

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA KOMÓREK LINII ZARODKOWEJ W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ*

POTENTIAL APPLICATION OF GERM LINE STEM CELLS IN REGENERATIVE MEDICINE

Katarzyna PIOTROWSKA, Sylwia ŚLUCZANOWSKA-GLĄBOWSKA,
Mariusz Z. RATAJCZAK

Zakład Fizjologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Streszczenie: Dynamicznie rozwijająca się medycyna regeneracyjna poszukuje akceptowanej pod względem etycznym komórki macierzystej, która jako macierzysta komórka pluripotencjalna miałaby zdolność różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. Duże nadzieje budzą komórki linii zarodkowej izolowane z dorosłych tkanek. W niniejszej pracy przedstawione zostaną dotychczasowe postępy w identyfikacji i izolacji takich komórek z jąder, jajników i innych narządów pozagonadalnych. Przedstawiony będzie również związek tych komórek z izolowanymi z dorosłych tkanek tzw. małymi komórkami o cechach embrionalnych – VSELs (ang. *Very Small Embryonic Like Stem Cells*), które, jak uważamy, są rozwojowo pokrewne komórkom linii zarodkowej.

Słowa kluczowe: VSELs, PGCs, piętno genomowe, medycyna regeneracyjna.

Summary: The rapidly developing regenerative medicine searches for pluripotent stem cell that will be able to differentiate into stem cells from all three germ layers. In this review we will focus on germ line stem cells that have been recently purified from adult ovaries, testes and other extragonadal tissues. We will discuss their potential clinical application and their relationship of these cells to so called very small embryonic-like stem cells (VSELs), a population of epiblast/germ line pluripotent stem cells identified recently by our team in adult tissues.

Key words: VSELs, PGCs, genome imprinting, regenerative medicine.

Wykaz skrótów: **ASCs** (ang. *Adult Stem Cells*) – komórki macierzyste dorosłych osobników; **bFGF** (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*) – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów; **CSF-1** (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) – czynnik stymulujący wzrost kolonii -1; **DAZL** (ang. *Deleted Azoospermia-Like Gene*); **DMRs** (ang. *Differential Methylated Regions*) – regiony różnie zmetylowane; **EBs** (ang. *embryonic bodies*) – ciała embrionalne; **EGCs** (ang. *Embryonic Germ Cells*) – embrionalne komórki płciowe; **EGF** (ang. *Epidermal Growth Factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; **EpiSC** (ang. *Epiblast derived Stem*

*Finansowane z grantu KBN (N N401 024536) oraz European Union Structural Funds, Innovative Economy Operational Program POIG.01.01.02-00-109/09-00 oraz finansowane z grantu KBN (N N401 024536).

Cells) – komórki macierzyste wywodzące się z epiblastu; **ESCs** (ang. *Embryonic Stem Cells*) – embrionalne komórki macierzyste; **GDF9b** (ang. *Growth Differentiation Factor 9b*) – czynnik różnicujący wzrost 9b; **GDNF** (ang. *Glial Cells Line-Derived Neurotrophic Factor*) – neurotroficzny czynnik wywodzący się z linii komórek glejowych; **GSCs** (ang. *Germline Stem Cells*) – komórki macierzyste linii płciowej; **HIF** (ang. *Hypoxia Inducible Factor*) – czynnik wywołany niedotlenieniem; **ICM** (ang. *Inner Cell Mass*) – komórki masy węzła zarodkowego; **IGF-1** (ang. *Insulin-Like Growth Factor*) – insulino-podobny czynnik wzrostu-1; **KL** (ang. *Kit Ligand*) – inaczej SCF; **LIF** (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*) – czynnik hamujący białaczkę; **mGS** (ang. *multipotent Germline Stem Cells*) – multipotencjalne komórki macierzyste linii germlinalnej; **OSCs** (ang. *Ovarian Stem Cells*) – jajnikowe komórki macierzyste; **OSE** (ang. *Ovarian Surface Epithelium*) – nabłonek powierzchniowy jajnika; **PGCs** (ang. *Primordial Germ Cells*) – komórki prapłciowe; **PSCs** (ang. *Pluripotent Stem Cells*) – pluripotencjalne komórki macierzyste; **SCF** (ang. *Stem Cell Factor*) – czynnik wzrostu komórek macierzystych; **SDF-1** (ang. *Stromal Derived Factor-1*) – podścieliskowy czynnik wzrostu-1; **SSCs** (ang. *Spermatogonial Stem Cells*) – spermatogonialne komórki macierzyste; **Stra8** (ang. *Stimulated by Retinoic Acid gene 8*) – gen 8 stymulowany kwasem retinowym; **TCSCs** (ang. *Tissue Committed Stem Cells*) – ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste; **TNAP** (ang. *Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase*) – tkankowo niespecyficzna fosfotaza alkaliczna; **VEGF** (ang. *Vascular Endothelial Cell Growth Factor*) – czynnik wzrostu komórek śródbłónki naczyń; **VSELs** (ang. *Very Small Embryonic-Like Stem Cells*) – bardzo małe, podobne do embrionalnych komórki macierzyste.

WSTĘP

Z punktu widzenia przetrwania gatunku najważniejszą funkcją organizmów jest przekazywanie genów z pokolenia na pokolenie. Plemniki i oocyty są komórkami biorącymi udział w tym procesie. Są to jedyne komórki, które po połączeniu tworzą zygotę – komórkę o cechach totipotencjalnych, czyli zdolną do tworzenia wszystkich tkanek organizmu i łożyska. W wyniku podziałów zygoty, w dalszych etapach rozwoju powstaje morula i blastocysta. Ta ostatnia składa się z trofoblastu i komórek węzła zarodkowego – ICM (ang. *Inner Cell Mass*) różniących się ekspresją genów. W dalszych etapach ICM przekształca się w komórki hipo- i epiblastu. Z hipoblastu powstaje pęcherzyk żółtkowy, natomiast komórki epiblastu dają początek trzem listkom zarodkowym oraz prekursorom komórek prapłciowych – PGCs (ang. *Primordial Germ Cells*). PGCs wykazują cechy komórek pluripotencjalnych. Po opuszczeniu epiblastu migrują przez tkanki zarodka do grzebieni płciowych, gdzie osiedlają się w powstających gonadach i w wyniku podziałów i różnicowania tworzą populacje komórek płciowych. PGCs wykazują ekspresję markerów komórek pluripotencjalnych, takich jak: Oct4, Sox2, Nanog, SSEA1 (mysz), SSEA4 (człowiek) [1,28,53], oraz markerów specyficznych dla takich komórek prapłciowych, jak: TNAP (ang. *Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase*), stella, fragilis, c-kit [1].

Możliwość, że PGC mogą podczas embriogenezy ulec zdeponowaniu w innych tkankach, została zauważona na początku XX wieku na podstawie obserwacji migracji tych komórek podczas rozwoju zarodkowego u żółwia [25]. Następnie do koncepcji tej powrócono na początku lat 80. XX wieku, gdy Upadhyay i Zamboni [60] wykazali obecność ektopowych komórek płciowych w nadnerczach myszy. Autorzy wskazali, iż w czasie wędrówki PGCs przez tkanki zarodka część z nich

zostaje uwięziona między komórkami rozwijającego się nadnercza, gdzie podlega różnicowaniu do oocytów, rzadziej do spermatogonii. Ostatnio obecność komórek pluriipotencjalnych mających zdolność różnicowania w kierunku komórek trzech listków zarodkowych wykazano także w zawiesinach komórkowych pozyskanych z jąder – SSCs (ang. *Spermatogonial Stem Cells*) i jajników – OSCs (ang. *Ovarian Stem Cells*) dorosłych osobników [43,61].

