

## 전기충격법을 이용한 레트로바이러스 벡터의 줄기세포내 유전자 발현 연구

정동기\*

제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부 동물자원과학과

### Study on the gene expression in stem cells of retroviral vector using electroporation method

Dong Kee Jeong\*

College of Applied Life Sciences, Cheju National University

#### Abstract

This study was conducted to transfer foreign gene into spermatogonial stem cells. In general, liposome mediated gene transfection method was used for most viral vector mediated gene transfection. However, this study performed retroviral vector system combined with electroporation. In results, this experiment could obtained 70% gene expression ratio using electroporation method in 293T cell which is packaging cell line for viral vector. Also, these cells were selected for 25 days by G418 selection marker and then showed 89% high gene expression. This data indicated virus titration could be used direct X-gal staining method instead of NIH3T3 indirect tritration. Virus soup which was selected 89% gene expression in 293T cells infected into 10 mice samples and were expressed all samples.

However, Although control mice also showed gene expression in eight sample, only 5% cells were expressed in total stem cell suspansion. Finally, virus infected stem cells transplanted into busulphan treated recipient mice and identified gene expression in all testes and production of sperm with foreign gene.

**Key words** : stem cells, spermatogonial geve eectroparation, retro viral vector.

#### 서 론

정원줄기세포는 분화를 통하여 정자를 생산하는 근원세포이다. 사람의 경우불임의 5% 정도가 정자성의 문제점을 가지고 있는 경우로 보고되고 있다(Hull 등, 1985). 그중 정원줄기세포의 기능 이상과 정소내의 세르톨리 세포와의 상호 관계에 의한 경우이다(Russell등, 1990). 그래서 많은 연구들이 정자를 매개로한 유전자 전이 또는 치료와 더불어

\*Corresponding author: Major of Animal Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University Jeju 690-756, Korea. (e-mail: [dkieong@cheju.ac.kr](mailto:dkieong@cheju.ac.kr))

어 근원세포인 정원줄기세포를 이용한 유전자 전이법 개발에 몰두하고 있다. 정원줄기세포는 한 기관과 한 세대안에서 모든 분화를 한눈에 볼 수 있는 유일한 기관이며 후일 ES cell 또는 EG cell 등으로 발전하는 기초세포로 생각되어 지고 있다(Ohta 등, 2000). Brinster등이 처음 이 줄기세포의 존재를 이식실험을 통하여 증명한 이래, 이 줄기세포를 이용한 배양(O'Brien, 1993), 유전자 전이(Nagano 등, 1998), 형질전환 동물 생산(Nagano 등, 2001), 타동물간의 이식에 의한 정자 생산(Honaramooz 등, 2003), 바이러스 벡터를 이용한 유전자 전이 등(Nagano 등, 1998)이 이루어 지고 있다. 최근에는 정원줄기세포 또한 다능성 있음을 보고한 연구도 있다(Kanatsu-Shinohara 등, 2004). 이 연구에서는 ES-like cell을 확립한 후 germ layer를 확인하고 내배엽, 외배엽 그리고 중배엽 유래 세포로 분화가 가능함을 증명하였다. 그리고 예쁜 꼬마 선충을 이용하여 역분화를 통하여 germ cell에서 줄기세포를 만들어 내었다(Brawley와 Matunis, 2004). 그리고 현재 문제가 되고 있는 인간 배아 줄기세포의 생명파괴 논란을 잠식할 수도 있는 정원줄기세포를 이용한 전능성 연구도 활발하게 진행되고 있다(Toyooka 등, 2003). 그리고 유전자 전이법 연구로는 현재 전기충격법은 많은 세포에서 리포솜 방법과 함께 일반적으로 이용하고 있는 방법이다(Luo와 Redies, 2005; Lee 등, 2005). 그러나 줄기세포에서는 특히 germline stem cell에서는 세포 특성상 그리 높은 효율을 보이고 있지 못하였다. 본 연구자는 이전 연구에서 조류의 원시생식세포를 이용한 전기충격법에서 80%에 가까운 유전자 전이율을 보고한 바 있다(Hong 등, 1998). 그러나 리포솜을 이용한 방법에서는 17%정도의 낮은 비율의 유전자 전이율을 보였다. 일반적으로 특정 유전자가 염색체내로 삽입시키는 기술에 의하여 형질전환 동물(Barbosa 등, 2005; Dieleman 등, 2004)이나 또는 특정 단백질의 발현에 따른 유전자 신호 전달 연구(Piek 등, 1999; Huang 등, 1999) 또는 최근 많은 연구가 진행되고 있는 RNA 간섭 연구(Yu 등, 2004)에서도 안정적 유전자 발현은 필수라고 할 수 있다. 그리고 또한 프로테오믹스 연구

