorovat, zda naše buňky v pulci jsou, ale nevěděli jsme, ve které konkrétní části těla se nachází,



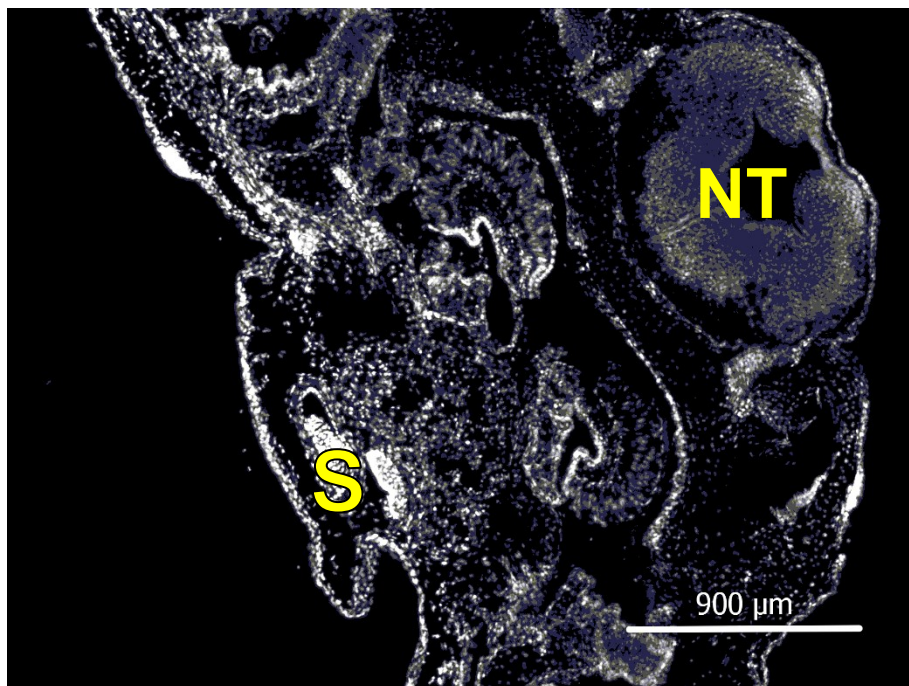
Obrázek 6: Řezový preparát mikroinjikovaného pulce ve stádiu 45 vytvořený pomocí kryostatu. A – foceno při procházejícím světle, B - fluorescence XlTSC exprimujících RFP, C – spojení předchozích snímků. Měřítka všech obrázků odpovídá 300 µm.

nebo jestli se mění jejich morfologie. Zároveň bylo těžké zajistit, aby při každém řezání vznikl preparát vhodný k pozorování.

Zásadní překážkou zkoumání vývoje mikroinjikovaných buněk byla neschopnost vytvoření řezových preparátů z jedinců starších než jeden týden (po oplození) při použití metody kryosekce. Zaměřili jsme se tedy na třetí způsob přípravy řezových preparátů pomocí vibratomu.

7.2.3 Vibratom

V prvních experimentech, jsme užívali zalévací médium, které obsahovalo albumin a pro zatvrdnutí bylo nutné používat glutaraldehyd. Albumin lépe interagoval s lipidy na povrchu embryí a glutaraldehyd umožnil prosíťování ostatních molekul v roztoku. Na *obrázku 7* jsou velmi zřetelné struktury srdce i neurální trubice.

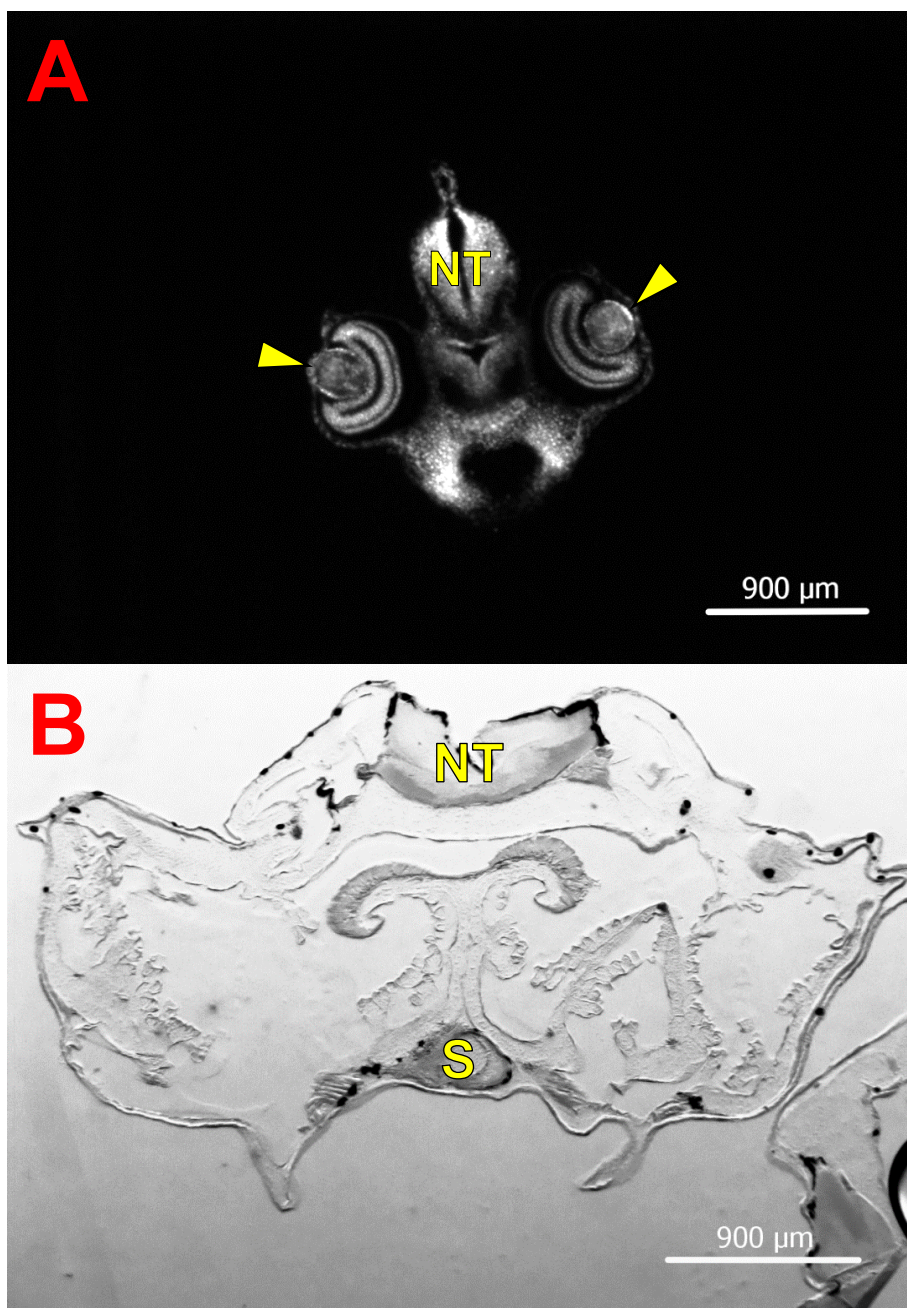


Obrázek 7: Řezový preparát z pulce ve stádiu 48 vytvořený pomocí vibratomu, zalévací médium s albuminem a glutaraldehydem. Jádra jsou značena DAPI, NT – neurální trubice, S – struktura srdce. Měřítka odpovídá 900 μm .

Abychom se vyhnuli manipulaci s toxickým glutaraldehydem, bylo předchozí zalévací médium nahrazeno agarózou. Inspirací nám byla práce Blackinston et al., 2010, ve které vzorky fixují pomocí roztoku MEMFA a preparáty zalévají do low melting agarózy. Jakmile byla metoda standardizována, zvolili jsme i my šetrnější způsob fixace vzorků pomocí roztoku MEMFA a nahradili tak stávající fixační roztok 4% formaldehydu.

Z důvodu vyšších pořizovacích nákladů na low melting agarózu postup přípravy preparátu pro vibratom jsme optimalizovali s použitím běžně dostupné agarózy pro elektroforézy. Jednokrokový proces zalévání do 4% agarózy jsme rozdělili na dvoukrokový. Napřed proběhlo prosycení sacharózou postupně od 7,5% přes 15% až na 30%, z níž byl pulec převeden do 5% agarózy, ve které se nechal zatuhnout. Poměrně často však docházelo k vypadávání částí tkání ze zatuhlé agarózy. Proto jsme se rozhodli nahradit při prosycování vzorku roztok sacharózy za 1% agarózu. Vzorek tak byl inkubován v 1% agaróze přes noc při 37 °C, která se pak díky nižší hustotě mohla lépe dostat do pulce a vyplnit ho. Druhý den byl vzorek přenesen do čisté kultivační destičky a zalit 5% agarózou, v níž se nechal zatuhnout. S tímto postupem jsme měli větší úspěšnost, na *obrázku 8A* je řez pulce ve stádiu 41 (průřez hlavou, na kterém jsou patrné struktury obou očí). Přesto ale bylo těžké

predikovat, zda bude řezání spolehlivé. Nebylo výjimkou, že se vzorky při řezání rozpadaly, protože nevydržely nápor vibrující žiletky. Především starší stádia byla velice choulostivá a často se trhala.



Obrázek 8: Řezový preparát připravený pomocí vibratomu, zalévací medium agaróza. A – Řez hlavou pulce ve stádiu 41, jádra barvena DAPI, NT - neurální trubice, žluté trojúhelníčky označují strukturu očí. B – Řez pulcem ve stádiu 52, NT – neurální trubice, S – struktura srdce. Měřítko u obou obrázků odpovídá 900 µm.

Rozhodli jsme se tehdy vyzkoušet inkubaci v 3% agaróze přes noc bez následného přenesení do koncentrovanějšího roztoku. Takto koncentrovaná agaróza nesla výhody obou předchozích. Byla natolik hustá, aby tvořila podporu tkáni při řezání a zároveň byla dostatečně tekutá, což umožňovalo lepší prostoupení vzorku

a vyplnění dutin. Toto spolu se zdokonalením samotného procesu řezání nám umožnilo připravovat řezové preparáty i ze starších pulců, jako na *obrázku 8B*, kde je průřez tělem pulce starého 1 měsíc.

7.3 Studium diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk *X. tropicalis*

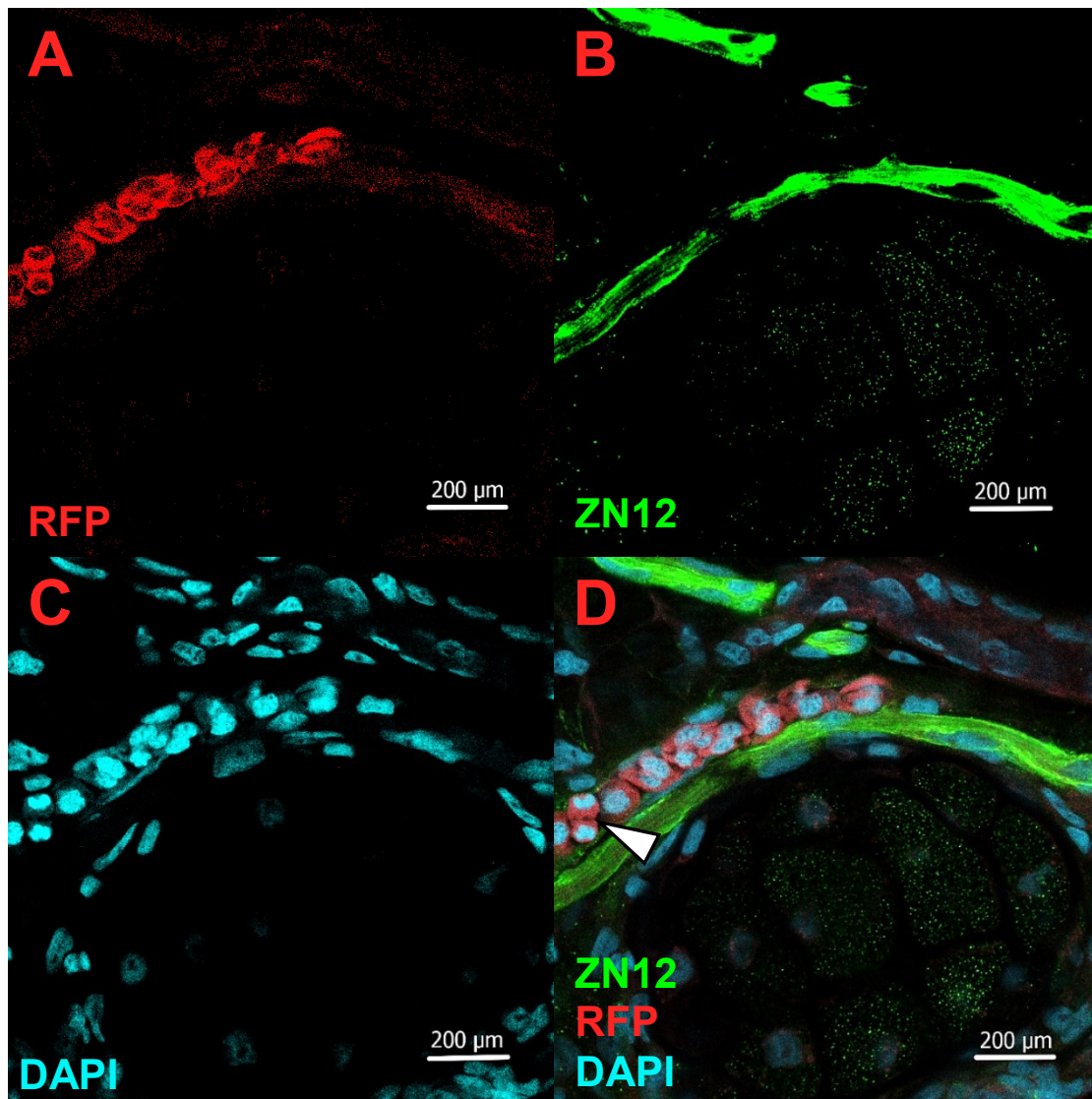
Po úspěšném zavedení metody přípravy řezových preparátů následovalo imunologické značení, které je nezbytné pro studium diferenciačního potenciálu XtTSC. Protože jsme ověřovali hypotézu, že XtTSC mají mesenchymální charakter, a navíc se nám zdálo, že vytvářejí neuronům podobné struktury, začali jsme postupně zkoumat, zda transplantované buňky obsahují markery typické pro jednotlivé druhy buněk. Značení pomocí protilátky ZN12, která se váže na neurální povrchový marker, se zprvu jevílo pozitivně, ale při pozorování konfokálním mikroskopem jsme zjistili, že buňky pouze kopírují linii nervových vláken (*obrázek 9*).

Protože transplantované buňky pocházejí z buněčné kultury vytvořené z varlat, rozhodli jsme se pro značení buněk proti vimentinu (protilátka 14h7), jakožto markeru Sertoliho buněk a také buněk migrujících, proti SOX9 (marker testikulárních buněk) a proti α -actinu z hladké svaloviny (marker myoidních buněk - SMA). Snímky vibratomových řezů pulců zalitých v agaróze byly pořizovány v den transplantace, následující den po transplantaci a 30 dní po transplantaci buněk.

Obrázek 10 ukazuje silnou expresi vimentinu v transplantovaných buňkách u všech zkoumaných stádií pulců. Kolokalizace signálů protilátky s RFP pozitivními buňkami naznačuje, že se může jednat o SeC nebo o migrující mesenchymální buňky, pro které je exprese vimentinu také typická.

Na *obrázku 11* je vidět, že kolokalizační signál z transplantovaných RFP pozitivních buněk a protilátky proti SOX9 se objevuje až měsíc po transplantaci. To může potvrzovat možnou diferenciaci mikroinjikovaných buněk do linie SeC nebo do chondrocytů, pro které je exprese SOX9 také typická. Nepřítomnost kolokalizačního signálu v předchozích stádiích by mohla značit dediferencovaný stav buněk umožňující migraci po těle pulce.

