

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra vývojové biologie a fyziologie živočichů

Retrovirová infekce kuřecích testikulárních buněk v procesu tvorby
transgenní drůbeže.

(Disertační práce)

Jiří Kalina

Vedoucí disertační práce:

RNDr. Jiří Škvor, CSc.

Odborný konzultant:

Ing. Pavel Trefil, DrSc.

Vypracováno v BIOPHARM, Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních
léčiv, a.s.,

Úsek výzkumu a vývoje

Pohoří – Chotouň

254 49, Jílové u Prahy

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto práci, ani její významnou část, nepředložil
k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, 20. května 2008

Jiří Kalina

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří přispěli k realizaci této disertační práce. Zejména pak RNDr. Jiřímu Škvorovi, CSc., Ing. Pavlu Trefilovi, DrSc., a RNDr. Jiřímu Hejnarovi, CSc., pracovníkům BIOPHARM, Výzkumného ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv, a.s., oddělení výzkumu a vývoje, a pracovníkům oddělení buněčné virologie Ústavu molekulární genetiky Akademie věd, Praha

Abstrakt

Biotechnologický výzkum v oblasti transgenní drůbeže není díky velmi specifickému rozmnožování ptáků zdaleka tak úspěšný jako u savců. Předkládaná práce se pokouší nabídnout komplexní přístup řešení jedné z možných technik tvorby transgenní drůbeže. V průběhu práce byla ověřena možnost použití obvyklých transfekčních technik na kulturách blastodermálních a testikulárních buněk. Byla propracována původní funkční technika sterilizace kohoutích varlat a obnovení spermatogeneze transplantací testikulárních buněk kohouta dárce. Značené transplantované buňky rekolonizovaly prázdné tubuly sterilních varlat a obnovily spermatogenezi. Byl vytvořen retrovirový konstrukt s markerovým transgenem pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), kterým byly infikovány transplantované testikulární buňky. Po obnovení spermatogeneze byl v DNA spermií detekován markerový transgen, přičemž u infikovaných buněk nebyla zjištěna signifikantní metylace integrované DNA. Metodou průtokové buněčné cytometrie byla analyzována směs testikulárních buněk a byly popsány a identifikovány populace testikulárních buněk, včetně tzv. side population buněk (SP), možné skupiny kmenových spermatogoniálních buněk.

Abstract

Biotechnological research in chicken transgenesis is still lagging beyond the mammals mainly due to the specificities of avian reproductive system. This thesis is trying to offer functionally complex approach to the chicken transgenesis through one of the techniques. Common transfection techniques were applied on chicken blastodermal and testicular cells to affirm this approach. Our original technique of sterilization of chicken testes was improved and applied. Stained testicular cells of donor male were transplanted into sterilized acceptors testes and subsequent tubuli recolonization and sperm production were described. The retroviral-based vector was developed and transplanted testicular cells were successfully infected. Carried marker transgene (Green fluorescence protein, GFP) was detected in DNA of produced sperms and no significant CpG methylation was detected when screening infected cells. Through the flow cytometry, testicular cells used for transplantation were analyzed. All major spermatogonia-derived populations were described including the side population (SP), possible group of spermatogonial stem cells.

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
VYUŽITÍ BLASTODERMÁLNÍCH BUNĚK	4
VYUŽITÍ SPERMATOGONIÁLNÍCH BUNĚK.....	5
VYUŽITÍ RETROVIROVÝCH VEKTORŮ	7
IDENTIFIKACE ZÁRODEČNÝCH BUNĚK	9
3. CÍL DISERTACE	13
4. KOMENTÁŘ K PREZENTOVANÝM PUBLIKACÍM.....	14
IN VITRO TRANSFEKCE KUŘECÍCH BLASTODERMÁLNÍCH A TESTIKULÁRNÍCH BUNĚK	14
OBNOVENÍ SPERMATOGENEZE POMOCÍ DÁRCOVSKÝCH TESTIKULÁRNÍCH BUNĚK	15
RETROVIROVÁ INFEKCE SPG JAKO METODA INTRODUKCE GENETICKÉ INFORMACE DO DRŮBEŽÍHO GENOMU	17
IDENTIFIKACE POPULACÍ KUŘECÍCH TESTIKULÁRNÍCH BUNĚK	18
5. SOUHRN VÝSLEDKŮ.....	20
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	21
7. AUTOROVY PUBLIKACE SOUVISEJÍCÍ S PŘEDKLÁDANOU PRACÍ.....	30
<i>I. Transfection of cock spermatogonial cells via electroporation and lipofection</i>	<i>30</i>
<i>II. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken.....</i>	<i>37</i>
<i>III. Retrovirus-mediated in vitro gene transfer into chicken male germ line cells.....</i>	<i>45</i>
<i>IV. Identification of various testicular cell populations in pubertal and adult cockerels....</i>	<i>55</i>

1. Úvod

Biotechnologický výzkum v oblasti transgenní drůbeže není zdaleka tak úspěšný jako u savců. Hlavní příčinou tohoto zpoždění je velmi specifické rozmnožování ptáků, které neumožňuje aplikaci již vyvinutých technik, popř. celých funkčních systémů u savců. Jedním z hlavních důvodů, proč se pozornost soustředila na vyvinutí transgenní technologie u drůbeže, je fakt, že ve srovnání s ostatními druhy masa, spotřeba drůbežího výrazně stoupá. Z drůbeže, která byla po staletí chována u vesnických příbytků, se teprve před několika desetiletími stal druh nejvyššího komerčního zájmu chovaný ve statisících na farmách a celé odvětví se dále dynamicky rozvíjí. Od roku 1960 se produkce drůbežího masa více než zešestinásobila (Mulder, 2002). Z toho také plynou nemalé investice do výzkumu drůbeže na buněčné a molekulární úrovni a odstartování rozsáhlých projektů vedoucích mj. také k přípravě geneticky modifikované drůbeže. Od transgenních ptáků si lze slibovat mnohé - snížení tučnosti masa, zvýšení svalové hmoty, lepší využití jednotlivých složek krmiva, zavedení genů pro rezistenci k nejrůznějším chorobám apod.

Dalším nezanedbatelným důvodem je fakt, že drůbeží vejcovod je možno vnímat jako potenciální bioreaktor pro produkci velkého množství proteinů, cenných například pro farmaceutický průmysl. Jednou z velkých výhod při využití drůbeže pro produkci farmaceuticky cenných látek oproti savcům by byla skutečnost, že při produkování těchto specifických látek by se výrazně snížil problém biologické zkřížené reaktivity. Ptáky syntetizované proteiny by byly biologicky účinné pro savce, ale ne pro ptáky. Nadprodukce cizorodých proteinů by pak nepůsobila produkujícím drůbežím jedincům žádné problémy, jako tomu může být u transgenních savců.

Vaječný bílek obsahuje přibližně 4g proteinů, z nichž více než polovina pochází z genu pro ovalbumin (OV). Pak tedy OV promotor v kombinaci s dalšími expresními elementy může vytvořit až 1g rekombinantního proteinu v cca 25% čistotě, to vše do přirozeně sterilního prostředí vaječného bílku. Při roční snášce 300 vajec pak jedna slepice může teoreticky vytvořit až 300g surového proteinu za rok. (Ivarie 2006)

I přes mnoho úsilí a času věnovaného řešení tohoto problému je nutno konstatovat, že po objektech výzkumných ústavů žije zatím nemnoho drůbežích jedinců s přívlastkem transgenní, přestože zejména v poslední době došlo k významným posunům v dané oblasti a na jedince, kteří by byli schopni komerčně produkovat pro člověka a zvířata cenné proteiny, již dlouho čekat nebudeme.

2. Současný stav řešené problematiky

Jak již bylo řečeno v úvodu, biotechnologický výzkum v oblasti transgenní drůbeže není zdaleka tak úspěšný jako u savců. Hlavní příčinou tohoto zpoždění je velmi specifické rozmnožování ptáků. Zárodečný terčík vejce je hned od počátku svého vzniku spojen s mimořádně velkým žloutkovým vakem a zhruba 15 minut po ovulaci vejce dochází v nálevce vejcovodu k jeho oplození a k následnému postupnému obalování vrstvami bílku, podskořápečnými blanami a nakonec skořápkou. Protože snesené vejce obsahuje již cca 60 000 buněk, je v tomto stádiu vývoje pro manipulace již téměř nepoužitelné. Chceme-li manipulovat s ptačím embryem ještě před snesením vejce, pak z výše uvedených důvodů (velký žloutkový vak, různé vrstvy, které tvoří vejce jako celek) je drůbeží zárodek téměř nepřístupný a jakékoliv manipulace na úrovni raného embryonálního stádia jsou tak na rozdíl od rutinně prováděných manipulací u savců nesmírně obtížné. Dalším problémem je fyziologická polyspermie. I kdyby se podařilo pronuklea v cytoplasmě vajíčka identifikovat, nelze s jistotou určit, které samčí prvojadro splyne se samičím (Birkhead et al., 1994).

Tyto manipulace by teoreticky byly možné provádět při inkubaci drůbežího embrya *in vitro*, ale i při zvládnutí je vzhledem k přítomnosti žloutkového vaku tato technika nesmírně obtížná a podařila se částečně zvládnout pouze ve Skotsku v Roslin Institutu (Perry, 1988) a později v Japonsku (Naito et al., 1994). Technika klonování, úspěšně prováděná u savců, nebyla u drůbeže dosud vyvinuta právě z uvedených důvodů.

