

Spermatogonial kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma sürecinde etkili moleküller

Fahriye Düzağaç¹, Ümmü Güven¹, Eda Açıkgöz², Doç. Dr. Gülperi Öktem^{1,2}

¹Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre AD,

²Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Spermatogenesis; spermatogonyumların kendi kendini yenilemesi (self-renewal) ve farklılaşmasının (diferansiyasyon) sürecinin düzenlenmesi sistemine dayanmaktadır. Birçok gen/protein bireysel olarak spermatogonial hücre tiplerindeki özelleşmiş ekspresyon profilleri ile tanımlanmıştır. Ancak, spermatogenezis ile ilgili moleküler mekanizmalar hala tam olarak bilinmemektedir. Bu derlemede, spermatogonial kök hücrelerin kendini yenileme ve spermatogonial farklılaşma süreçleri için gerekli olan genler, ilişkili proteinler, hormonlar ve diğer fizyolojik faktörler ele alınmıştır.

Spermatogenesis (Genel)

Spermatogenesis, spermatogonial kök hücrelerden spermatozoa oluşumunu kapsayan ve memelilerin çoğunda yetişkin ömrünün tümünde devam etmekte olan oldukça karmaşık bir süreçtir. Sertoli hücreleri spermatogenezisin önemli olaylarını destekleyen ve koordine eden temelde besleyici fonksiyonu olan özelleşmiş hücrelerdir. Seminifer tübüllerde, komşu sertoli hücreleri bağlantı kompleksleri üzerinden "kan-testis" bariyerini oluşturur ve intra-tübüler germinal epitelyumu iki kompartmana ayırır: ekstra-tübüler ortama yakın olarak konumlanmış hücrelerin bulunduğu bazal bölge ve germ hücreleri gibi sertoli hücreleri tarafından üretilen ortamla ilişkide bulunan, germ hücrelerinin bulunduğu luminal bölge (1).

Spermatogenesis mitotik, mayotik ve post-mayotik olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Mitotik (proliferatif) aşama, iki ardışık bölüm içeren kendini yenileme ve farklılaşma olaylarını kapsamaktadır (2). Mitotik germ hücreleri (spermatogonia) bazal bölgede lokalize olmakta iken, mayoz (spermatozite) ve post-mayotik (spermatit) germ hücreleri ise luminal bölgede bulunmaktadır. Mayoz aşamasında, genetik materyaller yeniden kombine edilir ve spermatozitelere ayrılır. Post-mayotik aşamada, spermatozite spermatozoa hücrelerini oluşturmak için bir dizi yapı-

sal ve morfoloji değişime uğrar ve spermatitleri oluşturur. Bu değişiklikler akrozom ve kuyruk oluşumu, kromozom kondenzasyonu ve spermiyasyondan kalan artık sitoplazmaların uzaklaştırılmasını kapsamaktadır (2).

Spermatogonial kök hücreler (SKH)

Spermatogonial kök hücreler (SKH) fetal dönemde primordial germ hücrelerinden köken alan, postnatal testislerdeki Gonosit'lerden kaynak alır. SKH'ler seminifer tübüllerinin bazal membranında lokalize olmuşlardır. Tip A spermatogonyum en pirimitif hücre tipidir. Bu hücreler önce A tekli (As) olarak isimlendirilir, daha sonra iki yeni hücreye bölünür ya da hücreler arası köprüler ile bağlı kalarak sitokinezi tamamlamayan spermatogonyum (Apr) olarak devam ederler. Apr spermatogonyum en fazla 32 (Aal olmak üzere 4,8 hizalı) spermatogonyum zinciri oluşturmak için bölünür. Bireysel As, Apr ve Aal hücreleri histolojik testis kesitlerinin ışık mikroskoplarında morfolojik olarak ayırt edilemezler.

Toplu olarak bu ayırt edilemeyen üç tip hücre farklılaşmamış tip spermatogonyum A (undiff) olarak isimlendirilir. Aal spermatogonyum morfolojik değişimler neticesinde A1 spermatogonyumu oluşturur. A1 oluşumunu takiben tip B spermatogonyum oluşur. Oluşan tip B spermatogonia pre-leptoten spermatozitelere bölünür. Tip A spermatogonia farklılaşmamış hücrelerin karakteristiği olarak çekirdekte heterokromatin yapısı gözlemlenmezken tip B spermatogoniada bu yapı gözlenir.

