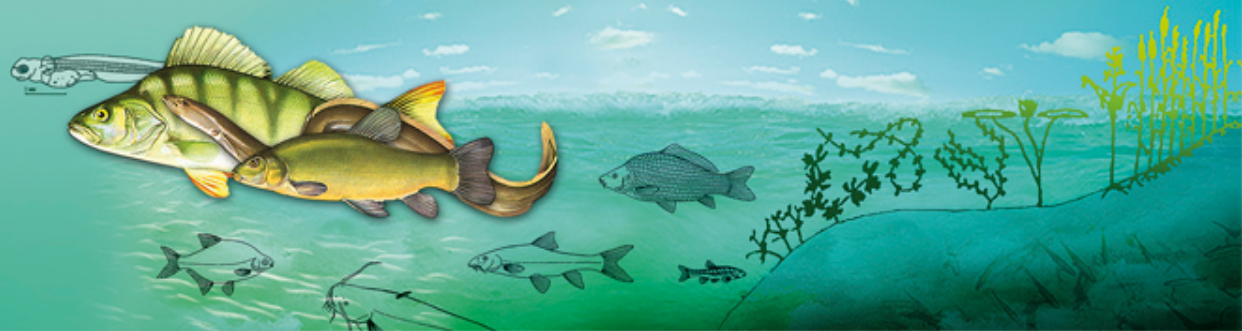




Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice
Czech Republic

Reproduction



Martin Pšenička

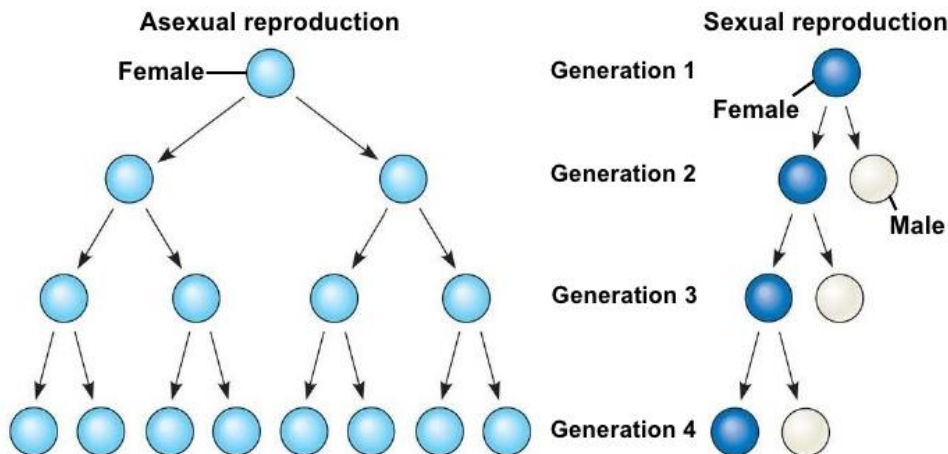
www.frov.jcu.cz



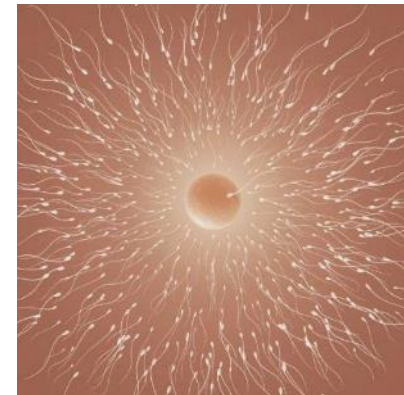
Vývoj pohlavního rozmnožování

Rozmnožování	Nepohlavní	Pohlavní
Výhody	Efektivní ve vhodných podmínkách; není nutný partner, vyžaduje méně energie	Vzniká genetická variabilita – adaptace na měnící se prostředí, zvyšuje se síla přirozeného výběru
Nevýhody	Žádná genetická variabilita, fixace škodlivých mutací	Vyžaduje více jedinců – více energie

The twofold cost of sex



Vývoj pohlavního rozmnožování se vyvinul spolu s meiotickým dělením a produkcí gamet - gametogeneze.

