

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ondřej Smolík

Studium diferenciačního potenciálu zárodečných kmenových buněk in vitro u vyšších obratlovců

Study of differential potential of germ stem cells in vitro in higher vertebrates

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 22.8.2014

Poděkování:

Děkuji svému školiteli za odborné vedení práce a vstřícný přístup plný optimismu.

A také děkuji svým nejbližším, bez jejichž podpory by tato práce nemohla nikdy vzniknout.

Abstrakt

Spermatogoniální kmenové buňky jsou zárodečné buňky zajišťující celoživotní produkci samčích pohlavních buněk, spermií. V roce 2004 byl realizován na myším modelu klíčový experiment, kdy v průběhu *in vitro* kultivace tyto zárodečné unipotentní buňky nabyly charakteristik embryonálních kmenových buněk, tedy znaků pluripotence. Takové buňky jsou schopny spontánně diferencovat do všech tří zárodečných vrstev, tedy entodermu, ektodermu a mezodermu, dále přenosu své genetické informace do dalších generací a také mohou dát vzniknout teratomům. Následovala řada studií zaměřená na další druhy obratlovců, jmenovitě na hlodavce, domácí zvířata i člověka. Diferenciaci těchto buněk je možné v *in vitro* podmínkách zacílit a generovat tak konkrétní buněčné typy. Jako takové jsou tedy spermatogoniální kmenové buňky alternativním zdrojem pluripotentních buněk, jenž nachází řadu uplatnění v biologických vědách. Cílem práce je shrnout současné poznatky o diferenciačních možnostech *in vitro* spermatogoniálních kmenových buněk vyšších obratlovců a pokusit se nalézt případné tendence, jaký diferenciační směr tyto buňky upřednostňují.

Klíčová slova: zárodečné kmenové buňky, spermatogoniální kmenové buňky, obratlovcí, *in vitro*, diferenciace

Abstract

Spermatogonial stem cells are unipotent male germ cells which provide spermatogenesis during the whole life. In 2004, an important experiment was conducted. During *in vitro* cultivation mouse spermatogonial stem cells gained the characteristics of embryonic stem cells, pluripotency by all means. Those cells had the feature to spontaneously differentiate into all three germ layers, endoderm, ectoderm and mesoderm. They also could pass its genetic information to the next generation and they could give rise to teratomas. By this event, experiments started on other vertebrates including rodents, domestic animals and also human. Differentiation of these cells can be directed *in vitro* to generate specific cell types. On base of these facts, spermatogonial stem cells are alternative source of pluripotent cells which possess many applications in life sciences. The purpose of this thesis is to summarize actual knowledge about differentiation potential *in vitro* of spermatogonial stem cells in higher vertebrates and try to identify tendencies which they prefer during differentiation, if they exist.

Keywords: germ stem cells, spermatogonial stem cells, vertebrates, in vitro, differentiation

Obsah

Úvod	1
1. Kmenové buňky <i>in vitro</i>	2
Embryonální kmenové buňky (ESCs)	3
Kmenové buňky epiblastu (EpiSCs)	3
Embryonální zárodečné buňky (EGCs)	3
Multipotentní adultní zárodečné kmenové buňky (maGSCs)	3
Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)	4
Embryonální buňky karcinomů (ECCs)	4
2. Spermatogoniální kmenové buňky.....	5
3. Diferenční potenciál spermatogoniálních kmenových buněk	9
Diferenční potenciál SSCs izolovaných z novorozenců.....	9
Diferenční potenciál SSCs izolovaných z dospělých jedinců	10
Navazující experimenty soustředěné na lidské spermatogoniální kmenové buňky	14
4. Řízená diferenciace u vyšších obratlovců	17
Závěr	21
Seznam zkratk.....	22
Seznam literatury	23

Úvod

Výzkum kmenových buněk v posledních letech nabývá na intenzitě. Na základě jejich diferenciačního potenciálu je lze rozdělit na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní.

Zárodečné buňky jsou schopny předávat genetickou informaci jedince napříč generacemi. Řadíme mezi ně i unipotentní spermatogoniální kmenové buňky. Jejich charakteristickým znakem je schopnost sebeobnovy a tím i zajištění celoživotní produkce samčích pohlavních buněk, spermií.

Recentní studie ukázaly, že tyto buňky jsou schopny ve specifických *in vitro* podmínkách změnit svou primární funkci a nabýt pluripotentního stavu. Takové buňky pak disponují potenciálem pro řízenou diferenciaci do dalších somatických typů buněk aplikovatelných v dalších výzkumech a medicíně.

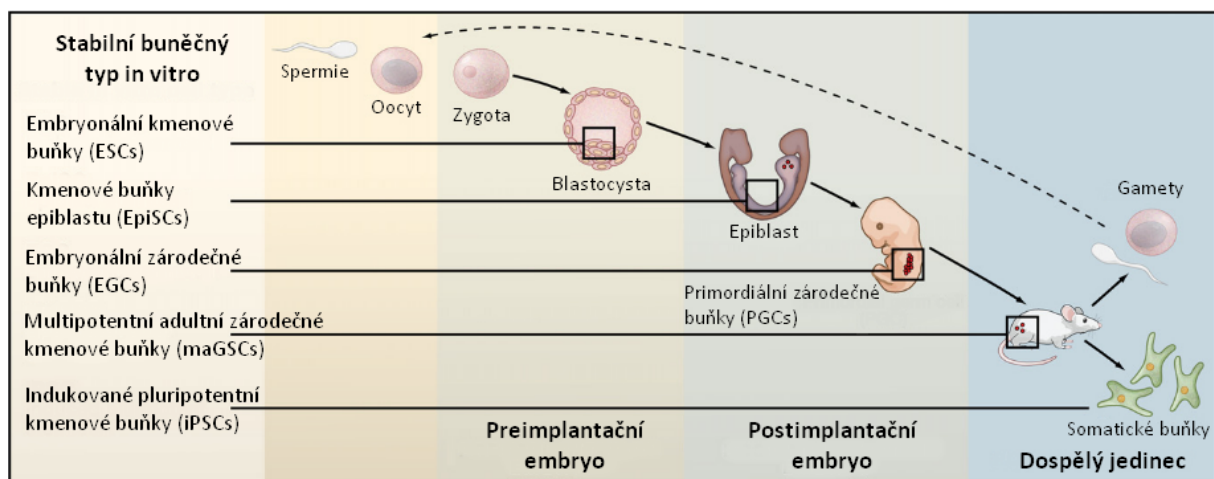
Cílem této práce je na základě odborné literatury shrnout současné poznatky o diferenciačních možnostech spermatogoniálních kmenových buněk v *in vitro* podmínkách u vyšších obratlovců a pokusit se identifikovat, pokud existují, diferenciační tendence v tomto prostředí.

1. Kmenové buňky *in vitro*

Kmenové buňky jsou známé svými unikátními proliferačními vlastnostmi. Mají schopnost nahrazovat samy sebe – schopnost sebeobnovy, tzn. symetrického typu proliferace, kdy během dělení vznikají dvě identické buňky, nebo asymetrického typu dělení, kdy si jedna buňka ponechává původní fenotyp a druhá je diferencovaná. Třetím typem proliferace je pak samotné diferenciační dělení, kdy obě dceřinné buňky diferencují (Wu *et al.*, 2009).

Diferenciaci lze definovat jako proces, při kterém se buňka během vlastního dělení stává buňkou specializovanější a získává při tom specifickou strukturu a funkci.

Na počátku vývoje každého vyššího obratlovce se nachází stádium diploidní zygoty vzniklé spojením dvou haploidních rodičovských pohlavních buněk, samčí spermie a samičího oocyty. Zygota sama, stejně jako blastomery vznikající během jejího raného rýhování, je označována jako buňka totipotentní, tedy schopna diferenciace do jakékoliv buněčnému typu, resp. tkáně, daného jedince včetně extraembryonálních struktur. Ve stádiu 16 buněk dochází k rozlišení embryonálních buněk na trofoblast, později formující část placenty, a embryoblast dávající vzniknout buňkám epiblastu – dále utvářejícímu samotné embryo, a hypoblastu – tvořícímu žloutkový váček. Buňky epiblastu se označují jako pluripotentní, protože jsou základem všech buněčných linií utvářejícího se embrya – jak somatické, tak zárodečné. Primordiální zárodečné buňky vystávající během gastrulace dávají později vzniknout v samčím embryu spermatogoniálním kmenovým buňkám. Pluripotentní buňky se podařilo odvodit z různých zmíněných vývojových stádií v umělých *in vitro* podmínkách, viz Obrázek 1, (shrnuto v Hanna *et al.*, 2010).



Obrázek 1: Vývojový původ pluripotentních kmenových buněk

Různé pluripotentní buněčné typy lze získat explantací z různých stádií raného embryonálního vývoje. Multipotentní buňky lze získat z dospělých jedinců, jako například spermatogoniální kmenové buňky (SSCs). Indukované pluripotentní buňky se připravují reprogramací somatických buněk *in vitro*. (převzato a upraveno z Hanna *et al.*, 2010)

Embryonální kmenové buňky (ESCs)

Pluripotentní ESCs byly poprvé připraveny z embryoblastu myši (Evans a Kaufman, 1981), přestože se ale původnímu zdroji buněk velmi podobají, např. expresí charakteristických genů pluripotence jako Oct4, Sox2, Nanog (Nichols a Smith, 2009), jiné znaky jako třeba míru methylace či úroveň proliferačních schopností nesdílí (Meissner *et al.*, 2008). Po injikování do blastocyst se včleňují do embrya, u kterého pak zapříčiňují chimérismus. Bylo prokázáno, že díky přítomnosti LIF (leukemického inhibičního faktoru) a séra, resp. LIF a BMP4 (kostního morfogenetického proteinu 4), v kultivačním médiu je možné tyto buňky uchovat v nediferencovaném stavu (Ying *et al.*, 2008).

Kmenové buňky epiblastu (EpiSCs)

Jako epiblast označujeme buňky formující jednovrstevné struktury pocházející z embryoblastu. EpiSCs se podařilo ustavit *in vitro* explantací epiblastu 5,5-7,5denních myší v přítomnosti FGF (fibroblastového růstového faktoru) a aktivinu (Brons *et al.*, 2007). Ve srovnání s ESCs exprimují pluripoteční geny v menší míře, diferencují do všech tří zárodečných listů formováním embryoidních tělísek – struktur formujících se i z ESCs kultivovaných *in vitro* a neorganizovaně diferencujících do všech tří zárodečných vrstev (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000), a jsou schopny generovat teratomy. Epigenetická úroveň methylace je opět odlišná od ESCs. LIF na rozdíl od BMP4 neinhibuje růst EpiSCs (Tesar *et al.*, 2007).

