

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Značení a izolace primordiálních gonocytů jeseterů

Autor: Bc. Dvořák Matěj

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pšenička Martin, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Linhartová Zuzana

Studijní program a obor: N4103 Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2014

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiát.

V Českých Budějovicích

Dvořák Matěj

dne:

.....

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Martinovi Pšeničkovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Zuzaně Linhartové za odborné vedení, rady a cenné připomínky při vypracování této práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky, projekt číslo P502/13/26952S.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Matěj DVOŘÁK**
Osobní číslo: **V11N003P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Značení a izolace primordiálních gonocytů jeseterů**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Transplantace primordiálních gonocytů (PGC) je jednou z nejpoužívanějších technik pro tvorbu chimér zárodečných linií (germ-line chimera). PGC je embryonální zárodečná buňka specializovaná pro tvorbu gamet, tedy spermií a vajíček. Ta se po transplantaci do embrya stejného nebo příbuzného druhu ryby začlení do gonád hosta, který pak v dospělosti produkuje gamety donora, transplantovaného jedince. Tato technika je prostudovaná zatím jen u modelových druhů ryb, ovšem její aplikací bychom mohli docílit např. efektivnější kryopresevaci rybích druhů nebo zkrácení generačního intervalu u dlouho dozrávajících ryb, jakými jsou například jeseteři. Pokud bychom vytvořili germ-line chiméru např. vyzy velké, která pohlavně dospívá zhruba za 18 let, v roli donora PGC a jesetera malého, dospívajícího kolem 6 let, v roli hosta, pak bychom zkrátili generační interval tohoto kriticky ohroženého druhu až 3 krát.

Prvním a hlavním požadavkem pro zvládnutí techniky transplantace u jeseterů je zvládnutí metodiky značení PGC. To se u většiny druhů modelových ryb provádí injekcí fluorescentu GFP konjugovaný s *nos1* 3'UTR mRNA do jikry po oplození. Tato aplikace se musí provádět do míst lokalizace prekursoru PGC, kterými je tzv. Babiani cytoplasma obsahující "nuage". Cílem této práce bude příprava a injekce sondy GFP, sledování migrace a izolace PGC.

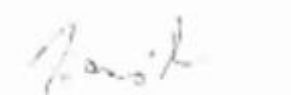
Rozsah grafických prací: 1 - 5 tabulek nebo grafů, 5 - 15 obrázků
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Grandi, G., Chicca, M., 2008. Histological and Ultrastructural Investigation of Early Gonad Development and Sex Differentiation in Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, *Chondrostei*). *J. Morphol.* 269: 1238-1262.
Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., Yamaha, E., 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 691-699.
Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. *Biol. Reprod.* 78, 159-166
Yamaha, E., Murakami, M., Hada, K., Otani, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Sakao, S., Kimura, S., Sato, S., Arai, K., 2003. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica* 119: 121-131.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Pšenička, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: Mgr. Zuzana Linhartová
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání diplomové práce: 2. prosince 2011
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013


prof. Ing. Otomár Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Žitná 728/II
389 25 Vodňany


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. Embryologie jeseterů	8
2.1.1. Neoplozená jikra	9
2.1.2. Oplození jikry	10
2.1.3. Počáteční rýhování.....	11
2.1.4. Pozdní rýhování	12
2.1.5. Blastulace	12
2.1.6. Počáteční gastrulace.....	12
2.1.7. Formování žloutkového bodu	13
2.1.8. Neuralace	13
2.1.9. Prodloužení předledvin a počáteční organogeneze.....	14
2.1.10. Formování srdce.....	14
2.1.11. Doba před líhnutím	14
2.1.12. Masové líhnutí	15
2.2. Zárodečné buňky.....	15
2.2.1. Diferenciace zárodečných buněk	16
2.2.2. Struktura a lokalizace zárodečné plazmy.....	16
2.2.3. Migrace a vznik PGC.....	19
2.2.4. Vlastnosti a nástrojek analýze PGC.....	22
2.3. Reprodukční technologie využívající PGC.....	24
2.3.1. Kultivace zárodečných buněk	24
2.3.2. Tvorba zárodečných chimér.....	25
2.3.2.1. Transplantace PGC	25
2.3.2.2. Transplantace zárodečných linií	26
2.3.2.2. Sterilizace hostitele pro produkci zárodečných chimér	26
2.3.3. Perspektivy využití zárodečných buněk.....	27
3. MATERIÁL A METODIKA.....	28
3.1. Příprava GFP <i>nos1</i> 3'UTR mRNA.....	28
3.1.1. Transformace plazmidové DNA pomocí bakterií.....	28
3.1.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
3.1.3. Amplifikace vybraných bakteriálních kolonií s plazmidem DNA	30

3.1.4. Enzymatická digesce, prurifikace (pročištění) amplifikovaných DNA plazmidů a jejich transkripce na RNA.....	30
3.2. Získání a příprava embryí k mikroinjekci	31
3.3. Mikroinjekce GFP <i>nos1</i> 3'UTR mRNA.....	32
3.4. Pozorování vzniku a migrace PGC.....	32
3.5. Izolace.....	32
4. VÝSLEDKY	33
5. DISKUZE A ZÁVĚR	37
6. LITERATURA.....	39
7. SEZNAM ZKRATEK	49
8. PŘÍLOHY.....	49
9. ABSTRAKT	56
10. ABSTRACT.....	56

1. ÚVOD

Jeseteři (*Acipenseriformes*) jsou nejstarším řádem ryb z třídy paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*). Fosilní záznamy jeseterů sahají až do svrchní křídly (Grande a Bemis, 1991) a analýza mitochondriální DNA naznačuje, že se tento řád ryb odchýlil od starověké kostnaté linie zhruba před 300 miliony let (Inoue a kol., 2005).

Jeseteři vajíčka mají holoblastický typ rýhování, stejně jako žáby (Elinson, 2009). Paradoxně je vývoj jeseteřích embryí více podobný drápatce (*Xenopus*), nežli kostnatým rybám (*Teleost*), a to nejen ve způsobu rýhování, ale i v mnoha dalších aspektech (Ballard a Ginsburg, 1980; Bolker, 1993a). Fylogenetická pozice jeseterů je posazena mimo skupinu kostnatých ryb (Bolker, 2004) a studie jeseteří embryogeneze spolu s PGC nám tak poskytuje cenný nástroj pro srovnání kostnatých ryb a obojživelníků.

PGC je embryonální zárodečná buňka specializovaná pro tvorbu gamet. PGC vznikají během embryonálního vývoje mimo budoucí lokalizaci zárodečné rýhy, prekursoru gonád. U několika modelových zvířat byly vznik a migrační modely PGC studovány a je již známo, že se tyto modely od sebe liší. Poznatky z živého zobrazení dynamických procesů vývoje primordiálních gonocytů (PGC) a manipulace s nimi může dále poskytnout poznatky pro humánní medicínu, např. pro vývoj reprodukčních technik (Xu a kol., 2010). U jeseterů, v zájmu reitrodukce těchto ohrožených druhů

a pro jejich výhodné chovatelské vlastnosti, se zvyšuje akvakulturní chov. V popředí uvedených zájmů je zefektivnit chov těchto ryb. Jedním z vhodných a vyvíjejících se nástrojů je manipulace s PGC. Mikromanipulacemi s PGC můžeme zefektivnit reprodukci jeseterů. Například kryokonzervací a kultivací PGC a tvorbou tzv. chiméry zárodečné linie, při které dochází k vývoji gamet z dárcovských PGC v hostiteli, pomocí níž můžeme zkrátit generační interval těchto dlouho dospívajících ryb. Mikromanipulace se zárodečnými buňkami, včetně PGC jsou zatím vyzkoušeny jen u modelových druhů ryb. Prvním a hlavním požadavkem pro provedení techniky transplantace PGC u jeseterů je zvládnutí metodiky značení PGC. Ta se u většiny druhů modelových ryb provádí injekcí fluorescentu GFP *nos1* 3'UTR mRNA (dřívější označení GFP *nos3* 3'UTR mRNA) do jikry po oplození. Tato aplikace se musí provádět do míst lokalizace prekursoru PGC, kterým je u jeseterů tzv. Balbianiho cytoplazma obsahující "nuage" (Dvořák, 2011).

Cílem této práce bude příprava a injekce sondy GFP *nos1* 3'UTR mRNA, sledování migrace a izolace PGC pro další manipulace.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Embryologie jeseterů

Počátek vývoje embryí začíná oplozením, splynutím samčích a samičích gamet (spermii a jiker). Oplozené jikry jsou již novým organismem, embryem, které se za příznivých podmínek transformuje a prochází řadou po sobě jdoucích stádií. Z biologického hlediska se v průběhu vývoje ryb rozeznávají stádia: embryonální, prelarvální, larvální, juvenilní, adultní a senektivní (Detlaff a kol., 1993). Embryonální vývoj končí počátkem příjmu exogenní výživy, respektive stádiem larvy.

Jak už bylo zmíněno embryologie jeseterovitých v ranných fázích vývoje (rýhování, morulace, blastulace a gastrulace) je podobná vývoji bezocasých obojživelníků. Objem žloutku je hlavním faktorem rozdílů ve vytváření vzorů zárodečných rýh u živočichů (Cooper a Virta, 2007). U vajíček jeseterů a bezocasých obojživelníků dochází k holoblastickému rýhování, tj. k rýhování dochází po celém povrchu jikry. Na animálním pólu probíhá symetrické rýhování, kdežto vegetativní pól jikry se rýhuje nesymetricky (heterolecitálně). Jeseteří embrya tvoří samostatný blastocel a archenteron a neurální trubice se vyvíjí z formujících se neurálních valů,

kteřé se proti sobě ohýbají, až se uzavřou do trubice (Ginsburg a Dettlaff, 1991). Naproti tomu většina kostnatých nevykazuje žádnou strukturu odpovídající významné segmentace dutiny, označované jako blastocel a archenteron a neurální trubice vzniká ze dvou mezistádií, neurální tyče a neurálního kýlu, který se utváří z neurální desky (Kimmel a kol., 1995). Navíc se embrya kostnatých ryb podrobují meroblastickému rýhování, kdy pouze animální polovina vajíčka, tj. blastodisk podléhá rýhování. U embryí bichirů (*Polypterus*), kteří také patří do fylogeneticky dávné skupiny, procházejí embrya holoblastickým rýhováním podobným obojživelníkům a jeseterům (Bolker, 1993a,b, Takeuchi, 2009b,c). Zástupce starých primitivní druhů jak jsou: kostlín (*Lepisosteus*) a kaproun (*Amia*) jsou považovány za přechodné fáze od holoblastického k meroblastickému rýhování. Vytvářejí obří žloutkové blastomery ve vegetativní části a rýhování probíhá převážně v animální části vajíčka (Long a Ballard, 2001; Ballard, 1986a,b).

Většina poznatků jeseteří embryologie je založená na studiích několika druhů jeseterů (Dettlaff a kol., 1993; Conte a kol., 1988; Beer, 1981; Wang, 1984). Vývoj embryí u jeseterů několika druhů vykazoval identické rýhování a první morfologické odlišnosti nastaly až v prelarvální a larvální fázi. Z tohoto důvodu bude popsán vývoj embrya v obecnější formě.

Pro popis vývoje embrya jeseterů bylo stanoveno 36 etap dle (Dettlaff a kol., 1993), viz Příloha I.

2.1.1. Neoplozená jikra

Neoplozená jikra je v závislosti na druhu kulovitého tvaru, např. jeseter ruský (*A. gueldenstaedti*), nebo spíše elipsovitého (vejčitého), např. vyza velká (*Huso huso*) a jeseter hvězdnatý (*A. stellatus*) (Dettlaff a kol., 1993). Velikost ovulovaných jiker u jednotlivých druhů je variabilní, například u jesetera sibiřského (*A. baerii*) 2,5–2,8 mm, jesetera malého (*A. ruthenus*) 1,8–2,8 mm a vyzy velké 3,3–4,5 mm (Hochleithner a Gesner, 2001). Většina jiker je břidlicovitě šedá, s výjimkou animálního pólu, který je obvykle světlejší, obklopený 2 až 3 tmavými soustřednými kruhy. Průměr světlého pólového místa, intenzita pigmentace a šířka soustředných kruhů spolu se světlou oblastí mezi kroužky se liší nejen u jiker různých ryb, ale také u jiker od jedné ryby. U albinotických ryb jsou jikry světle žluté až bílé barvy. Další výjimku představují jikry *A. gueldenstaedti colchinus*, u kterého je animální pól pigmentován intenzivněji natolik,

že je tmavší než vegetativní pól. Existují další barevné variace, např. některé jikry jsou úplně šedé a jiné mají bílé skvrny na animálního pólu – obvyklá známka přezrálých jiker. Variace jsou často odrazem v odlišnostech zralosti a stavu jiker. Avšak k porovnání barev jakožto indikátor kvality jiker není v současné době dostatek informací (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.2. Oplození jikry

Spermie jeseterovitých ryb proniká do jikry mikropylárními otvory na animálním pólu. Při průchodu spermie mikropylem dochází u spermie k tzv. akrozomální reakci. Akrozomální reakce zahrnuje exocytózu syntetizovaného materiálu ze tří endonukleárních kanálků a implantační jamky a vzpříčení posterolaterálních výběžků, které s největší pravděpodobností slouží k ukotvení spermie v mykropilárním otvoru při oplození jikry (Pšenička a kol., 2010; DiLauro a kol., 1998). Syntetizovaný materiál je vystřelen vpřed v podobě dlouhého jemného filamentu, který v předstihu zkontaktuje hlavičku spermie s cytoplazmatickou projekcí jikry (část jikerné cytoplazmy vchlipující se do mykropilárního otvoru) a zahájí řadu změn v jikře. Akrozomální reakce spermií u jeseterů je v podstatě podobná akrozomální reakci spermií u bezobratlých živočichů (Dan, 1976; 1970) a mihule (*Lampetra fluviatilis*) (Nicander a Sjo:den, 1971; Jaana a Yamamoto, 1981). U těchto živočichů je však akrozomální reakce mechanismem sloužící k překonávání vaječných membrán jako bariér mezi spermií a vajíčkem. Jeseteroví si tento prastarý mechanismus uchovali navzdory skutečnosti, že jikerné obaly mají hned několik mykropilárních otvorů a jikerné obaly tak nepředstavují překážku pro proniknutí spermie. Počet, struktura a velikost mikropylí se u různých druhů jeseterů liší. Ale také počet mikropylí se může lišit mezi jikrami jednoho druhu. Průměr mikropyle není výrazně širší než je šířka hlavičky spermie. Vnitřní průměr mikropyle může přispívat k zamezení polyspermie (Pšenička a kol., 2010).

Kontaktem spermie s cytoplazmou vajíčka dochází k aktivaci mnohých reakcí a procesů ve vajíčku jako jsou: kortikální reakce, bobtnání jikerných obalů, otáčení jiker animálním pólem nahoru, morfologické změny lepivost jiker atd.

Kortikální reakce začíná do 2 s od splnutí gamet (Ginsburg, 1961; 1987). V průběhu kortikální reakce alveolární granule bobtnají, až prasknou a jejich obsah je rozlit pod zona radiata interna (tzv. L1 vrstva vajíčka) za vzniku perivitelinního prostoru. Ke kortikální reakci dochází v centru animální oblasti jikry, místa kde spermie

pronikla přes mikropyle. Odtud se kortikální reakce šíří ve všech směrech jako, tzv. fertilizační vlna, rychle pokrývá celou animální oblast a přes ekvatoriální oblast jikry dosahuje vegetativního pólu (Dettlaf a kol., 1993). Periviteliní prostor obklopuje celý obvod jikerné cytoplazmy a vstupuje do zbývajících prázdných mikropylí, u kterých nedošlo k penetraci spermií a blokuje tím tak vznik polyspermie. U mikropyle, kterým prošla spermie dochází k „zalití“ mikropyle cytoplazmou za vzniku tzv. fertilizačního kónusu (Cherr a Clark, 1985). Spermie přicházející do styku s obsahem kortikálních granulí jsou aglutinovány, kdy se povrch spermií stává lepkavý, bičíky jsou k sobě připojeny, tvoří smyčky a spermie ztrácejí schopnost pohybu vpřed (Ginsburg, 1961).

Vzhledem k několika možným blokacím vzniku polyspermie, oplození jiker může být polyspermní pouze zřídka kdy. K polyspermii dochází jen ve výjimečných situacích jako je současný průnik několika spermií přes několik mikropylí. Jikerné obaly po oplození bobtnají, povrch jikry se stává lepivý. Již 1 hod. po oplození nastanou změny mezi jikernými membránami (Dvořák 2011). Alveolární vrstva (L3) a zona radiata externa (L2) se oddělí od zona radiata interna (L1). Stejný proces byl zdokumentován Pšeničkou a kol. (2010) i u neoplozených jiker jesetera. Tohoto procesu, oddělení L3 a L2 vrstvy od zbylé L1, lze využít i v praxi např. pro mechanickou dechorionaci jiker (pomocí pinzet) k usnadnění penetrace kapiláry v rámci mikromanipulačních technik (Dvořák 2011).

