



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"

**DOTTORATO DI RICERCA IN
EMBRIOLOGIA MEDICA**

XIX° CICLO

**Meccanismi di controllo della proliferazione delle
cellule germinali primordiali**

Tesi di Dottorato di Ricerca di

Eleonora Sorrentino

COORDINATORE

**Università degli Studi di Roma
Tor Vergata**

Prof. Raffaele Geremia
Dipartimento di Sanità Pubblica e
Biologia Cellulare

RELATORE

**Università degli Studi di Roma
Tor Vergata**

Prof. De Felici Massimo
Dipartimento di Sanità Pubblica e
Biologia Cellulare

Roma, Maggio 2007

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 3
IL CICLO CELLULARE.....	pag. 3
I CHECKPOINTS.....	pag. 5
I sensori.....	pag 6
I mediatori.....	pag .7
I trasduttori.....	pag 7
Gli effettori.....	pag 10
CELLULE EMBRIONALI STAMINALI.....	pag 12
CELLULE GERMINALI PRIMORDIALI.....	pag 14
CELLULE GERMINALI EMBRIONALI.....	pag 16
Caratteristiche del ciclo cellulare delle cellule ES e EG.....	pag 17
BASE RAZIONALE E SCOPO DEL LAVORO.....	pag 18
MATREIALI E METODI.....	pag 20
Isolamento delle cellule germinali.....	pag 20
Coltura delle linee cellulari ES , EG e STO.....	pag 21
cDNA microarray.....	pag 21
Analisi dei Microarray.....	pag 22
RT-PCR e Real time PCR.....	pag 23
Citofluorimetria	pag 23
RISULTATI.....	pag 25
Confronto dell'espressione di cDNA di geni del ciclo cellulare nelle PGCs, cellule ES ed EG.....	pag 25
La coltura delle PGCs in presenza di LIF, KL e bFGF causa aumento dei livelli di espressione del trascritto di Timp3	pag28
Confronto PGCs, prospermatogoni e ovociti.....	pag 29
DISCUSSIONE.....	pag 32
Espressione di cDNA di geni del ciclo cellulare nelle PGCs, cellule ES ed EG.....	pag 32
Confronto PGCs, prospermatogoni e ovociti.....	pag 33
CONCLUSIONI.....	pag 39
FIGURE E TABELLE.....	pag 40
BIBLIOGRAFIA.....	pag 50

INTRODUZIONE

La gametogenesi nei mammiferi si svolge attraverso una serie di complessi processi comprendenti sia la mitosi che la meiosi. La divisione meiotica è ristretta alle cellule germinali e richiede meccanismi di controllo del ciclo cellulare che non esistono nelle cellule somatiche. Anche se le cellule germinali maschili e femminili attraversano gli stessi stadi della meiosi, i tempi e le modalità con cui questi eventi si susseguono nonché probabilmente i meccanismi di controllo sono differenti nei due sessi.

La genesi delle cellule germinali inizia nei primissimi stadi dello sviluppo embrionale intorno al settimo giorno post coitum (dpc) nel topo (periodo pregastrulazione) e nella terza settimana nell'uomo, con la formazione delle cellule germinali primordiali (PGCs). Tali cellule possono essere identificate morfologicamente e tramite metodi istochimici (attività dell'enzima fosfatasi alcalina) o anticorpi specifici, in una regione extraembrionale alla base dell'allantoide. Recenti studi nel topo, hanno mostrato che la linea germinale viene determinata intorno a 6.25dpc allorché in circa sei cellule dell'epiblasto prossimale inizia ad essere espresso *Blimp1*, un fattore di repressione dei geni *Hox* (Saitou M. et al 2005). Queste cellule, in cui subito dopo inizia ad esprimersi la proteina adesiva *Fragilis*, migrano attraverso la linea primitiva nel mesoderma extraembrionale alla base dell'allantoide dove intorno a 7.25 dpc vengono specificate in PGCs mediante l'induzione di diversi fattori di trascrizione (*Nanog*, *Nanos2*, *Sox2*), la proteina adesiva *E-caderina*, un altro fattore di repressione genica, *Stella*, l'enzima fosfatasi alcalina *TNAP* e il recettore tirosin chinasi *c-Kit*. Dopo la migrazione prima nella parete dell'intestino primitivo posteriore e quindi nelle creste gonadiche (9-11.5 dpc), le PGCs differenziano in oogoni nelle femmine ed in prospermatogoni nei maschi. Al termine di un periodo di intensa proliferazione che porta il numero delle cellule germinali a circa 25.000 a 13.0 dpc (Tam and Snow, 1981), gli oogoni entrano in meiosi divenendo ovociti primari. I prospermatogoni al termine della mitosi, non iniziano la meiosi, ma entrano in una fase di quiescenza del ciclo cellulare arrestandosi in G1/G0.

Se coltivate in presenza di alcuni fattori di crescita tuttavia, quali il ligando di *c-Kit* (*KL*), il fattore di inibizione leucemica (*LIF*) e il fattore basico di crescita dei fibroblasti (*bFGF*), le PGCs hanno la peculiarità di dare vita a linee di cellule staminali pluripotenti chiamate cellule germinali embrionali (*EG*) (Resnick et al, 1992, Matsui et al 1992, Durcova-Hills et al 2001). Le cellule *EG* sono molto simili alle cellule embrionali staminali (*ES*) (per una rassegna vedi, Donovan and De Miguel, 2003). Entrambe i tipi cellulari crescono rapidamente e in modo permanente "in vitro" mantenendo le loro caratteristiche di "self renewing" e pluripotenza.

IL CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare nelle cellule somatiche è definito come una sequenza di transizioni che attraverso quattro distinte fasi porta una cellula madre a dare origine a due cellule figlie. Le quattro fasi del ciclo cellulare includono la fase S, durante la quale avviene la sintesi del DNA e la fase M, durante la quale la cellula madre si divide nelle due cellule figlie che ereditano l'identico genoma della madre. Tra questi due stadi esistono due periodi intermedi o "gap", ossia la fase G₂ (S/M) e quella G₁ (M/S). Si tratta di due fasi di controllo che richiedono una serie di attività enzimatiche sequenziali regolate in modo complesso. Il sistema di regolazione primario che controlla la progressione nelle diverse fasi, consiste di una subunità regolatrice, la "ciclina" e di una subunità catalitica, la "chinasi ciclina dipendente" (cdk). Esistono sottoclassi di cicline suddivise dalla "A" alla "H" in base alla loro sequenza amminoacidica ed alla loro comparsa durante la progressione del ciclo cellulare (Sherr 1993; Pines 1995; Roberts 1999). Le cicline A, B e D posseggono a loro volta diverse sottoclassi.

La progressione del ciclo cellulare è regolata dall'attività dei complessi cicline e cdk. La concentrazione delle cicline è regolata dal loro livello di trascrizione e di proteolisi. La regolazione trascrizionale può dipendere da diversi fattori. Un esempio è rappresentato dalle cicline D la cui espressione in generale è stimolata dai fattori di crescita in assenza dei quali esse non vengono trascritte e quelle già presenti vengono degradate provocando l'arresto della cellula nella fase G₁. Le cdk, appartengono ad una famiglia di serine/treonine chinasi. Ad oggi sono state identificate nove distinte cdk nei mammiferi e non per tutte si conosce la ciclina che ad essa si associa. Tutte le cdk posseggono un dominio catalitico conservato e siti di fosforilazione che possono modulare la loro attività. L'attivazione delle cdk, infatti non dipende solamente dalla loro espressione né esclusivamente dalla loro associazione alla ciclina (Pines, 1995), ma è finemente controllata dal tipo di fosforilazione cui sono soggette che può avere un effetto attivatore o inibitore. Un esempio è rappresentato dal complesso MPF formato dalla ciclina B e dalla cdk1. Questo complesso non è attivo fino alla fase di transizione G₂/M pur essendo la cdk1 presente durante le diverse fasi del ciclo. Ciò avviene perché durante le fasi S e G₂, la cdk1, pur complessata alla ciclina B, è fosforilata in tre siti specifici, due dei quali sono inibitori. Nel momento in cui ha inizio la fase M, una proteinfosfatasi della famiglia Cdc25, opera una defosforilazione nei siti inibitori che porta all'attivazione dell'MPF. Nel topo, i tre geni codificanti per le Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), sono espressi in modo temporalmente sovrapposto, ma sono coinvolti in pattern diversi (Kakizuka et al. 1992; Nargi and Woodford-Thomas

1994; Wu and Wolgemuth 1995). Esiste un quarto livello di controllo dell'attività dei complessi cicline/cdks, rappresentato da proteine di basso peso molecolare (16kDa e 57kDa) chiamate CKIs che hanno il ruolo di inibire le chinasi (Sherr and Roberts, 1995, 1999). Le CKIs sono suddivise in base alla loro struttura e alle Cdks che inibiscono. Esse includono la famiglia CIP/KIP (formato da p21CIP/WAF1, p57kip2, p27kip1) e quella INK (formata da p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d). Le CKIs inibiscono in modo stechiometrico i complessi ciclina/cdk, ma possono inibire anche le cdks non complessate. La famiglia delle INK contiene particolari sequenze chiamate anchirine e lega solo le cdk4 e cdk6, ma non le altre Cdks né le cicline D. Un' ulteriore regolazione del complesso cicline/cdks, è rappresentato dalla loro localizzazione cellulare. Un esempio è fornito dalla ciclina B1 fosforilata che si accumula nel nucleo impedendo l'attivazione dell'MPF fino a quando non venga traslocata nel citoplasma di seguito ad una defosforilazione. I processi più importanti che controllano la progressione del ciclo cellulare attraverso le fasi G1/S, coinvolgono il pathway del Retinoblastoma (RB1), gli inibitori p15INK4b, p16INK4a, le cicline D ed E, CDK4 e CDK6. pRB può regolare negativamente la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S nella sua forma defosforilata, mentre nella sua forma fosforilata, che si ritrova in tarda fase G1, la promuove. La forma attiva defosforilata di RB, può legare una serie di fattori di trascrizione tra cui alcuni membri della famiglia degli E2fs (Goodrich, D. W., 1993, Hatakeyama, M et al, 1994, Nevins, J. R. 1992, Sherr CJ 1994). La fosforilazione di Rb nella media-tarda fase G1, permette il rilascio di una serie di fattori di trascrizione E2fs, importanti regolatori dei geni che controllano la transizione G1/S e la successiva sintesi del DNA. Le proteine p15INK4b e p16INK4a legano ed inibiscono l'attività catalitica del complesso ciclina D/CDK4-6 che fosforila la proteina RB1, che di seguito rilascia fattori di trascrizione come gli E2Fs (Serrano M et al 1993, Hannon GJ 1994). Le proteine p15INK4b e p16INK4a regolano anche negativamente la proliferazione cellulare mediando l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 (Hannon GJ 1994, Sherr CJ 1996).

I CHECKPOINTS

Le cellule posseggono molti sistemi di controllo del ciclo cellulare chiamate "checkpoints", attivati in momenti diversi del ciclo e in grado di bloccare la progressione nel caso in cui si verificano degli errori in qualche fase di tale processo. Uno di questi si verifica alla fine della fase S quando le cellule monitorano l'eventuale presenza di frammenti di Okazaki sullo strand complementare durante la fase di replicazione del DNA (incompleta duplicazione del DNA). Il meccanismo non consente la progressione fin tanto che tali frammenti sono presenti.

Altri checkpoints hanno lo scopo di controllare l'integrità del DNA (DNA damage). Questi si attivano prima dell'ingresso nella fase S (G1), durante la fase S e dopo la replicazione del DNA (G2). Infine ci sono gli "spindle checkpoints" (M checkpoints) che servono a monitorare eventuali difetti dell'attacco delle fibre cromosomiche al cinetocore, nel qual caso provocano l'arresto in metafase fino a che non avvenga la corretta connessione; essi verificano anche che gli allineamenti dei cromosomi siano corretti. In generale i checkpoints, oltre che regolare la progressione del ciclo cellulare e attivare meccanismi di correzione dei difetti, nel caso di danni non riparabili sono in grado di attivare vie molecolari che portano alla morte delle cellule. Questi processi vanno sotto il nome di apoptosi cellulare da cause intrinseche. Per la loro rilevanza per i risultati del presente lavoro che discuteremo più avanti, nei paragrafi seguenti tratteremo in particolare i checkpoints del DNA damage. Questi si avvalgono dell'intervento di:

- 1) Proteine "sensore" del danno come il complesso Rad9-Rad1-Hus (9-1-1) e il complesso Rad-RCF
- 2) Proteine "mediatrici" come le proteine BRCT
- 3) Proteine "trasduttrici" come ATM, ATR, Chk1 e Chk2.
- 4) Proteine "effetttrici" come Cdc25, wee1 e p53 che inattivano le cdks inibendo la progressione del ciclo cellulare e che come nel caso di p53 possono attivare l'apoptosi

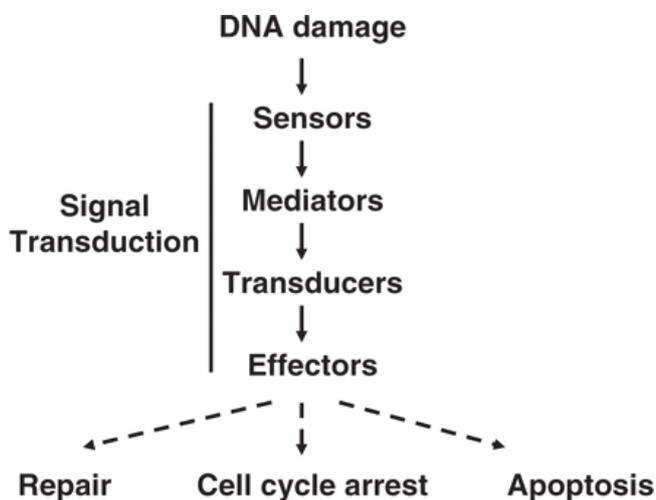


FIG. 1

I sensori

Molti studi dai lieviti all'uomo hanno dimostrato che Rad9, Rad1, Hus1 (Parrilla-Castellar, 2004) e Rad17, sono essenziali per il "signaling" del checkpoint. Sia nell'uomo che nel lievito Rad9, Rad1 ed Hus1 formano un complesso eterotrimerico (il complesso 9-1-1) la cui struttura ricorda quella del "proliferating nucleus antigen" (PCNA) (Shiomi, Y. et al 2002). Rad 17 interagisce con quattro "fattori di replicazione" (RFC), Rfc2, Rfc3, Rfc4 ed Rfc5 per formare il complesso RFC che agisce come un complesso attivatore ed è correlato al complesso attivatore PCNA (Griffith, J.D., et al 2002; Kondo, T. et al 1999; Green, C.M. et al. 2000; Naiki, T. et al 2000). Se il DNA è danneggiato, il complesso 9-1-1 viene reclutato al sito danneggiato sotto il controllo del complesso Rad17 (Kondo, T. et al 2001; Melo, J.A. et al. 2001). Il complesso lega la cromatina e facilita la fosforilazione mediata dall' Ataximia telangiectasia (ATM) e Rad-3-related (ATR) e ataxia telangiectasia mutated (ATM).

I mediatori

Nei mammiferi ci sono quattro tipi di proteine mediatrici che contengono domini ripetuti al C-terminale BRCA (BRCT) che interagiscono con proteine/fosfoproteine di interazione (Manke, I.A. et al 2003; Yu, X. et al 2003). I mediatori del DNA damage checkpoint 1 (MDC1) funzionano come ponti molecolari tra l'isoforma γ dell' istone H2A (γ H2AX) e le proteine Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1) nel complesso MRE11-Rad50-NBS1 (MRN). Diversamente dalle proteine "sensore" che si accumulano sul sito danneggiato del DNA in modo ATM-indipendente, il reclutamento delle proteine "mediatrici" che formano dei "foci" microscopicamente visibili dipende dalla fosforilazione dell'istone γ H2AX mediata da ATM (Mochan, T.A. et al 2004, Stucki, M. and Jackson, S.P. 2004, Lukas, C. et al 2003, Lukas, C. et al 2004) che modifica, marcandole, le regioni di cromatina che presentano aperture dell'ordine di megadalton su doppi strands di DNA (Rogakou, E.P. et al 1999).

I trasduttori

ATM e ATR

Nei mammiferi i segnali recepiti dai "sensori" sono rapidamente trasdotti da ATM ed ATR. Entrambe sono proteine molto grandi (350kDa e 303kDa rispettivamente) che presentano una omologia con la fosfoinositide 3 chinasi (PIKK) e fosforilano un gran numero di substrati. Nell'uomo mutazioni di ATM causano l' ataxia talagiectesia, una rara malattia autosomale recessiva, compatibile con la sopravvivenza, suggerendo che ATM, pur importante, non sia essenziale per il normale svolgimento del

ciclo cellulare ed il differenziamento (Shiloh, Y. and Kastan, M.B. 2001). L'attività chinasi basale di ATM è minima, ma può essere stimolata "in vivo" da agenti che inducono double strand breaks (DSBs). ATM attivata fosforila molte proteine tra cui BRCA1 (Cortez, D. et al 1999), NBS1 (Lim, D.S. 2000), Chk2 e p53 (Banin, S. et al. 1998, Canman, C.E. 1998) così come se stessa (Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003). Recentemente l'identificazione di un sito di fosforilazione (Ser 1981) su ATM indotto da un danno ha rivelato un nuovo meccanismo di regolazione di ATM (Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003). In condizioni normali ATM esiste sotto forma di omodimero in cui il dominio chinasi è fisicamente inibito dallo stretto contatto intermolecolare con una proteina sita intorno alla Ser1981. I DSBs causano un cambio conformazionale di ATM che stimolano la chinasi ad autofosforilare la Ser1981 causando la dissociazione dell'omodimero. L'attività chinasi di ATM è anche regolata dal legame a MRE11 che aumenta la sua capacità di fosforilare i substrati "in vitro" (Lee, J.H. and Paull, T.T. 2004). Poiché ATM non è in grado di essere reclutato nei DSBs si pensa che il complesso MRE11–Rad50–NBS1 (MRN) favorisca l'accumulo di ATM in questi siti (Kitagawa, R et al 2004, Uziel, T. et al 2003, Carson, C.T. et al 2003, Horejsi, Z. et al 2004).

ATR è stato scoperto nel genoma umano come un omologo di ATM e di SpRad3 (da qui il nome di ATR) (Cimprich, K.A. et al 1996). Diversamente da ATM, la mancanza di ATR nel topo causa letalità embrionale, mentre una sua mutazione causa una sua parziale perdita di funzione che comporta la comparsa di un disordine autosomale recessivo che prende il nome di sindrome di Seckel (O'Driscoll, M. 2003). Come ATM, ATR è in grado di fosforilare residui di serina e treonina, ma diversamente da quest'ultimo, non si rilevano cambiamenti misurabili della sua attività chinasi in conseguenza di un danno al DNA, suggerendo che ATR possa normalmente svolgere un'attività chinasi e che il suo ruolo nello specifico sia correlato alla sua localizzazione nella cellula. Nell'uomo ATR esiste sotto forma di un complesso stabile con ATRIP, un potenziale partner regolativo (Cortez, D 2001, Unsal-Kacmaz, K. and Sancar, A. 2004). Poiché RPA, una ssDNA binding protein, stimola "in vitro" il legame di ATRIP all'ssDNA (Zou, L. and Elledge, S.J. 2003), è possibile che il complesso ATR-ATRIP sia reclutato sui siti del DNA danneggiato grazie al legame di ATRIP all'RPA.

Una volta che ATR attivato è traslocato sui foci di replicazione del DNA, può fosforilare ed attivare Chk1. Questo modello sarebbe anche consistente con l'osservazione che Chk1 è essenziale per la vitalità embrionale (Takai, H 2000; Liu, Q. 2000). ATR sembra comunque essere una chinasi multifunzionale che svolge molteplici ruoli nella regolazione di molti eventi tra la fase S e quella M. Le "checkpoint kinases" Chk1 e Cds (Chk2) sono considerate chinasi essenziali dell'arresto del ciclo cellulare che si verifica in G2/M in risposta ad un danno al DNA e/o per incompleta replicazione del DNA (Walworth, N 1993; Murakami, H. and Okayama, H. 1995) come mostrato dallo studio dei topi Chk1-deficienti (Takai, H. 2000; Liu, Q. 2000). Chk1 è fosforilato in Ser317/345 in risposta al danno al

DNA. Questa fosforilazione manca in assenza di ATR (Liu,Q. 2000) ed è marcatamente inibita nelle cellule con una ridotta quantità di Rad17 (Zou,L 2002) o mancanti di Hus1 (Weiss,R.S 2002). Topi Chk1-deficienti muoiono a stadi embrionali precoci presentando delle grosse anomalie nei nuclei (Takai,H. 2000; Liu,Q 2000), suggerendo che, come ATR, Chk1 giochi un ruolo importante per il ciclo cellulare. Coerentemente con questa osservazione, la mancanza di Chk1 porta ad un prematuro inizio della mitosi attraverso la defosforilazione di Cdc2 in Tyr15 (Chen,M.S 2003).

