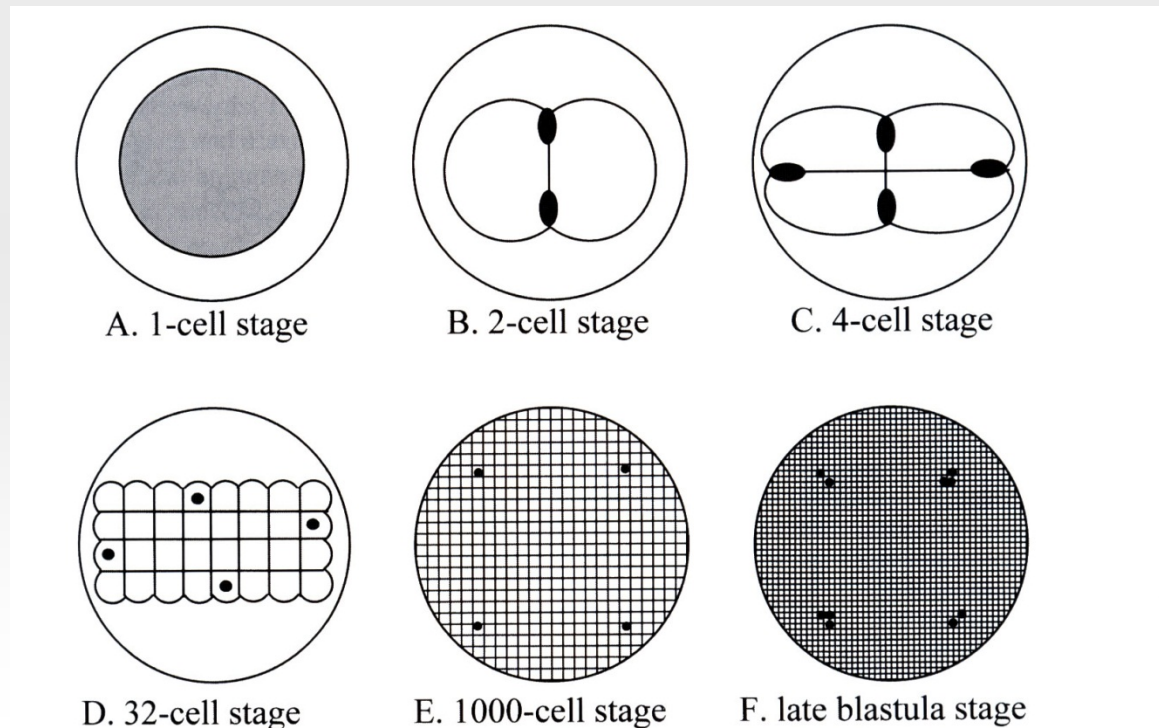


Primordiální gonocyty a diferenciaci pohlaví.

- Primordiální gonocyty (neboli = PGC; primordial germ cells; prapohlavní buňky; buňky specializované pro tvorbu pohlavních buněk)
- PGC umožňují přenos genetických informací mezi generacemi
- Pohlavní buňky se diferencují z malého množství PGC v průběhu časně embryogeneze.
- PGC vytvářejí zárodečné linie, které později „osidlují“ gonádu.
- Vedle znalosti biologických jsou důležité v biotechnologických aplikacích u ryb s přenosem PGC mezi druhy, včetně transgenóz, zmrazování atd.
- Zárodečná plasma byla nalezena u oplozených jiker mnoha druhů ryb
- U zebřičky *Danio rerio* byly izolovány „vasa“ a „nanos“ geny. Především vasa je používána jako molekulární marker PGC kdy umožňuje identifikovat a lokalizovat PGC
- Vasa (význam při formování proteinu) i nanos (význam při migraci PGC) RNA jsou maternálně děděny. Transkripční RNA vasa a nanos byly lokalizovány jako složky zárodečné plasmy.