Ostatnio zespół nasz postawił hipotezę istnienia tzw. czwartego listka zarodkowego, w którego skład wchodziłyby: (i) populacja migrujących komórek linii zarodkowej (PGCs), (ii) spokrewnione z nimi VSELs oraz (iii) komórki linii hematolimfopoetycznej [32]. Komórkami prekursorowymi tych komórek są, jak uważamy, najwcześniejsze PGCs, które wyodrębniają się w początkowym okresie gastrulacji w części proksymalnej epiblastu. Badania metodą cytometryczną wskazują obecność VSELs w narządach limfatycznych (szpik kostny, grasica, śledziona), trzustce, mózgu, płucach, wątrobie i innych [32, 67]. Wykazane przez nasz zespół, podobieństwo VSELs do PGCs wynika z obecności tych samych markerów komórkowych Oct4 i SSEA1, a także podobnych zmian we wzorze piętna genomowego (*genomic imprinting*) niektórych ważnych dla rozwoju genów (np. *Igf2-H19* i *Rasgrf1*). To przeprogramowanie genów chroni komórki VSELs przed nadmierną niekontrolowaną proliferacją i tworzeniem potworników (teratoma). Podobna zmiana piętna genomowego pojawia się w czasie migracji PGCs do grzebieni płciowych, co sprawia, że PGCs nie ulegają partenogenezie oraz nie tworzą potworników [14]. Prawidłowy wzór piętna genomowego zostaje odtworzony w komórkach dopiero po pierwszym podziale mejotycznym, gdy materiał genetyczny zostaje zredukowany o połowę do liczby haploidalnej.

Jak wykazano, PGC mogą jednak odróżnicować się w warunkach hodowli w kontakcie z fibroblastami płodowymi, w obecności niektórych czynników wzrostowych, takich jak: KL (ang. *kit ligand*), LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*) oraz bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*) i dać początek tzw. komórkom embrionalnym linii germinальной/zarodkowej – EGCs (ang. *Embryonic Germ Cells*). Komórki takie mogą po wszczepieniu zwierzętom doświadczalnym tworzyć potworniki [11].

W tabeli 1 podsumowano dane literaturowe dotyczące komórek linii germinальной zidentyfikowanych w różnych tkankach poza gonadami.

TABELA 1. Komórki linii zarodkowej (germinальной) zidentyfikowane poza gonadami
TABLE 1. Germ line cells identified in extra gonadal tissues

Tkanka Tissue	Rodzaj komórek Type of cells	Fenotyp Phenotype	Piśmiennictwo References
Skóra Skin	oocytopodobne oocyte-like	Oct4, GDF9b, Dazl, Vasa	[5]
Skóra Skin	oocytopodobne oocyte-like	Oct4, Stella, Dazl, Vasa,	[44]
Szpik kostny Bone marrow	spermatogonialne komórki macierzyste, spermatogonia spermatogonial stem cells	Fragilis, Stella, Vasa, ct4, Stra8, Dazl, β 1-I α 6-integryna	[45]

JĄDRO JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Gonada męska, jądro składa się z kanalików plemnikotwórczych i tkanki interstycjalnej. W nabłonku plemnikotwórczym, wyściełającym kanaliki, obecne są dwie populacje komórek: komórki Sertoliego, zwane też komórkami podporowymi i komórki linii germinalnej. Komórki linii germinalnej ułożone są w warstwach, począwszy od spermatogonialnych komórek macierzystych (SSCs) i spermatogonii, poprzez spermatocyty i spermatydy aż do plemników, które są uwalniane do światła kanalika.

Spermatogonialne komórki macierzyste są populacją komórek, która wywodzi się bezpośrednio z PGCs. Najmniej zróżnicowanymi komórkami dojrzałych gonad w nabłonku plemnikotwórczym są spermatogonia *A dark* (Ad) i *A pale* (Ap) u mężczyzn oraz *A single* (As), *A paired* (Apair) i *A aligned* (Aal) u myszy i szczura. Uważa się, że spermatogonialnymi komórkami macierzystymi są *A dark* u mężczyzn i *A single* u myszy i szczurów [12,17]. Populacja ta zasiedla część przypodstawną nabłonka plemnikotwórczego i stanowi zaledwie ~0,03% populacji komórek płciowych [57]. Jest to pula regeneracyjna. Ma ona zdolność do zasiedlania nabłonka plemnikotwórczego [41]. Główną funkcją tej nieaktywnej mitotycznie populacji jest ochrona integralności genomu i odtworzenie nabłonka plemnikotwórczego po jego wcześniejszym zniszczeniu [17].

Wiadomo, że aktywność komórek macierzystych jest regulowana przez specyficzne warunki mikrośrodowiska, zwane niszą komórek macierzystych [13,54]. Nisza SSCs charakteryzuje się obecnością sygnałów niezbędnych do przetrwania, proliferacji i różnicowania. Czynniki wpływającymi na regenerację populacji SSCs są GDNF (ang. *Glia cells derived Growth Factor*), EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) i bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*). Kanatsu-Shinohara i wsp. [27] wykazali, iż komórki macierzyste linii germinalnej w hodowli *in vitro* nie są w stanie proliferować bez suplementacji GDGF. Innymi białkami niezbędnymi do proliferacji SSCs *in vivo* są: plzf, taf-4b, IGF-1, LIF, KL, natomiast białkami odpowiedzialnymi za różnicowanie są Sohlh 1 i 2 [8, 31].

Badania Chiarini-Garcia i wsp. [7] wykazały, iż zarówno u myszy, jak i u szczura rozmieszczenie niszy nie jest przypadkowe. Wykazali oni obecność spermatogoniów *A single* w tych miejscach kanalików plemnikotwórczych, które nie stykają się z innymi kanalikami – *interstinal region* [7]. Ostatnie doniesienia Oatley i wsp. [44] wskazują, że CSF-1 (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) produkowany przez komórki Leydiga i komórki mioidalne bierze udział w tworzeniu niszy. Wykazali oni, iż CSF-1 wzmacnia samoodnowę SSCs w hodowlach *in vitro*. Dodatkowo wykazali obecność funkcjonalnego receptora dla CSF-1 na SSCs jąder myszy [44].

IZOLACJA I RÓŻNICOWANIE SPERMATOGONIALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (SSCs)

Kilka grup badaczy prawie jednocześnie podjęło się izolacji SSCs z jąder myszy. Zastosowano różne metody, a także użyto zwierząt w różnym wieku [11].

Kanatsu-Shinora i wsp. [26] użyli do izolacji SSCs gonad noworodków myszy, u których na tym etapie rozwoju obecne są tylko prespermatogonia. Grupy Guana i Seandela [19,52] przeprowadziły izolację SSCs z jąder myszy dorosłych, gdzie obecne są już wszystkie warstwy spermatogonii, co sprawia, że ich populacja jest mniej jednorodna. Natomiast Hu i wsp. [21] użyli jąder zwierząt kilkudniowych i otrzymali populację zbliżoną do tej uzyskanej przez Guan i Seandel [19,21,26,52].

Doskonalenie metod izolacji i hodowli SSCs pozwoliło na otrzymanie hodowli *in vitro*, które mogły być podtrzymywane przez wiele miesięcy, bez utraty zdolności do kolonizacji jądra i wytwarzania plemników. Uzyskane w ten sposób populacje komórkowe nazwano multipotencjalnymi komórkami linii płciowej – mGS (ang. *multipotent Germline Stem Cells*), w odróżnieniu od populacji komórek macierzystych embrionalnych (ESCs) i embrionalnych komórek płciowych (EGCs) [27]. Okazało się, że populacja mGS nie jest jednorodna i mogą w niej występować komórki o różnych fenotypach, co związane jest faktem różnicowania się części tych komórek [9]. Populacje mGS wykazują wiele markerów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych, takich jak: Oct4, SSEA-1, Sox2 oraz Nanog [9,18,27,31,43].