SKH kendini yenileme ve farklılaşması somatik çevreden kaynaklı dış (ektrinsik) faktörler ve germ hücrelerindeki içsel (intrinsik) genetik programlar ile kontrol edilmektedir. Glial hücre türevli nötrofik faktörler (GDNF) ve KIT ligand (KITL) gibi bazı dış faktörler sertoli hücreleri tarafından üretilerek salınır. İçsel faktörler; zinc finger, 16 (ZBTB16/PLZF) içeren BTB domain transkripsiyonel faktörleri içermektedir.

Spermatogonial kök hücrelerin (skh) oluşmasında anahtar moleküller

SKH'lerin farklılaşması ve kendini yenilemesinde etkili sinyalizasyon sistemi içsel ve dışsal faktörlerle aktive olur. Glial hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) parakrin yolak ile birlikte keşfedilen ilk moleküldür. Sertoli hücreleri tarafından üretilen GDNF SKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasında rol almaktadır. Yapılan in-vivo çalışmalarda GDNF'nin fazla ekspresyonunun farklılaşmamış spermatogonia fazında birikmeye neden olduğu, GDNF'nin gen hedefli çalışmalarla ablasyonunun ise spermatogonia azalmasına yol açtığını göstermiştir (3). Diğer taraftan in-vitro çalışmalar GDNF eklenen kültür ortamındaki SKH'lerin proliferasyonunun arttığını ortaya koymuştur (4-6). Bu sonuçlar GDNF'nin spermatogonial kök hücrelerin kendini yenilemesi ve varlıklarını sürdürebilmesi için gerekli bir molekül olduğunu kanıtlamaktadır. GDNF sinyalleri GFRA1 ve RET içeren bir reseptör kompleksi ile işlemektedir. GFRA1 ve RET sinyalleri Apr ve Aal spermatogoniadan eksprese olur.

GDNF/GFRA1 sinyalinin olmaması SKH'lerin farklılaşmasını tetiklemektedir. GFRA1'in RNA interferans ile susuturulması, SKH'ler için bir anahtar rolü görmüş, spermatogenezi A1-A4 spermatogoniaya farklılaşma ile başlatmıştır. Çalışmalar göstermektedir ki her iki GDNF ligandı ve reseptörü SKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşması için gereklidir.

Promyelositik lösemi zinc finger (PLZF) farklılaşmamış spermatogoniada kendini yenileme mekanizması için gerekli ilk keşfedilen transkripsiyon faktörüdür. PLZF'de meydana gelen mutasyonlar SKH farklılaşmasında intrensek defektlere yol açar (7,8). Şaşırtıcı bir şekilde PLZF kök hücre faktörü olarak bilinen KİT transkripsiyonunu baskılamaktadır (9).

SKH'lerin kendini yenilemesi (self-renewal)

Farklılaşmış germ hücrelerinin sürekli olarak temin edilmesi spermatogenez için gereklidir. Bu nedenle SKH'lerin farklılaşmamış durumunun sürdürülmesi ve kendini yenileme kapasitesine sahip olması gerekmektedir. SKH'ler yetişkin germ hücrelerinin küçük bir kısmını teşkil ederler. Her bir yetişkin fare testis içinde yaklaşık olarak 30.000 SKH bulunmaktadır ve bu hücreler seminifer tübüllerin

periferal bölgesinde lokalize olmuşlardır (10). Yapılan çalışmalarda spermatogonial kök hücre karakterlerinin değerlendirilmesi için alıcı erkeklere spermatogonial kök hücreler nakledilmiş ve testis kolonizasyon aktivitesi belirlenmiştir (11,12). Pratikte, belirli yüzey belirteçleri (integrin- α 6+, integrin- β 1+, THY-1+, CD24+, CD9+, KIT-, integrin- α v-, MHC-Ia/ β , CD34-) izolasyon ve SKH'lerin zenginleştirilmesi için kullanılmıştır (13). Bu yüzey belirteçleri diğer bazı kök hücrelerde de bulunmaktadır.

Aşağıda SKH'lerin kendini yenilemesinde etkin olan sinyal ileti yolakları özetlenmiştir.