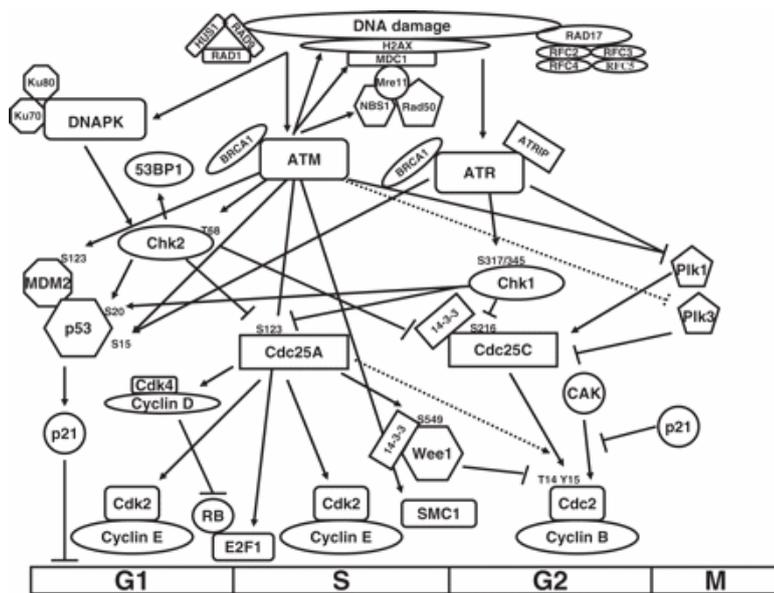


FIG. 2

Recenti studi effettuati su ovociti di “Xenopus”, hanno dimostrato che Chk1, ma non Chk2, è in grado di fosforilare la famiglia delle Cdc25 ed inibire la loro attività fosfatase impedendo l’interazione tra le Cdc25 ed i complessi ciclina/Cdk. Poiché Chk1 e non Chk2 è indispensabile per l’arresto del ciclo cellulare in risposta ad uno stress genotossico, questa fosforilazione potrebbe essere importante per il “signaling” del checkpoint. Diversamente da Chk1, Chk2 non è indispensabile per lo sviluppo prenatale (Hirao,A 2000, Takai,H 2002). Dato che Chk2 viene attivato dalla fosforilazione in treonina 68 in modo ATM dipendente, si deduce che esso è implicato nel signaling del danno DNA. Analisi biochimiche rivelano che Chk2 attivato fosforila Cdc25A, Cdc25C, BRCA1 e p53. Lo studio di topi Chk2-deficienti rivela che questo enzima è coinvolto principalmente nell’apoptosi p53-dipendente, ma non nell’arresto in G2/M causato da DNA damage (Takai,H, 2002). La funzione di ATM-Chk2 nel checkpoint della fase S riguardante il DNA damage è comunque importante, poiché la fosforilazione di Cdc25A da inizio alla sua ubiquitinizzazione e degradazione (Falck,J. 2001). Nelle cellule mancanti di Chk2 si osserva la non

indispensabilità di quest'ultima nel checkpoint della fase S, pertanto possiamo ritenere che non è ancora del tutto chiaro il suo ruolo nella fase di arresto del ciclo cellulare a seguito di un danno al DNA.

Gli effettori

p53

La proteina p53 gioca un ruolo centrale nella decisione di una cellula di arrestare il ciclo cellulare o andare incontro ad apoptosi a seguito di stress, incluso il danno al DNA, l'ipossia e l'attivazione di oncogeni (Green SL 1998, Prives,C 1999, Vousden,K.H. 2000). La quantità e l'attività trascrizionale di p53 è regolata da modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione l'acetilazione, e l'interazione con le proteine SUMO (sumorilazione) e Nedd8 (neddarilazione) (Appella,E 2001). Nelle cellule normali, i livelli della proteina p53 sono bassi a causa della ubiquitinizzazione mediata da Mdm2 e la degradazione via proteosomica. Mdm2 regola l'attività di p53 anche facilitando il suo esporto nucleare (Liang,S.H. and Clarke,M.F. 2001). A seguito di un danno al DNA, p53 viene fosforilata in diversi siti del suo dominio transattivatore incluse Ser 15 e 20 (Chehab,N.H. 1999). ATM ed ATR fosforilano p53 nella Ser15 (Banin,S 1998, Canman,C.E. 1998) e ciò porta all'inibizione dell' interazione di p53 con Mdm2 (Shieh,S.Y. 1997). Mdm2 viene fosforilata da ATM riducendo la sua capacità di promuovere il trasporto nucleo-citoplasmatico e la conseguente degradazione di p53 (Maya,R 2001). Il ruolo di p53 è altrettanto importante nell'arresto in G1 in risposta al danno al DNA. L'obiettivo trascrizionale chiave di p53 è l'inibitore p21Cdk (p21CKI) (el-Deiry,W.S 1993) che inibisce l'attività della CyclinaE-Cdk2 inibendo la transizione G1/S (Harper,J.W. 1993). P21 CKI lega anche il complesso CiclinaD-Cdk4 inibendo in questo modo la fosforilazione di Rb e quindi sopprimendo il pathway RB/E2F.

Recentemente anche la degradazione della ciclina D1 si è dimostrata importante nell'inizio dell'arresto in G1 a seguito di un danno al DNA (Agami,R. and Bernards,R. 2000). La quantità ridotta della ciclina D1 porta alla diminuzione della quantità del complesso CyclinaD1-Cdk4, portando alla redistribuzione di p21CKI sulla CyclinaE-Cdk2 e alla inibizione di quest'ultimo complesso (Agami,R. and Bernards,R. 2000, Yu,Q., Geng,Y. and Sicinski,P. 2001). Ad ogni modo la risposta è indipendente da ATM-p53. Questa osservazione insieme a quella che i topi tripli Knockout delle cicline D1, D2, D3 mostrano apparentemente un normale ciclo cellulare senza significativi difetti nelle risposte ai checkpoints (Kozar,K et al 2004), rendono evidente che non è ancora del tutto chiaro il meccanismo secondo il quale p53 regola l'inizio dell'arresto nella fase G1 in risposta al DNA damage.

La famiglia delle fosfatasi Cdc25

Nell'uomo e nel topo esistono tre fosfotirosine fosfatasi, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C che agiscono defosforilando le Cdks agendo sulle chinasi e regolando direttamente le transizioni del ciclo cellulare. Diversi studi hanno dimostrato che la fosforilazione delle Cdc25 tramite Chk1 crea dei legami per le proteine 14-3-3 e downregola la loro attività fosfataseica in molti modi incluso quello dell'inibizione diretta (Blasina, A 1999, Uto, K 2004, Lopez-Girona, A 2001) escludendo le proteine dal nucleo (Peng, C.Y 1997, Furnari, B. 1999, Graves, P.R 2000) ed iniziando la loro degradazione proteolitica (Falck, J. 2001, Kastan, M.B. 2001). Per esempio in presenza di DNA danneggiato durante la progressione della fase S, ATR-Chk1 attivato, fosforila Cdc25A causando la sua ubiquitinizzazione e degradazione. La Cdc25A downregolata sopprime l'attivazione di Cdk2 che blocca il legame di Cdc45, la proteina richiesta per l'inizio della replicazione del DNA sulla cromatina (Arata, Y 2000). Inizialmente si pensava che Cdc25C fosse l'effettore maggiore della risposta al danno al DNA nella fase G2/M, ma recenti studi mostrano che sia le cellule mancanti di Cdc25A che quelle mancanti di Cdc25B, hanno un normale checkpoint della fase G2/M (Chen, M.S 2001, Lincoln, A.J 2002), suggerendo che anche Cdc25A abbia un ruolo come effettore nel checkpoint G2/M. Inoltre l'inattivazione di Cdc25A comporta l'accumulo di Cdc2 fosforilata in Tyr15 e l'arresto mitotico

CELLULE EMBRIONALI STAMINALI

Le cellule embrionali staminali (ES) sono state originariamente derivate dalle cellule dell'embrione di topo pre-impianto allo stadio di blastocisti. (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Le cellule ES possono essere mantenute indefinitamente in coltura come una popolazione cellulare omogenea e indifferenziata e presentano molte proprietà comuni con le cellule dell'ICM, inclusa l'espressione di marker di pluripotenza come Oct4 e Nanog o anche di markers più specifici come Rex1. Le ES sono in grado di contribuire alla formazione di tutti i tessuti dell'embrione, ad eccezione del trofoblasto, se reintrodotte in una blastocisti di topo (Bradley et. al 1984). In coltura esse formano aggregati cellulari chiamati "corpi ebrionici" (EBs) da cui, utilizzando protocolli diversi, possono essere ottenuti un gran numero di tipi cellulari rappresentativi dei tre foglietti embrionali primari, ectoderma, endoderma e mesoderma (Doetschman et. al 1985, Lake J 2000). Le ES differiscono dalle cellule da cui derivano per la loro richiesta di citochine. Il mantenimento del loro stato pluripotente richiede infatti l'attivazione di una subunità recettoriale gp130 che è normalmente attivata dalla presenza di membri della famiglia delle citochine IL-6 nel mezzo di coltura (vedi rassegna di Rathjen and Rathjen 2001). In particolare, le ES murine necessitano, per il self-renewal, della presenza nel mezzo di coltura del Leukemia Inhibitor Factor (LIF) e di Bone Morphogenetic proteins (BMPs). Il LIF lega direttamente il suo recettore (LIFR) che contiene un lungo dominio citoplasmatico omologo alla gp130. Il complesso LIF/LIFR va poi a reclutare la gp130 formando un complesso trimetrico (Zhang et al 1997). Diversamente dal LIFR, l'IL-6 si lega ad un recettore che manca di un significativo dominio intracellulare e che è dipendente dalla dimerizzazione della gp130 per poter mediare il suo signaling. Le ES non esprimono il recettore per l'IL-6, ma la forma solubile dell'IL6R insieme all'IL6 consentono alle ES di propagare in uno stato indifferenziato (Yoshida et al 1994). Ciò indica che la presenza del LIFR non è assolutamente necessaria e può essere sostituita da un'altra gp130. Dopo la dimerizzazione della gp130 si ha la tirosin-fosforilazione, la dimerizzazione ed il trasporto nucleare di un trasduttore del segnale ed attivatore trascrizionale, STAT3 (Niwa et al 1998). Diversi studi dimostrano che la sola attivazione di STAT3 è sufficiente per il selfrenewal (Matsuda et al 1999). Si è poi visto che la presenza addizionale di siero consente ugualmente di mantenere lo stadio indifferenziato stabilendo che STAT3 non è strettamente

necessario per il selfrenewal (Ying et al 2003). Oltre a fattori estrinseci, fattori trascrizionali intrinseci sono necessari per mantenere lo stato indifferenziato delle cellule ES. Questi includono i fattori di trascrizione Oct4, una proteina omeodominio membro della famiglia POU e Nanog. Oct4 è espresso negli ovociti maturi e negli embrioni precoci e scompare prima della segregazione della ICM dal trofoblasto (Pesce and Schöler 2001). Successivamente Oct4 torna ad essere espresso nell' ICM (Palmieri et al 1994). L'espressione di Oct4 è mantenuta nell'epiblasto degli embrioni pre- e postimpianto prima che inizi ad essere ristretta alle PGCs migratorie. Un adeguato livello di espressione di Oct4 è richiesto per il mantenimento della pluripotenza delle ES, difatti quando i suoi livelli vengono aumentati a più del 50% dei valori normali, una buona parte delle cellule ES differenzia esprimendo markers di origine endodermica e mesodermica. In assenza di LIF nel mezzo di coltura, l'espressione di Oct4 lentamente diminuisce e le ES differenziano in vari tipi cellulari a secondo dei protocolli di coltura. E' probabile che Oct4 non sia sufficiente da solo per mantenere la pluripotenza e che altri fattori di trascrizione agiscano in combinazione e sinergicamente ad Oct4. Tra questi vogliamo ricordare FoxD3, Sox2 e Nanog. Anche se l'interazione con Oct4 è stata dimostrata (Guo et al 2002), non ci sono evidenze dirette che FoxD3 sia coinvolto nel mantenimento della pluripotenza. Per quanto riguarda Sox2, è dimostrato che questo fattore di trascrizione, che presenta un dominio di legame al DNA, agisce su molti geni target di Oct4 (Niwa 2001). Un caso ben studiato è quello dell' enhancer di FGF4 in cui Sox2 e Oct4 si legano a siti adiacenti promuovendone la trascrizione in modo sinergico (Ambrosetti et al 2000). Come Oct4, Nanog è una proteina che contiene omeodomini e la sua espressione è ristretta a pochi tipi cellulari che esprimono Oct4, incluso le cellule ES. Nanog non è presente negli ovociti maturi. La sua espressione inizia allo stadio di morula, aumenta nella blastocisti precoce per poi diminuire prima dell'impianto (Chambers et al 2003; Mitsui et al 2003). A partire da 7.5 dpc, Nanog è espresso nelle PGCs e la sua espressione rimane in tali cellule fino al completamento della colonizzazione della gonade. Numerose evidenze sperimentali indicano che Nanog agisce indipendentemente al signaling stimolato dal LIF attraverso gp130/STAT3, nel mantenimento della capacità di "self renewing" delle cellule staminali (Chambers et al 2003). Per rassegne recenti sui meccanismi molecolari che controllano il "self renewing" e la pluripotenza delle cellule ES rimandiamo alla rassegna di Sun Y. Et al 2006.

Vogliamo infine brevemente menzionare, perché rilevanti per alcuni dei risultati ottenuti nel presente studio, un'ultima proprietà delle cellule ES, nonché delle loro strette parenti le cellule EG, quella di generare teratomi e/o teratocarcinomi quando trapiantate sottocute o nella capsula testicolare. Risultati recenti indicano che tale proprietà dipende almeno in parte dall'elevata espressione nelle cellule ES del gene, *Ras*-like, chiamato Eras (Takahashi et al., 2003). Eras codifica per una proteina della famiglia delle G-protein che possiede un dominio CAAX conservato e localizzato nella membrana plasmatica.

Questo gene è costitutivamente attivo nelle ES e la sua espressione forzata fa aumentare l'incidenza dei tumori derivati da tali cellule. Eras lega ed attiva PI3K ed insieme a questa chinasi favorisce la proliferazione e la tumorigenicità delle ES. Si è visto che cellule ES in cui Eras è stato deletato, formano teratomi più piccoli ed hanno una ridotta capacità proliferativa.

CELLULE GERMINALI PRIMORDIALI

Le cellule germinali primordiali (PGCs) sono i precursori embrionali dei gameti. In tutti gli organismi, le PGCs si formano lontano dal sito di sviluppo delle gonadi dove poi migrano per dare vita alle cellule germinali maschili (prospermatogoni) e femminili (oogoni/ovociti). Fino a pochi anni orsono, nel topo le PGCs venivano identificate al giorno embrionale 7.5 (7.5dpc) come un piccolo gruppo di circa 40 cellule positive per l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina (TNAP) site alla base dell'allantoide (Ginsburg et al., 1990). In tutte le specie di mammifero studiate, incluso l'uomo, l'attività TNAP ha permesso di localizzare le PGCs in equivalenti siti extraembrionali e di seguirne gli spostamenti fino all'interno della gonade in sviluppo (Cook et al 1993). Negli ultimi anni nel topo, sono stati identificati numerosi altri markers delle PGCs pre-gonadiche, quali Oct4, Nanog, Nanos2, Esg-1, Fragilis, Stella e Blimp-1. Grazie allo studio dell'espressione di Blimp-1 e Stella, si è potuto stabilire che i precursori delle PGCs originano circa 24h prima della loro localizzazione nel mesoderma extraembrionale, da circa 6 cellule dell'epiblasto prossimale che stimolate da fattori di crescita della famiglia BMPs (in particolare BMP-4 e BMP-6), esprimono fattori di trascrizione quali Blimp-1 e proteine che legano RNA messaggeri (es. Stella), che reprimono l'espressione di geni chiave per il differenziamento delle cellule dell'epiblasto nelle diverse linee di cellule somatiche. A partire dal giorno E9.0, le PGCs migrano nell'intestino posteriore e tra 9.0 e 9.5 dpc, iniziano a colonizzare le creste gonadiche.

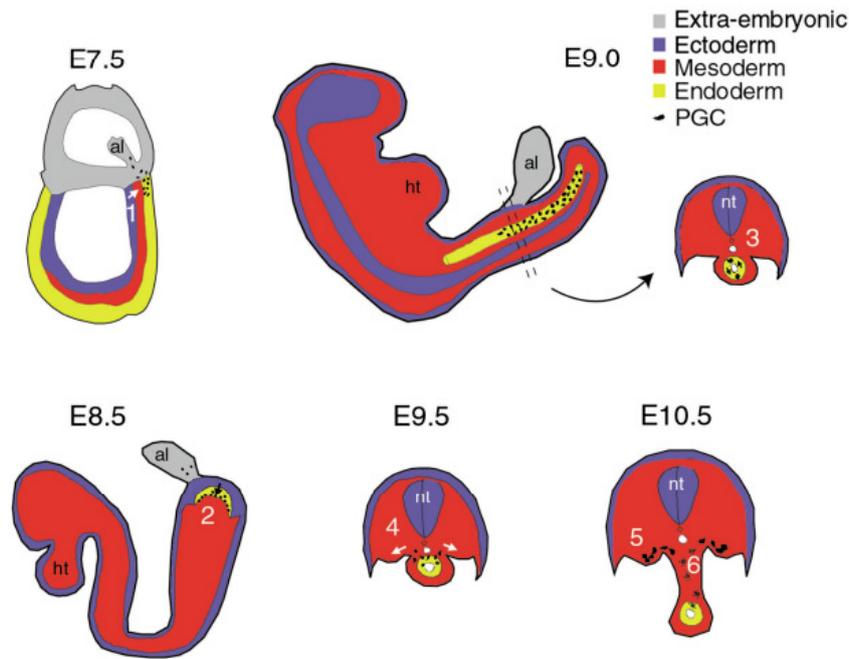


FIG. 3

Durante la migrazione e per 1-2 giorni dopo la colonizzazione delle creste gonadiche, le PGCs proliferano mitoticamente ed in circa otto cicli di replicazione della durata di circa 16 h (Tam and Snow 1981), aumentano da circa 50-100 a circa 20,000 a 13.5 dpc . I tempi di duplicazione sono di circa 7h per i precursori delle PGCs e il ruolo putativo di *Fragilis* durante la formazione delle PGCs potrebbe essere quello di rallentare il ciclo nelle PGCs nascenti fino a che non vengano prodotti fattori anti-proliferativi. E' stato osservato che la proliferazione delle PGCs è strettamente dipendente dalla presenza di diversi fattori di crescita necessari da una parte a prevenire l'apoptosi e dall'altra a stimolare la proliferazione. Ad esempio l'osservazione che le PGCs in coltura in assenza delle circostanti cellule somatiche vadano incontro ad apoptosi (Pesce et al, 1993; Pesce and De Felici 1994), lascia supporre che alcuni fattori, come KL ed il LIF, agiscano prevenendo l'apoptosi delle PGCs (Pesce et al 1993). Studi su sistemi di coltura (De Felici 2000, De Felici 2001), mostrano che l'interazione tra il recettore tirosin chinasi kit ed il suo ligando Steel Factor (anche noto come KL), la cui assenza è causa di sterilità oltre che anemia e mancanza di melanociti, è richiesta per la sopravvivenza e la proliferazione delle PGCs. Dopo la fase proliferativa, si osserva una distinzione morfogenetica tra le gonadi maschili e quelle femminili intorno ai 12-12.5dpc. Relativamente pochi geni sembrano essere connessi con il differenziamento sessuale iniziale delle gonadi, (Merchant-Larois and Moreno-Mendoza 2001), tra questi un ruolo chiave è svolto da *sry* posto sul cromosoma Y (Koopman et al 1990). L'esatto pathway attraverso cui l'*sry* influenza la determinazione del sesso non è stato ancora del tutto chiaro ed è probabilmente il risultato combinato dell'espressione genica e di interazioni cellulari. Dopo il differenziamento, le cellule germinali maschili entrano in arresto mitotico G0/G1 che si mantiene fino

alla nascita. Per quanto riguarda le cellule germinali femminili, queste entrano nella profase meiotica. Recentemente è stato identificato il gene *stra8* (Menke et al, 2003) che sembra essere un marker precoce del differenziamento delle cellule germinali femminili. Questo gene appare up-regolato nelle cellule germinali delle gonadi XX prima dell'ingresso in meiosi probabilmente dalla stimolazione dell'acido retinoico prodotto dal limitrofo mesonefro (Koubova J et al 2006), mentre è espresso a livelli molto più bassi nelle cellule germinali embrionali maschili. Ciò in associazione all'up-regolazione del gene meiotico *Dmc1* ed alla down-regolazione di *Oct3/4*.