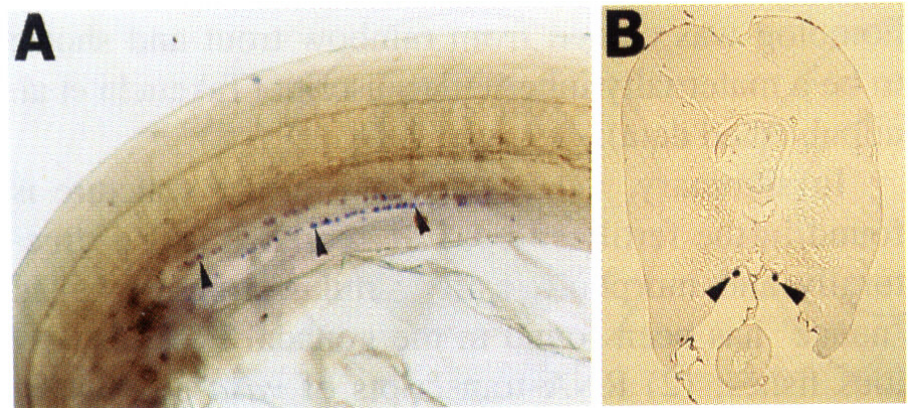
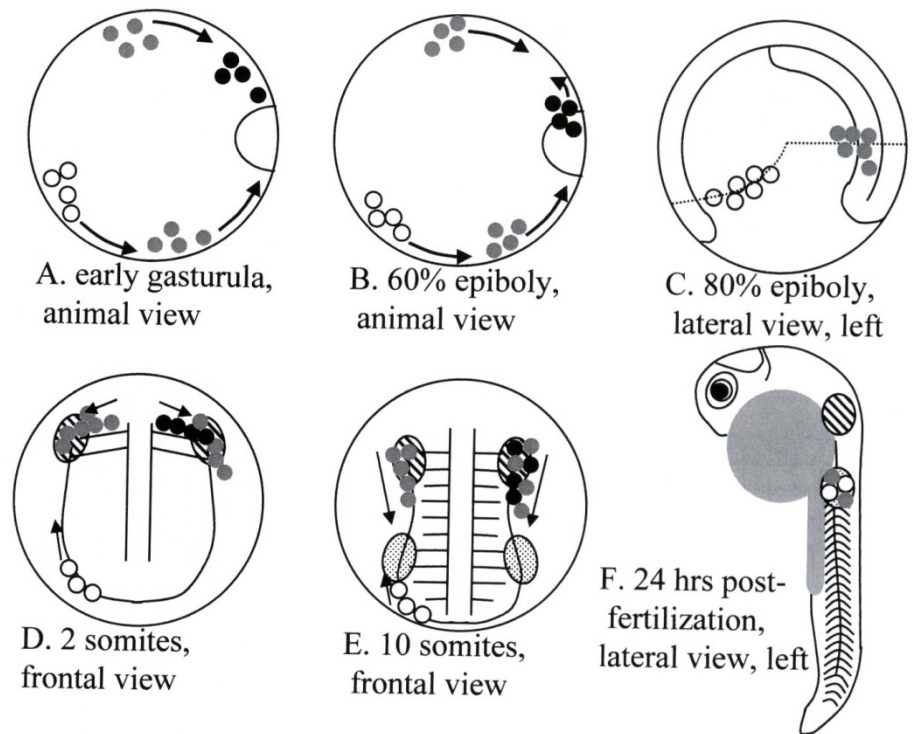
Lokalizace vasa RNA v embryu zebřičky

- Lokalizace ve stádiu 2, 4, 32 a 1000 blastomer ve 4 buňkách od stádia F tzn. v pozdní blastule mezi 4000 – 8000 buňkami dochází k segregaci do dceřiných (okolních buněk, jedná se již o PGC).