2.1.3. Počáteční rýhování

Počátek embryogeneze je zaznamenám mitotickým dělením buňky (vajíčka) ve velký počet menších buněk (rýhování vajíčka). Nerovnoměrné rozdělení žloutkových inkluzí u jiker jesetera způsobí v pozdějších fázích embryogeneze nepravidelné rýhování. V animální části jikry, která obsahuje malé nutriční inkluze v relativně nízké koncentraci, se tvoří malé blastomery. Ve vegetativní části je mnoho velkých žloutkových granulí s lipidovými inkluzemi a blastomery jsou pak mnohem větší. První rýha se začíná tvořit v animální oblasti a postupuje k vegetativní části jikry. Druhá dělicí rýha se formuje kolmo k první štěpné brázdě před tím, než je první zcela kompletní. První dělicí rýha je uzavřena ve vegetativním pólu, když se druhá štěpná brázda blíží k ekvatoriální oblasti a embryo se rozděluje na 4 rovnoměrné blastomery. Poloha štěpné rýhy u jiker jeseterů striktně dodržuje Hertwigovo pravidlo, podle kterého je osa rýhy orientována ve směru maximální délky

volné cytoplazmy s inkluzemi, tedy třetí štěpená rýha je položena meridiálně spíše než ekvatoriálně, jak je tomu u zvířat s menším množstvím žloutku u vajíček, například obojživelníků. Vzor tvořený dělicí rýhou však není obvykle geometricky zcela pravidelný a blastomery mají různé tvary a velikosti. Malé protáhlé nebo kulovité blastomery jsou někdy formovány během třetího rýhování. Ještě větší rozmanitost ve štěpném vzoru je pozorována v průběhu čtvrtého dělení vytvořením „hromádky“ s mnoha blastomery na animální polokouli. Animální polokoule je lehce pigmentovaná, zatímco vegetativní polokoule je tmavá (Dettlaff a kol., 1993). Přibližně 6–10 hod. po oplození, v období počátečního rýhování jsou embrya nejvíce náchylná k otřesům (Conte a kol., 1988).

2.1.4. Pozdní rýhování

Buněčné dělení pokračuje tak, že se animální pól štěpí do mnoha malých, ale rozeznatelných blastomer s různou pigmentací, které vytváří „oblázkový“ vzhled. Střední pásmo středně velkých blastomer odděluje animální a vegetativní pól. Vegetativní pól je rozdělen do větších blastomer (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.5. Blastulace

U rané blastuly se povrch vznikajícího embrya jeví jako zrnitý díky přechodu v pigmentaci a nerovnoměrnosti povrchového reliéfu. Jednotlivé blastomery se v částech animální polokoule stávají již od sebe nerozeznatelnými a animální pól se pak jeví vizuálně hladkým (Conte a kol., 1988).

Během blastulace embrya dochází v animální části k počátku formování blastocelu (prvotní dutiny) a desynchronizaci dělení buněk vedoucímu k částečnému rozřídění buněk do dvou na sebe dosedajících listů: epiblast (budoucí ektoderm) a hypoblast, tj. mezo-endoderm (budoucí endoderm a mezoderm). Ke konci blastuly vzniká ostré rozhraní mezi světle zbarvenou animální oblastí a tmavě pigmentovanou „popraskanou“ vegetativní oblastí (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.6. Počáteční gastrulace

Gastrulace je charakteristická buněčnými přesuny, se kterými je spojen vznik zárodečných vrstev. Během gastrulace zaujme zárodečný materiál embrya své konečné umístění.

Na začátku gastrulace dochází k tvorbě pigmentovaného pásu v ekvatoriální rovině, v místě budoucích prvoúst (blastoporu), tj. místa formace světlého srpku (půlměsíce). Následně prostřednictvím blastoporu dochází k tzv. involuci. Při involuci se mezo-endodermální vrstva buněk pohybuje (vchlipuje) směrem dovnitř dutiny přes dorzální část prvoúst a tvoří dva zárodečné listy, endoderm a mezoderm. Buňky, které nemigrují dovnitř embrya (epiblast) vytváří ektoderm a podílejí se na tzv. epibolii. Prvotní dutina blastocel se v průběhu involuce zmenšuje, až zmizí a involuce buněk vede k tvorbě druhé embryonální dutiny, prvostřeva (archanteronu). Jak již bylo zmíněno, spolu s involucí je spojen epibolický pohyb buněk epiblastu, při kterém buňky epiblastu situované na animální části obrůstají celou plochu vegetativní části embrya. Vizuálně se epibolie projevuje zatlačováním původně tmavě zbarveného vegetativního pólu rozšiřující se světlou částí z animální části embrya (Dettlaff a kol., 1993). Při dokončení epibolie (pokrytí světlé části 2/3 povrchu embrya) se prvoústa uzavírají a formuje se tzv. žloutkový bod – yolk plug (Conte a kol., 1988).

2.1.7. Formování žloutkového bodu

V tomto okamžiku pigmentovaný pás prvoúst tvoří kruh (prstenec) kolem embrya. Epibolický pohyb buněk pokračuje přes vegetativní oblast. Buňky migrují přes vegetativní polokouli ve vytvořeném kruhu, který představuje okraj blastoporu. Jak epibolie pokračuje, postupující okraj blastoporu se postupně sbíhá, čímž se snižuje velikost kruhu a oblast exponovaného žloutkového bodu. Žloutkový bod se ve vegetativní části projeví tmavým zbarvením proti světlejší animální oblasti. Během této fáze se těžiště embrya posouvá a orientuje vyvíjející se embryo hřbetní stranou nahoru a malý žloutkový bod na boční stranu. Jak se okraj blastoporu postupně přibližuje (sbíhá), tak se žloutkový bod zmenšuje, až zmizí. Se zánikem žloutkového bodu je spojený vznik štěrbinovitých prvoúst s tenkou rýhou, která označuje embryonální osu, a jemné pigmentované linie nastiňují vyvíjející se embryo (Dettlaff a kol., 1993). Od období formace žloutkového bodu (konce gastrulace) do začátku neuralace je u embrya zvýšená citlivost k otřesům (Conte a kol., 1988).

2.1.8. Neuralace

Neuralace začíná, když se boční okraje blastoporu sblíží a současně žloutkový bod v této vzniklé depresi zmizí. Neurální rýha začíná jako vyvýšená pigmentovaná deska

rozšiřující se z blastoporu. Během rané neurulace je neurální deska široká a na jejím předním konci se tvoří hlavová část embrya (neurální valy kolem hlavové části). Jak vývoj pokračuje, neurální valy v hlavové oblasti jsou jasně zřetelné a tvoří prohlubeň ve tvaru „diamantu“. Neurální deska s neurálními valy se ztenčují, prostupují do oblasti trupu a objevují se základy exkrecečního systému (předledvin). Neurální valy se postupně přibližují, až se přehnou do sebe a vytvoří neurální trubici, nejprve ve střední oblasti, pak v ocasní a hlavové oblasti. Vývoj pokračuje, oblast hlavy se prodlužuje a tvoří tři váčky prvotního mozku. V této fázi jsou podél trupu vytvářeny boční somity (nediferenciované mezodermální segmenty) (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.9. Prodloužení předledvin a počáteční organogeneze

U embrya se trup postupně zužuje a předledviny se z trupu rozšiřují vpřed. Spolu s prodlužováním předledvin se vyvíjí přední hlavová oblast a základy očí. Somity jsou zřejmé po větší délce trupu. V této fázi embryo zřetelně vyčnívá nad povrch žloutkového vaku a uvolňuje základ ocasu od povrchu žloutkové hmoty. Na embryu začíná být patrný základ kulíci žlázy, hypofýzy, prodloužené míchy, dýchacích orgánů (branchiální oblouky) a 2 páry rudimentálních viscerálních oblouků (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.10. Formování srdce

Srdce se prvně vytvoří jako rovná trubice hlavé oblasti embrya. Srdeční trubice se postupně ohýbá do tvaru S, začíná bít a svaly trupu již reagují záškubem na mechanické podráždění. V této fázi se začínají tvořit 2 čichové a sluchové váčky a slabě pod kožním epitelem se objeví oči.

Podél trupu se začínají tvořit ledvinové kanálky spolu se základem močové papily. Ocas je značně proříznut nad žloutkovou oblast a je dorzoventrálně zploštělý s rudimentem ploutevního lemu (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.11. Doba před líhnutím

Těsně před líhnutím se špička ocasu přibližuje k srdci, kaudální část trupu a ocas se začínají napřimovat. Posléze se ocas embrya prodlužuje, až se dotkne hlavy a zkroutí o 90 ° tak, aby dorzoventrálně zploštělá strana ležela v jedné rovině s povrchem chorionu (Conte a kol., 1988). Střevo se jeví jako pigmentovaná trubice,

kteřá se rozprostírá od kraniálního okraje žloutkového váčku až k papile. Ploutevní lem se zvětší, rozšíří se dorzálně od trupu, kolem ocasu a ventrálně k okraji žloutkového váčku. Nosní jamky, pigmentované oči a sluchové váčky jsou jasně viditelné (Dettlaff a kol., 1993).

2.1.12. Masové líhnutí

Líhnutí nastane, jakmile larvy prolomí jikerné membrány. Účinkem enzymatické chorionázy, produkovanou epidermálními buňkami kulíci žlázy dojde k zeslabení, někdy až k protržení obalů jikry (Lugowska a Sarnowski, 2011). Následně aktivním pohybem embrya dojde k uvolnění jedince z jikry, obvykle ocasem napřed (Dettlaff a kol., 1993). Hlavní kulení nastává druhý až třetí den od zaznamenání počátečního kulení. Po masivním kulení se již „dokulují“ málo životné nekvalitní larvy (Gela a kol., 2012).

Když opustí embryo jikerné obaly, tělo trupu se narovná a špička ocasu se mírně zvedá. U líhnoucího se embrya je podél trupu vyvinutých 55 až 60 somitů (od hlavy k ocasní ploutvi). Žloutek je vejčitý a „zrnitý“. U srdce může být pozorováno čerpání červených krvinek prostřednictvím párových Cuvierových trubic do oběhové sítě na ventrálním povrchu žloutku. U vylíhlého embrya jsou výrazné nosní jamky a oči (Dettlaff a kol., 1993).

2.2. Zárodečné buňky

Ryby, stejně jako mnoho jiných živočichů, mají dvě hlavní buněčné linie, zárodečnou a somatickou linii buněk. Zárodečné a somatické linie jsou součástí prvních událostí embryonálního vývoje. Tyto dvě hlavní buněčné linie mají odlišné životní fáze. Buňky somatu tvoří tělo odpovědné za individuální život a jsou „smrtné“. Naopak zárodečné buňky jsou „nesmrtelné“, protože jsou zodpovědné za život jednotlivých druhů prostřednictvím gamet přenášející genetické informace z jedné generace na další (Ikenishi, 1988).

U mnoha organismů, včetně ryb se zárodečné buňky tvoří na počátku embryonálního vývoje. Prvotní zárodečné buňky (PGC) vznikají v embryu v místech prekursoru těchto buněk a během embryonálního vývoje migrují do oblasti genitální brázdy (oblasti budoucích gonád). V souladu s tím by se daly u PGC stanovit následující fáze: premigrační (vznik), migrační a postmigrační.

2.2.1. Diferenciace zárodečných buněk.

K oddělení zárodečné linie a somatické dochází brzy před, nebo v průběhu embryonálního vývoje. Obecně se dají rozeznat dva různé způsoby diferenciace zárodečných buněk. U organismů jako octomilka (*Drosophila*) (Santos a Lehmann, 2004), hlístic (*Caenorhabditis*) a bezocasých obojživelníků (Ikenishi, 1988), ptáků (Tsunekawa a kol., 2000) a kostnatých ryb (Olsen a kol., 1997; Yoon a kol., 1997) je zárodečná linie oddělena od somatu během počátečního rýhování pomocí specifických cytoplazmatických determinantů – zárodečné cytoplazmy. Tento model formace PGC se nazývá preformace. Studie embryí bezocasých obojživelníků vykazují jeseterům podobný embryonální vývoj a jsou prvními experimentálními důkazy o preformaci a roli zárodečné plazmy ve vajíčku při tvorbě zárodečných buněk obratlovců (Bounoure, 1939). Zárodečná plazma je prekurzorem zárodečných buněk.

U savců (Eddy 1975), ocasatých obojživelníků (Maufroid a Capuron, 1985), želv (Bachvarova a kol., 2009) jsou PGC vytvářeny od začátku (*de novo*), tj. jinými buňkami v časném vývoji embrya bez maternálního determinantu, zárodečné plazmy. U těchto organismů jsou zárodečné buňky pozorovány až v pozdním vývoji jako výsledek induktivního signálu sousední tkáně (extracelulární signály vyvolávající tvorbu PGC z pluripotentích prekurzorů). Tento vývoj zárodečných buněk se nazývá epigeneze. Například u podrobně zkoumaných myší bylo prokázáno, že jsou PGC specifikovány primitivním ektodermem, indukci z endodermálních blastomer (Sutasurja a Nieuwkoop, 1974). Následně na to Lawson a kol., 1999 popsali signály proteinu bone morphogenetic protein 4 (BMP4) vycházející z extraembryonálního ektodermu, který zajišťuje vznik PGC. Z nedávných studií vyplývá, že epigeneze, tj. tvorba PGC u myší, respektive savců je ovlivněna komplexem několika signálů různých proteinů (Johnson a kol., 2011).

2.2.2. Struktura a lokalizace zárodečné plazmy

Zárodečná plazma je ribonukleový proteinový komplex zahrnující desítky různých RNA a proteinových složek. Tyto komponenty se sestavují do cytoplazmatické architektury závislé na cytoskeletu. Struktura zárodečné plazmy u studovaných zvířat několika druhů sdílí společné charakteristiky, které je možné určit na základě pozorování pod elektronovým mikroskopem. Zárodečná plazma je bohatá na mitochondrie a strukturální komponenty obecně nazývané jako elektrodenzní granule,

tzv. nuage. Přesné složení těchto granulí není známo. Několik studií ukazuje, že obsahují, nebo jsou spojeny s proteiny účastnících se zpracování RNA a RNA, které je kódují (Anderson a Kedersha, 2006). Obecně je zárodečná plazma v oocytech organizována asymetricky. U oocytů drápatky vodní (*Xenopus leavis*) (Houston a King, 2000) a dania pruhovaného (*Danio rerio*) (Kosaka a kol., 2007) nuage společně s mitochondriemi tvoří oblast známou jako „mitochondriální oblak“. V pozorování u drápatky se zárodečná plazma skládala ze seskupení několika desítek až stovek mitochondrií a nuage, tzv. Balbianiho cytoplazma. V průběhu previtelogenéze a vitelogenéze oocytů Balbianiho cytoplazma migrovala od jádra oocytu k vegetativnímu pólu, kde se pak rozptýlila ve vegetativní cytoplazmě (Houston a King, 2000; Kloc a kol., 2001; Kloc a kol., 2002). Během a následně po oplození je zárodečná plazma vajíčka drápatky nestejně rozptýlena ve vegetativní oblasti vajíčka, kde je během rýhování buněk nerovnoměrně oddělována a specificky zabudována do několika vegetativních blastomer (Johnson a kol., 2011). Transplantací vizualizované zárodečné plazmy u drápatky do abnormální polohy hostitelského vajíčka bylo zjištěno, že PGC mohou být specifikovány a produkovány i v abnormální poloze dárcovské zárodečné plazmě (Tada a kol., 2012). To znamená, že zárodečná plazma nacházející se ve vegetativním pólu je nezbytným faktorem pro produkci funkčních PGC.

U jesetera ruského byla v previtelogenních oocytech pozorována podobná zárodečná plazma, nazvaná stejně jako u drápatky Balbianiho cytoplazma. Ta nebyla omezena na zřetelné cytoplazmatické tělísko, ale obklopovala celý zárodečný váček. U oocytů v této fázi měla Balbianiho cytoplazma sférickou strukturu s mitochondriemi, prvky endoplazmatického retikula, Golgiho komplexy a nuage granule (Zelazowska a kol., 2007). Tato charakteristika se podobá některým bezobratlým a obratlovcům, včetně drápatky a kostnatých ryb. Dále byla tato zárodečná plazma také pozorována ve vegetativním pólu jikry u jesetera sibiřského těsně po oplození (Dvořák, 2011).

Jak už bylo zmíněno, u embryí kostnatých druhů ryb, jako je například danio, probíhá meroblastické rýhování. Jikry těchto ryb jsou bohaté na žloutkově buněčnou masu a dělicí rýha nemůže proniknout do vegetativní části jikry. U dania bylo zjištěno, že se zárodečná plazma přemísťuje z vegetativní části, stejného místa jako u žab a jeseterů k dělicím brázdám do animální části embrya (blastodisku) (Raz, 2003), což bylo potvrzeno i u dalších sledovaných druhů kostnatých ryb, zlatého karase (*Carassius auratus*) (Kitauchi a kol., 2012) a medaky (*Oryzias latipes*) (Herpin a kol.,

2007), kde se zárodečná plazma hromadila kolem distálních konců štěpné brázdy ve stadiu 2–4 buněk. Theusch a kol. (2006) pozorovali migrace jednotlivých druhů RNA zárodečné plazmy. Způsob přemístění zárodečné plazmy, resp. jednotlivých RNA nebyl plně objasněn, protože jednotlivé RNA byly do animální části odváděny různými cestami.

Charakteristickým znakem zárodečné plazmy jsou zárodečné granule nuage, jejichž úloha není zatím jasná. Nuage jsou specifické pouze pro zárodečné buňky a byly pozorované ve většině fází gametogeneze ryb (PGC, oogonie, oocyty, spermatogonie) (Eddy, 1975; Wallace a Selman, 1990). Podle Touryho a kol. (1977) a Azeveda (1984) jsou nuage prostoupeny fibronukleárním materiálem a obsahují proteiny a RNA. Tito autoři se dále domnívají, že se nuage účastní na vytváření nových mitochondrií a ribozomů. Podle dalších studií představují úložiště RNA a proteinů, které mohou být důležité pro vznik, nebo diferenciaci PGC (Williamson a Lehmann, 1996; Ikenishi, 1998). U medaky v počátečních fázích embryogeneze byly nuage pozorovány ve větším množství v pozdní migraci PGC, než na začátku pozorování, z čehož vyplývá, že probíhá neo-syntéza tohoto materiálu (Hamaguchi, 1985). S opakovanou neo-syntézou nuage je spojena i změna jejich struktury, vyplývající ze ztrát některých jejich složek, které nastanou v průběhu neo-syntézy (Hamaguchi, 1993). Nejdramatičtější změny ve struktuře jsou však popsány na začátku migrace PGC, nuage se tedy mohou podílet na diferenciaci zárodečných linií.