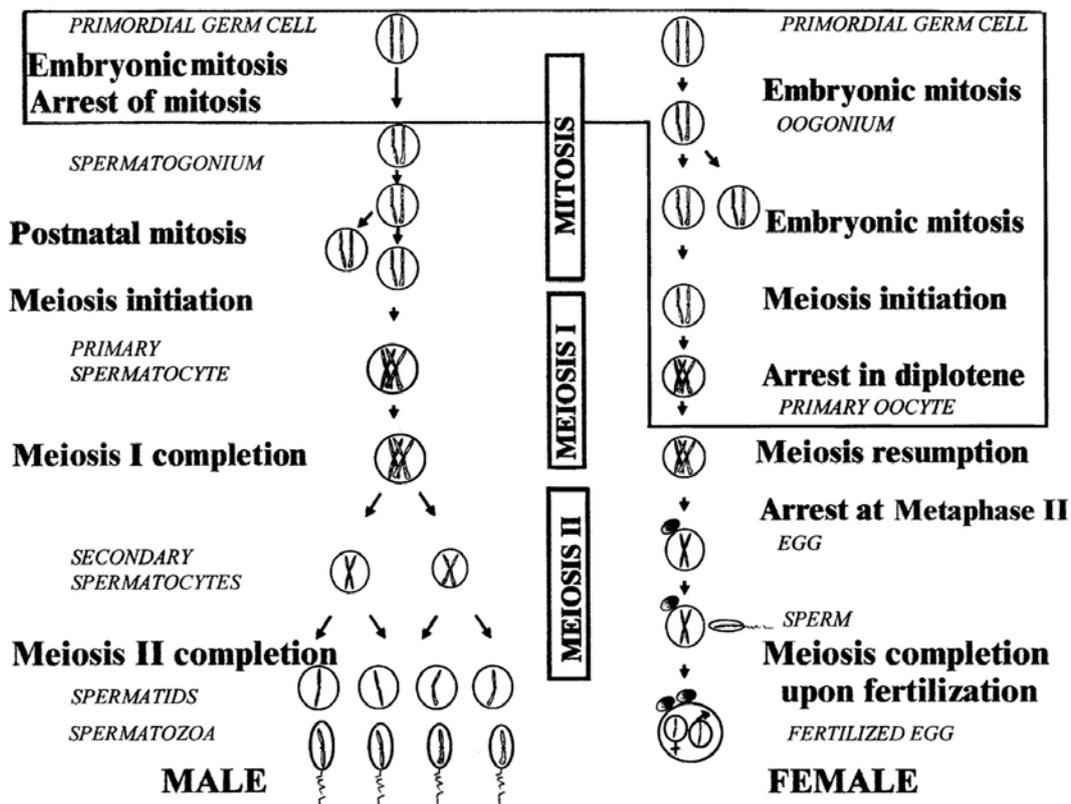


FIG. 4

CELLULE GERMINALI EMBRIONALI

Le cellule germinali primordiali, possono dare luogo a due tipi di cellule staminali pluripotenti. In vivo, le PGCs possono formare cellule di carcinoma embrionali (EC), cellule staminali pluripotenti dei tumori testicolari. In vitro se coltivate in presenza di uno specifico cocktail di fattori di crescita (LIF, bFGF, KL) si trasformano in cellule germinali embrionali (cellule EG) che si è dimostrato essere una popolazione di cellule staminali (Matsui et al 1992, Resnick et al 1992). Il bFGF sembra agire come un mitogeno in coltura e può essere sostituito dalla forskolina o dall'acido retinoico, mentre il LIF o OSM o l'IL-6, possono tutti attivare il pathway della gp130, inibendo il differenziamento e promuovendo la

formazione di colonie (Koshimizu et al 1996). Il KL sembrerebbe svolgere contemporaneamente un'azione antiapoptotica e mitogenica sulle PGC (Runyan C 2006). Linee di cellule EG possono essere ottenute da PGCs premigratorie (8-8.5 dpc), migratorie (9,5 dpc) e postmigratorie (11,5-12,5 dpc) (Matsui et al 1992, Resnick et al 1992), e da vari ceppi di topo (Durcova-Hills et al 2001). In ogni caso le cellule che si ottengono sono in grado di proliferare indefinitamente in coltura e di generare corpi embrioidi nei quali si sviluppano una varietà di tipi cellulari diversi. Se iniettate all'interno delle blastocisti, le EG colonizzano tutti i lineages cellulari dell'embrione in sviluppo incluso, ma non preferenzialmente, la linea germinale (Stewart et al 1994). Tuttavia alcune chimere che si ottengono utilizzando cellule EG derivate da 11.5 e 12.5 dpc hanno mostrato anomalie nella crescita e nello sviluppo dell'apparato scheletrico (Labosky et al 1994, Tada et al 1998). Tali anomalie sono probabilmente dovute alla cancellazione della metilazione dei geni soggetti al processo dell'imprinting che si verifica nelle PGCs a partire da 10.5 dpc.

Caratteristiche del ciclo cellulare delle cellule ES e EG

Diversamente dalla maggior parte delle cellule somatiche proliferanti, le cellule ES di topo passano la maggior parte del tempo, circa il 75%, in fase S e sembrano proliferare indipendentemente dalla stimolazione con citochine (Savatier et al., 2002). Si ritiene inoltre che il ciclo cellulare delle cellule ES di topo non sia regolato a livello del checkpoint tra le fasi G1/S. In particolare, anche se queste cellule esprimono sia Rb che Rbp-107 (ma non Rpb-103), seppur a bassi livelli, il pathway di Rb non è attivo (Robanus-Maandag et al. 1998; LeCouter et al. 1996). Si ritiene anche che le cellule ES manchino della regolazione mediata dalle cicline Ds e cdk 4 e 6 (Savatier et al. 1996 and 2002; Jirmanova et al. 2002; Burdon et al. 2002). Un'altra caratteristica del ciclo cellulare delle cellule ES, è che i complessi Cdk2- A2/E1 sono costitutivamente attivi, mentre Cdc2-ciclinaB sembra essere l'unica attività Cdk ad essere regolata durante il ciclo cellulare (Stead et al. 2002). Infine, la mancanza degli inibitori delle Cdk, come p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p16^{INK4a} così come la non sensibilità all'inibitore del complesso ciclina D3-Cdk6, p16^{INK4a} (Stead et al. 2002; Faast et al. 2004), sembra contribuire all'assenza di un checkpoint tra le fasi G1/S nelle cellule ES di topo.

Le caratteristiche del ciclo cellulare delle EG sono sovrapponibili a quelle delle cellule ES (McLaren A. 2001)

BASE RAZIONALE E SCOPO DEL LAVORO

Il ciclo cellulare nelle PGCs presenta aspetti particolari che richiedono probabilmente meccanismi di controllo unici. Difatti tali meccanismi devono assicurare allo stesso tempo l'espansione della popolazione germinale, il mantenimento potenziale della totipotenza differenziativa intrinseca alla linea germinale e il passaggio dal ciclo mitotico a quello meiotico in maniera dipendente dal sesso. Come sopra riportato la proliferazione mitotica delle PGCs di topo dura circa sette giorni e dopo il primo giorno in cui il ciclo cellulare nei precursori delle PGCs è molto rapido (circa 7 ore), assume una durata media di circa 16 ore. Le informazioni attualmente in nostro possesso indicano che la proliferazione mitotica delle PGCs viene mantenuta, come nelle cellule somatiche, dalla stimolazione combinata di fattori di crescita antiapoptotici e mitogenici. Tali fattori, tuttavia, agiscono su cellule che esprimono fattori di trascrizione quali Blimp-1 e proteine che legano RNA messaggeri (Stella e Vasa) che inibiscono il differenziamento in lineage somatici, e fattori di trascrizione che assicurano il mantenimento della pluripotenza differenziativi quali Oct-4, Sox2 e Nanog. A queste particolari condizioni si aggiunge l'elevata attività di demetilazione del DNA che porta alla cancellazione dell'imprinting genomico nelle PGCs e partire da 10.5 dpc. Mentre l'elevata espressione di fattori di trascrizione per il mantenimento delle pluripotenza nonché l'espressione di alcune proteine e oligosaccaridi di membrana (TNAP, SSEA-1/TG-1, E-cad, gp130) è comune alle PGCs e alle cellule ES, quest'ultime non esprimono fattori di repressione di attività genica quali Blimp-1 e Vasa né vanno incontro a cancellazione dell'imprinting. E' possibile che le suddette caratteristiche rendano il controllo del ciclo cellulare mitotico delle PGCs particolarmente sensibile a deregolazione e soggetto a modificazioni che ne causano la trasformazione in cellule EC e EG. Allo stesso tempo, il ciclo mitotico delle PGCs può essere modificato in ciclo meiotico. Tale modificazione sembra verificarsi di norma nella fase G1 di uno degli ultimi cicli mitotici delle PGCs (Swain A, 2006) sotto l'azione dell'acido retinoico, considerato il principale induttore della meiosi nell'ovaio fetale (Swain A. 2006).

Come riassunto nei paragrafi precedenti, il controllo del ciclo cellulare avviene a diversi livelli trascrizionali e post-trascrizionali. Nel nostro lavoro, impiegando metodologie di isolamento e coltura di cellule germinali delle gonadi di embrioni murini a diversi stadi di sviluppo messe a punto nel nostro laboratorio, abbiamo iniziato a caratterizzare l'espressione in tali cellule di un gruppo significativo di geni (96) coinvolti nel controllo del ciclo cellulare mitotico delle cellule somatiche, utilizzando per la prima volta una tecnologia di analisi di c-DNA microarray su popolazioni purificate di PGCs, ovociti

primari in profase meiotica I e prospermatogoni in G0. Allo stesso tempo, l'espressione degli stessi geni è stata analizzata per confronto in cellule ES, EG e fibroblasti embrionali. Lo scopo principale di questo studio è stato quello di eseguire un'analisi comparativa dei livelli di espressione dei c-DNA per i geni esaminati nelle diverse popolazioni cellulari e ottenere quindi indicazioni per futuri studi che avranno lo scopo di confermare a livello proteico e funzionale le differenze rilevate in rapporto alle somiglianze e differenze tra PGCs, ES e EG e tra PGCs mitotiche e ovociti meiotici o prospermatogoni.

MATERIALI E METODI

Isolamento delle cellule germinali

Le PGCs sono state isolate e purificate dalle gonadi indifferenziate di embrioni di topi CD-1 di 11.5 dpc secondo il metodo descritto in Pesce and De Felici (1995). Brevemente, le creste gonadiche (30-40 per esperimento) sono state prelevate in mezzo di coltura M2 e trasferite in tubi Eppendorf da 1,5 ml contenenti 0,5 ml di M2 contenente 0,25% tripsina e 1mM EDTA. Dopo 2-3 minuti di incubazione a temperatura ambiente la soluzione enzimatica è stata rimossa e le gonadi lavate con M2 contenente 20-30 µg/ml DNase (tipo I Calbiochem). Le gonadi sono state lasciate in 0,1 ml di mezzo e dissociate meccanicamente fino ad ottenere una sospensione di cellule monodisperse. A seguito dell'aggiunta di ulteriori 0,2 ml di mezzo e dell'anticorpo anti TG-1 (diluizione 1:300), la sospensione cellulare è stata lasciata per 45 minuti a 4°C in agitazione continua. Trascorso questo intervallo di tempo, la sospensione di cellule è stata incubata per ulteriori 15 minuti nelle stesse condizioni, ma con l'aggiunta di 10 µl di microbeads magnetiche ricoperte con un anticorpo monoclonale anti mouse IgM (Milteny Biotec). La sospensione cellulare è stata quindi portata a 0,5 ml con M2 e fatta passare attraverso una colonna inserita in un campo magnetico. Le cellule TG-1 positive, ossia le PGCs, rimaste nella colonna sono state quindi eluite con 1 ml di mezzo flussato attraverso la colonna. In ogni sospensione cellulare è stata quindi controllata la percentuale di PGCs mediante la reazione per l'enzima fosfatasi alcalina. La purezza delle popolazioni cellulari è stata verificata anche tramite RT-PCR utilizzando primers per il gene VASA specifico per le PGCs e KL specifico per le cellule somatiche.

Per quanto riguarda le cellule germinali di 14.5 dpc (ovociti meiotici e prospermatogoni) queste sono state ottenute dalla disgregazione enzimatica di ovaie e testicoli di embrioni prodotti dall'incrocio di femmine CD1 con maschi transgenici esprimenti GFP sotto il promotore del gene OCT-4 (Δ PE-GOF18) (gentilmente forniti dal Dr. Hans Schöler) espresso specificamente nella linea germinale. Tale sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm per 10 min. Il pellet è stato risospeso e sottoposto a sorting utilizzando FACSVantage SE. Per ogni esperimento sono stati utilizzati circa 40 testicoli e 40 ovaie. Le cellule sortate sono state centrifugate a 1000 rpm e il pellet utilizzato per l'estrazione dell'RNA. Campioni di cellule sono stati osservati al microscopio ottico dopo colorazione con Hoechst per la valutazione morfologica del grado di purezza delle cellule germinali. La purezza delle popolazioni sortate è stata valutata anche tramite RT-PCR utilizzando primers per il gene SCP-3 specifico per gli ovociti e Nanos3 specifico per i prospermatogoni.

Coltura delle PGCs e delle linee cellulari ES, EG e STO

Le PGCs ottenute da embrioni di topi CD-1 di 11.5 dpc, sono state coltivate secondo il metodo descritto in Farini et al. 2005. La linea cellulare D3 di ES murine (Doetschmann et al., 1985) proveniva dall' American Type Culture Collection (ATTC, USA); mentre le EG sono state prodotte nel nostro laboratorio (Moe-Behrens et al., 2003). Le cellule EG ed ES sono state cresciute in uno stato indifferenziato su di un feeder-layer di fibroblasti embrionali di topo (MEFs) inattivati con mitomicina C e derivati da embrioni di topo CD-1 di 12.5 dpc (Wobus et al., 1984), in DMEM, 15% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, selected batches ES cell tested), 2mM L-glutamina, 50 µM di β-mercaptoetanol, 100nM di amminoacidi non essenziali, 50U/ml di penicillina e 50 µg/ml di streptomycina (tutti Invitrogen). Le ES e le EG sono state piastrate sul feeder-layer di MEF e coltivate a 37° C in presenza del 5% CO₂ in un incubatore per colture di tessuti umidificato. Le cellule non ancora a confluenza sono state tripsinizzate, pellettate a 500 rpm per tre min e ripiastrate su un nuovo feeder-layer di MEF alle diluizioni 1:2-3. Per rimuovere le MEF, le cellule sono state risospese nel mezzo di coltura in un tubo Falcon da 50 ml dopo tripsinizzazione e gentilmente disaggregate meccanicamente. La sospensione cellulare è stata poi piastrata su una piastra gelatinata per 15-30 min in incubatore. Durante questo periodo di tempo, le MEF si attaccano alla piastra mentre le ES e le EG restano in sospensione. Ripetendo questa procedura per due volte, il supernatante conteneva circa il 98% di ES o EG che sono state poi utilizzate per l'estrazione dell'RNA.

La linea cellulare STO (fibroblasti embrionali) è stata cresciuta secondo comuni protocolli in accordo con le procedure consigliate dalle ATCC.

cDNA microarray

L'RNA totale è stato estratto dai vari tipi cellulari tramite l'RNeasy Quiagen microkit secondo le istruzioni del kit. Una volta purificato la qualità dell'RNA è stata valutata tramite spettrofotometria a 260 e 280 nm usando il Nanodrop (NanoDrop Technologies). Approssimativamente sono state necessarie 50,000-100,000 PGCs per ottenere 1 µg di RNA totale che è stato poi utilizzato per il successivo step di amplificazione e preparazione dei probes. La stessa quantità di RNA è stata utilizzata per le cellule ES ed EG. L'amplificazione dell'RNA è stata condotta utilizzando l'AmpoLabeling-LPR Kit (SuperArray Inc, L-03) e aggiungendo contemporaneamente la Biotina 16-dUTP (Roche, 1-093-070). Questa procedura, che utilizza primers specifici per i geni presenti sulle membrane di ibridazione, permette di ottenere probes marcati con biotina di "second strand" cDNA in quantità proporzionali a quelle di mRNA presenti nel campione iniziale anche se queste sono molto piccole.

Per quanto riguarda gli ovociti e i prospermatogoni a causa del limitato numero di cellule ottenute dagli esperimenti di sorting, si è eseguito un primo ciclo di amplificazione dell'RNA partendo da circa 25 ng di RNA totale utilizzando il TargetAmp 1-Round Aminoallyl-aRNA Amplification kit 101 (Epicentre) secondo le istruzioni. Con questo metodo l'RNA Poly A⁺ dell'RNA totale viene retrotrascritto in un primo strand di cDNA tramite l'utilizzo di oligo(dT) sintetici contenenti la sequenza promotrice dell'RNA polimerasi T7 al 5' terminale. L'ibrido cDNA/RNA prodotto nel primo step viene quindi digerito in piccoli frammenti di RNA utilizzando l'RNase H. I frammenti di RNA servono a condurre la sintesi del secondo strand di cDNA. Il prodotto di reazione è quindi un cDNA che contiene un promotore della trascrizione T7 posto in un orientamento che permette di generare elevate quantità di RNA antisenso (aRNA) durante la successiva reazione di trascrizione in cui il canonico UTP è parzialmente sostituito dal 5-(3-aminoallyl)-UTP. L'aRNA così ottenuto viene infine purificato utilizzando colonne dell'RNeasy Quiagen microkit. In questa serie di esperimenti, questa procedura di amplificazione è stata effettuata anche su campioni di RNA estratti da PGCs di 11.5 dpc. La successiva marcatura degli aRNA (100ng) è stata eseguita utilizzando l'AmpoLabeling LPR Kit come sopra descritto.

Le membrane utilizzate erano le "Cell Cycle GEArrayTM Q Series" (SuperArray Inc., MM-001). Prima dell'ibridazione la membrana è stata incubata con una soluzione contenente il GEHyb Hybridization Solution e 100µg/mL di DNA denaturato di Salmon Sperm (Invitrogen/GIBCO) a 60 °C in agitazione continua per due ore. Successivamente la soluzione è stata sostituita con un tampone di ibridazione contenente i cDNA marcati che è stato incubato nelle stesse condizioni per circa 16 ore. Le membrane sono state quindi lavate due volte per 15 min con 2 x SSC/1% SDS e altre due volte per 15 min con 0.1 x SSC/0.5% SDS a 60°C in agitazione continua. Il segnale è stato rilevato tramite chemiluminescenza mediante l'incubazione della membrana con alkaline phosphatase-conjugated streptavidin e CDP-Star substrate.

Analisi dei Microarray

Le membrane sono state prima acquisite con lo ScanJet scanner (Hewlett Packard) e gli spots di ibridazione (4 per ogni cDNA) quantificati usando il software di analisi densitometrica ScanAnalyze. Il background di ogni membrana è stato sottratto dalla media dei valori dei tetraspots di cDNA e i valori normalizzati per il segnale del gene housekeeping "GAPDH" la cui intensità su ogni membrana era portata allo stesso valore di grigio usando il software PhotoShop. Gli esperimenti di microarray sono stati eseguiti tre volte con nuove membrane e RNA isolato da campioni cellulari diversi.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite l'analisi della varianza (ANOVA), secondo il metodo "post hoc" di Tukey, usando un P-value < 0.05. I valori dei "fold changes" sono stati espressi come il \log_2 delle medie dei rapporti tra i livelli di cDNA per ogni gene.

RT-PCR e Real time PCR

La metodica dell'RT-PCR è stata utilizzata per verificare il grado di purezza delle sospensioni di cellule germinali mediante l'analisi di espressione di specifici geni. Per le PGCs e le cellule somatiche ottenute dalle creste gonadiche di 11.5 dpc sono stati utilizzati i primers per i geni VASA e KL espressi rispettivamente dalle PGCs e dalle cellule somatiche. A 100ng di c-DNA ottenuti da ogni campione sono stati aggiunti 1X di PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA Polimerasi, 0,5 μ M di ogni primer specifico, 0,2 mM di ogni dNTP e acqua distillata fino ad un volume finale di 25 μ l. Come controllo è stato utilizzato il gene housekeeping HPRT. Le sequenze degli oligo sono riportate nella Tab.2. I campioni sono stati posti nel termocilcatore ed incubati per 3' a 94 °C, quindi sono stati effettuati 35 cicli composti da: 94 °C per 45 secondi, 58 °C per 30 secondi, 72 °C per 45 secondi. Dopo una ulteriore incubazione a 72 °C per 10 minuti i campioni sono stati lasciati a 4 °C e quindi corsi su gel di agarosio all'1% in TBE.

