



Biotechnologie v akvakultuře

Spermie a vajíčka ryb

Martin Pšenička
psenicka@frov.jcu.cz

Vše živé potřebuje čas od času sex

Mnoho organismů se dovede rozmnožovat i nepohlavně, ale téměř bez výjimky na tento jednoduchý způsob žádný druh nespolehá bezvýhradně. Alespoň jednou za čas se sexu oddává vše živé.

Pohlavní rozmnožování zvyšuje rozmanitost potomstva, dochází ke spojování rodičovských genů do nových kombinací.

Nepohlavně se množící organismus je identickou kopií (klonem) svého jediného rodiče. Je to pohodlné, ale nebezpečné, protože svět se neustále mění.

Nejnebezpečnější jsou paraziti, ti jsou díky rychlejšímu rozmnožování schopni reagovat opravdu bleskově.

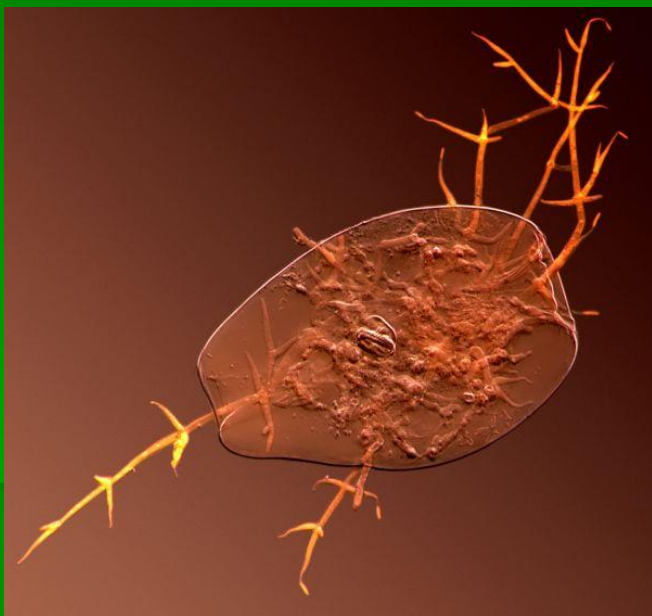
Závod ve zbrojení: Parazit přijde na způsob, jak hostitele zotročit, ten zareaguje obranným mechanismem, čímž parazita donutí hledat nové způsoby vykořisťování.

Nebýt sexu, hostitel by neměl šanci. Jakmile by parazit jeho obranu prolomil, nedokázal by zareagovat a šel by k rychlému vyhynutí.

Výjimka

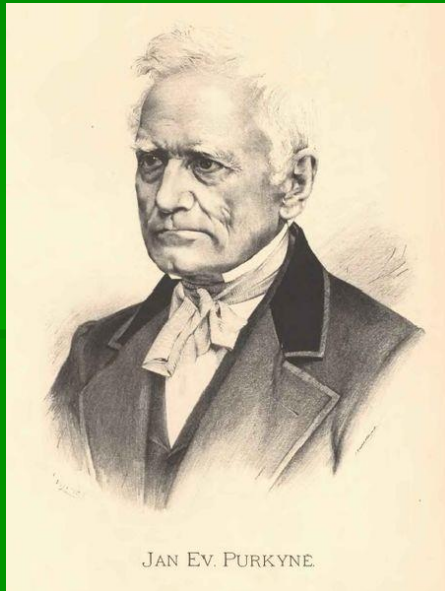
Pijavenky *Bdelloidea*, známo asi 450 druhů – více než 80 mil let bez sexu

Svůj boj s cizopasníky řeší vyschnutím





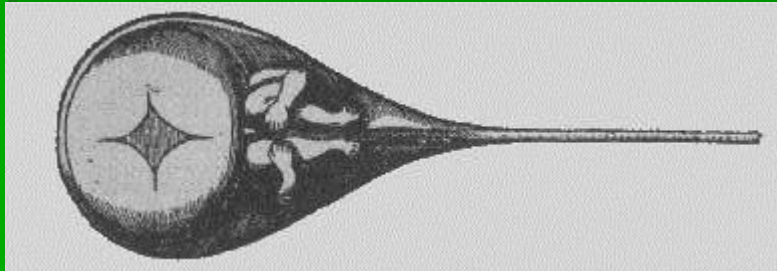
16./17. stol. W. Harvey – odmítl teorii samooplození



**Vše živé je z vejce -
Omne vivum ex ovo**

Opomíjená spermie

- Objevena v roce 1676
- Spermie byla považována za cizopasníka spermatu
- Oplození objasněno 1876
- Marně v ní hledali humunkula



Anton van Leeuwenhoek

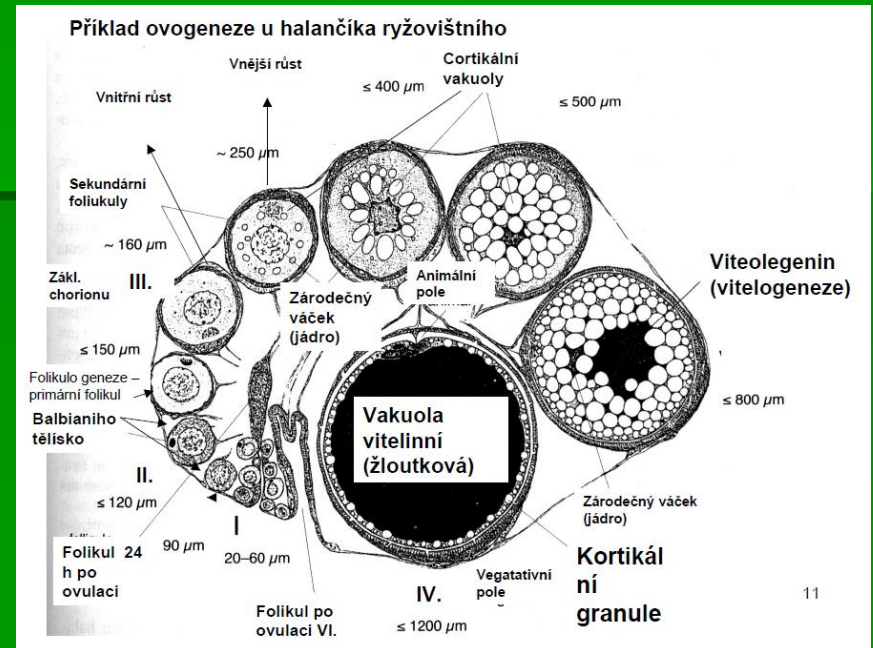
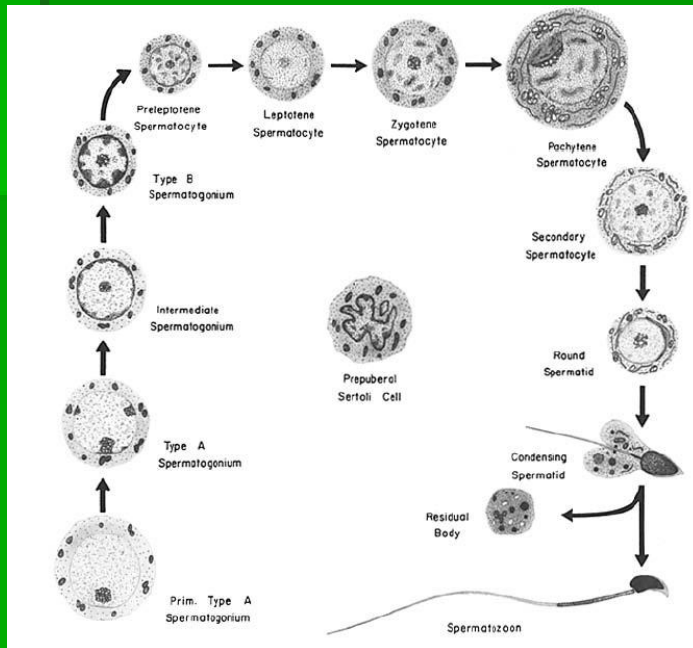
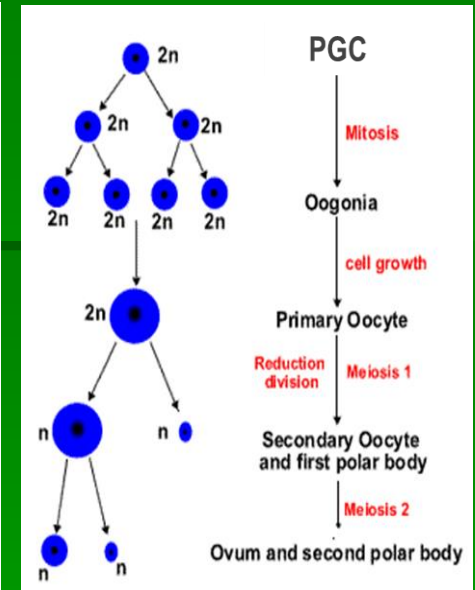
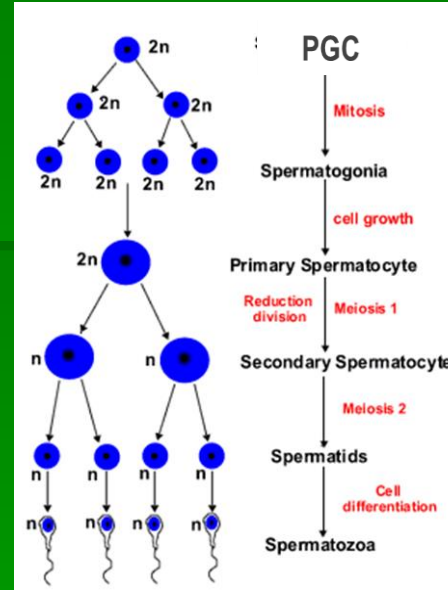
Oplození vajíčka spermií

- 1876 – Oscar Hertwig a Herman Fol

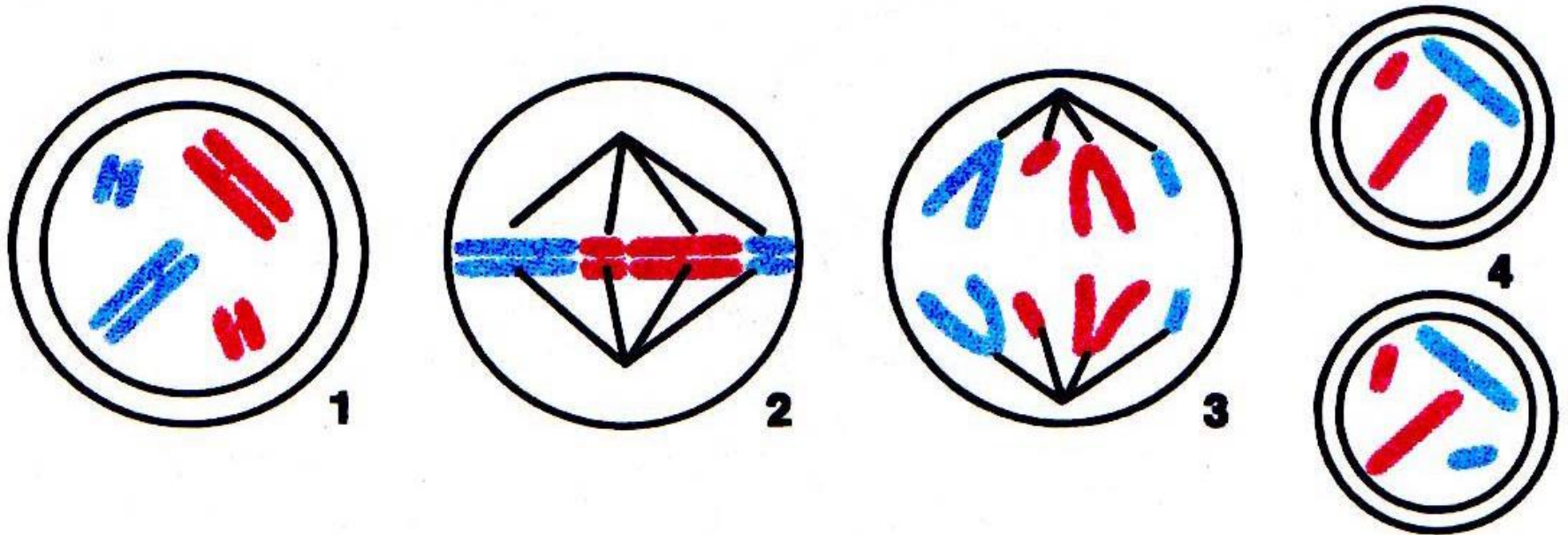


Zárodečné buňky – gametogenéze (spermatogenéze/oogenéze)

Diferenciace pohlaví je samotný jev, při kterém dochází k tvorbě pohlavních buněk (oocyty či spermie) z buněk zárodečných. Oproti tomu **determinace pohlaví** je pojem, poukazující na faktory, které podmiňují, jaké pohlavní buňky se budou u daného jedince vyvíjet.



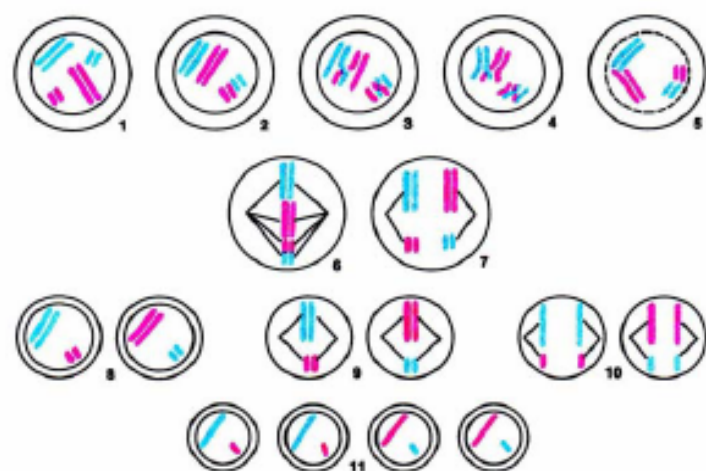
Mitoza



1 profáze, 2 metafáze, 3 anafáze, 4 telofáze

<http://www.youtube.com/watch?v=Ba9LXKH2ztU&NR=1&feature=endscreen>

Meióza



I. Redukční dělení heterotypické – 1

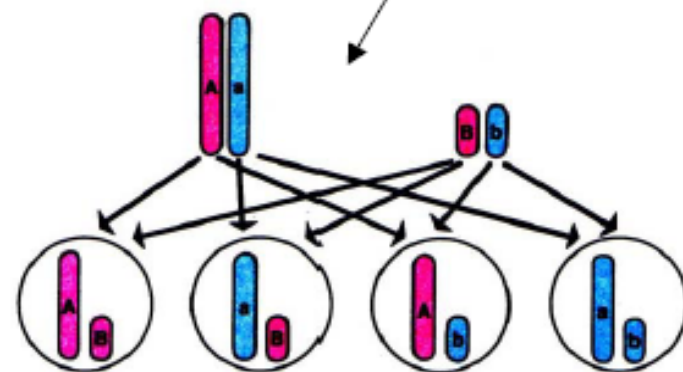
leptotene, 2 zygotene, 3 pachytene, 4 diplotene, 5 diakineze (1-5 heterotypická profáze)

6 heterotypická metafáze, 7 heterotypická anafáze,

II. Redukční dělení homeotypické

- 8 homeotypická profáze, 9 homeotypická metafáze, 10 homeotypická anafáze, 11 tetráda haploidních gamet

Výsledkem je volná kombinovatelnost znaků



Meioza

Heterotypické dělení (Meióza I)

Dochází k redukci počtu chromozómů na polovinu a dochází ke crossing-overu.

Profáze I

Leptotenní Dochází ke spiralizaci vláken DNA a diferenciaci chromozómů.

Zygotenní Homologické chromozomy (chromozomy jednoho páru) se přibližují k sobě a za pomoci speciální bílkoviny se spojují v tzv. bivalent.

Pachytenní Chromozomy dokončují spiralizaci a bivalenty jsou pozorovatelné jako tetrády - čtyřchromatidové komplexy. Nesesterské chromatidy se přitom proplétají a dochází ke vzniku chiazmat (uzlíků). V této fázi dochází k tzv. crossing-overu, kdy se rekombinují části homologických chromatid.

Diplotenní Uvolňují se bílkovinné vazby mezi homologickými chromozomy a dochází k jejich postupnému oddalování. Vzniklé uzlíky mezi nehomologickými chromatidami jsou stále spojené.

Diakineze Dochází k přeuspořádání a rozchodu homologických chromozómů. Chiazmata se posunují na konec chromatid kde zanikají (terminalizace chiazmat).

Metafáze I

Zaniká jaderná membrána. Uspořádání chromozómů v ekvatoriální rovině. Napojení vláken dělicího vřeténka na centromery chromozómů, vlákna z opačných pólů se napojují na centromery různých homologických chromozómů.

Anafáze I

Dvouchromatidové chromozomy se rozcházejí k opačným pólům buňky - jsou přitahovány pomocí dělicího vřeténka. Chromozomy se před tím seskupily ve středové ekvatoriální rovině buňky.