Embryonální zárodečné buňky (EGCs)

EGCs jsou pluripotentní buňky odvozené ze zárodečné linie, konkrétně z PGCs (primordiálních zárodečných buněk) – progenitorů gonocytů tvořících v pozdějším vývoji pohlavní buňky. PGCs lze izolovat a ustavit *in vitro* z 8,5denních embryí myší za přítomnosti SF (steel faktor), LIF a bFGF (základního fibroblastového růstového faktoru) (Matsui *et al.*, 1992). Při injikování těchto buněk do blastocyst je možné detekovat chimérismus, generují také teratomy při subkutánním injikování do nahých myší.

Multipotentní adultní zárodečné kmenové buňky (maGSCs)

maGSCs je možné připravit vhodnou kultivací SSCs (spermatogoniálních kmenových buněk) neonatálních i dospělých jedinců podobnou přípravě ESCs (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a), detailněji se tímto diferenciačním potenciálem zabývají následující kapitoly. Samotný termín „multipotentní“ pak vyjadřuje schopnost diferencovat do pouze omezené škály specializovanějších buněk, např. jako buňky kostní dřeně – hematopoetické kmenové buňky, které jsou progenitory schopnými diferencovat do erytrocytů, lymfocytů, krevních destiček a dalších druhů krvinek (Yu, 2013).

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)

Jako iPSCs označujeme somatické plně diferencované buňky, u nichž byla pomocí transdukce navozena zvýšená exprese transkripčních faktorů Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc, což vedlo k dediferenciaci do pluripotentního stavu (Takahashi a Yamanaka, 2006). Později byla objevena alternativní kombinace faktorů Nanog, Lin28, ESRRB, NR5A (Ichida *et al.*, 2009). Takto masivní reprogramační zásah plně diferencované buňky se ukázal jako účinný, nicméně zanechává po sobě mnohokrát diskutované stopy na úrovni epigenetické či stopy po transdukci virem s potenciální mutagenezí (shrnutí v Tavernier *et al.*, 2013). To pro terapeutické aplikace u člověka představuje velkou překážku a výzkum v hledání alternativních zdrojů kmenových buněk pokračuje.

Embryonální buňky karcinomů (ECCs)

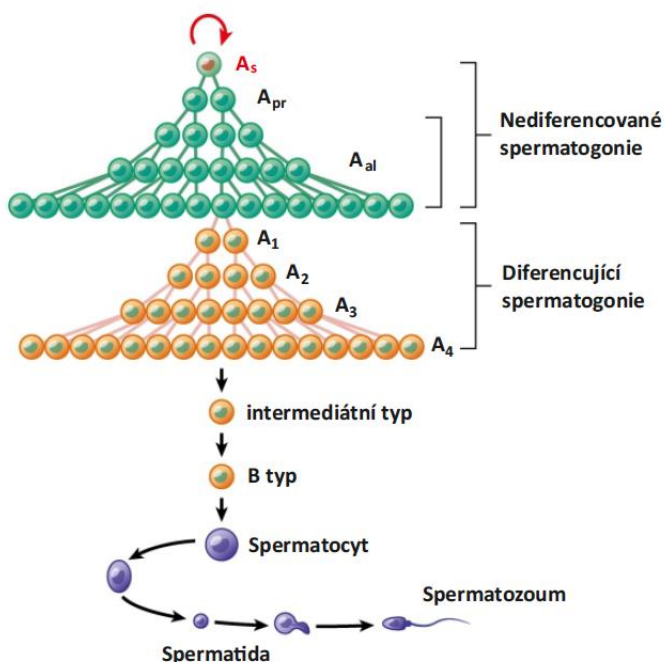
ECCs jsou svým původem odvozeny od nestabilních PGCs, přirozeně se proto objevují během embryonálního vývoje a způsobují rakovinné bujení časté v testikulární tkáni. Tyto nádory nazýváme již zmiňovanými teratomy, zhoubnou formu potom teratokarcinomy. Objevovat se začínají jako shluk nediferencovaných buněk, který později během svého růstu a postupné diferenciaci obsahuje deriváty všech tří zárodečných vrstev. Této vlastnosti lze využít uměle k důkazu buněčné pluripotence pomocí injikování testovaných buněk do imunodeficientního kmene nahých myší (Gordeeva a Nikonova, 2013, Donovan, 1998).

2. Spermatogoniální kmenové buňky

Spermatogoniální kmenové buňky (SSCs) jsou jedinými buňkami zárodečné linie podstupující kontinuální sebeobnovu v průběhu života jedince. Zároveň v průběhu diferenciačního procesu zvaným spermatogeneze produkují samčí pohlavní buňky, spermie, čímž zajišťují jejich produkci po celý život, jedná se tedy o buňky unipotentní – diferencující pouze do jednoho buněčného typu.

Jak už bylo předesláno, původ SSCs a celé zárodečné linie leží v PGCs, které se u myši vyčleňují z epiblastu 6,5 dpc (dnů post coitum). Poprvé jsou patrné při vychlípení zárodečného stvolu z allantois a v průběhu vývoje se množí a migrují do genitálních rýh, kde zakládají progenitory pohlavních buněk (10,5 dpc), gonocyty, které se dále vyvíjejí v závislosti na pohlaví plodu. Během tohoto procesu také mění své epigenetické charakteristiky, např. úroveň methylace regionu H19. V genitálních rýhách samců formují pro-spermatogonie a zastavují svou mitotickou aktivitu až do zhruba pátého dne po narození, kdy obnovují svou mitotickou aktivitu a iniciují spermatogenezi (shrnuje Chuma *et al.*, 2005).

V průběhu spermatogeneze (Obrázek 2) prochází spermatogoniální buňka řadou morfologicky odlišitelných stádií. V základním měřítku lze rozlišit typ A, intermediální typ a typ B. Typ A lze dále rozdělit na A_s (single), A_{pr} (paired) a A_{al} (aligned) a to na základě počtu vlastních klonů, které zůstávají spojeny cytoplasmatickými mosty, nedochází u nich k úplnému dokončení telofáze buněčného dělení. Tyto mosty slouží k výměně genových produktů mezi klony a tím synchronizují jejich vývoj. Spermatogonie typu A_s lze potom považovat za samotné SSCs, neboť jsou nejméně diferencovaným stádiem, jejich počet se odhaduje na 0,02–0,03% z celkového počtu zárodečných buněk (shrnuje Kanatsu-Shinohara a Shinohara, 2013, De Rooij a Russell, 2000).

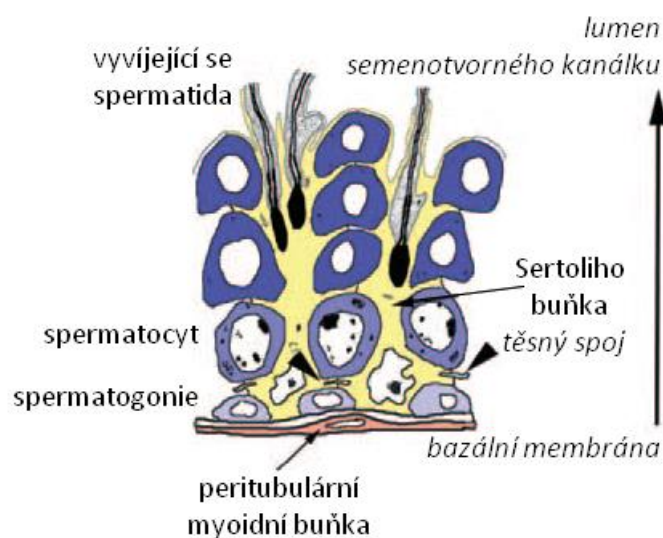


Obrázek 2: Schéma myší spermatogeneze

Spermatogonie A_s (single) mají schopnost sebeobnovy a produkce spermatogonií A_{pr} (paired), které se mnohonásobně množí a později diferencují přes stádia A_{al} , A_{1-4} do intermediálního typu, typu B a spermatocytu postupně zrajícího do spermatozoí. (převzato a upraveno z Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2013)

Důležitým faktorem pro zachování sebeobnovy SSCs se ukázal být GDNF (neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk)(Meng *et al.*, 2000), FGF2 (fibroblastový růstový faktor 2) a LIF (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003).

SSCs se přirozeně vyskytují v mikroprostředí nazývaném nika (Obrázek 3). Jedná se o specifické seskupení buněk v semenotvorných kanálcích skládající se ze somatických, peritubulárních myoidních a Sertoliho buněk. Recentní studie ukázala, že nediferencované spermatogonie se vyskytují v nikách umístěných v místech blízko peritubulárních myoidních buněk oddělujících jednotlivé semenotvorné kanálky a současně tam, kde je tkáň vaskularizovaná (Yoshida *et al.*, 2007). Roli v lokalizaci pravděpodobně nik hrají i Leydigovy buňky (Oatley *et al.*, 2009).



Obrázek 3: Organizace buněk semenotvorného kanálku

Spermatogeneze probíhá ve směru šipky od bazální membrány směrem do lumen semenotvorného kanálku. Spermatogonie se nachází po stranách, přichyceny k bazální membráně a v průběhu spermatogeneze se diferencované buňky přesouvají doprostřed kanálku, kam se později zralé spermatidy uvolňují. Všechny buňky jsou spolu v těsném kontaktu a vzájemně se ovlivňují. Sertoliho buňky jsou navzájem propojeny pomocí těsných spojů. (převzato a upraveno z Jones a Fuller, 2009)

Techniky rozlišení SSCs od ostatních nediferencovaných spermatogonií jsou kvůli nedostatečným znalostem molekulárních markerů nevyhovující. Jako známé adhezivní molekuly povrchu SSCs lze uvést α_6 -integriny a β_1 -integriny. β_1 -integrin hraje roli v setrvávání SSCs na bazální membráně semenotvorných kanálků. Další specifickou molekulou je E-cadherin, který je zapojený do soudržnosti během buněčných migrací. Claudiny jsou potom považovány za molekuly zajišťující interakci buněčných povrchů spermatogonií a Sertoliho buněk během migrace směrem do lumen semenotvorných kanálků. Diferenciace SSCs je také doprovázena nárůstem exprese EpCAM. U markerů jako Thy1, CD146 a CD9 zatím není známá funkce. GFR α -1 (α -1 receptor rodiny GDNF) byl pozorován u nediferencovaných spermatogonií. Mezi nespécifické markery pak můžeme zařadit molekuly

charakterizující diferencující buňky jako c-kit, Stra8 a Smc6. (shrnutí v Kanatsu-Shinohara a Shinohara, 2013, Zheng *et al.*, 2014)

Klíčovým krokem pro experimenty s SSCs je nalezení protokolu pro přípravu vhodných podmínek *in vitro* umožňujícího jejich dlouhodobou kultivaci. První taková kultura byla připravena u myši v roce 2003 (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003).