Proto se experimentální práce v uvedené oblasti u drůbeže zaměřily na manipulace s nediferenciovanými drůbežími buňkami, ať již se jedná o blastodermální buňky (pluripotentní buňky izolované ze zárodku ve stádiu blastocysty sneseného vejce), primordiální gonocyty (PGC, prekurzory gamet; lze je získat přibližně 2. den inkubace embrya) či spermatogoniální buňky (počáteční stádium vývoje spermie ve varleti).

Byly vyvinuty rozdílné metody a přístupy, z nichž doposud nejúspěšnější popsaná technika spočívá ve využití virů jako vektorů pro přenos genů.

Využití blastodermálních buněk

Ze sneseného vajíčka stádia X (Eyal-Giladi and Kochav, 1976) je již embryo tvořeno 60-80 tisíci buňkami (Kochav et al., 1980). Buňky vytvářejí blastodermální terčík tvořený epiblastem a formujícím se hypoblastem. Z tohoto vývojového stádia je izolován blastodisk a získána suspenze jednotlivých blastodermálních buněk. Určité množství těchto pluripotentních buněk je pak injikováno do blastodermální dutiny stejně starého recipientního embrya. Předpokládá se, že se injikované buňky budou podílet na výstavbě těla, a že některé z nich dají vzniknout i pohlavním buňkám. I při injikaci několika set buněk je stále malá pravděpodobnost, že se stanou součástí těla a v ideálním případě progenitory pohlavních buněk. Další problém je neexistence zavedené slepičí linie embryonálních kmenových buněk.

První zárodečnou chiméru se podařilo vytvořit v Kanadě (Petitte et al., 1990). Pak následovaly další úspěšné pokusy (Carsience et al., 1993, Thoraval et al., 1994, Etches et al., 1993, Trefil et al., 1995). Celý postup je v současnosti vylepšován na buněčné úrovni – kultivace in vitro, genetická modifikace, přenos buněk bez ztráty totipotence.

Využití spermatogoniálních buněk

Transplantace spermatogoniálních buněk (SSC) umožňuje způsob jak studovat proliferaci a diferenciaci zárodečných buněk varlete a zároveň může být pro přenos exogenní genetické informace do tkáně operovaného jedince. U savců je této problematice věnována rozsáhlá pozornost, nicméně u ptáků je doposud málo prozkoumána. Varlata ptáků se nacházejí v břišní dutině a jsou tedy přístupná pouze po chirurgickém zákroku. Navíc leží v sakrální oblasti, v těsné blízkosti *aorta abdominalis* a *vena cava posterior* (Tingari and Lake, 1972), takže operace je náročná na přesnost. Morfologické a histologické specifikace ptačích buněk účastnících se procesu spermatogeneze již byly studovány u několika druhů (Brillard, 1986; Goes and Dolder, 2002; Lin and Jones, 1990; Noirlaut et al, 2006; Thurston and Korn, 2000; Zhao and Garbens, 2002;), teprve nedávno pak byly na základě detekce specifických povrchových markerů identifikovány možné kmenové spermatogonie (Bakst et al, 2007).

U savců byly první transplantace provedeny se suspenzí tetsikulárních buněk obsahujících neznámý počet kmenových spermatogonií. Autoři uvádějí, že po této operaci byla zahájena normální spermatogeneze u více jak 70% recipientů. Vytvořené spermie byly morfologicky zcela normální a schopné oplození vajíčka (Brinster et al., 1994, Brinster and Zimmermann, 1994). Následnou charakterizací spermatogoniálních kmenových buněk izolovaných z myšího embrya, adolescentního a dospělého jedince, se tyto buňky podařilo částečně purifikovat, což kromě studia jejich funkcí (Brinster, 2002) umožnilo optimalizaci celé techniky kolonizace varlat dárcovskými buňkami, a to jak u jedinců stejného druhu (Ogawa et al, 1997; Russel et al, 1996), tak i mezidruhově (Clouthier et al, 1996; Dobrinski et al, 1999; Oatley et al, 2002; Russel and Brinster, 1996).

U ptačích druhů byly přenosem primordiálních gonocytů (PGC) do embrya křepelky a kuřete vytvořeny zárodečné chiméry (Naito et al.,

1994, Naito et al., 1999, Nakamura et al., 1992), transplantace kmenových spermatogonií se však podařila poměrně nedávno (Trefil et al., 2003; Trefil et al., 2006, Song and Silversides, 2007).

Základem pro úspěšné zvládnutí této techniky je v první řadě úspěšné zvládnutí sterilizace varlat kohouta akceptora tak, aby mohlo dojít k rekolonizaci varlat. To však u drůbeže, na rozdíl od savců, není snadná záležitost. Bylo vypracováno několik postupů, včetně *in ovo* aplikace účinné látky do časných embryonálních stádií kuřete (Eyal-Giladi and Simkiss, 1991; Song et al, 2005), chirurgického zásahu, či vystavení čerstvě vylíhlých kuřat ionizačnímu záření (Carsience et al, 1993; Tajima, 2002; Thoraval et al., 1994). Busulfan (1,4-butandioldimetansulfonát), cytostatikum s prokázaným sterilizačním účinkem u savců, byl shledán škodlivým pro vyvíjející se kuřecí embrya (Smýkalová et al., 1998), i když bylo později zjištěno, že pokud podán až po 24hod inkubace, dojde ke sterilizaci kuřete bez škodlivých následků (Song et al., 2005). Jako alternativa k busulfanu byla posána úspěšná sterilizace myší a potkanů po jejich opakovanému vystavení vysokým dávkám gamma záření (Judas et al., 1996; Meistrich et al., 1978; Pinon-Lataillade et al., 1991; Van Beak et al., 1986). Podobně jako u kuřat, úplné sterilizace bylo dosaženo vystavením jedince pěti dávkám o velikosti 8 grayů (Gy) v 3-4 denních intervalech (Trefil et al., 2003).

Myší SSC se řídce vyskytují v suspenzi čerstvě izolované testikulární tkáně a mohou být infikovány replikačně-defektními retrovirovými vektory (Nagano et al., 2000). Byly zjištěny kultivační podmínky pro obnovu a růst myších SSC (Kubota et al. 2004, Hamra et al. 2005). Takto udržované buňky byly geneticky modifikovány a následně úspěšně použity k obnově fertility sterilních jedinců (Kanatsu-Shinohara et al. 2003, 2004, Kubota et al. 2004). I když u ptáků doposud nebyly vypracovány podmínky pro udržení SSC *in vitro*, lze předpokládat, že efektivní metodou genetické modifikace směsi čerstvě izolovaných kuřecích testikulárních buněk lze posílnout i řídce se vyskytující SSC. Toho lze dosáhnout právě použitím virového vektoru o vysokém titru; proniknutí viru do buňky trvá velmi krátkou dobu, navíc s minimálním negativním

vlivem v porovnání např. s lipofekčními či elektroporačními technikami, což by v důsledku mohlo vést k omezené účinnosti následné transplantace.

Díky doposud nevýrazným úspěchům při kultivaci a genetické modifikaci kuřecích embryonálních kmenových buněk (ESC, Pain et al. 1996, Petite et al. 2004) se v současnosti používané techniky soustředí zejména na práci s blastodermálními buňkami stádia X (Koo et al. 2004, Kwon et al. 2004, McGrew et al. 2004, Lillico et al. 2007) a primordiálními gonocyty (PGCs; Vick et al. 1993, Naito et al. 1999, van de Lavoie et al. 2006). Spermatogoniální kmenové buňky, pokud by byly *in vitro* geneticky modifikovány a následně transplantovány do varlat kohouta příjemce, by tak mohly být vhodnou alternativou k těmto technikám.

Využití retrovirových vektorů

I přes velkou snahu využít pro transfer cizorodé genetické informace různé dostupné techniky, infekce pomocí retrovirových vektorů s vysokým titrem se zdá být jedinou možností pro úspěšný přenos genů (Kwon *et al.*, 2004; McGrew *et al.*, 2004).

První geneticky modifikovaní ptáci byli vytvořeni pomocí vektorů odvozených z ptačích retrovirů. Retroviry byly samozřejmými kandidáty pro přenos genů, protože nedílnou součástí jejich životního cyklu je integrace do chromozomů svého hostitele. Nejprve byly k infekci používány replikačně-kompetentní drůbeží sarkomové a leukosové viry, stejně tak jako retikuloendotheliosové - derivované virové vektory (Salter *et al.*, 1987; Bosselman *et al.*, 1989). Modifikací vektorů odvozených z viru ptačí leukózy (ALV, avian leukosis virus) a viru retikuloendoteliózy vznikly první replikačně defektní vektory, které ve svém hostiteli podstupují pouze jedнокrokovou integraci do genomu. Tyto replikačně defektní vektory obsahují virový genom zbavený klíčových genů kódujících virové proteiny a naopak obsahují zvolený transgen;

zachovány jsou sekvence nezbytné pro integraci virové DNA a pro pakážování virionu. Kopie genů virových proteinů jsou uchovány odděleně v samostatných plasmidech. Virové partikule se pak získávají kotransfekcí virových vektorů a těchto plasmidů do tkáňových kultur.