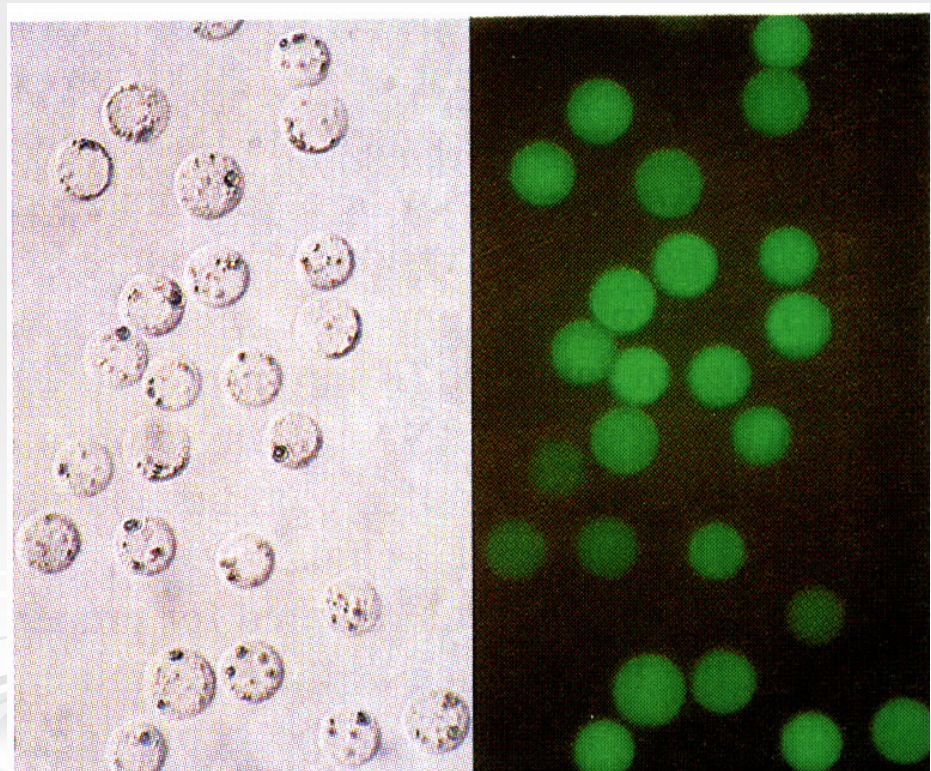
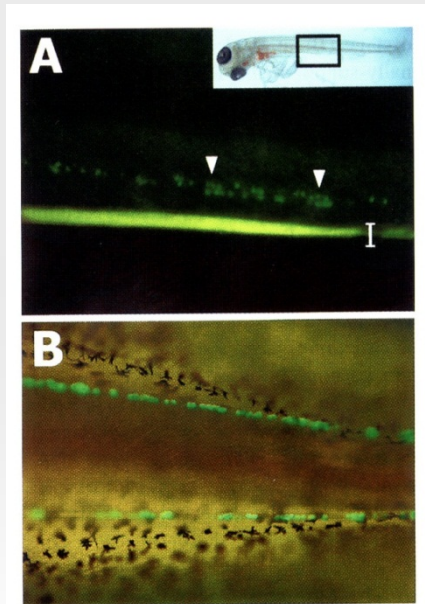
Lokalizace PGC

- U embrya zebřičky migrují klastry 4 PGC do dorsální části budoucího embrya s lokalizací do dvou míst na každé straně embrya
- U pstruha duhového A, B se PGC lokalizuje v dorzální části břišní dutiny, pořízeno v očním stádiu



Tvorba zárodečných linií

- U pstruha duhového A, B, se vytváří z PGC po vykulení zárodečná linie. PGC migrují po mitotickém množení v určitých obdobích do budoucí gonády. PGC jsou vizualizovaný u transgenózního pstruha duhového zeleným fluorescenčním proteinem tzv. GFP proteinem, pocházející z medúzy. Lze využít látku „morfolino“, která fluorescenčně zbarví vnesené PGC.