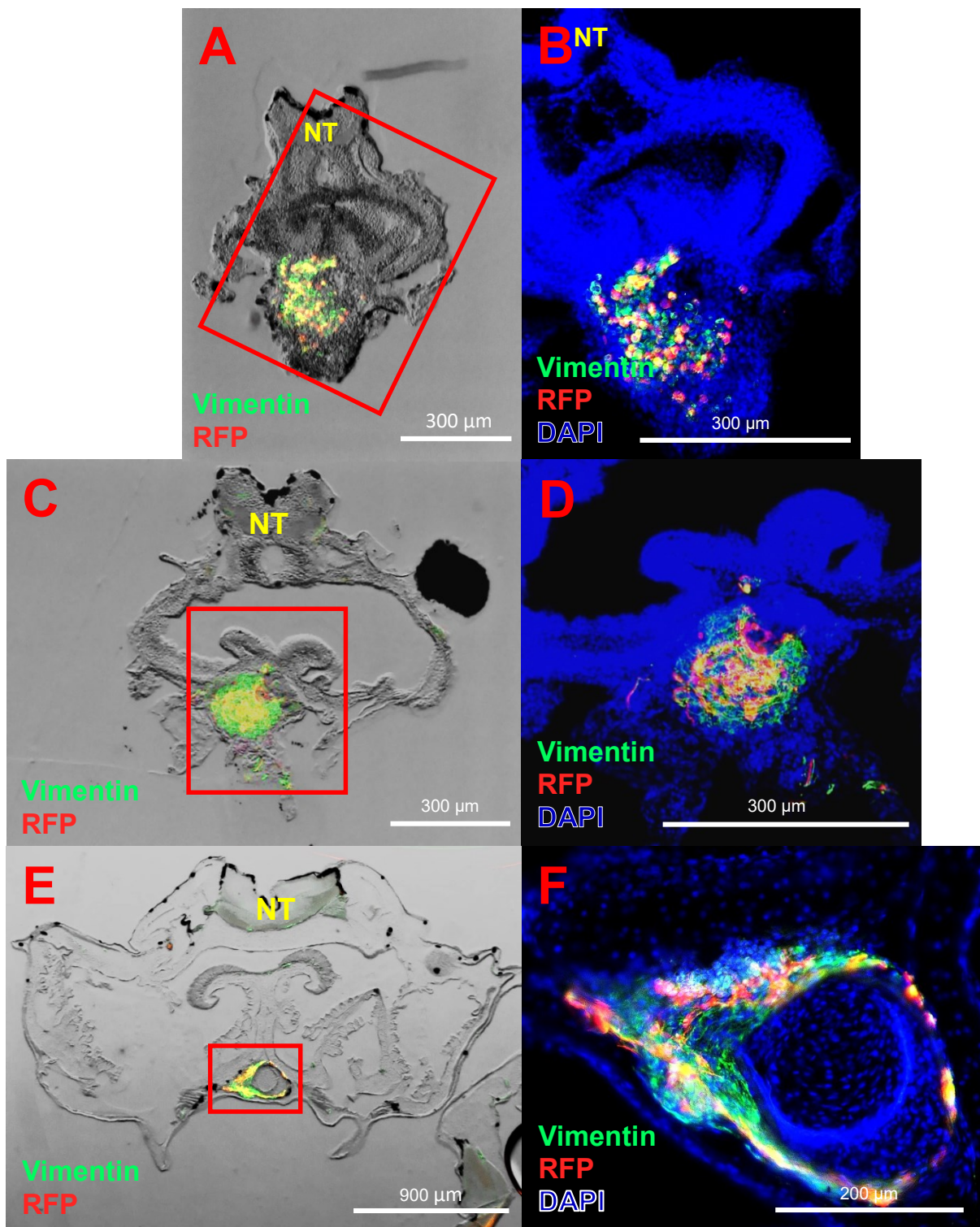
Při značení α -actinu (*obrázek 12*) se neobjevil žádný kolokalizační signál protilátky s RFP pozitivními buňkami. To potvrzuje předchozí domněnky



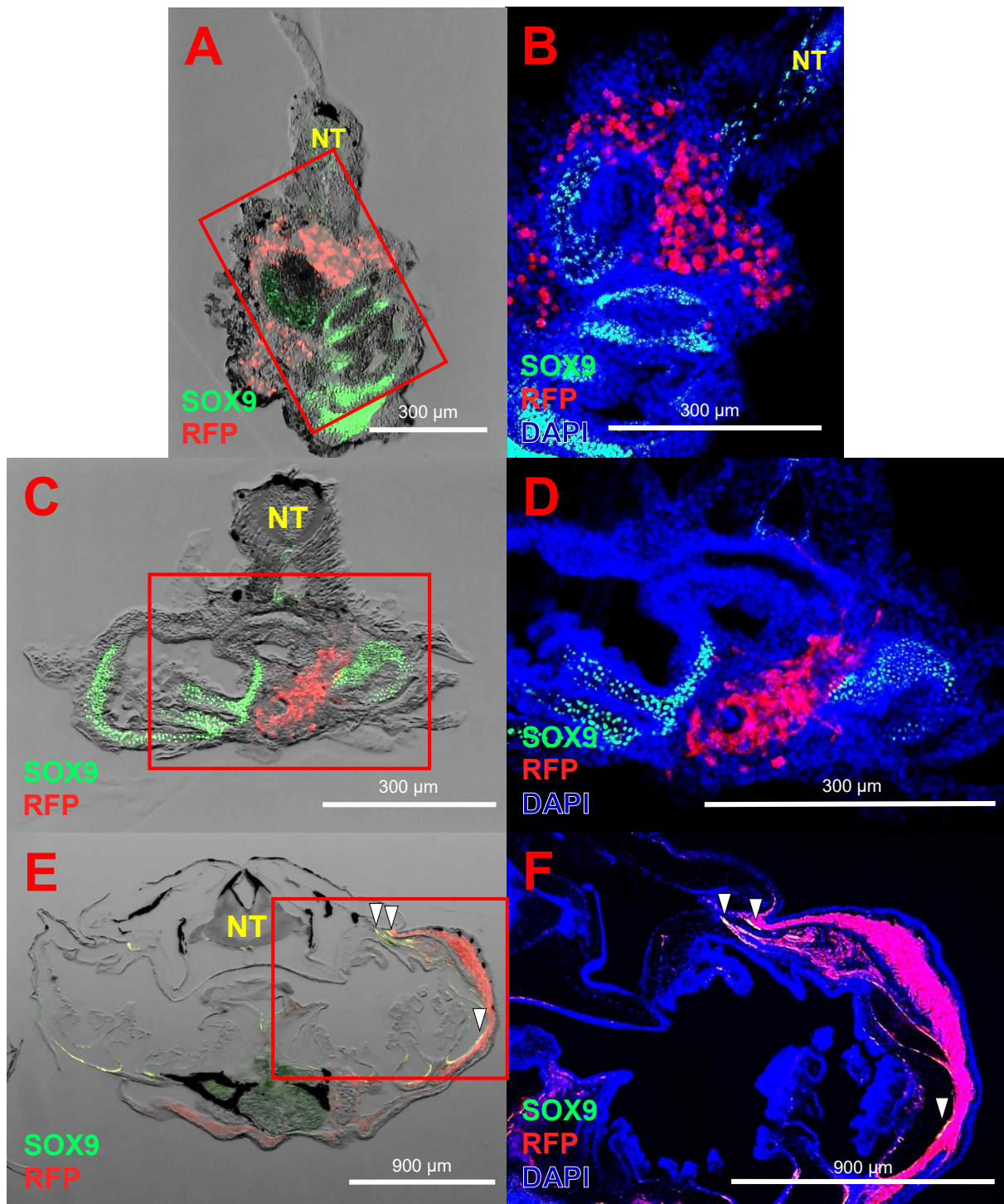
Obrázek 9: Vibratomový řez pulce zalitého v agaróze ve stádiu 52, značení protilátkou ZN12. **A** - fluorescence RFP v mikroinjikovaných buňkách, **B** – značení povrchového markeru neuronu protilátkou ZN12, **C** – jádra buněk obarvena DAPI, **D** – spojení předchozích snímků, bílá šipka označuje dělící se buňky (snímky pořízené konfokálním mikroskopem). Měřítka odpovídá 200 µm.

o dediferencovaném stavu buněk, nebo jejich probíhajícím vývoji směřujícím do linie SeC.

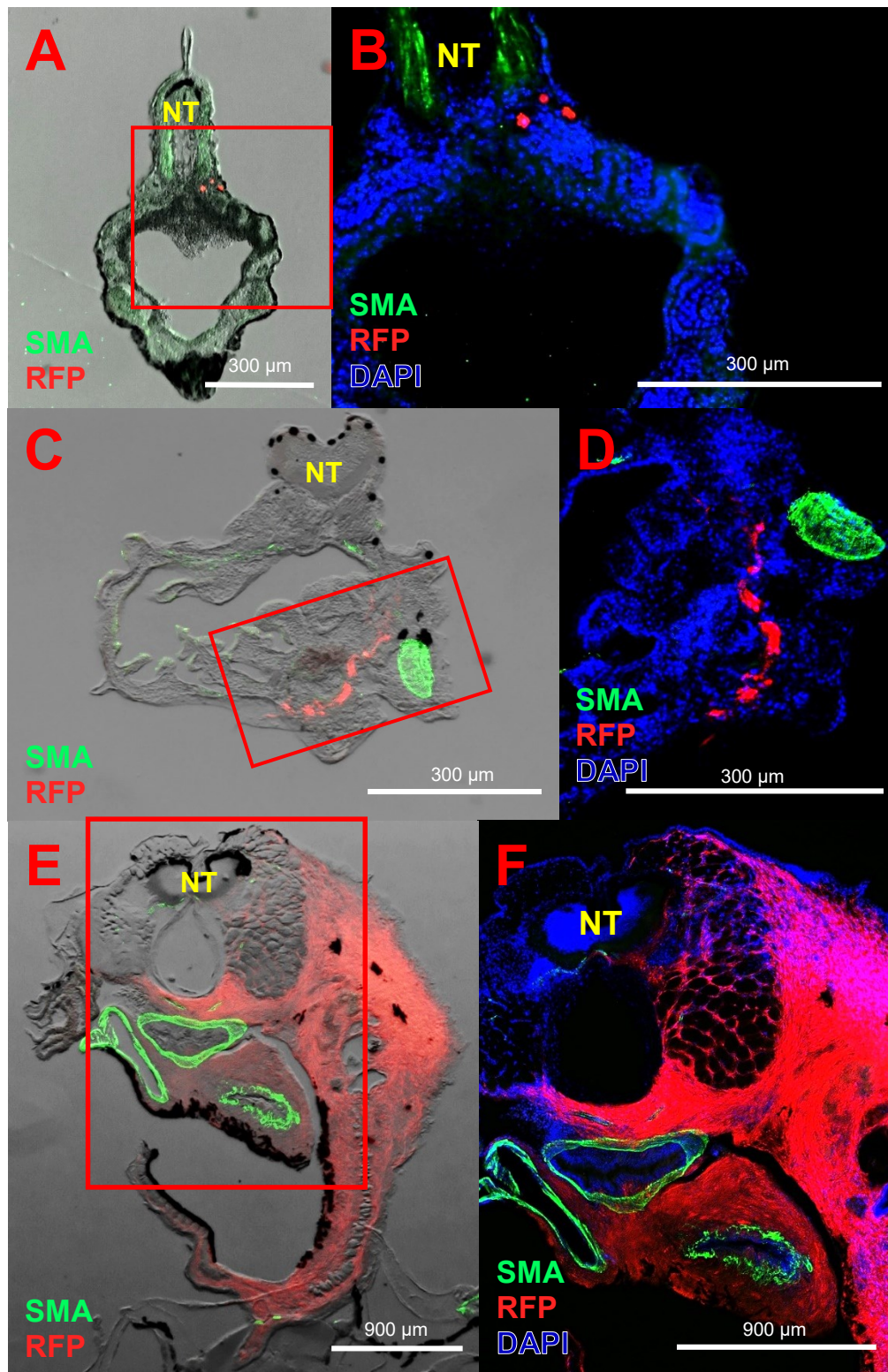
Tyto pokusy potvrzují hypotézu, že buněčná kultura vytvořená v laboratoři školitele obsahuje progenitory SeC a PTMC se sklonem k diferenciaci do SeC. Buňky po transplantaci jsou schopné migrovat do všech částí těla, ale nedokáží se diferencovat v jiný buněčný typ a zachovávají si svůj původní charakter.



Obrázek 10: Vibratomové řezy mikroinjikovaných pulců zalitých v agaróze, imunohistochemické barvení proti vimentinu. A, B – pulec fixovaný v den transplantace buněk. C, D – pulec fixovaný den po transplantaci buněk. E, F – pulec fixovaný 30 dní po transplantaci buněk. Na všech snímcích je patrná kolokalizace RFP pozitivních buněk spolu s protilátkou značící vimentin. A, B, C, D – měřítko odpovídá 300 μm . E - měřítko odpovídá 900 μm . F - měřítko odpovídá 200 μm . A, C, E – snímky pořízeny pomocí binolupy. B, D, F – jádra značena DAPI, snímky pořízeny fluorescenčním mikroskopem. NT- neurální trubice. (převzato a upraveno z Tlapakova et al. 2016)



Obrázek 11: Vibratomové řezy mikroinjikovaných pulců zalitých v agaróze, imunohistochemické barvení proti SOX9. A, B – pulec fixovaný v den transplantace buněk. C, D – pulec fixovaný den po transplantaci buněk. E, F – pulec fixovaný 30 dní po transplantaci buněk, na obou snímcích je bílými trojúhelníčky vyznačena kolokalizace RFP pozitivních buněk spolu s protilátkou značící SOX9. Což může vypovídat o možné rediferenciaci injikovaných buněk směřující k linii SeC. A, B, C, D – na snímcích se neobejvuje žádný kolokalizační signál RFP pozitivních buněk s protilátkou značící SOX9, měřítko odpovídá 300 μm . E, F - měřítko odpovídá 900 μm . A, C, E – snímky pořízeny pomocí binolupy. B, D, F – jádra značena DAPI, snímky pořízeny fluorescenčním mikroskopem. NT – neurální trubice. (převzato a upraveno z Tlapakova et al. 2016)



Obrázek 12: Vibratomové řezy mikroinjikovaných pulců zalitých v agaróze, imunohistochemické barvení proti SMA. A, B – pulec fixovaný v den transplantace buněk. C, D – pulec fixovaný den po transplantaci buněk. E, F – pulec fixovaný 30 dní po transplantaci buněk. Na žádném snímku se neobejví kolokalizační signál RFP pozitivních buněk s protilátkou značící SMA. To může znamenat buď setrvalý dediferencovaný stav buněk, nebo již započatý vývoj buněk do linie SeC. A, B, C, D – měřítko odpovídá 300 μm . E, F - měřítko odpovídá 900 μm . A, C, E – snímky pořízeny pomocí binolupy. B, D, F – jádra značena DAPI, snímky pořízeny fluorescenčním mikroskopem. NT – neurální trubice. (převzato a upraveno z Tlapakova et al. 2016)

8 Diskuze

Do pulců byla mikroinjikována suspenze transformovaných buněk, které v sobě nesly gen pro červený fluorescenční protein RFP. Buněčná kultura s takto modifikovanými buňkami byla založena z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* (drápatky tropické) v laboratoři vedoucího práce. *In vitro* tyto buňky vykazovaly charakter mesenchymálních kmenových buněk, a zároveň exprimovaly markery buněk Sertoliho. Cílem této práce bylo nejen vytvořit stabilní protokol pro přípravu řezových preparátů, ale také zkoumat migrační a diferenciační potenciál těchto buněk po transplantaci do raných stádií pulců.

8.1 Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk XtTSC u pulců *X. tropicalis*

Při transplantačních pokusech se podařilo potvrdit, že XtTSC si udržují svůj mesenchymální kmenový charakter také *in vivo*. XtTSC se po mikroinjikování do peritonea pulců nejčastěji shlukovaly v břišní dutině a kolem srdce, ale také v rámci několika málo hodin po transplantaci migrovaly do jiných tkání, kde buď zůstávaly a množily se, nebo uhynuly. Velice často byly pozorovány v oblasti hlavy, kde se vyskytovaly především kolem hlavních nervových drah. Zřídka byly pozorovány v ocasní části pulce nebo v genitální rýze.

Právě migrace je jedním z hlavních rysů mesenchymálních kmenových buněk (MSC) (Xinaris et al. 2013). Vincent et al. (2013) prokázali *in vitro*, že MSC dokážou rozeznávat jakým prostředím jsou obklopeny, a podle toho určit směr svého dalšího pohybu. Vytvořili tři polyakrylamidové gely o různé tuhosti od fyziologické (jakou má svalová tkáň) přes patologickou (například v nádorech) a gel s měnícím se gradientem tuhosti. MSC vždy migrovaly do částí s největší tuhostí. Na základě experimentů s cytoskeletárními jedy (nokodazol a cytochalasin) zjistili, že za řízenou migraci odpovídá mikrotubulární aparát, přestože motilitu buňky zajišťuje aktinový cytoskelet. V našich experimentech *in vivo* se zdá, že XtTSC migrují do tužších struktur, jako například srdce a jeho obaly, střevo nebo také hlava, kde kopírují především linie hlavních nervových drah, jak je to znázorněno na *obrázku 9*.

MSC přirozeně cirkulují v krvi a jsou vychytávány především v srdci, plicích a ledvinách (Li a Ikehara 2013). Také XtTSC v transplantačních experimentech vykazují stejný charakter. Velmi často se buňky držely v srdci, o něco méně pak v žaberních obloucích nebo v pronefros (zastávající funkci ledvin u pulců).

Další výzkum migračního potenciálu XtTSC by proto měl být zaměřen na *in vitro* testování schopností těchto buněk rozeznávat okolní prostředí a migrovat do konkrétních oblastí.