Ostatnio pojawiły się doniesienia o uzyskaniu SSCs z komórek szpiku kostnego. Nayernia i wsp. [42], w wyniku stymulacji adherentnych komórek szpiku kostnego kwasem retinowym, otrzymali komórki wykazujące ekspresję markerów wczesnych komórek linii germinacyjnej m.in. Oct-4, charakterystycznego dla nieodróżnionych spermatogoniów, a także transkrypty genów *fragilis*, *stella*, *mvh* i *Rnf17*. Dodatkowo wykazali oni za pomocą badań immunohistochemicznych obecność α 6- i β 1-integryny, które uznali m.in. za markery SSCs [42].

KOMÓRKI MACIERZyste JAJNIKA (OSCs)

Od wielu lat wiadomo, że u ssaków w momencie narodzin jajnik zawiera pęcherzyki jajnikowe z oocytami, których rozwój rozpoczęty w życiu płodowym jest zatrzymywany w diakinezie profazy pierwszego podziału mejozy. Do tej pory uważano, że liczba oocytów w momencie narodzin jest już określona i komórki te będą zużywane wraz z wiekiem aż do okresu menopauzy. Uważano, że jest to pula nieodnawialnych komórek. Od kilku lat różni badacze donoszą, że zarówno u ludzi, jak i u innych ssaków możliwe jest tworzenie nowych, dodatkowych oocytów, nawet w życiu pozapłodowym [10,29,61]. Prekursory komórek jajowych mogą prawdopodobnie pochodzić zarówno z jajnika [10,29,61], jak i z innych pozajajnikowych tkanek [5,16].

W jajniku dojrzałych płciowo samic uwalnianie oocyta (owulacja) wiąże się ze zniszczeniem nabłonka powierzchniowego jajnika (OSE), po czym w dalszych etapach cyklu dochodzi do jego odnowienia. Fizjologiczny proces odnowy OSE wskazuje, iż w jego obrębie muszą znajdować się komórki zdolne do asymetrycznych podziałów. Udowodniono także, iż duża część nowotworów jajnika pochodzi z OSE. Potwier-

dzeniem teorii o istnieniu w OSE komórek zdolnych do podziału mogą być badania Bowena i wsp. [2]. Wykazali oni, że prawidłowe komórki OSE mają peptydy sygnałowe charakterystyczne dla dorosłych komórek macierzystych. Wykazują także ekspresję genów *LHX2* i *LHX9*, związanych ze zdolnościami komórek do asymetrycznego podziału charakterystycznego dla komórek macierzystych. Wskazuje to na istnienie w OSE komórek niezróżnicowanych, które w odpowiednich warunkach, fakultatywnie są zdolne do asymetrycznych podziałów [2].

Podobne wnioski uzyskali także Szotek i wsp. [56], którzy stosując metody barwienia i zatrzymywania związków barwnych (ang. *label retaining*) wykazali w OSE asymetryczne podziały. Dodatkowo stosując odczynnik Hoechst 33342 stwierdzili oni oporność tych komórek przed związkami potencjalnie toksycznymi. Sprzyja to ich długowieczności i jest cechą komórek macierzystych, progenitorów, a także komórek nowotworowych [56].

Uważa się, że pewna liczba PGCs może przetrwać w nabłonku powierzchniowym jajnika [10]. Poparciem dla tej tezy jest m.in. wykazanie w jajniku płodowym świni niezróżnicowanych PGCs [3].

Virant-Klum i wsp. [61] opisali z kolei obecność w OSE u kobiet małych (od 2 do 4 μm), kulistych komórek, ze strukturami przypominającymi „bąbelki”, z dużym, zajmującym prawie całą komórkę jądrem oraz z niewielką ilością cytoplazmy wokół. Komórki te określono jako potencjalne komórki macierzyste jajnika. Wykazują one ekspresję wczesnoembrionalnych markerów, takich jak: SSEA 4, Oct-4, Nanog, Sox-2, c-kit. Takie komórki wykazano w OSE u kobiet w wieku pomenopauzalnym, jak i u kobiet z przedwczesną niewydolnością jajnikową w wieku przedmenopauzalnym. W trakcie trwającej 20 dni hodowli, badacze oznaczali w różnym czasie markery embrionalnych komórek macierzystych. Między 5 a 7 dniem hodowli komórki te osiągnęły wielkość 20 μm , utraciły przypominające bąbelki struktury i przypominały oogonia. Te prawdopodobne komórki macierzyste jajnika wykazywały wówczas ekspresję wczesnorozwojowych markerów charakterystycznych dla PGC, takich jak: SSEA-4, Oct-4 (Oct-4A i Oct-4B), Sox-2 oraz Nanog. Dlatego nazwano je jajnikowymi komórkami macierzystymi z embrionalnymi markerami. W 20. dniu hodowli komórki te miały średnicę około 95 μm i wykazywały silną ekspresję Oct-4 oraz nieznaczną Sox-2 i Nanog. Badacze tłumaczą to zmniejszeniem pluripotencjalności, co związane jest z możliwością różnicowania się tych komórek w trakcie hodowli. Wykazywały również ekspresję białka VASA oraz genu *Zp2*. Podobieństwo tych komórek do wyizolowanych przez nasz zespół VSELs sugeruje, że komórki izolowane z nabłonka powierzchniowego jajnika być może są populacją komórek VSEL, która jest zdeponowana w jajniku we wczesnym okresie życia płodowego [34,48].

Wykazano obecność receptora c-kit na każdym etapie hodowli [61]. Jest to istotne, gdyż receptor c-kit oraz jego ligand KL, znany również jako SCF (*Stem Cell Factor*) [15] uczestniczą w oogenezie i folikulogenezie w czasie życia płodowego oraz kontrolują wzrost oocytów, różnicowanie komórek osłonki oraz chronią pęcherzyki jajnikowe przed apoptozą u dorosłych osobników. Obecność

markera c-kit również potwierdza ich pochodzenie od PGCs. Działanie osi KL-c-kit - receptor jest odpowiedzialne za migrację podczas embriogenezy PGCs do grzebieni płciowych.

Ostatnio Zhou i wsp. [66] wyizolowali z OSE komórki macierzyste żeńskiej linii płciowej (ang. *Female Germline Stem Cells*) mające prawidłowy kariotyp i wysoką aktywność telomerazy, które hodowali *in vitro* przez wiele miesięcy. Dodatkowo przeprowadzili oni udaną transfekcję tych komórek genem *GFP*, a po przeszczepieniu transfekowanych komórek do nieplodnych myszy otrzymali pokolenie myszy zawierających białko GFP. Ich eksperyment pokazuje, iż możliwe jest wykazanie w OSE obecności populacji komórek macierzystych zdolnych do wytworzenia oocytów i otrzymania potomstwa z tych oocytów.

Również i inni badacze [24] donoszą, że w OSE u młodych i dorosłych myszy obecne są komórki o cechach germinalnych komórek macierzystych – GSCs (ang. *germline stem cells*), które wykazują aktywność mitotyczną oraz ekspresję białka VASA. Mają zdolność organizowania pęcherzyków jajnikowych u dorosłych osobników. Podważa to tezę, że w momencie urodzenia jajnik traci możliwość produkcji nowych oocytów. Ci sami autorzy w innej pracy zastanawiają się, czy te komórki mogą pochodzić także z innych tkanek, np. ze szpiku kostnego [23].

Możliwe jest także uzyskanie komórek macierzystych z OSE wykazującego cechy starzenia. W swojej pracy Tilly i wsp. [59] uzyskali małą populację komórek Stra8 (ang. *Stimulated by Retinoic Acid gene 8*) pozytywnych z jajników starych myszy, które po przeszczepieniu do jajnika młodej myszy różnicowały się w oocyty.