Gdnf-Gfra1/Ret-Bcl6

GDNF Sertoli hücreleri tarafından üretilip salgılanır ve tip A spermatogonyumun bir alt kümesi ret protoonkogen (RET)'i içeren GDNF reseptör kompleksi ve nötrofil faktör familyası reseptör alfa-1 (GFRA1)'den türevlenen ve koreseptörü olan glial hücre hattı eksprese eder (14). GDNF in vitro kültür koşulları altında SKH'lerin sürdürülmesini ve proliferasyonunu artırır (15, 4, 5). GDNF -/+ fareler yaşla birlikte SKH rezervlerinin azalması özelliğini göstermiştir. Oysa, GDNF'nin aşırı eksprese edildiği farelerde spermatogonyum akümüasyonu gözlenmiştir (3).

GFRA1'e bağlı GDNF RET aktivasyonunu indüklemektedir ve sırasıyla RET intraselüler domaine değişik moleküllerin bağlanmasını sağlamaktadır. Gfra1 ve Ret-null farelerin erken öldüğü gözlenmiştir (16-18). Tüm testis transplantasyon teknikleri ile yapılan çalışmalarda GDNF (-), Gfra1 ve Ret-null testislere ait SKH'lerinde belirgin bir tükenme söz konusu olmuştur. Bu durum muhtemelen SKH'lerin proliferasyonlarının eksik olmasından ve farklılaşmamış durumu devam ettirmek için bu hücrelerin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (19).

Bcl6 (transkripsiyon reseptör), kültüre edilmiş SKH'lerde bir GDNF-yanıt genidir (20). Bcl6'nın mRNA'sının siRNA supresörünün seviyesi kültür koşulları altında SKH'lerin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bcl6-null testis analizleri bazı seminifer tübüllerinde spermatogenezin dejenerasyonunu ortaya çıkarmıştır (20).

ETV5 (Erm)

ETV5 (transkripsiyon faktör), temelde Sertoli hücreleri tarafından eksprese edilir (21). ETV5-null farelerin primer sertoli hücrelerinin mikroarray analizlerinde hematopoetik kök hücre nişini düzenlediği bilinen salgı faktörlerinde

değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. Redüksiyon ile ilgili genler kemokinleri (Cxcl12 (Sdf-1), Cxcl15 (Lix) ve Cc17 (Mcp3)) içermektedir. Bu kemokinler SKH'lerin kendini yenilemelerini düzenleyen niş sinyal molekülleridir (21). ETV5 geninin ekspresyonu kültüre edilmiş SKH'lerde GDNF tarafından regüle edilmektedir (20). Karşılıklı germ hücre transplantasyonları ETV5 'in normal spermatogenez için hem sertoli hücreleri hem de germ hücrelerinde gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır (22).

ZBTB16 (Plzf)

ZBTB16 ekspresyonu Aundiff spermatogonyumda sınırlanan bir transkripsiyon reseptörüdür (8,7). Son veriler, ZBTB16 ifadesi olan spermatogonyumda ZBTB16 modüle histon lizin metilasyon durumunu göstermektedirler (23).

TAF4b

TAF4BRNA polimeraz II, TATAbox bağlama proteini (TBP)-bağlantılı faktör (TAF4B) TFIID kompleksinin bir gonad spesifik bileşenidir (24). Bu kompleks, TATA-bağlama proteini (TBP) içerir ve TBP ilişkili faktörler core protein tanıma ve aktivatör bağımlı RNA polimeraz II için önemlidir (24,25).

ERK, JNK ve p38 MAPK'nın çoğu izoformları memeli testislerinde mevcut olup, spermatogenez için kritik fonksiyonları olan seminifer epitellerindeki hem sertoli hem de germ hücrelerinde bulunmaktadır.

ATM

Ataxia telangiectasia mutated (ATM), DNA çift iplik kırığı, telomer erozyonu ve oksidatif stres gibi uyarıların etkisi ile aktive olan bir serin/treonin protein kinaz'dır. ATM hücre döngüsü hasar kontrol noktalarında devreye girerek hücreyi ya hasar tamirine ya da apoptosize yönlendirir (26). Yapılan çalışmalarda ATM aktivitesi olmadığında (ATM-null) hem erkek hem kadınlarda infertilite gözlemlenmiştir (27). ATM-null testislerde hücre döngüsünün durmasına ek olarak farklılaşmamış spermatogoniada ilerleyen derecelerde azalma dikkati çekmiştir (28). Farklılaşmış ve farklılaşmamış spermatogoniada ATM'nin total protein seviyeleri farklılık göstermemesine rağmen ATM aktivasyonu farklılaşmamış spermatogoniada gözlemlenmektedir. BrdU kullanılarak yapılan hücre proliferasyon analizinde (Dual Pulse Labeling) ve pyronin Y boyaması sonucunda, ATM-null farklılaşmamış hücre