8.2 Optimalizace metody pro přípravu řezových preparátů

Pro přípravu řezových preparátů byly zvoleny tři různé postupy. Jako první jsme se zaměřili na běžně využívanou metodu zalévání vzorků do parafínu. Její výhodou je nadprůměrná kvalita řezů a možnost tvorby velmi tenkých řezových preparátů v řádech jednotek mikrometru. Zároveň, pokud jsou vzorky zalité do parafínu udržovány za správných podmínek, neznehodnotí se ani po několika letech skladování (Ward et al. 2008). Butler et al. (2001) použili stejnou metodu pro přípravu řezů určených k detekci specifických messenger RNA v embryích *X. laevis*. Jak je známo, RNA je velmi nestabilní a citlivá na jakoukoliv manipulaci, stejně tak citlivá jako žabí embrya obsahující tukovou tkáň. Přestože je při vytváření parafínových řezů nutné vzorky promývat v mnoha roztocích, což je kritické pro křehké tkáně a molekuly, autorům publikace se podařilo vyvinout metodu lokalizace mRNA v parafínových řezech a s použitím neradioaktivního značení.

V rámci našich studií samotné řezy vypadaly na první pohled bezvadně, avšak při imunobarvení se nám části tkání vždy odplavily. Problém s odplavováním vzorků mohl být způsobený špatnou fixací vzorku nebo nedostatečnou přilnavostí řezu k podložnímu sklíčku.

Dvě zásadní komplikace mohly ovlivňovat správnou fixaci pulců. Protože pulci byli vždy fixováni celí, je možné, že roztok formaldehydu nestačil během 24 hodin dostatečně prosytit všechny tkáně a k plnohodnotné fixaci došlo jen v okrajových tkáních pulců. Inkubace ve formaldehydu prodloužená na 48 hodin by mohla odstranit potíže s odpadáváním tkání (Ramos-Vara 2005). Druhou překážkou při fixování bývají lipidy, respektive tuková tkáň. Vzorky bohaté na lipidy (jako jsou například prsní tkáň a tkáň lymfatických uzlů a také povrch pulců) vyžadují také delší fixaci, rozdělení

vzorku na více menších částí, nebo oboje dohromady (Gambella et al. 2017, Haslam et al. 2014).

Pro zlepšení přilnavosti řezů k podložním sklíčkům jsme vyzkoušeli čtyři různé roztoky, z nichž nejlepších výsledků jsme dosáhli se sklíčky pokrytými roztokem 1,5% želatiny. Matsui et al. (2015) se zaměřili ve své studii na testování 8 různých typů speciálně ošetřených podložních sklíček tak, aby tkáň při imunohistochemickém barvení nebyla odplavena, ale zároveň aby bylo možné řezy z těchto podložních sklíček po barvení přesunout do epoxidové pryskyřice. Pět typů sklíček bylo ošetřeno aminopropyltriethoxysilanem v různých poměrech, jeden typ byl pokryt poly-L-lysinem, sklíčka Matsunami Adhesive Slides a Thinlayer Advanced Cytology Assay System (TACAS) mají složení chráněno patentem. Nicméně sklíčka TACAS, která mají pozitivně nabitý povrch, nejlépe obstála v experimentech, a ve čtyřech z pěti testování splnila všechny požadované parametry.

Druhým zvoleným přístupem byla kryosekce, která zajišťuje rychlé zpracování histologických vzorků, ale zároveň při ní dochází k morfologickým změnám preparátů, což ovlivňuje schopnost rozlišení při větším mikroskopickém přiblížení (Rohr et al. 2001, Ward et al. 2008). Přes tyto nevýhody patří kryosekce mezi významné techniky používané k přípravě řezových preparátů odvozených z pulců a dospělců drápatek. Příkladem úspěšného využití může být práce Tam et al. (2015), kdy pomocí kryostatu byly připraveny řezové preparáty pro zkoumání fotoreceptorů sítnice transgenního modelu *X. leavis* pomocí transmisního elektronového mikroskopu.

Ze začátku jsme se při přípravě preparátů potýkali se stejnými problémy jako u parafínových řezů. Tkáň z řezů vypadávala nebo byla velice poničená. Po úpravě protokolu, kdy jsme inkubaci v roztoku želatiny nahradili inkubací v dalším roztoku sacharózy, který byl dvakrát koncentrovanější než ten předchozí, došlo ke zlepšení. Nový postup tedy zahrnoval inkubaci v 7,5% sacharóze asi 2,5 hodiny v lednici. Následně byl vzorek zalit 15% sacharózou a opět uchováván v lednici zhruba 2,5 hodiny. Nakonec byl pulec prosycen 30% sacharózou v lednici přes noc. Tak se nám podařilo získat nepoškozené řezy i u starších pulců. Avšak ze strukturního hlediska byla tkáň v řezech nerozpoznatelná. Nemohli jsme tak zjistit, do jakých tkání XtTSC migrovaly, ani jestli se nezměnila jejich morfologie. I přes neúspěch s kryořezy jsme ale zjistili, že při řezání vzorků je nutné nastavit teplotu komory i objektu

podle toho, jaké stádium pulce je řezáno. Starší jedinci potřebovali nižší teplotu než mladší stádia.

Zpětně soudím, že zásadní chybou zřejmě bylo zdlouhavé několikanásobné prosycování embryí v roztocích sacharózy a želatiny. Domnívám se, že při výměně méně koncentrovaných roztoků za koncentrovanější, nemuselo docházet k dostatečnému prostoupení těla pulce následujícím roztokem, čímž při zamrazování mohlo docházet k vytváření krystalků vody, a tím k poničení tkáně (Chatterjee 2014). Isachenko et al. (2015) testovali difúzi kryoprezervativního roztoku s 0,15M sacharózou v ovčích ováriích. Zjistili, že pokud je perfúze roztoku moc pomalá (0,21 ml/minutu a pomalejší), nedojde k úplnému prosycení všech tkání, a tedy k nedostatečné ochraně tkání při zamrazení. Naopak rychlá perfúze (1,25 ml/minutu a rychlejší) poničí tkáně. Optimální rychlost perfúze je mezi 0,4 a 0,8 ml/minutu. Je pravdou, že potopení pulce na dno by mělo značit jeho kompletní prosycení, avšak zda k celkovému prosycení došlo, není jisté. Podle Bernhard a Viron (1971) není vždy nutné používat kryoprezervativní prostředky, záleží na typu tkáně. Nejvíce krystalků se vytváří v ledvinách. Avšak radí, aby se při kryosekci choulostivější vzorky nechaly prosytit želatinou, která vyztuží mezibuněčný prostor.

Pokud došlo ke vzniku krystalků, a ty poškodily tkáně, je možné, že se tím zhoršila jejich výsledná kvalita při pozorování. Důkazem mohou být studie, ve kterých je patrné, že nejlepší pro vzorek je, když se inkubuje pouze v jednom roztoku o určité koncentraci (Satoda et al. 1995 a Gravagna et al. 2008 a naše vlastní experimenty). Dokonce se zdá být podstatné i stáří vzorku. V práci Dubaissi a Papalopulu (2011) autoři používali pro zalévání embryí vždy jinak koncentrovaný roztok rybí želatiny (fish gelatin) v závislosti na stupni vývoje zárodků.

Třetí metodou, kterou jsme zvolili pro vytvoření řezových preparátů, byla technika s použitím přístroje Vibratom. Ačkoliv vibratomové řezy neumožňují vytvářet tenké preparáty a mohou na řezech zanechávat stopy po řezání žiletkou, jsou velmi oblíbené pro aplikaci imunohistochemických technik, protože dovolují lepší prostoupení vzorku značícími protilátkami (Ward et al. 2008). Zprvu jsme používali zalévací médium obsahující 20% albumin a 1% glutaraldehyd. Médium o podobném složení bylo úspěšně použito i v dalších vědeckých pracích (Lau et al. 2017 a Ulmer et al. 2017). Vzhledem k tomu, že glutaraldehyd je vysoce toxický a postup přípravy těchto preparátů byl poměrně náročný, rozhodli jsme se vyzkoušet netoxickou variantu s použitím agarózy, která nebyla zároveň tolik nákladná. Hlavní inspirací nám

byl článek od Blackinton et al. (2010). U vibratomových řezů se nám více než u jiných metod ukázalo, že problém nemusí být jen v pulci jako takovém, nýbrž i s řezáním specifických částí těla. U všech metod byla nejkritičtější oblast vyvíjejícího se střeva. Jedná se o velkou dutinu obsahující střevo. Proto bylo při řezání břišní části nutné upravit parametry kmitající žiletky (musela být snížena rychlost posunu žiletky a někdy také amplituda kmitu žiletky), aby se vzorek neponičil. Ve špatně prosycených anebo nedostatečně fixovaných vzorcích kmitající žiletka vytrhávala kusy tkání z pulčích těl (Prieto et al. 2007).

Celkově na kvalitu vzorků mohlo mít vliv i skladování pulců po jejich fixaci. Fixovaní jedinci byli přeneseni do 15ml nebo 50ml zkumavek, zaliti roztokem 100% metanolu a uloženi do mrazáku, kde byli skladováni při -20 °C. Ze zkumavek byli následně odebíráni jednotliví pulci k dalším pokusům, někdy i po několika měsících skladování. Studie O'Leary et al. (2014) se zaměřila na vliv dlouhodobého skladování vzorků při -20 °C. U téměř 90 vzorků aortické tkáně prasat pozorovali změnu mechanických vlastností po jednom dni, jednom týdnu, jednom, šesti a dvanácti měsících skladování. Vzorky byly měřeny vždy před a po zamrazení. Došli k závěru, že dlouhodobé skladování zamrazených vzorků nijak významně nezměnilo hlavní mechanické vlastnosti. Zároveň však poukazují na nárůst tloušťky a váhy testovaných tkání. Domnívají se, že to mohlo být způsobeno právě krystalkami ledu v extracelulární matrix, které vznikly při zamrazení tkáně. Krystalky ledu v mezibuněčném prostoru vytvořily póry a tím zvětšily celkový objem vzorku.

8.3 Studium diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk XtTSC u řezových preparátů pulců *X. tropicalis*

Na základě výsledků dosažených v laboratoři vedoucího práce při *in vitro* pokusech je zřejmé, že modifikované buňky obsažené v buněčné kultuře vytvořené z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* (XtTSC) jsou progenitory Sertoliho a PTMC buněk. XtTSC byly transformovány a byla tak vytvořena transgenní linie, která exprimuje červený Katushka RFP protein pod CAG promotorem. Zdá se také, že tyto buňky už nastoupily na diferenciační dráhu směřující k Sertoliho buňkám.

Po transplantacích do těl pulců, jsou tyto buňky schopné migrovat do všech částí těla, ale nedokážou se vyvinout v jiný buněčný typ.

XtTSC byly mikroinjikovány do peritoneální dutiny pulců ve stádiu 41. Během prvního týdne bylo možné buňky pozorovat v oku, srdci nebo ve střevech. Silná exprese vimentinu potvrzuje, že se může jednat o Sertoliho buňky (Franke et al. 1979), a je také typická pro migrující mesenchymální buňky (Kim et al. 2014). Snížená až žádná exprese diferenciačních markerů Sertoli a PTMC buněk (Sox9 a Sma) značí dediferenční dráhu směřující k MSC, které jsou schopny migrace a proliferace.

Získat buněčnou kulturu z varlat obsahující MSC, se podařilo i De Chaira et al. (2018) nebo Chikhovskaya et al. (2014). Baert et al. (2017) dokonce pomocí primární kultury z lidských varlat dokázali vytvořit organoid, který byl schopem udržet nezbytné mikroprostředí nutné pro udržení funkčních spermatogonií.

Ve studii Magnanti et al. (2001) studovali expresi erythropoetinu (*EPO*) v primárních kulturách Sertoliho, Leydigových a PTM buněk. *EPO* je syntetizován především v ledvinách a játrech, ale jeho messenger RNA (mRNA) je možné nalézt také v jiných orgánech, například ve varlatech, kde podle autorů může zasahovat do regulačních mechanismů. Zjistili, že po stimulaci buněčných kultur folikuly stimulujícím hormonem (FSH) se objevila zvýšená exprese mRNA pro *EPO* jak v SeC tak v PTMC. Na druhou stranu v Leydigových buňkách nedošlo k žádné změně. Zároveň při inkubaci s FSH došlo k navýšení hladiny mRNA pro *EPO* u SeC, zatímco při stimulaci PTMC testosteronem došlo k jejímu snížení. Tento fakt podporuje naše zjištění, že oba typy buněk jak SeC tak PTMC mají stejný prekurzor, protože oba typy buněk syntetizují mRNA pro *EPO*. Nicméně oddělení jejich buněčných linií během vývoje varlat mohlo mít vliv na hormonální řízení exprese *EPO* v jednotlivých buňkách.

Přestože SeC jsou epiteliálního původu a PTMC spíše mesenchymálního, Conigliaro et al. (2013) zjistili, že linie mesenchymální i epiteliální může mít společný prekurzor. Ve svém výzkumu se zaměřili na buňky jater. Vytvořili linii rezidentních jaterních kmenových buněk (RLSC model), která byla schopna spontánně diferencovat do hepatocytů. *In vitro* dokázaly tyto buňky diferencovat do dvou oddělených populací, které exprimovaly buď mesenchymální nebo epitheliální geny. Aby autoři objasnili jejich diferenciační kapacitu *in vivo*, transplantovali tyto buňky do jater novorozenech myší, kde pozorovali jejich vývoj, jak do mesenchymální, tak do epiteliální větve.

Diferenciace RLSC do konkrétních jaterních buněk byla podmíněna lokálními signály tkáně.

Podle studie od Schlatt et al. (1993) je vývoj PTMC v těle jedince podmíněn hormonální stimulací testosteronem a FSH. Zároveň je nezbytná parakrinní komunikace mezi SeC a PTMC. Proto by v dalším výzkumu měla být věnována pozornost možné diferenciaci XtTSC do PTMC pomocí hormonální stimulace a dále podpořit, zda se skutečně jedná o buněčnou kulturu prekursoru společného pro oba typy buněk.

V laboratoři školitele bylo zjištěno (nepublikovaná data), že XtTSC jsou schopny diferencovat *in vitro* do chondrocytů, což by naznačovalo jejich mesenchymální charakter. Podle studie od Gong et al. (2017) jsou Sertoliho buňky skutečně jedním z typů mesenchymálních kmenových buněk. Nejen že mají v organismu podobné funkce (modulace imunitního systému, produkce růstových faktorů atd.), ale zároveň také exprimují skoro stejné povrchové markery. Zjistili také, že Sertoliho buňky jsou schopné proliferovat a diferencovat do osteoblastů a adipocytů, i když oproti MSC je jejich diferenciační potenciál slabší. Při *in vivo* experimentech s XtTSC jsme také testovali povrchové markery neuronálních buněk, progenitorů kardiomyocytů (data nepublikována), buněk hladké svaloviny (data nepublikována) a kosterního svalstva (data nepublikována), avšak pokaždé s negativními výsledky.

Při podrobnějším zkoumání podobnosti MSC a SeC, co se zejména imunomodulačních schopností týče, nelze přehlédnout víceméně stejné působení na imunitní systém. Jak MSC, tak SeC dokážou inhibovat proliferaci NK, B a T-buněk a zároveň aktivují T-regulační lymfocyty, které pomáhají zmírňovat imunitní reakci. Oba typy buněk také produkují stejné modulační molekuly jakoIDO, IL-10, TGF β nebo FasL. Zmíněné vlastnosti předurčují SeC a MSC k využití v regenerativní medicíně zejména při transplantačních zákrocích (Kaur et al. 2014, Gao et al. 2016).

V rámci studia diferenciačního potenciálu XtTSC proběhlo i několik experimentů s jejich transplantací do krevního oběhu BALB myši (data nepublikována). Při těchto pokusech bylo zjištěno, že buňky v tělech myši přežívají, a dokonce se i množí, aniž by měly negativní vliv na kvalitu života mikroinjikované myši. Domnívám se, že to bylo umožněno právě na základě jejich imunomodulačních vlastností. SeC jsou dnes také v popředí zájmu při xenotransplantacích. Luca et al. (2016) využili prasečích SeC při léčbě diabetu typu 2 u myši. Z 30 myši, kterým byly SeC zavedeny do deposit břišního tuku, se u 18 obnovila glukózová homeostáze. Ve studiích Yin et al. (2010)

a Wright et al. (2016) testovali vliv kultivace neonatální prasečí SeC s lidským sérem. SeC byly rezistentní k imunitní reakci a dokázaly zastavit komplementem řízenou buněčnou lyzi.

Přestože analýza genové exprese XtTSC nepotvrdila přítomnost markerů Leydigových buněk (LC) (Tlapakova et al. 2016), další experimenty by se měly zaměřit na podrobnější identifikaci povrchových markerů XtTSC. Je totiž možné že by XtTSC nemusely být prekursori jen SeC a PTMC, ale také právě LC. Zhang et al. (2015) zjistili, že při delecii *Wt1* (Wilms' tumor gene 1) v SeC dojde k jejich přeprogramování na LC. Naznačují tak, že SeC a LC mají stejné progenitorové buňky a jejich rozlišení řídí právě exprese *Wt1*, která je u SeC silná. Went et al. (2016) potvrzují roli *Wt1* při správném vývoji varlat u ještě nenarozených a novorozených myší. Pokud odstranili *Wt1* ze SeC, došlo ke snížení diferenciaci PTMC, a zároveň se navýšil počet fetálních LC. Zdůrazňují, že úzká spolupráce mezi těmito třemi buněčnými liniemi je nezbytná pro vytvoření funkčních varlat. Hypotézu společného prekursoru všech tří linií podporují i články Rebourcet et al. (2014) a Rebourcet et al. (2014). V obou studiích vytvořili myší model, ve kterém mohli po injekci diferického toxinu zničit populaci SeC. Jakmile došlo k jejich odstranění, nastal nejen rapidní úbytek všech zárodečných buněk, ale také snížení počtu LC na 25% a snížení aktivity PTMC. Autoři dále zjistili, že nepřítomnost PTMC vede ke ztrátě prekursorů dospělých LC.