ALV vektory byly použity k tvorbě transgenní drůbeže, ale frekvence transgenních kohoutů byla nízká (10%) a pouze jeden z 56 jedinců produkoval transgenní potomky. Frekvence transgenních potomků tohoto samce byla také nízká - ~ 0,7% (Harvey and Ivarie, 2003). Použitím vektoru odvozeného z ptačího viru slezinné nekrózy (Avian spleen necrosis virus, ASNV) byli získáni transgenní jedinci exprimující nízké hladiny transgenního proteinu (Mozdziak et al., 2003). Injikací replikačně defektního retroviru produkovaného systémem retrovirového vektoru pantropizovaného glykoproteinem G viru vesikulární stomatitidy, byli získáni transgenní jedinci exprimující zelený fluorescenční protein (GFP; Kwon et al., 2004, Koo et al. 2004). Použitím lentivirových vektorů odvozených z viru koňské infekční anémie (EIAV), stejně jako replikačně-defektních vektorů odvozených z Moloney murine leukemia virus (MoMLV), bylo dosaženo cílené exprese terapeutických proteinů ve vaječném bílku (Kamihira et al., 2005; Lillico et al., 2007; Lee et al., 2007; Kwon et al., 2008). Kromě vaječného bílku se v jednom případě rekombinantní protein objevil i v séru, což by mohlo být kontraproduktivní zejména při expresi vysoce konzervativních proteinů, jako např. hormonů, či růstových faktorů (Kamihira et al., 2005).

V našem nedávném výzkumu (Kalina *et al.*, 2007) jsme zjistili, že drůbeží testikulární buňky mohou být účinně infikovány *in vitro* pomocí replikačně-defektních reporterových retrovirových vektorů pantropizovaných pomocí glykoproteinu G viru vesikulární stomatitidy (VSV-G).

Identifikace zárodečných buněk

Přesná identifikace populací zárodečných buněk je předpokladem pro jejich využití např. v integraci exogenní genetické informace do tkáně varlat kohouta. Lze očekávat, že transplantace kuřecích zárodečných testikulárních buněk do sterilizovaných recipientů (Trefil et al., 2006) zvýší účinnost kolonizace semenotvorných kanálků. Přenos genetické informace do kohoutích (samčích) definovaných zárodečných buněk (Kalina et al., 2007) pak může představovat velmi účinnou cestu tvorby transgenních jedinců.

Během posledních několika let byl výzkum molekulárních a biochemických charakteristik zárodečných buněk ve varleti zaměřen především na identifikaci základních savčích spermatogoniálních buněk, u drůbeže však bližší specifikace těchto buněk není dosud známa.

V současné době máme pouze chabé znalosti o genové expresi během kuřecí spermatogeneze, o unikátních povrchových znacích germinálních buněk, ani o regulačních a parakrinních faktorech řídících drůbeží spermatogenezi.

Rozšíření znalostí o molekulárních a biochemických charakteristikách myších testikulárních buněk přispělo k rozvoji technik sloužících k identifikaci, izolaci a následně pak k transplantaci kmenových spermatogoniálních buněk, které u myší vedly k obnovení spermatogeneze u sterilních jedinců (Brinster et al., 1994; Ogawa et al., 1997; Russel and Brinster, 1996). Pro izolaci buněk rozličných stádií spermatogeneze u myší, krys a skotu byla vyvinuta celá řada metod, jako je např. separace na hustotním gradientu (van Pelt et al., 1996, Izadyar et al., 2002), separace pomocí centrifugální eluce (Meistrich et al., 1978), třídění buněk pomocí magnetického sortu nebo pomocí specifických

monoklonálních protilátek (van Pelt *et al.*, 2002), či použití lektinů (van Pelt *et al.*, 1996). Jung *et al.*, (2005) používali k ověření přítomnosti kuřecích kmenových spermatogoniálních buněk imunologické značení pomocí lektinů jako např. STA (solanum tuberosum agglutinin), WGA (wheat germ agglutinin) a Con A (konkavalin A). Nově byla k separaci zárodečné populace myších spermatogoniálních buněk použita technika stanovení obsahu DNA v buňkách pomocí Hoechst 33342 (H33342). Toto barvivo difunduje skrze membrány a navazuje se s vysokou afinitou na poly(d/AT) sekvenční DNA. Použití DNA barvení s Hoechst 33342 odhalilo populaci, která je silně zastoupená v kmenových buňkách – tzv. Side population.

Umístění nediferenciovaných myších spermatogonií v blízkosti membrány semenotvorných kanálků předpokládá, že na kmenových spermatogoniálních buňkách mohou být exprimovány receptory extracelulární matrix. Studium receptorů integrinu a lamininu ukázalo, že v množině testikulárních buněk myši jsou zastoupeny populace buněk (včetně buněk kmenových), které exprimují $\beta 1$ nebo $\alpha 6$ řetězce integrinu (Shinohara *et al.*, 2000). Na základě ústního sdělení, skupina Junga (Stem cell research center) prokázala na spermatogoniálních buňkách kuřat přítomnost $\beta 1$ či $\alpha 6$ integrinů podobně jako je tomu u savců.

Mezi časně se exprimujícími geny myší spermatogeneze byl jako marker kmenových buněk popsán Stra8 gen, který je exprimován ve spermatogoniích (Ouland-Abdelghani *et al.*, 1996) a sloužil jako marker pro purifikaci zárodečných buněk u myši (Giulii *et al.*, 2002). Exprese Stra8 probíhá výhradně u premeiotických zárodečných buněk (tj. spermatogonie a pravděpodobně preleptotení spermatocyty) ve varlatech dospělých myších jedinců. To dělá z genu Stra 8 velmi zajímavý marker premeiotických zárodečných buněk; může být významný při identifikaci populace zárodečných buněk ve studiích zabývajících se vývojem kmenových buněk samotných (Lassalle *et al.*, 2004). Exprese myšího $\alpha 6$ -integrinu byla pozorována u čerstvě izolovaných testikulárních buněk (Lassalle *et al.*, 2004). Tito autoři uvádějí expresi dalších genů přepisovaných před prvním meiotickým dělením: *Dazl* (deleted in

azoospermia like) a *c-kit* geny, které jsou exprimovány pouze v tzv. side population (SP) buněk a v populaci buněk tetraploidních. Přítomnost Hsp70-2 a Crem t genů je popsána ve spermatocytech I. řádu a ve spermatidách.

Na rozdíl od savců, identifikace drůbežích kmenových buněk ve varleti kohouta byla realizována pouze imunohistochemicky na řezech tkáně varlat (Lin and Jones, 1992; Jones and Lin, 1993; Bakst et al, 2007), v suspenzi živých buněk doposud zárodečné testikulární buňky nebyly určeny. Cytochemická charakterizace drůbežích primordiálních gonocytů (PGCs) byla úspěšně popsána za použití kombinací několika markerů, s využitím protilátek SSEA-1 a EMA- 1, lektinů STA a DBA, protilátek SSEA-3 a SSEA-4, stejně tak i pomocí $\alpha 6$ a $\beta 1$ integrinů (Jung et al., 2005).

Bylo navrženo několik technik pro purifikaci zárodečných buněk z čerstvých preparátů savčích varlat, včetně centrifugové eluce (Meistrich et al., 1978), separace na percolovém gradientu (van Pelt et al., 1996, Izadyar et al., 2002), magnetického buněčného sortu (Van der Wee et al., 2001), lektinů (van Pelt et al., 1996) a monoklonálních protilátek (van Pelt et al., 2002). Techniky založené na obsahu DNA, jako je průtoková cytometrie, light scatter parameters (Mays-Hoopers et al., 1995) a mitochondrial mass or activity (Suter et al., 1997) byly použity hlavně k sortování fixované zárodečné populace germinálních buněk u stejného druhu. Identifikace spermatogoniálních zárodečných buněk pro účely transplantací a dalších manipulací však vyžaduje zvolení vhodné nedestruktivní techniky tak, aby umožnila nejen identifikaci, ale i výběr a následnou reintrodukci plně funkčních buněk do recipientního jedince.

Mezi specifity kmenových buněk různých původů a druhů jedna poukazuje na relativní neschopnost jader těchto buněk přijímat supravitální fluorescentní sondy jako je bis-benzimide (Goodell et al., 1996) oproti H33342. V případě ošetření testikulárních buněk inhibitorem Ko143, kdy dojde k blokaci aktivního transportu H33342 z buněk ven, došlo k výraznému obohacení frakce SP o zárodečné spermatogoniální

buňky (Lassalle et al, 2004; Bastos et al, 2005). V našem posledním výzkumu (Mucksová et al. submitted) jsme demonstrovali, že některé poznatky získané na savčím modelu mohou být z části využity i pro studium identifikace specifických drůbežích buněk. Na základě detekce jaderného buněčného obsahu pomocí průtokové cytometrie jsme byli schopni určit jednotlivé populace drůbežích testikulárních buněk (N, 2N, 4N, SP) a v nich expresi genů *Dazl* a *Stra 8*. v SP, Oba geny byly nalezeny v SP populaci buněk, zatímco exprese genu *Dazl* byla nalezena pouze u 4N buněk, exprese genu *Stra8* pouze u 2N testikulárních buněk.

3. Cíl disertace

Cílem práce bylo vypracovat komplexní techniku tvorby transgenní drůbeže metodou retrovirové infekce kuřecích testikulárních buněk, a přispět tak k rozvoji biotechnologických postupů u drůbeže. To zahrnovalo počáteční ověření účinnosti vybraných transfekčních technik, dopracování původních technik sterilizace kohoutů a transplantace testikulárních buněk, samotné retrovirové infekce testikulárních buněk a identifikaci germinální populace buněk ve varlatech adolescentních a dospělých jedinců a srovnáním exprese genů *Dazl* a *Stra8* v jednotlivých populacích testikulární tkáně.

V budoucnu bychom tak mohli pozitivním způsobem zasáhnout nejen do možnosti ovlivnění užitkových vlastností drůbeže a zvýšení rezistence proti chorobám, ale například i do možnosti syntézy specifických proteinů v drůbežím oviduktu a jejich následné izolace z některých částí sneseného vejce.

Experimentální práce byly provedeny v období let 2002 až 2008 na oddělení genetiky drůbeže v BIOPHARM, Výzkumném ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv, a.s.