Homogenizovaná testikulární tkáň novorozené GFP-značené (zeleným fluorescenčním proteinem) myši byla naštěpena kolagenázou a kultivována na želatinou pokrytých kultivačních miskách v médiu obsahujícím GDNF, bFGF, EGF (epidermální růstový faktor) a LIF. Takto se podařilo připravit ESC-podobné kolonie buněk. Po 2–3 pasážích byly buňky umístěny na vrstvu MEF (myších embryonálních fibroblastů), kde je bylo možné dlouhodobě kultivovat. Získané buňky připomínaly mitoticky aktivní spermatogonie. Buňky exprimovaly α_6 -integriny a β_1 -integriny, EpCAM a EE2 – spermatogoniální marker (Koshimizu *et al.*, 1995), velmi slabě potom c-kit – marker diferencujících buněk (Rossi *et al.*, 2000). Buňky byly kompletně negativní na SSEA-1 (stádiově specifický embryonální antigen 1) – PGC marker (Matsui *et al.*, 1992). Transplantačními experimenty do semenotvorných kanálků neplodných myši byla obnovena spermatogeneze. Oocyty oplodněné získanými spermii po vpravení do pseudopregnantních myši daly vzniknout nové fertlní generaci. Pod UV světlem, díky metodě GFP značení, bylo možné verifikovat její původ.

Získané buňky byly označeny jako GSCs (zárodečné kmenové buňky).

Přestože se z počátku zdálo, že kultivace SSCs vyžaduje přítomnost podpurných vrstev, např. MEF, nebo Sertoliho buněk, pozdější studie ukázaly, že tyto buňky lze úspěšně kultivovat i bez nich (Choi *et al.*, 2014).

Dlouhodobé kultury se podařilo také připravit z dalších živočišných druhů, jako je krysa, křeček, králík, s kratší kultivační schopností pak u tura (shrnuto v Kanatsu-Shinohara a Shinohara, 2013). Krátkodobější kultura byla připravena u bůvola (Kadam *et al.*, 2013), kočky (Tiptanavattana *et al.*, 2013) a prasete (Han *et al.*, 2009). Kozí SSCs se podařilo imortalizovat (Zhu *et al.*, 2014). Srovnání proliferační doby *in vitro* můžeme pozorovat v Tabulce 1. U těchto buněk, vyjma kozích, nebyl pozorován a cíleně testován jiný druh diferenceiace než po zárodečné linii.

Tabulka 1: Shrnutí výsledků kultivací SSCs na vybraných zvířecích modelech

Model	Max. doba proliferace	Skupina
myš	>6 měsíců	(Kubota <i>et al.</i> , 2004)
krysa	>7 měsíců	(Ryu <i>et al.</i> , 2005)
křeček	1 rok	(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> , 2008b)
králík	5 měsíců	(Kubota <i>et al.</i> , 2011)
kočka	2 měsíce	(Tiptanavattana <i>et al.</i> , 2013)
tur	2 týdny	(Nasiri <i>et al.</i> , 2012)
koza*	>3 měsíce	(Zhu <i>et al.</i> , 2014)
bůvol	1 měsíc	(Kadam <i>et al.</i> , 2013)
prase	2 měsíce	(Han <i>et al.</i> , 2009)

*kozí SSCs se podařilo recentně imortalizovat

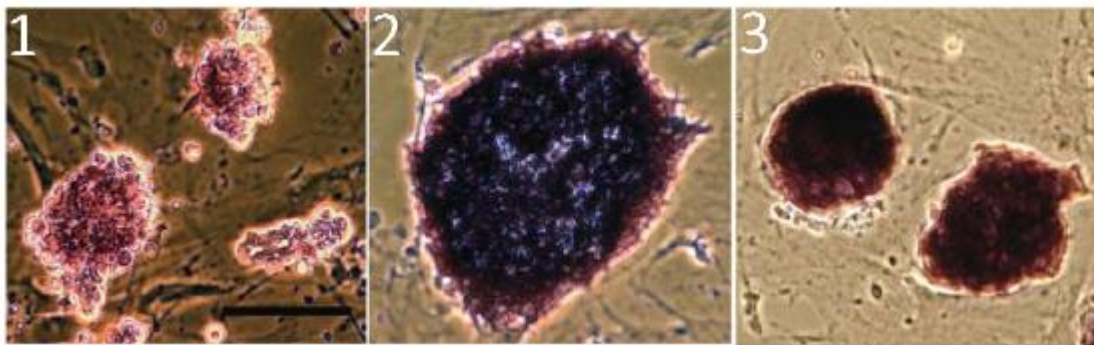
3. Diferenční potenciál spermatogoniálních kmenových buněk

Následující kapitola věnuje pozornost především myším *in vitro* kulturám SSCs, na nichž byly provedeny klíčové experimenty. Zmiňuje i na ně navazující experimenty na lidském modelu, na jejichž případné aplikované využití je kladen velký důraz.

Diferenční potenciál SSCs izolovaných z novorozených jedinců

V roce 2004 došlo na poli výzkumu kmenových buněk k malé revoluci, kdy bylo poprvé publikováno úspěšné dediferencování zárodečných kmenových buněk (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a), čímž tyto buňky nabyly ESC-podobné charakteristiky, tedy znaky pluripotence. Hypotéza uvažující, že se jedná o SSCs byla později potvrzena klonální analýzou (Ko *et al.*, 2009).

Z testikulární tkáně novorozených myší byla připravena kultura podle protokolu k získání dlouhodobě proliferujících SSCs (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003), jež je popsán v předchozí kapitole. Objevovaly se však i kolonie buněk, které nápadně morfologicky připomínaly ESC či kultivované buňky epiblastu. Ty pak postupně přerostly a v průběhu kultivace diferencovaly, pokud ale byly kultivovány v přítomnosti FCS (fetálního telecího séra) a LIF, morfologické znaky si zachovaly. Kvůli absenci GDNF se z kultury naopak vytratily GSCs, neboť bez něj nebyly schopny sebeobnovy (Meng *et al.*, 2000).



Obrázek 4: Alkalickou fosfatázou (AP) barvené kolonie pozorovaných buněk

(1) GSCs jsou slabě pozitivní, (2) ESC-podobné buňky jsou středně pozitivní, (3) ESCs jsou silně pozitivní. (převzato a upraveno podle Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004)

Příprava těchto buněk byla reprodukovatelná u dalších myších kmenů, buňky vykazovaly normální karyotyp. Od GSCs se lišily androgenetickým imprintingem, který prošel částečným smazáním, nicméně ne kompletním jako během fetálního vývoje (Davis *et al.*, 2000). Byla vyloučena přítomnost PGC-podobných buněk ve varlatech a také byla vyloučena případná shoda s EGCs.

Buňky byly testovány na expresi povrchových markerů SSEA-1, charakteristický pro ESCs (Solter a Knowles, 1978), EE2, β_1 - a α_6 -integrin, CD9, marker společný ESCs a GSCs (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004b) a EpCAM, marker ESCs a spermatogonií (Anderson *et al.*, 1999). Slabě pozitivní se buňky jeví při reakci s Forssmanovým antigenem typickým pro ESCs (Evans a Kaufman, 1981) a c-kit. ESC-podobné

buňky byly také silně pozitivně barveny AP (alkalickou fosfatázou) – viz Obrázek 4, jak je známo o ESCs a EGCs (Resnick *et al.*, 1992, Matsui *et al.*, 1992).

Pro ověření diferenciačních schopností byla u buněk indukována diferenciace pomocí několika následujících metod, výtěžnost diferencovaných buněk byla v některých případech větší než u ESCs (Ying *et al.*, 2003).

Kokultivace se stromální buněčnou linií OP9 (Nakano *et al.*, 1994): Během deseti dnů bylo možné pozorovat buňky hematopoetické, vaskulární a spontánně kontrahující myocyty, tzn. mezodermální struktury.

Kultivace v methylcelulóze: V tomto případě byla také vyvolána hematopoéza společně s formováním embryoidních tělísek.

Kultivace na želatině: Formovány byly nervové i gliové buňky, v menší míře dopaminergní neurony.

U ESC-podobných buněk byl proveden subkutánní transplantační test a také transplantace do semenotvorných kanálků. Ke generaci teratomů došlo ve všech případech. Tyto testikulární nádory obsahovaly deriváty tří zárodečných vrstev, dlaždicový epitel, neuroepitel a svalovou tkáň. Po mikroinjikování těchto buněk do blastocyst došlo podle očekávání ke vzniku chimér.

Na základě výše uvedených zjištění se předpokládalo, že v testikulární tkáni novorozenech myši se zachovává druh buněk schopných dosáhnout multipotentního stavu. Buňky byly proto pojmenovány jako mGSCs (multipotentní zárodečné kmenové buňky), aby bylo možné odlišit je od GSCs (zárodečných kmenových buněk) diferencujících pouze do zárodečné linie (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). Nabytím takového stavu buňky ale zároveň ztratily schopnost spermatogeneze, ač byly původem zárodečné. Tento stav multipotence se navíc podařilo navodit pouze u buněk do určitého počtu pasáží.

Diferenciační potenciál SSCs izolovaných z dospělých jedinců

První publikované důkazy o tom, že SSCs dospělých jedinců jsou také schopny transdiferencovat do pluripotentního stavu, byly publikovány v roce 2006 (Guan *et al.*, 2006).