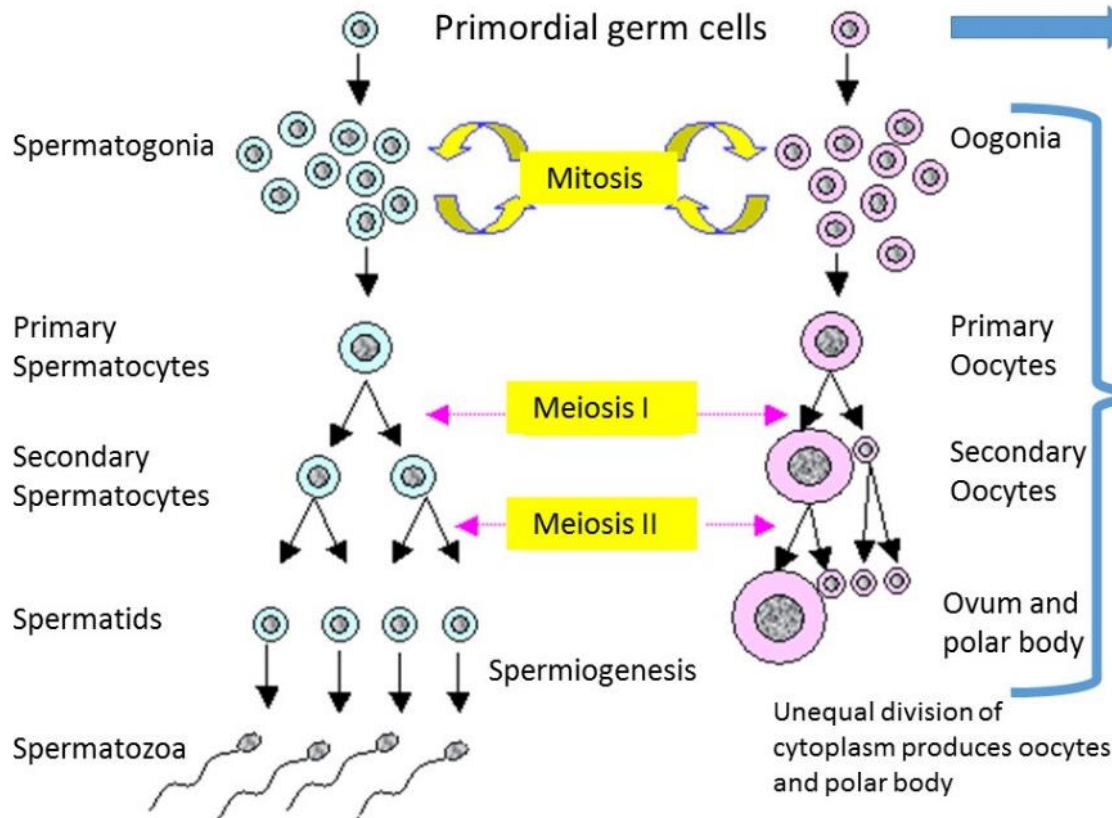




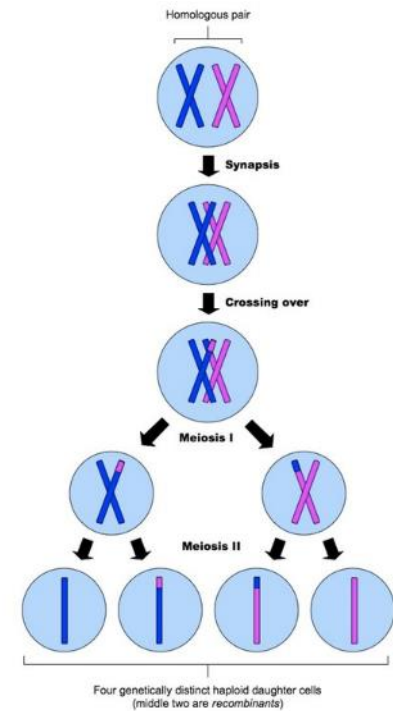
Gametogeneze – přehled

Spermatogeneze

Oogoneze



Meiosis



Gametogenesis is a developmental process during which a small number of diploid germ stem cells produce a large number of highly differentiated gametes carrying a haploid recombined genome (+ a polar body in oocyte).



Vývoj PGC Specifikace

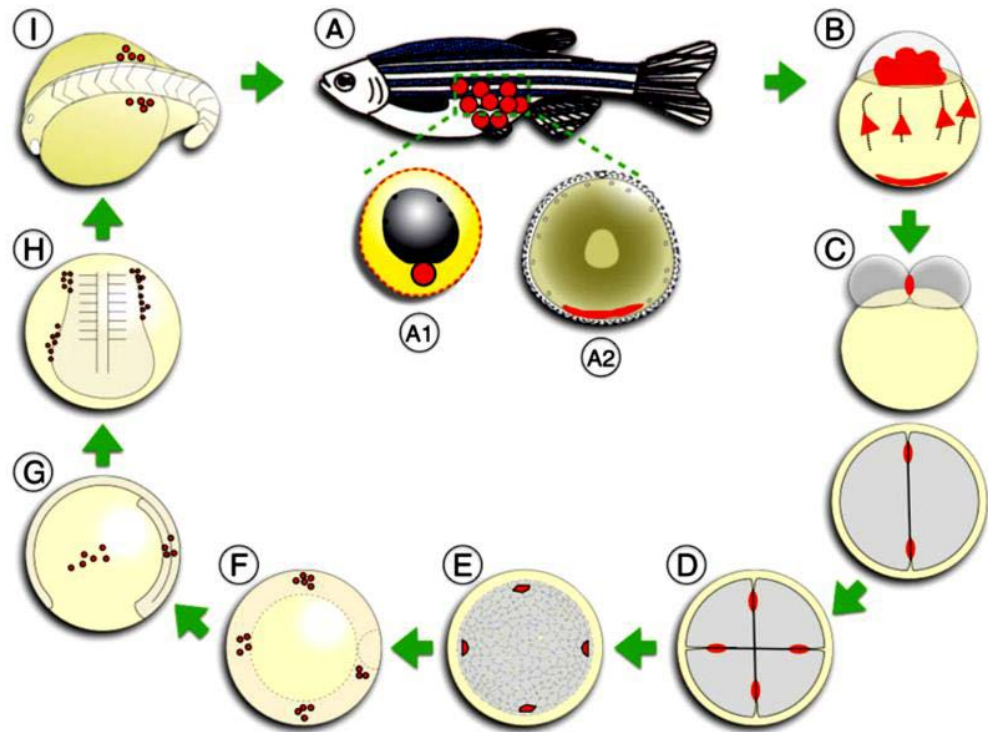
Savci - epigeneze

PGC je specifikováno pomocí indukčních signálů okolních somatických buněk.

To umožňuje tvorbu PGC *in vitro* (Hayashi et al. 2011).

Ryby (obecně) - preformace

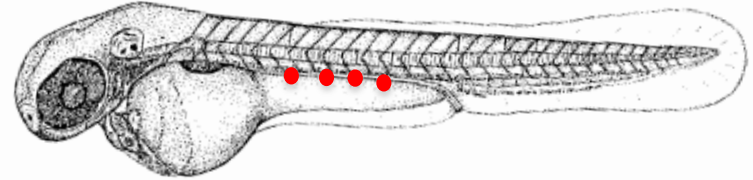
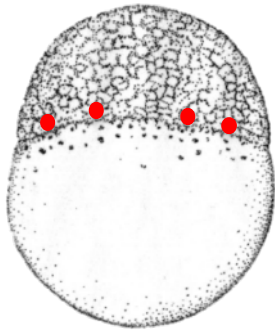
PGC je specifikováno maternálními determinanty – germ plasm.