La stessa procedura è stata effettuata per verificare la purezza delle popolazioni ovocitarie e prospermatogoniali. In questo caso abbiamo utilizzato 100 ng di aRNA e primers per il gene SCP3 per gli ovociti e Nanos3 per i prospermatogoni.

La metodologia Real Time PCR è stata utilizzata per verificare le differenze rilevate dalle analisi delle membrane di cDNA. I geni i cui livelli di cDNA risultavano significativamente diversi sono stati analizzati mediante Real-time PCR usando il Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG completo di ROX seguendo le istruzioni del kit (Invitrogen, 11744-100). Brevemente, 2 ng di cDNA ottenuti dall'amplificazione con l'AmpoLabeling LPR Kit di ciascun campione precedentemente utilizzato per l'ibridazione, sono stati uniti a 0.2 μ M di primers forward e reverse (vedi Tabella 1) in presenza dei reagenti contenuti nei kit utilizzati per le Real Time PCR. 40 μ l di questa soluzione sono stati posti in strip di tubi da 0.2 ml e corsi nell'ABI PRISM 7000 Detection System (Lab Centraal B.V.). Il programma dei cicli era composto da tre steps: 50 °C per due minuti, 95 °C per due minuti, quindi 45 cicli di 95 °C 15 sec, 54 °C per 30sec e 72 °C 30 sec. I risultati sono stati analizzati come segue: ogni valore è stato normalizzato per il suo gene housekeeping (18S), i livelli di espressione per le cellule ES ed EG sono stati poi normalizzati per quelli delle PGCs il cui valore è stato assunto come pari a 1. Il rapporto dei valori espresso come \log_2 è stato quindi utilizzato per ottenere la comparazione finale.

Citofluorimetria

Per studiare la distribuzione del ciclo cellulare, PGCs purificate con sorting immunomagnetico, cellule ES, ovociti e prospermatogoni ottenuti dal FACS sono stati lavati con PBS e sospesi in PBS/90% EtOH. Dopo un'incubazione overnight a 4 °C , le cellule sono state lavate e risospese in PBS/RNase (2mg/ml) ed incubate a 37⁰ C. Sono stati quindi aggiunti 10 µg/ml di ioduro di propidio (PI) ad ogni campione e dopo un'incubazione di 30 min a 37⁰ C , le cellule sono state lavate e risospese in 250 µl di PBS ed infine analizzate tramite il FACS^{Calibur} flow cytometer (Becton Dickinson, Germany).

RISULTATI

Confronto dell'espressione di cDNA di geni del ciclo cellulare nelle PGCs, cellule ES ed EG

La verifica della purezza delle popolazioni frazionate di PGCs mediante sorting immunomagnetico con APase, ha indicato una percentuale di PGCs variabile tra l'80 e il 90%. Allo stesso tempo l'analisi per RT-PCR dell'espressione dei geni *Mvh* (*VASA*) e *Kl* (vedi Materiali e Metodi) ha confermato l'elevato grado di purezza di queste popolazioni.

Preliminarmente allo studio dell'espressione dei cDNA dei geni del ciclo cellulare nelle tre popolazioni studiate, abbiamo eseguito un'analisi del ciclo cellulare delle PGCs e delle ES tramite la citofluorimetria (Fig. 5A-B). I risultati ottenuti nelle cellule ES sono compatibili con quanto già noto in letteratura. Difatti esse mostrano una distribuzione delle fasi del ciclo caratterizzata dalla presenza di circa il 56% delle cellule in fase G2/M, il 30% delle cellule sono risultate in G1, il 12,97% in S. Per quanto riguarda le PGCs esse mostrano una distribuzione nelle fasi del ciclo tipico di cellule somatiche mitotiche con circa il 52,7% di cellule in G1, il 17,99% in S, il 28,98% in G2/M.

Prima di analizzare e comparare l'espressione genica dei tre tipi cellulari, abbiamo anche voluto verificare se nei nostri arrays i livelli dei cDNA delle cellule ES fossero compatibili con le caratteristiche peculiari del ciclo cellulare di tali cellule. E' noto, ad esempio, che le cellule ES trascorrono la maggior parte del ciclo cellulare nella fase S e sono deficitarie dei meccanismi di controllo che normalmente regolano la transizione della fase G1 nella fase S. Difatti anche se *Rb* e *Rpb-107* sono espressi a bassi livelli, il pathway regolato da Rb in questa fase è inattivo. Un'altra caratteristica che queste cellule presentano è la bassa espressione delle *ciclina D* e l'assenza di regolazione mediata da queste ultime quando si legano alle Cdk. Alla mancata regolazione della fase di transizione G1/S, contribuiscono molto l'assenza degli inibitori p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e la non sensibilità del complesso Cdk6-cyclin D3 all'azione inibitoria di p16^{INK4a} (Stead et al. 2002; Faast et al. 2004).

Per quel che concerne i 38 geni della fase G1, presenti nel nostro array, una prima osservazione è che nelle cellule ES solamente 19/38 dei relativi cDNA risultano espressi a livelli >10% del gene housekeeping *Gapdh* (Fig. 6). Inoltre in tali cellule i trascritti di Rb e quelli delle ciclina D sono assenti o presenti a bassi livelli in accordo con i dati di letteratura. Sempre relativamente alla fase G1, possiamo inoltre osservare che: a) tra le Cdk, i cDNA di *Cdk2L*, *Cdk4* sono espressi ad alti livelli mentre *Cdk6* è

espresso ad un livello più basso; b) dei sei geni della famiglia E2fs essenziali per la regolazione della progressione della fase G1/S, sono risultati espressi solo i trascritti di *E2f4* e, ad un livello più basso, *E2f1*; c) gli unici inibitori delle Cdks, che mostrano livelli significativi di espressione sono *p21* e *p15*. D'altra parte nelle cellule STO (Fig. 7), utilizzate come modello di cellule somatiche embrionali proliferanti, si rileva che il numero dei trascritti della fase G1 > 10% *Gapdh* è di 22/38 cDNA, i livelli di espressione delle *ciclina D* (in particolare ciclina *D1* e *D2*) e di *Rb* sono più elevati delle cellule ES e l'espressione dei geni inibitori delle Cdks, fatta eccezione per *p19*, è mediamente più elevata. Considerando i geni che controllano la replicazione del DNA (fase S) e la transizione G2/M, recenti risultati indicano elevati livelli di trascritti nelle cellule ES per *Mcms*, *Cdc6*, *Pcna*, *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *Cdk1* (*Cdc2*) e *Cdc45* (Fujii-Yamamoto et al, 2005). Fatta eccezione per un membro della famiglia delle *Mcm* (*Mcm4*), tutti gli mRNAs per tali geni mostrano una significativa ed elevata espressione nelle membrane delle cellule ES, generalmente più alta rispetto a quello delle cellule STO (Figs. 6-7). Per quanto riguarda infine le vie molecolari responsabili dell'arresto nella fase G1 a seguito di un danno al DNA, in accordo con le nozioni che nelle ES tali vie sono poco attive e/o inefficienti, dall'analisi dei nostri arrays, è risultato che i trascritti sia di *p53* che di *p21^{Cip1}* sono espressi in tali cellule a bassi livelli, mentre i trascritti di *p27^{Kip1}* sono assenti (Fig.6, dati non mostrati). Virtualmente assente è anche risultato l'mRNA di *Atm*, mentre i trascritti di *Cdc25a*, *Cdk2*, *Chk2* (*Rad53*) sono presenti a livelli relativamente elevati (Fig.6). Per quel che riguarda le STO, è risultato che i trascritti di *p53* ed *Atm* sono presenti a bassi livelli in modo simile alle ES, mentre i livelli di espressione degli mRNAs per altri geni relativi al DNA damage/p53/Atm quali *Ube1x*, *Chk2* e *Mre11a*, sono significativamente più alti nelle ES (Fig.7).

I risultati relativi alle cellule ES, sono stati anche comparati con quelli recentemente pubblicati da Ginis et al. (2004). Questi autori hanno utilizzato le medesime membrane di cDNA array per studiare il ciclo cellulare delle cellule ES D3, ma senza effettuare lo step di amplificazione dell'RNA da noi utilizzati come raccomandato dal protocollo. Nel complesso il profilo di espressione dei trascritti dei geni analizzati appare sostanzialmente simile in entrambe le analisi. Solamente quattro geni (*Ciclina D3*, *Gadd45*, *Mdm2* ed *Mcm4*) su 42 che nelle nostre membrane sono risultati espressi a livelli molto bassi o assenti, hanno mostrato significativi livelli di trascritti nello studio di Ginis, mentre quattro geni (*Ube1x*, *Cdc45L*, *Mad2L1* e *Chk*) su 20 che sono espressi ad elevati livelli nei nostri array, risultavano invece assenti o espressi a bassi livelli nella precedente analisi.

I risultati comparativi dei profili di espressione dei cDNA dei 96 geni analizzati nelle cellule PGCs, ES e EG, con l'esclusione di quelli espressi in tutte e tre le popolazioni a livelli < 10% del gene housekeeping GAPDH, sono mostrati in Fig. 6 sottoforma di box plots. I geni sono stati suddivisi in quattro classi, le prime tre contenenti geni espressi in prevalentemente in G1, S, G2/M e una quarta con

geni coinvolti nel controllo dei danni al DNA (DNA damage/p53/Atm pathways). Una rappresentazione delle membrane ibridizzate, è mostrata nella Fig. 8. I fold changes tra i geni analizzati e comparati che hanno mostrato livelli di mRNA significativamente differenti tra le cellule ES, EG e PGCs sono riportati nella Tabella 2.

Un'osservazione generale è che il maggior numero di trascritti della fase G1 si osserva nelle PGCs (26/38) rispetto alle EG (20/38) ed alle ES (19/38). Tra questi, i trascritti della *Ciclina D3*, *p57kip2*, *Rb* e *Tceb1l* (*Skp1-like*) sono espressi a livelli significativamente più elevati nelle PGCs rispetto alle EG e nelle ES. I primi tre geni giocano un ruolo chiave nella regolazione della progressione della fase G1 dipendente dai fattori di crescita e il fatto che questi trascritti siano più elevati nelle PGCs è in linea con quanto è noto sulla dipendenza della loro proliferazione dai fattori di crescita (per una review vedi De Felici et al. 2004). Interessante è l'osservazione che tra i geni delle *ciclina D*, la *D3* sembra caratterizzare la PGCs, mentre la *D1* è più abbondante nelle cellule EG.

Se analizziamo l'espressione di geni che sono coinvolti nella formazione dei complessi di ubiquitinizzazione come l'SCF (Skp1-Cul1-F-Box protein) che media la degradazione delle proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare soprattutto nella fase G1, possiamo osservare che gli mRNA di molti membri di tale complesso, quali *Cullin 1,2,3*, *Cul4a* e *Cul4b* sono espressi nelle PGCs a livelli relativamente elevati. Il pathway di ubiquitinazione sembra piuttosto attivo anche nelle ES e nelle EG, anche se in queste cellule, i trascritti di alcuni geni coinvolti nel pathway sono espressi a bassi livelli o sono assenti (*Cul4b* nelle ES e *Cul4a* e *Skp2* nelle EG, Fig.6). Similmente i livelli di mRNA di *Nedd8*, codificante per una proteina "Ubiquitin-like" capace di regolare positivamente l'attività delle culline (Osaka et al.1998), apparivano più elevati nelle PGCs che nelle ES o EG, anche se le differenze non erano statisticamente significative (Fig.6). Infine rileviamo che mentre l' mRNA dell'ubiquitina C era assente e quello di *Ubl1* (*SUMO-1*) risultava ugualmente espresso nei tre tipi cellulari (Fig.6), gli mRNAs di *Ube1x* e di *Ube3a* (*E6-AP*) risultavano significativamente più espressi, il primo nelle PGCs e l'ultimo nelle ES e nelle EG (Fig. 6-9A). A tale proposito è interessante osservare che in generale elevati livelli di trascritti per i membri del complesso SCF come *Cul1* e *Cul2* e *Nedd8*, caratterizzano le tre popolazioni cellulari staminali rispetto alle cellule STO, mentre la presenza di elevati livelli di ubiquitina C caratterizza queste ultime (Fig.7).

Tra i venti geni della fase S analizzati, solamente i trascritti della ciclina G1 sono risultati significativamente diversi nelle tre popolazioni, più elevati nelle EG e nelle ES rispetto alle PGCs (Fig.6). Nel complesso il 50% (fase S) ed il 70-80% (G2/M) dei geni di queste fasi sono espressi nelle tre popolazioni cellulari, confermando un'elevata attività proliferativa di tali cellule.

Un numero relativamente basso di geni del pathways del DNA damage/p53/Atm, 12/26 nelle PGCs e nelle EG e 11/26 nelle ES (Fig.6) hanno mostrato livelli di trascritti maggiori del 10% di GAPDH. Tra

questi gli mRNA di *Ube1x* ed *Atm* risultavano più elevati nelle PGCs rispetto alle EG ed alle ES, mentre, come riportato precedentemente, *Ube3a* è risultato più elevato in queste ultime. Con sorpresa nelle cellule EG abbiamo rilevato livelli estremamente elevati di mRNA per *Timp3*. I livelli di questo gene apparivano molto bassi nelle PGCs e nelle STO ed appena rilevabili nelle ES. (Figs. 6-7 e Tabella 2). Da sottolineare che il cDNA di *Timp3* era anche l'unico tra quelli presenti nell'array ad avere livelli di espressione significativamente diversi tra le cellule EG ed ES.

Le differenze risultate statisticamente significative nei livelli di cDNA nelle PGCs ES ed EG, sono state confermate tramite SYBR Real Time PCR, fatta eccezione per *Tceb1l (Skp1-like)*, i cui livelli di mRNA sono risultati altamente variabili tra i diversi campioni (fig.9A e non mostrato).

Oltre ai geni presenti sulle membrane della Superarray, abbiamo analizzato mediante Real Time PCR due geni importanti nella regolazione della proliferazione delle cellule ES, *c-myc* e un nuovo membro della famiglia ras chiamato *Eras* (Takahashi et al, 2003).

Un ulteriore pathway regolatorio suggerito per la regolazione della proliferazione delle cellule ES, infatti, include l'attivazione di *c-myc* (Davis and Bradley, 1993; MacLean-Hunter et al., 1994).

L'attivazione di *c-myc*, più che il pathway ras-raf-erk, può essere critico nella regolazione del ciclo cellulare, poiché l'over-espressione di *c-myc* può rendere la proliferazione cellulare indipendente del controllo delle citochine esercitato in G1 (Shirogane et al., 1999). Infatti, *c-myc* può stimolare direttamente la trascrizione dei geni che codificano per la *ciclina E* e *cdc25a* per generare la chinasi *Cdk2-CiclinaE* (Bartek and Lukas, 2001).

Eras è espresso specificamente nelle cellule ES di topo e la sua over-espressione è sufficiente a mantenere la proliferazione cellulare e soprattutto ad indurre le trasformazioni delle cellule ES in cellule tumorigeniche maligne (Takahashi et al., 2003).

Tramite Real time PCR abbiamo riscontrato che il trascritto di *c-myc* era presente a livelli simili in tutti e tre i tipi cellulari esaminati, mentre per *Eras* i livelli di mRNA riscontrati nelle EG erano 1000 volte superiori rispetto alle PGCs (Fig 9B). Le ES hanno mostrato livelli di espressione per *Eras* intermedi tra gli altri due tipi cellulari (circa 10 volte superiore alle PGCs).

La coltura delle PGCs in presenza di LIF, KL e bFGF causa aumento dei livelli di espressione del trascritto di *Timp3*

Allo scopo di verificare se la coltura delle PGCs in condizioni che ne causano la trasformazione in cellule EG si accompagna ad un aumento dell'espressione di *Timp3* che come precedentemente riportato appare, nei nostri esperimenti di cDNA array, molto abbondante nelle cellule EG, abbiamo coltivato PGCs ottenute da embrioni di 11.5 dpc in presenza di 500 U LIF, 50ng/ml KL e 5ng/ml bFGF

nel sistema di coltura descritto in Farini et al., (2005) per 48 ore. I risultati mostrati in Fig. 9C, indicano che i livelli di espressione di tale trascritto vengono marcatamente aumentati dopo 48 ore di coltura.

Confronto PGCs, prospermatogoni e ovociti

Le osservazioni morfologiche delle cellule sortate al FACS (Fig 14) e le analisi RT per *Scp3* e *Nanos3* (non mostrato), indicavano che le cellule GFP positive (high e low) isolate dai testicoli e dalle ovaie di embrioni di 14.5 dpc, possedevano le caratteristiche dei prospermatogoni e degli ovociti.

Le analisi citofluorimetriche confermavano inoltre che mentre la maggior parte dei prospermatogoni (> 80%) si trovava in fase G0/G1, gran parte degli ovociti (circa il 70%) mostravano un contenuto di DNA 4N tipico di cellule meiotiche.

Per quanto riguarda l'amplificazione degli mRNA eseguite in questa seconda serie di esperimenti, queste non modificano in maniera significativa il profilo di espressione dei cDNA delle PGCs riportato nel confronto con cellule ES e EG.

Considereremo l'espressione dei 96 cDNA presenti nell'array, raggruppandoli, come per la precedente comparazione, in quattro classi (G1, S, G2/M e DNA damage/ATM/p53) ed escludendo dall'analisi i cDNA che mostravano livelli di espressione <10% del gene housekeeping *Gapd* in tutte e tre le popolazioni cellulari.

Analizzando l'espressione dei cDNA dei 38 geni della fase G1 presenti nell'array, undici (*Cdc7/1*, *Cdc37*, *Cdk5r*, *Cdk6*, *p57*, *p19*, *E2f2*, *E2f6*, *Skip-2*, *Rbl1* e *Rbl2*) sono risultati espressi a livelli < 10% *Gapd*.

Una prima osservazione è che nei prospermatogoni, i livelli di cDNA degli inibitori delle CDKs, in particolare di *p16INK4a*, risultano aumentati, mentre quelli delle culline e di *Skip-1*, proteine del complesso di ubiquitinazione SCF, del fattore di trascrizione *E2f4* e della *ciclina E1*, generalmente coinvolti nell'attivazione/repressione di geni che mediano il passaggio G1/S, appaiono in diminuzione rispetto alle PGCs (Fig 10a). Tuttavia, di queste variazioni sono risultate statisticamente significative e confermate dall'analisi real time RT-PCR (Fig 11), solamente quelle relative a *p16* e *E2f4*. Per quanto riguarda le altre cicline della fase G1 (*ciclina D* e *ciclina E2*), le CDKs (*Cdk2L* e *Cdk4*) e altri membri di complessi di ubiquitinazione (*Skip-1*, *Nedd8* e *Cks1*), i relativi livelli di cDNA non hanno mostrato variazioni statisticamente significative rispetto alle PGCs (Fig 10a). Da rilevare che, sebbene negli arrays i livelli di espressione di *Rb* nei prospermatogoni risultino significativamente più elevati rispetto alle PGCs (42 ± 8 vs 10 ± 6) (Fig 10a), l'analisi per real time non ha confermato queste differenze (non mostrato).