döngüsünün G1 Fazında yığılma ve S fazında bloklanma gösterilmiştir (28). Kök hücrelerin temel karakteristiği olan kendini yenileme özelliği bakımından hasarlı olan ATM-null farklılaşmamış spermatogonia hücre kültürlerinde izlenmiş ve bu hücrelerin özellikle germ hücre transplantasyonu denemelerinde kullanılması için gerekli olan koloni oluşturma yetisinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. ATM-null farklılaşmamış spermatogoniada DNA hasar birikimi ve p19Arf-p53-p21Clip1/Waf1 yolağında aktivasyon gözlemlenmiştir. Ek olarak ATM-null farklılaşmamış spermatogoniada P21Clip1/Waf1'in baskılanması sonucu bu hücrelerde transplantasyon yetisinin geri kazanılmasını sağlanmıştır (28). Bütün bu veriler ışığında: ATM sinyalinin SKH'lerde DNA hasarına bağlı hücre döngüsü bloğunu baskılayarak SKH'lerin kendini yenilemesini düzenleyen ve bu özelliği ile SKH'lerin yaşam döngüsünde önem gösteren bir molekül olduğu söylenebilir.

PIN1

Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1 (PIN1) hücre döngüsünün ilerlemesini regüle eden peptidyl-prolyl izomerase'dir. CyclinD1, c-JUN, CDC25, P53 ve β -CATENIN de içinde bulunduğu pek çok kritik hücre döngüsü fosfoproteinini module eder (29). Primordial germ Hücreleri (PGH) Pin1 aktivasyonu olmayan (Pin1-null) farelerde hücre döngüsü uzaması ve artmış proliferasyon kapasitesi gözlemlenmiştir (30). Pin1-null erkek farelerde fertilitede düşüş gözlemlenmesine rağmen postnatal PIN1-null testislerdeki germ hücreleri spermatogenez başlatıp tamamlayabilmiştir. İmmünohistokimya çalışmaları PIN1'in hem germ hem de sertoli hücrelerinde lokalize olduğunu göstermektedir (31). Doğrudan olmayan kanıtlar göstermiştir ki germ hücrelerinde PIN1 genellikle farklılaşmamış tip A spermatogoniada ifade edilmektedir. Tüm bu verilerle birlikte ele alındığında görülmektedir ki spermatogonial kök hücrelerin (SKH) devamlılığında PIN1'in varlığı önemlidir.

Farklılaşmamış tip A spermatogonia için niş ve kan damarı formasyonu

Farklılaşmamış tip A spermatogonia genellikle diğer tübüller yerine interstisyuma bitişik tübüllerin bazal kısmında lokalize olmuşlar ve bu alanda damar yayılımı göstermişlerdir (32). Son yıllarda yapılmış çalışmalar real-time görüntüleme tekniği ile farklılaşmamış tip A spermatogo-

nianın hücre bölünmesi ve migrasyonunu ayrıntılı bir şekilde göstermektedir (33). Bu çalışmalarda görüntüler açık bir şekilde interstisyuma ve kan damarlarına yakın 8-16 hücre zinciri oluşturmuş tip A spermatogonia göstermiştir. Zincirdeki hücreler sırayla tübüllerin iç kısımlarına göç edip tip A1 ve A2 spermatogoniaya dönüşerek yayılmıştır (33). Germ hücresi transplantasyonunu takiben izole edilen tübüllerde farklılaşmamış tip A spermatogonia tekrar interstisyuma yakın bir şekilde dağılarak içinde bulunan tübülün dış tarafına doğru yeni kan damarları oluşturmuşlardır. Bu veriler göstermektedir ki kan damarları/interstisyum ve farklılaşmamış tip A spermatogonia arasında fiziksel bir bağlantı mevcuttur. Farklılaşmamış tip A spermatogonianın varlığı interstisyum ve kan damarlarının varlığına bağlıdır (33).