Podle nedávných studií by měla existovat maternálně kódovaná autonomní regulace vzniku PGC. U háďátka (*Caenorhabditis elegans*) a octomilky je transkripční aktivita PGC potlačena RNA polymerázou II (*polII*) (Johnson a kol., 2011). Stejný obecný mechanismus, který inhibuje transkripci PGC je popsán u octomilky a hlístic. Nicméně molekuly odpovědné za tuto aktivitu jsou Pgc a Pie1 (Nakamura a Seydoux, 2008). Předpokládá se, že molekuly, které inhibují aktivitu, tj. polII, Pgc a Pie1 jsou součástí zárodečné plazmy, ačkoli toto bude třeba ještě prokázat. Venkatarama a kol. (2010) zjistili u drápatky, že v období tvorby zárodečných vrstev (od poloviny blastuly přes neurální fázi) je potlačena transkripční aktivita PGC, ale molekuly ovlivňující transkripční aktivitu PGC zatím nebyly popsány. Jak již bylo uvedeno výše, zárodečná plazma je nezbytná pro vznik PGC. Gen *vasa* kódující mRNA zárodečné plazmy byl prvním markérem u dania (Olsen a kol., 1997; Yoon a kol., 1997). Kosaka a kol. (2007) popisuje geny *daz*, *nanos* a *vasa* jako RNA markéry kódující zárodečnou plazmu

u dania. Bontems a kol. (2009) našli u dania gen *bucky ball* (*buc*) důležitý pro shlukování zárodečné plazmy.

U dania, zlatého karase je exprese *vasa* mRNA omezena na oblast zárodečné plazmy, což znamená, že *vasa* mRNA je součástí zárodečné plazmy (Knaut a kol., 2000; Kitauchi a kol., 2012; Knaut a kol., 2002). Oocyty dania se podobají drápatce (Johnson a kol., 2011) a *Vasa* RNA markér byl u drápatky také exprimován (Komiya a kol., 1994). U medaky (*Oryzias latepis*) byl získán homolog *vasa* genu – *olvas* (Shinomiya a kol., 2000) a markér *boule*, který patří do skupiny genů DAZ (Xu a kol., 2009). Dále byl například *nanos* gen jako markér úspěšně vyzkoušen u embryí sedmi druhů kostnatých ryb: zástupců *Clupeiformes* (sleď – *Clupeapallasii*), *Cypriniformes* (danio pruhovaného, danio perlové – *Danio albolineatus*, zlatý karas, mřenka – *Misgurnu sanguillicaudatus*), *Beloniformes* (medaka) a *Perciformes* (hlaváče – *Leucopsarion petersii*) (Saito a kol., 2006). Gen *nanos*, jako markér se udržitel napříč řadou těchto kostnatých ryb. Dále byl *vasa* gen jako markér úspěšně použit u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Yoshizaki a kol., 2005). Bylo navrženo, že molekuly potřebné pro vznik a migraci PGC jsou vysoce konzervované napříč širokým spektrem organismů (Extavour a Akam, 2003).

Johnson a kol. (2011) popisují u jesetera ostrorypého (*A. oxyrhynchus*) difúzní expresi *vasa* a *dazl* kolem cytoplazmy oocyty v různých stádiích, v porovnání s drápatkou nebo daniem nebyla exprese RNA markérů zárodečné plazmy lokalizována v omezeném prostoru cytoplazmy oocyty.

2.2.3. Migrace a vznik PGC

U ryb a dalších organismů vznikají PGC jako malá populace buněk oddělená od somatických buněk (Wylie, 1999; Raz, 2002). V rybách vznikají gamety z velkého množství zárodečných buněk, ty však pocházejí jen z několika desítek PGC (Saito a kol., 2006). Jak už bylo zmíněno, PGC vznikají v počátečním vývoji embrya v místě, které není konečným místem jejich určení. Tyto zárodečné buňky pak musí migrovat přes tkáň v určitých fázích embryonálního vývoje z místa svého vzniku směrem ke genitální brázdě nebo její předpokládané oblasti (Braat a kol., 1999), zde se namnoží a diferencují do gamet. Migrace PGC nastane velmi brzy, dávno před rozvojem pohlavní brázd. Procesy migrace PGC byly rozsáhle studovány např. u žab, ocasatých obojživelníků, octomilky, kuřat, myší a několika zástupců kostnatých ryb (Whittington

a Dixon, 1975; Nieuwkoop a Sutasurya, 1979; Santos a Lehmann, 2004; Shinomiya a kol., 2000; Shinomiya a kol., 2000; Raz, 2003; Saito a kol, 2006). Je známo, že existují dvě hlavní migrační cesty PGC. Jednou z nich je krevní oběh, který je používán u ptáků. Druhá migrační cesta je přes „střevo“, která se odehrává u všech dalších zkoumaných organizmů.

U histologického a morfologického zkoumání migrace PGC několika druhů ryb bylo zjištěno, že PGC migrují střevní stěnou, podobně jako u octomilky a myši (Braat a kol., 1999a). Dále následující studie pomocí molekulárních markerů toto potvrdily. U jeseterů byly PGC lokalizovány 6 dní po oplození konvenčním a elektronovým mikroskopem (Grandi a kol., 2007; Grandi a Chicca, 2008) a v současné době byl popsán původ PGC a jejich migrační chování (Saito a kol., 2014). U kostnatých ryb jsou PGC specifikovány v okrajové (marginální) oblasti blastodisku, v těsné blízkosti žlutkové syncytiální vrstvy, v předpokládané mezo-endodermální oblasti ve stadiu blastuly jak je tomu např. u dania pruhovaného (Braat a kol., 1999b). Během rané somitogeneze jsou tyto buňky zarovnány na obou stranách trupu, pak se shlukují poblíž žlutkového rozšíření a migrují podél hranice těla mezodermu přes střevo k oblasti budoucí gonadální brázdě, za vzniku dvou bilaterálních skupin, které nakonec zaujmou místo budoucích gonád (Raz, 2003). Podobná migrace PGC byla pozorovaná u dalších zástupců kostnatých ryb (Shinomiya a kol., 2000; Saito a kol., 2006).

U drápatky jsou PGC specifikovány ve vegetativních blastomerách, následně na to jsou PGC spolu s několika endodermálními buňkami pasivně přemístěny do centra endodermu (spodní část archanteronu), přes archenteron se nejspíše pasivně přesunují k animální části endodermu, kde se spojí s mezodermem. PGC spolu s mezodermem částečně aktivně migrují (autoři se domnívají o počátečním částečném pohybu mezodermálních buněk) přes mesenterium, až dosáhnou dorsální stěny tělní dutiny, kde jsou tyto buňky rozděleny na pravou a levou stranu (Whittington a Dixon, 1975).

U ocaatých obojživelníků PGC nemigrují přes endoderm archanteronu. PGC u těchto organismů vznikají v předpokládané boční liště mezodermu a migrují dorzálně spolu s mezo-endodermálním meziprostorem a mezenteriem, kde se pak tyto buňky rozdělují na pravou a levou stranu a tvoří genitální brázdou (Nieuwkoop a Sutasurya, 1979).

Migrace PGC závisí na buněčně autonomních a neautonomních mechanismech. Pohyby PGC můžeme rozdělit na aktivní a pasivní. Pasivní pohyby závisí hlavně na přestavbě buněk v gastrulaci (např. epibolie). Aktivní migrace se odvíjí od vlastní pohyblivosti PGC.

Brzy po vzniku, PGC u dania podstoupí přechod z kulatých nepohyblivých buněk do „polarizovaných“ migračních buněk pro aktivní pohyb (Blaser a kol., 2005). Ačkoli molekulární nebo cytoskeletální základ pro tento přechod není jasný, do přeměny PGC před jejich migrací byly zapojeny dva geny (fosfatidylinositol3-kináza (PI3K) a *dnd* gen) (Weidinger a kol., 2003). Rybí PGC pozorované v umělých kulturách si udržují svojí motilitu a buněčná motilita PGC se tak zdá být autonomním procesem (Blaser a kol., 2005; Li a kol., 2009).

PGC během své migrace k budoucí gonádě podstoupí řízenou migraci. Do migrace PGC drápatky se k orientaci směru pohybu PGC zapojují některé buňky. Adheze a migrace PGC je inhibována působením hřbetního okruží s fibronektinem, což naznačuje, že orientace fibronektinu obsahující extracelulární matrix je důležitým faktorem pro migraci PGC u tohoto druhu (Heasman a kol., 1981). Na druhé straně u dania nebyl pozorován vztah mezi PGC a endodermálními buňkami během migrace, a místo toho mnoho studií ukázalo užší propojení PGC s hlavním mezodermem (Yoon a kol., 1997; Braat a kol., 1999b; Weidinger a kol., 1999). U drápatky bylo dále navrženo, že se SDF-1/CXCR4 signalizace chemokinů podílí na řízení směru migrace PGC směrem genitální brázdě (Takeuchi a kol., 2010).

Stejně jako u drápatky se rybí PGC stěhují pomocí určitých přitahujících a naopak tlumících chemokinů, které působí na receptory molekul v PGC. Například se migrace PGC u dania řídí ligandem SDF-1a. Vazba tohoto ligandu na jeho receptor CXCR4b aktivuje signalizační kaskádu vedoucí k buněčné polarizaci PGC a směřuje migraci směrem ke zdroji atraktantu, tj. k pohlavních brázdě (Doitsidou a kol., 2002; Knaut a kol., 2003). Kromě SDF-1a a CXCR4b mohou existovat jiné chemokinní receptorové páry, které usměrňují migraci PGC, protože PGC dania migrují přes mnoho tkání produkující SDF-1, ale postupem migrace tkáněmi tvořící SDF-1 tento atraktant PGC ignorují (Kunwar a Lehmann, 2003). Migrace PGC u medaky je ovládána dvěma *sdf1* geny (SDF1a a SDF1b) vzniklými duplikací genomu. Tyto dva geny se částečně překrývají a spolupracují ve správném umístění PGC (Herpin a kol., 2007). U dania byl dále popsán mechanismus řízení migrace PGC (Thorpe a kol., 2004), ve kterém je

klíčovým faktorem hydroxymethyl-glutaryl-koenzym A reductáza (HMGCoAR). Tento gen kóduje klíčový enzym v biosyntéze cholesterolu, jehož činnost je nutná k tvorbě Geranyl-geranyl transferázy (GGT1) substrátů, GGT1 spouští zvláštní prenylace (lipidace) potřebné pro migraci PGC. Inhibice GGT1 měla za následek abnormální migraci zárodečných buněk. Bylo prokázáno, že migrace PGC zkoumaných ryb závisí na několika komponentech zárodečné plazmy a na integritě zárodečné plazmy. Například, PGC nemohly správně migrovat při vyřazení (knock downu) některých složek zárodečné plazmy jako *nanos* (Koprunner a kol., 2001) a *dnd* (Weidinger a kol., 2003). Knock down těchto složek způsobil, že PGC nebyly lokalizovány (Blaser a kol., 2005). U medaky je *vasa* gen pro migraci PGC buněčně nezávislý (Li a kol., 2009).

Identifikace více cílových genů a určení jejich role by mohla poskytnout nové výhledy k pochopení molekulárních mechanismů iniciace motility a zahájení migrace, tj. kritický krok pro normální vývoj zárodečné linie s konečnou plodností organismu, a nabízí nástroje pro manipulace s těmito kroky v inženýrství zárodečných linií.

U žab a ryb je mitotická PGC aktivita během embryogeneze nízká, PGC zůstávají během své migrace mitoticky klidné a rapidní zmnožení zárodečných buněk se spustí až v budoucích gonádách. U parmičky (*Barbus conchoni*) byla pozorována nízká mitotická aktivita PGC, průměrný počet PGC dosáhl 18. Mitotická aktivita PGC pak v púlce somitogeneze zanikla a k masivnímu rozmnožení PGC došlo až v místě budoucích gonád, téměř 3 týdny po oplození (Timmermans a Taverne, 1989). Počet PGC v určitých vývojových stádiích v rámci jednoho druhu může naznačit genetickou čistotu populace, pozorováno u drápatky (Akita a Wakahara, 1985).

2.2.4. Vlastnosti a nástroje k analýze PGC

Dříve bylo pozorování PGC odkázáno pouze na histologické nálezy vycházející z vlastností těchto buněk. PGC se liší od somatických buněk v několika morfologických charakteristikách (buňka o relativně velké velikosti s velkým jádrem, kulatého tvaru s přítomností nuage) a polohou této buňky (Braat a kol., 1999; Nagaia kol., 2001). Identifikace *vasa* genu u dania pruhovaného jako prvního markéru zárodečných buněk měl vliv na studium zárodečných buněk na molekulární úrovni (Yoon a kol., 1997). *Vasa* byl naklonován u několika dalších druhů ryb (Shinomiya a kol., 2000; Yoshizaki a kol., 2000). Použití *vasa* proteinu napříč několika druhy ryb (kmeny) ukázalo zachování sekvence, umožňující profilování exprese *vasa* proteinu přes imunozbarvení

pomocí „anti-Vasa“ protilátky u různých druhů ryb. Například anti-Vasa protilátka, která byla vyrobena pomocí rekombinace *vasa* proteinu karase stříbřitého jako antigen je používána pro imunohistochemii k detekci distribuce *vasa* proteinu v samčích a samičích zárodečných buňkách nejen u karase stříbřitého (*Carassius carassius*), ale také u několika dalších druhů ryb různé fylogenetické příbuznosti (Xu a kol., 2005).

Markéry zárodečných buněk jsou u ryb stále nově zjišťovány. Patří mezi ně *nanos*, *dnd*, *dal*, *sdf1/cxcr4*, *boule* a *buc*. Použití antisense RNA těchto genů jako sondy usnadňuje jejich jednoznačnou detekci PGC pomocí *in situ* hybridizace. *Vasa*-pozitivní buňky jsou distribuovány do různých částí embrya v určitých fázích vývoje a ne všechny *vasa*-pozitivní buňky se vyvíjí do PGC. Pro zlepšení detekce PGC je vhodné použít více genetických markerů (Li a kol., 2009). Proto byla u medaky vyvinuta duální fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tento dvoubarevný postup umožňuje současně označování PGC s nejméně dvěma genetickými markéry zárodečných buněk. Touto metodou se výrazně zlepší vizualizace a dokumentace dynamicky vyvíjející se zárodečné buňky.

Pro vizualizaci PGC u ryb se prozatím používají především: *vasa* promotor (VAS) a *nanos* promotor (NOS) spojený GFP nebo RFP. Metoda založená na mRNA reportéru GFP nebo RFP, který je syntetizován jako fúze na nepřekládané oblasti 3'(3'UTR) zárodečného genového markéru, jako je např. *nanos* (Ciruna a kol., 2002; Kopranner a kol., 2001). Lokalizace RNA se určuje podle cis-elementů v RNA. Ty jsou umístěny obvykle, ale ne výhradně, v rámci 3'UTR zprostředkující interakce mezi transpůsobilými bílkovinnými faktory a RNA. U některých ryb, jako je například danio, existuje evolučně zachovaná oblast *vasa*3'UTR cíl RNA translace do zárodečných buněk a tento *vasa*3'UTR pracuje také u drápatky (Xu a kol., 2010). Oblast *nos1*3'UTR u dania kontroluje specifickou expresi PGC u několika dalších druhů ryb, včetně medaky (Saito a kol., 2006; Ding a kol., 1993). 3'UTR ovlivňuje RNA stabilitu, funkce pro lokální koncentraci RNA, a/nebo její translaci. U dania mRNA *vasa* (Wolke a kol., 2002) a *nanos1(nos1)* (Mishima a kol., 2006) jsou selektivně degradovány v somatických buňkách, ale stabilizovány a translatovány v PGC. Tento mechanismus usnadňuje identifikaci domnělé lokalizace sekvencí RNA zárodečné plazmy a PGC (Rangan a kol., 2008). Tato technika využívá lokalizaci projevu (exprese) z injektované syntetické RNA, ale ne exprese ze stabilní transgenní linie. Tato metoda se nazývá lokální RNA exprese (LRE). Kromě rychlosti a jednoduchosti poskytuje LRE jednu

další výhodou, tj. všestrannost: značená RNA odvozená z PGC a zárodečné plazmy je použitelná i u jiných druhů ryb (Saito a kol., 2006). V důsledku toho má LRE stále vyšší využití pro označování PGC v dynamických procesech jako migrace, proliferace a přežití během embryonálního vývoje ryb (Herpin a kol., 2007; Weidinger a kol., 2002). U LRE je však rozdílná stabilita a translace injekované RNA a potřebná exprese před formováním PGC nenastane, tzn. počátek PGC specifikace nelze přesně touto metodou stanovit. Množství RNA aplikované do embrya vyžaduje zkušenosti k získání přiměřeného kontrastu pro jasné pozorování a následnou dokumentaci. Kromě toho, množství injekovaných embryí v každém experimentu je omezeno a různá embrya mohou vykazovat rozdíly v relativní (PGC versus soma) a absolutní intenzitě signálu (např. PGC signál mezi embryi). LRE byla omezena na značení PGC v počátečních fázích vývoje ryb. Promotor, který řídí nižší úroveň exprese v zárodečných buňkách (např. *nanos3* u medaky) je lepší než silnější promotor (*vasa* u medaky), pokud se pozorování PGC zaměří na počáteční fáze vývoje, nebo naopak (Xu a kol., 2010).