Roland Dosch (2015)

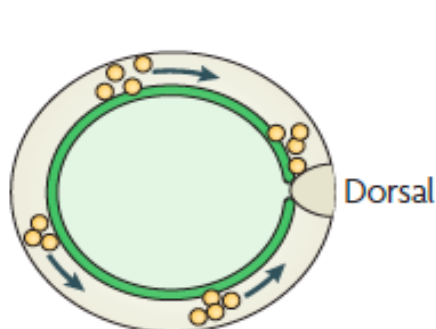


Vývoj PGC *Migration*

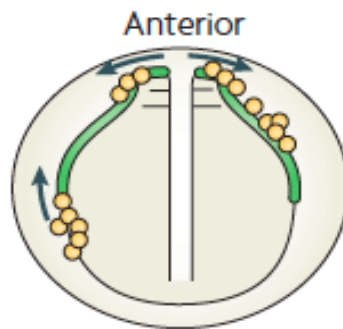


PGC exprimující receptor CXCR4b migrují podle signálu somatických buněk exprimující chemokin SDF1a (Doitsidou et al., 2002)

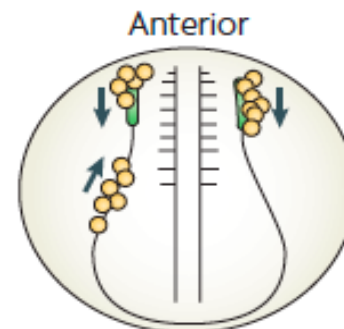
● PGCs ■ SDF1a expression



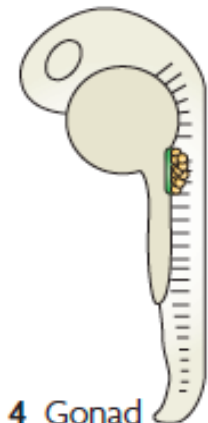
1 Migration to dorsal side



2 Migration to intermediate targets



3 Migration to final targets

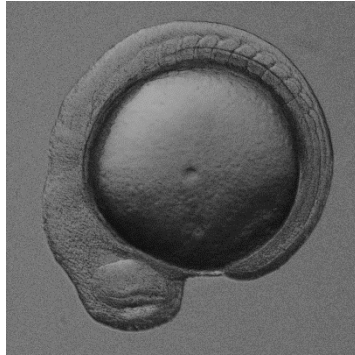


4 Gonad formation

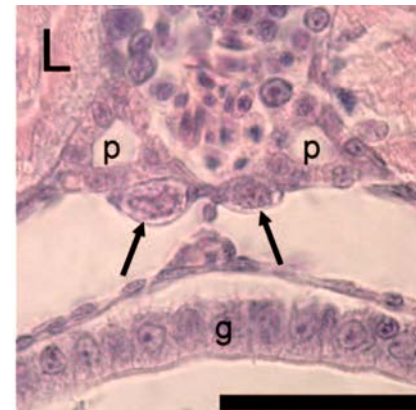
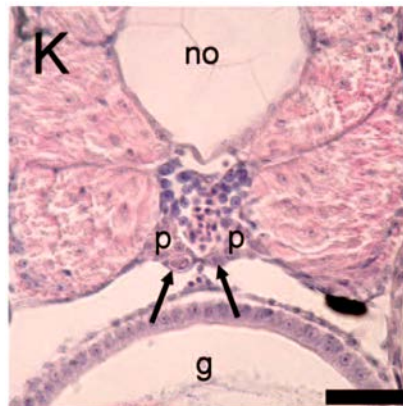


Zárodečné buňky v zárodečné rýze

Somitogeneze (segmentace) – PGC migrují obklopené mezodermálními somatickými buňkami



PGC dosednou na dorsální stěnu tělní dutiny, kolonizují nediferenciovanou gonádu a jsou nazývány gonocyty. Začínají se proliferovat (společně se somatickými buňkami) a diferenciovat do spermatogonií a oogonií.



(Fujimoto et al. 2006)



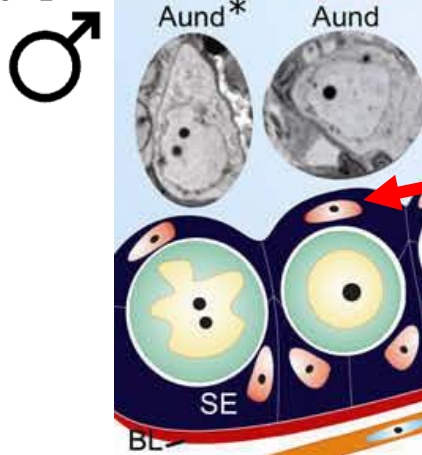
Zárodečné buňky v zárodečné rýze

Existuje velká rozmanitost v rozmnožovacích strategiích ryb:

Pohlavní stabilita (gonochorismus, hermaphroditismus)

- Determinace pohlaví – gen(y) determinující pohlaví na pohlavních chromozomech (XY, WZ, WXY) nebo autozomech nebo další faktory (sociální, environmentální...)
 - Synchronní a asynchronní oogeneze
- ... není předmětem této prezentace

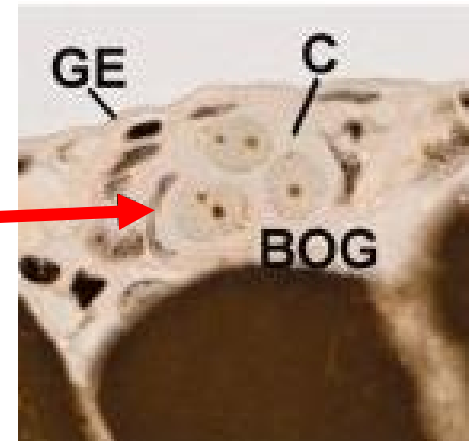
Obecně – pohlaví determinující faktor (SRY, DMY) aktivuje specifické transkripční faktory (SOX9), které způsobují diferenciaci podpůrných somatických buněk gonády produkující steroidní hormony a ty pak diferencují zárodečné buňky