(Baldi, 2005) 뿐만 아니라 유용한 생리활성 물질 생산을 위한 바이오 리액터 연구(Lui 등, 2003)에서도 인위적인 외래 유전자의 염색체 내 삽입 기술은 필 수라고 할 수 있다. 그래서 본 연구에서는 현재까지는 안정적 유전자 삽입 효율이라고 보고되고 있는 레트로 바이러스 벡터를 전기충격법을 통하여 줄기세포에 전이하여 지속적인 유전자 발현을 보이는 줄기세포를 개발하고자 본 연구 수행 하였다.

## 재료 및 방법

실험동물은 B6/129 마우스를 잭슨 랩으로부터 구입하여 자체 실험장비가 갖추어진 마우스 사육시설에서 프로토콜에 따라 교배하여 사용하였다. 이식실험시 사용될 마우스는 1개월전에 busulfan 50mg/kg를 전처리하여 수용체 마우스 자체의 줄기세포를 억제시켰다. 마우스의 정소를 각 실험목적에 따라 enzyme 처리를 통하여 싱글세포로 분리하였다(McLean 등 2002). 간단히 설명하면, 정소를 마우스에서 분리하여 정소막을 제거하고 0.5mg/ml의 collagenase type IV, 0.25mg/ml의 trypsin, 0.05mg/ml DNase가 포함된 배양액에 넣고 15분간 33°C에서 진탕배양하였다. 분리된 싱글세포를 생존율을 측정하고 필터링한 후 배양을 위한 준비를 하였다. 먼저 유전자 전이 효율 및 바이러스 생성 효율을 측정하기 위하여 레트로 바이러스의 packaging cell line인 293T cell를 이용하여 전기충격법과 리포솜 매개법을 이용하였다. 간단히 설명하면, 먼저 DNA 양에 따른 효율을 측정하고 리포솜 매개법을 대조구로 하여 실험을 수행하였다(Hong 등, 1998). 유전자 전이법을 통하여 도출된 결과에 따라 바이러스 생산을 하였다. 생산된 바이러스는 두가지 유전자 전이 법으로부터 생성된 것으로 이를 미리 배양하고 있는 줄기세포에 감염시켜 효율을 측정하였다. *In vitro* 배양을 통하여 검증된 결과에 따라 유전자가 전이된 줄기세포를 1개월 전에 busulphan 처리해 둔 수용체 마우스의 정소내로 이식하여 결과를 측정하여 두가지 방법에 의한 결과를 각각 비교하였다.

## 결과 및 고찰

유전자 전이법으로 알려져 있는 방법에는 가장 대표적인 방법에는 리포솜 방법, Ca-Phosphate 방법, 직접주입법, 전기충격법등이 사용되고 있으며 이중 일반적으로 개발되어 있는 리포솜 방법이 줄기세포에 많이 사용되고 있다(Thierry등,1995). 본 연구를 통하여 이미 전기충격법으로 닭의 원시생식세포의 외래 유전자가 약 80% 가까운 결과를 이미 보고한 바 있다(Hong 등, 1998). 그러나 선행연구를 토대로 *in ovo*나 *in vivo* 연구를 진행했을 경우 형질전환달 생산에 실패한 바 있다. 이는 생식세포의 유전자 전이가 단지 세포질내로의 발현이 되었거나 충격에 의하여 지속성이 떨어 진 것으로 생각된다. 그래서 본 연구에서는 마우스의 줄기세포를