2.3. Reprodukční technologie využívající PGC

2.3.1. Kultivace zárodečných buněk

Pro základní studie a inženýrství zárodečných buněk skýtají kultury zárodečných buněk obrovský potenciál. Buněčná kultura PGC a vyvinutých zárodečných buněk byla zkoušena u myši, kuřat a ryb, viz níže. V průběhu života dospělého u většiny zvířat samčí zárodečné buňky u testes produkují spermie, které přenášejí genetickou informaci mezi generacemi. Na počátku spermatogeneze jsou prospermatogonie, ty pokračují v proliferaci a vyvíjejí se v nediferencované spermatogonie typu A, samčí zárodečné buňky, které mají schopnost sebeobnovy (Brinster, 2002). Vzhledem k tomu, že dospělé testes obsahuje zárodečné kmenové buňky, bylo vyvinuto úsilí k izolaci a kultivaci buněčných kultur. U myši bylo několik buněčných linií kultivováno z dospělého testes (Hofmann a kol., 1994, Guan a kol., 2006). U medaky byla kultivována buněčná linie spermatogonií z dospělých testes (Xu a kol., 2010).

Kultivace PGC je však prozatím ve fázi počátečního výzkumu. Matsuietal a kol. (1992) úspěšně kultivovali myši PGC, což vedlo k tvorbě embryonálních zárodečných buněk. Kultury PGC byly také založeny u kuřat (Van De Lavoie a kol., 2006). Fan a kol. (2008) navrhuje vhodné metody pro kultivaci PGC daniel. Laboratoř Yoshizaki

izolovala pstruži PGC a zkoumala jejich růstové reakce v krátkých časech kultivace (Xu a kol., 2010).

2.3.2. Tvorba zárodečných chimér

Pochopení a znalost vývoje zárodečných buněk poskytuje základ pro inženýrství zárodečných buněk. Jedním takovým přístupem je transplantace zárodečných buněk do hostitele.

Chiméra je jedinec, jehož tělo je tvořeno z buněk pocházejících ze dvou různých jedinců. V případě, že jsou chimérismem postiženy pohlavní buňky hovoříme o tzv. zárodečné chiméře. Zárodečnou chiméru lze vytvořit transplantací dárcovských PGC nebo spermatogonií do embrya příjemce (Braat a kol., 1999a).

U modelových druhů ryb byly značné pokusy v tvorbě zárodečných chimér. Hong a kol. (1996) uvádí chimérickou kolonizaci buněk v zárodečné linii u medaky. Ma a kol. (2001) popisují tvorbu zárodečné chiméry u dania. Úspěchy u těchto ryb vyvolaly obdobné pokusy u akvakulturních druhů. Kolonizace transplantovaných zárodečných buněk byla popsána i u několika mořských druhů ryb (Chen a kol., 2007; Chen a kol., 2004). Probíhající práce si kladou za cíl dosažení vysoké účinnosti při tvorbě zárodečných chimér, zpravidla vhodným načasováním izolace a transplantace zárodečných buněk.

V současné době je u embryí ryb vyvinuto několik transplantačních technik zárodečných linií (Okutsu a kol., 2006a).

2.3.2.1. Transplantace PGC

Jednou z metod tvorby zárodečných chimér je metoda transplantace PGC. U několika druhů ryb byla použita mikroinjekce části blastomery ve fázi blastuly, například u dania (Lin a kol., 1992), pstruha duhového (Takeuchi, a kol., 2001) a medaky (Wakamatsu a kol., 1993) nebo vytvoření tzv. sandwich chiméry, vložením spodní části blastodermu mezi oddělené části blastuly příjemce (Lina kol., 1992; Wakamatsu a kol., 1993; Yamaha a kol., 2001). U těchto metod se transplantuje část blastuly s předpokládaným výskytem PGC spolu se somatickými buňkami. Saito a kol. (2008) pak transplantovali mezi různými druhy dánia izolované PGC. Z embryí ve fázi somitů se izolují PGC. Izolované PGC se pak transplantují do hostitelského embrya (u kostnatých ryb do okrajových částí blastodisku, převážně ve fázi somitů).

2.3.2.2. Transplantace zárodečných linií

Transplantace spermatogoniálních zárodečných linií (GCT) byla původně vytvořena u kuřat (Tajima a kol., 1993) a myši (Brinster a Zimmermann, 1994). GCT byla aplikována u mnoha živočišných druhů, včetně domácích savců (Honaramooz a kol., 2002), ptáků (Kang a kol., 2008) a ryb (Kim a Broxmeyer, 1998). Vzhledem k dostupnosti pro *in vitro* fertilizaci a embryogenezi je použití GCT u ryb relativně snadné (Okutsu a kol., 2006b; Takeuchi a kol., 2009a). Transplantace rybích GCT byla poprvé popsána u pstruha duhového „naroubováním“ směsi testikulárních buněk do izogenetické nezralé gonády s nízkou účinností dárcovsky odvozené spermatogeneze (Naglera kol., 2001). Dále byla provedena úspěšná kolonizace příjemce gonády transplantovanými syngenními nebo xenogenními spermatogoniemi (Okutsu a kol., 2006a). Lacerda a kol. (2010) navrhli novou metodu pro rychlou obnovu transplantovaných zmražených a čerstvých spermatogonií, kde jsou spermatogonie injektovány do testes dospělých ryb, u kterých byla potlačena endogenní spermatogeneze busulfanem. Nedávné studie u lososovitých odhalily dva předpoklady pro integraci intraperitoneálně transplantovaných dárcovských spermatogonií. Jedním z nich je věk larev příjemce, který má vliv na účinnost kolonizace dárcovských PGC nebo spermatogonií. Druhým předpokladem je, že pouze spermatogonie typu A mají schopnost kolonizovat genitální brázdou příjemce (Takeuchi a kol., 2003; Okutsu a kol., 2006a). Proto je v zájmu objevit markéry pro spermatogonie. U pstruha se zdá být takovým markérem Notch1 (Yano a kol., 2009).

2.3.2.2. Sterilizace hostitele pro produkci zárodečných chimér

Nezbytnou podmínkou pro produkci potomstva zárodečných chimér je odstranění nebo snížení počtu endogenních PGC embrya příjemce. Zvýšený podíl heterogenních PGC v zárodečné chiméře nám neposkytne dostatečnou produkci potomstva zárodečných buněk dárcovského původu.

Strategií sterilizace hostitele je několik. Nejjednodušší metodou sterilizace recipienta je triploidizace pomocí retence druhého polového tělíska nebo hybridizace. Tyto metody jsou ovšem použitelné pouze v některých případech. Ovšem u jeseterů nebyla prozatím prokázána sterilita u triploidů ani žádných kombinací hybridů. Alternativní metodou vhodnou pro tyto ryby je dočasné vyřazení exprese genů jako je *vasa*, *nanos*, *dnd* vyskytujících se především v PGC pomocí antisense morpholino

oligonukleotidu (MO). MO dočasně modifikuje expresi určitých genů. Proces funguje na dvou úrovních, při splicingu pre-mRNA a translaci mRNA. Před splicingem se MO naváže na známou sekvenci *vasa*, *nanos*, *dnd* genu v pre-mRNA. Kódující extrony se známou sekvencí genu jsou při splicingu společně s nekódujícími introny vystřihány a dočasně se tak vyřadí činnost známých genů. Při druhém mechanismu působení se morfolino naváže na úsek mRNA a zablokuje translaci mRNA na ribozomu. Například vyřazení *dnd* ve fázi blastuly morfolinem ovlivňuje přežití a migraci PGC do gonád, což hostiteli plně otevře možnost pro kolonizaci transplantované dárcovské PGC (Kobayashi a kol., 2004). Morfolino je v současné době široce užíváno a používají se modifikace tohoto oligonukleotidu, například často používaný morfolino fosfordiamidátový oligonukleotid MPO (Sumanas a Larson, 2002). Dále byly syntetizovány a testovány některé molekuly na bázi DNA a RNA, peptidické nukleové kyseliny (PANs) (Egholm a kol., 1992) a molekuly s krátkými úseky podobným nukleovým kyselinám (Weller a kol., 1991; Huang a kol., 1991).

Další metoda null mutation, při které trvale vyřadíme známé geny zárodečné plazmy je již genová modifikace organismu a z důvodu střetů s legislativou je pro sterilizaci hosta méně vhodná. A nakonec strategie chemických látek potlačující gametogenézy v podobě koupelí a krmiv v různých vývojových stádiích nezaručují 100% účinnost a dostatečnou bezpečnost zdraví ohrožující práce.

2.3.3. Perspektivy využití zárodečných buněk

Rybí zárodečné buňky získaly rostoucí zájem ze třech důvodů. Za prvé, ryby nabízejí jedinečně snadnou embryologii pro experimentování a živé zobrazení dynamických procesů vývoje PGC. Za druhé, ryby představují velkou skupinu obratlovců s mnoha ohroženými druhy. Kultivace zárodečných buněk a transplantace poskytuje mocný nástroj pro kryokonzervace a šíření těchto druhů náhradní reprodukci. Za třetí, ryby jako obratlovci mají mnoho společných rysů se savci, včetně člověka. Je všeobecně přijímáno, že údaje ze zárodečných buněk ryb vnesou náhled do pochopení rozmnožování a neplodnosti. Například nedávné narození ryby Holly demonstruje možnost semi-klonování jako nové reprodukční techniky. Semi-klonovaná ryba Holly (Yi a kol., 2009) byla vytvořena za předpokladu, že haploidní kmenové buňky embrya jsou schopné napodobovat spermie k produkci plodného potomstva. Tato ryba pochází z mozaiky oocyty, která měla haploidní meiotické jádro oocyty a transplantované

haploidní mitotické kultury buněčných jader. Toto mitoticko-meiotické spojení podporuje normální vývoj, prokazující proveditelnost semi-klonování v reprodukční medicíně.

U ryb se experimentální analýza funkce genů ve vývoji zárodečných linií především spoléhá na knock down pozorovaného genu. Všechny geny zárodečné linie, které byly v rybách analyzovány, se zdají být nezbytnými pro tvorbu PGC. Přesné určení role těchto genů napomůže ke zlepšení metodik vizualizace původu a migrace PGC u jednotlivých druhů a knock down těchto genů poskytne účinnou metodu sterilizace hosta pro transfer PGC.

Vývoj technologie mobilních embryonálních kmenových buněk bude v budoucnosti velmi žádoucí. Vytváření stabilních kultur PGC bude představovat další budoucí směr. Izolace, kryokonzervace a transplantace zárodečných buněk z ryb v kombinaci s mezidruhovým transferem PGC dokonce i u některých fylogeneticky velmi vzdálených druhů, tj. xenogenetická transplantace, má význam udržitelné akvakultury a zachování biologie. Tyto nabízené možnosti mohou vést k posílení stavů ohrožených druhů a zefektivnit produkci komerčně chovaných ryb. Například mezidruhový přesun PGC může napomoci ke zkrácení generačního intervalu u některých dlouho dospívajících druhů ryb tím, že transplantujeme zárodečné buňky dlouho dozrávajících ryb (například jeseteři) do embryí rychleji dospívajících druhů. Transplantované buňky by se pak teoreticky při jejich zrání řídily hormonální úrovní hosta. Touto myšlenkou se zabývá např. Tokijská univerzita Marine Science and Technology, kde uvádějí dva druhy čeledi makrelovitých, tuňáka obecného (*Thunnus thynnus*) dospívajícího v 7–8 letech při 300 kg v roli donora PGC a makrelu obecnou (*Scomber scombrus*) v roli hosta dospívající v půlce roku života při 0,3 kg. Pokud by se transplantovaná PGC ujala, tak zde máme předpoklad až 16 násobného zkrácení generačního intervalu (Yoshizaki, 2010).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Příprava GFP *nos1* 3'UTR mRNA

3.1.1. Transformace plazmidové DNA pomocí bakterií

DNA plazmidy nesoucí GFP *nosI* 3'UTR mRNA, připravené v Japonsku (Faculty of Fisheries Sciences, univerzita Hokkaido, Hakodate), byly dodány na tvrdém papíře s označením místa jejich lokalizace (jednotlivá kolečka) a uchovány při 4 °C až do použití. Kolečko s plazmidem (obsahující nejméně 10 µg DNA) bylo vystřiženo, rozpuštěno v 50 µl 10 mM Tris-HCL) a uchováno na ledu. Poté byla DNA namnožena za pomoci bakterií *E. coli* (Topota Cloning Kit; Life Technologies, s. r. o; Česká republika). Do zkumavky s bakteriemi *E. coli* (50 µl) bylo přeneseno 4 µl roztoku plazmidu. Vzniklý ligační roztok (dispreze plazmidu a bakterií) byl 30 min. inkubován na ledě. Pro inzerci DNA (plazmidu) do plazmidu bakterií byla zkumavka s ligačním roztokem zahřata (heatshock) na 30 s, ponořením do horké lázně s vodou o teplotě 42 °C a následně zchlazena po dobu 2 min. na ledě. V posledním kroku bylo přidáno 950 µl S. O. C. média (médium se používá k získání maximální účinnosti transformace *E. coli* (Life Technologies, Česká republika) vytemperovaného na pokojovou teplotu. Takto připravená suspenze byla inkubována na termobloku po dobu 45 min. při 37 °C s intenzitou míchání 150 rpm. V průběhu inkubace byly připraveny Ampicilonové agarové plotny na Petriho misky pro růst bakterií dle firemního protokolu (Invitrogen, katalog. č. Q602-20) a po ztuhnutí byly plotny zahřáty v inkubátoru na 37 °C. Výhodou použití imMedia™ Growth Media je modro/bílá selekce bakterií (blue/white colors creening), což je způsob, kterým lze orientačně rozlišit kolonie bakterií obsahující plazmid s vloženou cizí DNA od kolonií, které obsahují pouze intaktní plazmid bez vložené cizí DNA.

Po inkubaci byla suspenze bakterií rozprostřena sterilní skleněnou tyčkou po celé ploše agarových ploten (cca 100 µl suspenze bakterií na 1 Petriho misku). Pro zamezení kontaminace s vnějším prostředím bylo pracováno po celou dobu za sterilních podmínek (rukavice, sterilní laboratorní materiál, flow-box). Takto připravené Petriho misky byly pro nárůst kolonií bakterií vloženy do inkubátoru na 10–14 hod. při 37 °C. Následující den byly vypíchnuty (dotknutím špičky) pouze bílé kolonie do 10 µl PCR H₂O a uchovány při -20 °C pro následné použití, viz níže).

3.1.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tento krok je nezbytný pro rychlé zmnožení požadovaného úseku DNA a pro ověření, zda dané „vypíchnuté bílé kolonie“ obsahují ve svém plazmidu námi vloženou DNA.

Prvním krokem byla příprava 10 μl PCR mixu o složení: 5 μl PPP Master Mixu (Top-Bio, ČR); 0,4 μl primeru 1F se 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ CTGACCCTGAAGTTCATCTG; 0,4 μl primeru 2R se 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ GGCGETTATGTTTGTCAAACCTG; a 4,2 μl templátu (DNA vypíchnutá z 1 kolonie bakterií a rozpuštěná v PCR H_2O). PCR proběhla za následujících podmínek: 94 °C po dobu 3 min., následovalo 30 cyklů (94 °C – 20 s, 55 °C – 20 s, 72 °C – 1 min.), 72 °C – 5 min., s uchováním vzniklého produktu při 4 °C. Následně na to bylo nanášeno 10 μl vzniklých PCR produktů na 1% agarosový gel (připravený v TE (Tris/EDTA) pufru) a elektroforeticky rozděleno po dobu 25 min., při napětí 100 V. Jako kontrola byl použit DNA standart o délce 200–1500 bp (Top-Bio, ČR). Správné DNA bandy pro další použití měly velikost 1kb.

3.1.3. Amplifikace vybraných bakteriálních kolonií s plazmidem DNA

Na základě předchozích kroků byly z Petriho misek vypíchnuty kolonie se správným inzertem sterilní špičkou do 2 ml zkumavky a bylo přidáno 1,5 ml LB media (Luria Bertani Broth medium, médium pro růst bakterií připravené z tablet Sigma-Aldrich, USA). Takto nachystaná startovací kultura byla inkubována 8 hod. při teplotě 37 °C za intenzivního třepání (300 rpm). Po inkubaci byla startovací kultura opětovně zředěna LB médiem (500-1000 \times), přelitím startovací kultury do 250–300 ml LB media. Takto nachystaná kultura byla inkubována při 37 °C po dobu 12 až 16 hod. při třepání (300 rpm). Kultura by podle protokolu měla dosáhnout buněčné hustoty přibližně 3-4 $\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$, která obvykle odpovídá vzniklé peletce o hmotnosti přibližně 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ media. Namnožené bakteriální buňky byly centrifugovány při 6000 xg po dobu 15 min. při teplotě 4 °C a pročištěny pomocí kitu QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Německo) dle firemního protokolu (Qiagen, 2005).

3.1.4. Enzymatická digesce, purifikace (pročištění) amplifikovaných DNA plazmidů a jejich transkripce na RNA

Pro narýhování plazmidu a získání požadované sekvence DNA z plazmidu byla použita restriční endonukleáza XbaI (Sigma-Aldrich), která štěpí DNA v místě rozpoznání 5'-TCTAGA-3' pro generování fragmentů DNA s 5'-kohezními termini. Bylo postupováno dle firemního protokolu (Invitrogen, katalog. č. 15226-012).

Správnost nasednutí restriční endonukleázy a nastříhnutí jedné části kruhového plazmidu na jeho linearizaci byla ověřena elektroforeticky, kdy měl být obdržen produkt (band) o velikosti 4 kb. Naproti tomu u plazmidů, kde XbaI nenedla správně, byly obdrženy 3 bandy menších velikostí. Vzorky byly rozděleny pomocí 0,8% agarosového gelu v TE pufru při napětí 100 V, za dobu 30–45 min. Následovalo pročištění DNA pomocí PCI (phenol/chloroform/isoamyl-alkohol v poměru 25:24:1 pro odstranění kontaminujících proteinů, které byly následně vysráženy 100% etanolem. Po vysrážení etanolem byl DNA plazmid ve formě peletky, které pak byly dočištěny od zbývajících solí a malých organických molekul promytím 70% etanolem. Po pročištění byla koncentrace plazmidu naředěna na $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pomocí TE pufru. Posledním krokem byla transkripce linearizovaného plazmidu DNA na mRNA pomocí kitu mMACHINE mMACHINE Kit (Ambion, USA). Výsledkem bylo obdržení GFP *nos1* 3'UTR mRNA. Pro injekci byla syntetizovaná mRNA naředěna na $300 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pomocí 0,2 MKCL a uchována při -80°C pro následné použití.