Più complessa appare la comparazione dei livelli di cDNA negli ovociti rispetto alle PGCs e ai prospermatogoni. Anche negli ovociti, i livelli dei trascritti degli inibitori delle CDKs risultano in aumento, in special modo statisticamente significativi rispetto alle PGCs quelli relativi a *p16* e *p21*. I trascritti delle cicline D e delle CDKs non mostrano differenze statisticamente significative tra le tre popolazioni. Da notare il mantenimento di elevati livelli di espressione della *Cdk2L*, chinasi essenziale per la meiosi (Ortega et al., 2003) e la tendenza all'abbassamento dei livelli di cDNA della *Cdk4* negli ovociti (media \pm SE = 55 ± 28) sia rispetto alle PGCs (100 ± 5) che ai prospermatogoni (106 ± 16) (Fig 10a). Mentre negli ovociti, a differenza che nei prospermatogoni, i livelli di cDNA della ciclina E1 non sembrano diminuire rispetto alle PGCs, quelli della ciclina E2 aumentano significativamente rispetto ad entrambe le popolazioni (Fig 10a), come confermato dall'analisi real time (Fig 11). Per quanto riguarda, i complessi di ubiquitinazione, i livelli di cDNA delle culline in generale (in particolare delle *culline 1, 3 e 4b*) e di *Cks1* (necessario per l' ubiquitinazione di p27) rimangono elevati negli ovociti come nelle PGCs e superiori (sebbene non in modo statisticamente significativo) a quelli presenti nei prospermatogoni. Le quantità dei trascritti di *Skip-1* e *Nedd8* risultano più elevate negli ovociti (rispettivamente 64 ± 27 e 45 ± 7) rispetto sia alle PGCs (42 ± 21 e 18 ± 6) che ai prospermatogoni (39 ± 22 e 22 ± 9), con differenza statisticamente significativa per *Nedd8* per ovociti vs PGCs e al limite della significatività ($P = 0.09$) per ovociti vs prospermatogoni. Dei sei fattori di trascrizione della famiglia *E2f*, che svolgono un ruolo chiave nella repressione di geni che controllano il passaggio G1/S, negli ovociti risultano espressi a livelli relativamente elevati *E2f1*, *E2f4* ed *E2f5*. Da rilevare che i livelli di cDNA di *E2f5* risultano statisticamente più elevati sia di quelli presenti nelle PGCs che nei prospermatogoni (Fig 10a), come confermato dall'analisi real time (Fig 11). Infine, in analogia con quanto osservato nei prospermatogoni, sebbene negli arrays i livelli di trascritti per *Rb* risultino significativamente più elevati negli ovociti rispetto alle PGCs (51 ± 3 vs 10 ± 6) (Fig 10a), la real time non ha confermato questa differenza (non mostrato).

Nove geni (*ciclina A1*, *ciclina G1*, *cddc25b*, *Cdk7*, *Mcmd*, *Mcmd2*, *Mcmd4*, *Mcmd6* e *Mcmd7*) su venti della fase S hanno mostrato espressione <10% di *Gapd*. Per quanto riguarda i trascritti degli altri undici geni analizzati, nei prospermatogoni, cinque (*ciclina A2*, *Cdc6*, *Cdc45L*, *Ki67* e *Mcmd5*) hanno mostrato una tendenziale diminuzione di espressione rispetto alle PGCs, quattro (*ciclina C*, *ciclina G2*, *ciclina H* e *cdc25a*) un aumento e due (*Pcna* e *Cdk8*) nessuna evidente variazione (Fig 10b). L'analisi statistica rivelava una differenza al limite della significatività ($P = 0.095$) solamente per l'aumentata espressione della *ciclina G2* ed *H*; la real time confermava un maggior numero di trascritti per entrambe le cicline nei prospermatogoni rispetto alle PGCs (Fig 11).

Per quanto riguarda gli ovociti, dei cinque geni rilevati in tendenziale diminuzione nei prospermatogoni tre (*ciclina A2*, *Cdc6* e *Mcmd5*) mostravano un analoga tendenza, mentre *Cdc45L* appariva in aumento e

Ki67 non variava rispetto alle PGCs. Tutti e quattro i geni in aumento nei prospermatogoni, apparivano più espressi anche negli ovociti rispetto alle PGCs. La differenza di espressione negli ovociti risultava statisticamente significativa per le *cicline A2, C, G2* ed *H* rispetto alle PGCs, ma solo per la *ciclina C* rispetto ai prospermatogoni (Fig 10b). Queste differenze erano confermate dalla real time (Fig 11). Anche negli ovociti i livelli dei trascritti per *Pcna* e *Cdk8* non risultavano diversi da quelli trovati nella PGCs. Da rilevare infine che nelle tre popolazioni esaminate, dei sei geni della famiglia Mcm, che codificano per proteine essenziali per la duplicazione del DNA, quello di gran lunga più espresso risultava *Mcmd5* (Cdc46).

Dei dodici cDNA dei geni della fase G2/M presenti nell'array, solamente quelli della *ciclina F* risultavano <10% *Gapd*. Nei prospermatogoni, dei trascritti degli altri undici geni esaminati, sei (*ciclina B2, Cdc2a, Cdc20, Foxm1, Prc1* e *14-3-3*) mostravano una diminuzione non statisticamente significativa, mentre quelli dei rimanenti cinque (*ciclina B1, Cdc16, Rbx1, Rbx2* e *Mad 2/1*) restavano inalterati rispetto alle PGCs (Fig 10c). Negli ovociti si rilevava un andamento di espressione per tali trascritti simile ai prospermatogoni con qualche differenza, non statisticamente significativa, relativamente a *Foxm1* (un fattore di trascrizione della famiglia delle fork head) e *Prc1* (una proteina coinvolta nella citochinesi) che non mostravano alcuna tendenza alla diminuzione (Fig 10c).

I livelli di dieci su ventisei cDNA di geni del gruppo DNA damage/p53/ATM (*Apaf1, Atm, Bax, Brca1, Nbn, Rad9, Timp3, p53, p63* e *Sumo-1*) erano espressi a livelli >10% *Gapd*. Per quanto riguarda i prospermatogoni, degli altri geni di questo gruppo, sette (*Chk1, Gadd45, Mdm2, Rad17, Rad 50, Rad 51* e *Ube3a*) non mostravano alcun evidente cambiamento dei livelli di trascritti rispetto alle PGCs, mentre per cinque (*c-abl, bcl2, Hus1, Ikba, Ubc* e *Ube1x*) si rilevava un tendenziale aumento e per tre (*Mre11a, Rad 53* e *Rpa*) i livelli di espressione apparivano più bassi (Fig 10d). Tali differenze risultavano, tuttavia non statisticamente significative o al limite della significatività (P=0.06) per *Rpa*, un gene che codifica per una proteina coinvolta nella duplicazione, ricombinazione e riparo del DNA (Guo S. et al, 2006).

Negli ovociti, i livelli di sei trascritti di questo gruppo di geni (*Mdm2, Rad17, Rad50, c-abl, Hus1* e *Ube1x*) non hanno mostrato cambiamenti rispetto alle PGCs, né differenze significative rispetto ai prospermatogoni. Per altri sei geni (*Chk1, Gadd45, Rad51, Ube3a, Mre11a* e *bcl2*), i livelli di cDNA apparivano aumentati sia rispetto alle PGCs che ai prospermatogoni. Analogamente che nei prospermatogoni, i cDNA per *Rad 53* e *Rpa* risultavano in diminuzione. Tuttavia, l'analisi statistica di tali variazioni indicava che solamente l'aumento dei trascritti di *Rad 51* era da ritenersi significativo sia rispetto alle PGCs che ai prospermatogoni. Anche la real time confermava un più alto livello di trascritti di *Rad51* negli ovociti rispetto agli altri due tipi cellulari (Fig 11).

DISCUSSIONE

Espressione di cDNA di geni del ciclo cellulare nelle PGCs, cellule ES ed EG

Nell'embrione di topo le cellule germinali primordiali (PGCs), i precursori dei gameti, migrano e proliferano fino a che, una volta colonizzate le creste gonadiche, raggiungono il numero di 25,000 (13.5 dpc) per embrione (Tam and Snow, 1981). Nei maschi, le PGCs entrano in una fase di arresto mitotico (G0) e differenziano in prospermatogoni o gonociti, mentre nelle femmine le PGCs smettono di dividersi mitoticamente ed entrano in profase meiotica diventando ovociti primari. In vivo le PGCs sono in grado di generare cellule staminali pluripotenti di tumore testicolare (teratoma e teratocarcinoma) chiamate cellule di carcinoma embrionale (EC). In coltura in presenza di LIF, bFGF e KL, possono trasformarsi in una linea di cellule staminali pluripotenti chiamate cellule germinali embrionali (EG) (per una review, vedi Donovan and Gearhart, 2001). Le cellule EG sono molto simili alle cellule embrionali staminali (ES) e crescono rapidamente in vitro mantenendo le loro caratteristiche di cellule pluripotenti nonché le loro proprietà tumorigeniche (Matsui et al., 1992; Stewart et al., 1994). Inoltre, le EG e le ES mostrano simili caratteristiche nella distribuzione delle fasi del ciclo cellulare (Rohwedel et al., 1996).

Anche le PGCs mostrano diverse caratteristiche che le rendono simili alle cellule staminali indifferenziate. Come le EG e le ES, infatti, presentano un' elevata attività dell'enzima fosfatasi alcalina (Ginsburg et al., 1990), esprimono l'antigene embrionale stadio specifico SSEA-1 (Solter and Knowles, 1978), e presentano livelli di espressione di geni chiave della pluripotenza differenziativa come *Oct-4*, *Sox9*, *Nanog* ed *9+* (Western et al., 2005). Tuttavia sono da verificare somiglianze e diversità tra il ciclo cellulare delle PGCs e quello delle cellule ES e EG e rimangono in gran parte sconosciuti i meccanismi molecolari che regolano il ciclo cellulare delle PGCs probabilmente cruciali per il loro differenziamento in senso maschile o femminile e la trasformazione in cellule EC ed EG. Ad eccezione di alcuni geni la cui assenza compromette la normale proliferazione delle PGCs soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo (*Zfx*, Luoh et al., 1997; *Mvh*, Tanaka et al., 2000; *Fancc*, Nadler and Braun, 2000; *Pog*, Agoulnik et al., 2002; *Pin1*, Atchison et al., 2003; *Pten*, Kimura et al., 2003, Moe-Behrens et al., 2003), ad oggi non ci sono informazioni sull'espressione nelle PGCs di geni conosciuti controllare il ciclo cellulare mitotico in cellule somatiche. Recenti analisi si sono concentrate sull'espressione in PGCs di topo di geni che controllano il loro processo di formazione o hanno cercato di conoscere il profilo genico generale di tali cellule (Abe et al., 1998; Molyneaux et al., 2004; Yabuta et al., 2006).

Nel presente lavoro, dopo aver verificato le caratteristiche del ciclo cellulare delle cellule ES e delle PGCs al citofluorimetro, abbiamo utilizzato un cDNA array contenente 96 geni coinvolti nel ciclo cellulare, con lo scopo di identificare geni che controllano il ciclo cellulare delle PGCs nel periodo terminale della loro fase proliferativa all'interno della gonade ancora indifferenziata e di confrontare i livelli di espressione dei trascritti di questi geni con quelli delle cellule ES ed EG.

I risultati ottenuti indicano che nonostante le somiglianze nell'espressione di geni e di markers di staminalità tra le cellule PGCs e le ES, EG, il ciclo cellulare di queste popolazioni cellulari è con ogni probabilità diversamente regolato. In particolare i nostri dati suggeriscono che le PGCs, similmente alle cellule somatiche mitotiche, presentano un maggiore controllo della fase G1 rispetto alle cellule EG ed ES. L'espressione nelle PGCs dei trascritti di alcuni geni quali *Ciclina D3*, *Rb* e *p57kip2* è compatibile con la regolazione della fase G1/S basata sulla dipendenza dell'attività proliferativa dalle citochine ben dimostrato in questo tipo di cellule. Tuttavia, quando analizzata nel suo complesso, l'espressione dei 96 geni analizzati nelle PGCs sembra essere più vicina a quella delle EG e delle ES piuttosto che quella che si osserva nelle cellule STO considerate come modello di cellule somatiche embrionali proliferanti. Riteniamo che queste caratteristiche del ciclo cellulare delle PGCs intermedie tra quelle di normali cellule somatiche proliferanti e cellule staminali, siano in qualche modo correlate con la loro unica capacità di riacquistare prontamente, pur essendo cellule facenti parte di uno specifico lineage cellulare, caratteristiche di self renewing e multipotenza differenziativa di cellule staminali. Particolarmente interessante a nostro parere, l'elevata espressione di *Eras* e *Timp3* nelle linee di cellule EG da noi utilizzate. Oltre che essere gli unici geni tra quelli da noi analizzati, i cui livelli di espressione di cDNA sono risultati diversi tra le ES e EG, è possibile ipotizzare che essi siano coinvolti nel processo di trasformazione delle PGCs in cellule ES o EC, i cui meccanismi molecolari rimangono ancora in gran parte sconosciuti. I risultati ottenuti nella coltura di PGCs in presenza dei fattori che ne causano la trasformazione in cellule EG e che mostrano un marcato aumento del trascritto per *Timp3*, sembra essere in linea con tale ipotesi.

Confronto PGCs, prospermatogoni e ovociti

Il passaggio dal ciclo mitotico a quello meiotico o l'uscita temporanea dal ciclo mitotico, caratterizza il differenziamento delle PGCs in ovociti o prospermatogoni. Fin dai primi anni settanta, si sono confrontate due ipotesi per spiegare tali processi che nel topo si verificano pressoché contemporaneamente nell'ovaio e nel testicolo tra 12.5 e 13.5 dpc. Una prima ipotesi sostiene che al termine di un certo numero di cicli mitotici, le PGCs spontaneamente iniziano la meiosi nell'ovaio fetale ove non subiscono l'influenza inibitoria di un fattore chiamato MPS che verrebbe prodotto nel

testicolo fetale. La seconda ipotesi afferma invece che l'ingresso in meiosi sarebbe stimolato da una sostanza presente nell'ovaio chiamata MIS, assente nel testicolo. Mentre ci sono pochi dubbi che l'ambiente testicolare nell'embrione non consente l'ingresso in meiosi delle PGCs, rimaneva causa di discussione se ciò avvenisse per la presenza di un inibitore o per l'assenza di una sostanza che induce la meiosi. Recentemente due lavori (Koubova J, 2006; Bowles J et al, 2006) hanno portato prove convincenti che l'acido retinoico, prodotto dal vicino mesonefro, svolge nell'ovaio il ruolo di MIS e che nel testicolo l'enzima CYP26B1, prodotto dalle cellule somatiche, degrada l'acido retinoico impedendo l'attivazione del processo meiotico. E' stato anche provato di recente (Swain A., 2006) che la decisione di entrare in meiosi viene presa dalle PGCs nella fase G1 del ciclo cellulare. Ci sono, tuttavia, ad oggi pochissimi dati disponibili sul meccanismo di blocco della proliferazione delle PGCs e se e come questo si correla con l'ingresso in meiosi. Certamente la stimolazione di tirosin chinasi da parte di alcuni fattori di crescita quali KL e FGF2 è in grado di stimolare la proliferazione delle PGCs. Allo stesso tempo l'attività di PKA è coinvolta nella stimolazione del loro ciclo cellulare, quella di Pin1 nella progressione del ciclo cellulare delle PGCs (Atchison, F.W et al, 2003) mentre quella della fosfatasi lipidica Pten svolge probabilmente un ruolo inibitorio (Moe-Behrens et al, 2003).

Come sopra riportato lo scopo del confronto tra le membrane di cDNA ottenute da PGCs, ovociti e prospermatogoni riportato nel presente lavoro, è quello di evidenziare differenze di espressione di cDNA che possono portare all'identificazione di geni che controllano il passaggio tra ciclo mitotico e meiotico nelle cellule germinali femminili e il blocco proliferativo che si verifica nei prospermatogoni. Negli ultimi anni numerosi lavori, per quel che ci risulta undici, utilizzando diverse metodologie di analisi di espressione genica, hanno studiato l'espressione di geni nelle gonadi di embrioni di topo a diversi stadi di sviluppo. Tuttavia, con l'eccezione di due (Urven et al., 1993; Molyneaux et al., 2004, vedi più avanti), tutti questi lavori hanno utilizzato gonadi intere (Nordvist and Tohonene, 1997; Grimmond et al., 2000; Small et al., 2004; Boume et al., 2004; Menke and Page, 2002; Olesen et al., 2006), testicoli privi di cellule germinali (O'Shoughnessy et al., 2004) o le sole cellule somatiche (Nef et al., 2005; Beverdam and Koopman, 2006). Nel loro complesso questi studi hanno analizzato l'espressione globale di geni delle gonadi embrionali avendo come scopo principale l'identificazione dei meccanismi molecolari responsabili del differenziamento sessuale delle creste gonadiche. Poiché è largamente accettato che tale processo è guidato dalla componente somatica della gonade, grazie a questi lavori un numero crescente di geni espressi in queste popolazioni cellulari è stato identificato. Urven e coll., (1993), hanno prodotto una libreria di cDNA da cellule germinali purificate da gonadi di 12.5 dpc, senza distinzione di sesso, ne alcuna comparazione con cellule germinali di altri stadi differenziativi. Nel lavoro di Molyneaux et al. (2004), gli autori hanno utilizzato popolazioni purificate di cellule germinali isolate da embrioni di topo di 10.5 dpc e gonadi di 12.5 dpc, senza per altro fare

distinzione di sesso. Lo scopo di questo lavoro era di identificare geni coinvolti nella migrazione delle PGCs e nei primi eventi differenziativi che si verificano nelle PGCs subito dopo il loro arrivo nelle gonadi e nessuna attenzione è stata data ai geni del ciclo cellulare.

In generale, le informazioni disponibili su geni espressi nelle cellule germinali embrionali, riguardano prevalentemente quelli espressi nelle PGCs in relazione alla loro formazione (*Blimp1*, *Dppa3*, *Fragilis*) e alla loro staminalità (*Oct4*, *Nanog* e *Sox2*) e quelli espressi negli ovociti con un ruolo nella meiosi (quali *Scp1*, *Scp3*, *Spo11*, *Dmc1* ed altri). L'espressione genica nei prospermatogoni è stata poco caratterizzata e solo alcuni geni sono stati identificati quali ad esempio *Mvh*, *Nanos3*, *Oct4*, *Gcna1*, *Tex101*, *Stat3* e *Cd9*.

Poiché rilevanti per alcuni dei risultati riportati nel presente lavoro, dobbiamo menzionare alcune informazioni disponibili su geni espressi negli ovociti e nei prospermatogoni in relazione ai processi apoptotici che si verificano in entrambi i tipi cellulari. Ad esempio, la più elevata espressione di Bcxl negli ovociti rispetto ai prospermatogoni e eguale espressione di *Bax* in entrambi i tipi cellulari (Kasai et al., 2003), l'espressione di *p63* in ovociti in dictiatio e la sua importanza nel proteggerli da danni al DNA (Suh et al., 2006), l'importanza della caspasi 2 quale effettrice principale dell'apoptosi negli ovociti fetali e postatali (Bergeron et al., 1998; Hanoux et al., 2006) e l'espressione del recettore di Fas e della proteina cFlip nei prospermatogoni (Giampietri et al., 2006).

Da questa analisi si evince che non esistono in pratica informazioni sull'espressione di geni che controllano il ciclo cellulare nelle cellule germinali delle gonadi embrionali. Come sopra riportato, il controllo del ciclo cellulare in tali cellule presenta aspetti unici e peculiari. Difatti, dopo diversi cicli di proliferazione mitotica (circa sette nelle PGCs di topo), nell'ovaio le PGCs entrano in meiosi, in cui un ciclo replicativo di sintesi di DNA, caratterizzato da una più lunga durata (circa 11 ore) rispetto a quello della mitosi, è seguito da una prolungata fase G2 conosciuta come profase I. Nel testicolo invece, i prospermatogoni escono temporaneamente dal ciclo (nel topo per circa 5-6 giorni) rimanendo nella fase G1/G0.

Da un primo esame complessivo del nostro studio risulta che nel passaggio da PGCs ad ovociti o prospermatogoni, il numero dei cDNA i cui livelli superano il 10% di *Gapd* aumenta da 45/96 nelle PGCs a 56 negli ovociti e 58 nei prospermatogoni. Escludendo i cDNA che in tutte e tre le popolazioni mostravano un'espressione <10% *Gapd*, nei prospermatogoni, undici cDNA (*c-abl*, *ciclina D1*, *ciclina D2*, *ciclina G2*, *ciclina H*, *Cdc25a*, *p27*, *p57*, *p16*, *Rb*, *Ubc*) mostravano un apparente aumento (> 15) dei livelli di espressione rispetto alle PGCs e otto (*ciclina B2*, *P55cdc*, *Cdc2*, *Cdc6*, *cullina3*, *E2f4*, *Ki67*, *Rpa*) un'apparente (<15) diminuzione. Negli ovociti diciannove cDNA (*bcl2*, *ciclina C*, *Ccne1*, *Ccne2*, *ciclinaG2*, *ciclina H*, *p21*, *p27*, *p57*, *p16*, *p15*, *p18*, *cullina4b*, *E2f5*, *Gadd45*, *Nedd8*, *Rad51*, *Rb*, *Skip1*) mostravano un apparente aumento rispetto alle PGCs e sei (*ciclina A2*, *P55cdc*, *cdc6*, *Cdk4*,

cullin3, *14-3-3*) un'apparente diminuzione. Tuttavia, l'analisi statistica indicava che tali variazioni erano da ritenersi significative solamente per *ciclina G2*, *ciclina H*, *p16*, *Rb*, *E2f4* e *Rpa* nei prospermatogoni e *ciclina C*, *Ccne2*, *ciclina G2*, *ciclina H*, *p21*, *p16*, *E2f5*, *Nedd8*, *Rad51*, *Rb* e *ciclina A2* negli ovociti. Quando il confronto era effettuato tra ovociti e prospermatogoni, i cDNA di *ciclina E2*, *Nedd8*, *E2f5*, *ciclina C* e *Rad51* risultavano significativamente più elevati negli ovociti, mentre l'espressione di tutti gli altri trascritti appariva a livelli simili. Le analisi per real time RT-PCR confermavano sostanzialmente le differenze statisticamente significative degli arrays con l'eccezione di *Rb*.