Telofáze I

Chromozomy v jádře buňky se prodlužují (despiralizují) - vzniká jaderná membrána a jadérko - dělicí vřeténko mizí - buňka se zaškrcuje a dělí se na dvě dceřiné buňky (cytokineze) - organely do buněk se dělí náhodně.

Následně se pak dělí znovu, tentokrát **homeotypicky** (mitóze podobně) koncipovaným dělením.

<http://www.youtube.com/watch?v=QwmpD0OB3AQ>

Produkt spermatogeneze – spermata

Spermiogeneze - zrání spermie

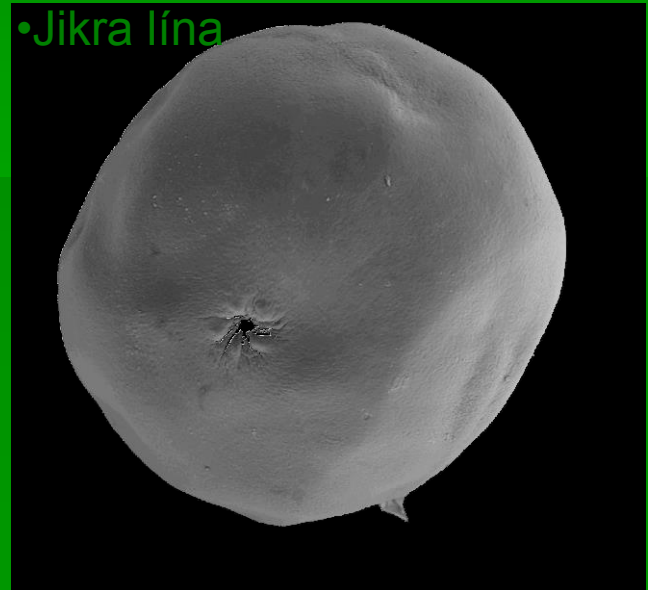
Z diploidního jedince ($2n$):

- Haploidní spermie ($1n$)
- Haploidní vajíčko s pólovým tělískem

• Spermie lína



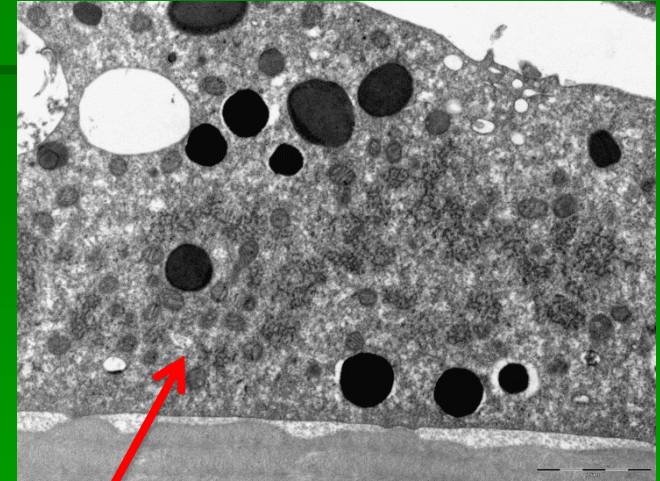
• Jikra lína



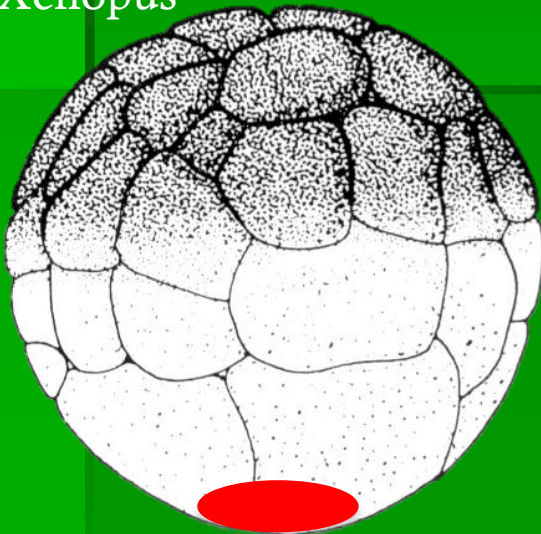
Vývoj PGC – závisí již na druhu rýhování

Kostnaté ryby - meroblastické (telolecitální rýhování)

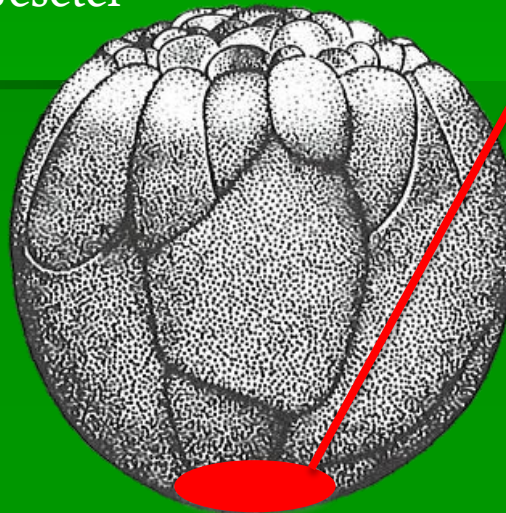
**Jeseteři (podobně jako žáby)
- holoblastické rýhování**



Xenopus



Jeseter

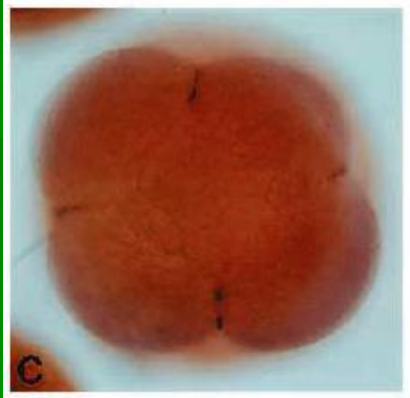


Zebřička

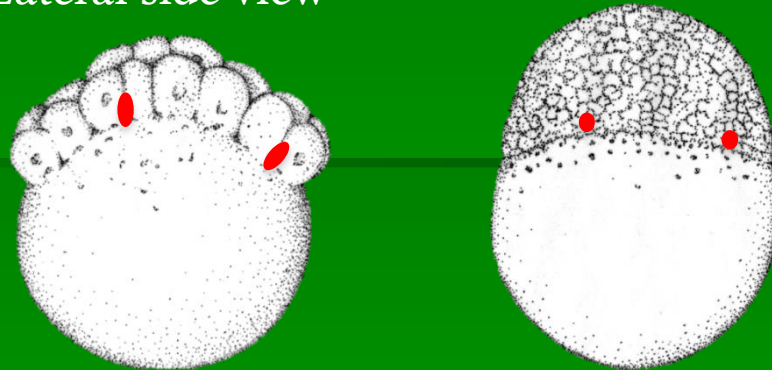


Vývoj PGC

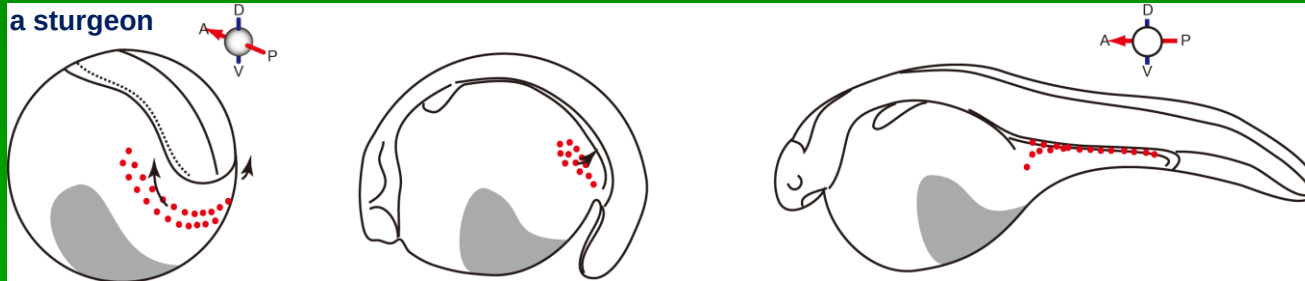
Animal pole view



Lateral side view

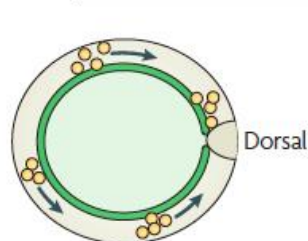


a sturgeon

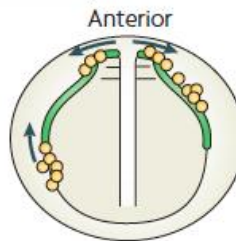


b Zebrafish

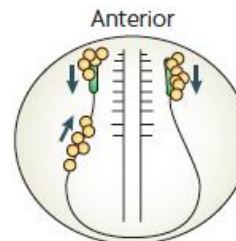
PGCs SDFIA expression



1 Migration to dorsal side



2 Migration to intermediate targets

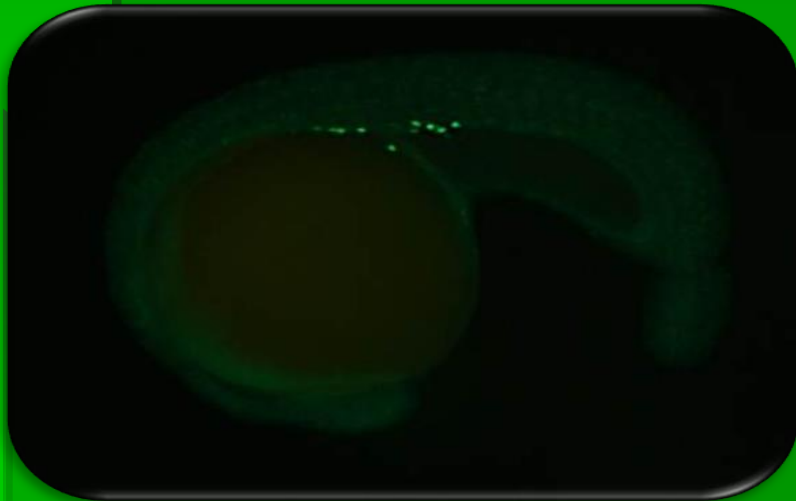
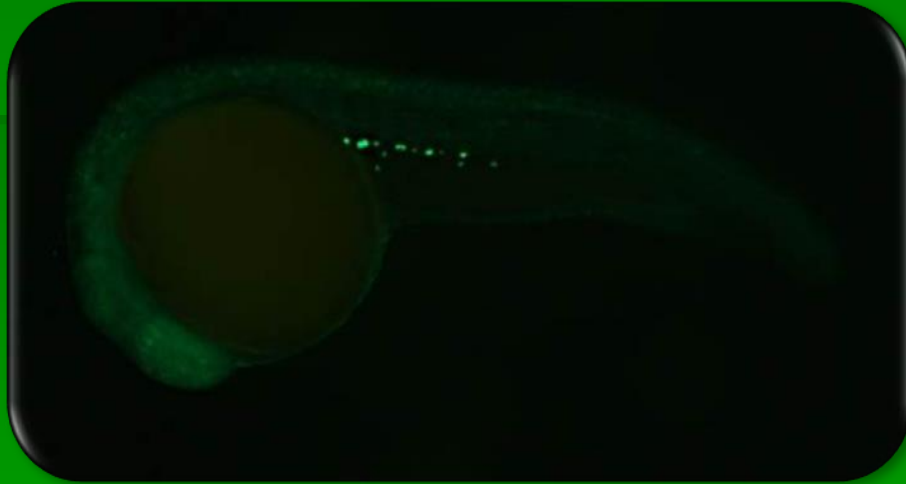


3 Migration to final targets

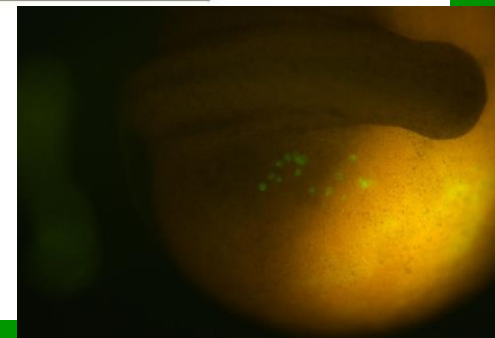
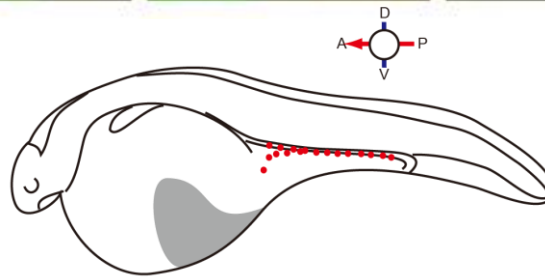
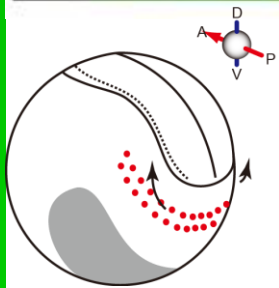
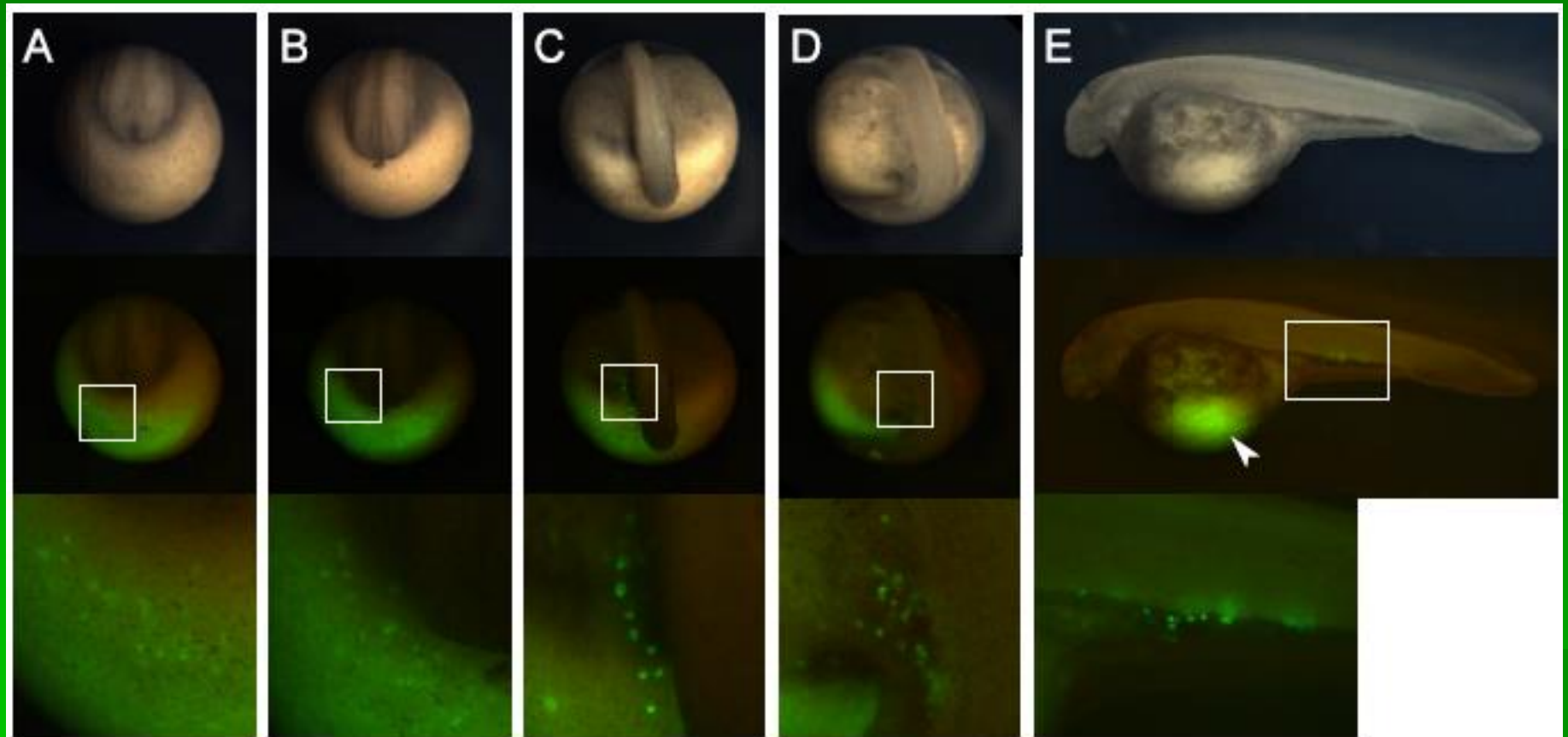