통하여 지속성 있는 유전자의 염색체 삽입 기술을 개발하고 궁극적으로 형질전환 동물 생산의 기초자료로 삼고자 본 연구를 시작하였다. 그리고 현재 줄기세포의 유전자 삽입율이 높은 것으로 알려진 레트로바이러스 벡터를 이용하여 선행연구에서의 조건과 결합한 방법을 통하여 효과적인 유전자 전이법을 개발할 목적을 가지고 있다. 그래서 먼저, DNA의 양을 결정할 목적으로 레트로 바이러스 벡터의 packaging cell line으로 널리 사용되는 293T cell을 이용하여 유전자 전이를 실시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 먼저 선행연구 결과를 이용하여 실험에 사용할 양을 결정하였다. 결과에서 보면, 가장 좋은 결과는 250V에 20 $\mu$ g의 DNA를 사용한 조건에서 약 70%의 유전자 발현율을 보이고 있다.

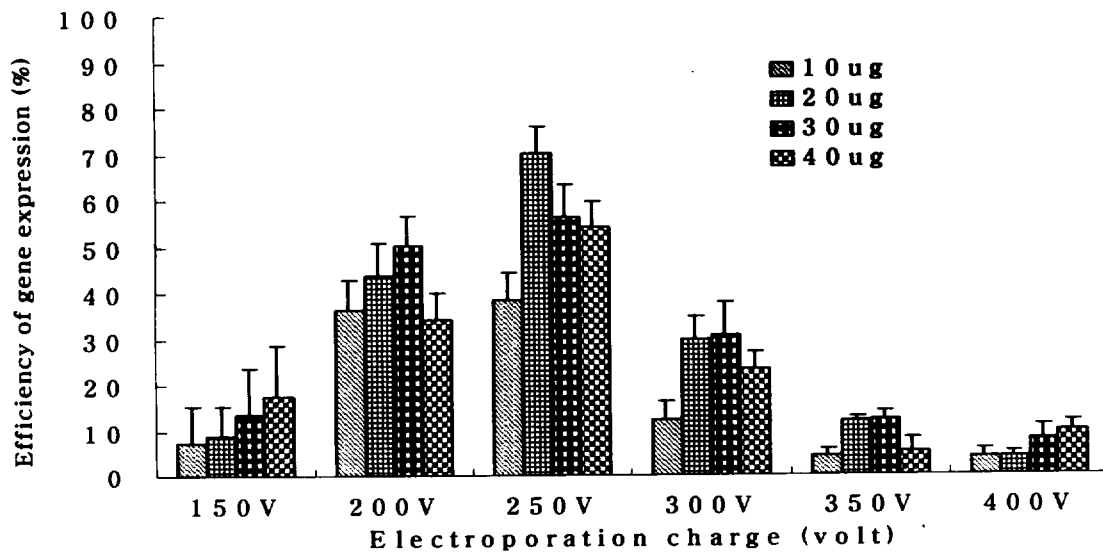


Fig. 1. Gene expression of pMSCV $\beta$ -gal retroviral vector in 293T cells for high titration using electroporation.

동일한 양을 사용했는데도 300V 이상으로 전압을 상승시켰을 때는 유전자 전이율이 급격히 저하됨을 알 수 있었다. 또한 낮은 전압에서는 150V 이하에서는 유전자 발현을 관찰 할 수 없었다. 단지 150V의 전압에서 7-18% 유전자 발현율이 보이고 있다. DNA의 양은 20 $\mu$ g이 가장 좋은 결과를 보였으며 더 많은 양을 사용하였을 때는 오히려 낮은 발

현율을 보이고 있었다. 이는 유전자 전이법중 전기충격법에도 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 사용한 레트로 바이러스 벡터는 mouse stem cell virus(MSCV) 프로모터를 가지고 있으며 원래의 프로모터를 약간 돌연변이시킨 후 좀더 강력하게 줄기세포에 유전자가 전달되게 변형시킨 벡터이고 물론 neomycin

selection 마커가 있다. 그래서 본 실험에서는 G418를 이용하여 높은 효율의 발현율을 검증하고자 다음 실험을 진행하였다(Fig. 2). 그림 2에서 보면 처음 유전자 전이 후 G418 처리 0 day의

X-gal염색 결과를 보여 주고 있다. Fig. 2에 D는 대조구로서 리포솜 매개법 결과이다. G418를 처리하여 15일, 25일까지 선발한 결과를 Fig. 2에 B와 C에서 보여 주고 있다.