Dlouhodobým cílem výzkumu XtTSC je získat pluripotentní buňky, které by byly schopné diferencovat do všech buněčných typů. V práci Wang et al. (2014) se podařilo vytvořit indukované pluripotentní buňky z myších SeC (Ser-iPS buňky). K porovnání Ser-iPS buněk vytvořili kulturu indukovaných pluripotentních buněk z myších embryonálních fibroblastů (MEF-iPS buňky). Zjistili, že Ser-iPS buňky jsou schopné při injikování do syngenních myší tvořit nejen více teratomů, ale zároveň odpověď imunitního systému je nižší, a tedy i méně devastující než u MEF-iPS buněk. Sníženou imunogenicitu měla také embryonální tělíska vytvořená ze Ser-iPS buněk. Nicméně autoři také objevili, že tyto imunomodulační vlastnosti si kultura Ser-iPS buněk uchovává pouze v prvních pasážích. Sníženou imunogenicitu vysvětlují tzv. somatickou paměť indukovaných buněk, která je právě patrná v raných pasážích buněčných kultur iPS buněk. Sheng et al. (2012) dokonce dokázali přeprogramovat SeC v multipotentní neurální kmenové buňky, které byly schopny sebeobnovy. Indukované neurální kmenové buňky (iNSC buňky) exprimovaly stejné povrchové markery a měly stejný genový profil jako běžné NSC. Dokázaly také diferencovat

do glií a neuronů. Nejenže neurony odvozené od iNSC buněk vykazovaly fyziologické vlastnosti srovnatelné s vlastnostmi funkčních neuronů, ale také po transplantaci do gyru dentatu (jedna ze tří oblastí dospělého mozku, kde probíhá neurogeneze) vytvářely synapse.

Je nezbytné však podotknout, že ve studiích Yin et al. (2010), Sheng et al. (2012), Wang et al. (2014), Luca et al. (2016) i Wright et al. (2016) autoři vždy pracovali se SeC získanými z jedinců, kteří ještě neprošli pubertálním obdobím, v němž dochází k dozrání somatických buněk ve varlatech. Konkrétně SeC po pubertě ztrácejí svou proliferační schopnost a již se dále nemnoží. Naproti tomu PTMC dále prolifерují (Skinner a Moses 1989). Stejně tak buněčná kultura XtTSC vytvořená v laboratoři školitele obsahuje buňky získané z juvenilních samců drápatky tropické. Ačkoli Chaira et al. (2018), Chikhovskaya et al. (2012) a (2014) potvrzují přítomnost multipotentních buněk odvozených z dospělých lidských varlat a dokládají jejich mesenchymální původ, další experimenty věnované výzkumu XtTSC by měly být zaměřeny také na ověření existence společného prekurzoru SeC a PTMC ve varlatech dospělých samců *X. tropicalis*.

9 Závěr

- Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že testikulární kmenové buňky získané z juvenilních samců *X. tropicalis* (XtTSCs) jsou schopny migrace *in vivo*, což naznačuje jejich podobnost s mesenchymálními kmenovými buňkami (MSC).
- Byla optimalizována metoda pro přípravu řezových preparátů z pulců *X. tropicalis*.
- V rámci studia *in vivo* diferenciačního potenciálu XtTSC se nepodařilo prokázat jejich spontánní diferenciace do MSC derivovaných buněčných typů – chondrocytů, osteocytů a adipocytů. Byla však detekována diferenciace do buněk Sertoliho řady (Sox9) při zachování mesenchymálního charakteru (vimentin).
- Některé z dosažených výsledků byly publikovány v impaktovaném časopise (Tlapakova et al. 2016).

10Literatura

- ALEVI, K. C. C., N. F. C. CASTRO, J. OLIVEIRA, J. A. ROSA a M. T. V. AZEREDO-OLIVEIRA. Cystic spermatogenesis in three species of the prolixus complex (Hemiptera: Triatominae). *Italian Journal of Zoology*. 2015, 1-7. DOI: 10.1080/11250003.2015.1020347. ISSN 1125-0003.
- BAAZM, Maryam, Farideh Jalali MASHAYEKHI, Saeid BABAIE, Parvindokht BAYAT, Cordian BEYER a Adib ZENDEDEL. Effects of different Sertoli cell types on the maintenance of adult spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2017, **53**(8), 752-758. DOI: 10.1007/s11626-017-0172-z. ISSN 1071-2690.
- BAERT, Yoni, Joery DE KOCK, João P. ALVES-LOPES, Olle SÖDER, Jan-Bernd STUKENBORG a Ellen GOOSSENS. Primary Human Testicular Cells Self-Organize into Organoids with Testicular Properties. *Stem Cell Reports*. 2017, **8**(1), 30-38. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.11.012. ISSN 2213-6711.
- BAI, Yinshan, Cui ZHU, Meiyong FENG, et al. *Previously claimed male germline stem cells from porcine testis are actually progenitor Leydig cells*. 2018, **9**(1). DOI: 10.1186/s13287-018-0931-0. ISSN 1757-6512.
- BATTEN, Puspa, Nadia A ROSENTHAL a Magdi H YACOUB. Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007, **362**(1484), 1343-1356. DOI: 10.1098/rstb.2007.2120. ISSN 0962-8436.
- BERNHARD, Wilhelm a Annie VIRON. IMPROVED TECHNIQUES FOR THE PREPARATION OF ULTRATHIN FROZEN SECTIONS. *The Journal of Cell Biology*. 1971, **49**(3), 731-746. DOI: 10.1083/jcb.49.3.731. ISSN 0021-9525.
- BLACKISTON, D., L. N. VANDENBERG a M. LEVIN. High-Throughput *Xenopus laevis* Immunohistochemistry Using Agarose Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010, **2010**(12), 1-13. DOI: 10.1101/pdb.prot5532. ISSN 1559-6095.
- BUTLER, Karen, Aaron M. ZORN a J.B. GURDON. Nonradioactive in Situ Hybridization to *Xenopus* Tissue Sections. *Methods*. 2001, **23**(4), 303-312. DOI: 10.1006/meth.2000.1142. ISSN 1046-2023.
- CAZARES, Lisa H, Sean A VAN TONGEREN, Julie COSTANTINO, et al. Heat fixation inactivates viral and bacterial pathogens and is compatible with downstream MALDI mass spectrometry tissue imaging. *BMC Microbiology*. 2015, **15**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s12866-015-0431-7. ISSN 1471-2180.

- CONIGLIARO, A, L AMICONE, V COSTA, et al. Evidence for a common progenitor of epithelial and mesenchymal components of the liver. *Cell Death and Differentiation*. 2013, **20**(8), 1116-1123. DOI: 10.1038/cdd.2013.49. ISSN 1350-9047.
- COOL, J., F.D. CARMONA, J.C. SZUCSIK a B. CAPEL. Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad. *Sexual Development*. 2008, **2**(3), 128-133. DOI: 10.1159/000143430. ISSN 1661-5433.
- DEFALCO, Tony, Satoru TAKAHASHI a Blanche CAPEL. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology*. 2011, **352**(1), 14-26. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.01.011. ISSN 0012-1606.
- DE CHIARA, Letizia, Elvira Smeralda FAMULARI, Sharmila FAGOONEE, et al. Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Testis. *Stem Cells International*. 2018, **2018**, 1-9. DOI: 10.1155/2018/4910304. ISSN 1687-966X.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ, Verónica, Alejandro MARMOLEJO-VALENCIA, Martha HARFUSH a Horacio MERCHANT-LARIOS. Formation of the genital ridges is preceded by a domain of ectopic Sox9-expressing cells in *Lepidochelys olivacea*. *Developmental Biology*. 2012, **361**(1), 156-166. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.10.001. ISSN 0012-1606.
- DONOUGHE, S., T. NAKAMURA, B. EWEN-CAMPEN, D. A. GREEN, L. HENDERSON a C. G. EXTAVOUR. BMP signaling is required for the generation of primordial germ cells in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, **111**(11), 4133-4138. DOI: 10.1073/pnas.1400525111. ISSN 0027-8424.
- DUBAISSI, E. a N. PAPALOPULU. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Disease Models & Mechanisms*. 2011, **4**(2), 179-192. DOI: 10.1242/dmm.006494. ISSN 1754-8403.
- EINAGA, Naoki, Akio YOSHIDA, Hiroko NODA, et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *Plos One*. 2017, **12**(5), 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0176280. ISSN 1932-6203.
- FALLARINO, Francesca, Giovanni LUCA, Mario CALVITTI, et al. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009, **206**(11), 2511-2526. DOI: 10.1084/jem.20090134. ISSN 0022-1007.
- FAYOMI, Adetunji P. a Kyle E. ORWIG. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*. 2018, **29**, 207-214. DOI: 10.1016/j.scr.2018.04.009. ISSN 1873-5061.
- FERNÁNDEZ, Dario, Maria V. BERTOLDI, Laura GÓMEZ, Alfonsina MORALES, Eduardo CALLEGARI a Luis A. LOPEZ. Identification and Characterization of Myosin from Rat Testicular Peritubular Myoid Cells¹. *Biology of Reproduction*. 2008, **79**(6), 1210-1218. DOI: 10.1095/biolreprod.107.066472. ISSN 0006-3363.

- FRANKE, WW, C GRUND a E SCHMID. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *European Journal of Cell Biology*. 1979, **19**(3), 269-275. ISSN 0171-9335.
- FREGNI, Giulia, Mathieu QUINODOZ, Emely MÖLLER, et al. Reciprocal modulation of mesenchymal stem cells and tumor cells promotes lung cancer metastasis. *EBioMedicine*. 2018, **29**, 128-145. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.02.017. ISSN 23523964.
- GALLAND, Sabine, Joanna VUILLE, Patricia MARTIN, Igor LETOVANEC, Anne CAIGNARD, Giulia FREGNI a Ivan STAMENKOVIC. Tumor-Derived Mesenchymal Stem Cells Use Distinct Mechanisms to Block the Activity of Natural Killer Cell Subsets. *Cell Reports*. 2017, **20**(12), 2891-2905. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.089. ISSN 2211-1247.
- GAMBELLA, Alessandro, Lucia PORRO, Simona PIGOZZI, Roberto FIOCCA, Federica GRILLO a Luca MASTRACCI. Section detachment in immunohistochemistry: causes, troubleshooting, and problem-solving. *Histochemistry and Cell Biology*. 2017, **148**(1), 95-101. DOI: 10.1007/s00418-017-1558-4. ISSN 0948-6143.
- GAO, F, S M CHIU, D A L MOTAN, et al. *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects*. 2016, **7**(1), e2062-e2062. DOI: 10.1038/cddis.2015.327. ISSN 2041-4889.
- GONG, Daoyuan, Chunfu ZHANG, Jiahui ZHANG, Nannan ZHANG, Zehua TAO, Wei ZHU a Xiaochun SUN. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells?. *American Journal of Translation Research*. 2017, **9**(3), 1067-1074. ISSN 1943-8141.
- GONZALEZ, R., L. GRIPARIC, V. VARGAS, et al. A putative mesenchymal stem cells population isolated from adult human testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, **385**(4), 570-575. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.103. ISSN 0006-291X.
- GRAVAGNA, Nicole G., Christopher S. KNOECKEL, Alison D. TAYLOR, Barbara A. HULTGREN a Angeles B. RIBERA. Localization of Kv2.2 protein in *Xenopus laevis* embryos and tadpoles. *The Journal of Comparative Neurology*. 2008, **510**(5), 508-524. DOI: 10.1002/cne.21804. ISSN 0021-9967.
- GRIER, Harry J. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. *American Zoologist*. 1981, **21**(2), 345-357. DOI: 10.1093/icb/21.2.345. ISSN 0003-1569.
- GURDON, John B. a Nick HOPWOOD. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*. 2000, **44**(1), 43-50. ISSN 0214-6282.
- HACKER, A., B. CAPEL, P. GOODFELLOW a R. LOVELL-BADGE. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*. 1995, **121**(no. 6), 1603-1614. ISSN 0950-1991.

- HANLEY, N.A, D.M HAGAN, M CLEMENT-JONES, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development*. 2000, **91**(1-2), 403-407. DOI: 10.1016/S0925-4773(99)00307-X. ISSN 0925-4773.
- HARLAND, Richard M. a Robert M. GRAINGER. Xenopus research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in Genetics*. 2011, **27**(12), 507-515. DOI: 10.1016/j.tig.2011.08.003. ISSN 0168-9525.
- HASLAM, Iain S., Eric W. ROUBOS, Maria Luisa MANGONI, et al. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biological Reviews*. 2014, **89**(3), 618-655. DOI: 10.1111/brv.12072. ISSN 1464-7931.
- HAYASHI, Katsuhiko, Hiroshi OHTA, Kazuki KURIMOTO, Shinya ARAMAKI a Mitinori SAITOU. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 2011, **146**(4), 519-532. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.052. ISSN 0092-8674.
- HELLSTEN, U., R. M. HARLAND, M. J. GILCHRIST, et al. The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. *Science*. 2010, **328**(5978), 633-636. DOI: 10.1126/science.1183670. ISSN 0036-8075.
- HUEBINGER, Jan, Hong-Mei HAN, Markus GRABENBAUER a Boris RUBINSKY. Reversible Cryopreservation of Living Cells Using an Electron Microscopy Cryo-Fixation Method. *Plos One*. 2016, **11**(10), 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0164270. ISSN 1932-6203.
- CHATTERJEE, Shailja. Artefacts in histopathology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2014, **18**(4), 111-116. DOI: 10.4103/0973-029X.141346. ISSN 0973-029X.
- CHEN, Anqi, Jixi LI, Lesheng SONG, Chaoneng JI, Marion BÖING, Jinzhong CHEN a Beate BRAND-SABERI. GGNBP2 is necessary for testis morphology and sperm development. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1-8. DOI: 10.1038/s41598-017-03193-y. ISSN 2045-2322.
- CHEN, Haolin, Erin STANLEY, Shiyong JIN a Barry R. ZIRKIN. Stem Leydig cells: From fetal to aged animals. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2010, **90**(4), 272-283. DOI: 10.1002/bdrc.20192. ISSN 1542-975X.
- CHIKHOVSKAYA, J.V., M.J. JONKER, A. MEISSNER, T.M. BREIT, S. REPPING a A.M.M. VAN PELT. Human testis-derived embryonic stem cell-like cells are not pluripotent, but possess potential of mesenchymal progenitors. *Human Reproduction*. 2012, **27**(1), 210-221. DOI: 10.1093/humrep/der383. ISSN 1460-2350.

- CHIKHOVSKAYA, J.V., S.K.M. VAN DAALEN, C.M. KORVER, S. REPPING a A.M.M. VAN PELT. Mesenchymal origin of multipotent human testis-derived stem cells in human testicular cell cultures. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2014, **20**(2), 155-167. DOI: 10.1093/molehr/gat076. ISSN 1460-2407.
- CHUI, Kitty, Alpa TRIVEDI, C. Yan CHENG, et al. Characterization and Functionality of Proliferative Human Sertoli Cells. *Cell Transplantation*. 2011, **20**(5), 619-635. DOI: 10.3727/096368910X536563. ISSN 0963-6897.
- IDDAWELA, Mahesh, Oscar RUEDA, Jenny EREMIN, Oleg EREMIN, Jed COWLEY, Helena M. EARL a Carlos CALDAS. Integrative analysis of copy number and gene expression in breast cancer using formalin-fixed paraffin-embedded core biopsy tissue: a feasibility study. *BMC Genomics*. 2017, **18**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12864-017-3867-3. ISSN 1471-2164.
- ILIADOU, Paschalia, Christos TSAMETIS, Athina KAPRARA, Ioannis PAPADIMAS a Dimitrios GOULIS. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones*. 2015, **14**(4), 504-514. DOI: 10.14310/horm.2002.1648. ISSN 1109-3099.
- IRIE, Naoko, Leehee WEINBERGER, Walfred W.C. TANG, et al. SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell*. 2015, **160**(1-2), 253-268. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.013. ISSN 0092-8674.
- ISACHENKO, V., E. ISACHENKO, R. SANCHEZ, M. DATTENA, P. MALLMANN a G. RAHIMI. Cryopreservation of Whole Ovine Ovaries with Pedicles as a Model for Human: Parameters of Perfusion with Simultaneous Saturations by Cryoprotectants. *Clinical Laboratory*. 2015, **61**(3-4), 415-420. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2014.140919. ISSN 1433-6510.
- JOHNSON, A. D. a R. ALBERIO. Primordial germ cells: the first cell lineage or the last cells standing?. *Development*. 2015, **142**(16), 2730-2739. DOI: 10.1242/dev.113993. ISSN 0950-1991.
- JØRGENSEN, Anne, Marie LINDHARDT JOHANSEN, Anders JUUL, Niels E. SKAKKEBAEK, Katharina M. MAIN a Ewa RAJPERT-DE MEYTS. *Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development*. 2015, **45**, 124-137. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.09.013. ISSN 1084-9521.
- KARL, Jeannie a Blanche CAPEL. Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Developmental Biology*. 1998, **203**(2), 323-333. DOI: 10.1006/dbio.1998.9068. ISSN 0012-1606.