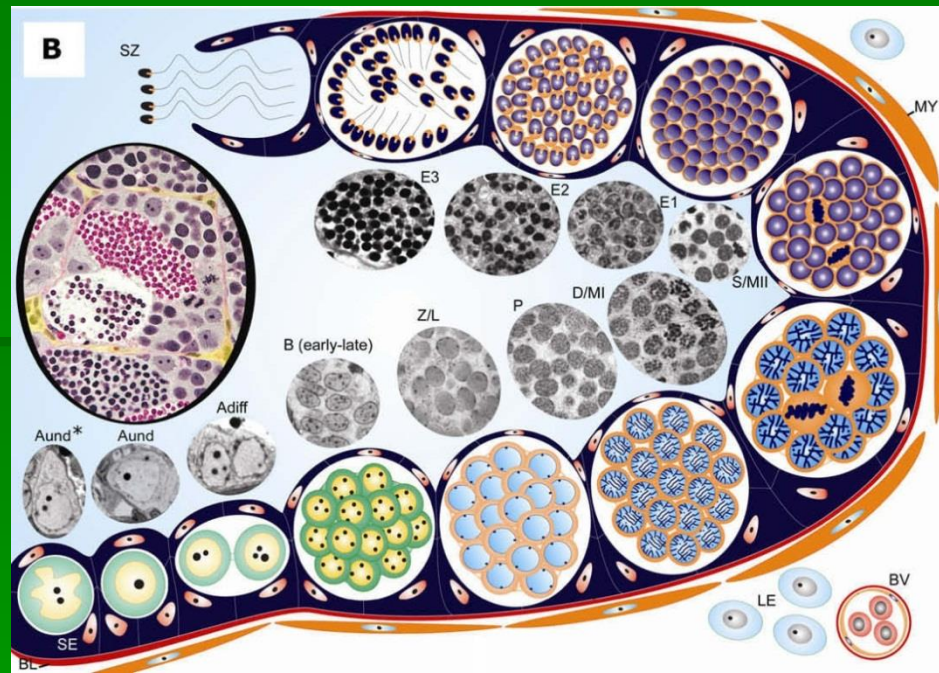
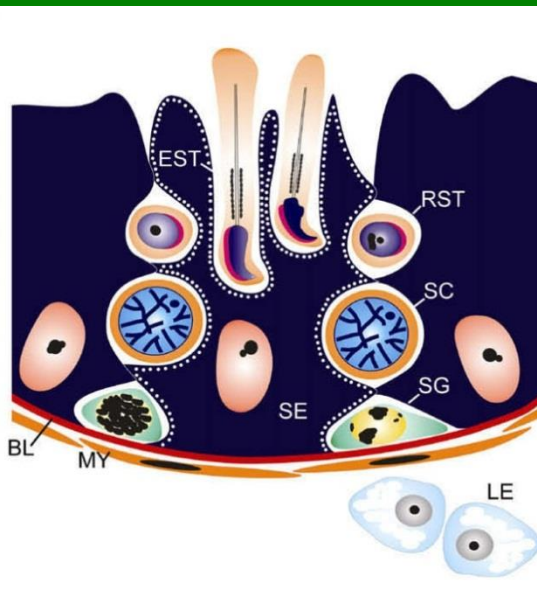
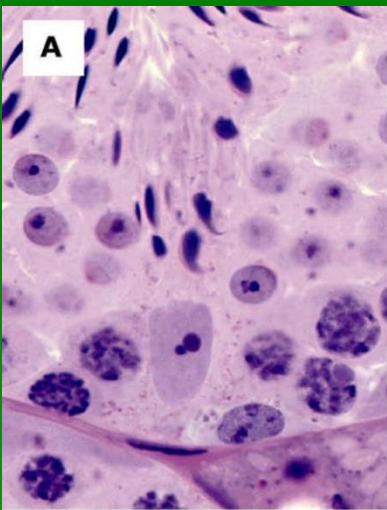
4 Gonad formation

Primordiální gonocyty - lín



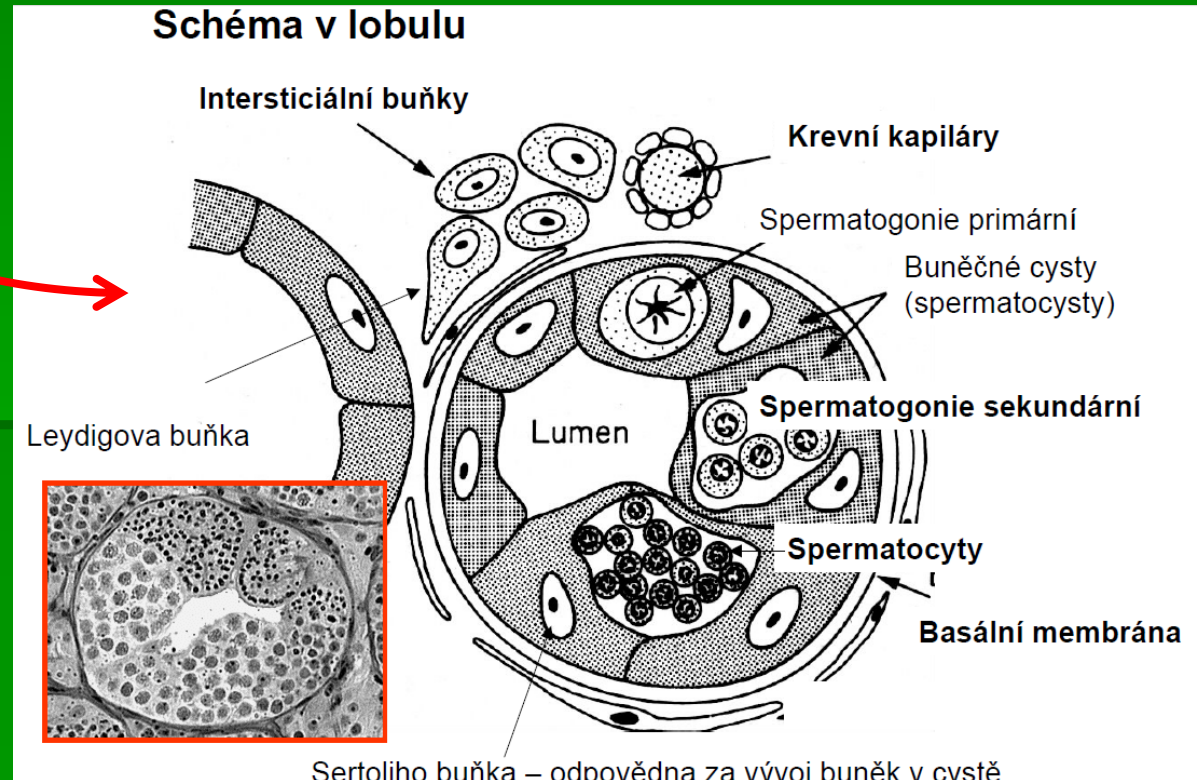
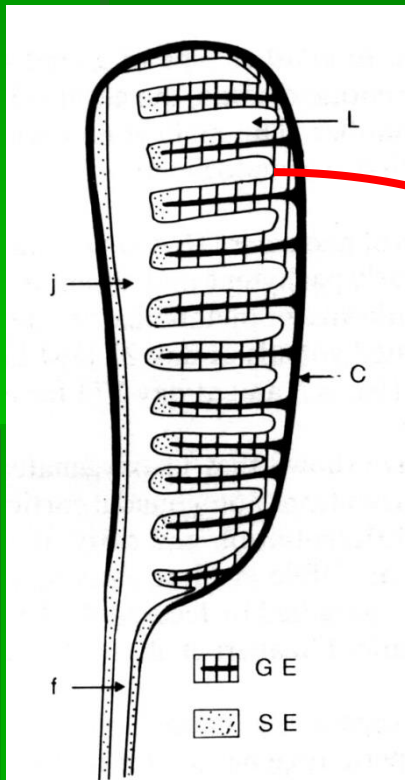
Primordiální gonocyty - jeseter





Comparison of mammalian (A, mouse) and fish (B, zebrafish) testis. Segments of spermatogenic tubules are shown to illustrate the differences in Sertoli/germ cell relation between cystic (B) and non-cystic (A) spermatogenesis. The germinal epithelium contains Sertoli (SE) and germ cells, delineated by a basal lamina (BL) and peritubular myoid cells (MY). The interstitial Leydig cells (LE) and blood vessels (BV) are shown. (A) spermatogonia (SG); spermatocyte (SC); round spermatid (RST); and elongated spermatid (EST). (B) Type A undifferentiated* spermatogonia (Aund*) (stem cell?); type A undifferentiated spermatogonia (Aund); type A differentiated spermatogonia (Adiff); spermatogonia type B [B (early-late)]; leptotenic/zygotenic primary spermatocytes (L/Z); pachytenic primary spermatocytes (P); diplotenic spermatocytes/metaphase I (D/MI); secondary spermatocytes/metaphase II (S/MII); early (E1), intermediate (E2) and final spermatids (E3); spermatozoa (SZ).

- Spermatogonie primární – zárodečná buňka uzavřena do lůžka ze Sertoliho buňky se mitoticky dělí. Z nich se vytvoří v době nástupu spermatogeneze spermatogonie sekundární, které se několikrát dělí a seskupují se do cyst (**diferenciace!!!**).
- Sertoliho buňky hrají dominantní roli v rozvoji testes a jeho funkci.
 - V cystách nastupuje meiotické dělení u spermatogonií sekundárních s produkcí spermatocytu a nakonec haploidní spermatidy (pohlavní buňky).
 - Dále následuje spermiogeneze se změnou spermatid na spermie, eliminace plazmy, kondenzace chromatinu, vytvoření bičíku
 - Spermie se uvolňují z cyst a zaplňují kanálek lobulu
 - Později se dostávají do odvodných kanálků v této době hovoříme o zrání spermií tzv. kapacitaci , dochází ke koncentraci spermatu v odvodných kanálcích, chámovodu nebo semenných váčcích.



j-semenný kanál, **l-lobul**, c-vazivo, f-chámovod

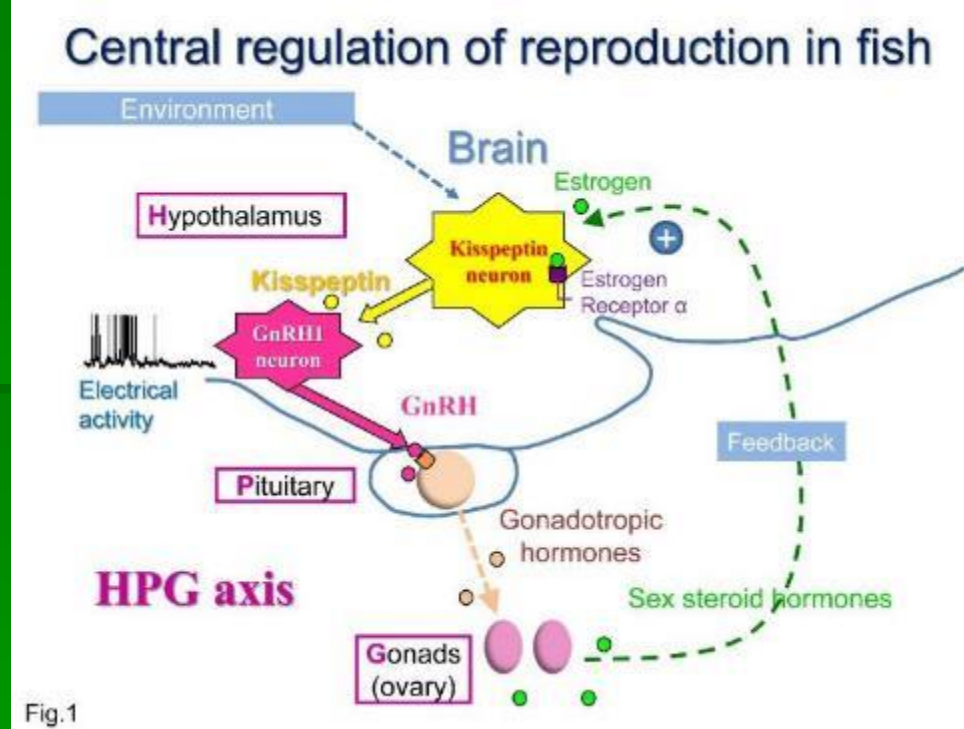
Hormonální řízení

GnRH (Gonadotropiny uvolňující hormon hypotalamu), působí na hypofýzu a ta uvoňuje LH a FSH.

LH (GTH I, luteinizační hormon hypofýzy) – působí na Leydigovy buňky (nachází se v gonádě mezi cystami) ---> produkce steroidů (11 keto-testosteron) stimulující spermatogenezi

• **FSH (GTH II, folikuly stimulující hormon hypofýzy)** – působí na Sertoliho buňky ---> produkce steroidů, řídí i rozmnožování Sertoliho buňek a spermatogenezi, má vliv na produkci růstového hormonu a steroidního hormonu 11 keto-testosteron

• 11 keta-testosteron stimuluje spermatogenezi, spermiogenezi, stimuluje růstový faktor produkovaný sertoliho buňkami.

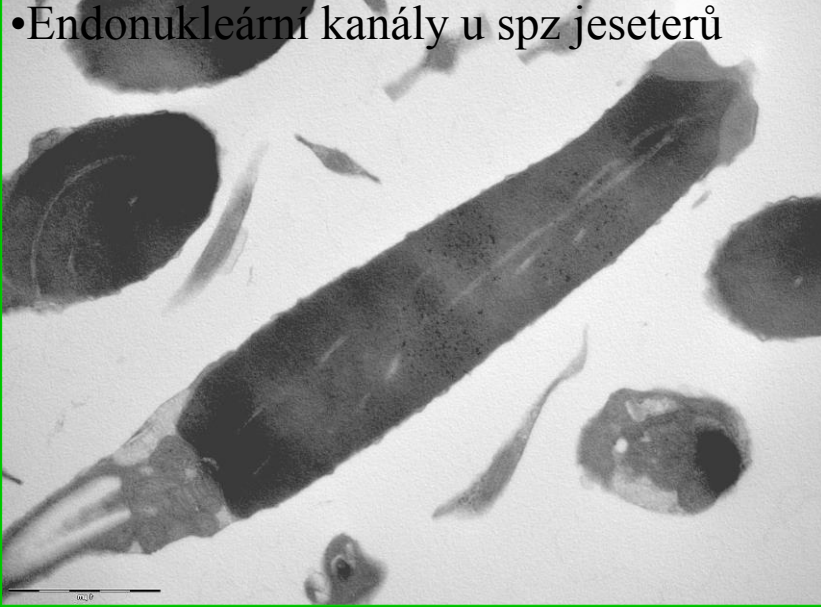


Stupně vývoje testes

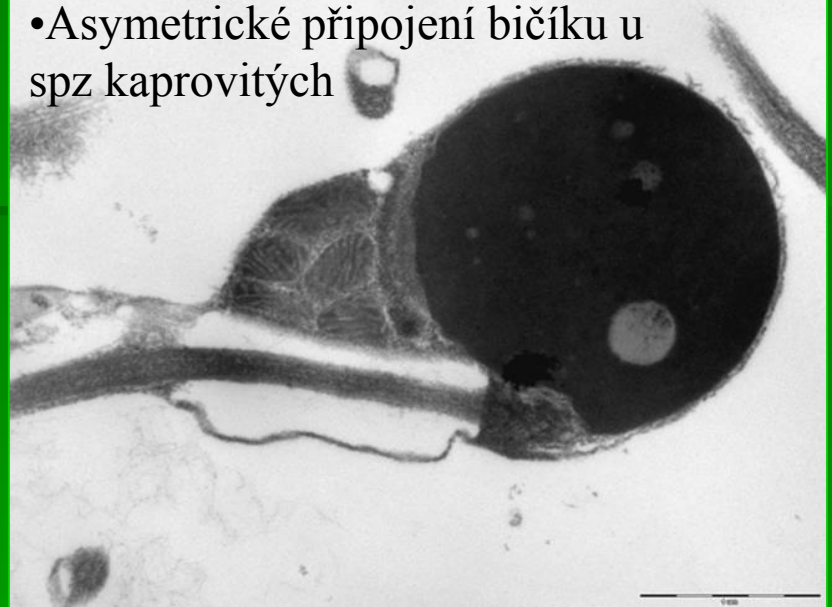
- 1) Stadium mladosti – testes jako úzké lišty, pohlaví nelze makroskopicky rozlišit
- 2) Stádium klidu – vyskytuje se u ryb poprvé dospívajících. Testes jsou drobné špatně se odlišují od vaječníků
- 3) Stádium dozrávání – testes se zvětšují jsou narůžovělá případně pouze zvětšená (GSI 2 %). Neuvolňuje se sperma.
- 4) Stádium zralosti – gonády jsou plně vyvinuté (GSI 4-6 % podle druhu). Z varlat se uvolňuje sperma.
- 5) Stádium výtěrové – dochází ke spontánní spermiaci
- 6) Stádium po výtěru – se velmi liší podle druhů. Studenomilné (pstruh) se po ukončení spermiace vrací do stádia 3 u teplomilných (kapra) se vrací do stádia 3-4, kdy v průběhu teplot nad 18 °C kontinuálně cyklicky produkuje sperma