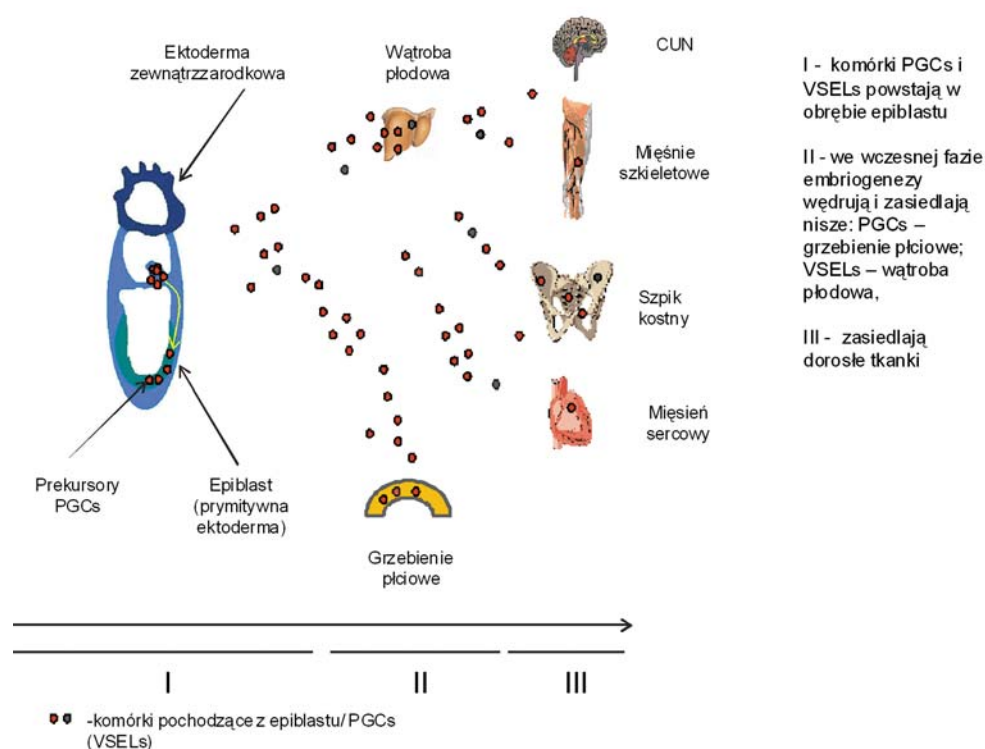
Bukovsky i wsp. [3] wykazali również, że przy uszkodzonym OSE możliwa jest odnowa pęcherzyków jajnikowych. Autor sugeruje, że ta odnowa jest możliwa dzięki obecności przypuszczalnie germinalnych komórek w okolicy rdzenia jajnika. Wykazali oni, iż komórki te pochodzą od komórek szpikowych i wykazują zdolność do przesuwania się w kierunku kory jajnika, gdzie formują struktury przypominające pęcherzyki.

Z kolei Dyce i wsp. [16] wykazali, że izolowane z płodowej skóry prosiąt komórki macierzyste wykazują zdolność różnicowania się w oocytopodobne komórki. W trakcie różnicowania wykazują one ekspresję takich markerów, jak: Oct-4, GDF9b (ang. *Growth Differentiation Factor 9b*), DAZL (ang. *Deleted Azoospermia-like gene*) oraz białko VASA. Mają zdolność formowania pęcherzyków oraz produkują estradiol i progesteron. Są także wrażliwe na działanie gonadotropin. Duże oocytopodobne komórki wykazują ekspresję markerów specyficznych dla oocytów, takich jak: SCP3 (ang. *synaptonemal complex protein-3*). Podobne wyniki uzyskali Linher i wsp. [38]. Komórki macierzyste wyizolowane przez nich z płodowej skóry prosiąt wykazywały w czasie hodowli *in vitro* zmiany morfologiczne i ekspresję markerów pluripotencjalnych, co wskazuje na transformację tych komórek od płodowych komórek macierzystych skóry poprzez komórki podobne do prekursorów komórek prąplciowych aż do komórek podobnych do oocytów [38].

KOMÓRKI VSELS I ICH POSTULOWANY ZWIĄZEK Z LINIĄ ZARODKOWĄ

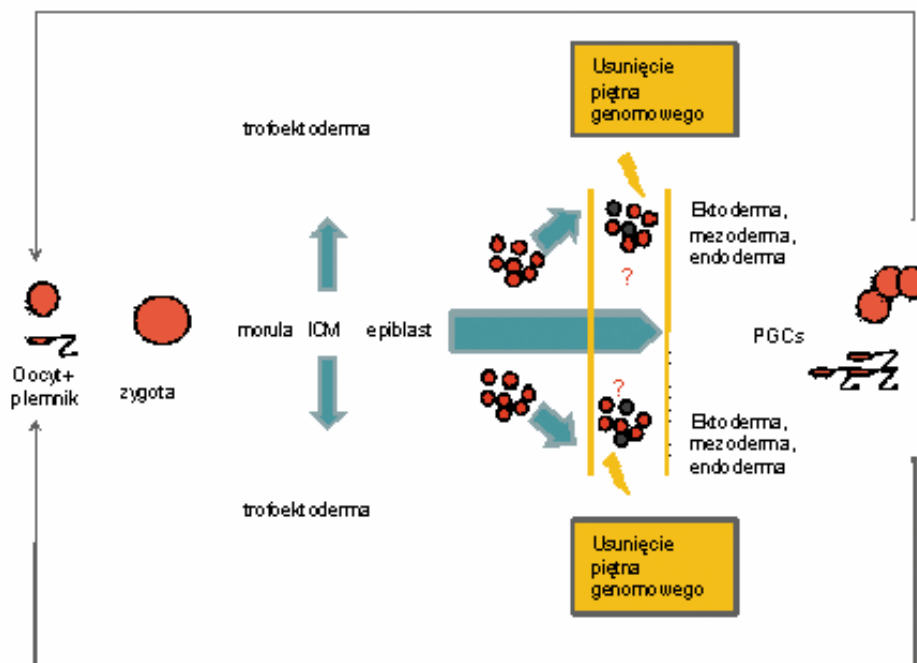
Badania prowadzone w ostatnich latach przez nasz zespół dowiodły, że pluripotentne komórki macierzyste epiblastu dają początek nie tylko komórkom macierzystym różnicującym się następnie w trzy listki zarodkowe oraz komórkom prapłciowym (PGC), ale prawdopodobnie także populacji VSELS [30,32,34,37,54].

Obecność VSELS wykazano w szpiku kostnym, w wielu narządach, a także we krwi obwodowej [29,37,62]. Są to małe komórki, o średnicy $\sim 3\text{--}4\ \mu\text{m}$ u myszy oraz $\sim 5\text{--}6\ \mu\text{m}$ u człowieka. Mają duże jądro z euchromatyną, otoczone wąskim rąbkim cytoplazmy. Zawierają diploidalną liczbę chromosomów. Komórki te wykazują obecność specyficznych markerów, takich jak: Oct-4, Nanog, SSEA-4 (u myszy SSEA-1), Rex, Rif-1 typowe dla pluripotentnych komórek epiblastu, co związane jest z możliwością różnicowania się we wszystkie trzy listki zarodkowe.