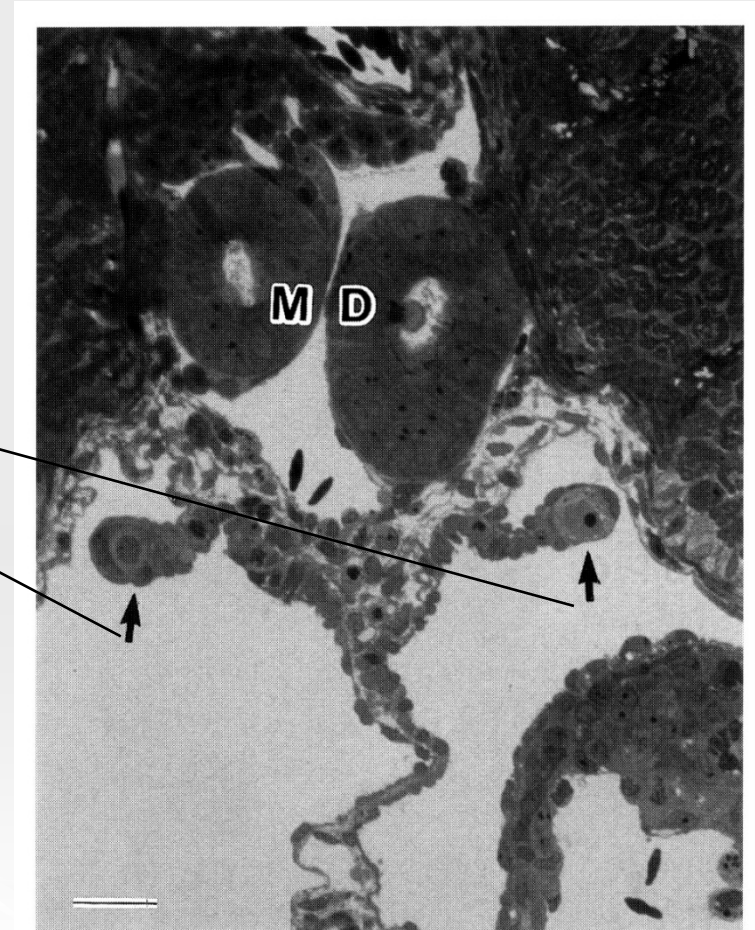


Využití primordiálních gonocytů

- Možnost odběru vizualizovaných PGC, a jejich uchovávání ve zmrazeném stavu.
- Přenos do hostitelských embryí (chimér) v období migrace PGC s budoucí produkcí gamet tzn. jiker a spermií původního druhu.