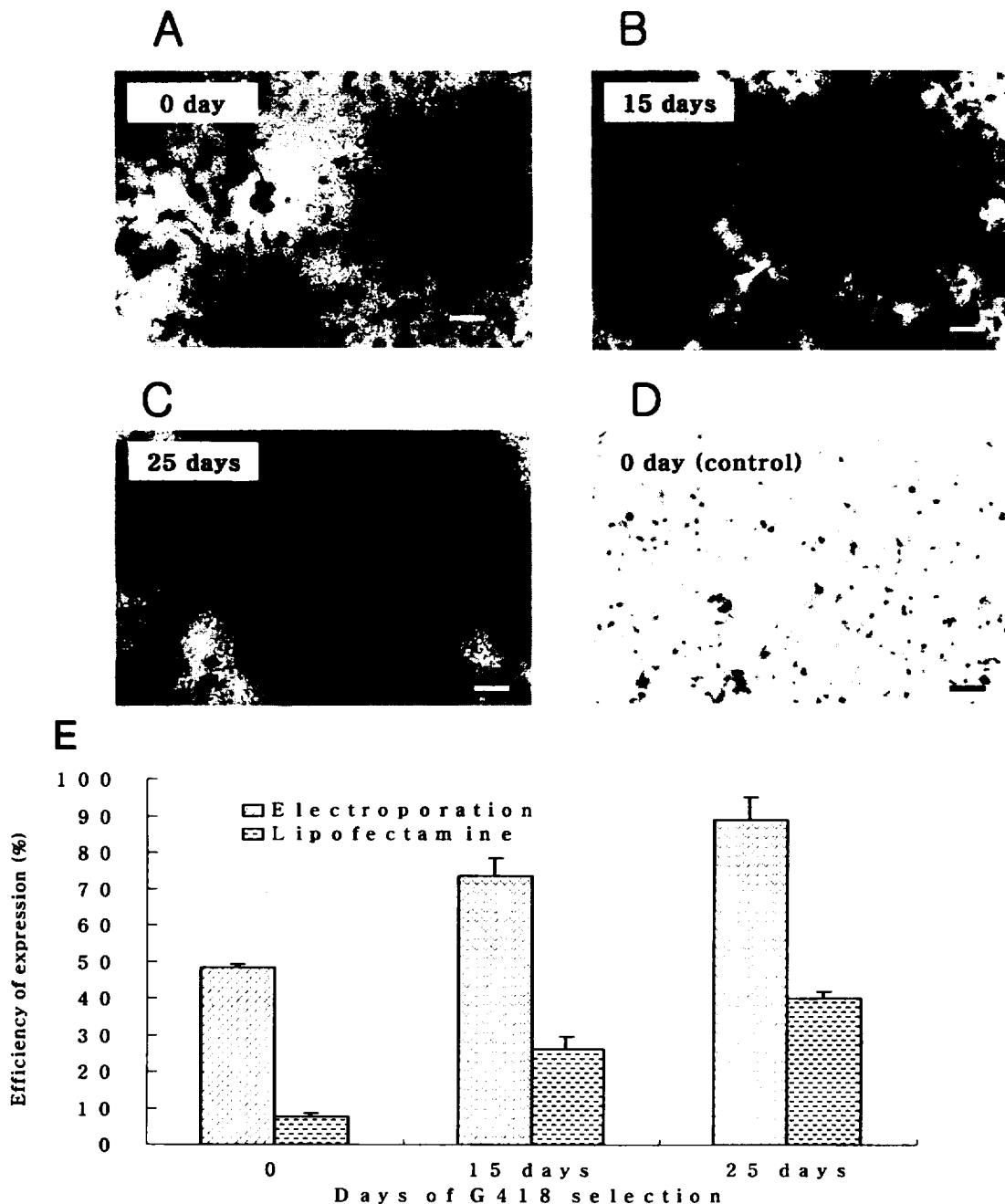


Fig. 2. Appearance of B-galactosidase (pMSCV $\beta$ -gal;retroviral vector) expression in 293T cells following electroporation. (A) 0 day after electroporation at 250V, 10msec, one time pulse. (B) G418 selection for 15 days. (C) G418 selection for 25 days. (D) control; appearance of X-gal staining after transfection into 293T cells using the lipofectamine (0 day). (E) Efficiency of pMSCV $\beta$ -gal (retroviral vector) gene expression in 293 cells. Bar=33 $\mu$ m. The experiments were repeated three times, each experiment comprised triplicate cultures.