Testikulární buňky izolované z dospělých myši byly kultivovány za přítomnosti GDNF. Užitím metody značení GFP specifického markeru Stra8 proběhla identifikace spermatogonií (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996), GFP-pozitivní buňky byly vytříděny pomocí FACS (fluorescenčně aktivovaného třídění buněk) a jejich identita verifikována transplantačním experimentem, spermatogeneze sterilní myši byla po 5-6 měsících obnovena. Následně byly testovány kultivace v různých podmínkách, vzniklé

buněčné kolonie se v jednom případě podobaly epiblastu, v ostatních pak koloniím ESCs. Kolonie nejlépe expandovaly ve standardních podmínkách pro kultivaci ESCs, tzn. s podpůrnou vrstvou MEF a za přítomnosti LIF.

Buňky byly testovány na expresi povrchového markeru SSEA-1 a transkripčního faktoru Oct4 (Nichols *et al.*, 1998), což je typické pro nediferencované myší ESCs, marker SSEA-3 (stádiově specifický embryonální antigen 3), jehož absence charakterizuje ESCs (Damjanov *et al.*, 1982), c-kit a další rozlišující markery jako Thy1, Sca1, Ter119 a CD34. AP byla silně exprimována.

Na základě těchto testů bylo publikováno, že SSCs v kultivačních podmínkách vhodných pro ESCs získávají vlastnosti podobné právě ESCs. Pro odlišení těchto speciálních buněk od SSCs byly pojmenovány jako maGSCs (multipotentní adultní zárodečné kmenové buňky).

Pomocí RT-PCR (polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí) byla také ověřena exprese dalších transkripčních faktorů typických pro ESCs jako Nanog, Utf1, Esg1 a Rex1.

Technikou visící kapky (hanging drop) byla u maGSCs vyvolána spontánní diferenciací spojená s tvorbou embryoidních tělísek a potvrzená úbytkem GFP-pozitivních buněk a snížením exprese výše uvedených transkripčních faktorů. Pro ověření diferenciací do všech tří zárodečných listů byla testována exprese genů a hladina proteinů charakteristická pro daný list.

Mezoderm: exprese časného markeru brachyury a dalších specifických genů a proteinů srdeční a kosterní svaloviny.

Ektoderm: exprese neuroepiteliálního prekursoru nestin a dalších markerů diferencovaných neuronů, diferenciací dopaminergních neuronů, exprese cytokeratinu 10 přítomného ve vrstevnatých epitelech.

Entoderm: známky diferenciací do hepatocytů a žlučovodných buněk.

Subkutánním injikováním byl u všech recipientů vyvolán vznik teratomů během 6 týdnů. Teratomy obsahovaly deriváty entodermu, ektodermu i mezodermu. Pro ověření vývojového potenciálu byly zmiňované buňky injikovány do 3,5denních blastocyst a transferovány do pseudopregnantních myší. Následně byl detekován chimérismus u narozených mláďat ve velkém množství tkání. Křížením těchto chimér byl dokázán přenos vloh i na další generaci.

Výsledky tedy poukázaly na to, že SSCs by mohly být samy o sobě multipotentními, limitujícím faktorem v jejich přirozeném mikroprostředí by tak mohla být testikulární nika, která by ve varlatech mohla inhibovat tento potenciál.

Následovala řada podobných experimentů, které se ve výsledných pluripotentních vlastnostech získaných buněk částečně odlišovaly (Izadyar *et al.*, 2008, Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008a, Seandel *et al.*, 2007, Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a). Kritický pohled na tyto experimenty byl publikován v roce 2009 (Ko *et al.*, 2009), srovnal jednotlivé experimenty z hlediska užitých metod, stáří použitých testikulárních tkání, úrovně methylace charakteristický promotorů, míry potence získaných buněk, výsledků RT-PCR, reprodukovatelnosti daných experimentů a dalších faktorů; mimo jiné také nedostatků jednotlivých studií. Jak už bylo zmíněno, klonální analýzou bylo dokázáno, že získané pluripotentní/multipotentní buňky pocházejí z unipotentních adultních GSCs, rozumějme SSCs. Oproti GSCs měly tyto buňky schopnost formovat teratomy a nikoliv podílet se na spermatogenezi, v případě experimentů skupiny Guan *et al.* mohlo tedy dojít k testování dvou rozdílných druhů buněk, neboť další testování myši s obnovenou spermatogenezí nebylo již zmiňováno. Také bylo poukázáno na to, že míra androgenetické methylace zjištěná u experimentu skupiny Kanatsu-Shinohara *et al.* (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a) může být v porovnání s ostatními experimenty ovlivněna stářím testikulárních buněk, což lze brát jako výraznou odlišnost mezi neonatálními a dospělými GSCs.

Součástí studie skupiny Ko *et al.* zmíněné o kapitole výše byl rovněž publikován důkaz, že zárodečné kmenové buňky jsou schopny dosáhnout kompletně pluripotentního stavu (Ko *et al.*, 2009).

GSCs byly získány z transgenních myší, ne starších 7 měsíců, s GFP-značeným promotorem Oct4, specifickým markerem GSCs (Kehler *et al.*, 2004). Kolonie těchto buněk byly kultivovány na želatině a poté přeneseny na podpůrnou vrstvu MEF. Pomocí RT-PCR byly testovány na expresi Oct4 a imunohistochemicky na přítomnost charakteristických proteinů. Transplantace těchto buněk do semenotvorných kanálků sterilní myši iniciovala spermatogenezi a obnovila plodnost, i když u jednoho kmene myši s menší efektivitou. Teratomy zde nebyly generovány. Buňky si tuto vlastnost zachovaly i v průběhu delší kultivace. Po zhruba měsíční kultivaci v GSC médiu se na MEF začaly objevovat kolonie silně GFP-pozitivní a morfologicky odlišné od GSCs. Buňky byly trypsinizovány a dále kultivovány v ESC médiu a na podpůrné vrstvě MEF. Je tedy zřejmé, že subpopulace GSCs byla schopna konverze do ESC-podobného stavu.

Tyto buňky byly pojmenovány jako gPSCs (pluripotentní kmenové buňky odvozené od zárodečné linie).

Buňky byly pozitivně testovány na přítomnost AP a SSEA-1. Podobnost ESCs byla potvrzena také na základě RT-PCR a microarray studie, promotory Oct4 a Nanog byly zcela nemethylované. gPSCs si kompletně zachovaly stabilní androgenetickou metylaci charakteristických lokusů shodnou s GSCs, což potvrzuje jejich původ ukazující na GSCs, oproti somaticky methylovaným ESCs.

Pro ověření diferenciace do tří zárodečných vrstev byla formována embryoidní tělíska na želatinou pokrytých kultivačních miskách. Pozorován byl mezodermální marker Flk1 (fetální jaterní kináza 1), nervový marker Tuj1. Anti- α -fetoproteinem byly identifikovány deriváty entodermu.

Subkutánní transplantace generovala u athymických myší ve všech případech vznik teratomů s přítomností derivátů všech tří zárodečných listů. Pomocí GFP byl také detekován chimérismus a křížením byl potvrzen přenos na potomstvo.

Navíc byla provedena funkční analýza gPSCs, kdy byly *in vitro* generovány funkční spontánně kontrahující kardiomyocyty (Igelmund *et al.*, 1999) a nervové a gliové buňky jako astrocyty, oligodendrocyty (Okabe *et al.*, 1996). Získané kardiomyocyty byly schopné synchronizovaných kontrakcí, odpovídaly na hormonální signály autonomního nervového systému. Získané nervové buňky byly zase injikovány do mozků speciálního kmene myší trpících hypomyelinizací, kde byla pozorována myelinizace *in vivo*.

V závěru studie je uvažována také existence tzv. mikronik, které by mohly poskytovat podmínky ke vzniku ESC-podobných kolonií, za předpokladu že jsou vlastnosti okolního mikroprostředí optimální. Podle zjištění se totiž gPSCs formovaly uprostřed kolonií s vysokou expresí Oct4, jež bylo možné pozorovat díky značení pomocí GFP. Hypoteticky tedy k buněčné konverzi docházelo jen tehdy, když bylo GSCs vyseto na kultivační misku méně.

Shrnutím předcházejících tří kapitol je verifikované zjištění, že unipotentní kmenové buňky zárodečné linie přítomné v juvenilních i dospělých varlotech myší jsou schopné se za relativně jednoduše ustavitelných podmínek diferencovat do pluripotentního stavu, tedy do všech tří zárodečných listů, čímž mohou dát za působení různých faktorů vzniknout široké škále tkání, zároveň jsou schopny předat svou genetickou informaci další generaci a to bez generace teratomů.

Navazující experimenty soustředěné na lidské spermatogoniální kmenové buňky

Nelze proto opominout další část navazujících experimentů soustředěných na získání podobných výsledků u člověka, souběžně s experimenty na myším modelu probíhal výzkum diferenciacního potenciálu lidských zárodečných buněk.

V roce 2008 se údajně podařilo připravit lidské adultní pluripotentní kmenové buňky odvozené od zárodečné linie ze spermatogoniálních buněk extrahovaných z varlat dospělého člověka (Conrad *et al.*, 2008). Buňky měly vykazovat mnoho charakteristik shodných s ESCs, generovat teratomy a diferencovat do všech zárodečných listů. V červenci 2014 byla ale publikace odvolána, článek stažen a v době psaní této práce je upravován na základě nových zjištění. Cituji, „*Obrázky prezentované v původní verzi článku zapříčinily, že data působila robustnějším dojmem, než poukazují nově provedené experimenty. Nová data ukazují, že původní závěry nejsou tak robustní, jak byly prezentovány v původním článku (Conrad et al., 2014).*“ Pluripotence těchto buněk byla zpochybněna na základě srovnání genové exprese, výsledky ukázaly podobnost derivátům testikulárních fibroblastů (Ko *et al.*, 2010).

Další studie uvádí, že z testikulárních biopsií byla založena *in vitro* kultura SSCs, ze kterých se podařilo připravit lidské multipotentní zárodečné kmenové buňky (hmGSCs). Ty formovaly embryoidní tělíška obsahující deriváty třech zárodečných linií, vykazovaly normální karyotyp. Byla u nich zaznamenána zvýšená telomerázová aktivita a některé specifické markery pluripotence. Charakteristický lokus H19 byl však hypometylován a generace teratomů byla omezená. Neúplnost pluripotentních znaků byla odůvodněna neúplnou reprogramací původních buněk a poukázala na nutnost zdokonalení protokolů pro vhodnou kultivaci a reprogramaci (Kossack *et al.*, 2009).