Mentre, il mantenimento di livelli elevati di cDNA per diversi geni che promuovono la progressione del ciclo in cellule mitotiche sia nei prospermatogoni che negli ovociti nello stadio di differenziamento analizzato può sembrare non in linea all'ingresso in G0/G1 nei primi e in meiosi nei secondi, diverse spiegazioni possono essere avanzate. In primo luogo, nei testicoli e nelle ovaie, la fase di proliferazione mitotica delle cellule germinali non è ancora completamente esaurita a 14.5 dpc (Hilsher, 1983; McClennan et al., 2003), la vita media di alcuni trascritti può essere relativamente lunga e i sistemi di ubiquitinazione rappresentati nei nostri arrays da ben quindici cDNA rimanere attivi anche in G0 e in meiosi. Inoltre è ben documentato l'importante ruolo che in meiosi svolgono alcune cicline, CDKs e proteine coinvolte nella duplicazione e riparazione del DNA (vedi le rassegne, Wolgemuth et al., 2002; Cohen et al., 2007). Infine è possibile, che una piccola parte dei livelli di espressione dei cDNA sia dovuta alla contaminazione di cellule somatiche che soprattutto nei testicoli in questa fase si trovano in attiva proliferazione mitotica.

Possiamo speculare che alcuni dei significativi cambiamenti dei livelli di cDNA rilevati tra PGCs e ovociti e prospermatogoni siano correlabili al blocco del ciclo mitotico che si verifica in entrambi i tipi cellulari. A questo riguardo appare particolarmente interessante l'aumento dei livelli dei cDNA per la *ciclina G* e degli inibitori delle Cdk quali *p16* e *p21*. La *ciclina G2* è infatti una ciclina non convenzionale espressa a livelli elevati in cellule postmitotiche; a differenza delle altre cicline che promuovono la progressione del ciclo mitotico, essa blocca il ciclo mitotico in G1. In alcuni tipi cellulari è stato dimostrato che la *ciclina G2* si associa con la fosfatasi PP2A che defosforila Rb (Bennin et al., 2002). Inoltre la sua aumentata espressione sembra dipendere da un membro della famiglia delle fork heads *Foxo3a* che è attivo in assenza di fosforilazione da parte di *Akt*. Poiché nelle PGCs la via PI3K/*Akt* è attivata dal recettore c-Kit e tale recettore non viene più espresso negli ovociti e nei prospermatogoni, si può ipotizzare che l'inattivazione di tale via sia coinvolta nell'aumentata espressione della ciclina G2 e nel blocco mitotico. A questo contribuisce probabilmente anche l'aumento dei trascritti di *p16INK4* e *p21Waf1*. Il primo blocca l'attività delle *Cdk4/6*, mentre il secondo inibisce l'attività di pressoché tutti i complessi Cdk/cicline. Da notare che *p21* è espresso ad

elevati livelli in cellule meiotiche quali gli spermatociti in pachitene (West and Lahdetie, 1997). Anche l'aumento dei trascritti per *Rb*, può essere interpretato nell'ottica del blocco del ciclo mitotico. Difatti elevati livelli di *Rb* sono notoriamente correlati all'arresto del ciclo in G0/G1. Infine l'abbassamento nei prospermatogoni dei livelli di trascritti per *Rpa*, un gene che codifica per una proteina coinvolta nella duplicazione, ricombinazione e riparo del DNA (Zou L, 2003) del fattore di trascrizione *E2f4*, necessario per l'attivazione di geni che controllano il passaggio G1/S e l'aumento negli ovociti di *E2f5*, un fattore di trascrizione che legandosi a *Rb* reprime geni che controllano il passaggio G1/S, nonché la diminuzione dei trascritti della *ciclina A2*, sono in linea con la fine della fase di proliferazione mitotica. Per quanto riguarda l'aumento significativo dei livelli di cinque trascritti rilevato negli ovociti, quattro sia rispetto alle PGCs che ai prospermatogoni (*ciclina E2*, *Nedd8*, *ciclina C* e *Rad51*) e uno solo rispetto alle PGCs (*ciclina H*), è possibile che esso sia legato all'ingresso in meiosi. Le tre cicline di cui risultano aumentati i livelli di cDNA, una della fase G1, la *ciclina E2* e due della fase S, *ciclina C* e *H* possono difatti avere un ruolo nella meiosi. L'ablazione di *ciclina E2*, causa arresto della meiosi nelle cellule germinali maschili, anche se le femmine rimangono fertili (Geng et al., 2003). L'elevata espressione dei trascritti di *ciclina E1*, da noi rilevata negli ovociti, potrebbe compensare tale mancanza. Nel lievito, *Ume3p/Srb11p* (omologo di *ciclina C*) è necessario per l'uscita dalla mitosi e l'ingresso in meiosi (Cooper and Strich, 2002). Da rilevare che la *ciclina C* può avere un'attività chinasi indipendente dalla sua associazione con CDKs e che nelle cellule mitotiche i suoi partners preferenziali sono Cdk3 e Cdk8 in associazione con i quali essa può promuovere l'uscita da G0 (Ren and Rollins, 2004). L'abbondanza dei trascritti per *ciclina H* e del suo partner Cdk7 negli spermatociti di topo, ha fatto avanzare l'ipotesi che nella meiosi questo complesso sia necessario per attivare Cdk2/Ciclina A1 (Matt Kim et al., 2000), la cui attività è essenziale per la progressione meiotica nelle cellule germinali maschili. A tale proposito è difficile spiegare l'analogo aumento dei trascritti per la *ciclina H* rilevato nei prospermatogoni. Nelle cellule mitotiche tale *ciclina* si associa con la Cdk7 formando un complesso CAK in grado di fosforilare e attivare i complessi *Ciclina/CDK* (in particolare Cdk2/Ciclina E). Poiché i trascritti della *Cdk7* nei nostri arrays sono presenti a livelli molto bassi in tutti e tre i tipi cellulari analizzati, è possibile che in questa fase la *ciclina H* sia inattiva e venga accumulata nei prospermatogoni al fine di consentire la reversibilità del blocco in G0. L'aumento dei livelli di cDNA per *Nedd8* e *Rad51* negli ovociti sono pure spiegabile in relazione alla meiosi. In *C. elegans* l'associazione di *Nedd8*, una proteina simile all'ubiquitina, alla cullina 3 (la cullina più espressa nei nostri arrays degli ovociti) del complesso SCF è necessaria per la degradazione della proteina MEI-1/catanina, che media la depolimerizzazione dei microtubuli, nella transizione mitosi-meiosi (Pintard et al., 2003). *Rad51* è una delle proteine più importanti coinvolte nel riparo e nella ricombinazione del DNA durante la meiosi (Ashley et al., 1995).

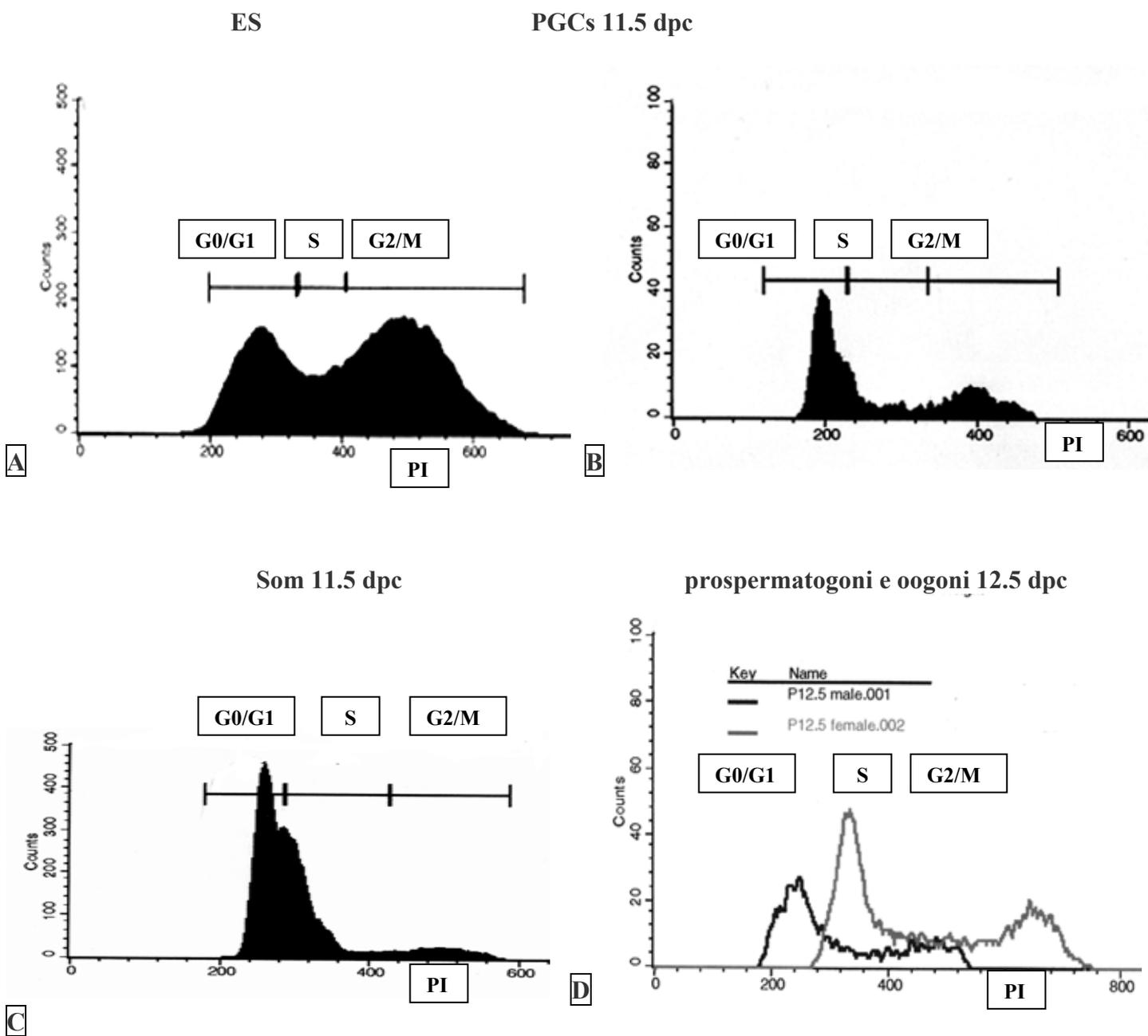
Un'ultima osservazione riguarda i trascritti per geni coinvolti nel danno al DNA e nell'apoptosi. Oltre che per *Rad51*, i trascritti per alcuni importanti geni di questo gruppo, come *Atm*, se pur espressi a livelli $<10\%$ *Gapd*, o con variazioni non statisticamente significative rispetto alle PGCs e ai prospermatogoni, come *bcl2*, *Gadd45a* e *Chk1*, risultavano in aumento negli ovociti. Altri trascritti per geni coinvolti nei processi apoptotici che si verificheranno negli ovociti più avanti nella meiosi, quali *Bax* e *p63* (vedi sopra), non mostravano in questo stadio significativi livelli di espressione.

CONCLUSIONI

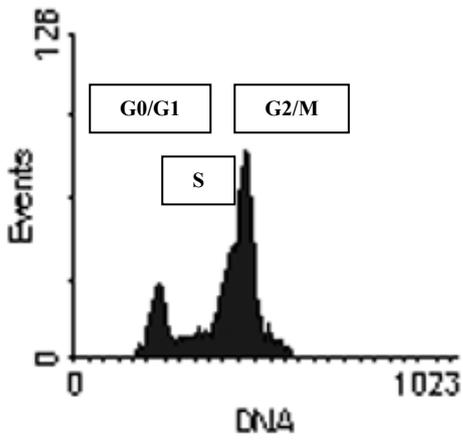
Il nostro lavoro è il primo ad affrontare uno studio mirato nelle cellule germinali embrionali su un gruppo di geni significativo e rappresentativo tra quelli coinvolti nel ciclo cellulare in cellule somatiche. Pur sottolineando il fatto che i livelli di controllo del ciclo cellulare sono molteplici e complessi e che la trascrizione di specifici geni rappresenta solo uno dei livelli di controllo di tale processo, alcuni risultati meritano a nostro parere di essere ulteriormente approfonditi. Nel complesso le analisi comparate dei cDNA arrays hanno da una parte evidenziato somiglianze e differenze nel ciclo cellulare tra PGCs, cellule ES e cellule EG e dall'altra fornito indicazioni su alcuni meccanismi molecolari relativi al ciclo cellulare che potrebbero essere responsabili del blocco mitotico nelle cellule germinali embrionali e il passaggio al ciclo meiotico negli ovociti.

Per quanto riguarda il primo tipo di confronto, si è potuto rilevare che relativamente ai geni analizzati le PGCs presentano un ciclo cellulare che da una parte le rende simili a normali cellule somatiche proliferanti, in particolare per la presenza di una fase G1 soggetta a regolazione, dall'altra le rende più affini nel complesso di espressione genica alle cellule staminali alle quali sono accomunate per diverse altre caratteristiche genomiche. Da rilevare in tale ambito le notevoli diversità di espressione dei cDNA per *Eras* e *Timp-3* tra le PGCs e le cellule EG che possono rappresentare oggetto di ulteriori studi relativi ai meccanismi alla base della trasformazione delle PGCs in cellule EG o EC. Nel confronto PGCs verso prospermatogoni e ovociti e prospermatogoni verso ovociti, le osservazioni più interessanti a nostro parere, riguardano l'espressione relativamente elevata sia nei prospermatogoni che negli ovociti della *ciclina G2* e degli inibitori delle CDKs *p16* e *p21*, che rende queste proteine candidate per un ruolo nel blocco mitotico che si verifica in questi due tipi cellulari, e gli aumentati livelli di trascritti per *ciclina C* e *ciclina H*, due cicline che potrebbero avere un ruolo importante nel passaggio da mitosi a meiosi negli ovociti.

FIGURE E TABELLE



Ovociti 14.5 dpc



Prospermatogoni 14.5 dpc

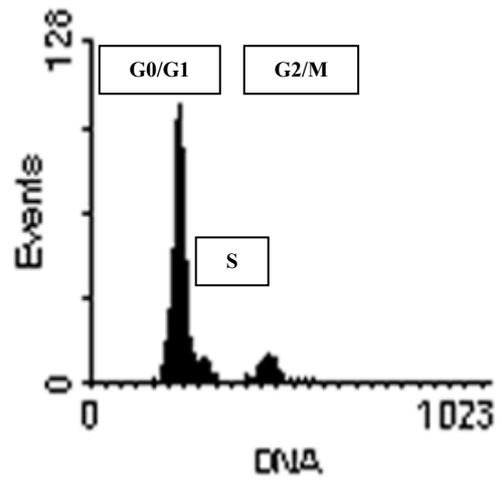
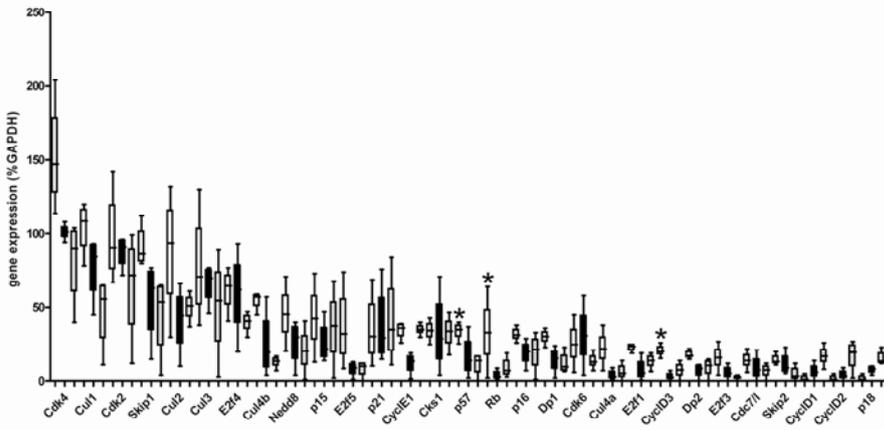
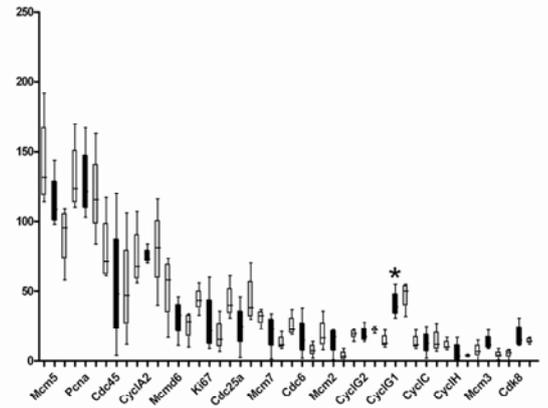