결과처럼, 높은 비율의 유전자가 발현됨을 알 수 있고 이를 토대로 배양액내에는 높은 농도의 바이러스가 포함되어 있음을 간접적으로 확인 할 수 있었다(Blanchard등,1997). Fig. 2에 E에는 평균적인 발현율을 도표로 나타내고 있다. 대략적으로 45%에서 25일이 지난 후 결과를 보면 89.2% 정도의 높은 발현율을 확인 할 수 있었다. 일반적으로 바이러스 titration을 하려고 하면 NIH 3T3 세포를 이용하여 콜로니 수를 측정하여 계산하는 방식에 비해 본 연구에서는 직접X-gal 염색을 통하여 titration하는 방법을 사용하여 간편하게 titration 할 수 있었다. 대조구로 사용된 리포솜 방법은 최고 효율이 38.4% 정도를 보여주고 있다. 이 결과는 약 2배에 가까운 발현율의 차이로 기존의 방법보다 개선되었음을 알 수 있었다. 높은 효율의 유전자 전이방법을 통하여 얻은 바이러스의 효과를 측정하기 위하여 줄기세포 장기 배양법을 통하여 확보한 마우스의 줄기세포에 배양액에 첨가하여 감염시켰다 (Fig. 3). Fig. 2에서 보는 것 처럼 A와 B에서

X-gal 염색을 실시했을 때 매우 강력하게 염색되는 것을 확인 할 수 있었다(Mercer등, 1991). 특히, Fig. 3에 A에서는 줄기세포가 콜로니를 형성하여 배양되고 있는 상태로 일종의 포도송이 모양 자라면서 감염되는 것을 확인 할 수 있었다(De Rooij, 1988a,b). 반면에 리포솜 방식에서도 강력하게 염색되는 것을 확인 할 수 있었지만, 낮은 바이러스 titration 비율로 인하여 적은 수만이 감염됨을 Table 1을 통하여 확인 할 수 있었다. Table 1에서 보면, 사용된 마우스 샘플은 전기충격법에서는 10 마리 사용하고 리포솜에서는 8 마리를 사용하였는데 모두 유전자가 전이되어 있음을 확인하였다. 이는 바이러스 벡터가 세포분열이 일어나는 세포에 쉽게 전이되는 것을 기존의 연구와 동일한 결과를 보여 주고 있다. 그러나 유전자 효율면에서 볼때 전체 세포를 suspension 상태로 확인 한 결과 전기충격법은 약 40%의 효율을 보인 반면에 리포솜 방법은 5% 밖에 보이지 않았다.

Table 1. Comparison of transfection methods for high titered virus production and gene expression.

Transfection methods for viral vector	No. of Sample	No. of X-gal stained sample	Efficiency of gene expression of total suspension cells (%)
Electroporation	10	10	40
Lipofectamine	8	8	5

이는 선행연구에서도 닭의 원시생식세포에 주입 후 배자 단계서 확인 한 결과와 유사한 결과를 보이 나 전기충격법과 레트로 바이러스 방법을 결합한 본 연구에서는 좀더 높은 유전자 전이를 확인 할 수 있었다(Jeong등, 2001; Hong 등,1998).