4. Komentář k prezentovaným publikacím

***In vitro* transfekce kuřecích blastodermálních a testikulárních buněk (I).**

Jednou z prvních námi použitých technik při zkoumání možností modifikace kuřecího genomu byla transfekce bakteriálním plasmidem pEGFP-C1 exprimujícím zelený fluorescenční protein (GFP) jako expresní marker. Pomocí elektroporace a lipofekce byla ověřována účinnost exprese na populacích blastodermálních a testikulárních buněk, a jejich viabilita v závislosti na transfekčních podmínkách.

Při transfekci kuřecích fibroblastů bylo možno pozorovat expresi GFP po celou dobu udržování buněčné kultury, tedy cca 10 pasáží. Transfekované klony byly selektovány pomocí antibiotika G418 sulfátu. Výsledky u somatických buněk tak dávaly naději i pro použití u pluripotentních buněk kuřecího blastodisku nebo varlete, přestože se z povahy plasmidu nemohlo jednat o stálou stabilní modifikaci genomu, ale pouze o transientní persistenci bez integrace do genomu. Cílem prověřované techniky bylo především ověřit možnosti proniknutí do kuřecích pluripotentních buněk a zkoumat reakce kultury na cizorodou DNA. Úspěšnost transfekce se pohybovala kolem 30 procent, určováno podle exprese GFP pod fluorescenčním mikroskopem.

Blastodermální buňky byly transfekovatelné velmi snadno, byly citlivé již na nízká napětí a citlivě reagovaly i na použitá lipofekční činidla. Úspěšnost jejich transfekce se pohybovala kolem 30 procent. Exprese byla silná, s minimálním cytotoxickým efektem exprimovaného GFP a neztrácela se ani po delší kultivaci. Naproti tomu transfekce směsi testikulárních buněk vyžadovala delší optimalizaci. Buňky byly po izolaci

kultivovány na feederu z inaktivovaných embryonálních fibroblastů v obohaceném kultivačním médiu. Podařilo se dosáhnout účinnosti transfekce 31,5% resp. 35,8%. Díky do té doby nemožnosti preciznější identifikace jednotlivých buněčných populací však docházelo k rychlému přerůstání kultury všudypřítomnými buňkami intersticia, zejména pak fibroblastoidními a myoidními buňkami, a tím tak i ke zkreslování výsledků.

Dosažené výsledky z transfekce drůbežích spermatogoniálních buněk ve směsi testikulárních buněk posloužily k sepsání odborné publikace, uveřejněné v Czech Journal of Animal Science (Kalina et al., 2003, viz publikace I).

Data získaná při transfekci kuřecích blastodermálních buněk byla ve formě posteru presentována na 11. evropské drůbežářské konferenci v Brémách (EPC 2002).

Obnovení spermatogeneze pomocí dárcovských testikulárních buněk (II)

Pro další pokračování jsme se rozhodli jít cestou Ralpha Brinstera, tedy cestou reintrodukce zárodečných buněk varlete (následně modifikovaných) do sterilních varlat kohouta příjemce. Prvním nezbytným krokem bylo zvládnutí techniky sterilizace kohouta akceptora. Po počátečních experimentech s busulphanem, který se ukázal jako nevhodný zejména díky negativnímu vlivu na růst a vývoj drůbežích embryí (Smýkalová et al., 1998), byla sterilizace prováděna odstraněním spermatogoniálních buněk ve tkáni kohouta příjemce cestou gamma radiace. Byla vyvinuta funkční technika sterilizace, která umožňuje 100% likvidaci spermatogoniálních buněk kohouta příjemce, ale zároveň zachovává funkčnost varlat pro následné přijetí cizích spermatogoniálních buněk kohouta dárce (Trefil et al., 2003).

K vytvoření funkčního modelu bylo z hlediska kompatibility implantovaných buněk nezbytné vyvinout speciální linii kohoutů – dárců spermatogoniálních buněk. Byly připraveny 2 syngenní linie s odlišným zbarvením peří, aby bylo možné jednoduše vytřídit potomstvo získané z přenesených buněk. Zbytek genomu musel být co nejvíce shodný, aby bylo vyloučeno nebezpečí odhojení přenesených buněk z důvodu histoinkompatibility. K těmto účelům byla vybrána inbrední linie CC.21 a kongenní linie CC – obě se liší pouze v haplotypu MHC (CC je B4, CC.21 je B21) a v barvě peří (CC je bílá – II, CC.21 je černá - ii). Křížením těchto linií a testováním MHC a genotypu pro barvu, byla vytvořena jako finální produkt nová kongenní linie CC.21 – I, která je homozygotní v B21 a II. Buňky (CC.21) pak byly implantovány kohoutům CC.21-I (Trefil et al., 2003).

V současnosti již tuto techniku rutinně zvládáme; potomstvo operovaného jedince po křížení s barevnými slepicemi tvoří pouze černá kuřata, což indikuje produkci spermií vzniklých pouze z buněk kohouta dárce.

Přenášené dárcovské testikulární buňky byly v dalších experimentech značeny fluorescenčním barvivem PKH47 a transplantovány do varlat ozářeného kohouta příjemce. Po době nezbytné pro rekolonizaci semenotvorných kanálků byl kohout akceptor usmrčen a z jeho varlat byly připraveny histologické řezy, které pod fluorescenčním mikroskopem jasně demonstrovaly funkčnost a úspěšnost techniky. Shrnutí této techniky bylo publikováno v prestižním časopise *Biology of Reproduction* (Trefil et al., 2006, viz publikace II)

Retrovirová infekce SPG jako metoda introdukce genetické informace do drůbežního genomu (III)

Po vytvoření a osvojení techniky reintrodukce zárodečných buněk do sterilních varlat kohouta akceptora a obnovení spermatogeneze bylo třeba zvolit vhodnou metodu genetické modifikace zárodečných buněk. Nejvhodnější se ukázala být metoda retrovirové infekce.

Retrovirový vektor byl sestaven vložením sekvence pro EGFP do plasmidu pLPCX, který byl následně zbaven puromycinové resistance a vnitřního CMV promotoru. Vzniklý pLG vektor obsahující hybridní LTR sekvence byl následně použit pro produkci viru.

Směs testikulárních buněk z varlat 32 týdnů starých kohoutů plemene Black Minor byla izolována a buňky byly krátkodobě kultivovány. Buněčná suspenze byla následně infikována 50x koncentrovaným rekombinantním retrovirovým vektorem nesoucím reportérový gen pro GFP a míra infekce byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie. Byla rovněž provedena analýza zastoupení jednotlivých populací přítomných buněk v takto získané kultuře. Analýza na základě množství buněčné DNA prokázala přítomnost všech potenciálních nosičů cizorodé genetické informace, tedy haploidních, diploidních i tetraploidních populací spermatocytů, a zejména i dnes velmi studovaných buněk, tzv. side population, vážného kandidáta na SSC. Pro samotnou transplantaci byly infikované testikulární buňky kultivovány pouze několik hodin, aby se zabránilo neregulované proliferaci kmenových buněk.

U infikovaných testikulárních buněk nebyla zjištěna významná CpG methylace, což nasvědčuje tomu, že v dané fázi vývoje pohlavních buněk je omezena role epigenetického silencingu.

Infikované buňky byly transplantovány do sterilních varlat kohouta příjemce. K obnovení spermatogeneze došlo během 9 týdnů od

transplantace. Ve spermiích kohoutů příjemců byl následně detekován reportérový gen pro GFP. Bylo tedy demonstrováno, že podobně jako u myší a potkanů, retroviry infikované spermatogonie nabízí jednu z možností jak vnést cizorodé geny přímo do samčí zárodečné linie kura.

Výsledky získané experimenty byly publikovány v časopise *Reproduction* (Kalina et al., 2007, viz publikace III).

Identifikace populací kuřecích testikulárních buněk (IV)

V počátečních výzkumech jsme zjistili, že SP populace drůbežích buněk může obsahovat populaci buněk obohacenou o zárodečné (kmenové) spermatogoniální buňky, které hrají významnou roli v transplantaci spermatogoniálních buněk (Trefil et al., 2006) .

Pro zefektivnění našich dosavadních technik transplantace testikulárních buněk a retrovirálních infekce, je třeba precizní analýza zastoupení jednotlivých buněčných populací ve směsi izolovaných testikulárních buněk. Naším dalším cílem tedy bylo identifikovat germinální populace buněk ve varlatech adolescentních a dospělých jedinců metodami srovnávání obsahu jaderné DNA pomocí FACS a srovnáním exprese genů *Dazl* a *Stra8* v jednotlivých populacích testikulární tkáně.

Buňky s tetraploidním obsahem (4N) DNA tvořily malou frakci ze všech zárodečných buněk a mezi porovnávanými skupinami nebyl významný rozdíl. Naproti tomu, haploidní (N) a diploidní (2N) populace se mezi porovnávanými skupinami signifikantně lišily, což je dáno rozdílným stupněm pohlavní zralosti zkoumaných jedinců. Na rozhraní haploidní a diploidní frakce byla identifikována specifická populace zárodečných buněk, referovaných jako tzv. side population (SP), se signifikantním rozdílem v zastoupení u porovnávaných věkových skupin.

U čtyř identifikovaných populací buněk byla testována exprese genů *Dazl* a *Stra8*, na myším modelu obvykle exprimovaných v premeiotických buňkách včetně kmenových spermatogonií. Exprese obou genů byla zjištěna u SP, zatímco exprese *Dazl*, nebo *Stra8* byla pouze u 4N resp. 2N populací. Korelace mezi ploditou a *Dazl*/*Stra8* expresí byla stejná u obou skupin.