Fig. 5

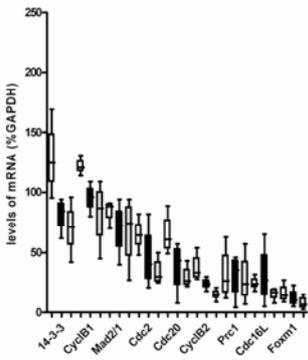
G1 phase



S phase



G2/M phase



DNA damage/p53/Atm

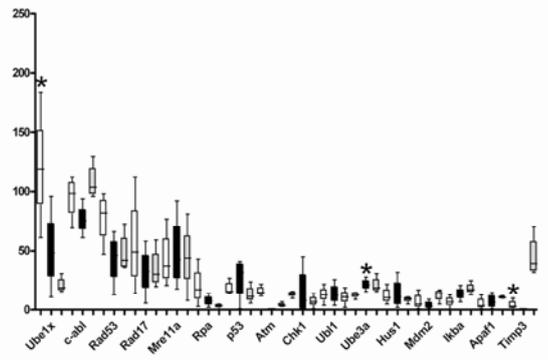


Fig. 6

□ PGC ■ ES ▒ EG

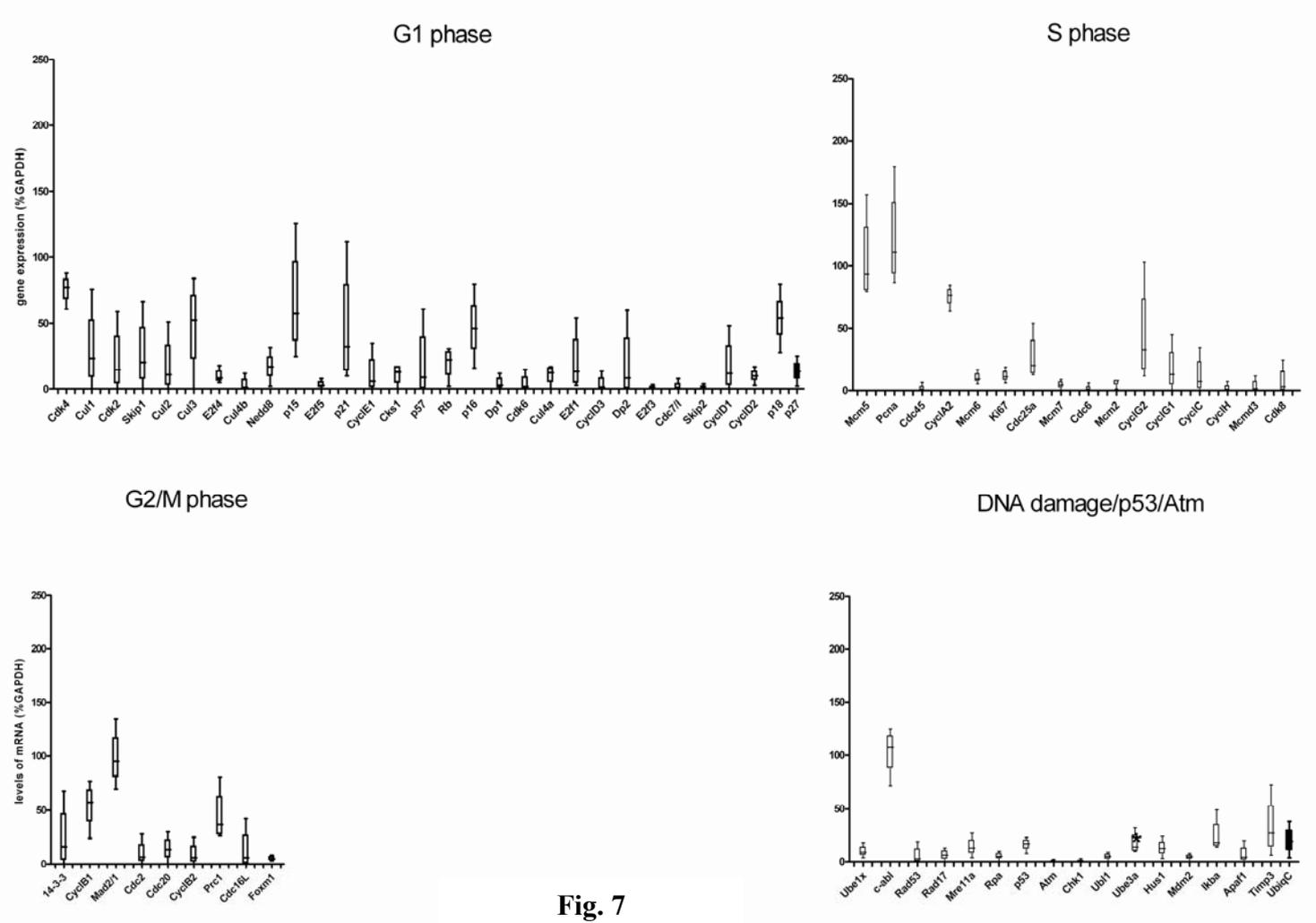


Fig. 7

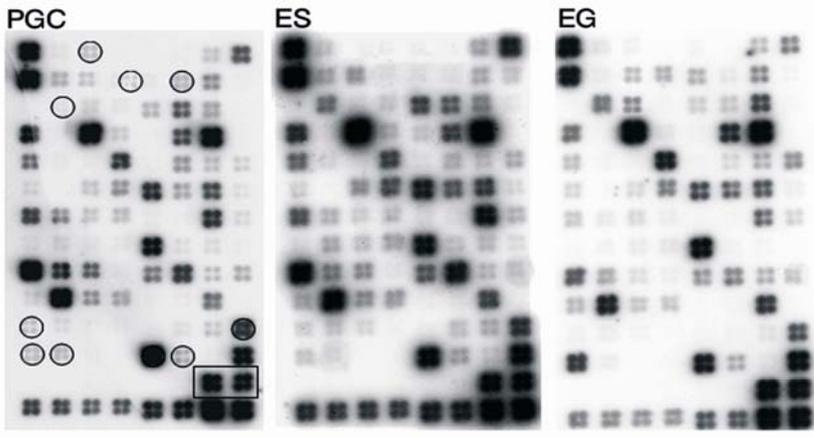
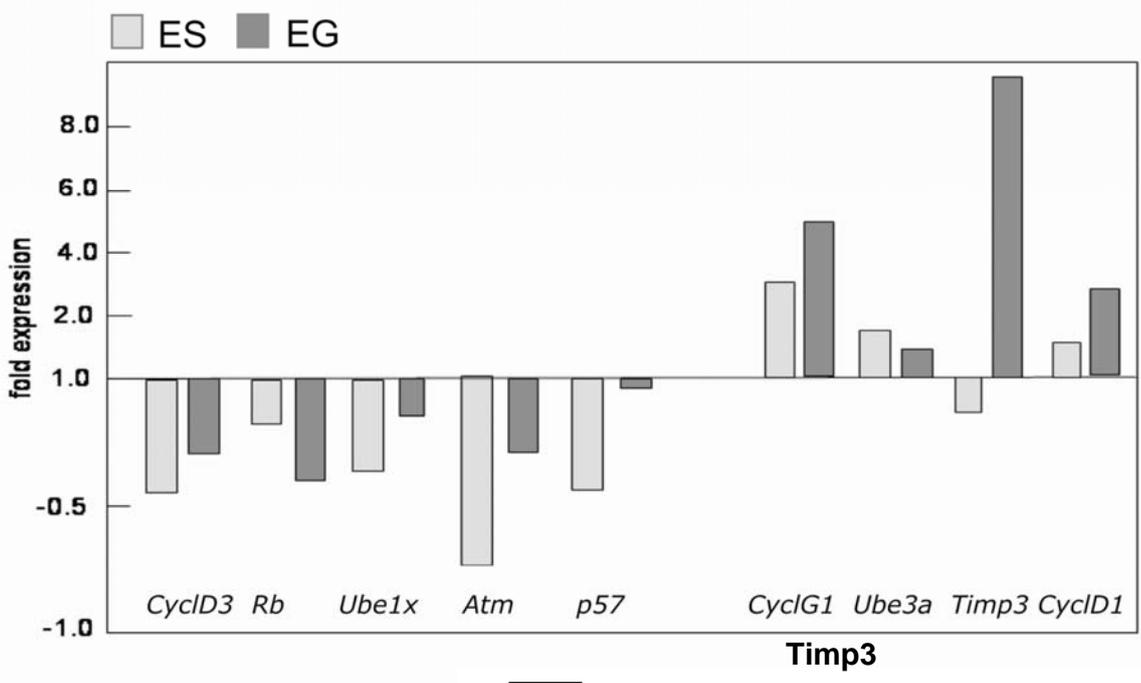
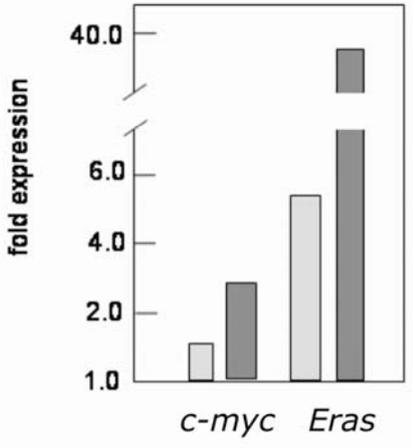


Fig. 8

A



B



C

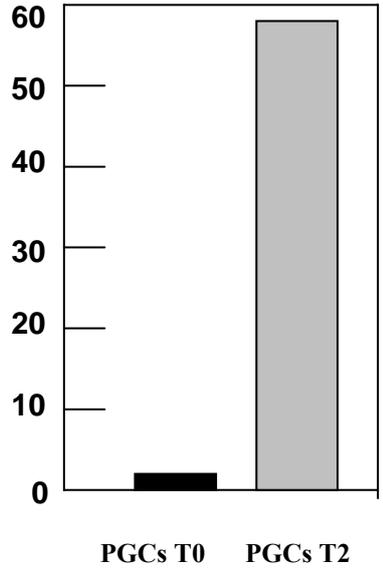


Fig.9

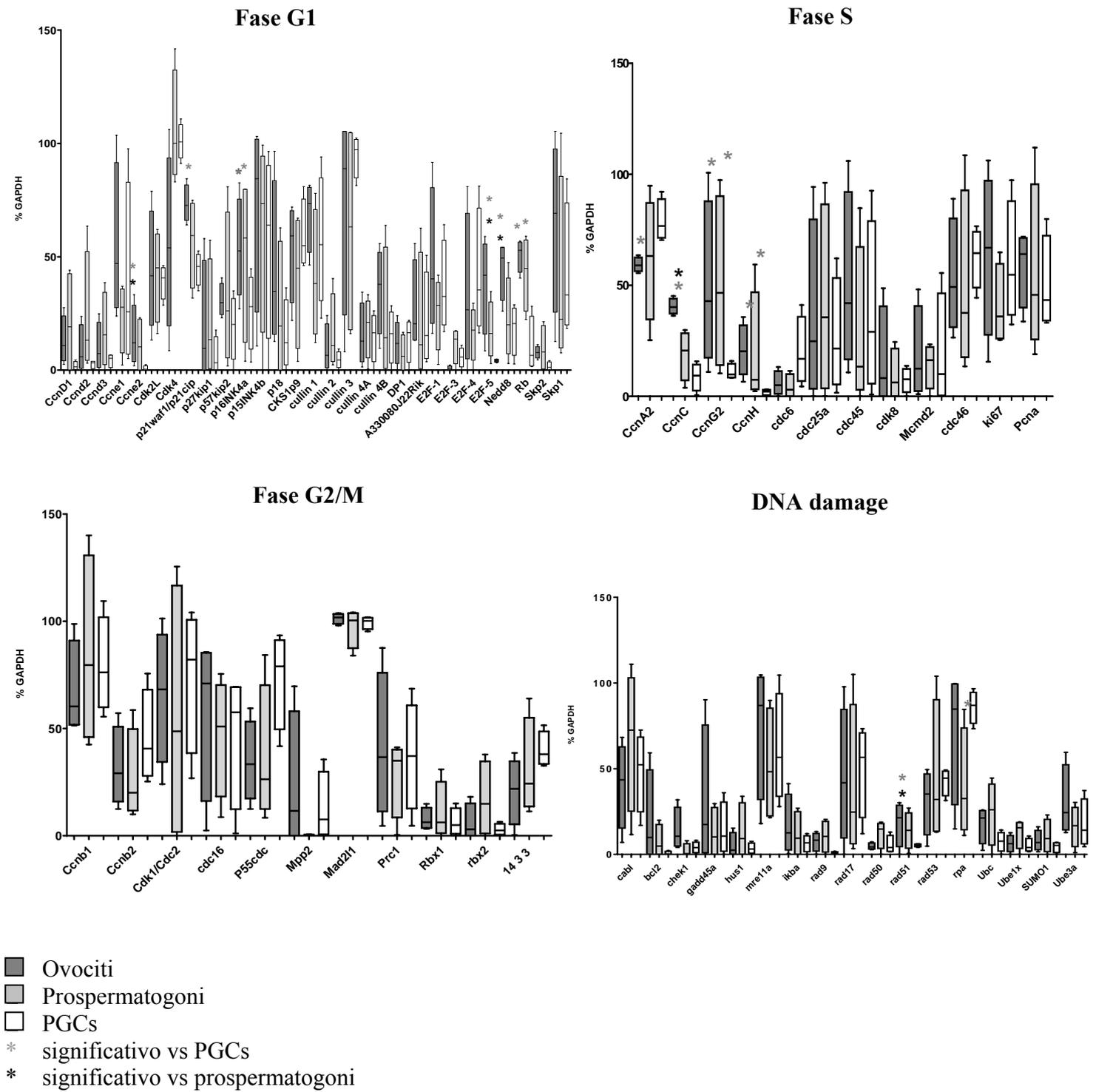
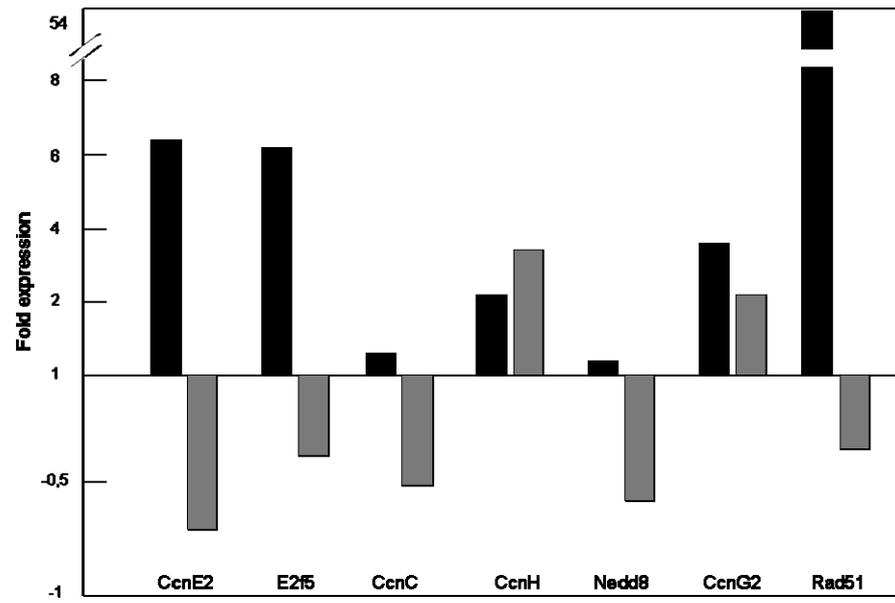
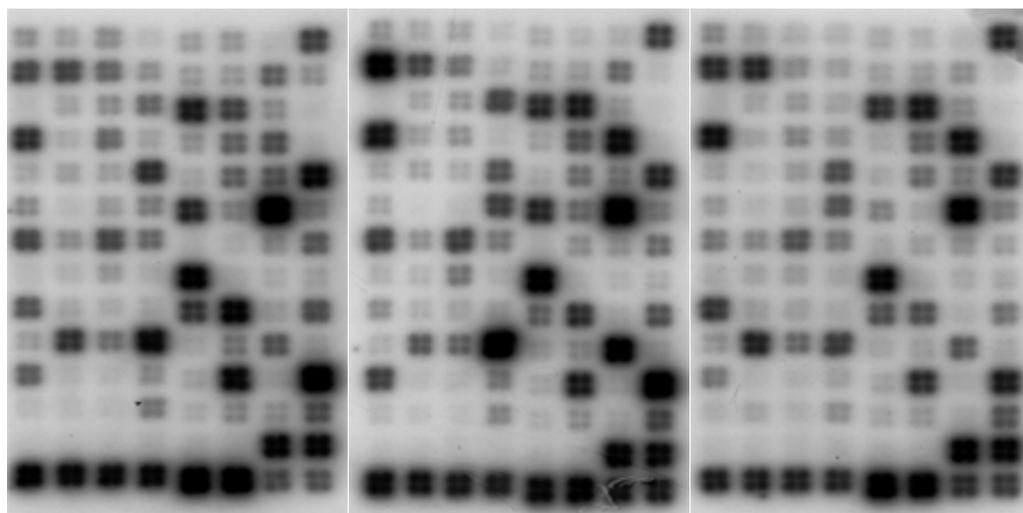


Fig. 10



Ovociti
 Prospermatogoni

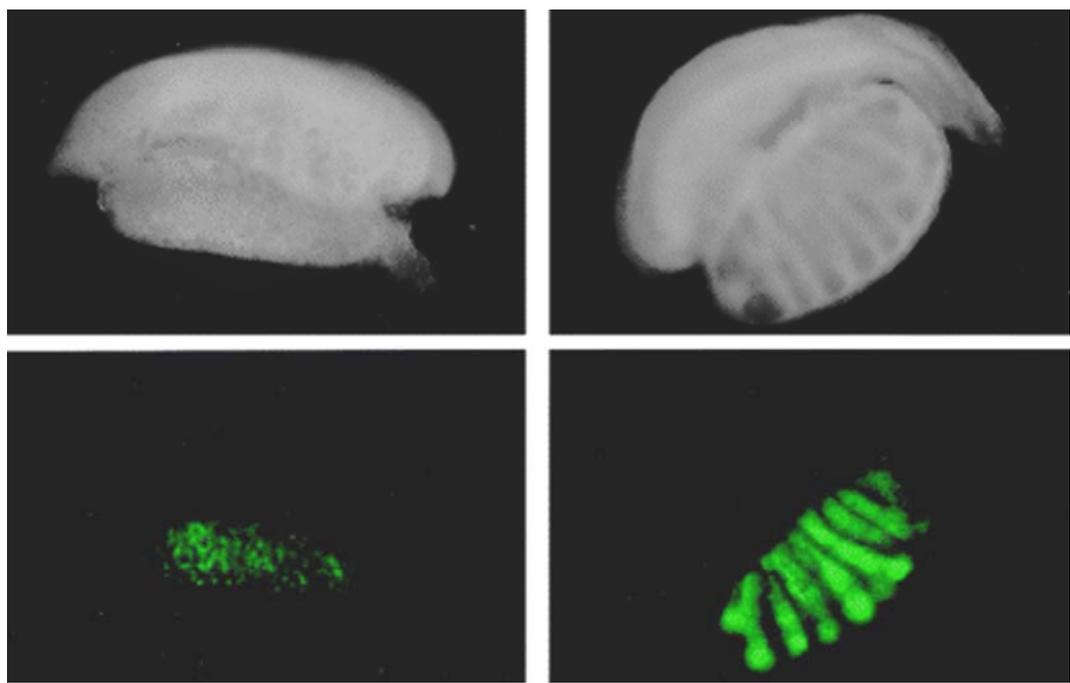


Ovociti 14.5 dpc

Spermatogoni 14.5 dpc

PGCs 11.5 dpc

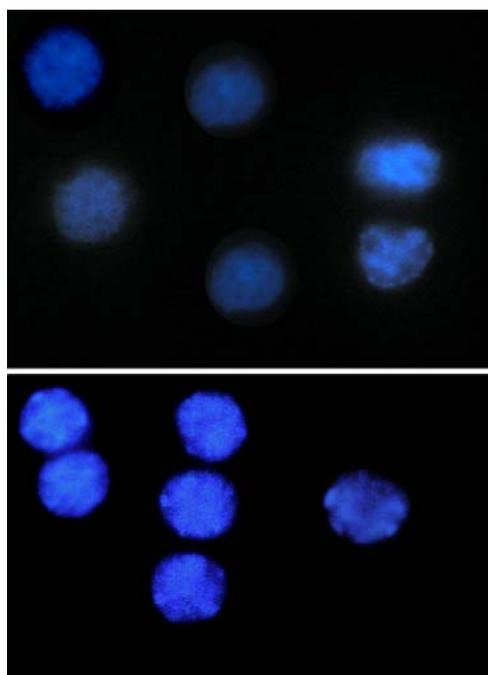
Fig. 12



Ovaio di topo CD1/ΔPE-GOF18 14.5 dpc

Testicolo di topo CD1/ΔPE-GOF18 14.5 dpc

Fig. 13



Spermatogoni 14.5 dpc post-sorting

Ovociti 14.5 dpc post-sorting

Fig. 14

Tabella 1

Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nella real time RT-PCR.

<i>Name</i>	<i>Fw/Rw</i>	<i>Accession number</i>	<i>sequence</i>
Timp3	Fw	NM_011595	caactccgacatcgtgatcc
Timp3	Rw	NM_011595	tgaggccacaaagactttca
Atm	Fw	NM_007499	gaaagccaagtctctgatgc
Atm	Rw	NM_007499	aggaaaaagccagaggcaat
Skip1	Fw	NM_011543	gggcagcttgaagtaacca
Skip1	Rw	NM_011543	cccactccaaaaccacaaac
Eras	Fw	NM_181548	atgcaccagatctccagagg
Eras	Rw	NM_181548	tggccacttcctccagtag
p57kip2	Fw	NM_009876	gtcgaggagaaggacgagga
p57kip2	Rw	NM_009876	gaagaagtcgttcgattgg
Ube1X	Fw	NM_009457	aggagttgcagagtgcgaat
Ube1X	Rw	NM_009457	tgctgtcatcatccttctca
Ube3a	Fw	NM_173010	actggtccggctagagatg
Ube3a	Rw	NM_173010	accagactatgccaatca
Rb	Fw	NM_009029	caggcctcctacctgtcac
Rb	Rw	NM_009029	tgtcccaaatgattcaccaa
CyclinG1	Fw	NM_009831	aatgaaggtacaggcgaagc
CyclinG1	Rw	NM_009831	tgcagaaattgaaaggcagt
c-myc	Fw	NM_010849	cagcgactctgaagaagagc
c-myc	Rw	NM_010849	gttgtgctggtgagtgagga
CycD1	Fw	NM_007631	gctgcaaatggaactgcttc
CycD1	Rw	NM_007631	agggtgggttgaaatgaac
CyclinD3	Fw	NM_007632	atgctggaggtgtgtgagga
CyclinD3	Rw	NM_007632	ccacagcctggtccgtatag
18S	Rw	X56974	gcagcaactttaataacgctattgg
18S	Fw	X56974	gaggccccgtaattggaatgag
VASA	Fw	D14859.	ccaaaagtgacatatataccc
VASA	Rw	D14859.	ttggtgatcagttgtcgagt
KL	Fw	BC011322	cagcttgactactctctggacaa
KL	Rw	BC011322	ttcttctccagtataaggctcca
CcnE2	Fw	NM_009830	aagacgcagccgttacaag
CcnE2	Rw	NM_009830	taatgcaagggtgattcct
E2f5	Fw	NM_007892	aagcggctgcagataccttg
E2f5	Rw	NM_007892	ccacaacttctgctggtaa
CcnC	Fw	NM_016746	accacctccaaacagtgaag
CcnC	Rw	NM_016746	ttcattgcatctgctcca
CcnH	Fw	NM_023243	tctgttgggttacagcttg
CcnH	Rw	NM_023243	atctgtccagtgccctctc
Nedd8	Fw	NM_008683	acagacaaggtggagcgaat
Nedd8	Rw	NM_008683	tttcttactgccaagacc
CcnG2	Fw	NM_007635	aggtgaaaccgaaacacctg
CcnG2	Rw	NM_007635	atgtcagacgtgtgcattt
p16Ink	Fw	NM_009877	aactcgaggagagccatctg
p16Ink	Rw	NM_009877	ggggtagaccgaaagagtt
Rad 51	Fw	NM_011234	tcacggttagagcagtgagg
Rad 51	Rw	NM_011234	gtgggtgaaaccattggaac

Tabella 2

Volte di espressione nelle PGC dei trascritti la cui abbondanza differisce significativamente comparata alle cellule ES e EG nell'analisi di microarray. Per ogni gene è riportato il \log_2 del rapporto tra i livelli di espressione.