대부분의 유전자 전이 연구 결과에서 보는 바와 같이, 실제 생체내에서는 또 다른 여러 가지 요인에 의하여 실제 나타나는 결과는 다른 경향을 보이는

것이 일반적이다. 그래서 본 연구에는 유전자 전이 된 줄기세포를 1개월전 busulphan를 사용하여 수 용체의 줄기세포를 모두 파괴한 불임쥐에 주입하여 결과를 살펴 보았다(Oatley등, 2004). Fig. 4에서 보는 바와 같이 1개월 후 정소만 적출하여 고정 처리한 후 X-gal 염색을 한 결과 두 방법 모두에서 실제 줄기세포가 분열과 동시에 분화가 이루어진 것을 확인 할 수 있었다. 그렇지만, Fig. 4에 A

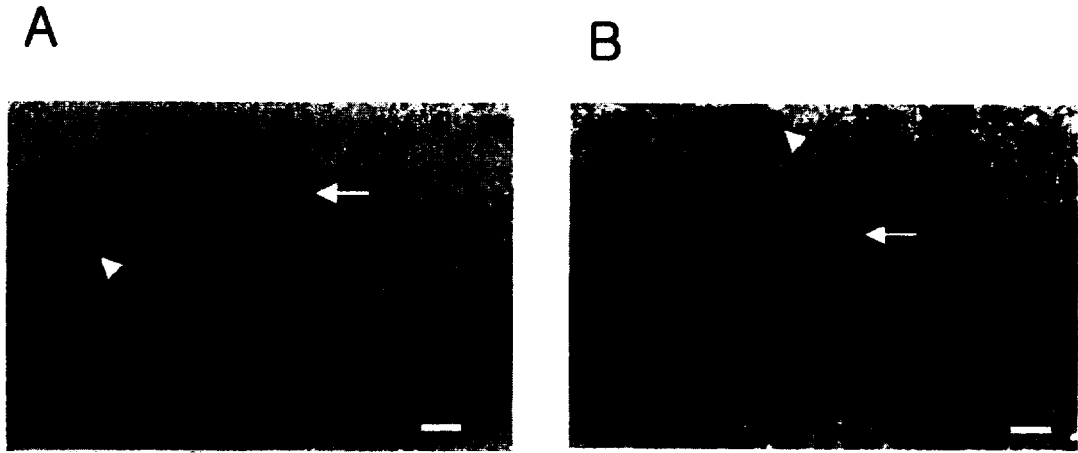


Fig. 3. pMSCVβ-gal gene expression patterns between electroporation and lipofectamine transfection method in the spermatogonial stem cells of mouse. (A) electroporation method (B) lipofectamine method. arrow indicated X-gal stained stem cell colonies. arrow head indicated non infected stem cells. Bar=30μm.

에서 좀더 강력한 발현율을 확인 할 수 있었다. 그리고 이 정소를 파라핀 절편을 만들어 관찰 한 결과 정자에서도 유전자 전이 되어 있음을 확인 하였다 (Shamblott등, 1998; Shinohara등, 1999). 형질전환 동물 생산연구는 소동물의 경우는 마우스가 주로 실험대상이다. 이는 특정 유전자를 삽입하여 표현형에 따른 유전자의 기능 탐색 연구나 대동물 특히 경제 동물의 경우 대부분 육종보다는 생리활성 물질을 동물의 유즙이나 오줌 또는 혈액 등의 생리

활동물질에 포함시켜 발현 한 후 분리하는 방법을 사용하고 있다. 그런데 대부분 형질전환 동물의 생산방법들이 많은 노력에 비하여 낮은 형질전환 효율로 실패로 돌아가거나 많은 비용에도 불구하고 경제성 없음으로 판정되고 있다. 그래서 본 연구에서는 이러한 문제점중의 하나인 사전 검증 시스템을 구축할 목적으로 시험관내에서 충분히 유전자 발현을 검증하기 위하여 전기충격법과 바이러스 벡터를 결합하여 줄기세포에 전이하여 검증된 줄기세포를 정