RYCINA 1. Pochodzenie embrionalnych komórek macierzystych epiblastu w dojrzałych tkankach. Obecność VSELS w wątrobie płodowej, gonadach, szpiku kostnym i innych tkankach można wyjaśnić hipotezą zasiedlania tych organów w wyniku migracji VSELS z epiblastu

FIGURE 1. Hypothesis of developmental deposition of epiblast-derived embryonic stem cells in adult tissues. The presence of VSELS in the fetal liver, gonads, BM and other tissues could be explained by the developmental deposition of epiblast derived VSELS



RYCINA 2. Postulowane pochodzenie komórek VSELs z epiblastu/linii zarodkowej. Z punktu widzenia ewolucji i rozwoju najważniejsza jest linia zarodkowa, która przekazuje DNA i mitochondria następnym pokoleniom. Komórki somatyczne powstają podczas rozwoju z komórek linii zarodkowej i tworzą somę, która umożliwia komórkom linii zarodkowej spełnić ich misję. Najwcześniejsza rozwojowo komórka linii zarodkowej to zygota. Potencjał linii zarodkowej utrzymuje się następnie w komórkach gastruli, komórkach węzła zarodkowego i epiblastie. Pierwotne komórki gonad jako pierwsze ulegają specyfikacji w proksymalnej części epiblastu i wędrują do grzebieni płciowych, gdzie dają początek gametom. Linia zarodkowa daje początek najpierw komórkom trofoblastu, które utworzą łożysko, a następnie komórki epiblastu dają początek komórkom macierzystym różnych rozwijających się narządów. Uważamy, że na tym etapie powstają komórki VSELs, które zdeponowane zostają w rozwijających się narządach jako rezerwowa pula pluripotencjalnych komórek macierzystych (zaznaczone kolorem czerwonym). Potencjał proliferacyjny tych komórek, podobnie jak pierwotnych komórek płciowych jest regulowany poprzez modulację ekspresji genów wykazujących piętno genomowe

FIGURE 2. Postulated germ line origin of VSELs. From the developmental and evolutionary point of view, the germ line carries the genome (nuclear and mitochondrial DNA) from one generation to the next. Somatic cell lines „bud out” from the germ line during ontogenesis to soma that will help germ line-derived gametes fulfill this mission. The germ potential is established in the fertilized oocyte (zygote) and subsequently retained in the morula, ICM of the blastocyst, epiblast, PGCs, and mature GCs (gonocytes - oocytes and sperm). The first cells that bud out from the germ lineage are trophoectodermal cells that will give rise to the placenta. Subsequently, during gastrulation, the epiblast is a source of PSCs for all three germ layers (meso-, ecto-, and endoderm) and PGCs. We hypothesize that at this stage some epiblast/germ line-derived SCs could be deposited as Oct-4⁺ VSELs in peripheral tissues and organs (red circles). Proliferative potential of these cells in adult tissues is regulated due to modulation of expression of some developmentally crucial imprinted genes

Mają ponadto receptor CXCR4, antygeny CD133, Sca-1 (mysz) oraz CD45. W czasie życia płodowego ulegają zdeponowaniu w różnych tkankach i narządach (ryc. 1) i tym samym jako linia komórek pluripotencjalnych, są źródłem dla komórek macierzystych ukierunkowanych tkankowo w życiu pozapłodowym [30,32,34,37,54,62]. Wykazują tym samym duże podobieństwo do PGCs, które również pochodzą z epiblastu i w życiu płodowym zasiedlają przede wszystkim grzebienie płciowe, ale także, jak wspomniano, można je wykazać w innych tkankach [16,32,51,60]. Ze względu na fakt, iż oba typy komórek mają podobny zestaw markerów komórek pluripotencjalnych, jest sprawą dyskusyjną, czy te zdeponowane komórki to PGCs, czy też może VSELs.

Usunięcie piętna genomowego (ang. *genomic imprinting*) na niektórych genach w komórkach VSELs kontroluje ich proliferację oraz zabezpiecza je przed rozwojem nowotworów, podobnie jak to ma miejsce w komórkach PGCs (ryc. 2). W wyniku tych zmian epigenetycznych VSELs utrzymywane są w dojrzałych tkankach w stanie „uśpienia”. W odpowiednich warunkach jest jednak to proces odwracalny, co może być istotne w z punktu widzenia rozwoju medycyny regeneracyjnej [30,33,49].

MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA VSELs

Użyliśmy kilku strategii dla oceny molekularnej VSELs. Ze szpiku kostnego i wątroby płodowej myszy uzyskano wysoce oczyszczoną populację małych komórek Sca-1⁺CD45⁻lin⁻, które wykorzystano do oceny ekspresji: (i) genów odpowiedzialnych za cechy pluripotencjalności, (ii) markerów komórek linii epiblastu/germinalnej oraz (iii) ekspresji kluczowych dla rozwoju genów wykazujących piętno genomowe.

Ekspresja genów odpowiedzialnych za pluripotencjalność komórek macierzystych

Jak wspomniano, VSELs wykazują ekspresję czynnika transkrypcyjnego Oct-4 na poziomie zarówno mRNA, jak i białka. Czynniki te są charakterystyczne dla embrionalnych komórek macierzystych. Ostatnio pojawiły się wątpliwości, czy pozytywny wynik reakcji PCR dla genu *Oct-4* nie jest skutkiem amplifikacji pseudogenów dla *Oct-4*. Aby wykluczyć wykrywanie obecności pseudogenów *Oct-4* i pokazać rzeczywistą ekspresję genu *Oct-4* w komórkach VSELs, oceniliśmy stan epigenetyczny promotora genu *Oct-4* w tych komórkach. Populacja komórek Sca-1⁺Lin⁻CD45⁻ VSELs została podwójnie oczyszczona i określono w niej poziom metylacji promotora genu *Oct-4*, przy użyciu techniki sekwencjonowania poprzedzonego modyfikacją DNA w reakcji z wodorosiarczynami. Zauważono, że promotor *Oct-4* w komórkach VSELs nie jest zmetylowany, podobnie jak w komórkach izolowanych z ustalonych linii komórek embrionalnych, a poziom metylacji wynosi odpowiednio 18% i 13,2%. Następnie, aby dostarczyć bezpośredniego dowodu na obecność w komórkach VSELs aktywnego/otwartego promotora *Oct-4*, użyto metody immunoprecypitacji chromatyny za pomocą przeciwciał skierowanych

przeciwko odpowiednim białkom histonów – ChIP (ang. *chromatin immunoprecipitation assay*) w połączeniu z reakcją PCR mającą wykryć sekwencje DNA w promotorze związane z tymi białkami. Metoda ta pozwala na określenie asocjacji chromatyny z białkiem histonowym H3Ac (ang. *Acetylated-histone-3*) oraz białkiem histonowym H3K9me2 (ang. *dimethylated-lisine-9 histone-3*), które są znacznikami molekularnymi odpowiednio otwartego (H3Ac) i zamkniętego (H3K9me2) typu chromatyny. Okazało się, że chromatyna promotora *Oct-4* jest połączona głównie z H3Ac, a połączenie z H3K9me2 jest stosunkowo niewielkie.

Ponieważ komórki VSELs wykazują także ekspresję białka Nanog, określono również wpływ czynników epigenetycznych na promotor genu *Nanog* w tych komórkach. Okazało się, że poziom metylacji tego genu sięga 50%, jednakże dane otrzymane w reakcji ilościowego ChIP potwierdziły, iż pomimo tego stosunek H3Ac/H3K9me2 wskazuje na otwarty typ chromatyny genu *Nanog*. Opierając się na wynikach testów można stwierdzić, iż komórki VSELs wykazują ekspresję *Oct-4* i *Nanog*. Wykazano także ekspresję w komórkach VSELs innych markerów komórek PSCs, takich jak antygen SSEA-4, oraz czynników transkrypcyjnych Sox2 i Klf4. Poziomy ekspresji transkryptów *Oct-4* i *Nanog* w VSELs wynoszą odpowiednio 50% i 20% w porównaniu z komórkami ustalonymi linii embrionalnej myszy ESC-D3. Podobny poziom zanotowano dla transkryptów Sox2, a 3,5 razy wyższy dla transkryptów Klf4 w porównaniu z ESC-D3.