Struktura spermie ryb

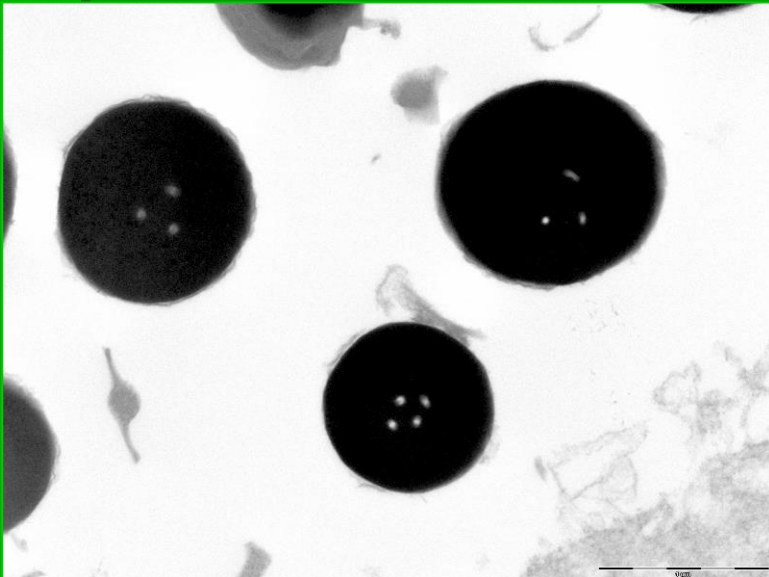
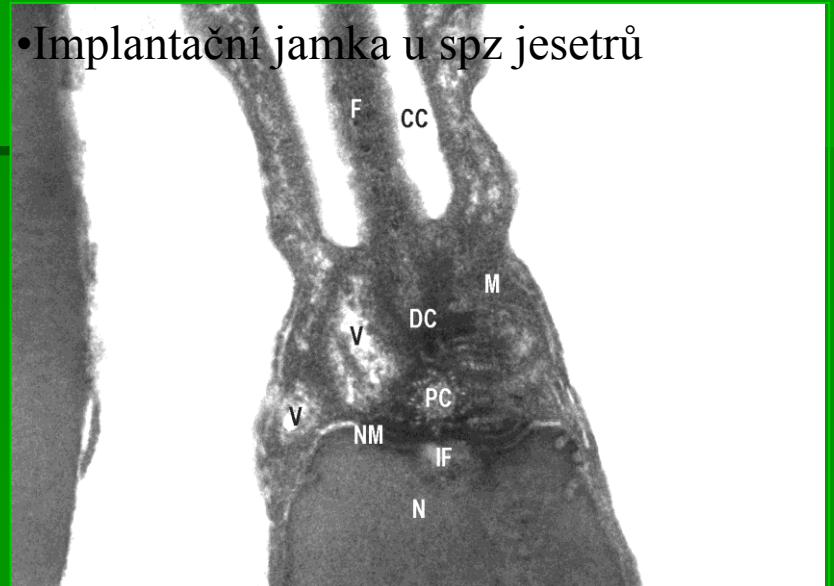
- Endonukleární kanály u spz jeseterů



- Asymetrické připojení bičíku u spz kaprovitých

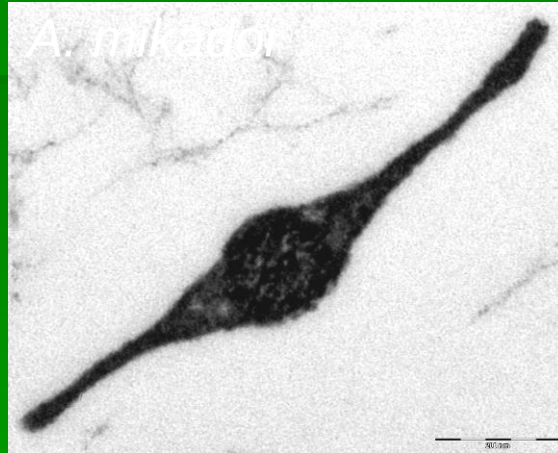
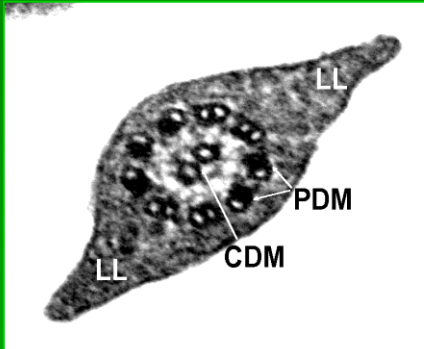


- Implantační jamka u spz jesetrů

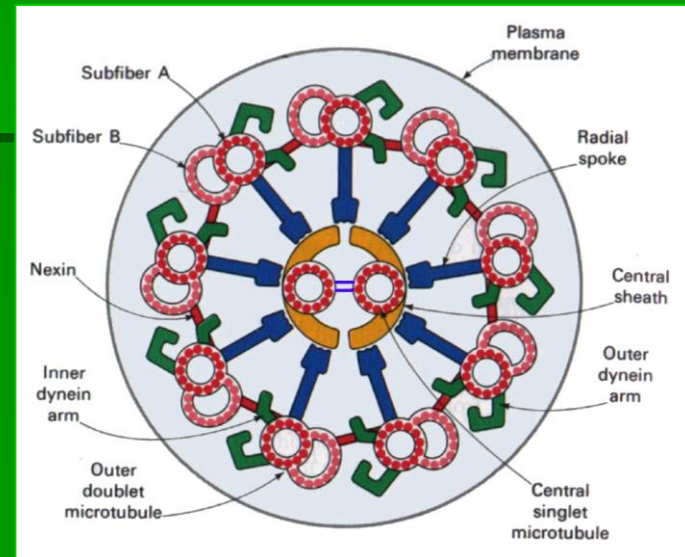
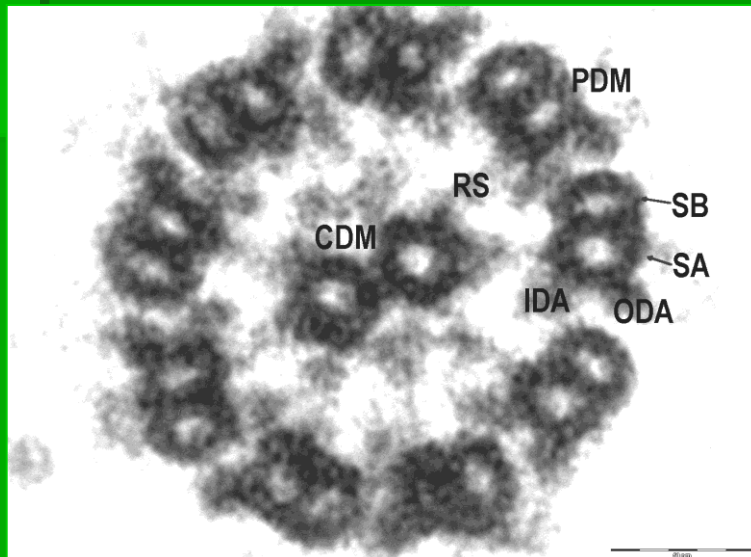
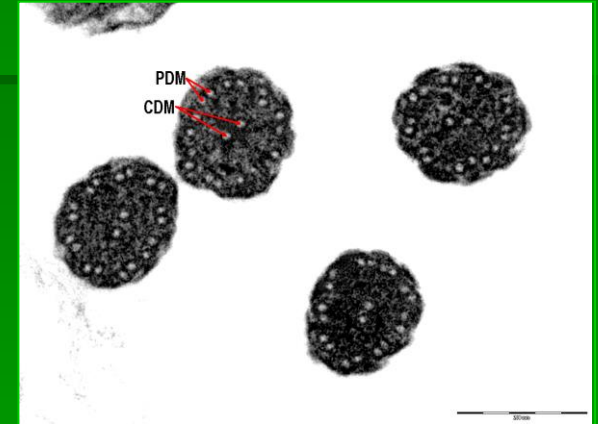


Bičík spermie

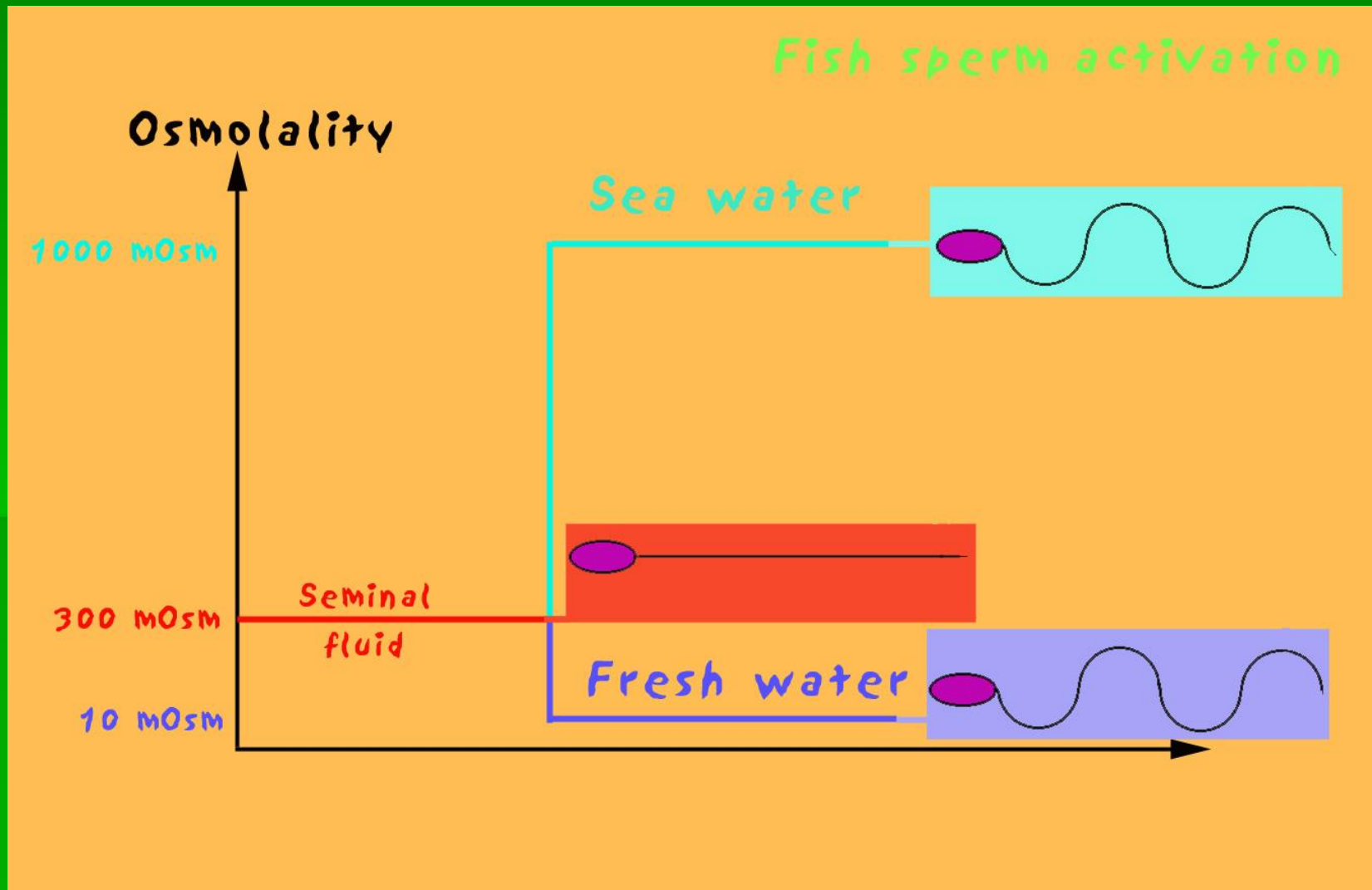
- Flagellum with a fin in sturgeon



- Flagellum in teleost



Aktivace spermií ryb



Aktivace spermií ryb

Spermie jesetera

jeseteři 4.3.2008 pokuy s polyploidy
Aktivace voda z líhně
mlíčák: SIB 2106 (7)

0:00:00:08

Spermie kapra

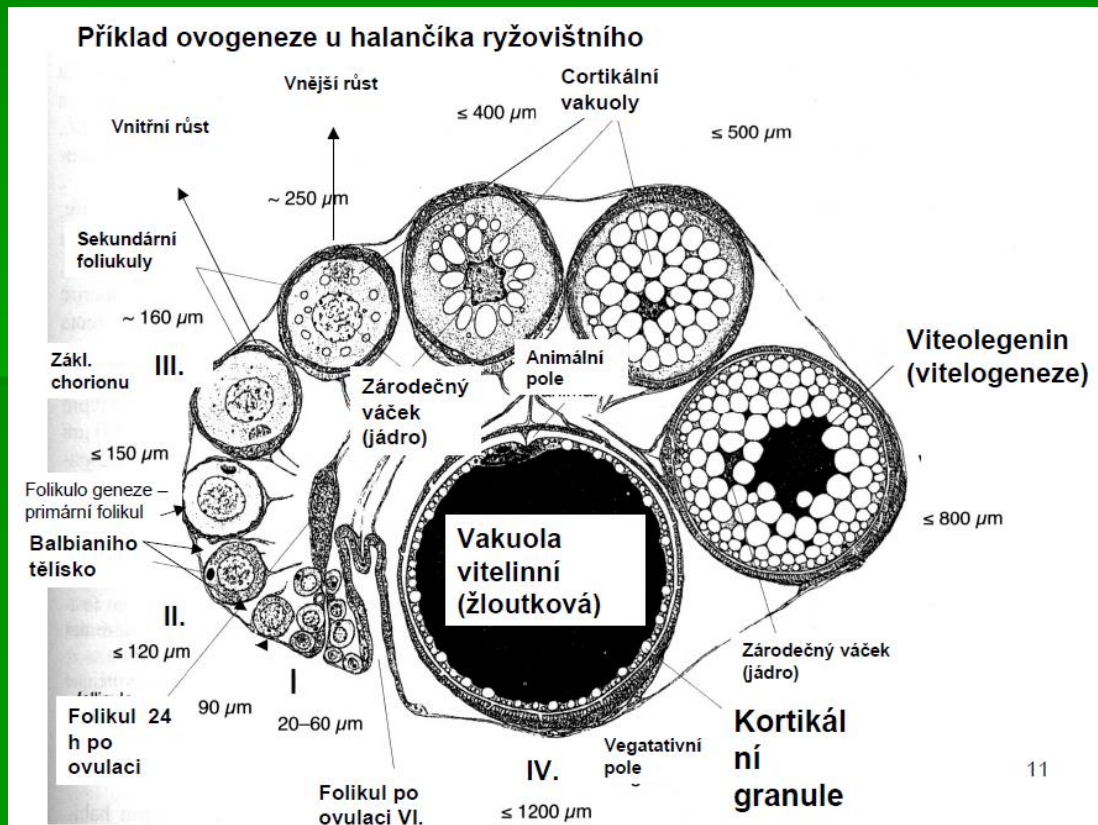
4.6.2007
KAPR MHC
AKTIVACE DESTILKA S BSA
MLÍČÁK 1

0:00:03:12

	ryby	muži
Rychlost	100-300	10-30 $\mu\text{m.s}^{-1}$
Hustota	1-10x10 ¹⁰	10 ⁸ spz.ml ⁻¹

Oogenéze

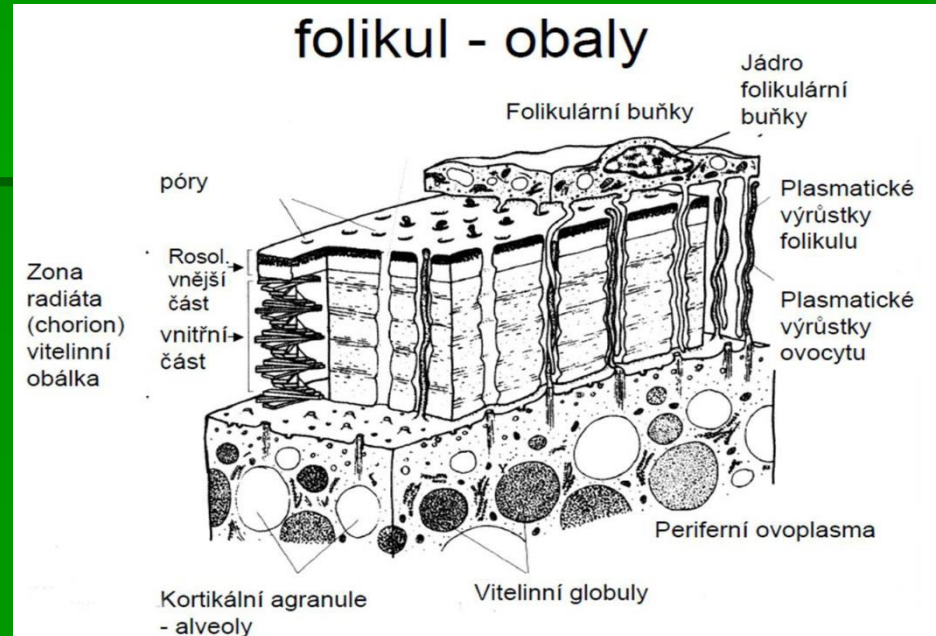
- Ovocyt primární – mitoticky se množí a jsou obaleny primárním folikulem (jednovrstevný epitel)
- Sekundární ovocyt vytváří rostoucí folikul (více vrstevný epitel, théka)
- Zralý folikul s vajíčkem – Gráfov folikul



Růst ovocytů v průběhu zadržení meiozy

A) Předvitelogenní růst – tedy vnitřní (protoplasmatický) růst

- Dochází k produkci ribozomální RNA a mRNA – mRNAs – prezentují se později jako receptory Vg (vitelinního růstu)
- Glycoproteiny se syntetizují a později formují v období vnějšího růstu do **kortikálních granulí**
- Začínají se vyvíjet ovocytární lipidy
- Vlastní folikul a jeho vnitřní struktura se vyvíjí do formy mikrovýrustků korespondující s výrůstky v oblasti zony radiata (vitelinní obálky ovocytu a budoucího vajíčka). Vlastní prorůstání **mikrovýrustků (klků)** obálky ovocytu do obalu folikulu je umožněno tvorbou tzv. **VE proteinu (vitelinního proteinu)**, **kontrolovaného estrogeny**. V místech výrustků se vytvářejí tzv. vnější kanálky pro transport především vitelogeninu.