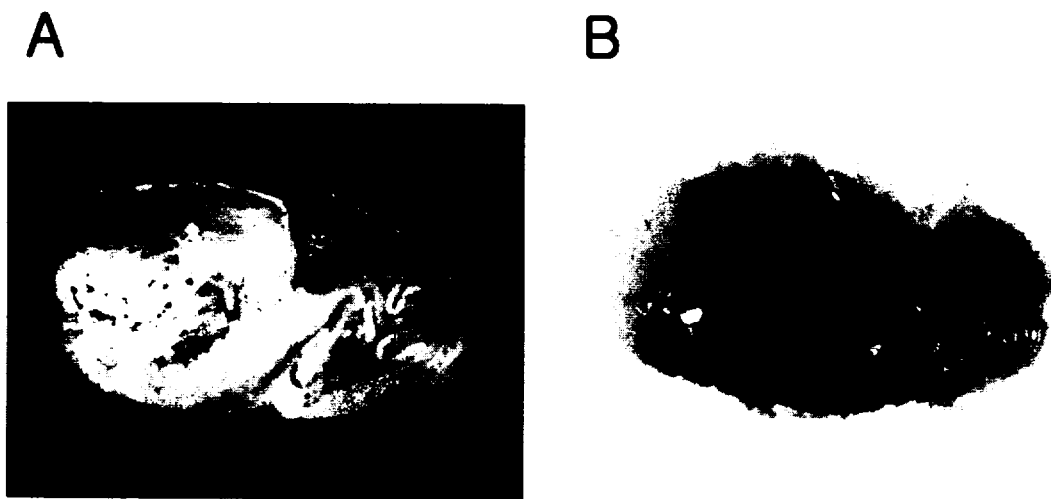


Fig. 4. Comparison of gene expression in testes of mouse between electroporation and lipofectamine method after virus infected stem cell transplantation. (A) electroporation, (B) lipofectamine.

자로 분화 시킨 후 100% 형질전환 동물을 생산 할 목적을 가지고 있다 (Nagano 등, 2001). 현재 안정적으로 전이됨을 확인하였고 그러므로 추후 추가 연구를 통하여 정자로 분화 시킬 연구도 함께 진행 해야 할 것으로 사료된다. 만일, 이러한 가설이 검증된다면 정원줄기세포는 현재 배아 줄기세포에서 문제가 되고 있는 윤리적인 문제뿐만 아니라 자가면역적합성 문제도 함께 해결 할 수 있는 강력한 도구로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 정원줄기세포에 안정적으로 유전자를 전이 시킬 목적을 가지고 수행하였다. 일반적으로, 유전자 전이법으로는 리포좀 방법을 많이 사용하여 바이러스 벡터를 유전자 전이를 시키는 반면, 본 연구에서는 전기충격법과 바이러스벡터 전이법을 결합하였다. 결과는 전기충격법에 의하여 293T 세포에 유전자 전이는 250V 전압에서 20 $\mu$ g의 DNA가 약 70% 정도로 높은 효율을 보여 주었다. 그리고 이 결과를 이용하여 유전자 선발한 결과 25일간 선발 시 89%의 높은 발현율을 보여주고 있다. 이는 간접적인 바이러스 선발법이 아닌 직접 관찰법으로 배양액내에 높은 바이러스 함유를 의한다. 89% 선발된 세포주로부터 수집한 바이러스 용액을 직접 정원줄기세포에 감염시킨 결과 10개의 샘플에서 모두 발현을 발견하였으며 전체 세포중 40%가 효과적으로 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다. 반면, 대조구에서는 8개의 모두에서 발현을 보였으나 전체 세포중에서는 5% 만이 확인 되었다. 최종적인 생체내 이식에서는 두 방법 모두 유전자 발현과 함께 정자를 생산하였다. 전기충격법을 이용한 바이러스 생산 실험에서 좀더 안정적인 유전자 삽입을 확인하였다.

## 참고문헌

Baldi L., Muller N., Picasso S., Jacquet R., Girard P., Thanh H. P., Derow E., Wurm FM. 2005. Transient gene

expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production. *Biotechnol Prog.* 21(1): 148-53.

Barbosa M. E., Alenina N., Bader M. 2005. Induction and analysis of cardiac hypertrophy in transgenic animal models. *Methods Mol Med.* 112:339-52.

Blanchard K. T. , Boekelheide K. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo. *Biol Reprod* 56:495-500

Brawley C. , Matunis E. 2004. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science.* 304(5675):1331-4. Epub 2004

De Rooij D. G., van Beek M. E., Rutgers D. H., van Duyn-Goedhart A., van Buul P. P. 1998A. Radioprotective effect of misoprostol on mouse spermatogonial stem cells. *Genet Res.* 72 (3): 185-189.