Ekspresja markerów linii epiblastu

Ponieważ, jak uważamy, VSELs mogą być komórkami macierzystymi wywodzącymi się z epiblastu, początkowo skupiliśmy się na ekspresji w tych komórkach genów charakterystycznych dla komórek macierzystych wywodzących się z tej części zarodka (*Gbx2*, *Fgf5* oraz *Nodal*). Wiadomo, że ekspresja *Gbx2*, *Fgf5* i *Nodal* jest podwyższona w komórkach macierzystych wywodzących się z epiblastu – EpiSC (ang. *Epiblast Stem Cells*), ale jest niższa w komórkach embrionalnych izolowanych z ICM [54]. Wykazaliśmy, że w VSELs ekspresja *Gbx2*, *Fgf5* i *Nodal* jest znacznie podwyższona, natomiast ekspresja genów *Rex1/Zfp42* charakterystyczna dla komórek embrionalnych węzła blastocysty jest niższa, co potwierdza tezę, iż VSELs są bardziej zróżnicowane niż wywodzące się z węzła blastocysty embrionalne komórki macierzyste. Tak więc VSELs mają ekspresję niektórych markerów podobną do komórek wywodzących się z epiblastu.

Ekspresja markerów linii zarodkowej

Oceniono również związek VSELs z wywodzącymi się z epiblastu komórkami PGCs i za pomocą reakcji RQ-PCR stwierdziliśmy ekspresję wielu genów charakterystycznych dla tej linii (np. *Stella*, *Prdm14*, *fragilis*, *Blimp1*, *Nanos3* i *Dnd1*). Ponadto ekspresja genów *Stella*, *Blimp1* oraz *Mvh* została potwierdzona na poziomie białka w barwieniu immunofluorescencyjnym w czystej populacji VSELs. Stwierdziliśmy również za pomocą reakcji ChIP, iż promotor genu *Stella* w

komórkach VSELs ma otwarty charakter chromatyny (asocjacja promotora z H3Ac i H3K4me3). Uzyskane przez nas wyniki pokazują, iż VSELs wykazują ekspresję genów oraz wykazują strukturę chromatyny promotora genu *Stella* charakterystyczne dla linii komórek zarodkowej/germinalnej.

Komórki VSELs wykazują również ekspresję *Dppa2*, *Dppa4* i *Mvh*, które są charakterystyczne dla późnych, migrujących PGCs, jednakże nie wykazują ekspresji genów: *Sycp3*, *Dazl* i *LINE1*, których ekspresja jest wysoka w PGCs, które zakończyły migrację (ang. *postmigratory PGCs*) i zasiedliły już gonady.

EPIGENETYCZNE ZMIANY PIĘTNOWANYCH GENÓW REGULUJĄCYCH PLURIPOTENCJĘ VSELs

Szybko rozwijająca się medycyna regeneracyjna poszukuje bezpiecznych efektywnych źródeł pluripotencjalnych komórek macierzystych. Z definicji, pluripotencjalne komórki macierzyste powinny: (i) dawać początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych; (ii) mieć zdolności tworzenia blastocysty; (iii) tworzyć potworniki po podaniu zwierzętom eksperymentalnym. Niestety, w przeciwieństwie do unieśmiertnionych linii komórkowych embrionalnych komórek macierzystych czy indukowanych komórek pluripotencjalnych, dwa ostatnie kryteria nie zostały do tej pory spełnione przez żadną z linii pluripotencjalnych komórek macierzystych izolowanych z dorosłych tkanek. Są dwa wytłumaczenia tego zjawiska. Pierwszym może być fakt, iż komórki pluripotencjalne izolowane z dorosłych tkanek nie są w pełni pluripotencjalne; drugie to możliwość istnienia fizjologicznych mechanizmów zaangażowanych w utrzymanie tych komórek w stanie „uśpionym” w dorosłych tkankach w celu zabezpieczenia przed ich nadmierną proliferacją i ryzykiem formowania potworników.

Zakładamy, że VSELs podobnie do PGCs mogą modyfikować wzór metylacji niektórych z piętnowanych genów, co zapobiega nadmiernej ich proliferacji i tworzeniu potworników i może tłumaczyć ich stan „uśpienia” w dorosłych tkankach. Zauważyliśmy bowiem, że Oct-4⁺ VSELs nie proliferują *in vitro* oraz że uśpienie tych komórek jest epigenetycznie regulowane przez stan metylacji genów wykazujących piętno genomowe. Powszechnie wiadomo, iż piętnowane geny odgrywają kluczową rolę w embriogenezie, rozwoju płodu, totipotencjalnym stanie zygoty i odpowiadają za właściwości pluripotencjalne wczesnych komórek macierzystych. Ekspresja piętnowanych genów jest regulowana poprzez metylację DNA w tzw. różnie zmetylowanych regionach – DMRs (ang. *differential methylated regions*), które zawierają elementy *cis* bogate w CpG w swoich *loci*. Zauważyliśmy, że VSELs tuż po izolacji ze szpiku kostnego mają zdolność usuwania piętna na chromosomach pochodzących od ojca (np. *Igf2-H19*, *Rasgrf1 loci*), natomiast następuje w nich hipermetylacja niektórych genów pochodzących od matki (np. *Igf2* receptor (*Igf2R*), *Kcnq1-p57^{KIP2}*, *Peg1 loci*).

Ponieważ ojcowska ekspresja piętnowanych genów reguluje wzrastanie zarodka, a matczyna ekspresja piętnowanych genów hamuje proliferację komórek, unikalny wzór piętnowania obserwowany w VSELs ilustruje piętna hamujące wzrost w tych komórkach. Potwierdzone jest to wysoką ekspresją genów hamujących rozrost (*H19*, *p57^{KIP2}*, *Igf2R*) i zmniejszeniem ekspresji genów promujących proliferację (*Igf2*, *Rasgrf1*). Tłumaczy to stan „uśpienia” VSELs zdeponowanych w dorosłych tkankach. Wyniki te sugerują, iż epigenetyczna zmiana programu piętnowania genomowego powinna utrzymać „uśpienie” najprymitywniejszych dorosłych komórek pluripotencjalnych zdeponowanych w dorosłym organizmie i zabezpieczać je przed przedwczesnym starzeniem i tworzeniem guzów nowotworowych. Dalszych badań wymaga ocena, czy piętnowanie genomu różni się w VSELs w zależności od wieku myszy i czy zmiany epigenetyczne mogą mieć potencjalny wpływ na wspomniany wcześniej spadek liczby VSELs w wyniku starzenia organizmu.

VSELs pojawiają się w krwi obwodowej w wyniku uszkodzenia tkanek lub narządów, np. w zawale mięśnia sercowego i udarze mózgu [33,47,62]. Krążeniem VSELs zawiadują różne czynniki, takie jak: SDF-1, VEGF, HGF/SF, LIF oraz bFGF [32,34,36,37,50,65].

Dalszych badań wymaga również zbadanie związku VSELs z krążącymi we krwi obwodowej komórkami prekursorowymi gamet oraz SSCs [43] i OSCs [61] które opisał we krwi obwodowej Tilley podczas uszkodzenia jajników [23,46,58].

POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA KOMÓREK SSCs I OSE W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

Obecność markerów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych na komórkach mGS i OSE, jak i wstępne wyniki hodowli *in vitro* wskazują, iż możliwe jest otrzymanie komórek wszystkich trzech listków zarodkowych.

Wykorzystanie mGS do rekolonizacji nabłonka plemnikotwórczego jest uznanym testem biologicznym sprawdzającym, czy wyizolowane komórki są populacją SSCs. Metoda ta może być wykorzystana jako sposób oceny regeneracji nabłonka plemnikotwórczego i przywrócenie płodności samców przez SSCs i OSE i potencjalnie VSELs.