B) Vitelogenin a jeho regulace

- Vitelogenin je glyko-fosfo-lipo-protein syntetizovaný v játrech s transportem přes cévní systém. Především se transportují strukturální lipidy a esenciální tuky.
- Produkce vitelogeninu je spojena u lososovitých s produkcí FSH – produkcí 17 beta estradiolu (tzv. E2) – který stimuluje jaterní vitelogenezi. U teplomilných druhů (kapr, karas) a převážné většiny ryb je vitelogeneze způsobena produkcí LH.
- Vitelogenin se dostává přes jednotlivé vnější a vnitřní vrstvy folikulu a vnější vrstvy ovocytu (kanálky) až k ovolemě, naváže se na specifický receptor v oblasti ovolemy a fúzuje s lysozomem.
- Následuje vznik žloutkového proteinu. Vitelogenin a z něj žloutkový protein představuje u sladkovodních ryb 80 % sušiny vajíčka

C) Formování žloutkového proteinu

- Z vitelogeninu se vytváří dva hlavní žloutkové proteiny – lipovitelin (Lv) a fosvitin (Pv).
- kontrolováno produkcí 17 beta estradiolu za účasti aromatázy. 17 beta estradiol vzniká za podpory aromatázy z testosteronu.

E) Umístění lipidů a jeho regulace

- Většinou u kostnatých ryb vitelogenin obsahuje zhruba 20 % lipidů z čehož je 60-80 % fosfolipidů tzv. polární lipidy. Polární lipidy - tvorba membrán. U pelagických jiker obsah olejových kapek - důležité pro výživu embryí a rovněž funkci jikry.

F) Formování vitelinní membrány (obaly, zona radiata)

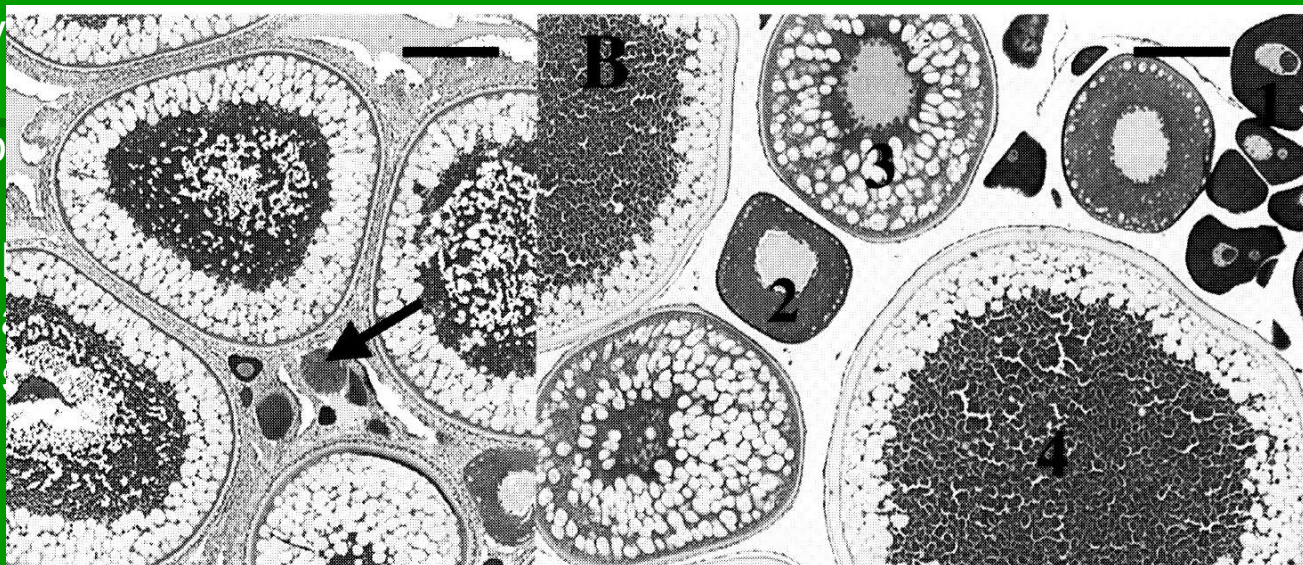
- Obecně v době růstu tvoří folikul - théka, folikulární epitel, rosolovitá vrstva budoucího ovocyty a vajíčka, zona radiata ovocyty (chorion) a kortikální vrstva v ovocyty. Regulováno komplexem hormonu E2.

Dozrávání

LH – je u ryb odpovědný za dozrávání. V době dokončení folikulu s ovocytem se LH naváže na receptor v théce, který spustí tvorbu tzv. indukčně-dozrávacího hormonu (MIH) v závislosti na meioze. LH je odpovědný za znovu nastratování meiozy

Stupně vývoje ovárií, tzv. stupně pohlavní zralosti

- 1) Stadium mladosti – ovária jako úzké lišty přiléhající ke stěně těla, pohlaví nelze makroskopicky rozlišit
- 2) Stádium klidu – u ryb po výtěru (u typu se synchronním zráním zárodečných buněk) případně dospívající. Ovária velmi malé s drobnými jikrami, makroskopicky špatně rozpoznatelné.
- 3) Stádium dozrávání ovárií, vyplňují až 1/3 tělní dutiny, zvětšují se (GSI 3-5%). Na vnitřní straně vaječníků výrazná krevní céva, nejdelší období.
- 4) Stádium zralosti – gonády jsou plně vyvinuté. Vyplňují 2/3 tělní dutiny. GSI 5-20 % podle druhu. Krátké období ve vývoji gonád.
- 5) Stádium výtěrové – probíhá ovulace jiker, které opouští tělo při malém tlaku na stěnu tělní dutiny. U lososovitých ryb prasknou vaječníky a jikry se dostávají do tělní dutiny a následně močopohlavním otvorem z těla ven. U kaprovitých ryb dojde k vyprázdnění v
- 6) Stádium po výtěrové jsou vyprázdněné. Go
teplomilných (kapra -
nad 18 °C gonády
asynchronním dozráv
a gonáda se vrací do



Příklad uložení gonád (párový orgán) u juvenilního lososa (obdoba u lososovitých ryb) nezákládá se vejcovod.

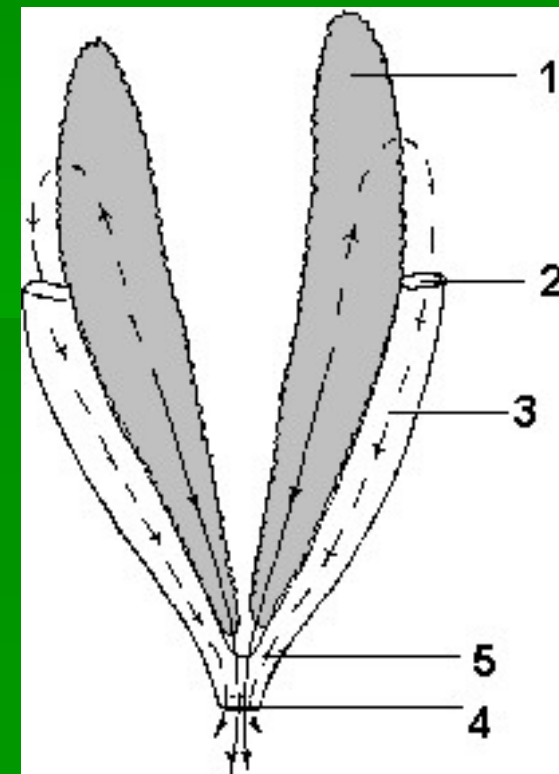


A – játra, b – ovária, c –pylorické přívěsky žaludku, d – žaludek, e- střevo, f – slezina, h – ledviny, g - střevo,

Ovarium protáhlý párový orgán v dorzální části zakončený vejcovodem s vývodem v močopohlavní papile za řitním otvorem

Výjimka např. jeseter, lososovití – ovulace jiker do tělní dutiny.

Okoun – samice mají nepárové, srostlé ovaria



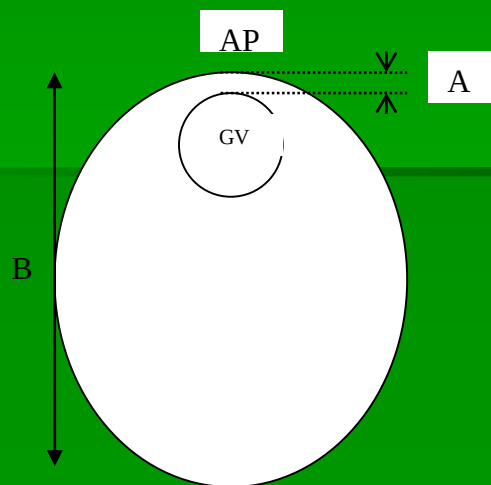
Určení zralosti oocytu

Biopsy



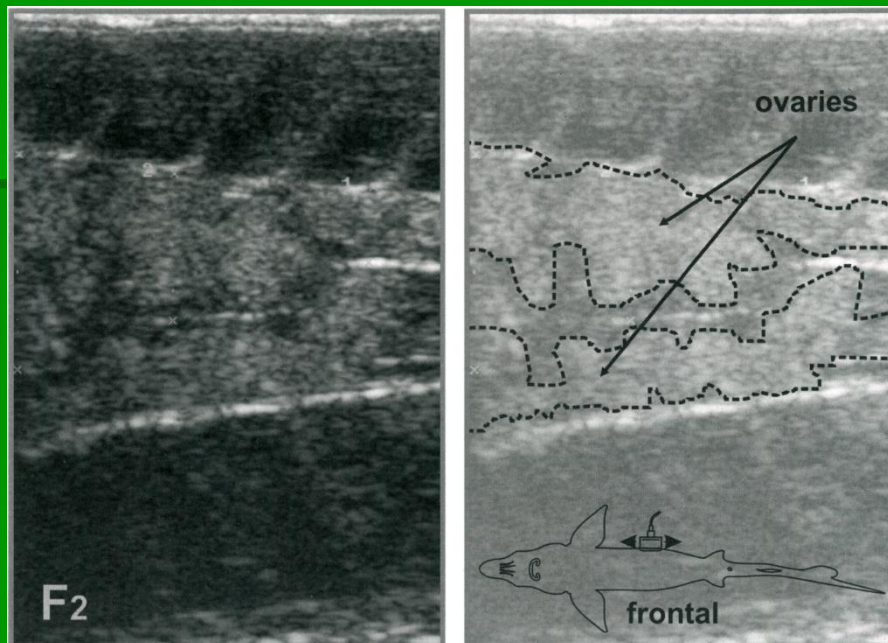
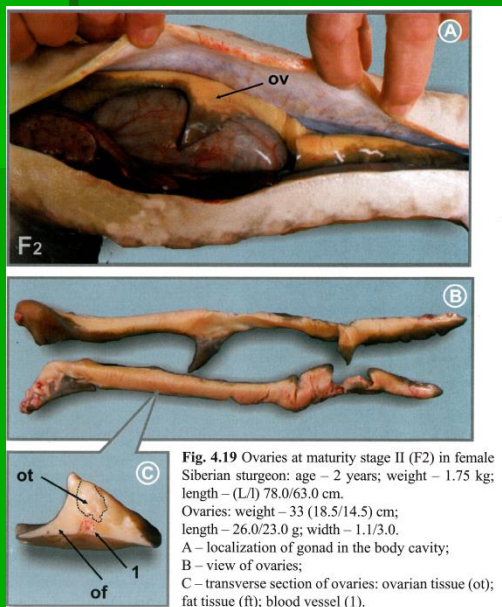
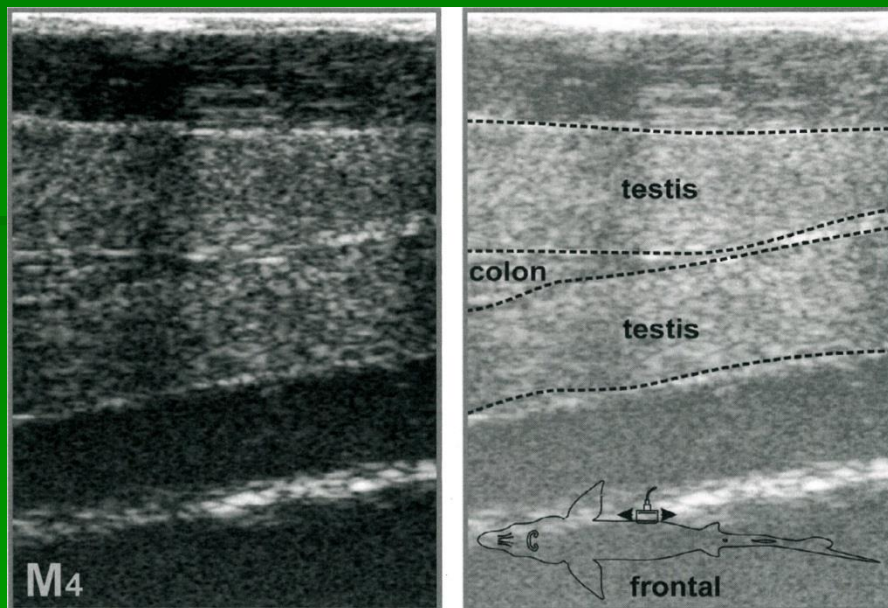
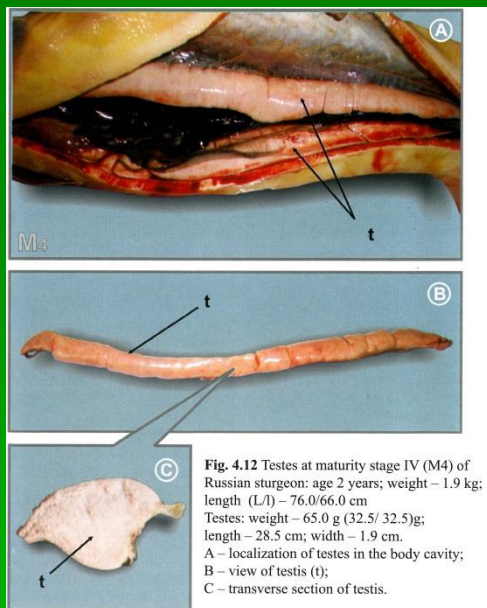
Sérův roztok:

60 ml of 96 % ethanol, 30 ml of 38 % formaldehyd, 10 ml 99% acetatic acid



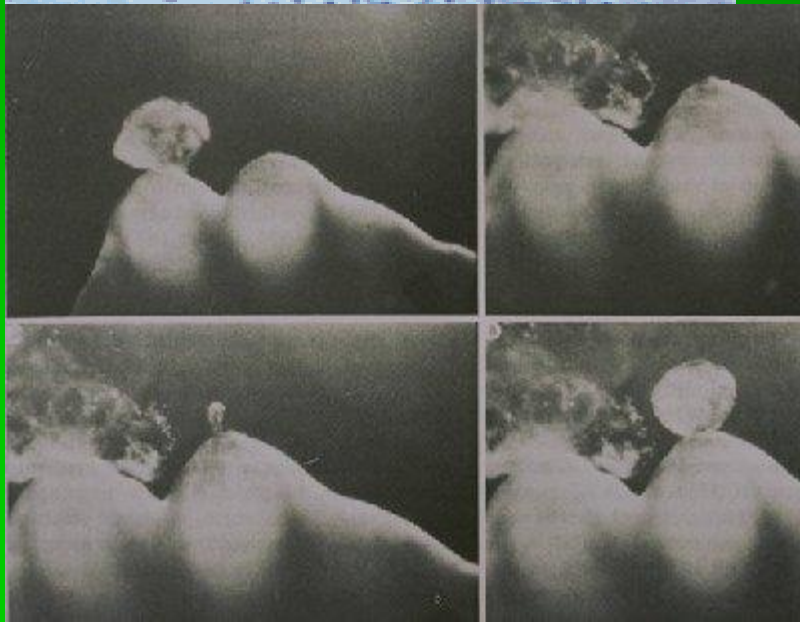
Optimální pozice jádra:
 $A/B \leq 0,07$

Určení pohlaví pomocí ultrazvuku

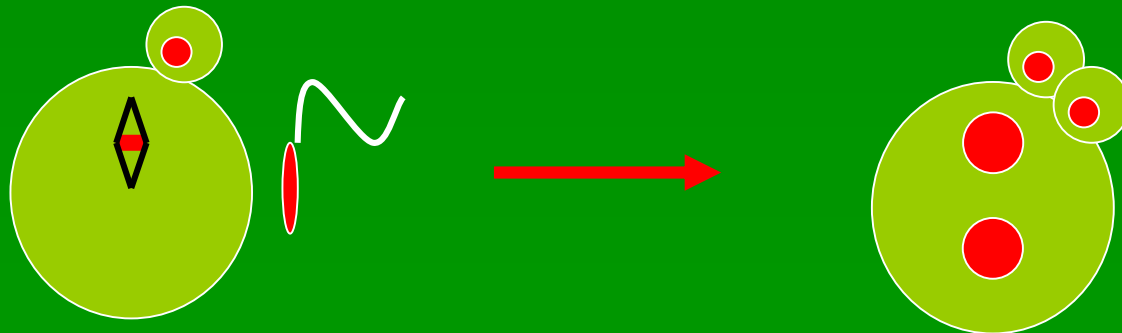
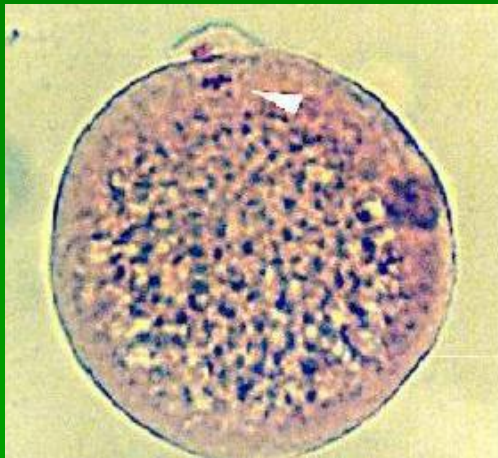


Kdy nastává ovulace?