De Rooij D. G. 1998B. Regulation of the proliferation of spermatogonial stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:181-194

Dieleman L. A., Hoentjen F., Qian B. F., Sprengers D., Tjwa E., Torres M. F., Torrice C. D., Sartor R. B., Tonkonogy S. L. 2004. Reduced ratio of protective versus proinflammatory cytokine responses to commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Exp Immunol.* 136(1):30-9.

Honaramooz A., Snedaker A., Boiani M., Scholer H., Dobrinski I., Schlatt S. 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature.* 418(6899): 778-81.

Hong Y. H., Moon YK. K., Jeong D. K. and Han J. Y., 1998. Improved transfection efficiency in chicken

- gonadal primordial germ cells for the production of transgenic chicken. *Transgenic Research*. 7, 247-252.
- Huang G., Chantry A., Epstein R. J. 1999. Overexpression of ErbB2 impairs ligand-dependent downregulation of epidermal growth factor receptors via a post-transcriptional mechanism. *J Cell Biochem*. 74(1):23-30.
- Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., Coulson, C., Lambert, P. A., Watt, E. M. and Desai, K. M. 1985. *Br. Med. J.* 291, 1693- 1697.
- Jeong D. K., McLean D. J. and Griswold M. D., 2003. Long-term culture and transplantation of murine spermatogonial stem cells. *J of Andrology*. 24(5): 661-669.
- Luo J. and Redies C. 2005. Ex Ovo Electroporation for Gene Transfer Into Older Chicken Embryos. *Developmental Dynamics* 233:1470-1477.
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. 119(7):1001-12.
- Lee S. L., Ock S. A., Yoo J. G., Kumar B. M., Choe S. Y., Rho G. J. 2005. Efficiency of gene transfection into donor cells for nuclear transfer of bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 72(2):191-200.
- Lui V. C., Tam P. K., Leung M. Y., Lau J. Y., Chan J. K., Chan V. S., Dallman M., Cheah K. S. 2003. Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4Ig) in milk by transgenesis. *J Immunol Methods*. 277(1-2): 171-83.
- McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. 2002. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin a-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod*. 66 (5): 1374-9.
- Mercer E. H., Hoyle G. W., Kapur R. P., Brinster R. L., Palmiter R. D. 1991. The dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene promoter directs expression of E. coli lacZ to sympathetic and other neurons in adult transgenic mice. *Neuron* 7:703-716
- Nagano M., Avarbock M. R., Leonida E. B., Brinster C. J., Brinster R. L. 1998. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*. 30 (4): 389-397.
- Nagano M., Brinster C. J., Orwing K. E., Ryu B. Y., Avarbock M. R., Brinster R. L. 2001. From the cover: transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13090-13095.
- Oatley J. M., de Avila D. M, Reeves J. J., and McLean D. J. 2004. Spermatogenesis and Germ Cell Transgene Expression in Xenografted Bovine Testicular Tissue. *Biology of Reproduction* 71, 494-501.
- O'Brien, D. A. 1993. Isolation, separation, and short-term culture of spermatogenic cells. *Methods Tox.* 3A: 246-264.



- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., and Nishimune, Y. 2000. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cell: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 127, 2125-2131.
- Piek E., Afrakhte M., Sampath K., van Zoelen E. J., Heldin C. H., ten Dijke P. 1999. Functional antagonism between activin and osteogenic protein-1 in human embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 180(2):141-149.
- Russell, L. D., Ettl, R. A., Sinha Hikim, A. P., and Clegg, E. D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater.
- Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gearhart J. D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (23):13726-13731.
- Shinohara T., Avarbock M. R., Brinster R. L. 1999. B1- and a6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5504-5509.
- Thierry A. R., Lunardi-Iskandar Y., Bryant J. L., Rabinovich P., Gallo R. C., Mahan L. C. 1995. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9742-9746.
- Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R., and Noce T. 2003. Embryonic stem cell can form germ cells in vitro. *PNAS.* vol. no. 20, 11457-11462.
- Yu J., Deng M., Medvedev S., Yang J., Hecht N. B., Schultz R. M. 2004. Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev. Biol.* 268(1):195-206.