Studie publikovaná ve stejném roce předkládala přípravu pluripotentních buněk. Z varlat člověka po mozkové mrtvici byla připravena kultura zárodečných kmenových buněk obsahujících SSCs a/nebo jejich progenitory, navíc ale také somatické buňky, od kterých byly buňky formující ESC-podobné kolonie izolovány až v pozdější části kultivace. Expresí specifických markerů podobajících se svou úrovní ESCs však byla pouze dočasná. Telomerázová aktivita byla zvýšená, karyotyp byl shledán jako normální. Technikou visící kapky byla formována embryoidní tělíška diferencující buněčné deriváty všech tří zárodečných linií. Subkutánní injekcí zkoumaných buněk do nahých myší generovalo pouze malé druhy teratomů. V závěru práce uvažuje nedostatky užití terminologie v rámci již zmiňovaných experimentů, kdy význam pluripotence a multipotence nabývá nekonkrétního dojmu, a dále si klade otázku, zda všechny SSCs mají potenciál být reprogramovány či je to jen schopnost jejich subpopulace (Golestaneh *et al.*, 2009).

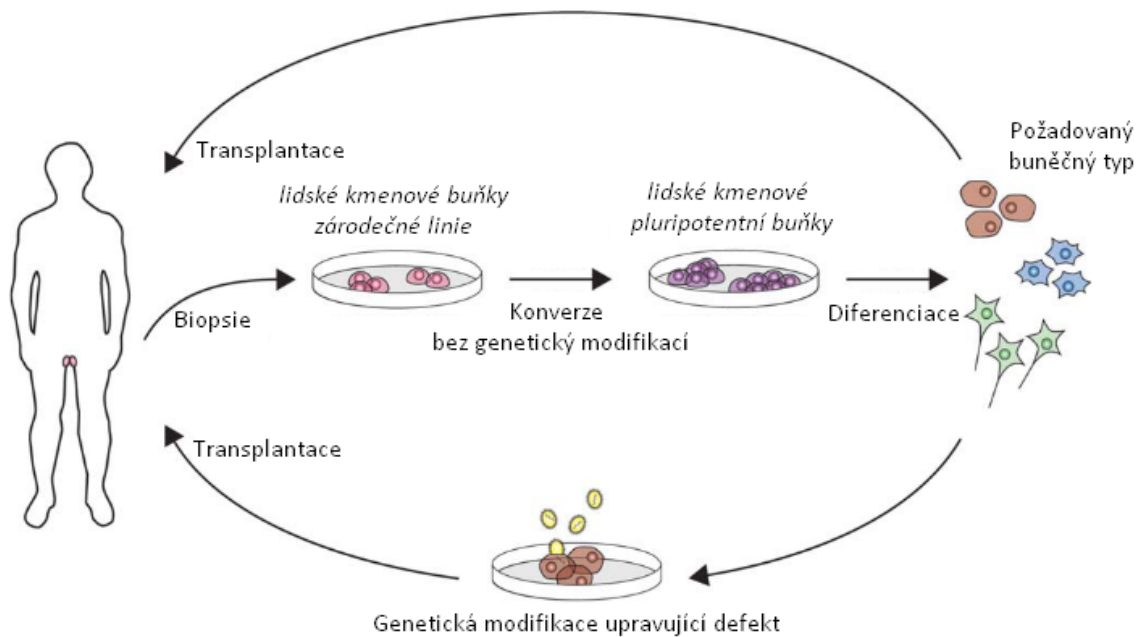
Třetí studie publikovaná v roce 2010 uveřejnila přípravu *in vitro* kultury ESC-podobných buněk. Testikulární tkáň byla získána od čtyř mužů podstupujících bilaterální kastraci spojenou s léčbou rakoviny. Na rozdíl od předchozích tří experimentů byl během přípravy použit protokol užitý k přípravě dlouhotrvající kultury prolifерujících SSCs (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). Přesný původ buněk získaných po kultivaci v ESC podmínkách však nebylo možné určit, protože během experimentu byla použita směs testikulární kmenových buněk obsahující Sertoliho a peritubulární buňky, SSCs byly tedy pouze předpokladem. Získané ESC-podobné buňky exprimovaly markery ESCs a po aplikaci metody visící kapky formovaly *in vitro* embryoidní tělíska obsahující neurální, osteogenní, epiteliální, myogenní buňky, dále adipocyty a funkční pankreatické buňky. Karyotyp byl normální, methylace specifických promotorů byla nižší. Formování extenzivních teratomů u imunodeficientních myšiček však nebylo pozorováno. Získané buňky byly tedy považovány za multipotentní a bylo poukázáno na potřebu bližšího porozumění reprogramačnímu procesu *in vitro* u lidských buněk (Mizrak *et al.*, 2010).

Kritického shrnutí se zmíněné články dočkaly v roce 2011, kdy na základě srovnání všech výsledků byla vyloučena předkládaná pluripotence ve všech případech (shrnuto v Tapia *et al.*, 2011). U žádného z experimentů nebyla metodicky rozlišena izoforma transkripčního faktoru Oct4a, která je specifickým znakem pluripotence, oproti Oct4b přítomné v mnoha tkáních dospělého člověka (shrnuto v Wang a Dai, 2010) nebo pseudogenu Oct4P3. V žádném experimentu také nedošlo k formování plnohodnotných teratomů. Dále byla použita ve všech experimentech kompletní testikulární tkáň pro založení kultury, což vnáší nejasnosti do původu buněk. Je možné, že se jednalo o deriváty testikulárních fibroblastů, nebo o MSCs (mezenchymální kmenové buňky) přítomné v krevním oběhu. Získané ESC-podobné buňky navíc nebylo možné kultivovat delší dobu.

V roce 2013 byl publikován článek o přípravě pluripotentních buněk z dlouhotrvající vysoce purifikované kultury lidských adultních SSCs identifikovaných pomocí SSEA-4 (stádiově specifického embryonálního antigenu 4). Buňky v průběhu kultivace vykazovaly pomalý nárůst exprese vybraných markerů ESCs. Byly schopny formovat embryoidní tělíska obsahující tři zárodečné listy a v omezené míře generovat teratomy. Karyotypicky byly normální. Studie ale byla primárně soustředěná na identifikaci vhodných podmínek pro kultivaci lidských SSCs a postrádá další testování získaných buněk (Lim *et al.*, 2013).

V současnosti se výzkum lidských SSCs zaměřuje směrem vedoucím k nalezení ideálních *in vitro* podmínek a jejich účinné separaci, vypovídá o tom například studie realizovaná na primátních modelech (Langenstroth *et al.*, 2014).

Následující obrázek (Obrázek 5) zjednodušeně nastiňuje potenciální způsob aplikace SSCs v moderní medicíně.



Obrázek 5: Terapeutický potenciál lidských pluripotentních buněk odvozených z varlat.

Lidské zárodečné kmenové buňky mohou být odvozeny od buněk získaných z testikulární biopsie pacienta a konvertovány *in vitro* do lidských pluripotentních kmenových buněk bez jakýchkoliv genetických modifikací. Takové buňky by pak byly diferencovány do požadovaného buněčného typu a transplantovány stejnému pacientovi zpět bez jakýchkoliv imunologických odmítnutí. Pacientům s onemocněním genetického původu by mohl být defekt napraven před samotnou transplantací. (převzato a upraveno z Tapia et al., 2011)

4. Řízená diferenciaci u vyšších obratlovců

Jako řízenou diferenciaci považujeme takovou, která je usměrněna pomocí různých uměle dodaných faktorů k indukci diferenciaci do požadovaného buněčného typu, nebo k otestování možnosti takovým způsobem diferencovat. Tato kapitola zmiňuje experimenty provedené na modelu myši, krysy, kuřete, tura a kozy.

Mezi další experimenty pokračující ve výzkumu potence myších SSCs (Guan *et al.*, 2006) lze zařadit úspěšnou transdiferenciaci do funkčních kardiomyocytů (Guan *et al.*, 2007), funkčních nervových a gliových buněk (Glaser *et al.*, 2008, Streckfuss-Bomeke *et al.*, 2009) a funkčních endoteliálních buněk (Cheng *et al.*, 2012). Zkoumána byla i diferenciaci do zárodečných buněk (Nolte *et al.*, 2010) a renálních buněk (Heer *et al.*, 2013). Endoteliální buňky se podařilo připravit i z gPSCs (Kim *et al.*, 2014).

Výsledkem první zmíněné transdiferenciaci byly funkční myší kardiomyocyty, které by v budoucích aplikacích *in vivo* mohly posloužit k léčbě nekrotický či apoptotických srdečních onemocnění a zabránit tak vzniku srdečních jizev (Guan *et al.*, 2007). Publikovaná studie potvrdila možnost připravit kardiomyocyty *in vitro* a také jejich aplikaci *in vivo*. Získané buňky vykazovaly známky raných stádií vývoje srdeční svaloviny. Při transplantaci nediferencované buňky proliferovaly a diferencovaly do srdeční a hladké svaloviny. Generace tumorů nebyla během měsíce po aplikaci zjištěna. U maGSCs byla metodou visící kapky vyvolána diferenciaci v IMDM (Iscoveho modifikovaném Dulbeccově médiu) obsahujícím FCS, L-glutamin, neesenciální aminokyseliny, α -monothioglycerol a 3-mercapto-1,2-propandiol. Po 2-3 dnech byla embryoidní tělíska umístěna na želatinou pokryté kultivační misky a další 2 dny kultivována. Po celkově pětidenní kultivaci obsahovaly embryoidní tělíska bijící kardiomyocyty v různých stádiích vývoje. Ty byly schopné reagovat na vnější podněty změnou frekvence kontrakcí, měly funkční buněčné spoje. Výsledky byly tedy srovnatelné s výsledky získanými při diferenciaci ESCs. Nepodařilo se ovšem buňky diferencovat *in vivo* do funkčních kardiomyocytů jako za podmínek *in vitro*.