Schulz et al. 2010

Pre-sertoli cell

Pre-granulosa cell



Quagio-Grassiotto et al. 2011



Gametogeneze

Hormonální regulace

Centrální regulace reprodukce
Hypotalamus–**Hypofýza**–Gonáda

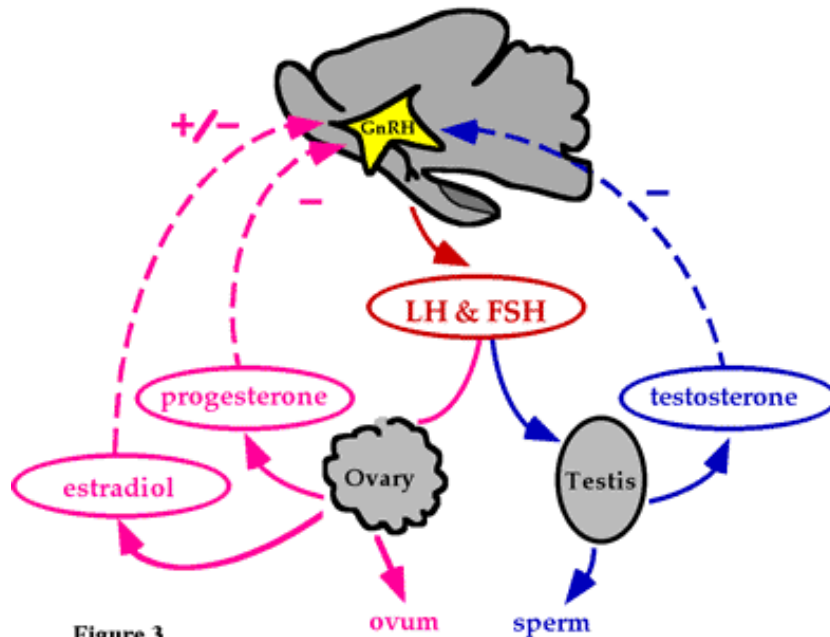


Figure 3

Gonadotropin releasing (uvolňující) hormon (GnRH)
(Hypothalamus)

Luteinizační Hormon (LH)
Folikuly stimulující hormon (FSH)
(Hypofýza)

LH a FSH stimulují somatické buňky gonády k produkci steroidních hormonů důležitých pro jednotlivé fáze gametogeneze.

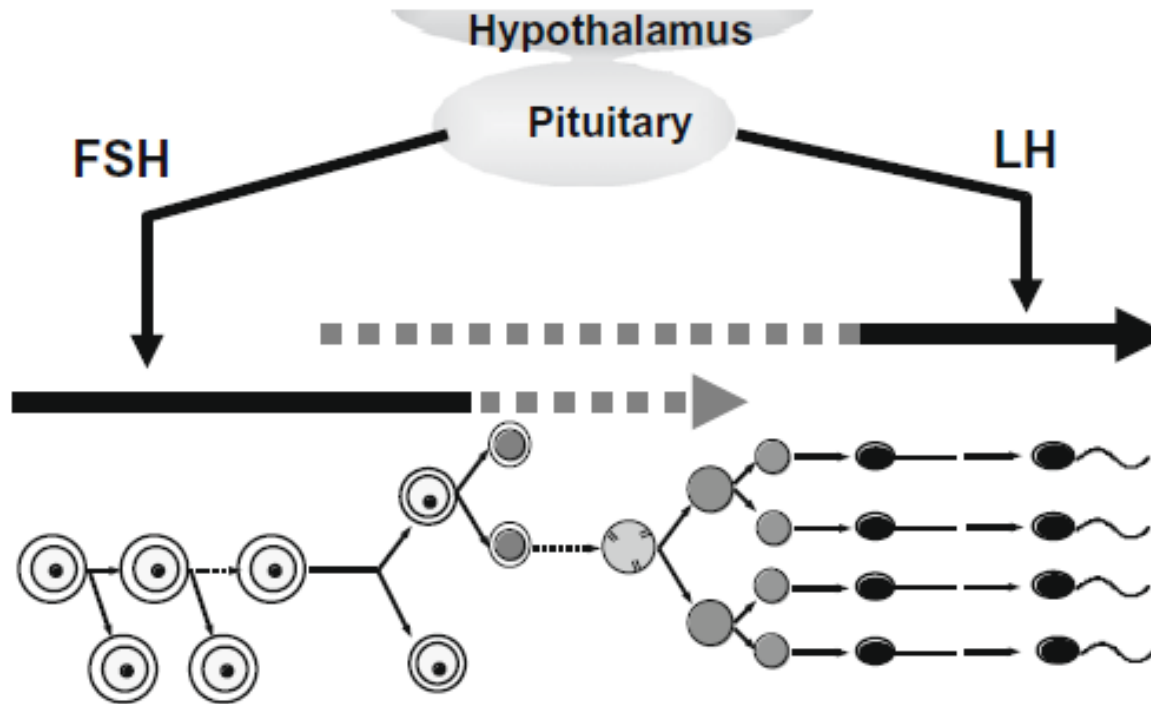
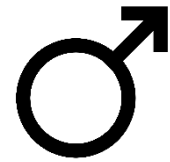
Podpůrné somatické buňky ovaria – **buňky theky** a **granulózní buňky** a testes - **Leydigovy** a **Sertoliho buňky**

Zárodečné buňky



Gametogeneze

Hormonální regulace



Proliferation → Meiosis initiation → Spermiogenesis → Spermiation

11-ketotestosterone (11-KT)

17 β estradiol (E2)