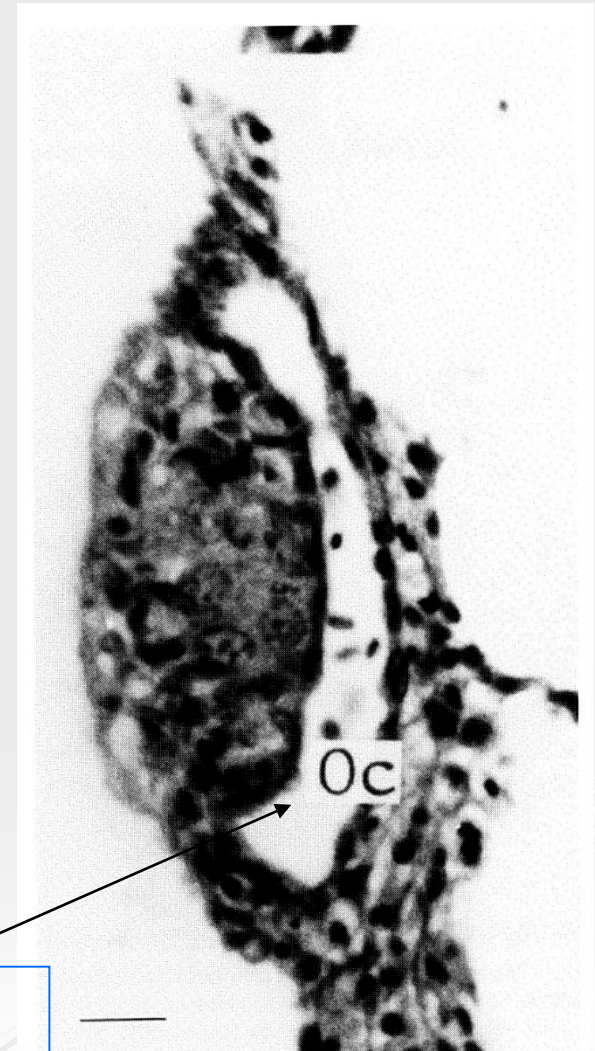
Diferenciace pohlaví

- Gonáda (obvykle párový orgán) je tvořen somatickými buňkami s kolonizací pohlavními buňkami (PGC).



Diferenciace ovária

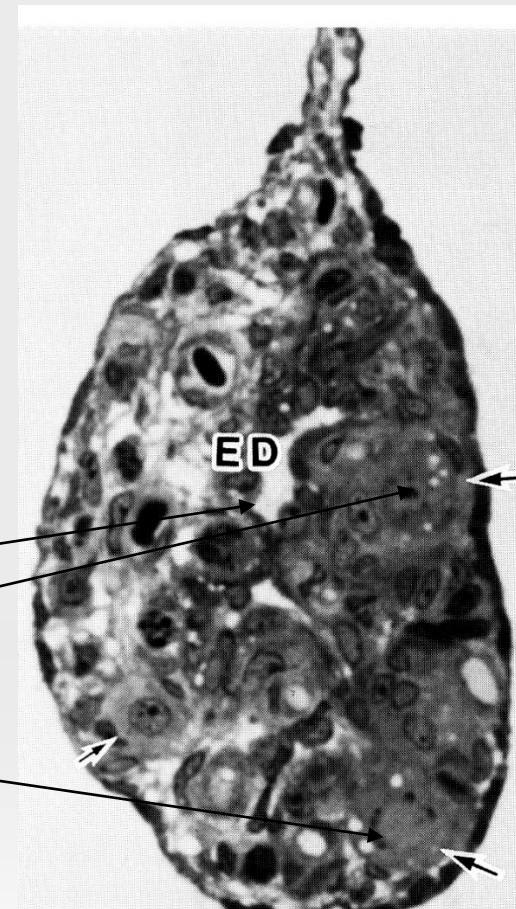
- Sexuální (pohlavní) diferenciace začíná tvorbou ovárií a časově později nastupuje vytváření testes, existuje i simultánní vývoj např. u tilápie.
- První průběh vytváření ovária je mitotické množení PGC, ale rovněž i somatických buněk pro tvorbu gonády, na které navazuje produkce specializovaných buněk pro produkci steroidů. Zárodečné buňky se nacházejí v meiotické profázi s následným spojením protilehlých valů somatických buněk, které vytvoří ovariální dutinu.



Ovariální dutina

Diferenciace testes

- U gonochoristů s pohlavím XY, tedy mlíčáků zebřičky, úhoře se nejprve vyvíjí rudimentární ovarium s ovogoniemi a rannými stádiemi ovocytů (rozvoj ovogeneze) a až následně dojde po apoptose ovocytů k rozvoji spermatogonií a spermatogenezi
- Později u XY mlíčáků se v budoucím testes z eferentního kanálku založí chánovod s postupnou mitózou spermatogonií. Dále se tvoří buňky produkující steroidy. Následuje meioza u sekundárních spermatogonií s vývojem spermatocytů.