Studie skupiny Glaser *et al.* poukázala na skutečnost, že maGSCs lze využít k přípravě nervových a gliových prekurzorů i k přípravě stabilní kultury NSCs (nervových kmenových buněk). Během diferenciaci tyto nervové buňky prokazatelně maturovaly do nejrůznějších typů neuronů a je pravděpodobné, že v závislosti na složení diferenciacního média by bylo možné usměrnit tuto diferenciaci do požadovaného typu. Podařilo se také připravit gliové deriváty oligodendrocytální a astrocytální linie aplikovatelné pro myelinizaci *in vivo* v myelin-deficientním kmeni myši. Diferenciaci nervových prekurzorů byla spontánně vyvolána během tvorby embryoidních tělísek na želatinou pokrytých kultivačních miskách, embryoidní tělíska byla po osmidenní diferenciaci umístěna do DMEM

(Dulbeccova modifikovaného Eagle média) média s inzulinem, lidským apo-transferrinem, selenidem sodným a fibronectinem. Po pěti dnech byla ještě přenesena na kultivační misky pokryté polyornithinem, kde byl navíc přítomen progesteron, putrescin a FGF2. Nejeftivnější byla generace neuronových prekurzorů za přítomnosti nogginu. Do gliové linie buňky diferencovaly, pokud byly kultivovány s FGF2 a EGF, poté 4 dny s FGF2 a PDGF (růstový faktor odvozený od krevních destiček). Terminální diferenciaci bylo dosaženo přidáním 3,3,5-trijodo-thyroninu a vitamínu C. Následným odebráním růstových faktorů na 4 dny došlo k rozdiferencování dalších subtypů jednotlivých buněk (Glaser *et al.*, 2008).

K podobným výsledkům dospěla i druhá skupina diferencující maGSCs řízeně do nervové linie. maGSCs byly nejprve kultivovány na podpůrné vrstvě MEF v přítomnosti média standardního pro ESC. Pro indukci diferenciaci byla vrstva MEF odstraněna a buňky umístěny do NSC média s bFGF a EGF. Vzniklé buněčné agregáty byly umístěny na želatinu na 10-18 dní. Během této doby část buněk změnila svou morfologii a začaly se podobat nervovým progenitorům. Diferenciaci funkčních neuronů pak byla vyvolána umístěním do N2B27-I média s bFGF, FGF8b (fibroblastový růstový faktor 8b) a shh (sonic hedgehog). Poslední dvě složky měly usměrnit diferenciaci směrem k dopaminergním a serotoninergním neuronům (Ye *et al.*, 1998). Po jednodenní kultivaci, byly tyto faktory odebrány k docílení maturace diferencovaných neuronů. Bylo tak prokázáno, že přidáním specifických růstových faktorů lze konkrétně zacílit k diferenciaci určitého buněčného typu (Streckfuss-Bomeke *et al.*, 2009).

Studie zaměřené na generaci endoteliálních buněk by mohla v medicínských aplikacích přispět k léčbě ischemie, trombózy, aterosklerózy nebo také cévních poranění (Cheng *et al.*, 2012). Kokultivací maGSCs se stromální kulturou OP9 se podařilo připravit kardiovaskulární progenitory, Flk-pozitivní buňky. Tyto buňky kultivované na kolagenu IV za přítomnosti VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) exprimovaly pokročilejší endoteliální markery. Byly schopné také formovat síťovité struktury. Získané Flk-pozitivní buňky bylo možné delší dobu kultivovat při zachování kontaktní inhibice. maGSCs byly nejprve kultivovány v IMDM obsahujícím FCS a monothioglycerol. Po pětidenní kultivaci byly přeneseny na kolagen IV a Flk-pozitivní buňky vyizolovány pomocí FACS a značením protilátkami. Byly testovány i další buněčné podklady, na kolagenu IV ale prosperovaly nejvíce. Diferenciaci byla indukována na kolagenu IV v EGM-2 (endoteliálním růstovém médiu 2) obsahujícím VEGF.

Další studie zaměřená na buňky endotelu vycházela z protokolu přípravy gPSCs. Podařilo se tak připravit tubulární struktury podobné cévám (Kim *et al.*, 2014). Myší gPSCs byly kokultivovány se stromální kulturou OP9 za přítomnosti VEGF-A (vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A), během 43 dnů byly zformovány charakteristické kolonie buněk podobných endoteliálním buňkám. Ty byly následně vysety na želatinu, či kolagen IV, kde vytvářely specifickou dlouhodobě přetrvávající

jednovrstevnou strukturu. Pro indukci formování cévám podobných útvarů byly buňky přeneseny na matrigel za přítomnosti VEGF a byl jim dodán acetylovaný LDL lipoprotein (Glaser *et al.*, 2008).

Publikace z roku 2010 ukazuje, že maGSCs bylo možné diferencovat zpětně i do zárodečných buněk, resp. samčích haploidních buněk. Aplikovat tyto postupy by bylo možné kupříkladu ve šlechtitelství nebo léčbě neplodnosti. Zkoumané buňky byly transfekovány dvěma konstrukty pro identifikaci stádia jejich diferenciaci, premeiotickým pomocí Stra8-EGFP a postmeiotickým pomocí Prm1-DsRed. Indukce diferenciaci byla v tomto případě vyvolána kyselinou retinovou. Získané haploidní buňky po mikroinjikování do oocytů vytvářely 2- a 4-buněčná zygotní stádia, po transplantaci do pseudopregnantních myší byl však buněčný původ prokázán pouze u nepatrného počtu nově narozených myší (Nolte *et al.*, 2010).

Realizována byla také studie potvrzující schopnost diferenciaci myších SSCs do progenitorů renálních tkání. Kondicionané médium z lidských ledvinných fibroblastů indukovalo u SSCs expresi endoteliálních a epiteliálních buněčných linií spojených s nefrogenezí. Získané buňky značené pomocí GFP v kultuře *ex vivo* byly schopny funkčního včlenění do vyvíjející se tkáně získané z myších embryí, histologicky pak byl prokázán podíl na tvorbě raných nefronů (Heer *et al.*, 2013).

Na krysím modelu byl rovněž realizován experiment dokazující schopnost neurální diferenciaci SSCs. Ty byly odlišeny na základě přítomnosti α_6 -integrinu pomocí MACS (magneticky aktivovaného buněčného třídění) a kultivovány na podpůrné vrstvě MEF a za přítomnosti LIF. Pluripotentní buňky byly identifikovány na základě barvení AP a exprese markerů nediferencovaných buněk. Vybrané buňky byly dále rozdiferencovány indukčním DMEM médiem obsahujícím EGF, bFGF, B27, N2 suplement a transretinovou kyselinu během 8 dnů. Imunohistochemicky byla potvrzena přítomnost dopaminergních nervových markerů. Po injekci *in vivo* byly tyto buňky detekovatelné čtyři týdny a jevíly známky morfologických změn a migrace. Patrné byly i behaviorální změny krys, u kterých byla před aplikací navozena neurodegenerace simulující Parkinsonovu chorobu (Liu *et al.*, 2012).

V roce 2010 byly provedeny experimenty u kuřat, jakožto významného modelového organismu vývojové biologie, ověřující schopnost řízeně diferencovat (Li *et al.*, 2010) v návaznosti na podobné experimenty u savců. SSCs byly izolovány z varlat 18-20denních kuřecích embryí a vysety na podpůrnou vrstvu kuřecích embryonálních fibroblastů. Po dvoutýdenní kultivaci byla identita SSCs ověřena pomocí pozitivního barvení AP a imunohistochemicky na přítomnost SSEA-1. Buňky byly dále kultivovány

v DMEM médiu, tři typy řízené diference *in vitro* byly vyvolány pomocí následujících faktorů a buněčné deriváty následně ověřeny barvením, imunohistochemicky nebo pomocí RT-PCR.

Diference do osteoblastů: Indukce byla vyvolána dexamethasonem, β -sodnou solí glycerolfosfátu a vitamínem C. Po 15, resp. 21 dnech diferencovalo úspěšně 75 – 80 % buněk.

Diference do neuronu podobných buněk: Indukci vyvolala kyselina retinová a 3-isobutyl-1-methylxanthin. Po 3, resp. 7 dnech diferencovalo úspěšně 78 – 85 % buněk.

Diference do adipocytů: Indukčními faktory byly dexamethason, inzulin a 3-isobutyl-1-methylxanthin. Po 7 dnech úspěšně diferencovalo 85 % buněk (Li *et al.*, 2010).

Diferenční potenciál SSCs byl testován i u tura domácího (Qasemi-Panahi *et al.*, 2011). Testikulární zárodečné buňky izolované ze čtyřměsíčních telat byly 7 dní kokultivovány se Sertoliho buňkami v DMEM médiu. Sertoliho buňky byly v tomto případě použity i jako podpůrná vrstva. SSCs formující kolonie byly odlišeny na základě značení protilátkami k Oct4-pozitivním buňkám. K indukci diference bylo užito DMEM médium bohaté na glukózu, dále obsahující FBS (fetální bovinní sérum), běžná antibiotika, askorbát-2-fosfát, β -glycerolfosfát a dexamethason. Po 21 dnech bylo možné barvením alizarinovou červení pozorovat mineralizaci (Sila-Asna *et al.*, 2007) prokazující diference do osteoblastů.

Zvláštním případem je recentně immortalizovaná kultura kozy (Zhu *et al.*, 2014). Kozí mSSCs byly izolovány z dospělých jedinců a kultivovány v DMEM médiu za přítomnosti FBS. Immortalizovány byly pomocí SV40 T antigenu a Bmi1 genů, což více než třikrát posílilo jejich proliferační schopnosti. Získané buňky exprimovaly markery SSCs i markery pluripotence. Spontánně diferencovaná embryonická tělíska na želatině jevila známky diference do osteoblastů, chondrocytů, neuronům podobných buněk a adipocytů. Řízeně pak byla potvrzena diference do mezodermu, endodermu, ektodermu i zárodečné linie. Podobně diferencovaly buňky i *in vivo* po xenotransplantaci do kuřecích embryí. V semenotvorných kanálcích navíc neprodukovaly teratomy, jak bylo očekáváno, ale včlenily se do poškozené tkáně.

Závěr

Závěrem celé práce lze říci, že spermatogoniální kmenové buňky disponují potenciálem, který zasluhuje dalšího výzkumu. Jejich optimální kultivací lze získat zdroj pluripotentních buněk a to bez zásahů do buněčného genomu jako v případě indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

Pokud by se podařilo dosáhnout podobných výsledků u člověka jako na myším modelu, znamenalo by to významný posun ve vědě i medicíně vedoucí například k řešení imunologických rejekcí transplantovaných orgánů nebo alternativním zdrojům pluripotentních buněk; na užívání lidských embryonálních buněk ve výzkumu se nahlíží v mnoha směrech kontroverzně. Pokrok by byl zaznamenán také na poli tkáňového inženýrství, v regenerativní medicíně či šlechtitelství a dalších odvětvích biologických věd.