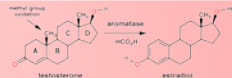
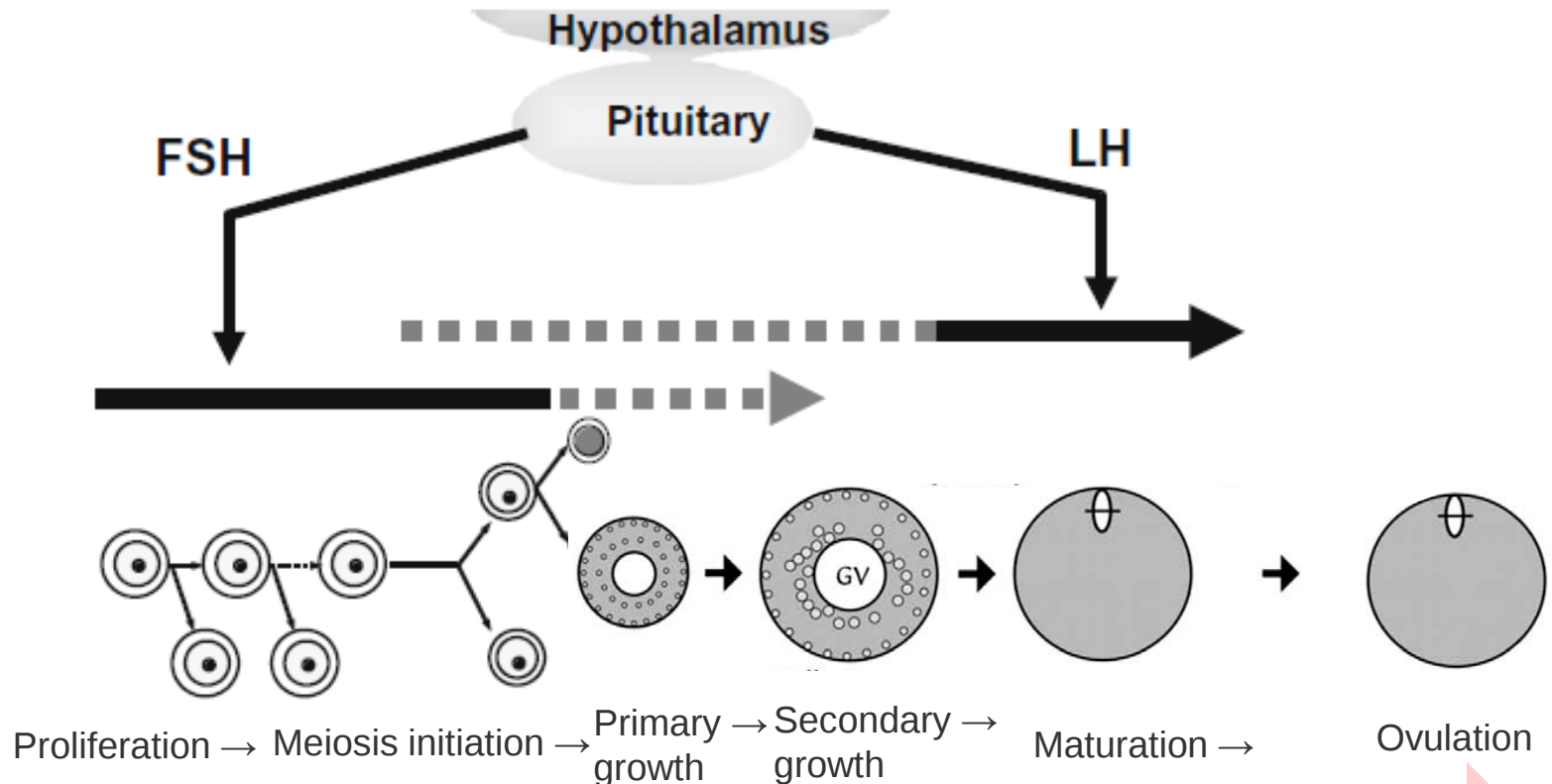
Progesterone (DHP)

DHP – 17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one



Gametogeneze

Hormonální regulace



17 β estradiol (E2)

Progesterone (DHP)

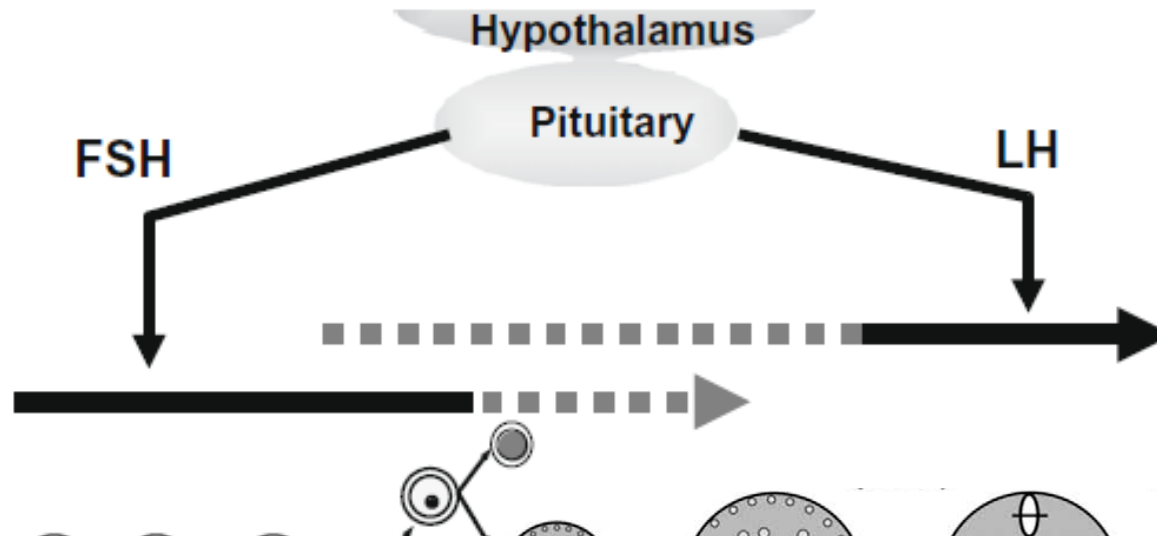
Progesterone (DHP)
Prostaglandin

DHP – 17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one



Gametogeneze

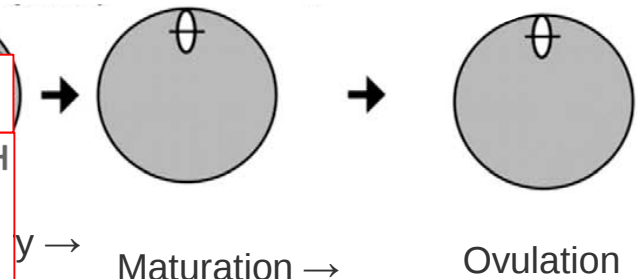
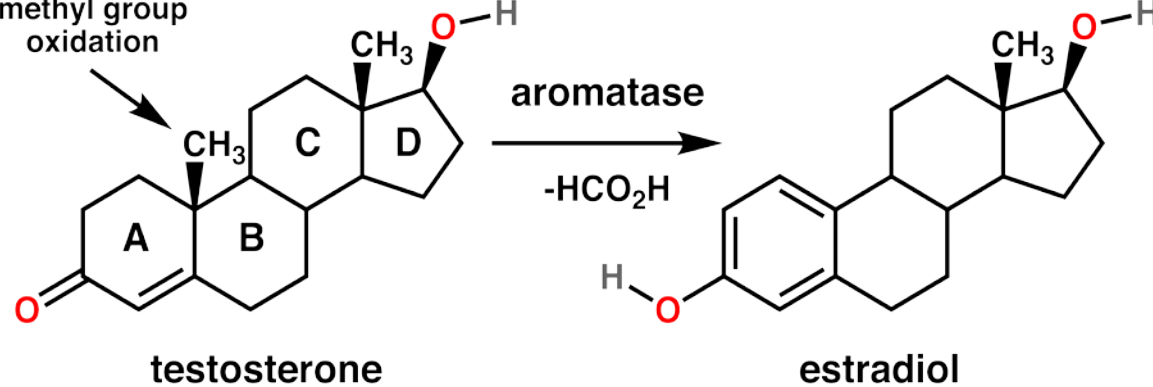
Hormonální regulace