Pojawiły się także doniesienia o udanych próbach uzyskania z mGS komórek ekto-, endo- i mezodermy. Glaser i wsp. [18] stosując odpowiednie warunki hodowli po 4 dniach otrzymali prekursorzy komórek tkanki nerwowej, w tym neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [18]. Z kolei sieci połączeń synaptycznych neuronów, które wykazywały spontaniczną aktywność neuronów GABAergicznym, glutamatergicznymi, serotonergicznymi i dopaminergicznymi oraz komórki glejowe otrzymali Streckfuss-Bomeke i wsp. [55].

Możliwe jest też otrzymanie komórek mezodermy. Wu i wsp. [63] przeszczepili SSCs myszy do nerek samicy myszy, u których znaleziono komórki z chromosomem Y w nabłonku kanalików nerkowych, również podocyty w nerkach tych myszy charakteryzowały się obecnością chromosomu Y [63].

Natomiast Guan i wsp. [20] stosując metodę wiszącej kropli uzyskali z mGS kardiomiocyty. Komórki te w hodowlach wykazywały obecność specyficznych dla serca kanałów wapniowych (L-type Ca^{2+}) oraz połączeń szczelinowych. Co więcej, po przeszczepieniu tych komórek do serca myszy, komórki te dalej dzieliły się i różnicowały w komórki mięśnia sercowego [20].

Coraz więcej badań oraz doniesień na temat odnowy pęcherzyków jajnikowych oraz potencjalnych możliwości komórek izolowanych z nabłonka powierzchniowego jajnika do tworzenia nowych oocytów, stwarza nowe perspektywy w leczeniu niepłodności u kobiet z przedwczesną niewydolnością jajnika, jak i u kobiet w wieku pomenopauzalnym oraz u kobiet leczonych chemioterapią [45,45,59,66]. Najnowsze badania wskazują, iż nawet w jajniku pozbawionym pęcherzyków pierwotnych możliwe jest uzyskanie oocytów z OSE i leczenie niepłodności metodami *in vitro* [6].

Należy się spodziewać, że najbliższe lata przyniosą odpowiedź, czy komórki te znajdą faktycznie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AFLATOONIAN B, MOORE H. Germ cells from mouse and human hypothesis stem cells. *Reproduction* 2006; **132**: 699–707.
- [2] BOWEN NJ, WALKER LD, MATYUNINA LV, LOGANI S, TOTTEN KA, BENIGNO BB, MCDONALD JF. Gene expression hypothesis supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *Medical Genomic* 2009; **2**: 71–81.
- [3] BIELANSKA-OSUCHOWSKA Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol* 2006; **6**: 161–193.
- [4] BUKOVSKY A, AYALA ME, DOMINIGUEZ R, SVETLIKOVA M, SELLECK-WHITE R. Bone marrow derived cells and alternative pathways of oogenesis in adult rodents. *Cell Cycle* 2007; **15**, 6(18): 2306–2309.
- [5] BUKOVSKY A, VIRANT-KLUM I, SVETLIKOVA M, WILLSON I. Ovarian germ cells. *Methods Enzymol* 2006; **419**: 208–258.
- [6] BUKOVSKY A. Oogenesis from human somatic stem cells and a role of immune adaptation in premature ovarian failure. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; **1**(3): 289–303.
- [7] CHIARINI-GARCIA H, RAYMERAM, RUSSELL LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 2003; **126**: 669–680.
- [8] DADOUNE JP. New insight into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol* 2007; **45**(3): 141–147.
- [9] DANN CK, ALVARADO AL, MOLYNEUX LA, DENARD BS, GARBERS DL, PORTEUS MH. Spermatogonial Stem Cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during Retinoic Acid-induced differentiation. *Stem Cells* 2008; **26**: 2928–2937.
- [10] DE FELICI M. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol Hum Reprod* 2010; (w druku)
- [11] DE ROOIJ DG, MIZAK SC. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development* 2008; **135**: 2207–2213.
- [12] DE ROOIJ DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; **121**: 347–354.
- [13] DE ROOIJ DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy Res Tech* 2009; **72**: 580–585.
- [14] DE-MIGUEL MP, ARNALICH-MONTIEL F, LOPEZ-IGLESIAS P, BLAZQUEZ-MARTINEZ A, NISTAL M. Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *Int J Biol* 2009; **53**: 1529–1540.
- [15] DRIANCOURT MA, REYNAUD K, CORTVRINDT R, SMITZ J. Role of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; **5**: 143–152.

- [16] DYCE PW, WEN L, LI J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 2006; **8**(4): 384–391.
- [17] EHMCKE J, WISTUBA J, SCHLATT S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 2006; **12**(3): 275–282.
- [18] GLASER T, OPITZ T, KISCHLAT T, KONANG R, SASSE P, FLEISCHMANN BK, ENGEL W, NAYER-NIA K, BRÜSTLE O. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells* 2008; **26**: 2434–2443.
- [19] GUAN K, NAYER-NIA K, MAIER LS, WAGNER S, DRESSSEL R, LEE JH, NOLTE J, WOLF F, LI M, ENGEL W, HASENFUSS G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; **440**: 1199–1203.
- [20] GUAN K, WAGNER S, UNSÖLD B, MAIER LS, KAISER D, HEMMERLEIN B, NAYER-NIA K, ENGEL W, HASENFUSS G. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 2007; **100**: 1615–1625.
- [21] HU HM, XU FC, LI W, WU SH. Biological characteristic of spermatogonial stem cells cultured in conditions for fibroblasts. *J Clin Rehab Tiss Engin Res* 2007; **11**: 6611–6614.
- [22] IZADYAR F, PAU F, MARH J, SLEPKO N, WANG T, GONZALEZ R, RAMOS T, HOWERTON K, SAYRE C, SILVA F. Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. *Reproduction* 2008; **135**: 771–784.
- [23] JOHNSON J, BAGLEY J, SKAZNIK-WIKIEL M, ADAMS GB, NIKURA Y, TSCHUDY KS, TILLY JC, CORTES ML, FORKET R, LACOMINI J, SCADDEN DT, TILLY JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; **122**: 303–315.
- [24] JONSON J, CANNING J, KANEKO T, PRU JK, TILLY JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; **428**: 145–150.
- [25] JORDAN HE. The history of the primordial germ cells in the loggerhead turtle embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1917; **3**: 271–275.
- [26] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, LEE J, YOSHIMOTO M, OGONUKI N, MIKKI H, BABAS S, KATO T, KAZUKI Y, TOYOKUNI S, TOYOSHIMA M, NIVA O, OSHIMURA M, HEIKE T, NAKAHATA T, ISHINO F, OGURA A, SHINOHARA T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; **119**: 1001–1012.
- [27] KANATSU-SHINOHARA M, MIKI H, INOUE K, OGONUKI N, TOYOKUNI S, OGURA A, SHINOHARA T. Long-term culture of mouse male Germ Line Stem Cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; **72**: 985–991.
- [28] KERR CL, HILL CM, BLUMENTHAL PD, GEARHART JD. Expression of Pluripotent Stem Cell Markers in the Human Fetal Testis. *Stem Cells* 2008; **26**: 412–421.
- [29] KERR JB, DUCKETT R, MYERS M, BRITT KL, MLADENOVSKA T, FINDLAY JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of hypothesis follicle supply. *Reproduction* 2006; **132**: 95–109.
- [30] KLICH I, WALAT ST, RATAJCZAK J, KUCIA M, RATAJCZAK MZ. Małe komórki macierzyste przypominające komórki embrionalne izolowane z tkanek dorosłych – obecny stan badań. *Post Biol Kom* 2010; **1**: 63–87.
- [31] KUBOTA H, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Cell Biol* 2004; **101** (47): 16489–16494.
- [32] KUCIA M, MACHALIŃSKI B, RATAJCZAK MZ. The developmental deposition of epiblast/germ cell-line derived cells in various organs as a hypothetical explanation of stem cell plasticity? *Acta Neurobiol Exp* 2006; **66**: 331–341.
- [33] KUCIA M, RATAJCZAK MZ. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance. *Dev Dyn* 2007; **236** (12): 3309–3320.
- [34] KUCIA M, RATAJCZAK MZ. Stem cells as a two edged sword – from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol* 2006; **57**: 5–16.
- [35] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL FR, ZUBA-SURMA E, MAJKAM, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4(+) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857–869.
- [36] KUCIA M, WOJAKOWSKI W, RECA R, MACHALIŃSKI B, GOŹDZIK J, MAJKA M, BARAN J, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp* 2006; **54**(2): 121–135.