	PGC/ES	PGC/EG
CyclinD3	2.70	1.40
CyclinD1	-0.50	-1.60
Rb	3.0	1.89
Skip1	0.75	1.05
p57kip2	1.89	2.33
CyclinG1	-1.42	-1.60
Ube1x	1.24	1.8
Atm	3.16	2.09
Ube3a	-1.0	-0.45
Timp3	2.48	-8.0

Volte di espressione nelle PGC dei trascritti la cui abbondanza differisce significativamente comparata agli ovociti e i prospermatogoni di 14.5 dpc nell'analisi di microarray. Per ogni gene è riportato il \log_2 del rapporto tra i livelli di espressione.

	P/F	P/M	F/M
Nedd8	0,18	0,57	0,25
RAD51	0,80	0,92	0,76
Skp2	0,89	0,91	0,5
Cyclin C	0,86	0,72	0,22
Cyclin D1	0,92	0,95	0,64
Rb	0,86	0,84	0,44
E2F-5	0,92	0,84	0,22
Cyclin H	0,94	0,93	0,47
Cyclin G2	0,85	0,87	0,5
p21waf1/p21cip	0,65	0,5	0,4
Cyclin E2	1,23	1,4	0,3
Cyclin A2	0,39	0,41	0,5
p16INK4a	0,71	0,69	0,47

BIBLIOGRAFIA

Abe K., Ko M.S.K., Mc Gregor G.R., 1998. A systematic molecular genetic approach to study mammalian germ line development. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1051-1605

Agami R, Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):55-66

Agoulnik, A.I., Lu, B., Zhu, Q., Truong, C., Ty, M.T., Arango, N., Chada, K.K., Bishop, C.E., 2002. A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3047-3053.

Ambrosetti DC, Scholer HR, Dailey L, Basilico C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23387-97.

Appella E. Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):2763

Arata Y, Fujita M, Ohtani K, Kijima S, Kato JY. Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem.* 2000 Mar 3;275(9):6337-45

Atchison, F.W., Capel, B., Means, A.R., 2003. Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation. *Development.* 130, 3579-3086.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003 Jan 30;421(6922):499-506

Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet.* 2006 Dec;38(12):1430-4.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Bartek, J., Lukas, J., 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 738-747.

Bennin DA, Arachchige Don AS, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, De Paoli-Roach AA, Horne MC. Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A Catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *The journal of biological chemistry* vol 277 No 30, pp 27449-27467, 2002

Bergeron L, Pelez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Giuriscova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 1998; 12 (9) 1304-14

Beverdam A and Koopman P. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human Molecular Genetics*, 2006, vol. 15, No. 3, 417-431

- Blasina A, de Weyer IV, Laus MC, Luyten WH, Parker AE, McGowan CH. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol*. 1999 Jan 14;9(1):1-10
- Bouma GJ, Affourtit JP, Bult CJ, Eicher EM. Transcriptional profile of mouse pre-granulosa and Sertoli cells isolated from early-differentiated fetal gonads.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*. 2006
- Bradley A, Evans MJ, Kaufman MH, Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255–56
- Burdon, T., Smith, A., Savatier, P., 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell. Biol.* 12, 432-438.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1677-9.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1677-9
- Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J*. 2003 Dec 15;22(24):6610-20
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):643-55.
- Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13777-82.
- Chen MS, Hurov J, White LS, Woodford-Thomas T, Piwnicka-Worms H. Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol*. 2001 Jun;21(12):3853-61.
- Chen MS, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*. 2003 Nov;23(21):7488-97
- Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, Schreiber SL cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):2850-5
- Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. 2006 *Endocrine reviews* 27 (4): 398/426
- Cooke J. E., Godin, I., French-Constant, C., Heasman, J., and Wyllie, C. C. (1993). Culture and manipulation of primordial germ cells. In "Methods in Enzymology: Guide to Techniques in Mouse Development" (P. M. Wassarman and M. L. DePamphilis, Vol. 225, pp. 37 –57. Academic Press, San Diego

- Cooper KF, Strich R. *Saccharomyces cerevisiae* C-Type Cyclin Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development. *Eukaryotic cell*, 2002 vol 1 No 1, 66-74
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signalling. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1713-6
- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. : *Science*. 1999 Nov 5;286(5442):1162-6
- Davis, A., Bradley, A., 1993. Mutation of N-myc in mice: what does the phenotype tell us? *Bioessays*. 15, 273-275.
- De Felici M, Scaldaferri ML, Lobascio M, Iona S, Nazzicone V, Klinger FG, Farini D. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Hum Reprod Update*. 2004 May-Jun;10(3):197-206. Review.
- De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *Int J Dev Biol*. 2000;44(6):575-80
- De Felici M. Twenty years of research on primordial germ cells. *Int J Dev Biol*. 2001;45(3):519-22 Review
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87:27–45
- Donovan P.J., Gearhart J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 419, 92-97. Oct;13(5):463-71
- Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003
- Durcova-Hills G, Ainscough J, McLaren A. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. *Differentiation*. 2001 Oct;68(4-5):220-6.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25
- Evans MJ, Kaufman M. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–56
- Faast, R., White, J., Cartwright, P., Crocker, L., Sarcevic, B., Dalton, S., 2004. Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16^{INK4a}. *Oncogene*. 23, 491-502.
- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):842-7.

- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):842-7.
- Farini D, Scaldaferri ML, Iona S, La Sala G, De Felici M. Growth factors sustain primordial germ cell survival, proliferation and entering into meiosis in the absence of somatic cells. *Dev Biol*. 2005 Sep 1;285(1):49-56.
- Fujii-Yamamoto H, Kim JM, Arai K, Masai H. Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2005 Apr 1;280(13):12976-87.
- Furnari B, Blasina A, Boddy MN, McGowan CH, Russell P. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell*. 1999 Apr;10(4):833-45.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 2003, 22; 114 (4): 431-43
- Giampietri C, Petrunaro S, Coluccia P, Antonangeli F, Paone A, Padula F, De Cesaris P, Ziparo E, Filippini A. c-Flip(L) is expressed in undifferentiated mouse male germ cells. *FEBS Lett*. 2006 Nov 13;580(26):6109-14.
- Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M.K., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M.S., 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 269, 360-380.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990 Oct;110(2):521-8.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., McLaren, A., 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528
- Goodrich DW, Lee WH. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta*. 1993 May 25;1155(1):43-61
- Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O'Connor PM, Piwnicka-Worms H. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25;275(8):5600-5.
- Green CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lowndes NF. A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol*. 2000 Jan 13;10(1):39-42.
- Green SL, Giaccia AJ. Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy. *Cancer J Sci Am*. 1998 Jul-Aug;4(4):218-23.
- Griffith JD, Lindsey-Boltz LA, Sancar A. Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15233-6.
- Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, Soares MB, de Fatima Bonaldo M, Smith L, Tymowska-Lalanne Z, Wells C, Greenfield A. Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet*. 2000 Jun 12;9(10):1553-60.

Guo S, Zhang Y, Yuan F, Gao Y, Gu L, Wong I, Li GM. Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):21607-16.

Guo Y, Costa R, Ramsey H, Starnes T, Vance G, Robertson K, Kelley M, Reinbold R, Scholer H, Hromas R. The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3663-7.

Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

Hanoux V, Pairault C, Bakalska M, Habert R and Livera G. Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. *Cell Death and Differentiation* (2006), 1-11

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):805-16

Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*. 1994 Aug 1;8(15):1759-71.

Hilscher W. Problems of the keimbahn new work on mammalian germ cell lineage. *Bibliothca anat.*, No 24, pp 1-21

Hilscher WM, Trott KR, Hilscher W. Cell progression and radio sensitivity of T1-prospermatogonia in Wistar Rats *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1982 May;41(5):517-24.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene*. 2004 Apr 15;23(17):3122-7

Horne MC, Donaldson KL, Goolsby GL, Tran D, Mulheisen M, Hell JW, Wahl AF. Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12650-61

Jirmanova, L., Afanassieff, M., Gobert-Gosse, S., Markossian, S., Savatier, P., 2002. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*. 21, 5515-5528.

Kakizuka A, Sebastian B, Borgmeyer U, Hermans-Borgmeyer I, Bolado J, Hunter T, Hoekstra MF, Evans RM. A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev*. 1992 Apr;6(4):578-90

Kasai S, Chuma S, Motoyama N, Nakatsuji N. Haploinsufficiency of Bcl-x leads to male-specific defects in fetal germ cells: differential regulation of germ cell apoptosis between the sexes. *Dev. Biol*. 264 (2003) 202-216

Kastan MB. Cell cycle. Checking two steps. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):766-7.

Kim JM, McGaughy JT, Bogle KR, Ravnik SE. Meiotic expression of the cycline H/Cdk7 complex in male germ cells of the mouse. *Biology of reproduction* 64, 5 (2001) 1400-1408

- Kimura, T., Suzuki, A., Fujita, Y., Yomogida, K., Lomeli, H., Asada, N., Ikeuchi, M., Nagy, A., Mak, T.W., Nakano, T., 2003. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development*. 130, 1691-1700.
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev*. 2004 Jun 15;18(12):1423-38.
- Kondo T, Matsumoto K, Sugimoto K. Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1136-43
- Kondo T, Wakayama T, Naiki T, Matsumoto K, Sugimoto K. Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):867-70.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990 Nov 29;348(6300):450-2
- Koshimizu U, Taga T, Watanabe M, Saito M, Shirayoshi Y, Kishimoto T, Nakatsuji N. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells in vitro and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development*. 1996 Apr;122(4):1235-42
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2474-9.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*. 2004 Aug 20;118(4):477-91
- Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp*. 1994;182:157-68
- Lake J, Rathjen J, Remiszewski J, Rathjen PD. Reversible programming of pluripotent cell differentiation. *J Cell Sci*. 2000 Feb;113 (Pt 3):555-66
- LeCouter, J.E., Whyte, P.F., Rudnicki, M.A., 1996. Cloning and expression of the Rb-related mouse p130 mRNA. *Oncogene*. 12, 1433-1440.
- Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 2004 Apr 2;304(5667):93-6
- Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem*. 2001 May;268(10):2779-83
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):613-7
- Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet*. 2002 Apr;30(4):446-9.
- Liu D, Liao C, Wolgemuth DJ. A role for cyclin A1 in the activation of MPF and G2-M transition during meiosis of male germ cells in mice. *Dev Biol*. 2000 Aug 15;224(2):388-400

Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 2000 Jun 15;14(12):1448-59.

Lopez-Girona A, Kanoh J, Russell P. Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Curr Biol.* 2001 Jan 9;11(1):50-4.

Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2003 Mar;5(3):255-60.

Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 2004 Jul 7;23(13):2674-83.

Luoh, S.W., Bain, P.A., Polakiewicz, R.D., Goodheart, M.L., Gardner, H., Jaenisch, R., Page, D.C., 1997. Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development.* 124, 2275-2284.

MacLean-Hunter, S., Makela, T.P., Grzeschiczek, A., Alitalo, K., Moroy, T., 1994. Expression of a rlf/L-myc minigene inhibits differentiation of embryonic stem cells and embryoid body formation. *Oncogene.* 9, 3509-3517.

Mak TW. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science.* 2000 Mar 10;287(5459):1824-7

Manke IA, Yaffe MB Chk'n out in mitosis. *Cell Cycle.* 2003 May-Jun;2(3):236-7.

Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7634-38

Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol.* 2004 Mar;24(5):2181-9.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, et al. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 18:4261-69

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):841-7

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 2001 May 1;15(9):1067-77

McClellan KA, Gosden R, Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev. Biol.* 258 (2003) 334-348

McLaren A. Mammalian germ cells: birth, sex, and immortality. *Cell Struct Funct.* 2001 Jun;26(3):119-22.

- Melo JA, Cohen J, Toczyski DP. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo *Genes Dev.* 2001 Nov 1;15(21):2809-21
- Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns.* 2002 Dec;2(3-4):359-67.
- Menke DB, Koubova J, Page DC. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol.* 2003 Oct 15;262(2):303-12
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. *Arch Med Res.* 2001 Nov-Dec;32(6):553-8. Review.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):631-42
- Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2004 Aug-Sep;3(8-9):945-52
- Moe-Behrens, G.H., Klinger, F.G., Eskild, W., Grotmol, T., Haugen, T.B., De Felici, M., 2003. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol. Endocrinol.* 17, 2630-2638.
- Molineaux K.A., Wang Y., Wylie C., 2004. Transcriptional profiling genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Gene Expr. Patt.*, 4, 167-181
- Murakami H, Okayama H. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature.* 1995 Apr 27;374(6525):817-9
- Murakami H, Okayama H. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature.* 1995 Apr 27;374(6525):817-9
- Nadler, J.J., Braun, R.E., 2000. Fanconi anemia complementation group C is required for proliferation of murine primordial germ cells. *Genesis.* 27, 117-123
- Naiki T, Shimomura T, Kondo T, Matsumoto. Rfc5, in cooperation with rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):5888-96
- Nargi JL, Woodford-Thomas TA Clonino and characterization of cdc25 phosphatase from mouse lymphocytes. *Immunogenetics.* 1994;39(2):99-108
- Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev. Biol.* 287 (2005) 361-377
- Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science.* 1992 Oct 16;258(5081):424-9.

- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith AG. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 12:2048–60
- Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct.* 2001 Jun;26(3):137-48. Review
- Nordqvist K, Tohonen V. An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development. *Int J Dev Biol.* 1997 Aug;41(4):627-38.
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet.* 2003 Apr;33(4):497-501.
- O'Shaughnessy PJ, Fleming L, Baker PJ, Jackson G, Johnston H. Identification of developmentally regulated genes in somatic cells of the mouse testis using serial analysis of gene expression. *Biology of Reproduction* 69, 797-808 (2003)
- Olsen C., Nyeng P., Kalisz M., Jensen TH, Moller M, Tommerup N, Byskov AG. Global gene expression analysis in fetal mouse ovaries with and without meiosis and comparison of selected genes with meiosis in the testis. *Cell. Tissue Res* (2007) 328: 207-221
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):25-31.
- Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K., Kato, S. 1998. A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.* 12, 2263-2268.
- Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.* 1994 Nov;166(1):259-67
- Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz J. D19-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst).* 2004 Aug-Sep;3(8-9):1009-14
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science.* 1997 Sep 5;277(5331):1501-5
- Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 2001;19(4):271-8
- Pesce M, De Felici M. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryol (Berl).* 1994 May;189(5):435-40.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development.* 1993 Aug;118(4):1089-94.
- Pesce, M., and De Felici., 1995. Purification of mouse primordial germ cells by MiniMACS magnetic separation system. *Dev Biol.* 170, 722-5.

- Pines J. Cell cycle. Confirmational change. *Nature*. 1995 Jul 27;376(6538):294-5.
- Pintard L, Kurz T, Glaser S, Willis JH, Peter M, Bouerman B. Neddylation and deneddylation of CUL-3 is required to target MEI-1/Katanin for degradation at the meiosis-mitosis transition in *C.elegans*. *Curr Biol* 2003 27; 13 (11): 911-21
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999 Jan;187(1):112-26
- Rathjen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Oct;11(5):587-94. Review.
- Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1674-7
- Ren S and Rollins BJ. Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, vol. 117, 239-251 2004
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):550-1
- Robanus-Maandag, E., Dekker, M., van der Valk, M., Carrozza, M.L., Jeann, J.C., Dannenberg, J.H., Rohwedel, J., Sehlmeier, U., Shan, J. Meister, A., Wobus, A.M., 1996. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell. Biol. Int.* 20, 579-587.
- Roberts JM. Evolve ideas about cyclins. *Cell*. 1999 Jul 23;98(2):129-32
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 1999 Sep 6;146(5):905-16.
- Rohwedel, J., Sehlmeier, U., Shan, J., Meister, A., Wobus, A.M., 1996. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol. Int.* 20, 579-587.
- Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development*. 2006 Dec;133(24):4861-9.
- Saitou M, Payer B, O'Carroll D, Ohinata Y, Surani MA. Blimp1 and the emergence of germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* 2005 Dec; 4(12):1736-40
- Savatier P., Lapillonne, H., Jirmanova, L., Vitelli, L., Samarut, J., 2002. Analysis of the cell cycle in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 185, 27-33.
- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B., Samarut, J., 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*. 12, 309-322.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.

- Sherr CJ, Roberts JM CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999 Jun 15;13(12):1501-12
- Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995 May 15;9(10):1149-63
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1672-7
- Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):551-5.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1059-65
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.
- Shiloh Y, Kastan MB. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res.* 2001;83:209-54. Review
- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J.M., Shima, D.T., Hibi, M., Hirano, T., 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 11, 709-719.
- Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod.* 2005 Feb;72(2):492-501.
- Solter, D., Knowles, B.B., 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75, 5565-5569.
- Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., Dalton, S., 2002. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene.* 21, 8320-8233
- Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol.* 1994 Feb;161(2):626-8
- Stucki M, Jackson SP. Tudor domains track down DNA breaks. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1150-2.
- Suh EK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, Elvin JA, Bronson RT, Crum CP & McKeon F. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature.* 2006 Nov 30;444(7119):624-8.
- Sun Y, Li H, Yang H, Rao MS, Zhan M. Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2006;16(3):211-31. Review.
- Swain A. Sex determination: time for meiosis? The gonad decides. *Curr Biol.* 2006 Jul 11;16(13):R507-9.
- Tada T, Tada M, Hilton K, Barton SC, Sado T, Takagi N, Surani MA Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells. *Dev Genes Evol.* 1998 Feb;207(8):551-61

- Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):541-5
- Takahashi, K., Mitsui, K., Yamanaka, S., 2003. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 423, 541-545.
- Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J*. 2002 Oct 1;21(19):5195-205
- Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev*. 2000 Jun 15;14(12):1439-47
- Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1981 Aug;64:133-47
- Tanaka S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T. 2000. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male. *Genes Dev*. 14, 841-853
- Unsal-Kacmaz K, Sancar A. Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(3):1292-300.
- Urven LE, Weng DE, Schumaker AL, Gearhart JD, Mc Carrey JR. Differential gene expression in fetal mouse germ cells. *Biol. Repr*. 1993 Mar; 48(3):564-74
- Uto K, Inoue D, Shimuta K, Nakajo N, Sagata N. Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J*. 2004 Aug 18;23(16):3386-96.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5612-21
- Vousden KH. p53: death star. *Cell*. 2000 Nov 22;103(5):691-4.
- Walworth N, Davey S, Beach D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature*. 1993 May 27;363(6427):368-71
- Weiss RS, Matsuoka S, Elledge SJ, Leder P. Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol*. 2002 Jan 8;12(1):73-7
- West A, Lahdetie J. p21WAF1 expression during spermatogenesis of the normal and X-irradiated rat. *Int J radiat biol* 1997; 71 (3): 283-91
- Western, P., Maldonado-Saldivia, J., van den Bergen, J., Hajkova, P., Saitou, M., Barton, S., Surani, M.A., 2005. Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2 and differences between human pluripotent cell lines. *Stem Cells*. 23, 1436-1442.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*. 1984 May;152(1):212-9

Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM. Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:75-101. Review.

Wu S, Wolgemuth DJ. The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse *Cdc25* gene family suggest differential functions during gametogenesis. *Dev Biol.* 1995 Jul;170(1):195-206.

Yabuta Y., Kurimoto K., Seki Y., Saitou M., 2006. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Repr.* 75, 705-716

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of *Id* proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003 Oct 31;115(3):281-92.

Yoshida K, Chambers I, Nichols J, Smith A, Saito M, et al. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech. Dev.* 45:163-71

Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature.* 2001 Jun 28;411(6841):1017-21

Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science.* 2003 Oct 24;302(5645):639-42

Zhang JM, Hoffmann R, Sieber-Blum M. Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF-beta1. *Dev Dyn.* 1997 Mar;208(3):375-86.

Zou L, Cortez D, Elledge SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev.* 2002 Jan 15;16(2):198-208.

Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 2003 Jun 6;300(5625):1542-8