- metafáze druhého meiotického dělení
- druhý meiotický blok
- vydělené 1. pólové tělísko



Meioza je dokončena po oplození



Savci

Klasické dogma od r. 1951

Meióza

- Zahájena a zastavena v těle samičího plodu
- Znovuzahájena v pubertě
- Znovu zastavena po dozrání vajíčka.
„Odbřžděna“ oplozením
- Opakuje se v každém pohlavním cyklu

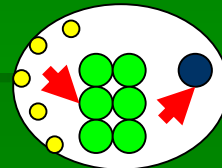
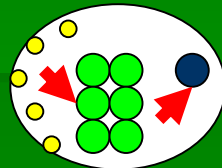
Pád „zlatého dogma“

15. 3. 2004

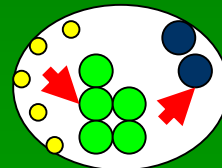
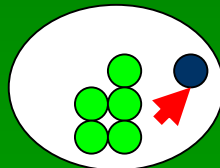
- **Jonathan L. Tilly – myš tvoří nové oocyty i po dosažení dospělosti**
- **Na ováriu jsou „germ stem cells“**
- **Neustále zaniká obrovské množství vajíček**
- **Neustále jsou nahrazována novými z GSC (zárodečných kmenových buněk)**

**Staré
dogma**

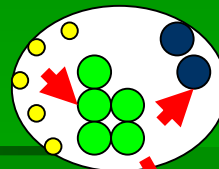
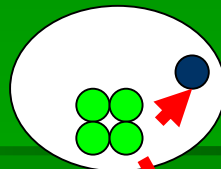
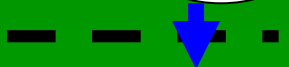
**Nové
dogma**



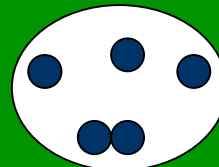
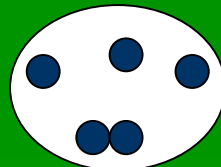
plod



mládě



**dospělá
samice**



**stará
samice**

Původ germ stem cells



- Zdroj – kostní dřeň
- Vycestují do krevního oběhu
- Zabudují se do ovária

Po transplantaci kostní dřeně nebo i krevní transfuzi může dojít k zabudování buněk dárce do vaječníku příjemkyně.

Pak by mohla žena počít dítě z vajíčka, které obsahuje DNA dárce. Dítě by nebylo biologicky její.



Oplození u ryb

Osemenění (inseminace) - smísení gamet

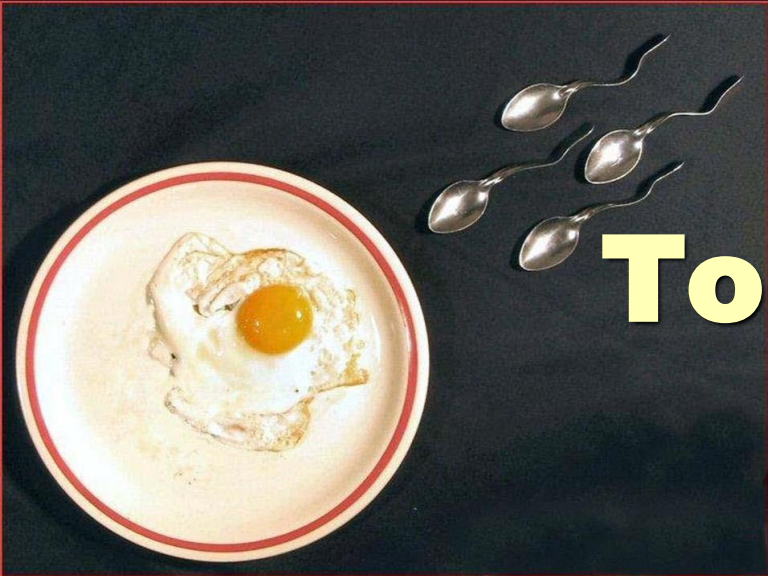
Aktivace gamet

- spermie jsou po aktivaci motilní (reverzibilní)
- u jiker dochází aktivací k ireverzibilním změnám (bobtnání, uzavírání mikropyle)

Oplození (fertilizace)

je proces následující po aktivaci gamet a je definován jako fúze samčích a samičích prvojader.

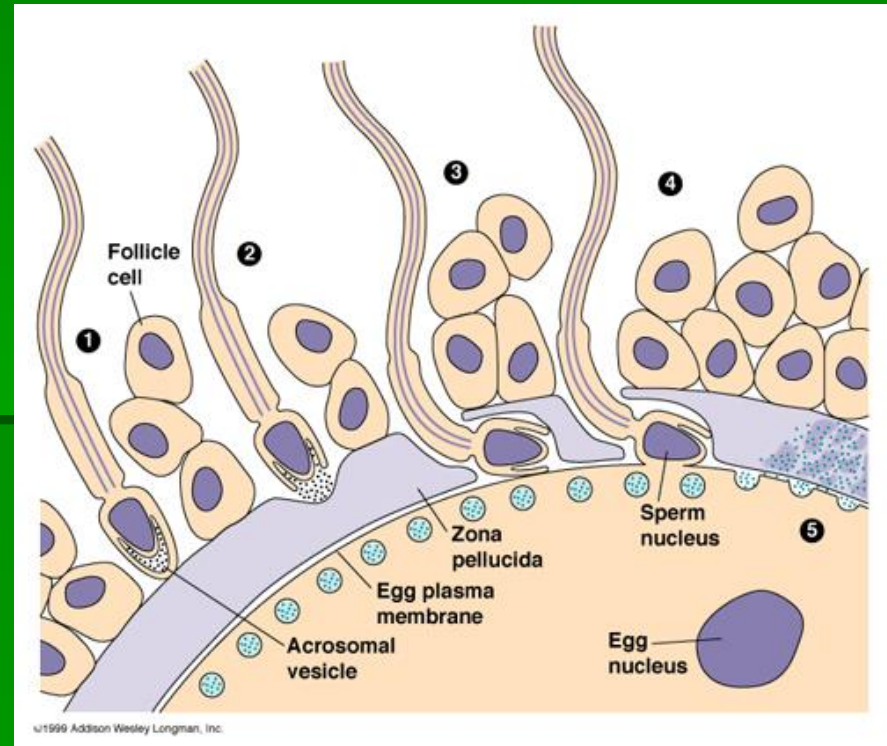
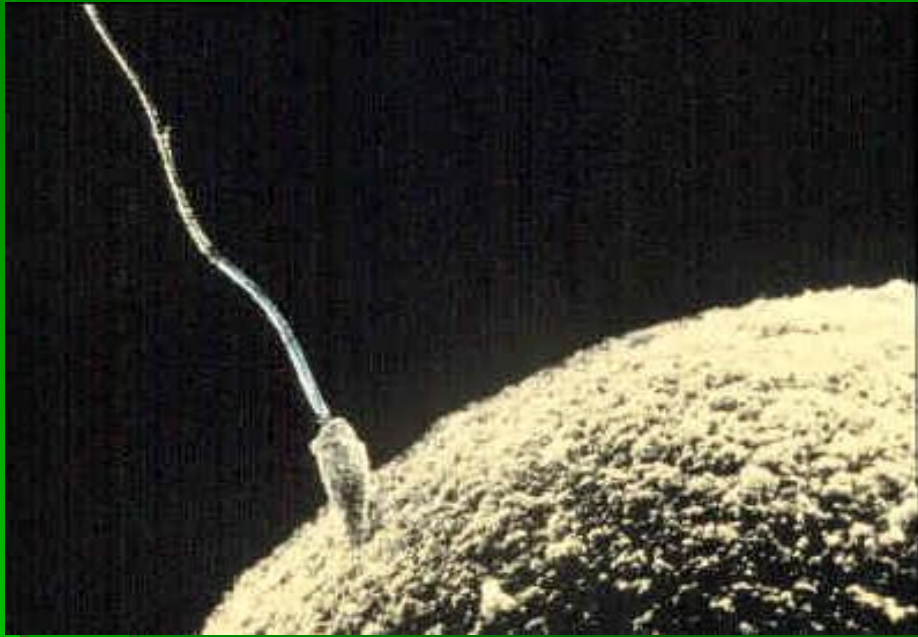
Platí, že vyhrává ta nejrychlejší



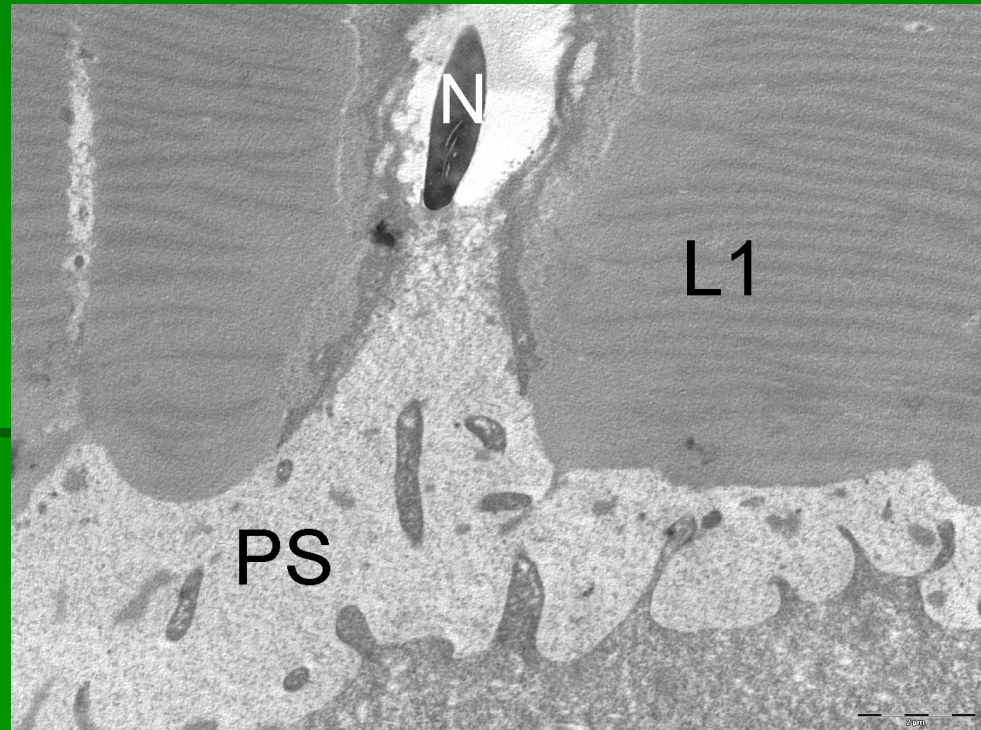
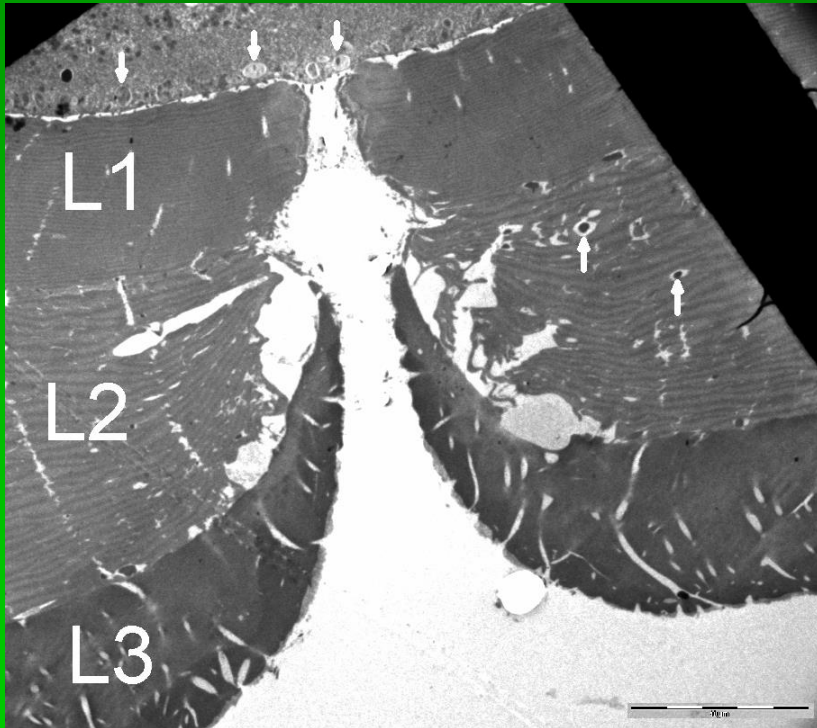
To neplatí u savců

- Prakticky všechna těhotenství jsou počata v období 6 dnů před ovulací
- Spermie může oplodnit vajíčko až za 6 dnů po ejakulaci
- Nejrychlejší spermie jsou v ampule za 30 minut – to je předčasné
- Často uspějí pomalé spermie