Současný trend ukazuje, že v nejbližších letech bude klíčové najít další molekulární markery sloužící ke spolehlivější identifikaci spermatogoniálních kmenových buněk a především pak vhodné *in vitro* podmínky pro jejich kultivaci a to individuálně pro každý zkoumaný živočišný druh. Můžeme pozorovat, že aplikace metod užitých u hlodavců nepřináší stejné výsledky jako u větších hospodářských zvířat a u člověka. Následně bude důležité správně porozumět jednotlivým způsobům regulace mechanismů ovlivňujících diferenciaci v jednotlivé buněčné typy a zacílit je vhodně tam, kam bude zapotřebí.

Na základě dosud realizovaných experimentů se mi nepodařilo najít tendence spontánní diferenciaci *in vitro*, které by spermatogoniální kmenové buňky upřednostňovaly. Výsledky všech zmiňovaných experimentů vypovídají pouze o diferenciaci do všech tří zárodečných vrstev, tedy entodermu, mezodermu a ektodermu. Je třeba také říci, že dosavadní poznatky získané pomocí řízených diferenciací naznačují skutečnost, že zacílit diferenciaci na konkrétní buněčný typ se nezdá být tak obtížné, jako pochopit mechanismy, na základě kterých tyto buňky fungují.

Seznam zkratek

AP	alkaline phosphatase	alkalická fosfatáza
bFGF / FGF2	basic fibroblast growth factor	základní fibroblastový růstový faktor
BMP4	bone morphogenetic protein 4	kostní morfogenetický protein 4
CD146	cluster of differentiation 146	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbeccovo modifikované Eagle medium
dpc	day post coitum	den post coitum
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFP	enhanced GFP	zesílený GFP
EGM-2	endothelial cell growth medium-2	endoteliálním růstovém médiu 2
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	
ESRRB	estrogen-related receptor beta	
FACS	fluorescence-activated cell sorting	fluorescenčně aktivované třídění buněk
FBS / FCS	fetal bovine / calf serum	fetální bovinní / telecí sérum
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
FGF8b	fibroblast growth factor 8b	fibroblastový růstový faktor 8b
Flk1	fetal liver kinase 1	fetální jaterní kináza 1
GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor	neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk
GFP	green fluorescence protein	zelený fluorescenční protein
GFR α -1	GDNF receptor α -1	α -1 receptor rodiny GDNF
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Iscoveho modifikované Dulbeccovo médium
Klf4	kruppel-like factor 4	
LIF	leukemia inhibitory factor	leukemický inhibiční faktor
MACS	magnetic-activated cell sorting	magneticky aktivované buněčné třídění
MEF	mouse embryonic fibroblasts	myší embryonální fibroblasty
Oct3 / Oct4	octamer-binding transcription factor 4	
PDGF	platelet-derived growth factor	růstový faktor odvozený od krevních destiček
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SF / SCF	steel factor	steel faktor
Shh	sonic hedgehog	
Sox2	sex determining region Y	
SSEA-1 / SSEA-3 / SSEA-4	stage specific embryonic antigen 1 / 3 / 4	stádiově specifický antigen 1/ 3 /4
Thy1 / CD90	cluster of differentiation 90	
Utf1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A	vaskulární endoteliální růstový faktor A

Seznam literatury

* – sekundární zdroj citací

- ANDERSON, R., SCHAIBLE, K., HEASMAN, J. a WYLIE, C. 1999. Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil*, 116, 379-84.
- BRONS, I. G., SMITHERS, L. E., TROTTER, M. W., RUGG-GUNN, P., SUN, B., CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M., HOWLETT, S. K., CLARKSON, A., AHLUND-RICHTER, L., PEDERSEN, R. A. a VALLIER, L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448, 191-5.
- CONRAD, S., RENNINGER, M., HENNENLOTTER, J., WIESNER, T., JUST, L., BONIN, M., AICHER, W., BUHRING, H. J., MATTHEUS, U., MACK, A., WAGNER, H. J., MINGER, S., MATZKIES, M., REPEL, M., HESCHELER, J., SIEVERT, K. D., STENZL, A. a SKUTELLA, T. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, 456, 344-9.
- CONRAD, S., RENNINGER, M., HENNENLOTTER, J., WIESNER, T., JUST, L., BONIN, M., AICHER, W., BUHRING, H. J., MATTHEUS, U., MACK, A., WAGNER, H. J., MINGER, S., MATZKIES, M., REPEL, M., HESCHELER, J., SIEVERT, K. D., STENZL, A. a SKUTELLA, T. 2014. Retraction: Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*.
- DAMJANOV, I., FOX, N., KNOWLES, B. B., SOLTER, D., LANGE, P. H. a FRALEY, E. E. 1982. Immunohistochemical localization of murine stage-specific embryonic antigens in human testicular germ cell tumors. *Am J Pathol*, 108, 225-30.
- DAVIS, T. L., YANG, G. J., MCCARREY, J. R. a BARTOLOMEI, M. S. 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet*, 9, 2885-94.
- DE ROOIJ, D. G. a RUSSELL, L. D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, 21, 776-798.
- DONOVAN, P. J. 1998. The germ cell-the mother of all stem cells. *Int J Dev Biol*, 42, 1043-50.
- EVANS, M. J. a KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- GLASER, T., OPITZ, T., KISCHLAT, T., KONANG, R., SASSE, P., FLEISCHMANN, B. K., ENGEL, W., NAYERNIA, K. a BRUSTLE, O. 2008. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells*, 26, 2434-43.
- GOLESTANEH, N., KOKKINAKI, M., PANT, D., JIANG, J., DESTEFANO, D., FERNANDEZ-BUENO, C., RONE, J. D., HADDAD, B. R., GALLICANO, G. I. a DYM, M. 2009. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev*, 18, 1115-26.
- GORDEEVA, O. F. a NIKONOVA, T. M. 2013. Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice. *Cell Transplant*, 22, 1901-14.
- GUAN, K., NAYERNIA, K., MAIER, L. S., WAGNER, S., DRESSEL, R., JAE, H. L., NOLTE, J., WOLF, F., LI, M., ENGEL, W. a HASENFUSS, G. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440, 1199-1203.
- GUAN, K., WAGNER, S., UNSÖLD, B., MAIER, L. S., KAISER, D., HEMMERLEIN, B., NAYERNIA, K., ENGEL, W. a HASENFUSS, G. 2007. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circulation Research*, 100, 1615-1625.
- HAN, S. Y., GUPTA, M. K., UHM, S. J. a LEE, H. T. 2009. Isolation and in vitro culture of pig spermatogonial stem cell. *Asian-Aust J Anim Sci*, 22, 187-193.
- *HANNA, J. H., SAHA, K. a JAENISCH, R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143, 508-525.
- HEER, R., HEPBURN, A. C., WILLIAMSON, S. C., KENNEDY, A., EL-SHERIF, A., SOOMRO, N. A., BROWN, C. D. a ROBSON, C. N. 2013. Renal differentiation from adult spermatogonial stem cells. *Ren Fail*, 35, 1387-91.

- CHENG, I. F., KAISER, D., HUEBSCHER, D., HASENFUSS, G., GUAN, K. a SCHAFER, K. 2012. Differentiation of multipotent adult germline stem cells derived from mouse testis into functional endothelial cells. *J Vasc Res*, 49, 207-20.
- CHOI, N. Y., PARK, Y. S., RYU, J. S., LEE, H. J., ARAUZO-BRAVO, M. J., KO, K., HAN, D. W., SCHOLER, H. R. a KO, K. 2014. A novel feeder-free culture system for expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Mol Cells*, 37, 473-9.
- *CHUMA, S., KANATSU-SHINOHARA, M., INOUE, K., OGONUKI, N., MIKI, H., TOYOKUNI, S., HOSOKAWA, M., NAKATSUJI, N., OGURA, A. a SHINOHARA, T. 2005. Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development*, 132, 117-22.
- IGELMUND, P., FLEISCHMANN, B. K., FISCHER, I. R., SOEST, J., GRYSHCENKO, O., BÖHM-PINGER, M. M., SAUER, H., LIU, Q. a HESCHELER, J. 1999. Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture. *Pflügers Archiv*, 437, 669-679.
- ICHIDA, J. K., BLANCHARD, J., LAM, K., SON, E. Y., CHUNG, J. E., EGLI, D., LOH, K. M., CARTER, A. C., DI GIORGIO, F. P., KOSZKA, K., HUANGFU, D., AKUTSU, H., LIU, D. R., RUBIN, L. L. a EGGAN, K. 2009. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*, 5, 491-503.
- ITSKOVITZ-ELDOR, J., SCHULDINER, M., KARSENTI, D., EDEN, A., YANUKA, O., AMIT, M., SOREQ, H. a BENVENISTY, N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, 6, 88-95.
- IZADYAR, F., PAU, F., MARH, J., SLEPKO, N., WANG, T., GONZALEZ, R., RAMOS, T., HOWERTON, K., SAYRE, C. a SILVA, F. 2008. Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. *Reproduction*, 135, 771-84.
- JONES, D. a FULLER, M. T. 2009. Stem Cell Niches. *Essentials of Stem Cell Biology*.
- KADAM, P. H., KALA, S., AGRAWAL, H., SINGH, K. P., SINGH, M. K., CHAUHAN, M. S., PALTA, P., SINGLA, S. K. a MANIK, R. S. 2013. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor, fibroblast growth factor 2 and epidermal growth factor on proliferation and the expression of some genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 1149-1157.
- KANATSU-SHINOHARA, M., INOUE, K., LEE, J., YOSHIMOTO, M., OGONUKI, N., MIKI, H., BABA, S., KATO, T., KAZUKI, Y., TOYOKUNI, S., TOYOSHIMA, M., NIWA, O., OSHIMURA, M., HEIKE, T., NAKAHATA, T., ISHINO, F., OGURA, A. a SHINOHARA, T. 2004a. 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. a SHINOHARA, T. 2008a. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod*, 78, 681-7.
- KANATSU-SHINOHARA, M., MUNETO, T., LEE, J., TAKENAKA, M., CHUMA, S., NAKATSUJI, N., HORIUCHI, T. a SHINOHARA, T. 2008b. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod*, 78, 611-7.
- KANATSU-SHINOHARA, M., OGONUKI, N., INOUE, K., MIKI, H., OGURA, A., TOYOKUNI, S. a SHINOHARA, T. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 69, 612-6.
- *KANATSU-SHINOHARA, M. a SHINOHARA, T. 2013. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29, 163-87.
- KANATSU-SHINOHARA, M., TOYOKUNI, S. a SHINOHARA, T. 2004b. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod*, 70, 70-5.
- KEHLER, J., TOLKUNOVA, E., KOSCHORZ, B., PESCE, M., GENTILE, L., BOIANI, M., LOMELI, H., NAGY, A., MCLAUGHLIN, K. J., SCHOLER, H. R. a TOMILIN, A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*, 5, 1078-83.