- KASHIWAGI, Keiko, Akihiko KASHIWAGI, Atsushi KURABAYASHI, Hideki HANADA, Keisuke NAKAJIMA, Morihiko OKADA, Minoru TAKASE a Yoshio YAOITA. *Xenopus tropicalis: An Ideal Experimental Animal in Amphibia. Experimental Animals.* 2010, **59**(4), 395-405. DOI: 10.1538/expanim.59.395. ISSN 1881-7122.
- KAUR, Gurvinder, Lea Ann THOMPSON a Jannette M. DUFOUR. *Sertoli cells - Immunological sentinels of spermatogenesis.* 2014, **30**, 36-44. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.02.011. ISSN 1084-9521.
- KERR, J. B. a K. E. DIXON. An ultrastructural study of germ plasm in spermatogenesis of *Xenopus laevis*. *Journal of embryology and experimental morphology.* 1974, **32**(3), 573-592. ISSN 0022-0752.
- KILCOYNE, K. R., L. B. SMITH, N. ATANASSOVA, et al. Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014, **111**(18), E1924-E1932. DOI: 10.1073/pnas.1320735111. ISSN 0027-8424.
- KIM, Ye-Seul, Bo-Rim YI, Nam-Hyung KIM a Kyung-Chul CHOI. Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Experimental & Molecular Medicine.* 2014, **46**(8), e108. DOI: 10.1038/emm.2014.44. ISSN 2092-6413.
- LAU, Melissa, Jianli LI a Hollis T. CLINE. In Vivo Analysis of the Neurovascular Niche in the Developing *Xenopus* Brain. *ENeuro.* 2017, **4**(4), 1-24. DOI: 10.1523/ENEURO.0030-17.2017. ISSN 2373-2822.
- LEITCH, Harry G., Jennifer NICHOLS, Peter HUMPHREYS, et al. Rebuilding Pluripotency from Primordial Germ Cells. *Stem Cell Reports.* 2013, **1**(1), 66-78. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.03.004. ISSN 2213-6711.
- LERCH, Melissa L., Daniel R. BAUER, David CHAFIN, Abbey THEISS, Michael OTTER a Geoffrey S. BAIRD. *Precision Medicine Starts With Preanalytics.* 2017, **25**(3), 160-167. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000489. ISSN 1541-2016.
- LI, Ming a Susumu IKEHARA. Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair. *Stem Cells International.* 2013, **2013**, 1-8. DOI: 10.1155/2013/132642. ISSN 1687 -966X.
- LIU, Chang, Karina RODRIGUEZ a Humphrey H.-C. YAO. Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. *Development.* 2016, **143**(20), 3700-3710. DOI: 10.1242/dev.135756. ISSN 0950-1991.
- LIU, Suling, Christophe GINESTIER, Sing J. OU, et al. Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. *Cancer Research.* 2011, **71**(2), 614-624. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0538. ISSN 0008-5472.

- LOSINNO, Antonella D., Alfonsina MORALES, Dario FERNÁNDEZ a Luis A. LOPEZ. Peritubular Myoid Cells from Rat Seminiferous Tubules Contain Actin and Myosin Filaments Distributed in Two Independent Layers1. *Biology of Reproduction*. 2012, **86**(5). DOI: 10.1095/biolreprod.111.095158. ISSN 0006-3363.
- LOSINNO, Antonella D., Viviana SORRIVAS, Marcelo EZQUER, Fernando EZQUER, Luis A. LÓPEZ a Alfonsina MORALES. Changes of myoid and endothelial cells in the peritubular wall during contraction of the seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*. 2016, **365**(2), 425-435. DOI: 10.1007/s00441-016-2386-x. ISSN 0302-766X.
- LUCA, Giovanni, Iva ARATO, Francesca MANCUSO, et al. Xenograft of microencapsulated Sertoli cells restores glucose homeostasis in db/db mice with spontaneous diabetes mellitus. *Xenotransplantation*. 2016, **23**(6), 429-439. DOI: 10.1111/xen.12274. ISSN 0908-665X.
- LU, Xiaoxiao, Xilian WANG, Hong NIAN, Dan YANG a Ruihua WEI. *Mesenchymal stem cells for treating autoimmune dacryoadenitis*. 2017, **8**(1). DOI: 10.1186/s13287-017-0593-3. ISSN 1757-6512.
- MAGNANTI, Massimo, Orietta GANDINI, Laura GIULIANI, et al. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood*. 2001, **98**(9), 2872-2874. DOI: 10.1182/blood.V98.9.2872. ISSN 0006-4971.
- MAHADEVAPPA, Asha, Thattamparambil G. NISHA a Gubbanna V. MANJUNATH. Intra-operative Diagnosis of Breast Lesions by Imprint Cytology and Frozen Section with Histopathological Correlation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017, **11**(3), 1-6. DOI: 10.7860/JCDR/2017/24454.9323. ISSN 2249-782x.
- MALEKI, Masoud, Farideh GHANBARVAND, Mohammad Reza BEHVARZ, Mehri EJTEMAEI a Elham GHADIRKHOMI. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2014, **7**(2), 118-126. DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118. ISSN 2005-3606.
- MARLOW, Florence. Primordial Germ Cell Specification and Migration. *F1000Research*. 2015, **4**, 1462. DOI: 10.12688/f1000research.6995.1. ISSN 2046-1402.
- MA, S, N XIE, W LI, B YUAN, Y SHI a Y WANG. *Immunobiology of mesenchymal stem cells*. 2014, **21**(2), 216-225. DOI: 10.1038/cdd.2013.158. ISSN 1350-9047.
- MATSUI, Takahiro, Takanori ONOUCHI, Kazuya SHIOGAMA, et al. Coated Glass Slides TACAS Are Applicable to Heat-Assisted Immunostaining and *In Situ* Hybridization at the Electron Microscopy Level. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2015, **48**(5), 153-157. DOI: 10.1267/ahc.15012. ISSN 0044-5991.
- MEINHARDT, Andreas a Mark P. HEDGER. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011, **335**(1), 60-68. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.022. ISSN 0303-7207.

- MITAL, Payal, Gurvinder KAUR a Jannette M DUFOUR. Immunoprotective Sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *REPRODUCTION*. 2010, **139**(3), 495-504. DOI: 10.1530/REP-09-0384. ISSN 1470-1626.
- MOCHIZUKI, Kentaro, Yohei HAYASHI, Tamotsu SEKINAKA, et al. Repression of Somatic Genes by Selective Recruitment of HDAC3 by BLIMP1 Is Essential for Mouse Primordial Germ Cell Fate Determination. *Cell Reports*. 2018, **24**(10), 2682-2693.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.108. ISSN 2211-1247.
- NIEUWKOOP, Pieter D. a Jacob FABER. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. New York: Garland Pub., 1994. ISBN 978-0815318965.
- OATLEY, Jon M. a Ralph L. BRINSTER. The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiological Reviews*. 2012, **92**(2), 577-595. DOI: 10.1152/physrev.00025.2011. ISSN 0031-9333.
- O'LEARY, Siobhan A., Barry J. DOYLE a Tim M. MCGLOUGHLIN. The impact of long term freezing on the mechanical properties of porcine aortic tissue. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2014, **37**, 165-173. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.04.015. ISSN 1751-6161.
- OLMSTEAD, Allen W., Annelie LINDBERG-LIVINGSTON a Sigmund J. DEGITZ. Genotyping sex in the amphibian, *Xenopus (Silurana) tropicalis*, for endocrine disruptor bioassays. *Aquatic Toxicology*. 2010, **98**(1), 60-66. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.01.012. ISSN 0166-445X.
- OSTRER, H., H.Y. HUANG, R.J. MASCH a E. SHAPIRO. A Cellular Study of Human Testis Development. *Sexual Development*. 2007, **1**(5), 286-292. DOI: 10.1159/000108930. ISSN 1661-5425.
- OULHEN, Nathalie a Gary WESSEL. A quiet space during rush hour: Quiescence in primordial germ cells. *Stem Cell Research*. 2017, **25**, 296-299. DOI: 10.1016/j.scr.2017.11.001. ISSN 1873-5061.
- PARK, Susan Y., Minghan TONG a J. Larry JAMESON. Distinct Roles for Steroidogenic factor 1 and Desert hedgehog Pathways in Fetal and Adult Leydig Cell Development. *Endocrinology*. 2007, **148**(8), 3704-3710. DOI: 10.1210/en.2006-1731. ISSN 0013-7227.
- PIPREK, Rafal P. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *The International Journal of Developmental Biology*. 2010, **54**(5), 779-786. DOI: 10.1387/ijdb.092939rp. ISSN 0214-6282.
- PRIETO, Pilar, Graham MOORE a Peter SHAW. Fluorescence in situ hybridization on vibratome sections of plant tissues. *Nature Protocols*. 2007, **2**(7), 1831-1838. DOI: 10.1038/nprot.2007.265. ISSN 1754-2189.

- QU, Jing a Huanxiang ZHANG. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury. *Stem Cells International*. 2017, **2017**, 1-12. DOI: 10.1155/2017/5251313. ISSN 1687-966X.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005, **42**(4), 405-426. DOI: 10.1354/vp.42-4-405. ISSN 0300-9858.
- REBOURCET, Diane, Peter J. O'SHAUGHNESSY, Ana MONTEIRO, et al. Sertoli Cells Maintain Leydig Cell Number and Peritubular Myoid Cell Activity in the Adult Mouse Testis. *PLoS ONE*. 2014, **9**(8), e105687. DOI: 10.1371/journal.pone.0105687. ISSN 1932-6203.
- REBOURCET, D., P. J. O'SHAUGHNESSY, J.-L. PITETTI, et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*. 2014, **141**(10), 2139-2149. DOI: 10.1242/dev.107029. ISSN 0950-1991.
- ROHR, L. Ralph, Lester J. LAYFIELD, Deborah WALLIN a Denise HARDY. A Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology Laboratory. *American Journal of Clinical Pathology*. 2001, **115**(5), 703-708. DOI: 10.1309/15FB-FLD1-408X-JQA3. ISSN 0002-9173.
- SAITO, Taiju, Martin PŠENIČKA, Rie GOTO, Shinji ADACHI, Kunio INOUE, Katsutoshi ARAI, Etsuro YAMAHA a Michael KLYMKOWSKY. The Origin And Migration Of Primordial Germ Cells In Sturgeons. *PLoS ONE*. 2014, **9**(2), e86861. DOI: 10.1371/journal.pone.0086861. ISSN 1932-6203.
- SATODA, Masahiko, Shin TAKAGI, Kunimasa OHTA, Tatsumi HIRATA a Hajime FUJISAWA. Differential Expression of Two Cell Surface Proteins, Neuropilin and Plexin, in Xenopus Olfactory Axon Subclasses. *The Journal of Neuroscience*. 1995, **15**(1), 942-955. ISSN 0270-6474.
- SCALDAFERRI, Maria Lucia, Francesca Gioia KLINGER, Donatella FARINI, Anna DI CARLO, Rita CARSETTI, Ezio GIORDA a Massimo DE FELICI. Hematopoietic activity in putative mouse primordial germ cell populations. *Mechanisms of Development*. 2015, **136**, 53-63. DOI: 10.1016/j.mod.2015.02.002. ISSN 09254773.
- SHALET, Stephen M. *Normal testicular function and spermatogenesis*. 2009, **53**(2), 285-288. DOI: 10.1002/pbc.22000. ISSN 15455009.
- SHENG, Chao, Qinyuan ZHENG, Jianyu WU, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Research*. 2012, **22**(1), 208-218. DOI: 10.1038/cr.2011.175. ISSN 1001-0602.
- SCHLATT, Stefan, Gerhard F. WIENBAUER a Eberhard NIESCHLAG. Appearance of α -Smooth Muscle Actin in Peritubular Cells of Monkey Testes Is Induced by Androgens, Modulated by Follicle-Stimulating Hormone, and Maintained after Hormonal Withdrawal. *Journal of Andrology*. 1993, **14**(5), 340-350. ISSN 1939-4640.

- SCHULZ, Rüdiger W., Luiz Renato DE FRANÇA, Jean-Jacques LAREYRE, Florence LEGAC, Helio CHIARINI-GARCIA, Rafael Henrique NOBREGA a Takeshi MIURA. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 2010, **165**(3), 390-411. DOI: 10.1016/j.ygcen.2009.02.013. ISSN 0016-6480.
- SKINNER, Michael K. a Harold L. MOSES. Transforming Growth Factor β Gene Expression and Action in the Seminiferous Tubule: Peritubular Cell-Sertoli Cell Interactions. *Molecular Endocrinology*. 1989, **3**(4), 625-634. DOI: 10.1210/mend-3-4-625. ISSN 0888-8809.
- SPINLER, K., F. M. KOHN, U. SCHWARZER a A. MAYERHOFER. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction*. 2010, **25**(9), 2181-2187. DOI: 10.1093/humrep/deq170. ISSN 0268-1161.
- SQUILLARO, Tiziana, Gianfranco PELUSO a Umberto GALDERISI. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation*. 2016, **25**(5), 829-848. DOI: 10.3727/096368915X689622. ISSN 0963-6897.
- STÉVANT, Isabelle, Yasmine NEIRIJNCK, Christelle BOREL, Jessica ESCOFFIER, Lee B. SMITH, Stylianos E. ANTONARAKIS, Emmanouil T. DERMITZAKIS a Serge NEF. Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Reports*. 2018, **22**(6), 1589-1599. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.043. ISSN 2211-1247.
- SVINGEN, T. a P. KOOPMAN. *Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations*. 2013, **27**(22), 2409-2426. DOI: 10.1101/gad.228080.113. ISSN 0890-9369.
- TAM, Beatrice M., Lee Ling YANG, Tami H. BOGÉA, Bradford ROSS, Garnet MARTENS a Orson L. MORITZ. Preparation of *Xenopus laevis* retinal cryosections for electron microscopy. *Experimental Eye Research*. 2015, **136**, 86-90. DOI: 10.1016/j.exer.2015.05.014. ISSN 0014-4835.
- TANDON, Panna, Frank CONLON, J. David FURLOW a Marko E. HORB. Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: Approaches and opportunities for human disease modeling. *Developmental Biology*. 2016, **426**(2), 325-335. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.04.009. ISSN 0012-1606.
- TEERDS, K. J. a I. T. HUHTANIEMI. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Human Reproduction Update*. 2015, **21**(3), 310-328. DOI: 10.1093/humupd/dmv008. ISSN 1355-4786.

- THOMPSON, Erik W., Alan W. BLACKSHAW a Samir S. RAYCHOUDHURY. Secreted Products and Extracellular Matrix from Testicular Peritubular Myoid Cells Influence Androgen-Binding Protein Secretion by Sertoli Cells in Culture. *Journal of Andrology*. 1995, **16**, 28-35. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1995.tb01726.x. ISSN 0196-3635.
- TLAPAKOVA, Tereza, Thi Minh Xuan NGUYEN, Marketa VEGRICHTOVA, Monika SIDOVA, Karolina STRNADOVA, Monika BLAHOVA a Vladimir KRYLOV. Identification and characterization of *Xenopus tropicalis* common progenitors of Sertoli and peritubular myoid cell lineages. *Biology Open*. 2016, **5**(9), 1275-1282. DOI: 10.1242/bio.019265. ISSN 2046-6390.
- TUNG, Pierre S. a Irving B. FRITZ. Interactions of Sertoli Cells with Myoid Cells in vitro. *Biology of Reproduction*. 1980, **23**(1), 207-217. DOI: 10.1093/biolreprod/23.1.207. ISSN 0006-3363.
- TURINETTO, Valentina, Emanuela VITALE a Claudia GIACHINO. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(7). DOI: 10.3390/ijms17071164. ISSN 1422-0067.
- ULMER, Bärbel, Melanie TINGLER, Sabrina KURZ, et al. A novel role of the organizer gene Goosecoid as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 43010. DOI: 10.1038/srep43010. ISSN 2045-2322.
- URIBE, Mari Carmen, Harry J GRIER a Víctor MEJÍA-ROA. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*. 2015, **4**(3). DOI: 10.4161/21565562.2014.983400. ISSN 2156-5562.
- VINCENT, Ludovic G., Yu Suk CHOI, Baldomero ALONSO-LATORRE, Juan C. DEL ÁLAMO a Adam J. ENGLER. Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biotechnology Journal*. 2013, **8**(4), 472-484. DOI: 10.1002/biot.201200205. ISSN 1860-6768.
- WANG, Xiaoying, Jie QIN, Robert Chunhua ZHAO, Martin ZENKE a Qiang WU. Reduced Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Sertoli Cells. *PLoS ONE*. 2014, **9**(8), e106110. DOI: 10.1371/journal.pone.0106110. ISSN 1932-6203.
- WARD, Tyson S., Glenn D. ROSEN a Christopher S. VON BARTHELD. Optical disector counting in cryosections and vibratome sections underestimates particle numbers: Effects of tissue quality. *Microscopy Research and Technique*. 2008, **71**(1), 60-68. DOI: 10.1002/jemt.20525. ISSN 1059-910X.
- WEI, Xin, Xue YANG, Zhi-peng HAN, Fang-fang QU, Li SHAO a Yu-fang SHI. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013, **34**(6), 747-754. DOI: 10.1038/aps.2013.50. ISSN 1671-4083.