3.2. Získání a příprava embryí k mikroinjekci

V této studii jsme použili embrya od páru jesetera malého z FROV JU. Spermiace ryb byla vyvolána intramuskulární injekcí homogenizovaného extraktu kapří hypofýzy (CPE) v dávce $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Spermata byla odebrána 48 hod. po hormonální injekci přepuštěním spermatu pomocí kanyly z urogenitální papily do samostatné nádoby pro buněčné kultury. Ovulace jiker byla vyvolána CPE ve dvou dávkách: nejprve $0,5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti a po 12 hod. od první injekce v dávce $4,5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Jikry byly ovulovány 18–20 hod. po druhé injekci a následně oplozeny předem aktivovaným spermatem vodou z líhně o teplotě 15°C (1 kg jiker: 25 ml > 90% motilního spermatu: 4 litry).

Lepivost oplozených jiker byla odstraněna opakovaným ponořováním jiker do 0,04% roztoku taninu (kyselina tříslová) (Sigma-Aldrich) na dobu 30 s, 20 s a nakonec 10 s s propíráním jiker vodou z líhně mezi jednotlivými ponořovacími koupelemi. Po odlepkování jiker byla pro usnadnění injekce sondy GFP *nos1* 3'UTR mRNA pomocí pinzet odstraněna vnější vrstva chorionu, L2 a L3 vrstvy. Embrya připravená k injekci se inkubovala v dechlorované vodovodní vodě obsahující 0,01 % penicilinu a 0,01 % streptomycinu při 15°C v Petriho miskách, až do vylíhnutí. V 100 ml této vody bylo

maximálně inkubováno 20 embryí a voda byla každých 24 hod. obměněna. Kontrolní skupina embryí byla inkubována za stejných podmínek bez dechorionace.

3.3. Mikroinjekce GFP *nos1* 3'UTR mRNA

Pro zjištění původu a sledování migrace PGC byla uměle syntetizovaná GFP *nos1* 3'UTR mRNA pod stereomikroskopem s kamerou (DFC425C camera, Leica, Germany) pomocí mikromanipulátoru s mikroinjektorem a skleněné kapiláry injektována do cytoplazmy animálního nebo vegetativního pólu oplozené jikry, resp. embrya ve stádiu 2–8 buněk po dechorionaci.

3.4. Pozorování původu a migrace PGC

Označená embrya byla v průběhu jejich vývoje (od stádia 2–8 buněk do období kulení) pozorována a fotografována ve světelném poli a fluorescenční snímky byly získány přes filtry pro GFP pomocí stereomikroskopu M165FC a digitální barevné kamery (Leica, Německo). Během pozorování byla hodnocena intenzita GFP fluorescence (somatické buňky – malá intenzita fluorescence, versus domnělé a migrující PGC – silnější intenzita fluorescence). Dále byly v průběhu pozorování zpracovány údaje o účinnosti vizualizace a počtu PGC v embryu, viz Tab 1.

Kontrolní skupina embryí byla pouze vizuálně kontrolována až do konce pozorování označených embryí a údaje o změnách byly zaznamenány stejným způsobem jako u pokusné skupiny.

3.5. Izolace

Poté co se PGC objevily, kolem zadní okrajové oblasti embryonálního těla v pozdní neurální fázi, byl embryonální fragment obsahující PGC chirurgicky oddělen pomocí pinzet. Oddělený fragment byl pro získání jednotlivých PGC ponořen do Ringerova roztoku (111,2 mMNaCl; 3,4 mMKCl; 2,7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 23,7 mMNaHCO₃; pH 7,4) s 0,5 % kyseliny citronové, 0,1 % trypsinu, 0,1 % kolagenázy. K inhibici enzymatické reakce a k zamezení shlukování buněk byly izolované PGC umístěny na skleněné misky naplněné Ringerovým roztokem s 3% BSA.

4. VÝSLEDKY

U embryí jesetera, kde byla mRNA injektována do animálního pólu, nebyly PGC v zárodečném těle pozorovány a somatické buňky byly značeny pouze slabou expresí GFP (Obr. 1 A, Tab. 1).

Na druhé straně u embryí jeseterů injektovaných do vegetativního pólu byly PGC pozorovány. PGC se projevovaly silnější a častější GFP fluorescencí než okolní buňky (Obr. 1 B–F, Tab. 1). U těchto embryí byla pozorována slabá GFP exprese zejména ve ventrální žloutkové oblasti (Obr. 1 F, šipky), zatímco PGC byly z počátku pozorovány v blízkosti ocasního hrbolu na endodermu bohatým na žloutek ve stádiu po uzavření neurální trubice (Obr. 1 B–C). Tyto buňky se následně oddělily od oblasti žloutku se slabou expresí GFP a migrovaly do těla embrya. V tomto stádiu byly PGC distribuovány ve tvaru půlměsíce kolem vyvíjejícího se ocasního hrbolu (Obr. 1 C). PGC se nadále pohybovaly spíše axiálním směrem a následně byly rozděleny do dvou populací, do levé a pravé strany zárodečného těla, v průběhu vývoje (rozšíření) žloutku během somitogeneze (Obr. 1 C–E).

V průběhu této migrace časosběrné snímání ukázalo aktivní migraci PGC prostřednictvím vznikajících buněčných výstupků. Ve stadiu 30 PGC migrovaly dorsálně a většina z nich se usadila na obou stranách vyvíjejícího se žloutkového rozšíření (Obr. 1 E). Do stadia 32 se tyto buňky vyrovnaly podél hranice mezi tělem a embryonálním žloutkovým rozšířením (Obr. 2 F). V tomto stadiu PGC vykazovaly méně aktivní migrační chování, což naznačuje, že jsou PGC přesunuty pasivně obklopujícími somatickými buňkami. Následně na to byly PGC axiálně přesunuty přes trávicí trubici a hřbetní mezenchym ke hřbetní části tělní dutiny. V průměru bylo v každém embryu nalezeno 23,5 PGC (Tab. 1). Na konci migrace PGC vytvořily dvě linie genitální brázdy, a proto jsme dospěli k závěru, že vizualizované buňky jsou skutečně PGC.

Na základě výsledků z časosběrného snímání pod fluorescenčním stereomikroskopem, předchozí studie (Dvořák, 2011) a nedávné studie (Saito a kol., 2014) bylo vysvětleno schéma vývoje PGC během embryogeneze jesetera (Obr. 2).

Tabulka 1. Účinnost vizualizace PGC u jesetera 4 dny po oplození po mikroinjekci GFP *nos1* 3'UTR mRNA v 1–4 buněčném stadiu embrya.

	Počet embryí	Počet normálně vyvíjejících se embryí (%)	Počet embryí s označenými PGC (%)	Počet PGC v embryu (aritmetický průměr) (\pm SD)	Rozsah počtu PGC
AP *	44	33 (75,0)	0 (0,0)	0,0 (\pm 0,0)	0–0
VP *	47	35 (74,5)	33 (94,3)	23,5 (\pm 17.1)	0–59
Kontrola	42	39 (92,9)	-	-	-

* AP, animální pól; VP, vegetativní pól.

Stadium 32

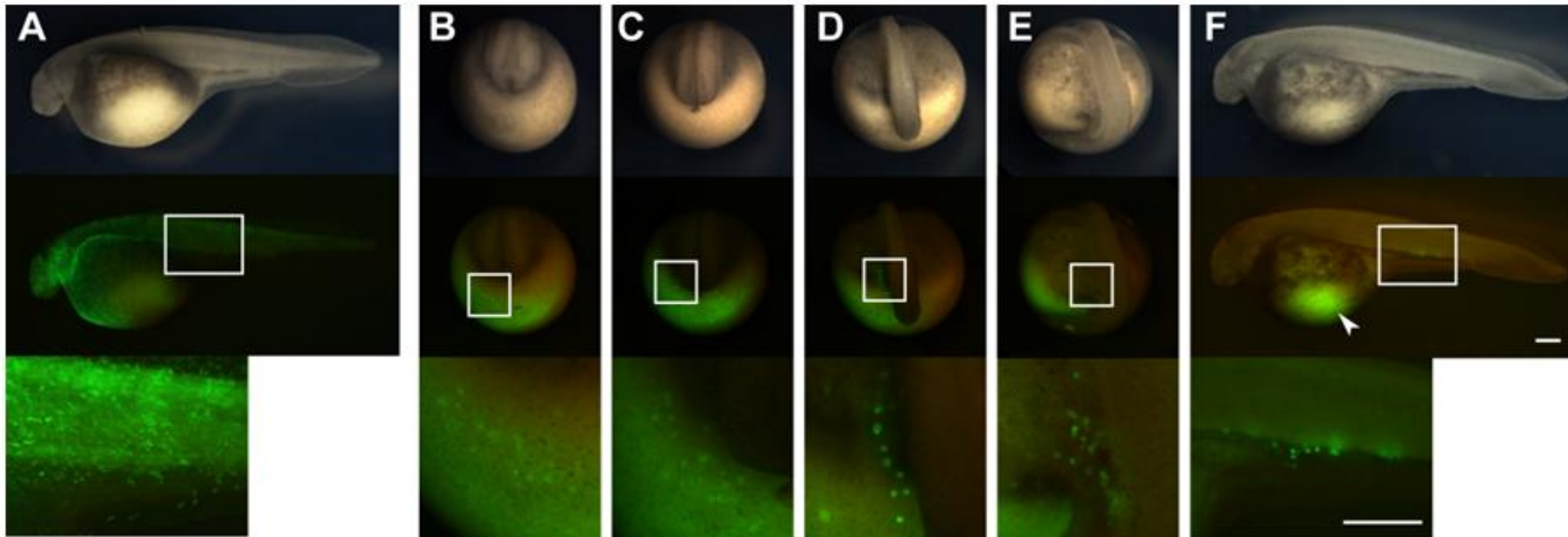
Stadium 24

Stadium 26

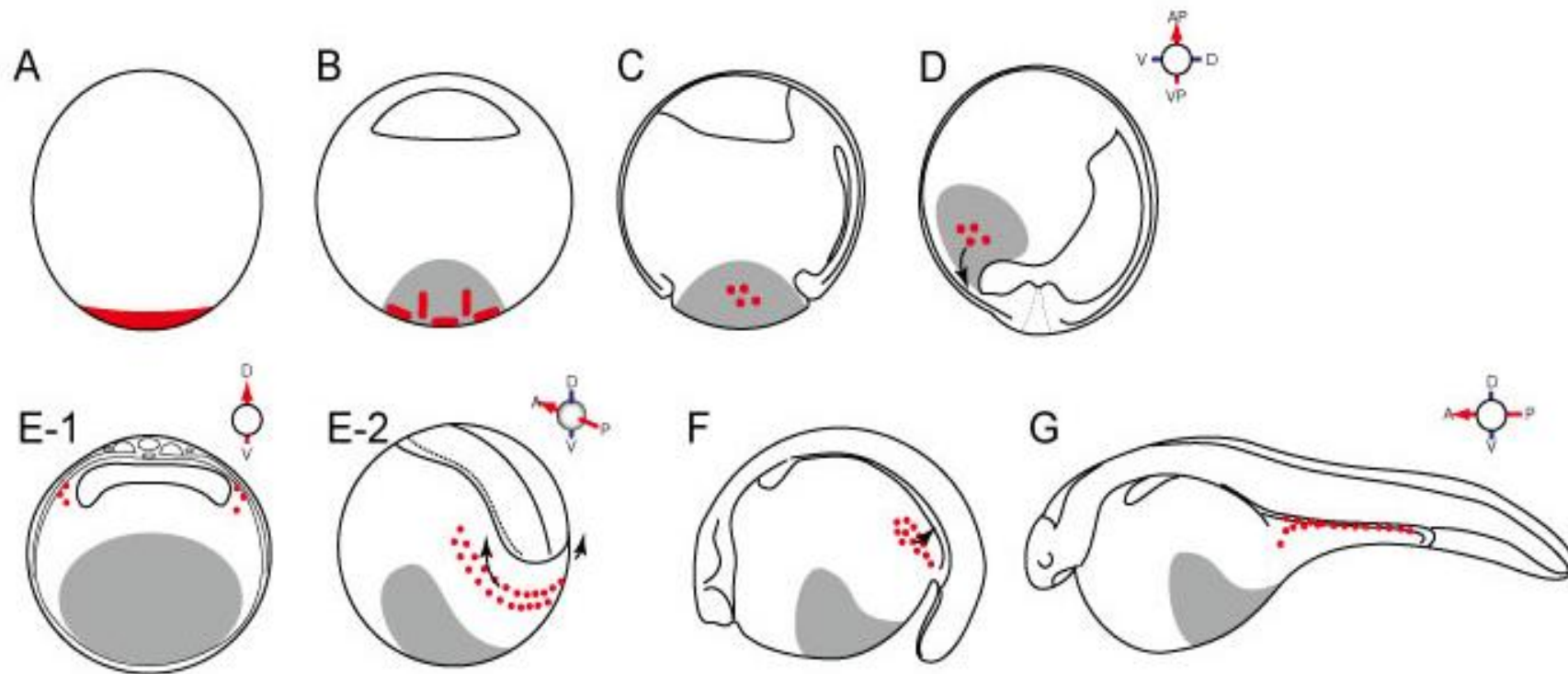
Stadium 28

Stadium 30

Stadium 32



Obrázek 1. Označené embryo injekcí GFP *nos1* 3'UTR mRNA do animálního pólu (A) a do vegetativního pólu (B–F). (A) Animální pól označeného embrya ve stadiu 32. (B) Vegetativní pól označeného embrya ve stadiu 24. V tomto stádiu byly PGC v počátku nalezeny v okrajových částech zadní oblasti vyvíjejícího se embrya. (C) Embryo ve stadiu 26. PGC migrovaly dorzálně, v průběhu tvorby ocasního hrbolku. Do konce tohoto stadia byly označené PGC distribuovány ve tvaru půlměsíce, který obklopoval vyvíjející se ocasní hrbolek. (D) Embryo ve stadiu 28. PGC byly rozděleny do dvou populací, levou a pravou stranu embryonálního těla. V tomto stádiu byla fluorescence PGC silnější než v průběhu stadia 24 a 26. Většina PGC byla stále lokalizována na žloutkové kouli. (E) Embryo ve stadiu 30. Většina PGC byla lokalizována na žloutkovém rozšíření, ale některé PGC byly ještě stále situovány na žloutkové kouli. (F) Embryo ve stadiu 32. PGC jsou lokalizovány v místě budoucích gonád. Některé z těchto buněk migrovaly axiálním směrem. PGC migrovaly na dlouhou vzdálenost z místa jejich původní polohy (šipka). Horní sloupec zobrazuje světlé pole, prostřední sloupec je fluorescenční zobrazení a dolní sloupec je zvětšené pole fluorescenčního zobrazení z prostředního sloupce. B–E jsou zadní zobrazení. E a F jsou boční pohledy. Bílý pruh stupnice představuje 500 μm .



Obrázek 2. Schematické znázornění vývoje PGC u jeseterů během embryonálního vývoje. (A) 1. buněčné stádium. (B) Stádium počátečního rýhování: podélný řez animálně-vegetativní osou. (C) Stádium gastruly: podélný řez animálně-vegetativní osou. (D) Stádium neuralace: podélný řez animálně-vegetativní osou. (E-1) Stádium uzavření neurální trubice: transverzální řez embryem. (E-2) Stádium uzavření neurální trubice: zadní boční pohled. (F) Embryo 4 dny po oplození: boční pohled. (G) Embryo 5 dní po oplození: boční pohled. Oblast šedé barvy je místem injekce fluorescentu. Červená oblast (A) ukazuje embryonální oblast, kde byla zárodečná plazma pozorována pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) (Dvořák, 2011). Červená oblast (B) je výskyt zárodečné plazmy v počátečním rýhování (Saito a kol., 2014). Červené tečky (C) a (D) jsou předpokládané PGC. PGC jako jednotlivé buňky bylo v těchto fázích obtížné pozorovat, protože PGC zůstávaly ve skupině s GFP pozitivními vegetativními buňkami. Červené tečky (E–G) jsou migrující PGC. Ve stadiu (E) jsou PGC na žlutkových buňkách podél zadní části zárodečného těla seskupeny ve tvaru půlměsíce. Kolem stádia (E) až (F) vykazují PGC aktivní pohyby s buněčnými výběžky. (G) Většina PGC byla transformována do kruhového tvaru a následně byly pasivně přesunuty směrem ke gonadální brázdě přes mezenchym.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

U kostnatých ryb je známá účinná vizualizace PGC injekcí GFP *nos3* 3'UTR mRNA, resp. GFP *nos1* 3'UTR mRNA do oblasti animálního pólu (Saito a kol., 2006). U těchto embryí, injektovaných ve stádiu 2–8 buněk, byla pozorována GFP exprese ve stádiu blastuly a to pouze jen na injektované animální části, což ukazuje, že injektovaná mRNA se sama o sobě nemohla šířit díky své vysoké molekulové hmotnosti (asi 44,000). U označených embryí jesetera, kde byla mRNA injektována do animálního pólu, nebyly PGC pozorovány a somatické buňky v zárodečném těle byly značeny pouze slabou expresí GFP.