Theca cells

Granulosa cells

methyl group
oxidation



Progesterone (DHP)
Prostaglandin

DHP – 17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one



Spermatogeneze

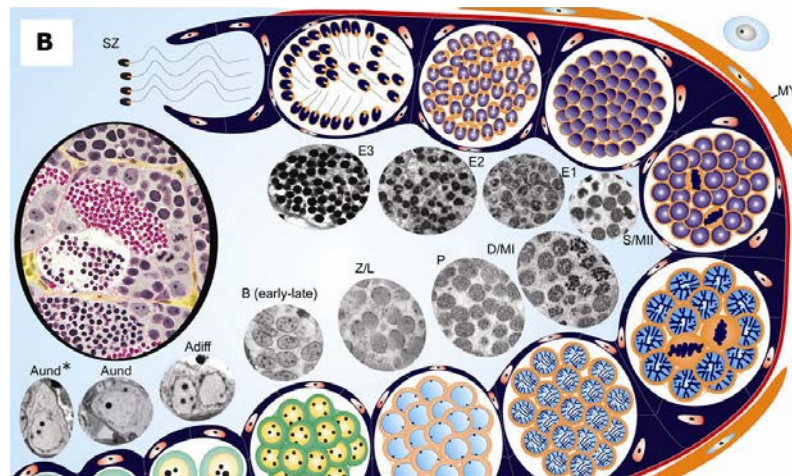
Struktura testes



Obratlovci mají teste složené ze dvou částí:

- 1) Intersticiální tkáň – Leydigovy buňky, krevní buňky, nervové buňky, makrofágy a bílé krvinky, pojivová tkáň
- 2) Semenotvorné kanálky – obsahuje zárodečné a Sertoliho buňky. Kanálky jsou obalené basální membránou a myoidními buňkami (charakter hladké svaloviny).

Sertoliho buňky – produkují steroidní hormony, obklopují spermatickou cystu a kontrolují každou fázi spermatogeneze. Vylučují semennou plasmu, fagocytují apoptotické zárodečné buňky a nepoužité spermie.



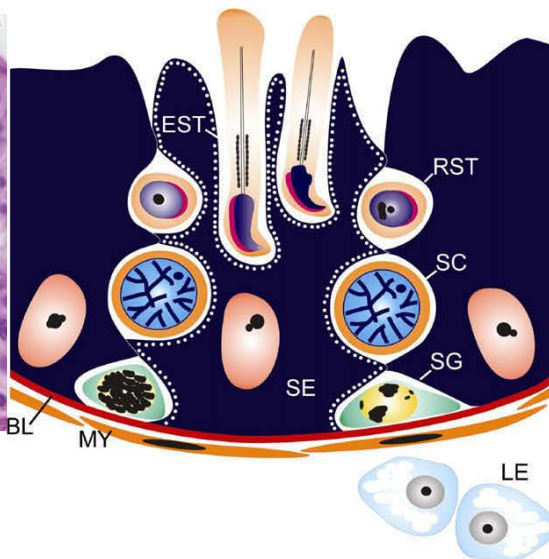
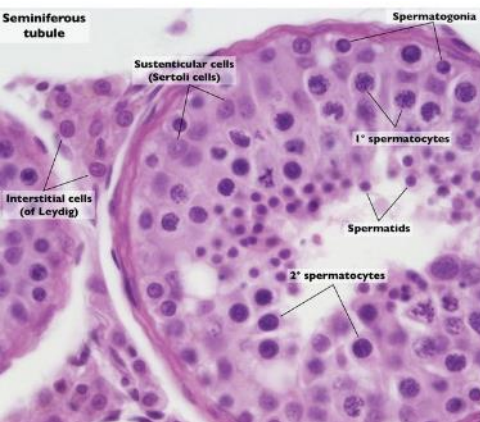


Spermatogoneze

Struktura testes

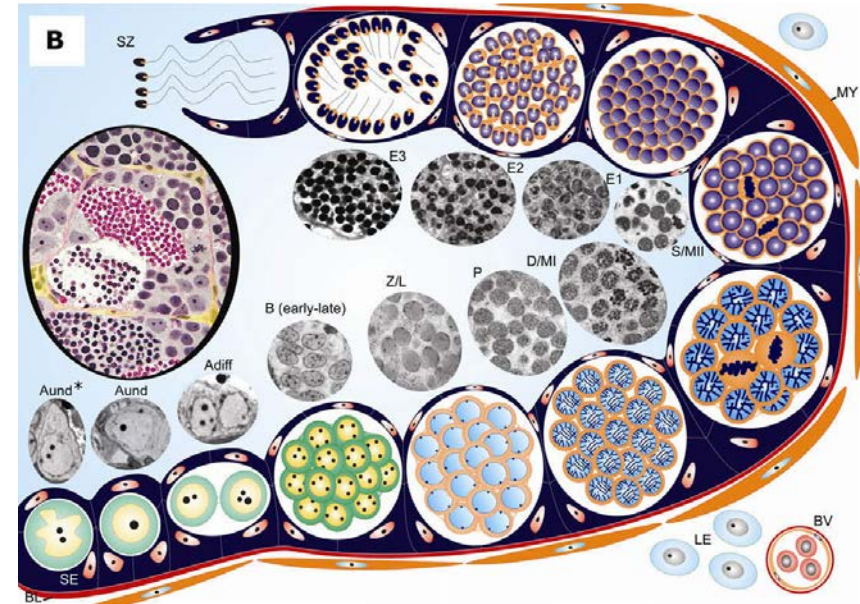
Savci (myš) – vývoj zárodečných buněk bez cyst

Jednotlivé zárodečné buňky se vyvíjejí a putují z periferie semenotvorného kanálku do lumenu nezávisle na sobě.