- WELSH, M., P. T. K. SAUNDERS, N. ATANASSOVA, R. M. SHARPE a L. B. SMITH. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal*. 2009, **23**(12), 4218-4230. DOI: 10.1096/fj.09-138347. ISSN 0892-6638.
- WEN, Qing, Yuqian WANG, Jixin TANG, C. Yan CHENG, Yi-Xun LIU a Ramani RAMCHANDRAN. Sertoli Cell Wt1 Regulates Peritubular Myoid Cell and Fetal Leydig Cell Differentiation during Fetal Testis Development. *PLOS ONE*. 2016, **11**(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0167920. ISSN 1932-6203.
- WRIGHT, Kandis, Rachel DZIUK, Payal MITAL, Gurvinder KAUR a Jannette M. DUFOUR. Xenotransplanted Pig Sertoli Cells Inhibit Both the Alternative and Classical Pathways of Complement-Mediated Cell Lysis While Pig Islets Are Killed. *Cell Transplantation*. 2016, **25**(11), 2027-2040. DOI: 10.3727/096368916X692032. ISSN 0963-6897.
- XIE, Lichun, Limin LIN, Qiuliu TANG, et al. Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in an in vitro co-culture system. *European Journal of Medical Research*. 2015, **20**(1). DOI: 10.1186/s40001-014-0080-6. ISSN 2047-783X.
- XINARIS, C., M. MORIGI, V. BENEDETTI, et al. A Novel Strategy to Enhance Mesenchymal Stem Cell Migration Capacity and Promote Tissue Repair in an Injury Specific Fashion. *Cell Transplantation*. 2013, **22**(3), 423-436. DOI: 10.3727/096368912X653246. ISSN 0963-6897.
- YIN, Zhuzeng, Lu WANG, Ying XIANG, et al. 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*. 2010, **17**(3), 215-223. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00581.x. ISSN 0908-665X.
- YOSHIDA, Shosei. From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2016, **5**(1), 119-131. DOI: 10.1002/wdev.204. ISSN 17597684.
- ZANG, Li, Haojie HAO, Jiejie LIU, Yijun LI, Weidong HAN a Yiming MU. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2017, **9**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s13098-017-0233-1. ISSN 1758-5996.
- ZHANG, Fu-Ping, Matti POUTANEN, Johannes WILBERTZ a Ilpo HUHTANIEMI. Normal Prenatal but Arrested Postnatal Sexual Development of Luteinizing Hormone Receptor Knockout (LuRKO) Mice. *Molecular Endocrinology*. 2001, **15**(1), 172-183. DOI: 10.1210/mend.15.1.0582. ISSN 0888-8809.
- ZHANG, Lianjun, Min CHEN, Qing WEN, et al. Reprogramming of Sertoli cells to fetal-like Leydig cells by Wt1 ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, **112**(13), 4003-4008. DOI: 10.1073/pnas.1422371112. ISSN 0027-8424.

- ZHANG, S., W.C. CHU, R.C. LAI, S.K. LIM, J.H.P. HUI a W.S. TOH. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016, **24**(12), 2135-2140. DOI: 10.1016/j.joca.2016.06.022. ISSN 1063-4584.

Přílohy

RESEARCH ARTICLE

Identification and characterization of *Xenopus tropicalis* common progenitors of Sertoli and peritubular myoid cell lineagesTereza Tlapakova¹, Thi Minh Xuan Nguyen¹, Marketa Vegrchtova¹, Monika Sidova^{1,2}, Karolina Strnadova¹, Monika Blahova¹ and Vladimir Krylov^{1,*}

ABSTRACT

The origin of somatic cell lineages during testicular development is controversial in mammals. Employing basal amphibian tetrapod *Xenopus tropicalis* we established a cell culture derived from testes of juvenile male. Expression analysis showed transcription of some pluripotency genes and Sertoli cell, peritubular myoid cell and mesenchymal cell markers. Transcription of germline-specific genes was downregulated. Immunocytochemistry revealed that a majority of cells express vimentin and co-express Sox9 and smooth muscle α -actin (Sma), indicating the existence of a common progenitor of Sertoli and peritubular myoid cell lineages. Microinjection of transgenic, red fluorescent protein (RFP)-positive somatic testicular cells into the peritoneal cavity of *X. tropicalis* tadpoles resulted in cell deposits in heart, pronephros and intestine, and later in a strong proliferation and formation of cell-to-cell net growing through the tadpole body. Immunohistochemistry analysis of transplanted tadpoles showed a strong expression of vimentin in RFP-positive cells. No co-localization of Sox9 and Sma signals was observed during the first three weeks indicating their dedifferentiation to migratory-active mesenchymal cells recently described in human testicular biopsies.

KEY WORDS: Testicular somatic cells, *Xenopus tropicalis*, Migration potential, Common progenitor

INTRODUCTION

The architecture of seminiferous tubules is tightly associated with the presence of peritubular myoid cells (PTMC) and Sertoli cells (SC) both forming basement membranes underlying the seminiferous epithelium (Skinner et al., 1985). Sertoli cells (SC) are also indispensable for germ cell maturation and differentiation (Bermdtson and Thompson, 1990; Johnson et al., 1984). They stretch to the lumen and have an intimate contact with developing gametes ranging from spermatogonia located on the base to spermatids in the centre. Sertoli cells also provide a signalling niche via expression of several growth factors and cytokines (De Rooij, 2009). In addition, with PTMCs they participate in the formation of seminiferous cords and appropriate vascularization

through the expression of Sry (Koopman et al., 1990) and downstream signalling cascades (Bott et al., 2006). Moreover, they function as an immunological barrier since testes are an immunologically privileged organ (Dufour et al., 2005). Leydig cells start to differentiate in the end of the proliferative phase of Sertoli cells (Baker et al., 1999; Nef et al., 2000; O'Shaughnessy et al., 2008) and form the stable cell line indispensable for the production of male sex hormones.

The origin of individual testicular somatic cell lineages in mouse is still controversial. Precursors of Sertoli cells were detected in the population of coelomic epithelial cells migrated into the gonad 11.5 days post-coitum (Karl and Capel, 1998). Later publications disproved these findings and showed that pre-Sertoli cells are already present in the developing gonad together with arrived germ cells and form Sertoli germ cell mass (SGCM) (reviewed in Cool et al., 2012). Based on the expression of the low affinity neurotrophin receptor p75, peritubular myoid cells were found as mesenchymal precursors migrated from an adjacent mesonephric tissue (Campagnolo et al., 2001); however, this result was also disproved and only endothelial cells, but not PTMCs, were identified as a migrating population from mesonephros to the gonadal base (Combes et al., 2009). Authors performed *ex vivo* assay in which they co-cultured a wild-type male genital ridge alongside mesonephroi constitutively expressing GFP (Nishino et al., 2000). They found that endothelial cells with VE-cadherin expression, and not p75 positive PTMCs, are the only migrating cells entering the gonad. Furthermore, endothelial cells were identified as being indispensable for establishing a proper seminiferous tubule architecture (Combes et al., 2009).

Regarding humans, Chikhovskaya et al. (2012) used frozen testicular biopsies for variable enzymatic digestions and subsequent cultivation *in vitro*. Over 30–50 days embryonic stem cell (ESC)-like colonies emerged. Gene expression analysis revealed a low level of pluripotency markers such as *POU5F1*, *NANOG* and *SOX2* which was in disagreement with similar studies performed on mouse where such colonies were found to be derived from dedifferentiated spermatogonial stem cells (SSCs) and showed the ability to form teratoma (Guan et al., 2006; Kanatsu-Shinohara et al., 2004, 2008; Ko et al., 2009). Human testicular cells expressed mesenchymal stem cell (MSC) markers and were able to differentiate to three mesodermal lineages (adipocytes, chondrocytes and osteocytes) indicating their multipotent but not pluripotent character (Chikhovskaya et al., 2014).

So far the majority of experiments employing testicular cells have been conducted in mammalian models; however, studies of their migration and differentiation potential *in vivo* via transplantation into early embryos are hampered by the inner embryonic development in the womb. In addition, Sertoli cells are able to survive after xenogeneic transplantation into the evolutionarily distant host. This feature is interesting for basic research in the field

¹Charles University in Prague, Faculty of Science, Vinicna 7, Prague 2 128 44, Czech Republic. ²Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, Prague 4 142 20, Czech Republic.

*Author for correspondence (vkrylov@natur.cuni.cz)

© V.K., 0000-0001-8678-7155

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 26 April 2016; Accepted 20 July 2016

of evolutionary immunology due to the potential utilization of xenogeneic Sertoli cells for co-transplantation with grafts without the need of immunosuppressive treatment. In this regard, well-established non-mammalian vertebrate model organisms are desirable and the diploid amphibian *Xenopus tropicalis* suits these requirements well. *X. tropicalis* is highly valuable in the fields of early vertebrate development, cell biology, and genome evolution, and large oocytes, outer fecundation and embryonic development make it feasible for microinjection or transplantation experiments. The *X. tropicalis* genome is fully sequenced and arranged into linkage groups (Hellsten et al., 2010; Wells et al., 2011), compared to evolutionarily-close fish model organisms (zebrafish, carp, trout etc.) the genome is diploid (Tymowska, 1973) and thus more suitable for gene function studies (Geach and Zimmerman, 2011).

Here we present a successful establishment and *in vitro* and *in vivo* (allogeneic transplantation into the tadpole peritoneal cavity) characterization of a stable cell culture derived from mechanically disrupted testes of a juvenile *X. tropicalis* male three months after metamorphosis. The cell culture is composed of a proliferative testicular cell feeder layer [*X. tropicalis* testicular somatic cells (XtTSC)] and testicular cell colonies [*X. tropicalis* testicular somatic cell colonies (XtTSCc)]. Reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis revealed a strong expression of mesenchymal, Sertoli and peritubular myoid

cell markers; however germ cell markers were not detected, which confirms their somatic origin. Double immunocytochemical staining against Sox9 (SC marker) and Sma (marker of PTMC) clearly showed the presence of both antigens in ~80% of cells. This result indicates that at least in *Xenopus* there exist a common progenitor of Sertoli cell and PTMC lineages emerging from mesenchymal cells present in developing testes.

RESULTS

Morphological and gene expression characterization of *X. tropicalis* testicular cell culture

After establishing a *X. tropicalis* testicular cell culture, the adherent cells formed a feeder layer (XtTSC) with the morphological characteristics of Pre-Sertoli cells (Fig. 1A). Long-term cultivation enables the forming of colonies (XtTSCc) resembling embryonic stem cells (ESC) (Fig. 1B). The ultrastructure and cell arrangement within the colony were visualized via transmission electron microscopy (TEM). Sertoli cell-like cells surrounded the colony in two or three tight layers (Fig. 1E), and few of them were found inside. TEM showed that XtTSCs and XtTSCc were arranged individually in an extensive amount of extracellular matrix (Fig. 1F).

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed a similar gene expression profile for both cell

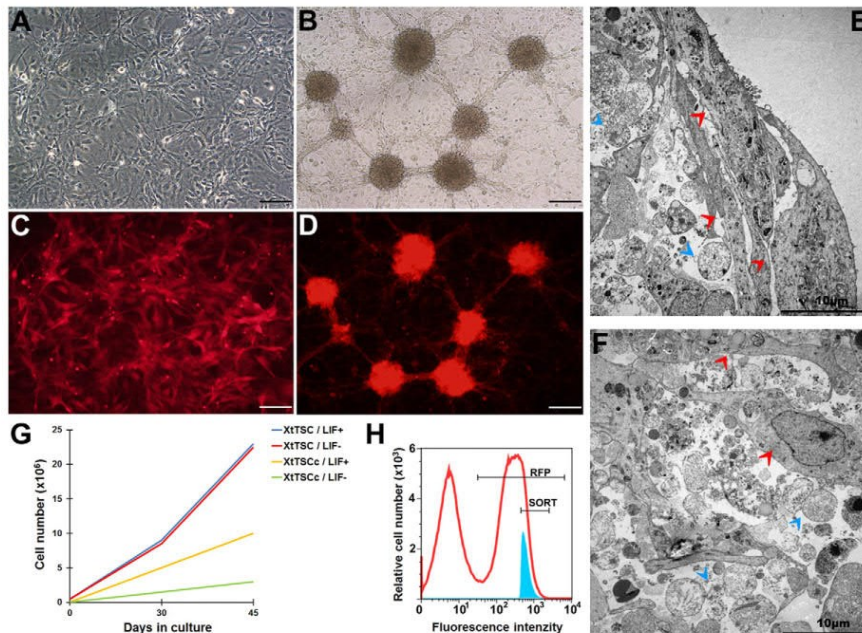


Fig. 1. *In vitro* characterization of *X. tropicalis* cell culture. (A,B) Testicular somatic cell culture in morphology of adherent feeder layer (XtTSC) (A) and after long-term cultivation which enables the forming of colonies (XtTSCc) (B). (C) *X. tropicalis* transgenic XtTSC expressing Katushka RFP under CAG promoter (XtTSC-RFP). (D) Transgenic Katushka RFP expressing XtTSC in colonies (XtTSCc-RFP). (E,F) Structure of *in vitro* testicular cell colony visualized by TEM. In the colony the cells are placed in an extensive amount of extracellular matrix with two or three tight layers of XtTSCs surrounding the colony at the edge (E). Both XtTSC and XtTSCc are present in the centre of the colony (F). The XtTSCc are clearly several times smaller than the XtTSC. Red arrowheads, XtTSC; blue arrowheads, XtTSCc. (G) *X. tropicalis* cell culture proliferation during long-term cultivation in medium with or without recombinant mouse LIF. (H) Representative graph of FACS sorting after nucleofection. Only ~15% of living transgenic cells with the highest intensity of fluorescent signal were sorted (blue area). Scale bars A,C:100 μ m; scale bars B,D: 200 μ m; scale bars E,F: 10 μ m.

types. The feeder layer and colonies were positive for pluripotency markers *klf4* (kruppel-like factor 4), *c-myc* and telomerase reverse transcriptase (*tert*). However, the key pluripotency genes *POU5F1* (in *X. tropicalis* *pou5f3.1*, *pou5f3.2* and *pou5f3.3*) (Morrison and Brickman, 2006; Frankenberg et al., 2014) or *sox2* (sex determining region Y box 2) were downregulated, suggesting that our cells are not in a pluripotent state as has been defined in the mouse model. Unfortunately, expression of the *nanog* gene, another key player in pluripotency acquisition (Silva et al., 2009), could not be determined since no homologue has been described in *Xenopus* yet. Germ cell markers such as *dazl*, *ddx4* and *ddx25* were not detected, this result confirmed the somatic origin of testicular cells. More detailed characterization was based on expression markers encompassing Sertoli cells (*sox9*, *kitlg*, *vim* and *lif*), peritubular myoid cells (*acta2* and *lif*), Leydig cells (*cyp11a1* and *cyp17a1*) and markers of mesenchymal cells (*itgb1* - *cd29*, *cd44* and *thy1*-*cd90*). Except for Leydig cell markers, both cell types were positive for all above mentioned genes (Fig. 2A).

RT-PCR data was confirmed by qPCR analysis. The standard deviation of the RNA spike quantification across all samples was 0.2 cycles, which shows evidence of minimal technical variation and

high reproducibility. The hierarchical clustering was performed according to two groups of analyzed markers, germ cell markers and testis-associated markers. Each heatmap included an RNA spike as a highly stable transcript across the cell types and housekeeping gene *odc1*. The result of the clustering indicated that the gene expression profile of testicular tissue is different from XtTSC and XtTSCc groups. Transcripts *dazl*, *ddx25* and *ddx4* are exclusively expressed in the testes, whereas expression of *lif* is substantially reduced in comparison with XtTSCs and XtTSCcs (Fig. 2B). Immunocytochemistry on feeder cells and colonies employing Sox9, Sma (smooth muscle α -actin) and vimentin antibodies revealed their colocalization on more than 80% of cells (Fig. 3). Taken together, we concluded that *X. tropicalis* testicular cell culture represents a population of Sertoli cell and PTMC common progenitors. To test if these cells are also present in adult individuals we prepared agarose embedded sections of *X. tropicalis* and mouse testes. After double staining with Sox9 and Sma antibodies we found individual cells expressing both antigens in the interstitial space close to the seminiferous tubules in *X. tropicalis* and even in mouse testes (Fig. 4).