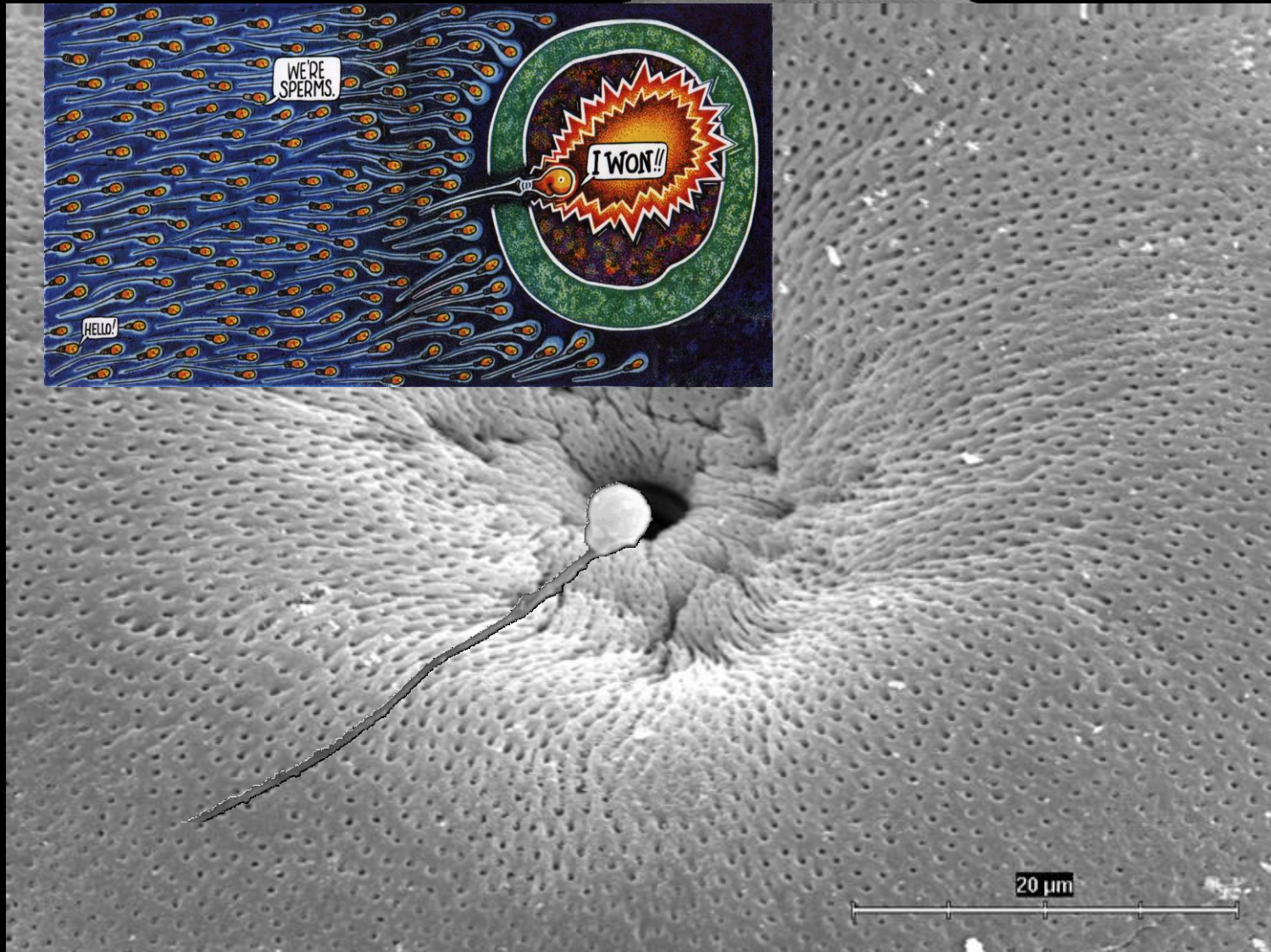
Penetrace u savců



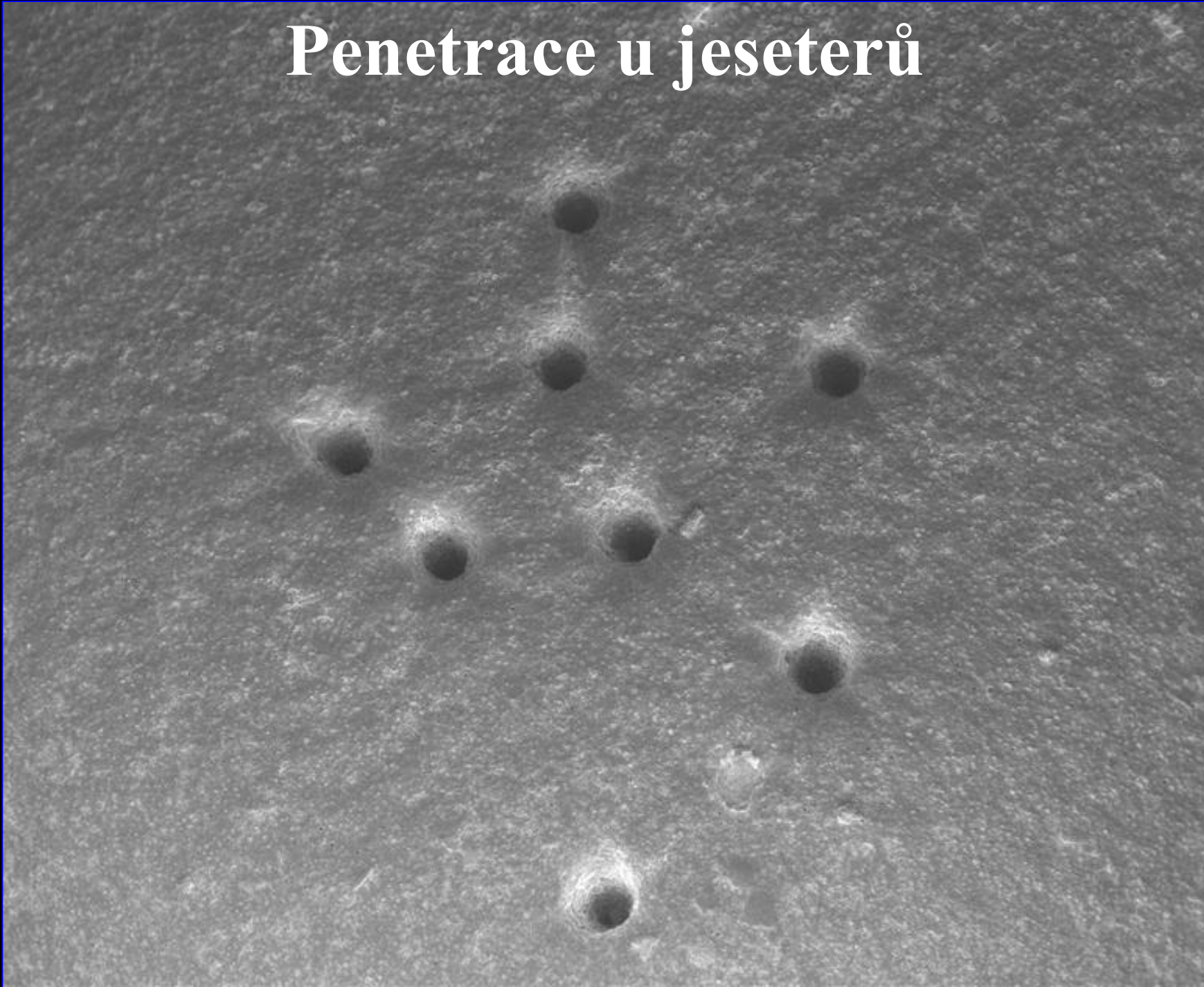
Penetrace u ryb pomocí mikropyle



Penetrace u kostnatých

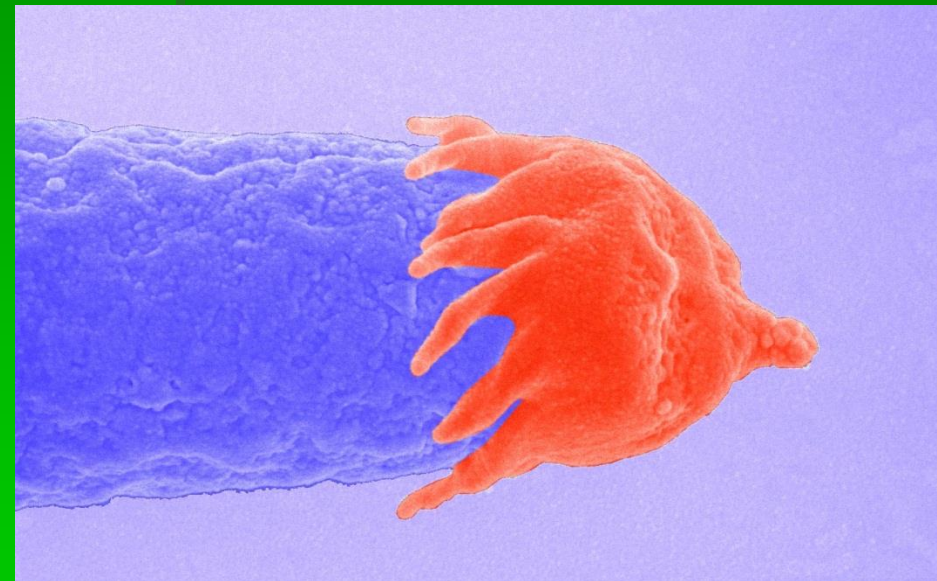


Penetrace u jeseterů

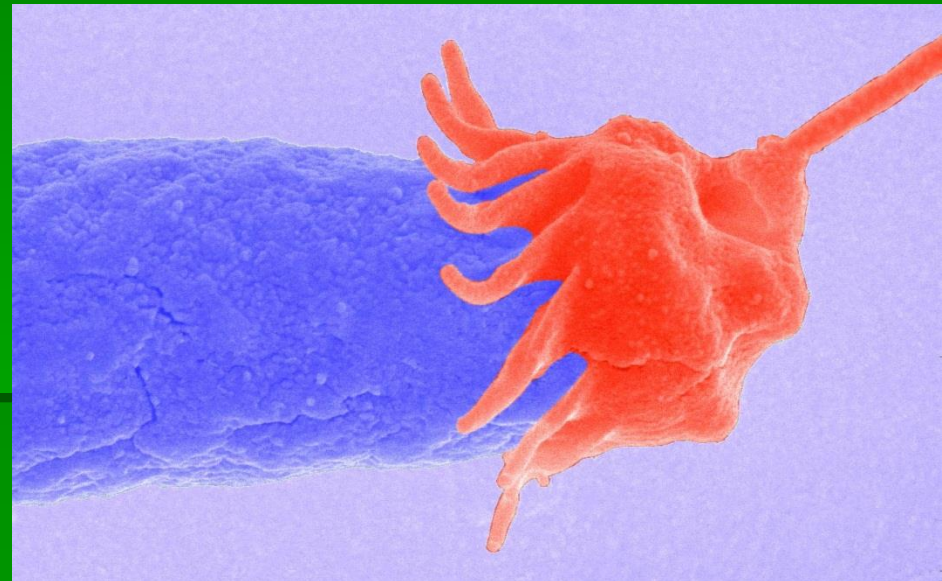


Akrozom u jeseterů

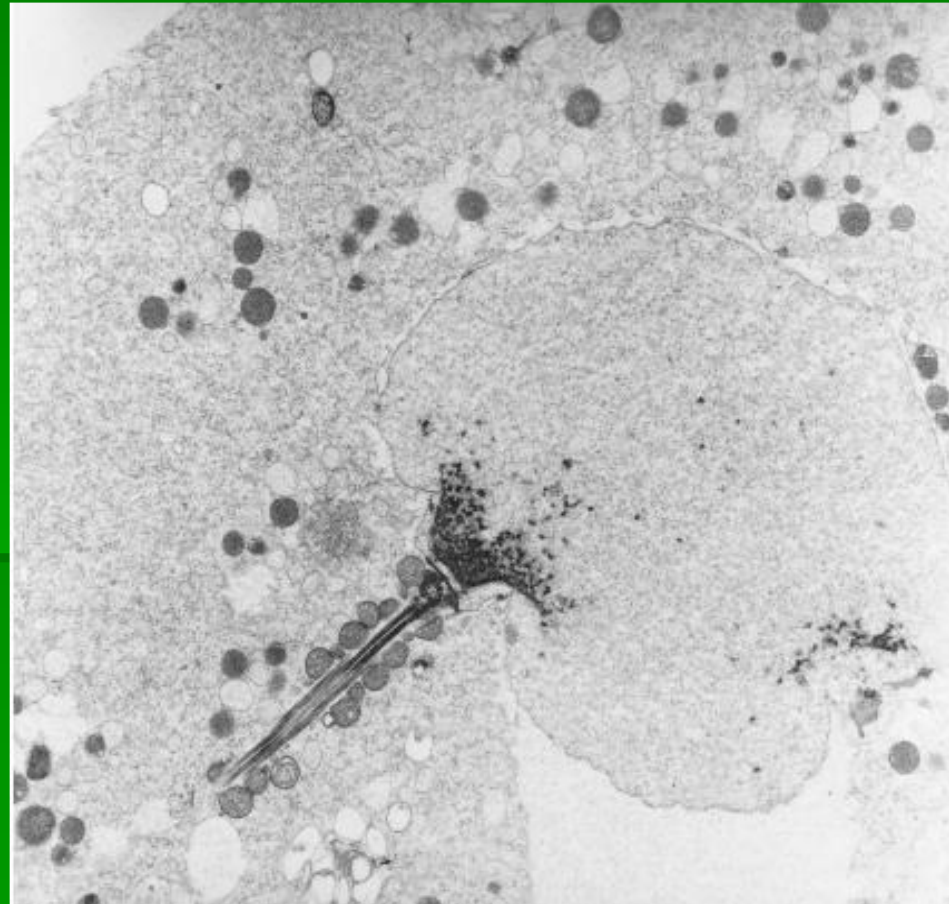
• Neaktivní akrozom



• Aktivovaný akrozom



Bičík proniká se spermií do oocyty?



Odhození bičíku je tradovaný omyl

Pattern of inheritance: Unlike nuclear DNA, which we inherit half from our mother and half from our father, mitochondrial DNA is passed on only by females. The reason is that when the sperm fertilizes the egg, it leaves behind all its mitochondria: the developing fetus therefore inherits mitochondria only from the mother's egg.

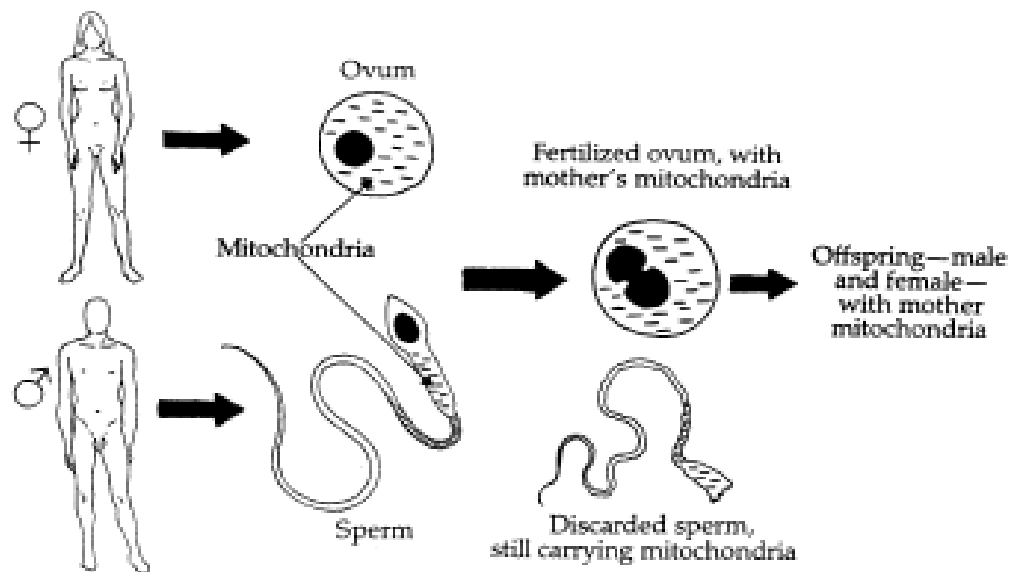
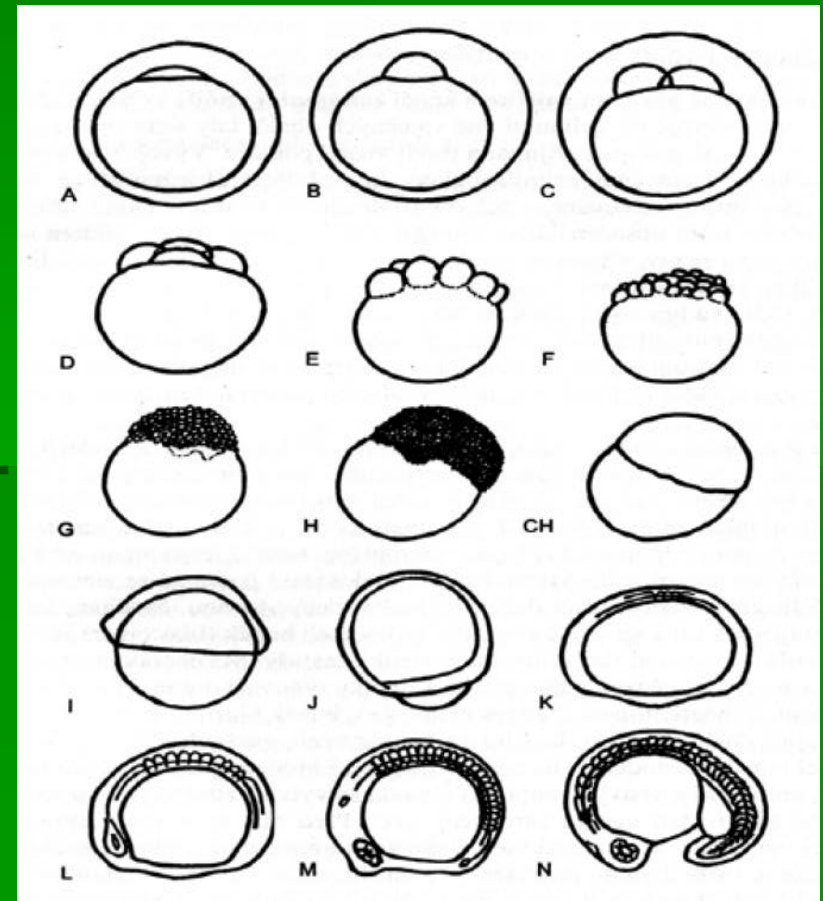


FIG. 2. One of the examples of the erroneous loss of the sperm tail depicted in a cartoon. [From Lewin (53) (Reproduced by permission of Blackwell Scientific, Oxford).]