Úroveň mitózy a meiozy v době diferenciace

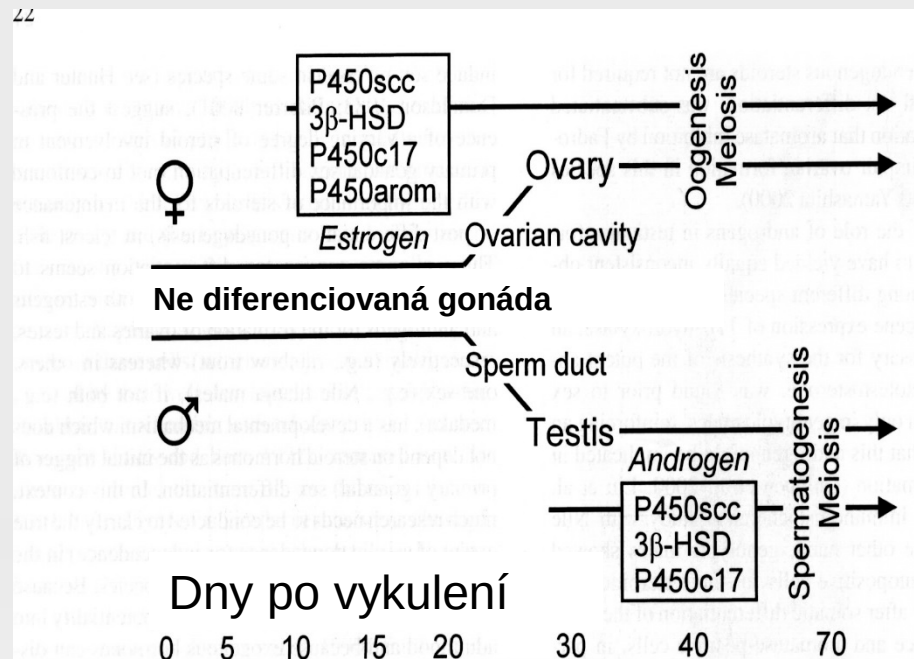
- Hlavní období diferenciace zárodečných buněk tzn. nástup mitózy a následně meiozy je u tilápií mezi 35 až 100 dny po vykulení, u kapra v období po 30 dnech (20 °C) po vykulení, pstruha duhového v 35-42 dnu při 10-11 °C po vykulení.
- Nárůst mitoticky se množících zárodečných buněk je enormní. U pstruh duhový má po vykulení 50 ks zárodečných buněk, po 4 týdnech je u samice 2000 zárodečných buněk, po 10 týdnech 12 000 zárodečných buněk, u samců do 10 týdnů se nepřekoná 2000 zárodečných buněk.

Vliv endogenních hormonů na diferenciaci pohlaví

- Iniciátorem diferenciaci jsou s největší pravděpodobností vnitřní hormony a geny odpovědné za pohlaví.
- Z mnoha experimentů je jasné, že v době diferenciaci jsou podávány androgení a estrogení hormony velmi efektivní.
- Základem úspěšné diferenciaci na samičí pohlaví představují folikulární buňky se steroidním hormonem kolem PGC.
- V základech testes jsou přítomny Leydigovy buňky s produkcí steroidů se signálem z adenohipofýzy.
- V další fázi je dominující FSH s produkcí steroidů v Sertoliho buňkách.
- S produkcí steroidů souvisí úroveň specializovaného enzymu. Produkce **17 beta estradiolu** s vazbou na estrogeny je receptorem propojena s tvorbou enzymu **aromatáza**. Tento nejdůležitější enzym se vytváří pouze u XX jikernaček. Při zablokování funkce aromatázy dojde k maskulinizaci (tilapie nilotika, pstruh duhový). Naopak u XY samců **hydroxyláza** aktivuje tvorbu **11 KT testosteronu** s následnou vazbou na testosteron.

Vliv steroidů nebo genu řídící diferenciaci pohlaví

- U tilápie nilské – nezávisle steroidní hormony na podkladě funkčnosti enzymu aromatázy určují diferenciaci pohlaví.
- U medaka existuje gen DMY (testis-determining gene), který není závislý na stereoidech a samostatně spouští diferenciaci pohlaví s produkcí steroidů.



Tilápie nilotická, enzymy důležité pro produkci estrogenních a androgenních hormonů v době po vykulení.