Sertoli cells produce many soluble factors necessary for germ cell survival and proliferation. One of them, the leukemia inhibitory

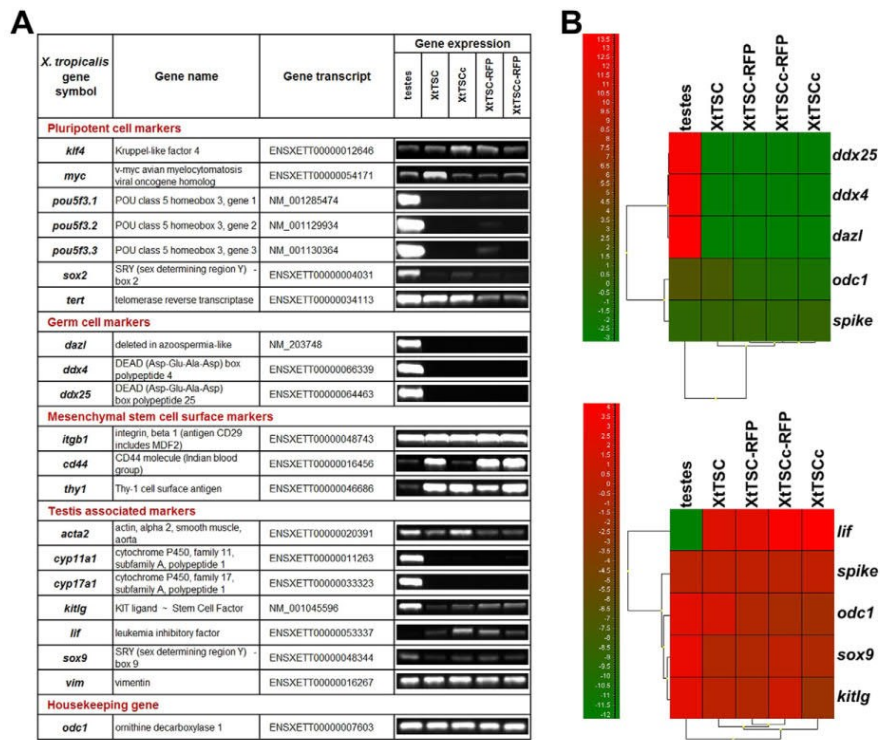


Fig. 2. Expression analysis of *X. tropicalis* testicular culture. (A) RT-PCR analysis of *X. tropicalis* testes, XtTSC, XtTSCc, XtTSC-RFP and XtTSCc-RFP. (B) Hierarchical clustering presented as a qPCR heatmaps of germ cell markers and selected testis associated markers. A scale of colours indicates level of expression (the highest expression is shown by bright red, whereas the lowest expression is shown by bright green). Similarity between cell types/genes is indicated by the height at which the dendrograms are joined. The RNA spike represents a highly stable transcript across the cell types and *odc1* represents housekeeping gene.

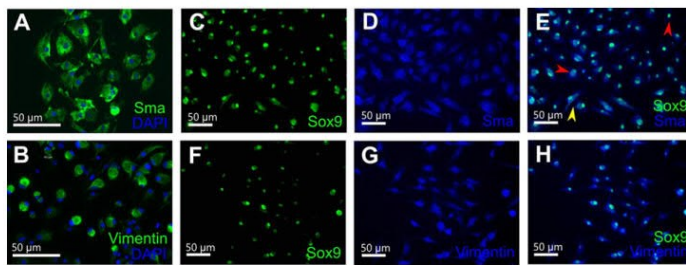


Fig. 3. Immunocytochemistry of *X. tropicalis* testicular cell culture expressing Katushka RFP. Positive staining for Sma (marker of peritubular myoid cells, green) (A) and vimentin (marker of mesenchymal cells and peritubular myoid cells, green) (B). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C-E) Double staining with Sox9 (marker of Sertoli cells, green) (C) and Sma (blue) (D) antibodies. (E) Merge of C and D. Yellow arrowhead, cell expressing both antigens; red arrowheads, cells expressing only Sox9 or only Sma. (F-H) Double staining with Sox9 (green) (F) and vimentin (blue) (G) antibodies. (H) Merge of F and G. Scale bars: 50 μ m.

factor (Lif), turned out to be crucial for *in vitro* enhanced XtTSC survival and colony forming activity. Although both the XtTSCs and XtTSCs express their own *lif* (measured on the RNA level) (Fig. 2A), the addition of recombinant mouse LIF into the cultivation medium entailed a rapid formation and expansion of XtTSC colonies. However, a total proliferation rate was unaffected by LIF since experimental groups (+LIF and -LIF) revealed the same growth curves as depicted on Fig. 1G.

In vivo migration potential of testicular somatic cells

A peritoneal cavity of tadpoles at stage 41 was used for the transplantation of transgenic XtTSCc-RFP and XtTSC-RFP expressing Katushka RFP under ubiquitous CAG promoter (Fig. 1C,D). Cell microinjection of 500 cells per peritoneum was performed through the dorsal side as depicted in (Fig. 5A). One week after transplantation we observed cell deposits mostly in heart and pronephros (Fig. 5B-E). During three following weeks transplanted cells strongly proliferated and formed a dense cell-to-cell connecting net growing through the tadpole's body (Fig. 5F,G). Immunohistochemical analysis of agarose embedded sections of tadpoles 0, 1 and 30 days after transplantation revealed a strong

vimentin and RFP colocalization (Fig. 5H). However, expression of Sox9 and Sma, found in testicular cells prior to microinjection was not detected even 2 h after transplantation when tadpoles from group '0 day' were fixed. Interestingly, 30 days after microinjection we observed Sox9 expression in a few RFP-positive cells indicating their potential differentiation into Sertoli cells or chondrocytes where this protein is also considered a cell-specific marker. Since both cell types (XtTSCc-RFP and XtTSC-RFP) showed the same migration and expression pattern, here we published only data concerning transplantation of testicular somatic cell colonies (XtTSCc).

DISCUSSION

In this study we characterized a newly established *X. tropicalis* testicular cell culture encompassing adherent feeder Sertoli-like cells (XtTSC) and cell colonies resembling ESC (XtTSCc). A long-term stem cell culture derived from testis was firstly described by Kanatsu-Shinohara et al. (2003) in mouse. Testes from newborn males were enzymatically dispersed and transferred to gelatin-coated plates. Here, in the presence of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2) and leukemia inhibitory factor (LIF) spermatogonia could be propagated as cell clumps. One year later the same team announced a conversion of germ cells (GS) to multipotent germ stem cells (mGSs) using standard ESC cultivation medium containing 15% fetal bovine serum (FBS) and LIF (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). In humans, the establishing of similar cell lines was found as a controversial. Four papers described the existence of ES-like cell colonies derived from testicular tissue (Conrad et al., 2008; Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Mizrak et al., 2010); however, in three of them (Golestaneh et al., 2009; Kossack et al., 2009; Mizrak et al., 2010) authors failed to induce teratoma after subcutaneous transplantation of testicular stem cells into immunodeficient mice. Chikhovskaya et al. (2012) revised previously published data of Mizrak et al. (2010) and performed an expanded study on human testis embryonic stem cell-like cells (htES-like cells) derived from frozen testicular samples using different enzyme digestion and cultivation conditions. Gene expression analysis revealed an expression of *KLF4* and *MYC* but not *SOX2*, *NANOG* or key pluripotency marker *POU5F1* indicating their multipotent rather than pluripotent character. RT-PCR confirmed the presence of *CD73*, *CD90* and *CD150* and absence of *CD31*, *CD34* and *CD45* surface markers characteristic for the expression profile of mesenchymal stem cells. Repeated efforts to induce teratoma with htES-like cells in immunodeficient mouse failed. Chikhovskaya et al. (2014) differentiated htES-like cells *in vitro* into three mesodermal cell lineages typical for mesenchymal

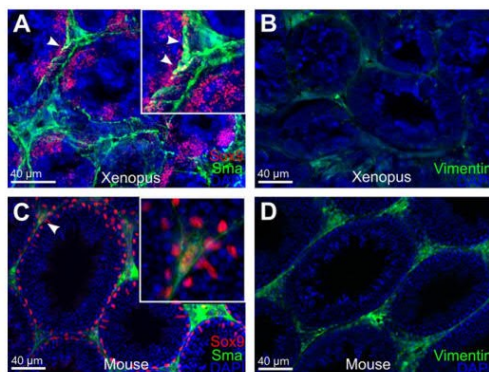


Fig. 4. Immunohistochemistry of agarose embedded testicular sections from *X. tropicalis* and mouse adult males. (A,C) Double staining with Sox9 (red) and Sma (green) antibodies. White arrowheads indicate potential common precursor cells for Sertoli and PTM cell lineages expressing both antigens in *X. tropicalis* (A) and mouse (C) samples. Insets show a detailed view of structures marked with white arrowheads in underlying figures. (B,D) Staining with vimentin (green) antibody on *X. tropicalis* (B) and mouse (D) samples. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars: 40 μ m.

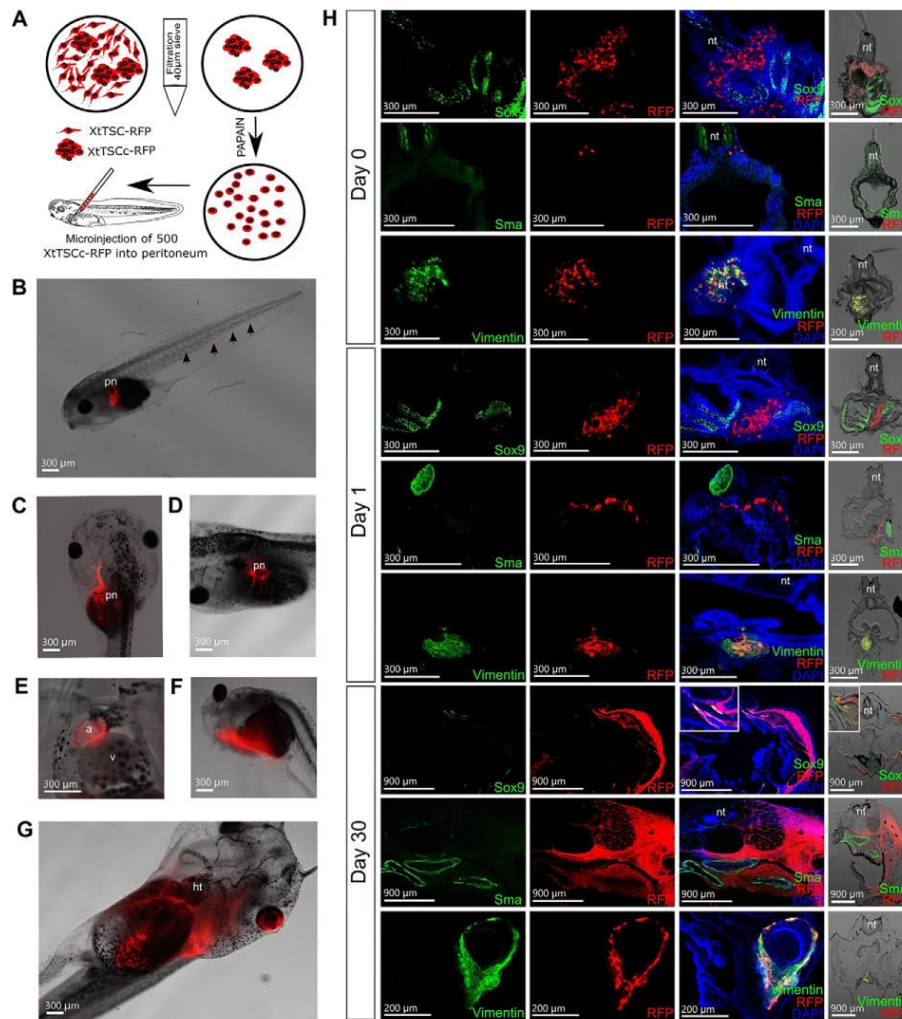


Fig. 5. Migration potential of *X. tropicalis* testicular somatic cells after allogeneic transplantation into peritoneal cavity of tadpoles in stage 41. (A) Scheme of XTSCc-RFP preparation prior to transplantation employing isolation of cell colonies using 40 µm sieve and subsequent single cell dissociation with papain. 500 cells were microinjected dorsally into peritoneal cavity. (B-G) Observation of RFP-positive cells in transplanted tadpoles under stereo microscopy. (B) Cell deposit in pronephros and tail 1 day after microinjection. (C,D) Cell deposits in pronephros 13 days after microinjection. (E) Migration of RFP-positive cells into heart atrium 15 days after transplantation. (F,G) Cell-to-cell net growing through the tadpole body observable 30 days after microinjection. (H) Immunohistochemistry of agarose-embedded sections of transplanted tadpoles using antibodies against Sox9, Sma and vimentin (green) and Katushka RFP (red) 0, 1 and 30 days after transplantation. RFP-positive cells were stained with vimentin antibody but not Sox9 or Sma even 2 h after transplantation. 30 days after microinjection, few cells start to express Sox9 indicating potential redifferentiation into Sertoli cells or chondrocytes where Sox9 is considered as a specific marker. The first three figures in each line were taken under fluorescence microscopy. The figures on the right side were taken under fluorescence stereomicroscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars B-G, H (0 and 1 day after transplantation), 300 µm; scale bars in H (30 days after transplantation, staining with Sox9 and Sma antibodies), 900 µm; scale bars in H (30 days after transplantation, staining with vimentin antibody), 200 µm.

stem cells (adipocytes, chondrocytes and osteocytes). In this study, up to five days after the mechanical disruption of *X. tropicalis* testis in the culture medium, adherent cells migrating from the organ were observed. Two months later small colonies of ES-like cells

(XtTSCc) started to appear on the feeder layer (XtTSC). RT-PCR analysis showed the same expression profile as in the case of htES-like cells (Chikhovskaya et al., 2012). We detected only some pluripotency markers (*klf4* and *myc*) and markers of mesenchymal

stem cells *cd29 (itgb1)*, *cd44* and *cd90 (thyl)*. Germ cell markers (*dazl*, *ddx4* and *ddx25*) were downregulated which further confirms the somatic rather than germ line origin of our testicular cells. Unlike Chikhovskaya et al. (2012) we performed gene expression analysis regarding testicular somatic lineages: Sertoli cells, peritubular myoid cells and Leydig cells. Except for the Leydig cell markers (*cyp11a1* and *cyp17a1*) we found positive reactions for both remaining cell types (*sox9*, *kitlg*, *lif*, *acta2* and *vim*). Immunocytochemistry revealed a colocalization of nuclear Sox9 and cytoplasmic Sma antigens. Together with previously published expression data in humans, we concluded that in *X. tropicalis* there exists a common progenitor of Sertoli and PTM cell lineages with morphological and expression characteristics of mesenchymal stem cells. Stem cell precursors for Leydig cells were already identified and characterized in interstitial space of rat testis close to seminiferous tubules (Inoue et al., 2016; Shan and Hardy, 1992; Stanley et al., 2011). We observed the same localization of cells double stained with Sox9 and Sma antibodies in *X. tropicalis* agarose embedded testicular sections and even in mouse samples.

The growth curve of our amphibian testicular cells showed a strong correlation between the addition of mouse leukemia inhibitory factor (mLIF) to the cultivation medium and cell colony forming activity. RT-PCR analysis revealed a relatively high *lif* transcription in both cell types (XtTSC and XtTSCc). In testis, a LIF production was determined in PTM cells located between the seminiferous tubules and the interstitium (Piquet-Pellorce et al., 2000) and also in remaining somatic cell types (Sertoli and Leydig cells) and spermatogonia (Jenab and Morris, 1998). LIF has an effect on spermatogonia proliferation and on the increased survival rate of Sertoli cells (De Miguel et al., 1996). We observed that for a successful establishment of amphibian testicular cell culture and its colony-forming activity, at least the initial addition of mLIF to the cultivation medium is indispensable. Further supplementation is important for the colony forming activity, but not for the testicular cell proliferation and survival. It is possible that initial addition of mouse LIF triggers the production of *Xenopus* homolog by testicular cells which is sufficient for their maintenance in the cell culture, but not for the formation of cell colonies.

The conservation of mammalian and non-mammalian LIF amino acid sequences is rather low (20–40%); however, all orthologous proteins share a conserved three-dimensional structure (Mathieu et al., 2012). As for lower vertebrates, *lif* cDNA was cloned in zebrafish, carp and goldfish (Fujiki et al., 2003; Abe et al., 2007; Hanington and Belosevic, 2007). Morpholino-based knockdown of *lif* in zebrafish revealed no obvious effect on early embryonic development. However, when its receptor (LIFR) had been targeted, effects on proper neural development were observed (Hanington et al., 2008). In chicken, LIF has been shown to function as an anti-differentiation factor for blastoderm cells (Horiuchi et al., 2006). In amphibians, its effect on early embryonic development is still unknown.

Unlike testicular cell culture, RT-PCR and qPCR analysis showed a low expression of *lif* in adult testes. As mentioned above, in mouse, LIF is mostly produced by peritubular cells located on a periphery of seminiferous tubules (Piquet-Pellorce et al., 2000). It is possible, that in *Xenopus* testis LIF is expressed by scarce cells positively stained for Sox9 and Sma antigens. When transferred out of the testicular niche, these cells can proliferate *in vitro* and produce a higher amount of LIF.