Na základě histologických údajů byla zárodečná plazma lokalizována u jesetera sibiřského 30 s po oplození pomocí TEM ve vegetativním pólu (Dvořák, 2011), což potvrzuje důkazy o preformaci. V této studii bylo toto potvrzeno úspěšnou vizualizací PGC injekcí GFP *nos1* 3'UTR mRNA do vegetativní části jeseteřího embrya. Saito a kol. (2014) popisují přechod zárodečné plazmy do jednotlivých blastomer u jesetera pomocí GFP-*zfbuc* mRNA, dále potvrzují tvorbu PGC ve vegetativním pólu pomocí FITC a úspěšnou xenogeneticou transplantací jeseteří PGC do zlatého karase naznačují, že jsou migrační vzory široce konzervovány i mezi vzdálenými druhy ryb.

Lokalizace ortologního genu *nanos* v zárodečných buňkách byla potvrzena téměř u všech studovaných taxonů (Extavour a Akam, 2003; Ewen-Campen a kol., 2010). Již dříve bylo prokázáno, že se 3'UTR *nanos3* podrobí rozkladu v somatických buňkách, a naopak je stabilizován v PGC interakcí s mikro RNA (miR-430), Dnd a Dazl (Mishima a kol., 2006; Giraldez, 2006; Mishima, 2012). Výsledky této studie naznačují, že mechanismus podmíněné regulace *nanos1* mRNA by měl být zachován u jeseterů stejně jako kostnatých ryb (Saito a kol., 2006, 2011). Nicméně byla také pozorována poměrně vysoká GFP exprese v somatických buňkách. Podobný účinek zaznamenali Saito a kol. (2006), kdy byl GFP *nos3* 3'UTR mRNA dania injektován do jiker fylogeneticky vzdálených druhů a dále zjistili, že pozadí exprese GFP v somatických buňkách byla silnější, než když se RNA injektovala do jiker dania a dalších příbuzných druhů. *Nos1* 3'UTR dania zprostředkovaný miR-430 ukázal poměrně slabou funkci v jeseteřích embryích, pravděpodobně pro velkou fylogenetickou vzdálenost těchto dvou druhů. Také je možné, že ostrůvky zárodečné plazmy, které nejsou použity pro tvorbu PGC, můžou chránit injektovaný *nos1* 3'UTR

před degradací. Bez ohledu na vysvětlení poněkud vysoké exprese v somatických buňkách je třeba poznamenat, že se tato exprese snížila v průběhu embryonálního vývoje a v PGC se tato exprese zvýšila. Proto bylo navrženo, že je funkce *nos1 3'UTR* mRNA zachována u všech druhů ryb.

Pro mikroinjekaci fluorescentu do jikry je u mnohých druhů ryb nutné ztenčit obaly chorionu. U jeseterů byla na základě dřívějšího pozorování pod TEM navržena metoda ztenčení obalu, oddělením L3 a L2 vrstvy od vzniklého vymezeného prostoru pomocí pinzet (Dvořák, 2011). Tento návrh byl při této studii úspěšně praktikován.

Pomocí této studie jsme dále zjistili původ a migrační vzor PGC u jeseterů (Obr. 2). Migrační trasy PGC jeseterů z místa jejich vzniku do gonadální brázdy se liší od žab, i když tyto buňky byly specifikovány podobně jako u žab. U drápatky jsou PGC specifikovány ve vegetativním pólu a migrují směrem ke gonadální brázdě uvnitř endodermu a následně mezo-endoremu (Whittington a Dixon, 1975). Jeseteří PGC migrovaly po etapě 22 na žloutkovou kouli, dále pak na žloutkovou rozšířeninu a nakonec PGC domigrovaly směrem ke gonadální brázdě přes mezenchym. Tento migrační vzor se podobá mnohým druhům kostnatých ryb, u kterých PGC migrují na žloutkové kouli kolem okraje boční lišty mezodermu k zadní části embrya (k žloutkovému rozšíření) a následně na to osidlují genitální brázdou (Saito a kol., 2006).

Ze studií popisující migrační trasy PGC lze rozpoznat druhově specifické rozdíly v původu a migračních drahách PGC, zatím se však nenašel vztah mezi migračními vzory PGC a fylogenetickou vzdáleností mezi druhy. K objasnění obecných zásad původu a migrace PGC je důležité popsat každý druh zvlášť.

Dále se po objevení PGC, v pozdní neurální fázi, úspěšně podařilo izolovat a zpracovat PGC pro další možné využití (transplantace, kultivace a kryokonzervace). Transplantace PGC může u jeseterů výrazně zkrátit generační interval, např. by mohl být při transplantaci PGC z vyzy velké, která dospívá v 18 letech, do sterilního embrya jesetera malého dospívajícího už v 5 letech, generační interval až 3× zkrácen. Dále by mohla transplantace v případě kryokonzervace umožnit obnovení dárcovského genotypu. Kryokonzervace PGC u jeseterů hraje významnou roli pro uchování genotypu s maternální mtDNA těchto ohrožených druhů. V současné době je metodika kryokonzervace PGC velmi dobře zpracována u kostnatých druhů ryb, ale poznatky z kryokonzervace PGC jeseterů zatím nejsou a započítání kultivace jeseteřích PGC je otázkou budoucnosti.

6. LITERATURA

- Akita, Y., Wakahara, M., 1985. Cytological analyses of factors which determine the number of primordial germ cells (PGCs) in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90: 251–265.
- Albert, M., Peters, A. H., 2009. Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr. Opin. Genet.* 19: 113–121.
- Anderson, P., Kedersha, N., 2006. RNA granules. *Journal of Cell Biology.* 172: 803–808.
- Azevedo, C., 1984. Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuage) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Cell Tissue Res.* 238: 121–128.
- Bachvarova, R. F., Crother, B. I., Manova, K., a kol., 2009b. Expression of Dazl and Vasa in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evolution & Development.* 11: 525–534.
- Ballard, W. W., 1986a. Morphogenetic movements and a provisional fate map of development in the holostean fish, *Amia calva*. *J. Exp. Zool.* 238: 355–372.
- Ballard, W. W., 1986b. Stages and rates of normal development in the holostean fish, *Amia calva*. *J. Exp. Zool.* 238: 337–354.
- Ballard, W. W., Ginsburg, A. S., 1980. Morphogenetic movements in acipenserid embryos. *J. Exp. Zool.* 213: 69–103.
- Beer, K. E., 1981. Embryonic and larval development of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Nepublikovaná diplomová práce, Univ Calif, Davis, CA. 93 s.
- Blaser, H., Eisenbeiss, S., Neumann, M., a kol., 2005. Transition from nonmotile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J. Cell Sci.* 118: 4027–4038.
- Bolker, J. A., 1993a. Gastrulation and mesoderm morphogenesis in the white sturgeon. *J. Exp. Zool.* 266: 116–131.
- Bolker, J. A., 1993b. The mechanism of gastrulation in the white sturgeon. *J. Exp. Zool.* 266: 132–145.
- Bolker, J. A., 2004. Embryology. In: *Sturgeons and paddlefish of North America*. LeBreton, G., Beamish, F., McKinley, R. S., eds. Kluwer Academic Publishers. 134–146 s.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., a kol., 2009. Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.* 19: 414–422.
- Braat, A. K., Speksnijder, J. E., Zivkovic, D., 1999a. Germ line development in fishes. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 745–760.

- Braat, A., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H., Zivkovic, D., 1999b. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* 216: 153–167.
- Brinster, R. L., 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science.* 296: 2174–2176.
- Brinster, R. L., Zimmermann, J. W., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 11298–11302.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H a kol., 2002. Production of maternal zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 14919–14924.
- Conte, F. S., Droshov, S. T., Lutes, P. B., Strange, D., Strange, E. M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon. *Div. Of Agricul. and Natural Resources University of California, USA.* 1-103.
- Cooper, M. S., Virta, V. C., 2007. Evolution of gastrulation in the ray-finned (actinopterygian) fishes. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 308: 591–608.
- Dan, J. C., 1967. Acrosome reaction and lysins. In: Metz, C. B., Monroy, A. (eds). Fertilization.1. svazek. Academic Press. New York. 237–293 s.
- Dan, J. C., 1970. Morphogenetic aspects of acrosome formativ and reaction. *Adv. Morphog.* 8: 1–39.
- Detlaff, T. A., 1962. Cortical changes in Acipenserids eggs during fertilization and artificial activation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10: 1–26.
- Detlaff, T. A., Ginsburg, A.S., 1954. The Embryonic Development of Acipenserid Fishes (Stellate Russian and Giant Sturgeon) with to the Problems of their Breeding *Izdatel'stvo Akad. Nauk. SSSR, Moscow* (in Russian).
- Detlaff, T. A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O. I., 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Berlin, Heidelberg.
- DiLauro, M. N., Kaboord, W., Walsh, R. A., 1998. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). *Can. J. Zool.* 76: 1822–1836.
- Ding, D., Parkhurst, S. M., Halsell, S. R. a kol., 1993. Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3773–3781.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., a kol., 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell.* 111: 647–659.
- Dvořák, M., 2011. Lokalizace Balbianiho cytoplazmy jako prekurzora primordiálních gonocytů u jiker jesetera během oplození. Bakalářská práce. JU České Budějovice. Fakulta FROV.

- Eddy, E. M., 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *International Review of Cytology*. 43: 229–280.
- Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P., Burg, R., 1992. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895–1897.
- Elinson, R. P., 2009. Nutritional endoderm: a way to breach the holoblastic-meroblastic barrier in tetrapods. *J. Exp. Zool.* 312B: 526–532.
- Ewen-Campen, B., Schwager, E. E., Extavour, C. G. M., 2009. The molecular machinery of germ line specification. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 3–18.
- Extavour, C. G., Akam, M., 2003. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*. 130: 5869–5884.
- Fan, L., Moon, J., Wong, T. T., a kol., 2008. Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa: RFP transgenic embryos. *Stem. Cells. Dev.* 17: 585–59.
- Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 126.
- Ginsburg, A. S., 1961. The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 9: 173–190.
- Ginsburg, A. S., 1987. Egg cortical reaction during fertilization and its role in block to polyspermy. *Sov. Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol.* 1: 307–375.
- Ginsburg, A. S., Dettlaff, T. A., 1991. The russian sturgeon *Acipenser guldensadti*. Part1. Gametes and early development up to time of hatching. In: *Animal species for developmental studies*. Dettlaff, T. A., Vassetzky, S. G. (eds). Volume 2, Vertebrates. Springer. 16–65 s.
- Giraldez, A. J., 2006. Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science*. 312: 75–79.
- Grande, L., Bemis, W. E., 1991. Osteology and Phylogenetic Relationships of Fossil and Recent Paddlefishes (*Polyodontidae*) with Comments on the Interrelationships of *Acipenseriformes*. *Journal of Vertebrate Paleontology* 11: 1–121.
- Grandi, G., Giovannini, S., Chicca, M., 2007. Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization. *J. Appl. Ichthyol.* 23: 3–8.
- Grandi, G., Chicca, M., 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, Chondrostei). *J. Morphol.* 269: 1238–1262.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., a kol., 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 440: 1199–1203.

- Hamaguchi, S., 1993. Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish (*Oryzias latipes*) treated with puromycin or actinomycin. *Repris. Nutr. Dev.* 33: 137–141.
- Hamaguchi, S., 1985. Changes in the morphology of the germinal dense bodies primordial germ cells of the teleost (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.* 240: 669–673.
- Heasman, J., Hynes, R. O., Swan, A. P., Thomas, V., Wylie, C. C., 1981. Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell.* 27: 437–447.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., a kol., 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* 7: 3.
- Hofmann, M. C., Hess, R. A., Goldberg, E., a kol., 1994. Immortalized germ cells undergo meiosis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 5533–5537.
- Hochleithner, M., Gesner, J., 2001. The Sturgeons and Paddlefishes of the World; Biology and Aquaculture. Aqua Tech. ISBN 3-9500968-0-9.
- Hong, Y., Winkler, C., Scharl, M., 1996. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* 60: 33–44.
- Honaramooz, A., Megee, S. O., Dobrinski, I., 2002. Germ cell transplantation in pigs. *Biol. Reprod.* 66: 21–28.
- Houston, D. W., King, M. L., 2000. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 50: 155–181.
- Huang, S., Nelson, J., Weller, D., 1991. Acyclic nucleic acid analogs: synthesis and oligomerization of gamma,4diamino-2-oxo-1(2H)-pyrimidinepentanoic acid and sigma,4-diamino-2-oxo-1(2H) pyrimidinehexanoic acid. *J. Org. Chem.* 56: 6007–6018.
- Chen, S. L., Ren, G. C., Sha, Z. X., a kol., 2004. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. *Dis. Aquat. Organ.* 60: 241–246.
- Chen, S. L., Sha, Z. X., Ye, H. Q., a kol., 2007. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mar. Biotechnol.* (NY). 9: 82–91.
- Cherr, G. N., Clark, W. H., 1985. An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon semen. *J. Exp. Zool.* 234: 75–85.
- Ikenishi, K., 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 40: 1–10.
- Inoue, J. G., Miya, M., Venkatesh, B., Nishida, M., 2005. The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (*Sarcopterygii: Coelacanthiformes*) and divergence time estimation between the two coelacanths. *Gene* 349: 227–235.

- Jaana, H., Yamamoto, T. S., 1981. The ultrastructure of spermatozoa with a note on the formative of the acrosomal filament in the lampbrush, *Lampetra japonica*. *Jpn. J. Ichthyol.* 28: 135-147.
- Johnson, A. D., Richardson, E., Bachvarova, R. F., Crothe, B. I., 2011. Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. *Reproduction.* 141: 291–300.
- Kang, S. J., Choi, J. W., Kim, S. Y., a kol., 2008. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 79: 931–937.
- Kim, C. H., Broxmeyer, H. E., 1998. *In vitro* behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood.* 91: 100–110.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253–310.
- Kitauchi, T., Saito, T., Motomura, T., Arai, K., Yamaha, E., 2012. Distribution and function of germ plasm in cytoplasmic fragments from centrifuged eggs of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Appl. Ichthyol.* 28: 998–1005.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Etkin, L. D., 2001. Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation.* 67: 80–83.
- Kloc, M., Dougherty, M., Bilinski, S., a kol., 2002. Three dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution in Terminal granules in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 241: 79–93.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., Nusslein-Volhard, C., 2000. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149: 875–888.
- Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., Nusslein-Volhard, C., 2002. An evolutionary conserved region in the vasa 3' UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Current Biology.* 12: 454–466.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., a kol., 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature.* 421: 279–282.
- Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., a kol., 2004. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 67: 91–100.
- Kopranner, M., Thisse, C., Thisse, B., a kol., A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes. Dev.* 15: 2877–2885.
- Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., Inoue, K., 2007. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mechanisms of Development* 124: 279–289.

- Kunwar, P. S., Lehmann, R., 2003. Developmental biology: Germ-cell attraction. *Nature*. 421: 226–227.
- Kurokawa, H., Aoki, Y., Nakamura, S., Ebe, Y., Kobayashi, D., Tanaka, M., 2006. Time lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 48: 209–221.
- Kusa, M., 1956. Studies on cortical alveoli in some teleostean eggs. *Embryologie*. 3: 105–129.
- Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Costa, G. M. a kol., 2010. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One*. 5: e10740.
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., a kol., 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Gene. Dev.* 13: 424–436.
- Li, M., Hong, N., Xu, H., a kol., 2009. Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech. Dev.* 126: 366–381.
- Lin, S., Long, W., Chen, J., Hopkins, N., 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 4519–4523.
- Long, W. L., Ballard, W. W. 2001. Normal embryonic stages of the longnose gar, *Lepisosteus osseus*. *BMC Dev. Biol.* 1: 6.
- Lugowska, K., Sarnowski, P., 2011. Heads or tails- fis hatching. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 41 (1):13–17.
- Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., a kol., 2001. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 2461–2466.
- Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B. L., 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 70: 841–847.
- Maufroid, J. P., Capuron, A. P., 1985. A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltlii*. *Differentiation*. 29: 20–24.
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., a kol., 2006. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr. Biol.* 16: 2135–2142.
- Mishima, Y., 2012. Wide spread roles of micro RNAs during zebrafish development and beyond. *Dev. Growth Differ.* 54: 55–65.
- Nagai, T., Yamaha, E., Arai, K., 2001. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. *Zool. Sci.* 18: 215–223.
- Nagler, J. J., Cloud, J. G., Wheeler, P. A., a kol., 2001. Testis transplantation in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 64: 644–646.

- Nakamura, A., Seydoux, G., 2008. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development*. 135: 3817–3827.
- Nicander, L., Sjöden, I., 1971. An electron microscopical study of the acrosomal complex and its role in fertilization in the river lampbrush, *Lampetra fluviatilis*. *J. Submicrosc. Cytol.* 3: 309–317.
- Nieuwkoop, P. D., Sutasurya, L. A., 1979. Primordial Germ Cells in the Chordates: Embryogenesis and Phylogenesis. Cambridge University Press.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., a kol., 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 2725–2729.
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., a kol., 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J. Reprod. Dev.* 52: 685–693.
- Olsen, L. C., Aasland, R., Fjose, A., 1997. A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66: 95–105.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*) function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 147–154.
- Qiagen Plasmid Purification Handbook, 2005. 3. vydání. [online]. listopad 2005. Dostupné na WWW:<http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf>
- Rangan, P., DeGennaro, M., Lehmann, R., 2008. Regulating gene expression in the *Drosophila* germ line. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73: 1–8.
- Raz, E., 2003. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4: 690–700.
- Saga, Y., 2008. Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 337–341.
- Santos, A. C., Lehmann, R., 2004. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14: R578–R589.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., a kol., 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3 UTRmRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 691–699.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. *Biol. Reprod.* 78: 159–166.
- Saito, T., Goto, R., Kawakami, Y., a kol., 2011. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. *PLoS ONE* 6: e24460.

- Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E., 2014. The Origin And Migration Of Primordial Germ Cells In Sturgeons. *PLoS ONE* 9 (2): e86861
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., 2000. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 42: 317–326.
- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., a kol., 2004. Primordial germ cell migration in the chin and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.* 272: 351–361.
- Sumanas, S., Larson, J., 2002. Morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides in zebrafish: A recipe for functional genomics? *Briefings in Functional Genomics and Proteomics.* 1 (3): 239–256.
- Sutasurja, L. A., Nieuwkoop, P. D., 1974. The induction of the primordial germ cells in the urodeles. *Development Genes and Evolution.* 175: 199–220.
- Tada, H., Mochii, M., Orii, H., Watanabe, K., 2012. Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 71(1):86–93.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., a kol., 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallusdomesticus*). *Theriogenology.* 40: 509–519.
- Takeuchi, T., 2005. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biol. Reprod.* 73: 88–93.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 380–389.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 69: 1142–1149.
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., a kol., 2009a. Development of spermatogonial cell transplantation in *Nibe croaker*, *Nibe mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol. Reprod.* 81: 1055–63.
- Takeuchi, M., Okabe, M., Aizawa, S., 2009b. The Genus Polypterus (Bichirs): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-Finned Fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harbor Protocols.*
- Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., Aizawa, S., 2009c. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Dev. Biol.* 332: 90–102.

- Takeuchi, T., Tanigawa, Y., Minamide, R., Ikenishi, K., Komiya, T., 2010. Analysis of SDF1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev* 127: 146–158.
- Theusch, E. V., Brown, K. J., Pelegri, F., 2006. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.* 292: 129–141.
- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S. Y., a kol., 2004. Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation. *Dev. Cell.* 6: 295–302.
- Timmermans, L. P. M., Taverne, N., 1989. Segregation of primordia germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonioides* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by ³H-thymidine incorporation. *J. Morphol.* 202: 225–237.
- Toury, R., Clerot, J. C., Andre J., 1977. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleosteens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isole. *Biol. Cell.* 30: 225–232. (ve francouzštině s anglickým abstraktem).
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., Noce, T., 2000. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development.* 127: 2741–2750.
- Van De Lavoie M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., a kol., 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature.* 441: 766–769.
- Venkatarama, T., Lai, F., Luo, X., Zhou, Y., Newman, K., King, M. L., 2010 Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. *Development.* 137: 651–660.
- Wakamatsu, Y., Ozato, K., Hashimoto, H., Kinoshita a kol., 1993. Generation of germ line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 2: 325–332.
- Wallace, R. A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.* 16: 175–201.
- Wang, Y. L., 1984. The effect of temperature on the early development of white sturgeon and lake sturgeon. Nepublikovaná diplomová práce. Univ. Calif., Davis, CA. 54 s.
- Weidinger, G., Wolke, U., Kopranner, M., a kol., 1999. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development.* 126: 5295–5307.
- Weidinger, G., Wolke, U., Kopranner, M., a kol., 2002. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development.* 129: 25–36.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., a kol., 2003. Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.* 13: 1429–1434.

- Weller, D., Dally, D., Olson, W., Summerton, J., 1991. Molecular modeling of acyclic polyanide oligonucleotide analogs. *J. Org. Chem.* 56: 6000–6006.
- Whittington, P. M., Dixon, K. E., 1975. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33 :57–74.
- Williamson, A., Lehmann, R., 1996. Germ cell development in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 365–391.
- Wolke, U., Weidinger, G., Kopranner, M., a kol., 2002. Multiple levels of post transcriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr. Biol.* 12: 289–294.
- Wylie, C., 1999. Germ cells. *Cell* 96: 165–174.
- Xu, H., Gui, J., Hong, Y., 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev. Dyn.* 233: 872–882.
- Xu, H., Li, Z., Li, M., Wang, L., Hong, Y., 2009. *Boule* Is Present in Fish and Bisexually Expressed in Adult and Embryonic Germ Cells of Medaka. *PLoS ONE.* 4(6): e6097.
- Xu, H., Li, M., Gui, J., Hong, Y., 2010. Fish germ cells. *Sci. China Life Sci.* 53: 435–446.
- Yamaha, E., Kazama-Wakabayashi, M., Otani, S., Fujimoto, T., Arai, K., 2001. Germ linechimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica.* 111: 227–236.
- Yano, A., von Schalburg, K., Cooper, G., a kol., 2009. Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* 76: 246–254.
- Yi, M., Hong, N., Hong, Y., 2009. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science.* 326: 4.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N., 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development.* 124: 3157–3165.
- Yoshizaki, G., 2010. Germ cell transplantation in fish: Basic biology and Applications. In: *Book of Abstracts, Satellite International Symposium, Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Okinawa, Japan.* 11 s.
- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., a kol., 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 364–371.
- Yoshizaki, G., Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T., Takeuchi, T. 2005. Greenfluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method

and its application for germ cell transplantation in Salmonidae. *Biology of Reproduction*. 73: 88–93.

Zotin, A. I., 1953. Consumption of water by developing Acipenserid eggs from the environment. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 89: 377–380.

Zelazowska, M., Kilariski, W., Bilinski, S. M., Podder, D. D., Kloc, M., 2007. Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Tissue Res*. 329: 137–145.

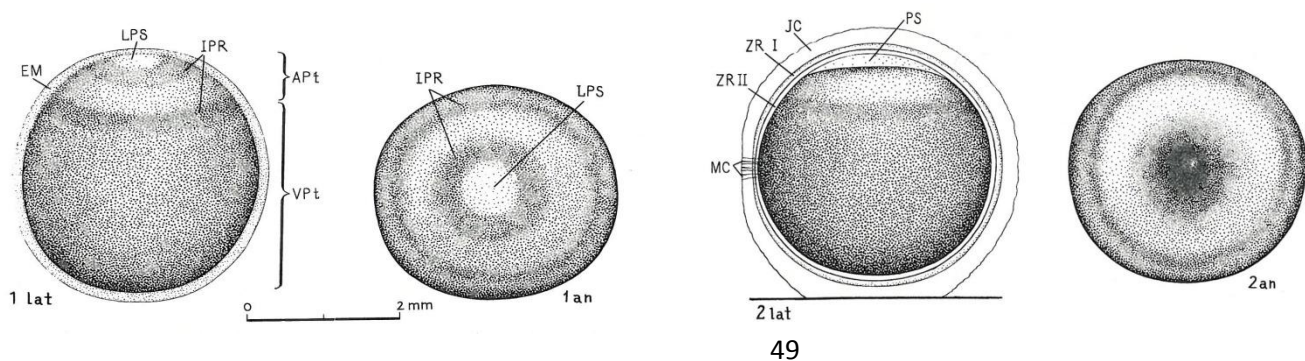
7. SEZNAM ZKRATEK

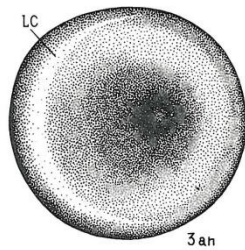
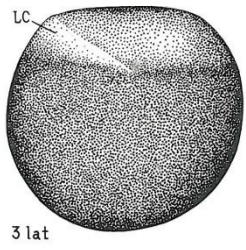
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GCT	Transplantace zárodečných linií
GFP	Zelený fluorescenční protein
GGT1	Geranyl-geranyl transferáza
HMGC _o AR	Hydroxymethyl-glutaryl-koenzym A reduktáza
LRE	Lokální RNA exprese
PGC	Primordiální gonocyt
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
UTR	Nepřekládaná oblast (untranslated region)

8. PŘÍLOHY

Příloha I Embryonální vývoj jesetera ruského podle Dettlaff a kol. (1993).

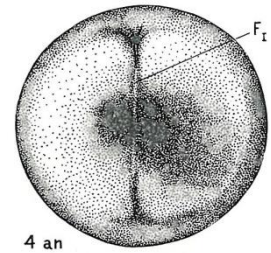
Čísla pod jednotlivými obrázky znamenají vývojové etapy (stádia) embrya.



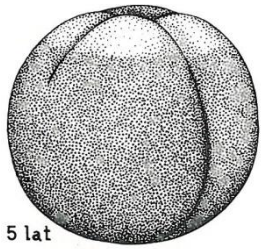


3 lat

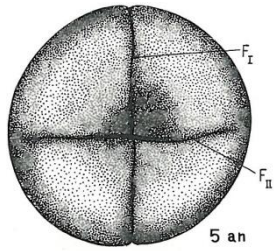
3 an



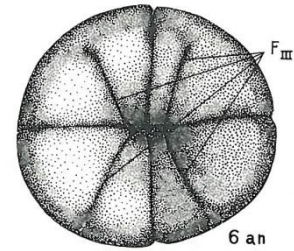
4 an



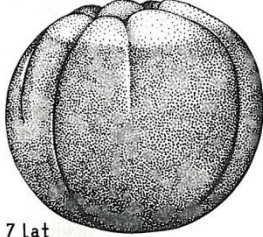
5 lat



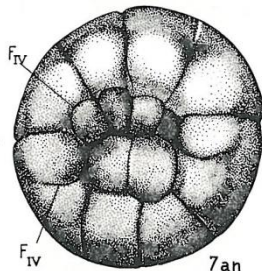
5 an



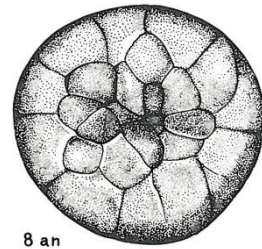
6 an



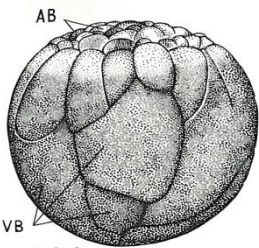
7 lat



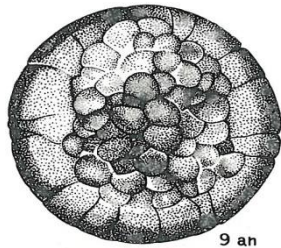
7 an



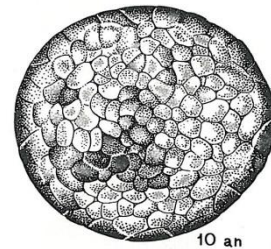
8 an



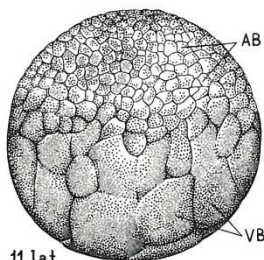
9 lat



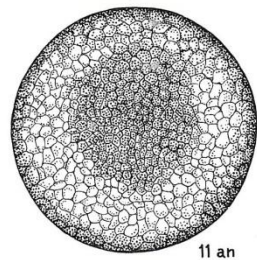
9 an



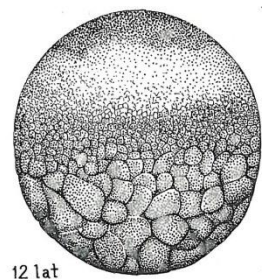
10 an



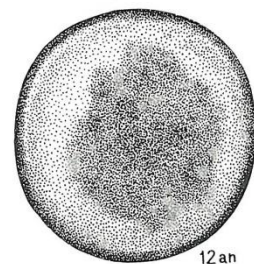
11 lat



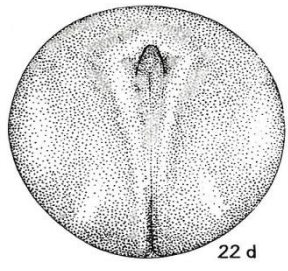
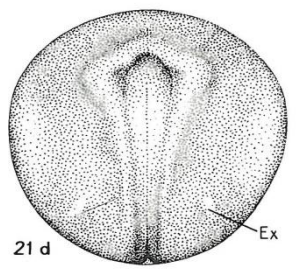
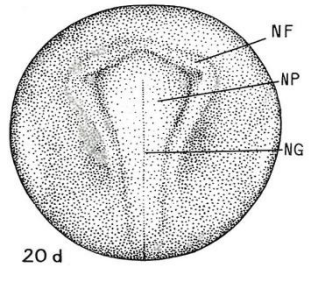
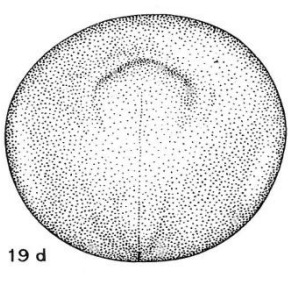
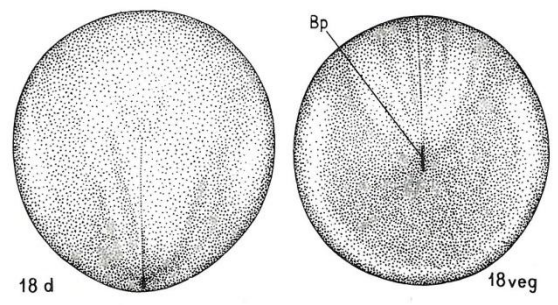
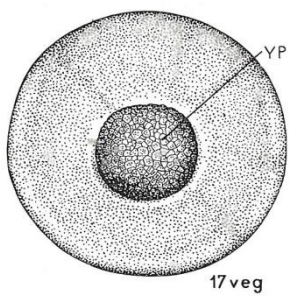
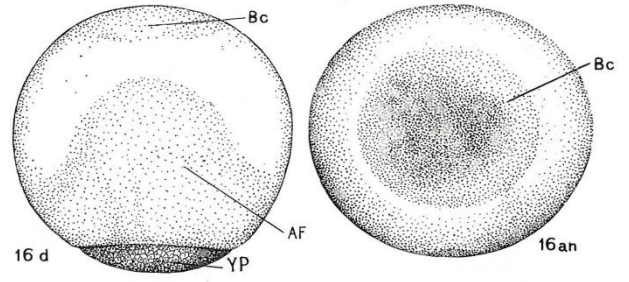
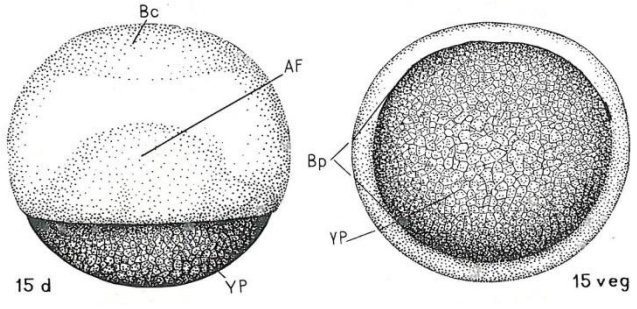
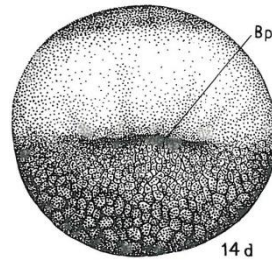
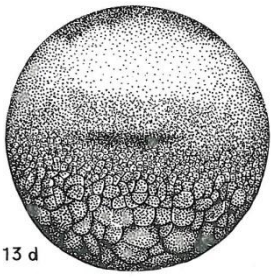
11 an