Z hlediska transgeneze je důležitá zejména identifikace SP populace, jakožto možná množina kmenových spermatogonií.

Analýza ploidie testikulárních buněk a srovnání exprese vybraných genů u juvenilních a dospělých kohoutů je předmětem sepsaného manuskriptu (Mucksová et al., podaný rukopis do *Animal Reproduction Science*, viz publikace IV).

5. Souhrn výsledků

V práci bylo dosaženo následujících výsledků:

- byla ověřena účinnost některých transfekčních technik (elektroporace, lipofekce) na směsi testikulárních buněk obsahujících buňky spermatogoniální.
- bylo potvrzeno, že opakovaným ozářením (5x8 Gy) varlat dospělých kohoutů lze docílit úplné sterilizace varlete, přičemž semenotvorné kanálky zůstávají funkční a mohou být rekolonizovány transplantovanými spermatogoniálními buňkami
- metodou transplantace testikulárních buněk kohouta dárce do ozářených varlat kohouta příjemce se podařilo obnovit spermatogenezi u sterilního jedince
- ve vypracovaném modelu byly úspěšně transplantovány testikulární buňky infikované retrovirovým vektorem, čímž bylo prokázáno, že transplantace infikovaných spermatogonií nabízí účinný systém pro vnesení cizorodých genů do drůbežího genomu.
- metodou FACS byly identifikovány populace směsi testikulárních buněk varlat pubertálních a dospělých kohoutů; specifická subpopulace, tzv. side population, byla identifikována jako možná podskupina zárodečných buněk kmenových spermatogonií.
- byla prokázána exprese genů *Dazl* a *Stra8* u populací SP buněk a u 4N a 2N populací byla prokázána exprese pouze *Dazl* resp. *Stra8*

6. Seznam použité literatury

Bakst M, Akuffo V, Trefil P, Brillard JP. (2007) Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. *Anim. Reprod. Sci.* 97(3-4):303-13.

Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, Fouchet P. (2005) Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A.* 65(1):40.

Birkhead TR, Sheldon BC, Fletcher F. (1994) A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *J Reprod Fertil* 101:353–361.

Brillard JP. (1986) Age-related variations in seminiferous dimensions and germinal and Sertoli cell numbers in guinea-chicken raised under a 14L:10D photoperiod. *Poult. Sci.* 65:369–374.

Brinster RL, Avarbock MR. (1994) Germ line transmission of donor haplotype follow in spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:11303-11307.

Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszweski J, Ou S. (1989) Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243:533-535.

Carscience RS, Clark ME, Gibbins AMV, Etches RJ. (1993) Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669–675.

Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381:418–421.

D'Costa, S et al. (2001) Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poultry Biol. Rev.* 12:151-168

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. (1999) Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol. Reprod.* 61:1331- 1339.

Etches RJ, Carsience RS, Clark ME, Fraser RA, Toner A, Verrinder Gibbins AM. (1993) Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome. *Poult Sci.* 72(5):882-9.

Eyal-Giladi H, Kochav S. (1976) From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol.* 49(2):321-37.

Eyal-Giladi H, Simkiss K. (1991) Sterilisation of avian embryos with Busulphan. *Res. Vet. Sci.* 50:139-144.

Giullini G, Tomljenovic A, Labrecque N, Ouland-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F. (2002) Murine spermatogonial stem cells: target transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep.* 3:753-759.

Goes RM, Dolder H. (2002) Cytological steps during spermiogenesis in the house sparrow (*Passer domesticus*, Linnaeus). *Tissue Cell* 34:273-282.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 183(4):1797-806.

Harvey AJ, and Ivarie R. (2003) Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poult. Sci.* 82:927-930.

Ivarie R. (2003) Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.* 21:14-19.

Ivarie R. (2006) Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol.* 24(3):101-2.

Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. (2002) Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 124:85-94.

Judas L, Bentzen SM, Hansen PV, Overgaard J. (1996) Proliferative response of mouse stem cells after irradiation: a quantitative model analysis of experimental data. *Cell. Prolif.* 29:73-78.

Kalina J, Kolmanová A, Mikuš T, Mičáková A, Trefil P. (2003) Transfection of cock spermatogonial cells via electroporation and lipofection. *Czech J. Anim. Sci.* 48(7):279-284.

Kalina J, Šenigl F, Mičáková A, Mucksová J, Mikuš T, Blažková J, Poplštejn M, Yan H, Hejnar J, Trefil P. (2007) Retrovirus-mediated *in vitro* gene transfer into chicken male germ line cells. *Reproduction* 134(3):445-53.

Kamihira M, Ono K, Esaka K, Nishijima K, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S. (2005) High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J Virol.* 79(17):10864-74.

Kochav S, Ginsburg M, Eyal-Giladi H. (1980) From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics. *Dev. Biol.* 79(2):296-308.

Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Lee HT, Choi HJ, Kim J-H, Kim N-H, Jeon I, Chang W, Kim T. (2004) Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol. Rep. Dev.* 68:429-434.

Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu W-S, Shim H, Kim J-H, Kim N-H, Kim T. (2004) Development of transgenic

chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:442-448.

Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Park YY, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim JH, Roh JY, Kim NH, Kim T. (2008) Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol. Reprod. Dev.* 75(7):1120-6.

Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I, (2004) Side population cells in adult mouse testis express Bcrp-1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal cell cells. *Development*; 131:479-487.

Lee SH, Gupta MK, Han DW, Han SY, Uhm SJ, Kim T, Lee HT. (2007) Development of transgenic chickens expressing human parathormone under the control of a ubiquitous promoter by using a retrovirus vector system. *Poult. Sci.* 2007 86(10):2221-7.

Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM. (2007) Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS* 104(6):1771-6.

Lin M, Jones J. (1980) The cycle of the semeniferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *J. Reprod. Fertil.* 88:481-490.

McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 5:728-733.

Meistrich ML, Hunter NR, Suzuki N, Trostle PK, Withers HR. (1978) Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 74:349-362.

Mozdziak PE, Borwornpinyo S, McCoy DW, Petite JN. (2003) Development of transgenic chickens expressing betagalactosidase. *Dev. Dyn.* 226:439-445.

Mozdziak P. and Petite J. (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dyn.* 229:414–421

Mucksová J, Brillard J-P, Hejnar J, Poplštein M, Kalina J, Bakst M, Trefil P. (2008) Identification of various testicular cell populations in pubertal and adult cockerels. Submitted to *Anim. Reprod. Sci.*

Mulder, R. 2002. Future of poultry products in global market. Proceedings, 2nd International Congress, Poultry 2002, Brno.

Naito M, Sasaki E, Ohtaki M, Sakurai M. (1994) Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. *Mol. Reprod. Dev.*;37(2):167-71.

Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. (1999) Production of germline chimeric chickens with high transmission rate of donor-derived gametes produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 153-161.

Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Kagami H, Sakurai M, Kuwana T. (1999) Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J. Reprod. Fertil.* 117:291-298.

Nakamura M, Yoshinaga K, Fujimoto T. (1992) Histochemical identification and behaviour of quail primordial germ cells injected into chick embryos by the intravascular route. *J. Exp. Zool.* 261:479-483.

Noirault J, Brillard JP, Bakst M. (2006) Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): quantitative approach in immature and

adult males subjected to various photoperiods. *Theriogenology* 65:845-859.

Oatley JM, de Avila DM, McLean DJ, Griswold MD, Reeves JJ. (2002) Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *J. Anim. Sci.* 80:1925–1931.

Ogawa T, Aréchag JM, Avarbock MR, Brinster RL. (1997) Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int. J. Dev. Biol.* 41:111-122.

Ouland-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. (1996) Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J. Cell Biol.* 135:469-477.

Paine B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. (1996) Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339-2348.

Perry MM. (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature.* 331(6151):70-2.

Petitte JN, Liu G, Yang Z. (2004) Avian pluripotent stem cells. *Mech. Dev.* 121:1159-1168.

Pinon-Lataillade G, Viguier-Martinez MC, Touzalin AM, Maas J, Jegou B. (1991) Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:617-628.

Russel LD, Brinster RL. (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J. Androl.* 17:615-627.

- Russell LD, Franca LR, Brinster RL. (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J. Androl.* 17:603–614.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Crittenden LB. (1987) Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology*; 157:236-240.
- Sang H. (2004) Prospects for transgenesis in the chick. *Mech. Dev.* 121:1179-1186
- Shinohara T, Orwing KE, Avarbock MR, Brinster RL. (2000) Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 97:8346-8351.
- Smýkalová Š, Kotrbová A, Trefil P. (1998) Effect of busulphan on growth and development of the chicken embryos. *Vet Med - Czech* 43(4):105-109
- Song Y, D'costa S, Pardue L, Petitte J. (2005) Production of germline chimeric chickens following the administration of a Busulfan emulsion. *Mol. Reprod. Dev.* 70:438–444.
- Song Y, Silversides F. (2007) Heterotopic transplantation of testes in newly hatched chickens and subsequent production of offspring via intramaginal insemination. *Biol Reprod.* 76(4):598-603.
- Tajima A. (2002) Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Avian and Poult. Biol. Rev.* 13:15–30.
- Thoraval P, Lasserre F, Coudert F, Dambrine G. (1994) Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poult. Sci.* 73:1897–1905.
- Thurston RJ, Korn N. (2000) Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. *Poult. Sci.* 79:1650-1668.

Tingari MD, Lake PE. (1972) The intrinsic innervation of the reproductive tract of the male fowl (*Gallus domesticus*). A histochemical and fine structural study. *J. Anat.* 112:251-71.

Trefil P, Horská M, Kanka J, Fulka J, Jirmanová J, Moor RM, Fulka J Jr. (1995) Response of avian nuclei to mammalian maturation promoting factor (MPF). *Zygote* 3(4):289-94.