Ryby (zebračka) – vývoj v cystách

Zárodečné buňky, které vznikly z jedné spermatogonie, se vyvíjejí v cystě obklopené Sertoliho buňkami



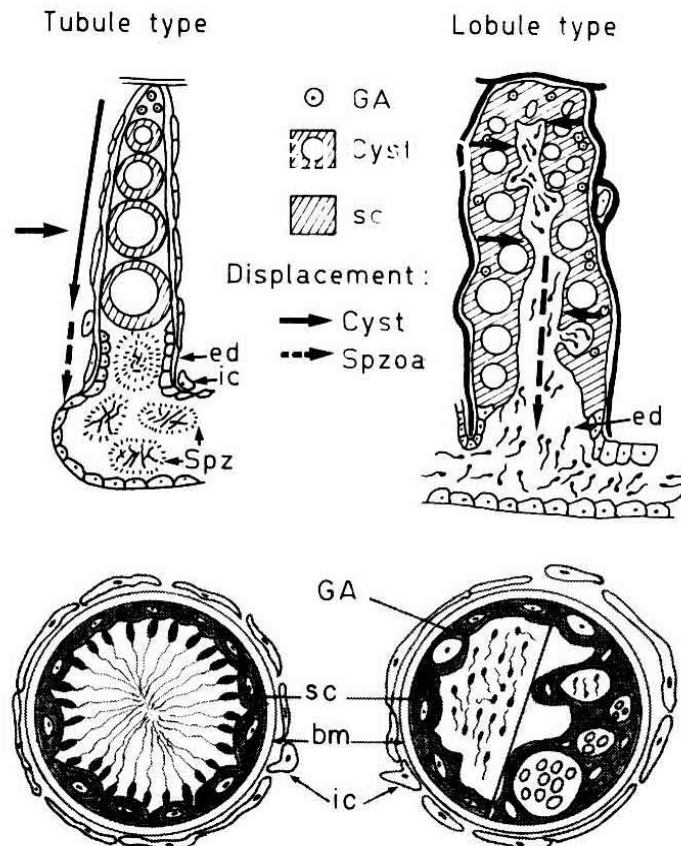


Spermatogoneze

Struktura testes

U ryb existují dva hlavní typy vnitřního uspořádání testes

- 1) Tubulární– cysta migruje během vývoje z apexu směrem do spermatického kanálku (paví očko)
- 2) Lobulární – cysty jsou v různých stádiích rozmístěny v různých částech lobulu (pstruh)