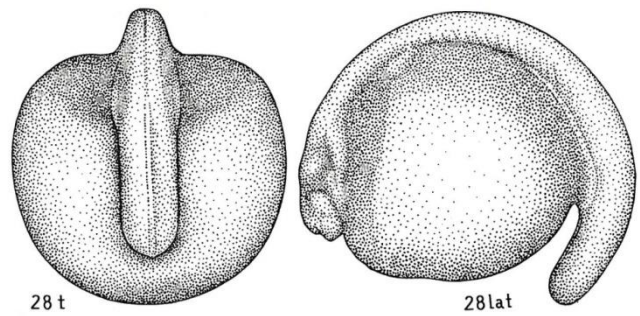
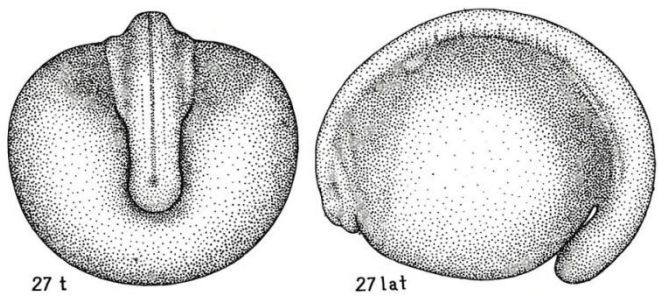
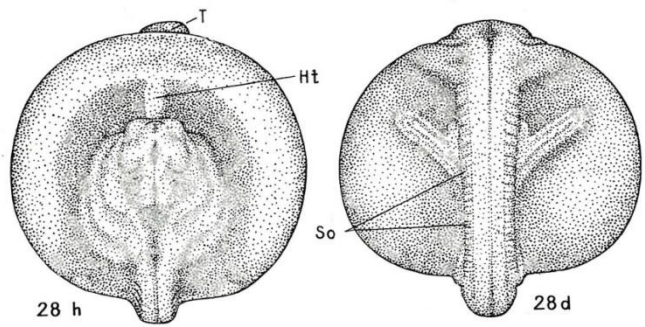
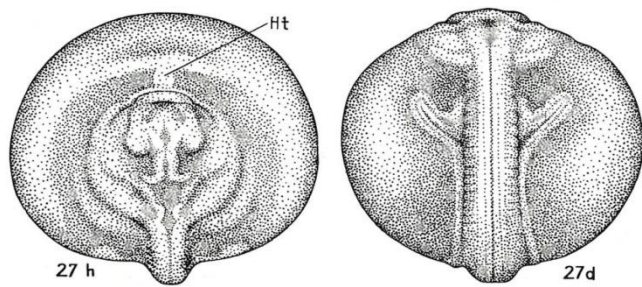
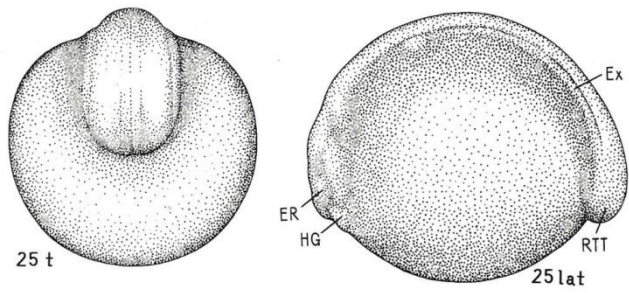
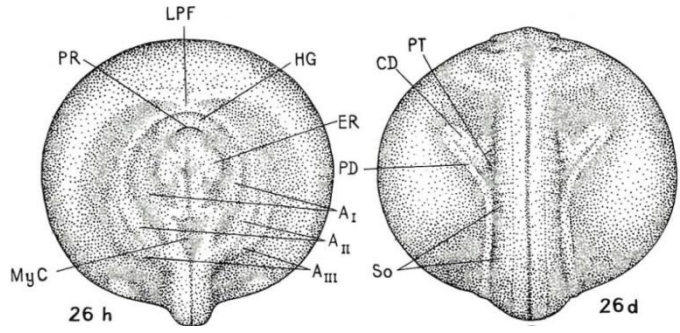
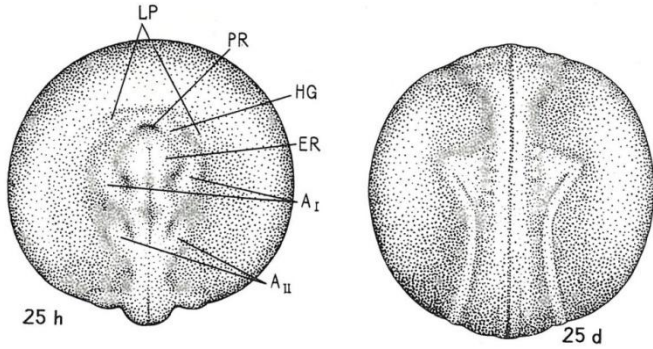
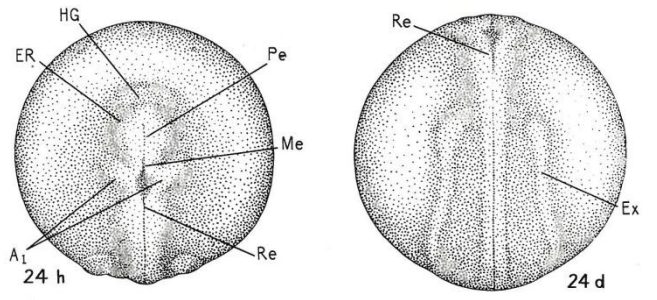
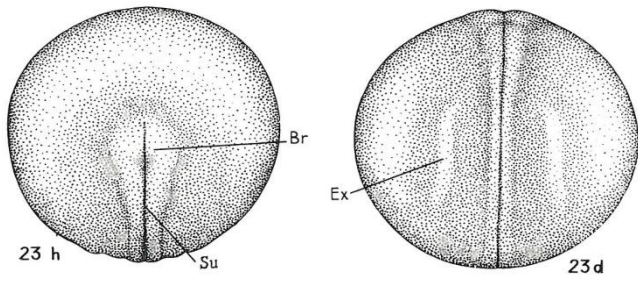


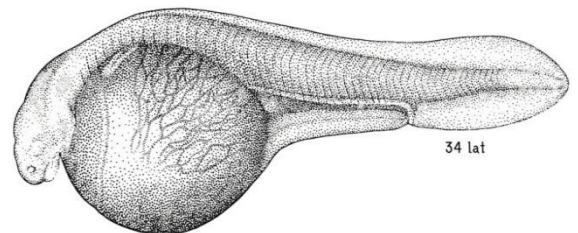
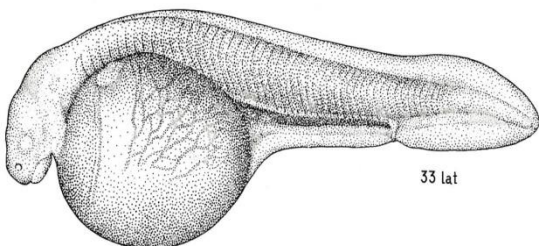
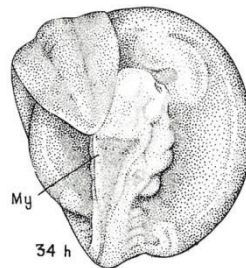
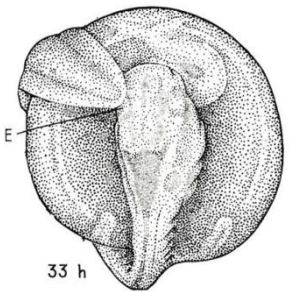
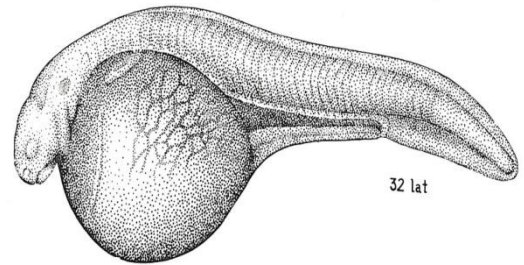
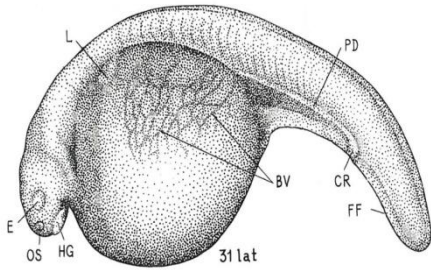
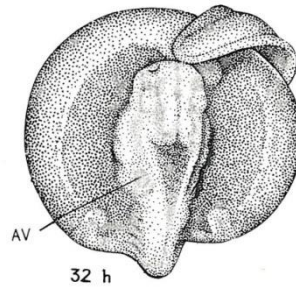
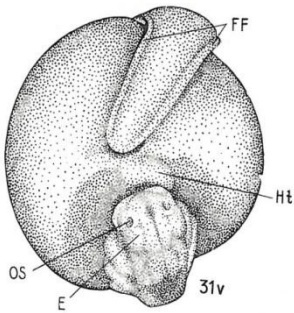
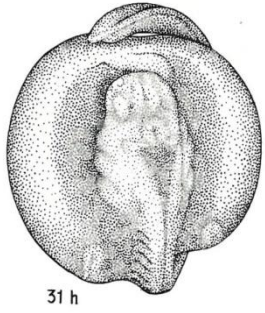
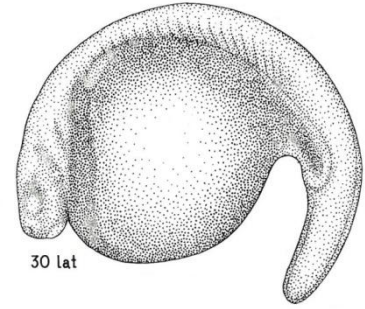
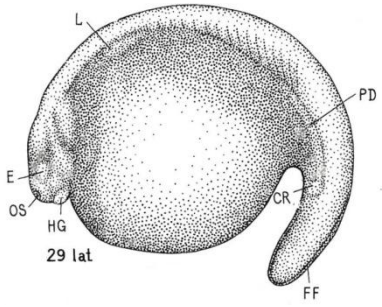
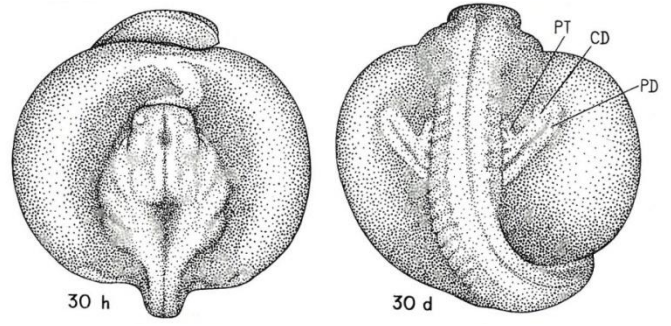
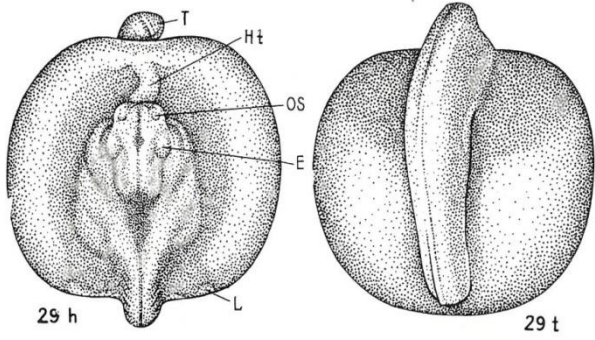
12 lat

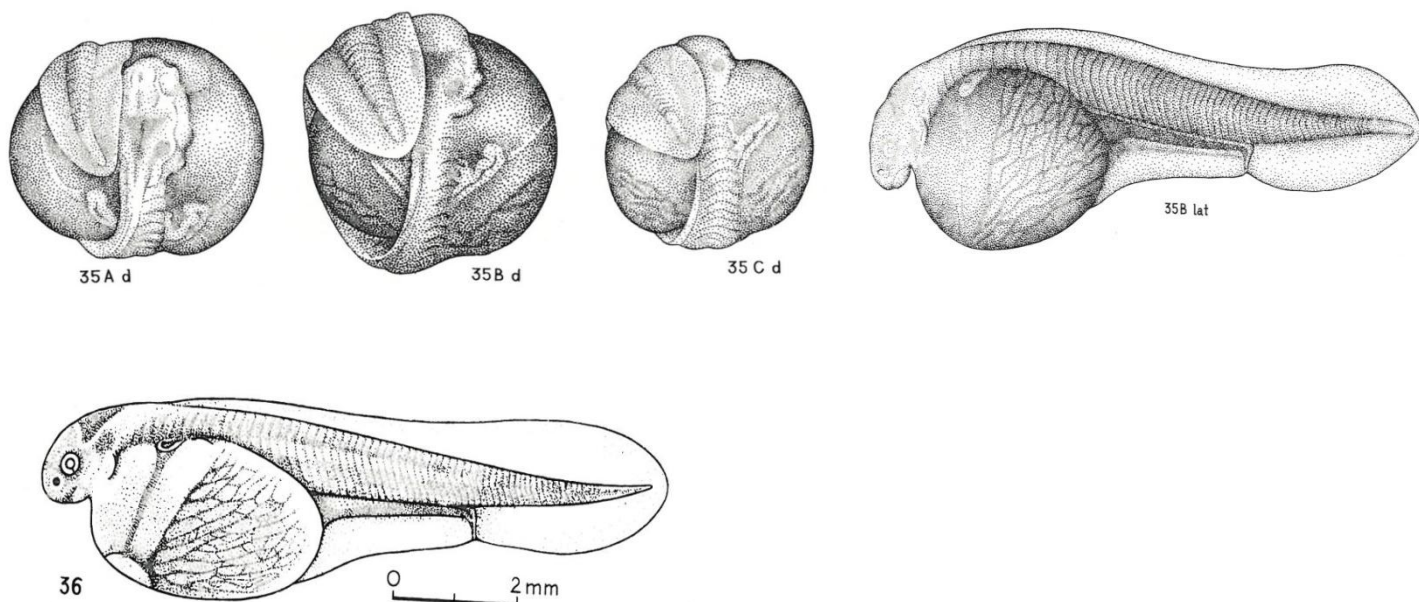


12 an









Chronologie embryogeneze u jeseterů v průměrné inkubační teplotě 18 °C, modifikováno z Dettlaff a kol., 1993 (překlad z Hochleithner a Gesner, 2001).

Stádium	Čas [hod.]	Čas [t0]	Popis embrya a jeho rysy
1	0	0	Jikra v době oplození.
2	0,7	1	Zmizení světlého polárního bodu, tvorba perivitelinního prostoru.
3	1,6	2	Excentrická akumulace pigmentu v animální oblasti, tvorba světlého srpku.
4	2,5	3,5	Rozdělení animálního pólu 1. štěpnou rýhou.
5	3,4	4,5	Rozdělení animálního pólu 2. štěpnou rýhou.
6	4,3	5,5	Rozdělení animálního pólu 3. štěpnou rýhou.
7	5,2	6,5	Rozdělení animálního pólu 4. štěpnou rýhou.
8	6,1	7,5	Rozdělení animálního pólu 5. štěpnou rýhou.
9	7,3	9	Vegetativní oblast zcela rozdělena 7 štěpnou rýhou.
10	8,2	10	Počáteční formace blastocelu, dělení buněk je stále synchronní.
11	10	12	Počáteční blastula, desynchronizace jaderného dělení v animálním pólu.
12	12,3	15	Pozdní blastula, jednotlivé buňky na animálním pólu jsou nerozpoznatelné.
13	16,1	19,5	Začátek gastrulace, tvorba pigmentovaného pásu kolem ekvatoriální oblasti.

14	17	20,5	Počáteční gastrula, invaginace zárodečného materiálu přes hřbetní okraj prvoúst.
15	22,5	27,5	Střední gastrula, animální zárodeč. materiál pokrývá 2/3 povrchu embrya.
16	25	30	Velký žloutkový bod.
17	27,5	32,5	Malý žloutkový bod.
18	31,4	38	Konec gastrulace, prvoústa ve tvaru štěrbin.
19	32,3	39	Počáteční neuralace, v okolí hlavy se objevují neurální valy.
20	33,4	40,5	Neurální deska je široká a zcela zřetelná.
21	24,4	41,7	Přitahování (spojování) neurální valů do sebe, objevují se základy exkrecečního systému.
22	36,4	44	Pozdní neuralace, neurální valy jsou spojené, prodlužují se základy exkrecečního systému.
23	37,3	45	Neurální trubice je uzavřená, jasně znatelný šev spojení neurálních valů.
24	-	-	Proces tvorby očí, v kranální části se zesilují základy exkreceční soustavy.
25	-	-	Laterální ploténky dosahují konce zadní části hlavy a jejich začištělé konce se sbíhají.
26	50	60	Laterální ploténky se spojují, v místě spojení se zakládá srdce.
27	53,2	64	Tvorba trubicovitého základu srdce.
28	57,3	69	Základ srdce má podobu prodlužující se trubice, svaly trupu ještě neodpovídají kontrakci na stimulaci.
29	60	72	Srdce se ohýbá do tvaru S a začíná bít.
30	62	74,5	Špička ocasu se přibližuje k srdci, zadní část trupu a ocas se napřimují.
31			Špička ocasu dosahuje k srdci, embryo dokáže hýbat hlavou a ocasem.
32	78	93,5	Špička ocasu se dotýká hlavy.
33	-	-	Zadní část trupu a ocas jsou zcela narovnané.
34	-	-	Embryo se dostává z membrán a dokáže se pomalu pohybovat vpřed.
35	105	126	Líhnutí jednotlivých prelarv, embryo se dokáže rychle pohybovat vpřed.
36	-	-	Masové líhnutí.

9. ABSTRAKT

Značení a izolace primordiálních gonocytů jeseterů

Primordiální gonocyty (PGC) u některých živočichů, včetně ryb vznikají po oplození v extragonádálním místě z maternálně děděné zárodečné cytoplazmy a během embryogeneze migrují do oblasti budoucích gonád, kde diferencují do gamet. Tvorba a migrační vzory PGC byly studovány u několika modelových druhů zvířat a je známo, že tyto vzory od sebe liší.

Jeseteři patří do třídy paprskoploutvých ryb (*Actinoptergii*), u které je fylogenetická pozice jeseterů mimo skupinu kostnatých ryb a navíc se vývojový vzor jeseterů podobá více obojživelníkům než kostnatým rybám.

Touto studií jsme vyvinuli injekační techniku pro vizualizaci PGC jeseterů pomocí GFP *nos1* 3'UTR mRNA. U jesetera malého (*A. ruthenus*) jsme zjistili, že jsou PGC specifikovány ve vegetativním pólu embrya. Následně na to jsme popsali migrační trasu PGC. Vzniklé PGC aktivně migrovaly na žloutkově buněčnou hmotu, žloutkovou rozšířeninu a pak byly pasivně přesunuty do gonadální brázdy. Tato studie je důkazem o tom, že jsou PGC specifikovány maternálně děděnou zárodečnou plazmou, nacházející se ve vegetativní části embrya. Způsob specifikace PGC u jeseterů byl podobný žabám, ale migrační vzorec se podobal kostnatým rybám.

Dále se nám pro další potřebné studie povedlo úspěšně izolovat PGC.

Klíčová slova: PGC, jeseter, embryogeneze, migrace PGC, zárodečná plazma, vizualizace PGC

10. ABSTRACT

Identification and isolation of primordial gonocytes in sturgeon

Primordial gonocytes (PGCs) in some animals, including fish arise after fertilization in extragonadal region from maternally inherited germline cytoplasm, and migrate to the future gonads region during embryogenesis, where they differentiate into gametes. PGCs formation and migration patterns have been studied in several species models, and it is known that these patterns differ from each other.

Sturgeons belong to class ray-finned fishes (*Actinoptergii*), in which the sturgeon phylogenetic position is an out-group to teleost fishes, the sturgeon development pattern is similar to amphibians more than teleost fishes.

In this study, we demonstrate an injection technique for sturgeon PGCs visualization by GFP *nos1* 3'UTR mRNA. We found that the Sterlet (*A. ruthenus*) PGCs are specified in the vegetative pole of the embryo. Subsequently, we reported the PGCs migration route. The arisen PGCs actively migrated on the yolky cell mass, yolky extension, and after that passively move to gonadal ridge. This study provides evidence that the PGCs are specified by maternally inherited germplasm, located in the vegetative part of the embryo. Sturgeon PGCs specification was similar to that of anuras, but the migration pattern resembled that of teleost.

Furthermore, we successfully isolated PGCs to next needed studies.

Keywords: PGC, sturgeon, embryogenesis, migration PGCs, germplasm, visualization PGCs