Trefil P, Polak J, Poplštejn M, Mikuš T, Kotrbová A, Rozinek J. (2003) Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiations. *Br Poult Sci* 44(4):643-50.

Trefil P, Micakova A, Mucksova J, Hejnar J, Bakst MR, Kalina J, Poplstejn M, Brillard J-P. (2006) Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biol. Reprod.* 75 575–581.

Van Beek MEAB, Davids JAG, de Rooij DG. (1986) Nonrandom distribution of mouse spermatogonial stem cells surviving fission neutron irradiation. *Radiat. Res.* 107:11–23.

Van Pelt, AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, Van Disselt-Emiliani, FMF. (2002) Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 143(5):1845-1850.

Van Pelt AMM, Morena AR, Van Disselt-Emiliani FMF, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, Stefanini M. (1996) Isolation of the synchronised A spermatogonia from adult vitamin A deficient rat testes. *Biol. Reprod.* 55:439-444.

Vick L, Li Z, Simkiss K. (1993) Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 251:179-182.

Zajchowski LD. and Etches RJ. (2000) Transgenic chickens: past, present and future. *Avian Poultry Biol. Rev.* 11:63-80.

Zhao G, Garbers D. (2002) Male germ cells specification and differentiation. *Dev Cell* 2:537-547.

IV.

Identification of Various Testicular Cell Populations in Pubertal and Adult Cockerels

JITKA MUCKSOVÁ¹, JEAN-PIERRE BRILLARD², JIŘÍ HEJNAR³,
MARTIN POPLŠTEIN¹, JIŘÍ KALINA¹, MURRAY BAKST⁴ and PAVEL
TREFIL^{1*}

¹*BIOPHARM, Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a.s. 254 49 Jílové u Prahy, Czech Republic*

²*Station de Recherches Avicoles, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Tours-Nouzilly, 37380 Monnaie, France*

³*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083
142 20 Prague 4, Czech Republic*

⁴*Biotechnology and Germplasm Laboratory, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA*

Key Words: spermatogonial cells, spermatogenesis, chicken

* **Correspondence to:** Pavel Trefil, BIOPHARM, Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a.s., 254 49 Jílové u Prahy, Czech Republic. Phone: +420 261 395 234, e-mail: trefil@bri.cz

ABSTRACT

Precise identification of male germinal stem cell populations is a prerequisite for their practical use in programs dedicated to the integration of exogenous genetic material in testicular tissues. In the present study, our aim was to identify germinal cell populations in the testes of pubertal and adult cockerels based on the detection of the nuclear DNA content by FACS and on the expression of the *Dazl* and *Stra 8* genes in single cell suspensions of testicular tissues. Cells with a tetraploid DNA content (4N) represent a small and equal fraction of the total germinal cell population in both pubertal and adult males. In contrast, the diploid (2N) and haploid (N) subpopulations differ significantly between ages as a consequence of different degrees of sexual maturation. A specific subpopulation of testicular cells, the side population (SP), was identified at the junction between the haploid and diploid cell populations. The percentage of this cell population differs significantly in pubertal and adult cockerels, accounting for 4.1% and 1.3% of the total cell population, respectively. These four testicular cell populations were also tested for the expression of *Dazl* and *Stra 8* genes known to be expressed in premeiotic cells including stem spermatogonia. Both genes were expressed in SP, whereas the expression of either *Dazl* or *Stra8* genes was detected only in the 4N and in the 2N testicular cell subpopulations, respectively. The correlation between the cell ploidy and *Dazl/Stra8* expression was the same in both male ages. We conclude that SP cells might represent a subpopulation of germinal cells enriched in stem spermatogonia, which can be of great importance for transgenesis in chicken.

INTRODUCTION

Precise identification of germinal stem cell populations is a prerequisite to their practical use in programs dedicated to the integration of exogenous genetic material in testicular tissues. Over past years, studies intended to provide some of the molecular and biochemical characteristics of stem spermatogonia in mammals have resulted in the development of workable techniques for the partial purification and transplantation of stem spermatogonia into recipient testes up to, in some cases, restoring functional spermatogenesis (Brinster and Avarbock, 1994; Russel and Brinster, 1996; Ogawa et al., 1997). In contrast to mammals, the identification of avian stem spermatogonia populations has become accessible only in fixed preparations of testes (Lin and Jones, 1992; Jones and Lin, 1993; Bakst et al, 2007) but remains to be established in fresh cell suspensions. Interestingly, the cytochemical characterisation of chicken primordial germ cells (PGCs) has been accomplished using the association of several markers including antibodies to SSEA-1 and EMA-1, lectins STA and DBA, antibodies to SSEA-3 and SSEA-4, as well as $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrins (Jung et al., 2005). Studies in the adult mouse based on the screening of integrin receptors of laminin, a protein from the extracellular matrix, have demonstrated that it is possible to enrich testicular cell suspensions 166-fold with isolated stem spermatogonia using a fluorescence-activated cell sorting analysis referring to light-scattering properties and expression of $\beta 1$ or $\alpha 6$ chains (Shinohara et al., 2000). Since, it has been established that $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrins are also present in primordial germ cells both in the chicken and the mouse embryo (Jung et al., 2005).

Among genes expressed at an early stage of spermatogenesis in the mouse, two stem cell marker genes, *Stra8* and $\alpha 6$ -integrin, have been characterized. The *Stra8* gene is expressed in spermatogonial cells (Ouland-Abdelghani et al., 1996) and the activity of its regulatory sequences has enabled purification of germinal stem cells (Giulli et al., 2002). *Stra8* expression is clearly restricted to premeiotic germ cells

(spermatogonia and possibly preleptotene spermatocytes) of the testes in the adult mouse, making this gene a putative candidate to identify premeiotic germ cells in other species (Lassalle et al., 2004). Regarding mouse *$\alpha 6$ -integrin*, its expression was observed in fresh preparations of dispersed testicular cells enriched in stem spermatogonia isolated by flow cytometry (Lassalle et al, 2004). Additional observations by the same authors indicate that, at least in the mouse, several other genes including *Dazl*, *c-Kit*, *Hsp70-2* and *Crem t* can be proposed to identify germ cell populations prior to the first meiotic division. Meanwhile, *Dazl* and *c-Kit* genes are expressed only in SP and tetraploid cells, while the transcripts of *Hsp70-2* and *Crem t* genes are expressed at or after the spermatocyte stage.

Several techniques have been proposed to purify germ cell populations in fresh preparations of mammalian testes including centrifugal elution (Meistrich et al., 1978), separation in discontinuous Percoll density gradients (van Pelt et al., 1996, Izadyar et al., 2002), magnetic cell sorting (Van der Wee et al., 2001), lectins (van Pelt et al., 1996) and monoclonal antibodies (van Pelt et al., 2002). In contrast, techniques such as flow cytometry based on DNA content, light scatter parameters (Mays-Hoopers et al., 1995) and mitochondrial mass or activity (Suter et al., 1997) have proven useful mainly to sort fixed germinal cell populations in the same species. Identification of spermatogonial stem cells for the transfer of exogenous cell populations is, indeed, difficult to resolve as it requires non destructive techniques to appropriately identify, purify and reintroduce functional cell populations into recipient individuals. Among specificities shared by stem cells of various lineages and species, one refers to the relative inability of their nuclei to take up supravital fluorescent probes such as bis-benzimide, more commonly referred (Goodell et al., 1996) to as Hoechst 33342 (H33342). In the case of germinal tissues, this DNA-binding probe was used to identify a side population (SP) of mouse testicular cells highly enriched in stem spermatogonia after inhibition of H33342 efflux by treatment with BCRP1 inhibitor Ko143 (Lassalle et al, 2004; Bastos et al, 2005). Such

observations are in direct contradiction with another study also performed in the mouse (Kubota et al, 2003), in which the transplantation of germinal cells present in an SP of germinal cells derived from cryptorchid males was unsuccessful to recolonize recipient testes. However, the direct demonstration that using SP cells derived from normal males results in functional neo-spermatogenesis suggests that SP cells derived from cryptorchid mice may have originated from the use of different experimental models, the SP issued from cryptorchid males being devoid of stem spermatogonia (Bastos et al, 2005).

Using RNA extraction and RT-PCR of gene markers to target germinal stem cells and after differential staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS) of testicular cell suspensions, the present study intended to identify and partly purify dispersed germinal cell populations in the chicken, a species of virtually unlimited potential to access the production of bio-engineered proteins.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals. A total of 5 pubertal (12 weeks of age) and 5 adult (28 weeks of age) inbred White Leghorn cockerels (WL; genotype II) issued from the Institute of Molecular Genetics (Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czechia) were used as donors. This experiment was repeated 5 times with one adult and one pubertal animal. Only animals of standard weight and producing good quality ejaculate, i.e. 4×10^9 /ml, were used in experiments. Males were kept in individual cages (4200 cm²) fitted with perches under standard husbandry conditions with photoperiod 12L:12D. Feed and water were provided ad libitum. All experiments were performed in accordance with CZ legal requirements (Acts Nos. 246/199, 162/1993 and 193/1994).

Preparation of Single-Cell Suspension of Testicular Tissue. Germinal testicular cells were isolated from the testes of adult cockerels by performing two-step enzymatic digestion of testicular tissues in order to

isolate seminiferous tubules and remove interstitial cells as described by Lassalle et al., 2004. Briefly, the tunica albuginea was removed and the seminiferous tubules dissociated from interstitial tissue using enzymatic digestion (50 min at 34°C in this study) with Type I collagenase in PBS (100 U/ml; Biochrom AG, Germany) supplemented with 1.2 mM MgSO₄ (7 x H₂O), 1.3 mM CaCl₂ (2 x H₂O), 6.6 mM sodium pyruvate and 2 mM glutamine (final pH = 7.2). Seminiferous tubule fragments were then isolated by two successive filtrations through a 40 µm nylon mesh to remove cell clumps, washed in PBS, centrifuged at 400 x g for 5 min and the resulting pellet resuspended in PBS supplemented with 1% fetal bovine serum.