Spermatogonial farklılaşma

Spermatogonial farklılaşmada 3 anahtar düzenleyici nokta bulunmaktadır. İlk anahtar nokta SKH'lerin tek (As) ve çift (Apr) spermatogoniaya dönüşmesidir. İkinci anahtar nokta tip A1 ve A2 spermatogoniaya geçiştir. Üçüncü anahtar nokta ise tip A1 spermatogoniyanın hayatta kalması ve tip B spermatogoniaya kadar olan evreyi tamamlamasıdır (34).

Apr spermatogoniada sitokinezis tamamlanmamıştır ve hücre içi köprüyle bağlarını koparmazlar. Apr spermatogonia oluştuğunda bu hücreler haploid gametler olmak için kararlanırlar. Germ hücrelerinin giderek daha büyük bir sinsityum oluşturmasını sağlayan ilerleyen bölünmelerde de sitokinezis tamamlanmamıştır. Spermatogonial farklılaşmanın görülebilen ilk işareti oluşan hücrelerarası köprüdür (35). Hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki oran her zaman 1:1 olmalıdır. Oranın her iki yöne kayması da tehlikelidir. Bu oran sağlanmadığında germ hücresi tümörleri veya spermatogonial kök hücrelerde azalma/yetersizlik meydana gelir (3). Bu noktada eksik sitokinez veya farklılaşmaya giden hücrelerin yönlenmesindeki moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir.

Kaynaklar

1. Griswold, MD. *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology.* 1998; 9: 411-416.
2. Eddy EM. *Male germ cell gene expression. Recent Progress in Hormone Research.* 2002. Vol 57 57, 103-128.
3. Meng XJ, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M et al. *Regulation*

Retinoik Asit (RA)

A vitamininin (retinol) biyolojik olarak aktif bir metaboliti olan retinoik asit, özellikle erkek üreme sistemi için vazgeçilmez bir ajandır (36,37). Vitamin A eksikliği (VAD) olan farelerde seminifer tübüllerde yalnızca farklılaşmamış tip A spermatogonia bulunabilmiştir (38). Yapılan çalışmalarda 24-48 saat sonra uygulanan RA veya retinol enjeksiyonu sonrası tip A spermatogoniada Kit onkojeni (Kit)'nin ekspresyonunu arttırdıktan sonra A1 spermatogoniayı tekrar hücre döngüsüne sokarak, A1 spermatogoniaya farklılaşmasını sağlar (39,38). VAD fare ve sıçanlarda retinol veya RA kullanılarak yapılan çalışmalarda birkaç senkronize spermatogenez döngüsü olduğu görülmüştür (38,36). Hem somatik hücrelerde hem de germ hücrelerinde retinoid reseptörleri eksprese edildiği için RA'nın spermatogonial farklılaşmayı arttırmasının direkt germ hücrelerine etki ederek mi yoksa Sertoli hücrelerinin regülasyonunu dolaylı olarak sağlayarak mı gerçekleştirdiği bilinmemektedir (40).

RA pek çok hücre ve dokuda çoklu gelişim evrelerinde farklılaşma faktörüdür (41). Spermatogonial farklılaşmada RA'nın farklı faktörlerle etkileşime girdiği ile ilgili birkaç kanıt vardır. İlk kanıt RA'nın VAD kemirgenlerin tip A spermatogoniada Kit'in ekspresyonunu arttırmasıdır (39). İkinci kanıt ise kriptorşid testis kültürlerinde RA'nın spermatogonial farklılaşmayı arttırmasıdır. Diğer bir kanıt ise RA ile tedavi edilen VAD testislerde Dazl seviyelerinin up-regüle olmasıdır (Yayınlanmamış data). Son olarak RA tedavisi testosteron üretimi ile ilgili olan 2 anahtar enzimin (Cyp17a1, Cyp11a1) gen kodunu önemli ölçüde azaltmaktadır (Yayınlanmamış data). Bu enzimlerin inhibisyonu ile RA'nın fizyolojik koşullarda testosteron sentezini düzenleyebilmesi mümkün olmuştur ve bu da testosteron ve RA'nın testislerde karşılıklı etkileşim halinde olduklarını desteklemektedir. Tüm bu veriler göstermektedir ki RA spermatogonial farklılaşmanın düzenlenmesinde ve döngünün sürdürülmesindeki en önemli faktörlerden biridir.

4. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S and Shinohara T. *Long-term proliferation in culture and germline transmission of Mouse male germ cells.* 2003. *Biology of Reproduction* 69, 612-616.