Vnější vlivy na diferenciaci pohlaví

- Je zřejmá vazba vnějších steroidů na receptor, který působí na transkripci/nebo expresi genů odpovědných za pohlaví.
- Oba receptory existují v ováriích a testes.
- Existují vlivy fyzikální, chemické a sociální na diferenciaci pohlaví.
- U tilápie vysoká teplota zablokuje produkci aromatázy a tím dojde k maskulinizaci. Na druhé straně u YY (nadsamců) tilápie při vysoké teplotě spolu s hormonální podporou produkce aromatázy bylo dosaženo feminizace.
- Plasticita změny pohlaví je obrovská – gavúnovec argentinský (*Odontesthes bonariensis*) – 100 % jikernaček 15-19 °C; – 0 % jikernaček při 29 °C; naopak 24-25 °C moduluje pohlaví v poměru 1:1.

Zvrat pohlaví u gynogenetických kaprů tzn. kaprů genotypu XX) příklad

➤ Meitotická gynogeneze provedena na jaře 1998:

- Výtěr jikernaček a mlíčáků kapra.
- Inaktivace spermií UV zářením s příkonem $1600 \mu\text{Ws}^{-1}$ UV po dobu 6 min
- Oplození s inaktivovaným spermatem, kontrola úspěchu inaktivace spermatu barevným markerem s použitím jikernačky KOI (Při dobrém ozáření všechno potomstvo barevné KOI tzn. gynogenetické, při špatné inaktivaci potomstvo zelené; zelená barva je dominantní, oproti ostatním barvám).
- Po 5 min po aktivaci gamet chladový šok ($0-2^{\circ}\text{C}$), 35 min.

➤ Vysazení do rybníka; v hmotnosti 4 g tzn. 50-55 dnech slovení a nasazení do recirkulačního systému (25°C) krmení od 4 g dietou s 0,1 g $17\text{-}\alpha$ -methyltestosterone v kg krmiva po dobu 40 dnů (Linhart et al., 1995).

➤ Ve stáří jednoho roku při teplotě 20°C byli gynogenetičtí maskulinizovaní kapři plně zralí.