- [37] KUCIA M, ZUBA-SURMA E, WYSOCZYŃSKI M, DOBROWOLSKA H, RECA R, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *J Physiol Pharmacol* 2006; **57**: 5–18.
- [38] LINHER K, DYCE P, JULANG L. Primordial germ cell-like cells differentiated *in vitro* from skin-derived stem cells. *PLoS One* 2009; **4**(12): e8263.
- [39] LIU Y, GAO L, ZUBA-SURMA E, PENG X, KUCIA M, RATAJCZAK MZ, WANG W, ENZMANN V, KAPLAN HJ, DEAN DC. Identification of small Sca1(+), Lin(-), CD45 (-) multipotential cell in the neonatal murine retina. *Exp Hematol* 2009; **37**: 1096–1107.
- [40] MARDANPOUR P, GUAN K, NOLTE J, LEE JH, HASENFUSS G, ENGEL W, NAYERNIA K. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J Anat* 2008; **213**: 26–29.
- [41] NAGANO MC. Homing Efficiency and Proliferation Kinetics of Male Germ Line Stem Cells Following Transplantation in Mice. *Biol Reprod* 2003; **69**: 701–707.
- [42] NAYERNIA K, LEE JH, DRUSENHEIMER N, NOLTE J, WULF G, DRESSEL R, GROMOLL J, ENGEL W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; **86**: 654–663.
- [43] OATLEY JM, AVARBOCK MR, TELARANTA AI, FEARON DT, BRINSTER RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *PNAS* 2006; **103**(25): 9524–9529.
- [44] OATLEY JM, OATLEY MJ, AVARBOCK MR, TOBIAS JW, BRINSTER RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 2009; **136**: 1191–1199.
- [45] OKTAY K, OKTEM O. Regeneration of oocytes after chemotherapy: connecting the evidence from mouse to human. *J Clin Oncol* 2007; **25**(22): 3185–3187.
- [46] OKTEM O, OKTAY K. Current knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. *Birth Defect Research* 2009; **87**: 90–95.
- [47] PACZKOWSKA E, KUCIA M, KOZIARSKA D, HALASA M, SAFRANOW K, MASIUK M, KARBICKA A, NOWIK M, NOWACKI P, RATAJCZAK MZ, MACHALIŃSKI B. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke* 2009; **40**.
- [48] RATAJCZAK M, ZUBA-SURMA EK, SHIN DM, RATAJCZAK J, KUCIA M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissue and longevity. *Exp Gerontology* 2007; **43**: 1009–1017.
- [49] RATAJCZAK MZ, MACHALIŃSKI B, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J, KUCIA M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-49(+) stem cells in adult bone marrow and other tissue. *Leukemia* 2007; **21**(5): 860–867.
- [50] SCHIOPPA T, URANCHIMEG B, SACCANI A, BISWAS SK, DONIA A, RAPISARDA A, SACCANI S, NEBULONI M, VAGO L, MANTOVANIA A, MELILLO G, SICAA. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003; **198**(9): 1391–1402.
- [51] SCHOLER HR, WU G. Oocytes originating from skin? *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 313–314.
- [52] SEANDEL M, JAMES D, SHMELKOV SV, FALCIATORI I, KIM J, CHAVALA S, SCHERR DS, ZHANG F, TORRES R, GALE NW, RAFII S. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 2007; **449**: 346–350.
- [53] SHAROVA LV, SHAROV AA, PIAOY, SHAIK N, SULLIVAN T, STEWART CL, HOGAN BLM, KO MSH. Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains. *Dev Biol* 2007; **307**(2): 446–459.
- [54] SHIN DM, LIU R, KLICH I, WU W, RATAJCZAK J, KUCIA M, RATAJCZAK MZ. Molecular Signature of adult bone marrow-purified Very Small Embryonic-Like Stem Cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia* 2010; (in press) doi: 10.1038/leu.2010.121
- [55] STRECKTFUSS-BÖMEKE K, VLASOV A, HÜLSMANN S, YIN D, NAYERNIA K, ENGEL W, HASENFUSS G, GUAN K. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res* 2009; **2**(2): 139–154.
- [56] SZOTEK PP, HANG HL, BRENNAND K, FUJINO A, PIERETTI-VANMARCKE R, CELSO CL, DOMBKOWSKI D, PREFFER F, COHEN KS, TEIXEIRA J, DONOHOE PK. Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristic. *PNAS* 2008; **105** (34): 12469–12473.
- [57] TEGELBOSCH RAJ, DE ROOIJ DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; **290**: 193–200.
- [58] TILLY JL, JOHNSON J. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary. *Cell Cycle* 2007; **6**: 879–883.

- [59] TILLY JL, TELFER EE. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer toward control of a female biological clock. *Mol Hum Reprod* 2009; **15**(7): 393–398.
- [60] UPADHAY S, ZAMBONI L. Ectopic germ cells: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 6584–6588.
- [61] VIRANT-KLUN I, ZECH N, ROŽMAN P, VOGLERA, CYJETICANIN B, KLEMENC P, MALICEV E, MEDEN-VRTOVEC H. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation* 2008; **76**(8): 843–856.
- [62] WOJAKOWSKI W, TENDERAM, KUCIA M, ZUBA-SURMA E, PACZKOWSKA E, CIOSEK J, HAŁA-SA M, KRÓL M, KAZMIERSKI M, BUSZMAN P, OCHAŁA A, RATAJCZAK J, MACHALIŃSKI B, RATAJCZAK MZ. Mobilization of bone marrow-derived Oct-4 SSEA-4 very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**: 1–9.
- [63] WU D, HE D, LI X, LIU Z. Differentiations of transplanted mouse spermatogonial stem cells in the adult mouse renal parenchyma *in vivo*. *Act Pharmacol Sin* 2008; **29**(9): 1029–1034.
- [64] YU J, THOMSON JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* 2008; **22**: 1987–1997.
- [65] ZHANG H, VUTSKITS L, PEPPER MS, KISS JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2- stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 2003; **163**(6): 1375–1384.
- [66] ZHOU K, YUAN Z, YANG Z, LUO H, SIM K, ZHOU L, XING J, SHI I, YU Q, ZHANG Y, HOU R, WU J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 631–636.
- [67] ZUBA-SURMA EK, KUCIA M, WU W, KLICH I, LILLARD JW., RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: image stream-based morphological analysis and distribution studies. *Cytometry A* 2008; **73A**: 1116–1127.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 04.06. 2010 r.

Przyjęto: 07.08. 2010 r.

*Prof. Mariusz Z. Ratajczak oraz Dr n. med. Katarzyna Piotrowska,
Zakład Fizjologii Katedry Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej,
70-111 Szczecin, ul Powstańców Wlkp. 72.*

*E-mail: mariuszratajczak@yahoo.com oraz
piot.kata@gmail.com*