5. Kubota H, Avarbock MR and Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of Mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101; 16489-16494.
6. Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. 2005. *Dev Biol* 279: 114-124.
7. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. 2004. *Nat Genet* 36: 647-652.
8. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*. 2004; 36, 653-659.
9. Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, Dolci S. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. 2007. *Mol Cell Biol* 27: 6770-6781.
10. De Rooij DG. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*. 1998; 79, 67-80.
11. Brinster RL, Avarbock MR. Germ line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11303-11307.
12. Brinster RL, Zimmerman JW. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11298-11302.
13. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta(1)- and alpha(6)-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96: 5504-5509.
14. Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J and Johnson EM. Expression of neurturin, GDNF and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature Mouse. 1999. *Experimental Neurology* 158, 504-528.
15. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ and Brinster RL. Culture of Mouse spermatogonial stem cells. 1998. *Tissue & Cell* 30, 389-397.
16. Pichel JG, Shen LY, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. 1996. *Nature* 382, 73-76.
17. Sanchez MP, SilosSantiago I, Frisen J, He B, Lira SA and Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. 1996. *Nature* 382, 70-73.
18. Scuchardt A, Dagati V, Larsson-blomberg L, Constantini F and Pachnis V. Defects in the Kidney and Enteric Nervous-System of Mice Lacking the Tyrosine Kinase Receptor. 1994. *Nature* 367, 380-383.
19. Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A and Milbrand J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. 2006. *Biology of Reproduction* 74, 314-321.
20. Oatley JM, Avarbock MR, Teleranta AI, Fearon DT and Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. 2006. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 9524-9529.
21. Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL et al. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. 2005. *Nature* 436, 1030-1034.
22. Morrow CMK, Hostetler CE, Griswold MD, Hofmann MC, Murphy KM, Cooke PS and Hess RA. ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood-testes barrier function and testicular immune privilege. 2007. *Testicular Chromosome Structure and Gene Expression* 1120, 144-151.
23. Payne C, Braun RE. Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Developmental Biology*. 2006; 293, 461-472.
24. Verrijzer CP and Tjian R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. 1996. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 338-342.
25. Freiman RN, Albright SR, Zheng S, Sha WC, Hammer RE and Tjian R. Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAF (II)105 in ovarian development. 2001. *Science* 293, 2084-2087.
26. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. 2003. *Nature Reviews Cancer* 3, 155-168.
27. Hamer G, Kal HB, Westphal CH, Ashley T and de Rooij DG. Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in testis. 2004. *Biology of Reproduction* 70, 1206-1212.
28. Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell*. 2008; 2, 170-182.
29. Atchison FW and Means AR. A role for Pin1 in mammalian germ cell development and spermatogenesis. 2004. *Frontiers in Bioscience* 9, 3248-3256.
30. Atchison FW, Capel B and Means AR. Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation. 2003. *Development* 130, 3579-3586.
31. Atchison FW and Means AR. Spermatogonial depletion in adult Pin1-deficient mice. 2003. *Biology of Reproduction* 69, 1989-1997.
32. Chiarini-Garcia H, Hornick JJR, Griswold MD and Russell LD. Distribution of type A spermatogonia in the Mouse is not random. 2001. *Biology of Reproduction* 65, 1179-1185.
33. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima YI. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*. 2007b; 317, 1722-1726.
34. De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2001; 121, 347-354.
35. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *Apmis* 2005;113, 727-742.
36. Griswold MD, Bishop PD, Kim KH, Ping R, Siiteri JE and Morales C. Function of Vitamin-a in Normal and Synchronized Seminiferous Tubules. 1989. *Annals of the New York Academy of Sciences* 564, 154-172.
37. Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C and Harbert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. 2002. *Reproduction* 124, 173-180.
38. Van Pelt AMM, de Rooij DG. Synchronization of the Seminiferous Epithelium after Vitamin-a Replacement in Vitamin a-Deficient Mice. *Biology of Reproduction*. 1990;43, 363-367.
39. Schrans-Stassen BH, Saunders PT, Cooke HJ and de Rooij DG. Nature of the spermatogenic arrest in *Dazl* ^{-/-} mice. 2001. *Biol Reprod* 65, 771-776.
40. Dufour JM and Kim KH. Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: Identification of potential heterodimeric receptors. 1999. *Biology of Reproduction* 61, 1300-1308.
41. Clagett-Dame M, DeLuca, HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual Review of Nutrition*. 2002; 22, 347-381.