El Jamil et al. (2008) studied the distribution of *sox9* mRNA and protein in *X. tropicalis* testicular and ovarian cryosections. In males,

authors observed a Sox9 expression in nuclei of supporting (pre-Sertoli) cells located on the base of seminiferous tubules in the vicinity of germ cells. Unlike higher vertebrates, Sox9 is also expressed in oocyte cytoplasm indicating its role in the testicular differentiation but not in the sex determination.

To study of migration potential of *X. tropicalis* testicular somatic cells we performed a series of transplantation experiments with transgenic cell culture expressing Katushka RFP (XtTSCc-RFP). Cells were microinjected into the peritoneal cavity of tadpoles at stage 41. During the first week after microinjection we observed migration of RFP-positive cells into heart, pronephros (tadpole kidney) and intestine. The same organs are also major migratory targets for mouse mesenchymal stem cells intravenously injected into the bloodstream (reviewed in Cornelissen et al., 2015). Strong expression of vimentin in transplanted cells observed even one month after microinjection is typical for migratory mesenchymal cells (reviewed in Kim et al., 2014). In addition, differentiation markers of Sertoli and PTM cells (Sox9 and Sma) were downregulated indicating a dedifferentiation process towards mesenchymal stem cells able to successfully proliferate and migrate through the tadpole body.

MATERIALS AND METHODS

Ethical statement

This study was carried out in strict accordance with the Act No. 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty. An official permission was issued to the Faculty of Science, Charles University in Prague by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (No. MSMT-37376/2014-4, date of expiry 3. 3. 2019).

X. tropicalis testicular somatic cell culture

The *X. tropicalis* testicular somatic cell culture was established from testes of juvenile male (Ivory Coast strain) 6 months after metamorphosis. For wash steps, diluted PBS (2:1 PBS/deionized H₂O) was used due to different cell osmolarity of amphibian contrary to mammalian cells. Testes were extensively washed with diluted PBS and disrupted with needles in cultivation medium consisting of 33.3% L-15 and 33.3% RPMI 1640 HEPES modification medium (both Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 1.33 mg/ml sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine and 50 µg/ml gentamicin (all Sigma-Aldrich). Testicular explants were cultivated at 29.5°C with 5.5% CO₂ for 5 days without any interference. Preparation of primary culture was successfully repeated three times with different *X. tropicalis* individuals originated from various breedings. All three lines exhibited the same morphology and behaviour during long-term cultivation and subsequent experiments.

For XtTSCc cultivation, medium has been improved with 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (both Sigma-Aldrich) and 1000 U/ml recombinant mouse LIF (ESGRO; Millipore) according to Chowdhury et al. (2010). The XtTSCc medium was changed every three days and cells were passaged every two weeks. To obtain a single cell suspension of XtTSCc, dissociation by a papain solution (61.25 mg/l papain, 0.5 mM EDTA and 1 mM L-cysteine in PBS without Ca²⁺, Mg²⁺; Biochrom AG) was efficient. Disintegration of colonies using Accutase™ (Thermo Electron Corporation), Biotase (Biochrome AG) or trypsin-EDTA (0.5% trypsin-0.2% EDTA) was always incomplete. To measure growth, viable cells were seeded at a density of 1×10⁵ cells per flask (75 cm²) and cultured in XtTSCc medium with and without recombinant mouse LIF for 45 days. During this time period cells were counted three times (15 days interval). Mean values were used to plot a growth curve for both cell types together and for XtTSCc separately.

Visualization of XtTSCc via transmission electron microscopy (TEM)

XtTSCc was separated from XtTSC feeder layer by trypsin-EDTA treatment and filtered through a 20 µm filter (CellTrics®, Partec). For TEM, colonies were fixed, dehydrated in a graded ethanol series and acetone, and

embedded in Araldite 502/PolyBed 812 resin (Polyscience, Inc.) as previously described (Hyltiš et al., 2007). Ultrathin sections (70 µm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with the JEOL 1011 transmission electron microscope with a Veleta CCD camera and Olympus Soft Imaging Solution GmbH software.

Preparation of transgenic Katushka RFP testicular cell culture

Testicular cells were electroporated with 6 µg of ISpBSIISK-CAG-Katushka RFP vector (Shcherbo et al., 2007) using Nucleofector™ 2b Device (Lonza), program T-020 and nucleofection solution (5 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl). One month after nucleofection, transfected cells were separated on the basis of Katushka RFP signal by a fluorescence-activated cell sorting (FACS) using the inFlux v7 Sorter (BD Bioscience) (Fig. 1H).

RT-PCR and qRT-PCR

Total RNA was isolated from the adult *X. tropicalis* testes, XtTSC, XtTSCc, XtTSC-RFP and XtTSCc-RFP using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with the same amount of total RNA (200 ng) by the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). The relative expression of target genes was determined by using *odc1* as a reference gene. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed with a real-time CFX384 cycler system (BioRad) using iQTM SYBR[®] Green Supermix (BioRad). A RNA spike (TATAA Biocenter) was used to validate the reverse transcription and the quantitative PCR reactions. The detailed protocol of cDNA synthesis and qPCR reaction was already described (Flachsova et al., 2013; Sidova et al., 2015). For primer sequences and further details, see the Table S1.

Transplantation of testicular somatic cells into tadpole's peritoneal cavity

X. tropicalis embryos were produced by the standard *in vitro* fertilization procedure (Geach and Zimmerman, 2011). Embryos were cultivated in 0.05×MMR with gentamicin (50 µg/ml) for two days (stage 41). The developmental stage was determined according to Nieuwkoop and Faber (1994). Katushka RFP-positive testicular cells were detached from the bottom of the cultivation flask by trypsin. XtTSCc were separated using 40 µm sieve and colonies were then disintegrated to single cell suspension by papain. 40 nl containing 500 Katushka RFP-positive cells was microinjected into each peritoneal cavity of tadpoles at stage 41 using a thin glass capillary (Drummond, type 1-000-0500) and the Narishige IM-300 pneumatic microinjector (Fig. 5A). To prevent tadpole movements, the microinjection experiments were performed in an agarose-coated Petri dish filled with 0.05× MMR containing few drops of 0.02% MS222 (Sigma-Aldrich). After transplantation, tadpoles were cultivated for up to one month and the distribution of RFP positive cells was observed under a fluorescence stereomicroscope (Olympus).

Immunohistochemistry of vibratome sections from transplanted tadpoles

Transplanted tadpoles at stage 41 (day 0), 45 (day 1) and 55 (day 30) were fixed overnight in MEMFA (0.1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, and 3.7% formaldehyde) at 4°C. Agarose embedding was performed by gradual rehydration using 90, 75, 50 and 25% methanol diluted by PBST (PBS plus 0.1% Tween 20), following by 3 times washing with PBS. Tadpoles were then immersed into 3% agarose in PBS overnight at 48.5°C and cooled down. Agarose blocks with fixed tadpoles were then cut into 30-40 µm sections on vibratome (Leica 1200) in PBS. The sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h and blocked with TNB [0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.5% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim GmbH)] for the same time. Incubation with primary antibody in TNB was done for 3 days at 4°C. The dilution of primary antibodies against vimentin, Sox9 and Sma was 1:40, 1:300 and 1:400 respectively or 1:5000 for anti-tRFP (rabbit, Evrogen). Appropriate secondary antibody (Sigma) was applied for 2 h at room temperature following washing five times with PBST. Individual sections were mounted on slides with Mowiol/DAPI

mounting medium and observed under fluorescence microscopy. For details of antibodies used in immunofluorescence, see the Table S2.

Acknowledgements

We thank Dr. Marcela Buchtova and Hana Dosedelova (both from Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Brno, Czech Republic) for the provision of Sox9 antibody.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Designing the experiments: T.T. and V.K. Carrying out experiments: T.T., T.M.X.N., M.V., M.S., K.S., M.B. and V.K. Writing the manuscript: V.K. and T.T.

Funding

The research was funded by the Charles University in Prague programs UNCE, PRVOUK P41 and SVV [grant no. 204013, 20504151 and 260310, respectively, to T.T., V.K., M.V., T.M.X.N., K.S., M.B.]; Charles University Grant Agency GAUK [grant no. 1008314 to T.M.X.N.]; Ministry of Youth, Education and Sports of the Czech Republic [grant no. AV0250520701 to M.S.]; ERDF [grant no. LK21305 and BIOCEV CZ.1.05/1.1.00/02.0/109 to M.S.].

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.019265.supplemental>

References

- Abe, T., Mikekado, T., Haga, S., Kisara, Y., Watanabe, K., Kurokawa, T. and Suzuki, T. (2007). Identification, cDNA cloning, and mRNA localization of a zebrafish ortholog of leukemia inhibitory factor. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **147**, 38-44.
- Baker, P. J., Sha, J. A., McBride, M. W., Peng, L., Payne, A. H. and O'Shaughnessy, P. J. (1999). Expression of β 3-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur. J. Biochem.* **260**, 911-917.
- Bernrdson, W. E. and Thompson, T. L. (1990). Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J. Androl.* **11**, 429-435.
- Bott, R., McFee, R., Clopton, D., Toombs, C. and Cupp, A. (2006). Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* **75**, 56-67.
- Campagnolo, L., Russo, M. A., Puglianiello, A., Favale, A. and Siracusa, G. (2001). Mesenchymal cell precursors of peritubular smooth muscle cells of the mouse testis can be identified by the presence of the p75 neurotrophin receptor. *Biol. Reprod.* **64**, 464-472.
- Chikhovskaya, J. V., Jonker, M. J., Meissner, A., Breit, T. M., Repping, S. and van Pelt, A. M. M. (2012). Human testis-derived embryonic stem cell-like cells are not pluripotent, but possess potential of mesenchymal progenitors. *Hum. Reprod.* **27**, 210-221.
- Chikhovskaya, J. V., van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., Repping, S. and van Pelt, A. M. M. (2014). Mesenchymal origin of multipotent human testis-derived stem cells in human testicular cell cultures. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 155-167.
- Chowdhury, F., Li, Y., Poh, Y.-C., Yokohama-Tamaki, T., Wang, N. and Tanaka, T. S. (2010). Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS ONE* **5**, e15655.
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A. and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev. Biol.* **326**, 112-120.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Weisner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Bühring, H.-J., Mattheus, U., Mack, A. et al. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* **456**, 344-349.
- Cool, J., DeFalco, T. and Capel, B. (2012). Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex *de novo* tubulogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 847-859.
- Cornelissen, A. S., Maijenburg, M. W., Nolte, M. A. and Voermans, C. (2015). Organ-specific migration of mesenchymal stromal cells: who, when, where and why? *Immunol. Lett.* **168**, 159-169.
- De Miguel, M. P., De Boer-Brouwer, M., Paniagua, R., van den Hurk, R., de Rooij, D. G. and Van Dissel-Emiliani, F. M. (1996). Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology* **137**, 1885-1893.
- De Rooij, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc. Res. Tech.* **72**, 580-585.

- Dufour, J., Hamilton, M., Rajotte, R. V. and Korbitt, G. (2005). Neonatal Porcine Sertoli cells inhibit human natural antibody-mediated lysis. *Biol. Reprod.* **72**, 1224-1231.
- El Jamil, A., Kanhouh, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B. and Penrad-Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev. Dyn.* **237**, 2996-3005.
- Flachsova, M., Sindelka, R. and Kubista, M. (2013). Single blastomere expression profiling of *Xenopus laevis* embryos of 8 to 32-cells reveals developmental asymmetry. *Sci. Rep.* **3**, 2278.
- Frankenberg, S. R., Frank, D., Harland, R., Johnson, A. D., Nichols, J., Niwa, H., Schöler, H. R., Tanaka, E., Wylie, C. and Brickman, J. M. (2014). The POU-er of gene nomenclature. *Development* **141**, 2921-2923.
- Fujiki, K., Nakao, M. and Dixon, B. (2003). Molecular cloning and characterisation of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 127-136.
- Geach, T. and Zimmerman, L. B. (2011). Developmental genetics in *Xenopus tropicalis*. *Methods Mol. Biol.* **770**, 77-117.
- Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez-Buono, C., Rone, J. D., Haddad, B. R., Gallicano, G. I. and Dym, M. (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev.* **18**, 1115-1125.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W. et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199-1203.
- Hanington, P. C. and Belosevic, M. (2007). Interleukin-6 family cytokine M17 induces differentiation and nitric oxide response of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 817-829.
- Hanington, P. C., Patten, S. A., Reaume, L. M., Waskiewicz, A. J., Belosevic, M. and Ali, D. W. (2008). Analysis of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Biol.* **314**, 250-260.
- Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L. et al. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* **328**, 633-636.
- Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2006). Maintenance of chicken embryonic stem cells *in vitro*. *Methods Mol. Biol.* **329**, 17-34.
- Hylis, M., Obornik, M., Nebesářová, J. and Vávra, J. (2007). Aquatic tetrasporoblastic microsporidia from caddis flies (Insecta, Trichoptera): characterisation, phylogeny and taxonomic reevaluation of the genera *Episentrum* Larsson, 1986, *Pyrotheca* Hesse, 1935 and *Cougourdella* Hesse, 1935. *Eur. J. Protistol.* **43**, 205-224.
- Inoue, M., Shima, Y., Miyabayashi, K., Tokunaga, K., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Akiyama, H., Suyama, M. and Morohashi, K.-i. (2016). Isolation and characterization of fetal Leydig progenitor cells of male mice. *Endocrinology* **157**, 1222-1233.
- Jenab, S. and Morris, P. L. (1998). Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* **139**, 1883-1890.
- Johnson, L., Zane, R. S., Petty, C. S. and Neaves, W. B. (1984). Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol. Reprod.* **31**, 785-795.
- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* **69**, 612-616.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S. et al. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**, 1001-1012.
- Kanatsu-Shinohara, M., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Ikawa, M., Nakamura, T., Ogura, A. and Shinohara, T. (2008). Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol. Reprod.* **78**, 681-687.
- Karl, J. and Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* **203**, 323-333.
- Kim, Y.-S., Yi, B.-R., Kim, N.-H. and Choi, K.-C. (2014). Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Exp. Mol. Med.* **46**, e108.
- Ko, K., Tapia, N., Wu, G., Kim, J. B., Bravo, M. J. A., Sasse, P., Glaser, T., Ruau, D., Han, D. W., Greber, B. et al. (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* **5**, 87-96.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **348**, 450-452.
- Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H. N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P. J. and Reijo-Pera, R. A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* **27**, 138-149.
- Mathieu, M.-E., Saucourt, C., Mournetas, V., Gauthereau, X., Thézé, N., Praloran, V., Thiébaud, P. and Boeuf, H. (2012). LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Rev. Rep.* **8**, 1-15.
- Mizrak, S. C., Chikhovskaya, J. V., Sadri-Ardekani, H., van Daalen, S., Korver, C. M., Hovingh, S. E., Roepers-Gajadien, H. L., Raya, A., Fluiter, K., de Reijke, T. M. et al. (2010). Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum. Reprod.* **25**, 158-167.
- Morrison, G. M. and Brickman, J. M. (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* **133**, 2011-2022.
- Nef, S., Shipman, T. and Parada, L. F. (2000). A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev. Biol.* **224**, 354-361.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. New York: Garland Publishing Inc.
- Nishino, K., Kato, M., Yokouchi, K., Yamanouchi, K., Naito, K. and Tojo, H. (2000). Establishment of fetal gonad/mesonephros coculture system using EGFP transgenic mice. *J. Exp. Zool.* **286**, 320-327.
- O'Shaughnessy, P. J., Morris, I. D. and Baker, P. J. (2008). Leydig cell regeneration and expression of cell signaling molecules in the germ cell-free testis. *Reproduction* **135**, 851-858.
- Piquet-Pellorce, C., Dorval-Coiffec, I., Pham, M.-D. and Jégou, B. (2000). Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis. *Endocrinology* **141**, 1136-1141.
- Shan, L. X. and Hardy, M. P. (1992). Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* **131**, 1107-1114.
- Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S. et al. (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* **4**, 741-746.
- Sidova, M., Sindelka, R., Castoldi, M., Benes, V. and Kubista, M. (2015). Intracellular microRNA profiles form in the *Xenopus laevis* oocyte that may contribute to asymmetric cell division. *Sci. Rep.* **5**, 11157.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I. and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **138**, 722-737.
- Skinner, M. K., Tung, P. S. and Fritz, I. B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* **100**, 1941-1947.
- Stanley, E. L., Johnston, D. S., Fan, J., Papadopoulos, V., Chen, H., Ge, R.-S., Zirk, B. and Jelinsky, S. (2011). Stem Leydig cell differentiation: gene expression during development of the adult rat population of Leydig cells. *Biol. Reprod.* **85**, 1161-1166.
- Tymowska, J. (1973). Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet. Cell Genet.* **12**, 297-304.
- Wells, D. E., Gutiérrez, L., Xu, Z., Krylov, V., Macha, J., Blankenburg, K. P., Hitchens, M., Bellot, L. J., Spivey, M., Stemple, D. L. et al. (2011). A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* **354**, 1-8.