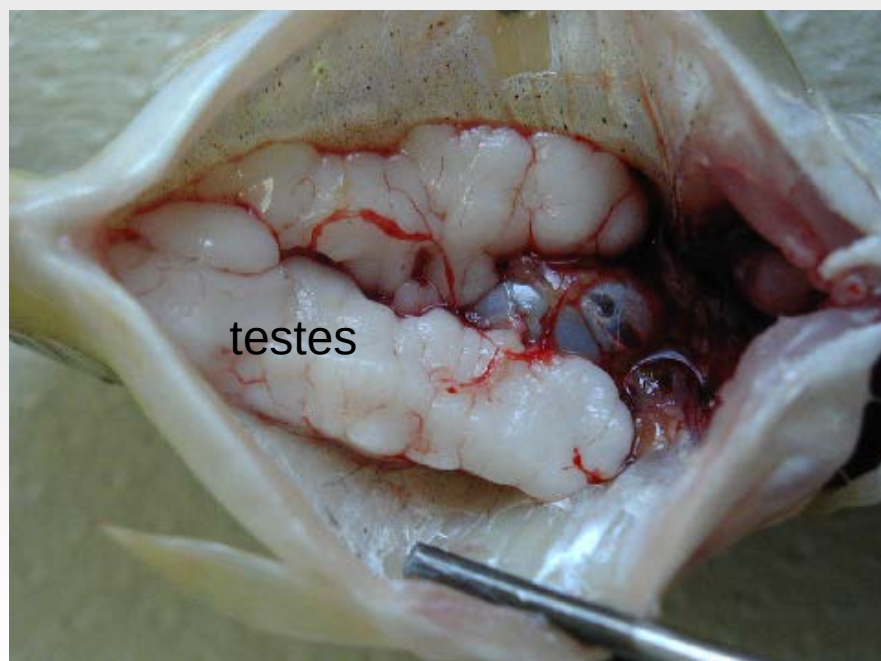
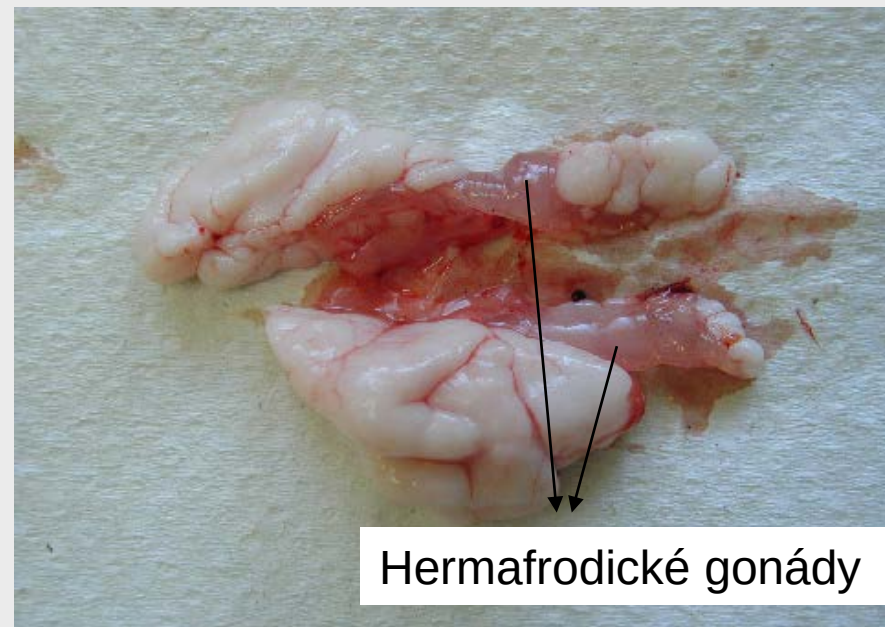
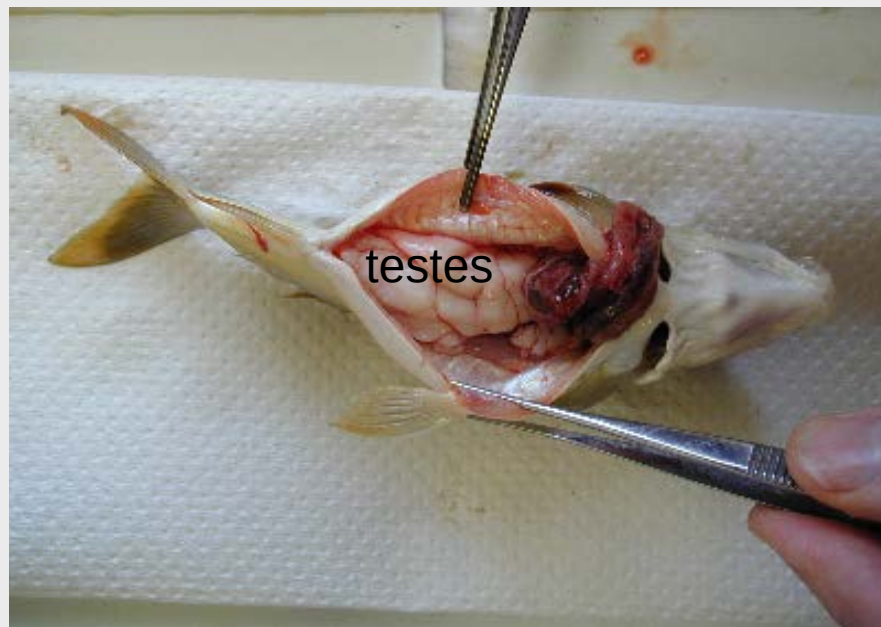
➤ Pro produkci celosamičí populace kapra bylo použito 13 maskulinizovaných gynogenetických jedinců (odebráno celkem 15 ml spermatu).

Ukázka recirkulací pro zvrát pohlaví u gynogenetických kaprů



Gonády u 60 dnů starého plůdku lína





Maskulinizovaní gynogenetičtí kapři ve stáří 1 roku

Otomar Linhart, Řízená
reprodukce ryb, 2018