Embryonální perioda

Telolecitální rýhování

A,B – blastodisk, C-H – morula,
CH – blastula, I,J – gastrula,
K,N- organogeneze
Stádia po vykulení



Embryogeneze lína - rýhování

after fertilization



1-cell



2-cell



4-cell



8-cell



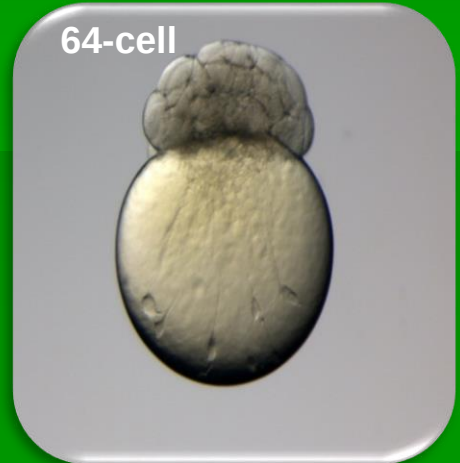
16-cell



32-cell



64-cell



Embryogeneze lína - Blastula

128-cell



256-cell



512-cell



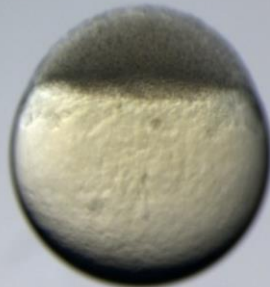
1k-cell



1k-2k-cell



oblong



sphere



dome-30% epiboly



Gastrula

50% epiboly



75% epiboly



90% epiboly



100% epiboly



Segmentace

4-somite



11_somite



20-somite



28-somite



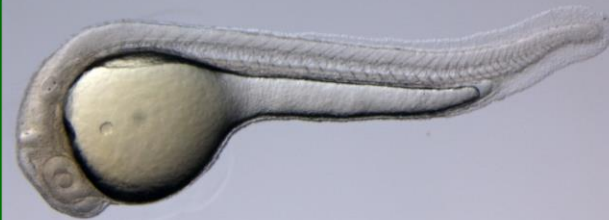
32-somite



35-somite



43-somite



45-somite



50-somite



Líhnutí



1st fry



1st fry



2nd fry



2nd fry



3rd fry



3rd fry



4th fry



4th fry



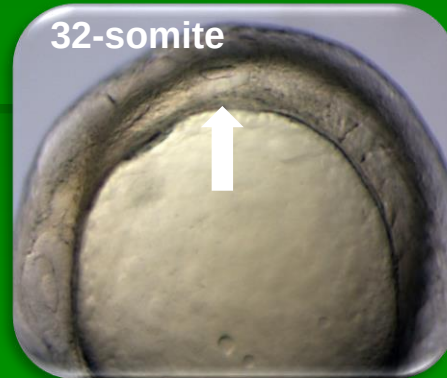
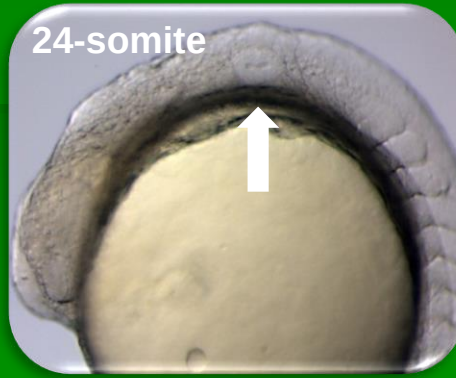
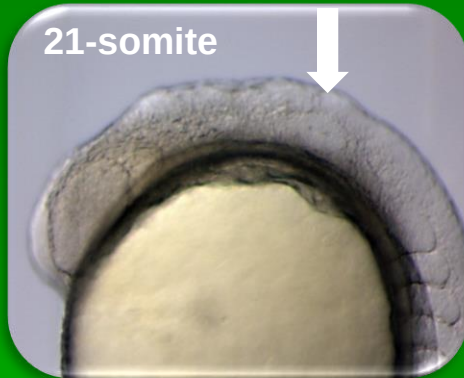
fry with gas bladder



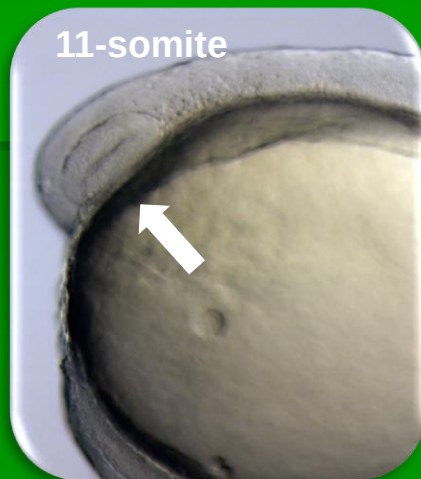
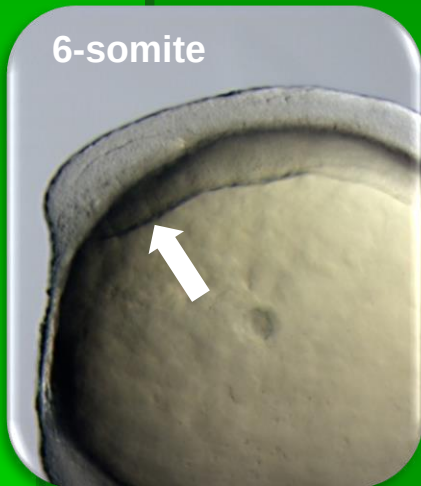
fry with gas bladder

Vývoj sluchového a optického orgánu

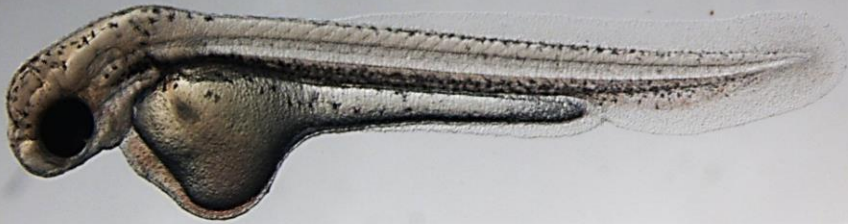
auditory organs (sluchové)



optical organs (optické)



Embryogeneze kapra

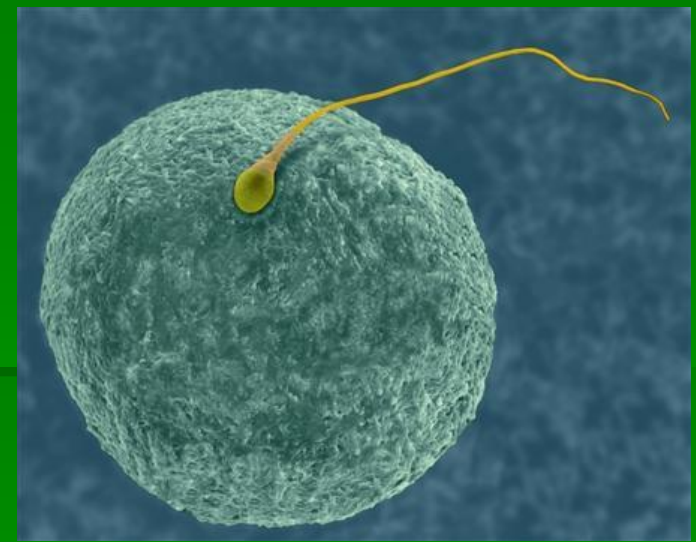


Nahradí biotechnologie sex?

Umělá spermie

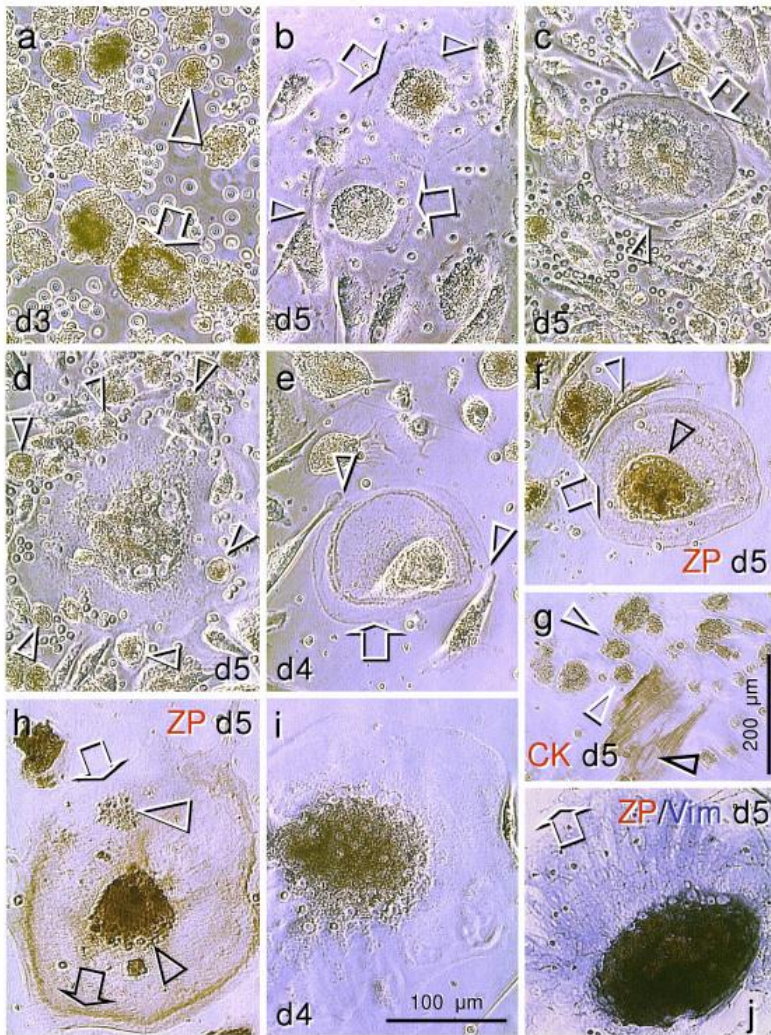


- Karim Nayernia 2009 Anglie – sperma inkubováno in vitro z embryonálních kmenových buněk
- Zákon ho neumožňuje použít k oplození

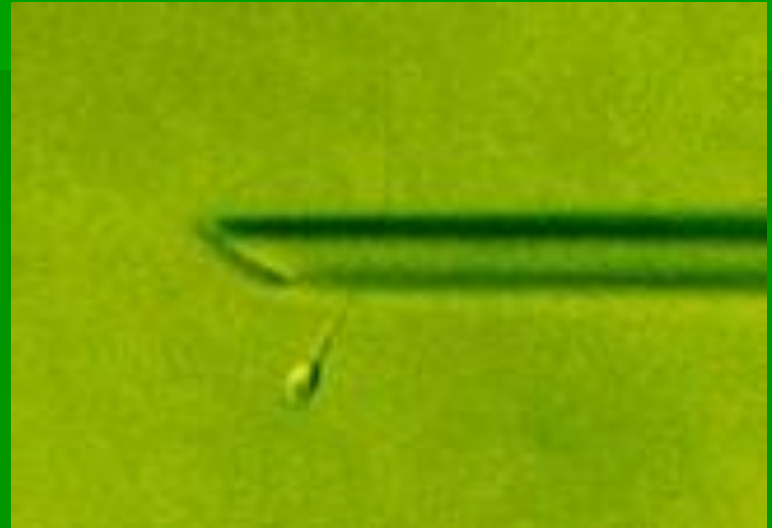


Umělé vajíčko

- Jonathan Tilly izoloval z žen kmenové buňky určené k produkci vajíček. Z těch byly inkubovány funkční vajíčka!



Injekce spermie do cytoplasmy vajíčka (ICSI)



Incest ve zkumavce



Jeanine Salomonová



Dr. Sahakian

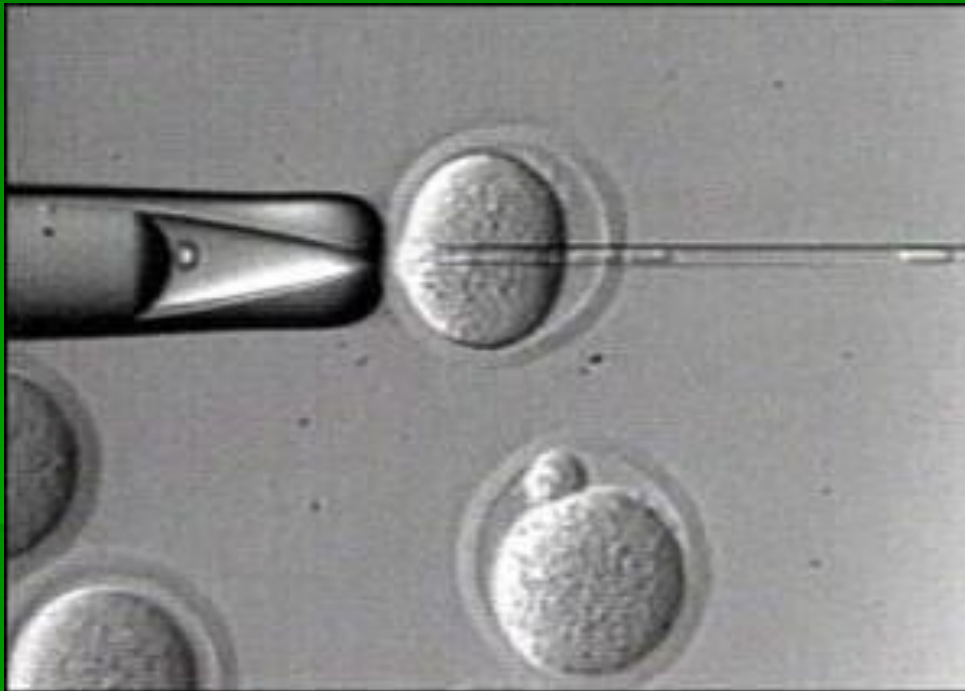
**62letá francouzská učitelka v důchodu
donosila dítě počaté po IVF vajíčka
anonymní dárkyně
Dárcem spermatu byl její bratr**

Akrozom savců má negativní vliv na vývoj embrya vzniklého po ICSI

- U spermie s akrozomem je zpomaleno uvolňování vápníku pro aktivaci oocyту
- Obsah akrozomu může poškodit oplozený oocyt
- Za odhození akrozomu před penetrací spermie je zodpovědný lysolecitin
- Ošetření spermie před ICSI lysolecitinem zlepšuje následný embryonální vývoj

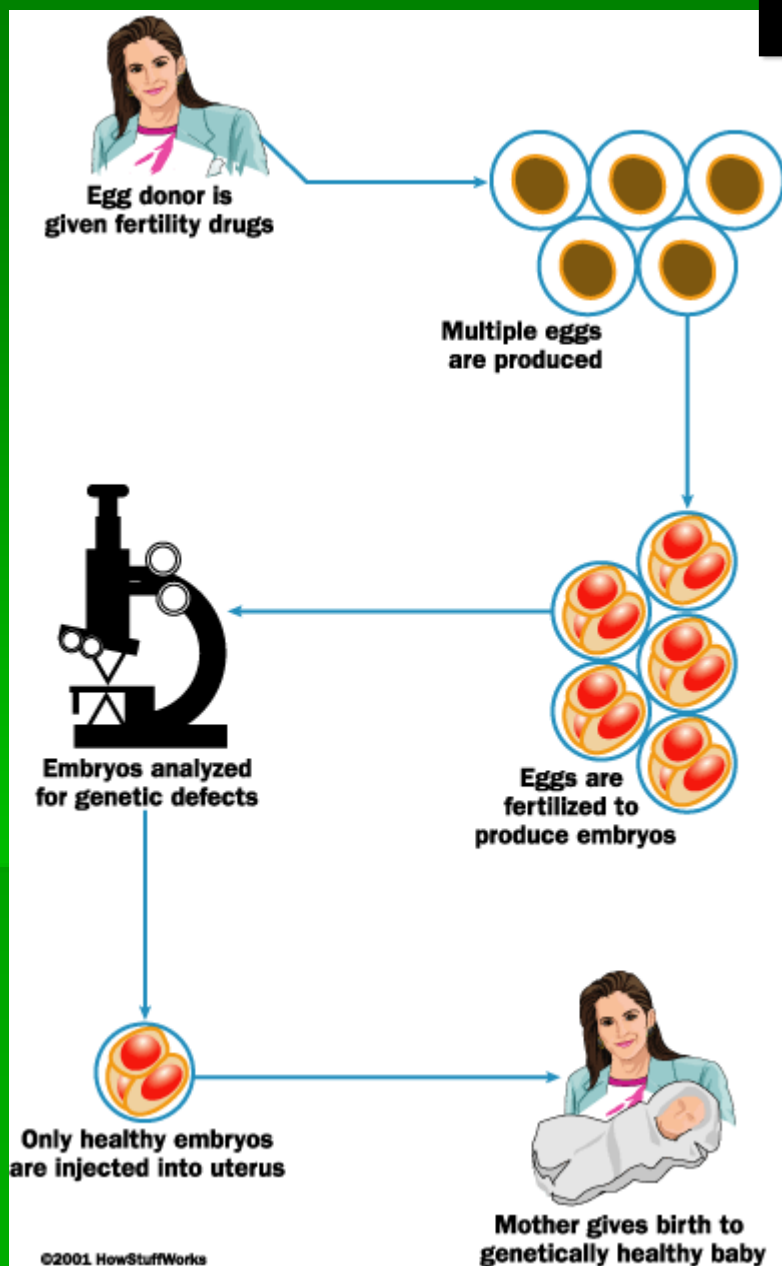
Oplození vajíčka tělní (somatickou) buňkou

Orly Lacham-Kaplanová



Zatím jen experimentálně
vývoj do blastocysty – myš

Předimplantační genetická diagnostika



Obecně u přirozeného početí 1/4 vajíček mají potenciál vyvinout se po oplodnění v dítě. Jedno až dvě další vajíčka mohou po oplodnění vést k těhotenství, to však končí potratem. Často se dělí partenogeneticky do 3-tího dne.

Transplantace se vždy provádí ve stádiu blastodisku.

Genetická analýza pólových tělísek



Příště – genomové manipulace a chiméry