- KIM, J., ELIGEHAUSEN, S., STEHLING, M., NIKOL, S., KO, K., WALTENBERGER, J. a KLOCKE, R. 2014. Generation of functional endothelial-like cells from adult mouse germline-derived pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 443, 700-5.
- KO, K., ARAUZO-BRAVO, M. J., TAPIA, N., KIM, J., LIN, Q., BERNEMANN, C., HAN, D. W., GENTILE, L., REINHARDT, P., GREBER, B., SCHNEIDER, R. K., KLIESCH, S., ZENKE, M. a SCHOLER, H. R. 2010. Human adult germline stem cells in question. *Nature*, 465, E1; discussion E3.
- KO, K., TAPIA, N., WU, G., KIM, J. B., BRAVO, M. J., SASSE, P., GLASER, T., RUAU, D., HAN, D. W., GREBER, B., HAUSDORFER, K., SEBASTIANO, V., STEHLING, M., FLEISCHMANN, B. K., BRUSTLE, O., ZENKE, M. a SCHOLER, H. R. 2009. Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell*, 5, 87-96.
- KOSHIMIZU, U., NISHIOKA, H., WATANABE, D., DOHMAE, K. a NISHIMUNE, Y. 1995. Characterization of a novel spermatogenic cell antigen specific for early stages of germ cells in mouse testis. *Mol Reprod Dev*, 40, 221-7.
- KOSSACK, N., MENESES, J., SHEFI, S., NGUYEN, H. N., CHAVEZ, S., NICHOLAS, C., GROMOLL, J., TUREK, P. J. a REIJO-PERA, R. A. 2009. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*, 27, 138-49.
- KUBOTA, H., AVARBOCK, M. R. a BRINSTER, R. L. 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16489-94.
- KUBOTA, H., WU, X., GOODYEAR, S. M., AVARBOCK, M. R. a BRINSTER, R. L. 2011. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J*, 25, 2604-14.
- LANGENSTROTH, D., KOSSACK, N., WESTERNSTROER, B., WISTUBA, J., BEHR, R., GROMOLL, J. a SCHLATT, S. 2014. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. *Hum Reprod*, 29, 2018-31.
- LI, B., WANG, X. Y., TIAN, Z., XIAO, X. J., XU, Q., WEI, C. X., FY, SUN, H. C. a CHEN, G. H. 2010. Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells in vitro. *Cytotherapy*, 12, 326-331.
- LIM, J. J., KIM, H. J., KIM, K. S., HONG, J. Y. a LEE, D. R. 2013. In vitro culture-induced pluripotency of human spermatogonial stem cells. *Biomed Res Int*, 2013, 143028.
- LIU, T., GONG, Z., HOU, L. a HUANG, Y. 2012. The induction of rat spermatogonial stem cells into neuronal-like cells and behavioral recovery following transplantation in a rat Parkinson's disease model. *Int J Mol Med*, 29, 239-44.
- MATSUI, Y., ZSEBO, K. a HOGAN, B. L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 841-7.
- MEISSNER, A., MIKKELSEN, T. S., GU, H., WERNIG, M., HANNA, J., SIVACHENKO, A., ZHANG, X., BERNSTEIN, B. E., NUSBAUM, C., JAFFE, D. B., GNIRKE, A., JAENISCH, R. a LANDER, E. S. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454, 766-70.
- MENG, X., LINDAHL, M., HYVONEN, M. E., PARVINEN, M., DE ROOIJ, D. G., HESS, M. W., RAATIKAINEN-AHOKAS, A., SAINIO, K., RAUVALA, H., LAKSO, M., PICHEL, J. G., WESTPHAL, H., SAARMA, M. a SARIOLA, H. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287, 1489-93.
- 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 REIJK, T. M., DE LA ROSETTE, J. J., KNEGT, A. C., BELMONTE, J. C., VAN DER VEEN, F., DE ROOIJ, D. G., REPPING, S. a VAN PELT, A. M. 2010. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod*, 25, 158-67.
- NAKANO, T., KODAMA, H. a HONJO, T. 1994. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, 265, 1098-101.
- NASIRI, Z., HOSSEINI, S. M., HAJIAN, M., ABEDI, P., BAHADORANI, M., BAHARVAND, H. a NASR-ESFAHANI, M. H. 2012. Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells in-vitro. *Theriogenology*, 77, 1519-28.
- NICHOLS, J. a SMITH, A. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4, 487-92.

- NICHOLS, J., ZEVIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWE-NEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SCHOLER, H. a SMITH, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-91.
- NOLTE, J., MICHELMANN, H. W., WOLF, M., WULF, G., NAYERNIA, K., MEINHARDT, A., ZECHNER, U. a ENGEL, W. 2010. PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. *Differentiation*, 80, 184-94.
- OATLEY, J. M., OATLEY, M. J., AVARBOCK, M. R., TOBIAS, J. W. a BRINSTER, R. L. 2009. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, 136, 1191-9.
- OKABE, S., FORSBERG-NILSSON, K., SPIRO, A. C., SEGAL, M. a MCKAY, R. D. G. 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*, 59, 89-102.
- OULAD-ABDELGHANI, M., BOUILLET, P., DECIMO, D., GANSMULLER, A., HEYBERGER, S., DOLLE, P., BRONNER, S., LUTZ, Y. a CHAMBON, P. 1996. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*, 135, 469-77.
- QASEMI-PANAHI, B., TAJIK, P., MOVAHEDIN, M., MOGHADDAM, G., BARZGAR, Y. a HEIDARI-VALA, H. 2011. Differentiation of bovine spermatogonial stem cells into osteoblasts. *Avicenna J Med Biotechnol*, 3, 149-53.
- RESNICK, J. L., BIXLER, L. S., CHENG, L. a DONOVAN, P. J. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359, 550-1.
- ROSSI, P., SETTE, C., DOLCI, S. a GEREMIA, R. 2000. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest*, 23, 609-15.
- RYU, B. Y., KUBOTA, H., AVARBOCK, M. R. a BRINSTER, R. L. 2005. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14302-7.
- SEANDEL, M., JAMES, D., SHMELKOV, S. V., FALCIATORI, I., KIM, J., CHAVALA, S., SCHERR, D. S., ZHANG, F., TORRES, R., GALE, N. W., YANCOPOULOS, G. D., MURPHY, A., VALENZUELA, D. M., HOBBS, R. M., PANDOLFI, P. P. a RAFII, S. 2007. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*, 449, 346-50.
- SILA-ASNA, M., BUNYARATVEJ, A., MAEDA, S., KITAGUCHI, H. a BUNYARATAVEJ, N. 2007. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci*, 53, 25-35.
- SOLTER, D. a KNOWLES, B. B. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5565-9.
- STRECKFUSS-BOMEKE, K., VLASOV, A., HULSMANN, S., YIN, D., NAYERNIA, K., ENGEL, W., HASENFUSS, G. a GUAN, K. 2009. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res*, 2, 139-54.
- TAKAHASHI, K. a YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- *TAPIA, N., ARAÚZO-BRAVO, M. J., KO, K. a SCHÖLER, H. R. 2011. Concise review: Challenging the pluripotency of human testis-derived ESC-like cells. *STEM CELLS*, 29, 1165-1169.
- *TAVERNIER, G., MLODY, B., DEMEESTER, J., ADJAYE, J. a DE SMEDT, S. C. 2013. Current methods for inducing pluripotency in somatic cells. *Advanced Materials*, 25, 2765-2771.
- TESAR, P. J., CHENOWETH, J. G., BROOK, F. A., DAVIES, T. J., EVANS, E. P., MACK, D. L., GARDNER, R. L. a MCKAY, R. D. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 196-9.
- TIPTANAVATTANA, N., THONGKITTIDILOK, C., TECHAKUMPHU, M. a THARASANIT, T. 2013. Characterization and in vitro culture of putative spermatogonial stem cells derived from feline testicular tissue. *J Reprod Dev*, 59, 189-95.
- *WANG, X. a DAI, J. 2010. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*, 28, 885-93.

- WU, Z., LUBY-PHELPS, K., BUGDE, A., MOLYNEUX, L. A., DENARD, B., LI, W. H., SÜEL, G. M. a GARBERS, D. L. 2009. Capacity for stochastic self-renewal and differentiation in mammalian spermatogonial stem cells. *Journal of Cell Biology*, 187, 513-524.
- YE, W., SHIMAMURA, K., RUBENSTEIN, J. L., HYNES, M. A. a ROSENTHAL, A. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93, 755-66.
- YING, Q. L., STAVRIDIS, M., GRIFFITHS, D., LI, M. a SMITH, A. 2003. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 21, 183-6.
- YING, Q. L., WRAY, J., NICHOLS, J., BATLLE-MORERA, L., DOBLE, B., WOODGETT, J., COHEN, P. a SMITH, A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453, 519-23.
- YOSHIDA, S., SUKENO, M. a NABESHIMA, Y. 2007. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 317, 1722-6.
- YU, J. 2013. Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. *Translational Cancer Research*, 2, 384-396.
- ZHENG, Y., ZHANG, Y., QU, R., HE, Y., TIAN, X. a ZENG, W. 2014. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 147, R65-74.
- ZHU, H., MA, J., DU, R., ZHENG, L., WU, J., SONG, W., NIU, Z., HE, X., DU, E., ZHAO, S. a HUA, J. 2014. Characterization of immortalized dairy goat male germline stem cells (mGSCs). *J Cell Biochem*, 115, 1549-60.