Flow Cytometry. The identification of several testicular cell populations was performed on the basis of DNA content using testicular cell suspensions stained for 90 minutes at 37°C in H33342 diluted in PBS at a final concentration of 5 µM. For detection of their cell cycle phase, these cells were stained with H33342 for 30 minutes in final concentration 10 µM at room temperature. Propidium iodide (PI) at a concentration of 5 µg/ml was used as counter stain to exclude necrotic cells (red fluorescence of nuclei). Flow cytometry analyses were performed with a FACSVantage SE flow cytometer (Becton Dickinson, USA) equipped with a two-stream argon-helium laser (Coherent Enterprise EE, Orsay, France). The various categories of cells stained by H33342 were excited by a UV laser adjusted to 50 mV using a combination of 485 nm long-pass and 505 nm short-pass filters in front of the first detector, while cell populations stained with PI were detected with a 682 nm/22 nm band-pass filter in front of the second detector.

RNA Extraction and RT-PCR of Genes *Stra 8*, *Dazl* and α -Actin. A total of 10⁵ H33342-stained cells were sorted and suspended into a solution of Rneasy Plus Mini Kit for RNA purification (Qiagen). Total RNA was then subjected to reverse transcription with a first strand cDNA synthesis kit (Fermentas). Primers for *Dazl* were prepared as described by van de Lavoie et al., 2006 to perform PCR of *Dazl* gene, forward 5'-

gcttgcatgctttcctgct-3', reverse *5'-tgcgtc acaaagttaggca-3'*. *Stra 8* (forward *5'-tatccatagagtcttcagcc-3'*, reverse *5'-cttcagaaagctcttgccaga-3'*) and α -*actin* (forward *5'-acaatggctccggtatgtgca-3'*, reverse *5'-gttcaggggagcctctgtgag-3'*) genes were detected with primers developed in our laboratory. For all these genes, PCR conditions were as follows: 94°C for 1 min, 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec. The number of PCR cycles was 36. PCR reactions were resolved in a 1% TAE-agarose gel with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

Statistical Analysis.

Comparisons between the proportions of testicular cells involved in spermatogenesis at the pre-pubertal and adult stages were performed by analysis of variance and t test (Microsoft Excel 2000). Data from the present study are shown as the mean +/- SEM. A value of $P < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

Identification of Cell Populations Based on DNA Content.

Flow cytometric analyses of single-cell preparations subjected to fluorescent probes H33342 and PI resulted in the identification of five different subpopulations of cells classified according to the emission of more or less marked red or blue fluorescence of their nuclei (Figure 1). Cells with a nucleus intensively stained in red were classified as necrotic and, as such, discarded from further analyses. The remaining four cellular categories expressed various intensities of blue fluorescence. As such, they were classified as viable and therefore subjected to flow cytometric analyses (Fig. 1A). Within each group of males (pubertal or sexually mature), the histogram derived from pre-cited analyses reflected nuclear surface characteristics in each cellular category, thus allowing discrimination between these cells on the basis of their DNA content (N, 2N or 4N; Fig. 1B). Cells with a tetraploid (4N) DNA content represented

8.4 % and 7.9 % of the total cell population analysed in pubertal and sexually mature males, respectively. These cells located in the upper region of Figure 1A were considered as reflecting the DNA content of germinal cell nuclei characteristic of the first meiotic prophase. In contrast, cells present in the intermediate region of the figure were identified as having a diploid (2N) DNA content, itself characteristic of germinal nuclei having undertaken mitosis II, i.e. type II spermatocytes. Cells with a haploid nuclear DNA content (N) were identified as having reached spermiogenesis and, as such, identified as round spermatids (see lower region of Fig. 1I). Cell subpopulations with a tetraploid nuclear DNA content were found similar between pubertal and adult males, 7.9% and 8.4% of the total cell population analysed, respectively. In contrast, significant differences ($P < 0.05$) were observed in the percentages of cells expressing haploid or diploid nuclear DNA content between the populations of cells issued from prepurbertal compared to adult males (haploid: 25.5% vs 54.6%; diploid: 44.7% vs 18.9% ($P < 0.05$ in both cases; Table 1). Finally, a specific subpopulation of testicular cells expressing blue fluorescence with low intensity was identified at the junction between N and 2N cell subpopulations. Such cells were referred to as a side scatter subpopulation (SP). They accounted for 4.1 % of the total cell population analysed in pubertal males compared to only 1.3% in adult males ($P > 0.05$).

RT-PCR analysis of markers in flow-sorted cellular subpopulations.

The four subpopulations of FACS-selected testicular cells were tested for expression of the *Dazl* and *Stra 8* genes in preparations from both categories of cockerels. These two genes were expressed in the SP cell population, while the *Dazl* gene was detected only in 4N and *Stra 8* gene only in 2N testicular cell subpopulation (Fig. 2). Within a given subpopulation of cells, the expression of *Dazl* and *Stra 8* genes had similar patterns in pubertal and adult males. Detection of the house keeping β -*actin* control gene confirmed the correct course of RT PCR.

DISCUSSION

In this study, a dual experimental approach was used to characterize and sort testicular cell populations from single-cell suspensions of pubertal and adult testicular tissues in the chicken. The general procedure, which combines FACS with marker genes, has already been successfully attempted to identify germinal cell populations and partly purify an SP phenotype enriched in stem spermatogonia in the mouse (Lassalle et al., 2004; Bastos, 2005). One singularity of the FACS approach is based on repeated observations that germinal and somatic stem cell populations express low or no fluorescence when subjected to supravital fluorescent probes such as H33342 or Rhodamine 123 (Spangrude and Johnson, 1990 ; Lassalle et al., 2004; Lo et al., 2005). The efflux of these probes from stem cell nuclei has been attributed to the existence of a p-glycoprotein pump activated by *Brcp1*, a gene which has been suggested to provide protection against cytotoxic substrates at least in hematopoietic cells (Zhou et al., 2002). In the present study, the SP phenotype was presented in testicular cell suspensions from both pubertal and adult males, but the percentage of cells carrying this phenotype reached 4.1% of the total population analysed in pubertal compared to only 1.3% in adult males ($P < 0.05$). In contrast, haploid cells, specific of spermiogenesis, accounted for 25.5% in pubertal and 54.6% in adult males. In both cases, the differences between the two types of males were significant ($P < 0.05$).

Such differences are themselves the consequence of differences in testicular development between the two types of males, those having reached the pubertal stage being several weeks from sexual maturity, a period at which seminiferous tubules contain large proportions of haploid cells (round and elongated spermatids, testicular spermatozoa) characteristic of spermiogenesis (de Reviers, 1971). In the chicken, the pubertal stage, itself defined as the stage of development during which an animal first becomes capable of reproducing sexually (Plant, 1999), has been histologically characterised by the presence of the first testicular

spermatozoa present in seminiferous tubule sections (de Reviere, 1971). This stage can be observed in testes >1g from 12-week-old males subjected to a photostimulatory photoperiod, a situation similar to experimental conditions used in the present study for this group of males.

Based on observations performed in the mouse, we used a combination of two genes, *Dazl* and *Stra8*, as putative candidates to identify germinal cell subpopulations in pubertal and adult chickens. In the mouse, the *Dazl* gene is expressed in SP and 4N cells, while *Stra8* is observed only at a premeiotic stage which includes 2N (spermatogonia) and 4N (type-I spermatocytes of mitosis I) cells. In the present study, the expression of the *Dazl* and *Stra8* genes was analysed in germ cell subpopulations sorted on the basis of their DNA content. For a given category of cells, both genes were expressed similarly in pubertal and adult males, but their expression was highly variable between germinal cells depending on their position in the process of spermatogenesis. For example, none of these two genes was expressed in N cells while *Stra8* was expressed only in 2N and *Dazl* in 4N cells. Interestingly, both types of genes were strongly expressed in SP cells while *Dazl* was expressed only in germ cells having reached the pre-leptotene/leptotene (4N) stage. These observations, similar to those previously reported in the mouse (Lassalle et al, 2004), strongly suggest that the chicken SP population isolated from pubertal and adult testes has been enriched with stem spermatogonia. In adult males, the fraction of SP cells recovered from single-cell suspensions accounted for only 1.3% of the total germinal cell population, a percentage itself similar to the percentage of SP cells recovered from dispersed germinal cell populations from adult mouse testes (Lassalle et al., 2004).

In conclusion, this study performed in the chicken reports for the first time the existence of SP cells present in variable proportions among single-cell suspensions of pubertal and adult testicular tissues. Such cells express the *Dazl* and *Stra8* genes in a manner similar to mouse SP cells, themselves recognized as a subpopulation of germinal cells highly enriched in stem spermatogonia. We expect that the transplantation of chicken pubertal or adult SP cells into sterilised recipient (Trefil et al.,

2006) will improve the rate of colonisation of seminiferous tubules by germinal cell populations and restoration of exogenous spermiogenesis. Together with the retrovirus-mediated gene transfer into the male germ cells (Kalina et al., 2007), it might be a way to the efficient transgenesis in chicken.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr. Zdenek Cimburek (Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic) for FACS analysis. This work was supported by grant No. ME 908 from the Grant Agency of the Ministry of Education (PT), Youth and Sports and grant No. 523/07/1171 awarded by the Grant Agency of the Czech Republic (JH).

REFERENCES

Bakst MR, Akuffo V, Trefil P, Brillard JP. 2007. Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. *Anim Rep Sci* 97:303-313.

Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, Fouchet P. 2005. Flow cytometric characterisation of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry* 65 A: 40-49.

Brinster RL, Avarbock MR. 1994. Germ line transmission of donor haplotype follow in spermatogonial transplantation. *PNAS* 91:11303 – 11307.

Giulli G, Tomljenovic A, Labrecque N, Ouland-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F. 2002. Murine spermatogonial stem cells: target transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep* 3:753-759.

Goodell MA, Browse K, Paradis G, Konner AS, Mulligamm RC. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.

Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij, DG. 2002. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 124: 85-94.

Jones RC, Lin M. 1993. Spermatogenesis in birds. *Oxford Review of Reproduction Biology* 15:233-264.

Jung JG, Kim DK, Park TS, Lee SD, Lim JM, Han JY. 2005. Development of novel markers for the characterisation of chicken primordial germ cells. *Stem Cells* 23:689-698.

Kalina J, Šenigl F, Mičáková A, Mucksová J, Blažková J, Yan H, Poplštejn M, Hejnar J, Trefil P. 2007. Retrovirus-mediated in vitro gene transfer into chicken male germ line cells. *Reproduction*. 134: 445-53.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. 2003. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *PNAS* 100: 6487-6492.

Lassalle B, Bastos, H, Louis JP, Riou L, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I. 2004. Side population cells in adult mouse testis express

Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal cell cells. Development 131:479-487.

van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw r, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 441:766-9.

Lin M, Jones RC. 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. Cell Tiss Res 267:591-601.

Lo KC, Brugh VM, Parker M, Lamb DJ. 2005. Isolation and enrichment of murine spermatogonial stem cells using rhodamine 123 mitochondrial dye. Biol Reprod 72: 767-71.

Mays-Hoopers LL., Bolen J, Riggs AD, Singer- Sam J. 1995. Preparation of spermatogonial, spermatocytes and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. Biol Reprod 53:1003-1011.

Meistrich ML, Hunter NR, Suzuki N, Trostle PK, Withers HR. 1978. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. Radiat Res 74: 349–362.

Ogawa T, Aréchag JM, Avarbock MR, Brinster RL. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. Int J Dev Biol 41:111–122.

Ouland-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. 1996. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra 8*, a novel retinoid acid-responsive gene. J Cell Biol 135: 469-477.

van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, Stefanini M. 1996. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod* 55: 439-444.

van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij, DG, van Dissel-Emiliani FM. 2002. Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinol* 143:1845-1850.

Plant TM. 1999. Puberty, in non human primates. *Encyclopedia of Reproduction, Vol 4 (Pro-Z): 135-142*, Knobil E and Neill JD, Academic press.

de Reviere 1971. Le développement testiculaire chez le coq. II. Morphologie des tubes séminifères et établissement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Biophys Bioch* 11: 531-546.

Russel LD, Brinster RL. 1996. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J Androl.* 17: 615-627.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. 2000. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *PNAS* 97:8346-8351.

Spangrude GJ, Johnson GR. 1990. Resting and activated subsets of mouse multipotent hemopoietic stem cells. *PNAS* 84: 7433-7437.

Suter L, Koch E, Bechter R, Bobadilla M. 1997. Three- parameters flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 27: 161-168.

Trefil P, Mičáková A, Mucksová J, Hejnar J, Poplštejn M, Bakst MR, Kalina J and Brillard JP. 2006. Restoration of spermatogenesis and male

fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biol Reprod* 75 : 575-581.

van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC. 2001. Immunomagnetic isolation and long term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl* 22:696-704.

Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. 2002. *Bcrp1* gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. *PNAS* 99:12339-12344.

TABLES

Tab. 1. Percentage of cells with haploid (N), diploid (2N) or tetraploid (4N) nuclear DNA content and side population (SP) among viable cells from single-cell suspensions of pubertal and adult testicular tissues in the chicken.

Percentage (%)	N	2N	4N	SP
Adult	54.6 (4.2) *	18.9 (3.3) *	8.4 (3.5)	1.3 (0.2) *
Pubertal	25.5 (2.7)	44.7 (7.7)	7.9 (1.3)	4.1 (0.6)

* ($P < 0.05$)

Dates are expressed as mean (standard deviation)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Flow cytometric analysis of adult and pubertal cockerel testicular cells stained with Hoechst 33342 and PI fluorescence. Visible populations of adult and pubertal cockerel tetraploid testicular cells, premeiotic spermatocytes I (4N), diploid testicular cells (2N), haploid spermatides (N) and specific population of testicular cells mainly called SP. (B) Dual-parameter flow cytometric analysis of adult and pubertal cockerel testicular cell cycle stained with Hoechst 33342 and PI fluorescence. Visible population of adult and pubertal testicular cells consists of haploid (N) testicular cells, diploid (2N) cells in G1 phase of the cell cycle and tetraploid cells, premeiotic spermatocytes I (4N) in G2/M phase of the cell cycle.

Figure 2. Expression of differentiation markers in the sorted testicular cell subpopulations from pubertal and adult cockerel. RNAs from the whole testes of an pubertal cockerel (T) as well as sorted haploid (N), diploid (2N), tetraploid (4N) and SP cell populations were analysed via RT PCR. RT PCR was performed for the *Dazl* (30 cycles), *Stra 8* (30 cycles), and *β -actin* (30 cycles) genes.

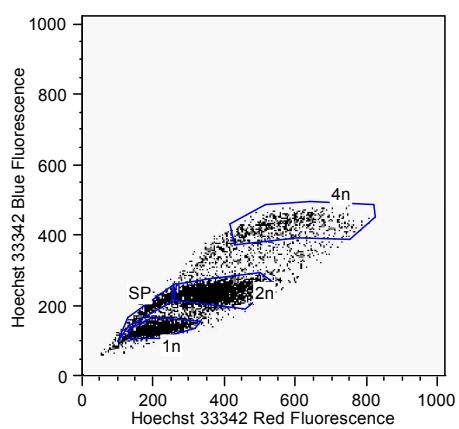
FIGURES

Fig. 1.

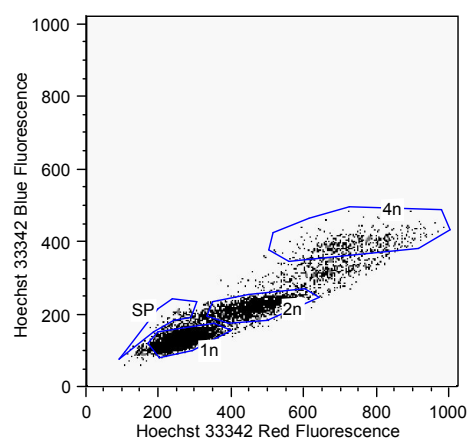
A)

Flow cytometric analysis of adult and pubertal cockerel testicular cells stained with Hoechst 33342 and PI

Adult



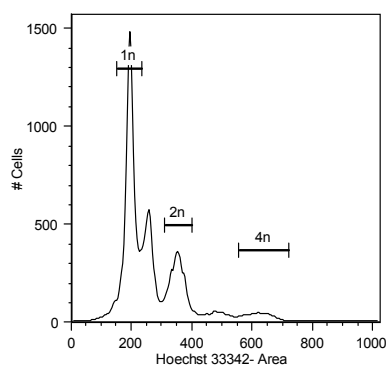
Pubertal



B)

Flow cytometric analysis of testicular cell cycle of adult and pubertal cockerels stained with Hoechst 33342 and PI

Adult



Pubertal

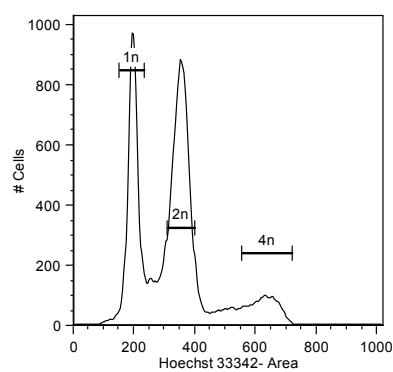
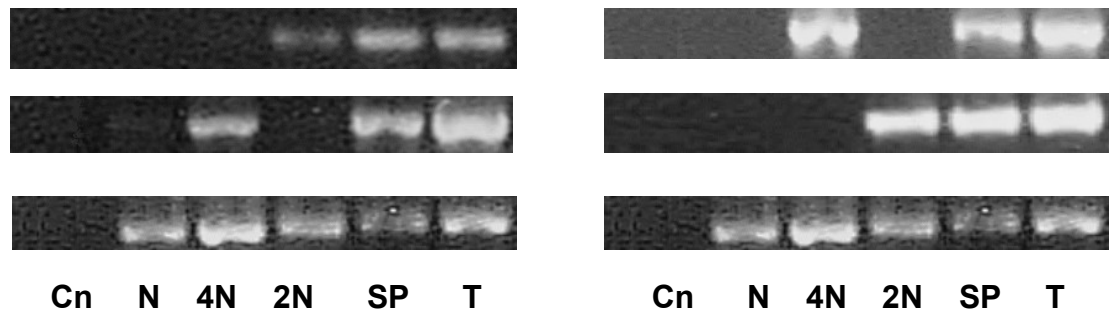


Fig. 2.

RT PCR analysis of differentiation marker expression in the sorted testicular cell subpopulations of pubertal and adult cockerels

A) pubertal

B) Adult



Stra 8 (371 bp) Dazl (563 bp) Actin (302 bp)