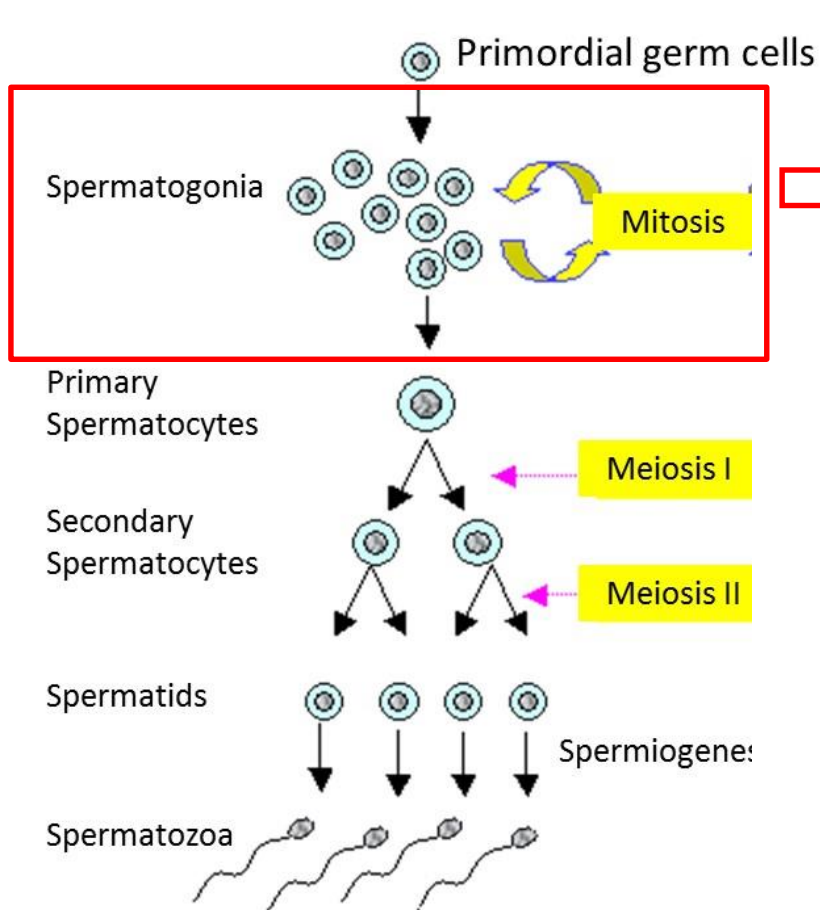


Billard et al. 1986

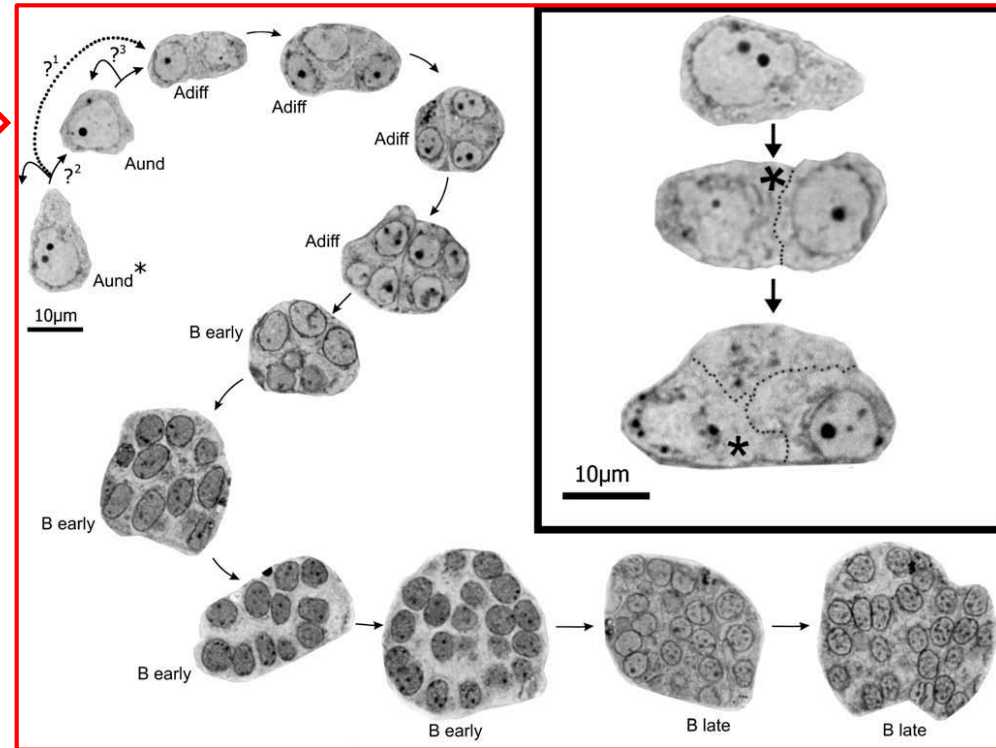


Spermatogoneze

Vývoj spermatické buňky



Mitotická fáze

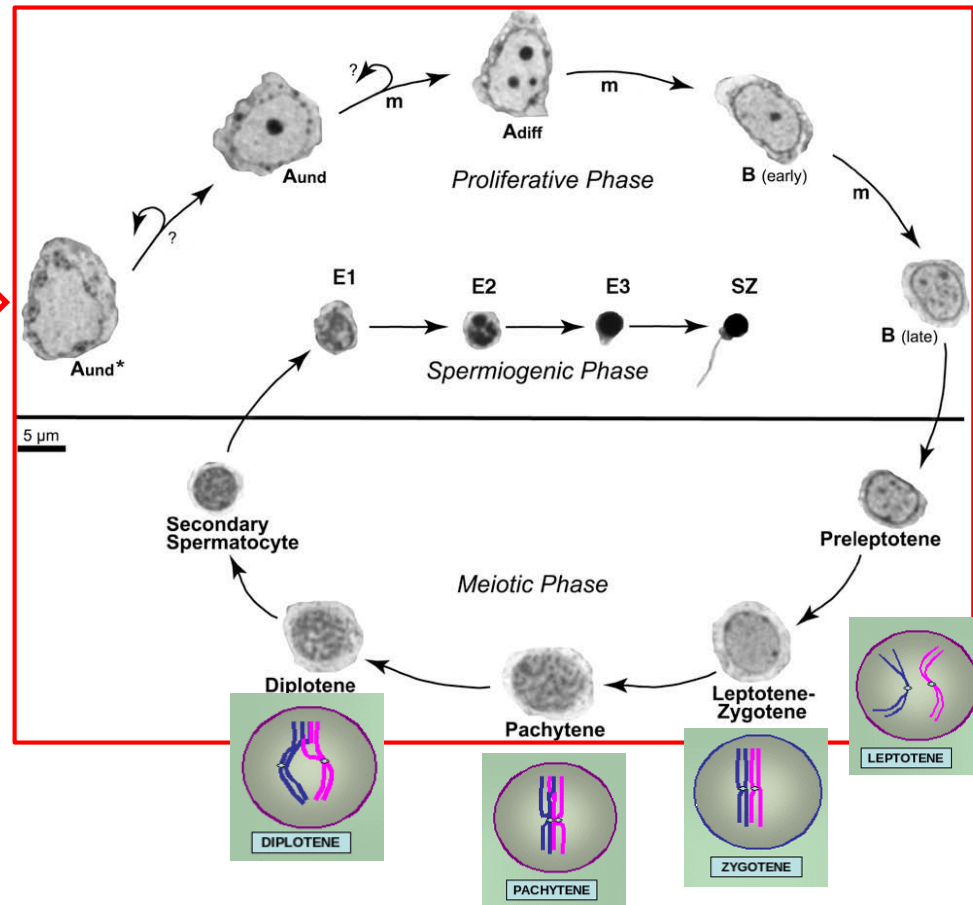
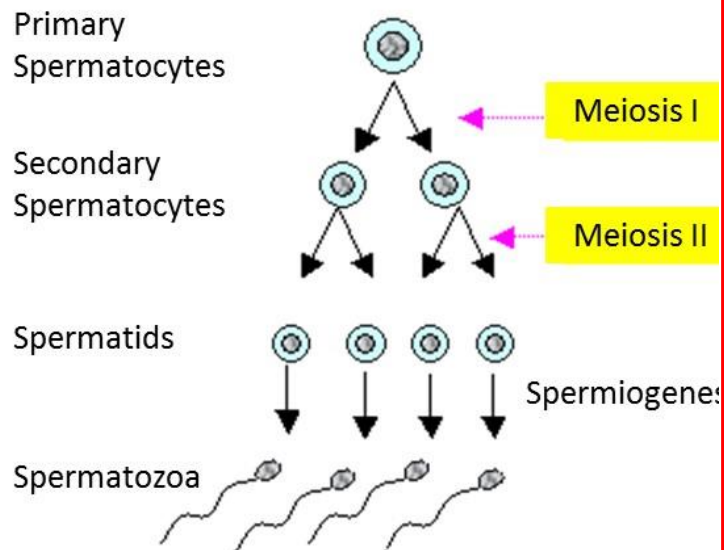
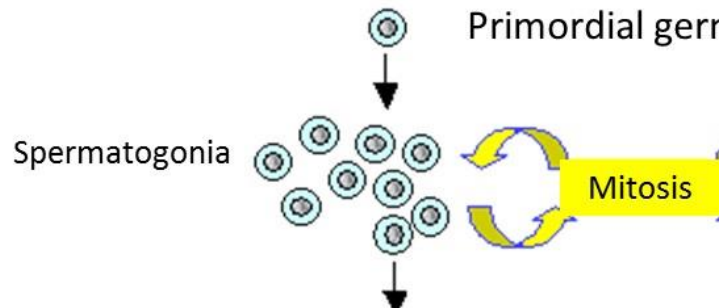


Schulz et al. 2010



Spermatogoneze

Vývoj spermatické buňky





Spermatogoneze

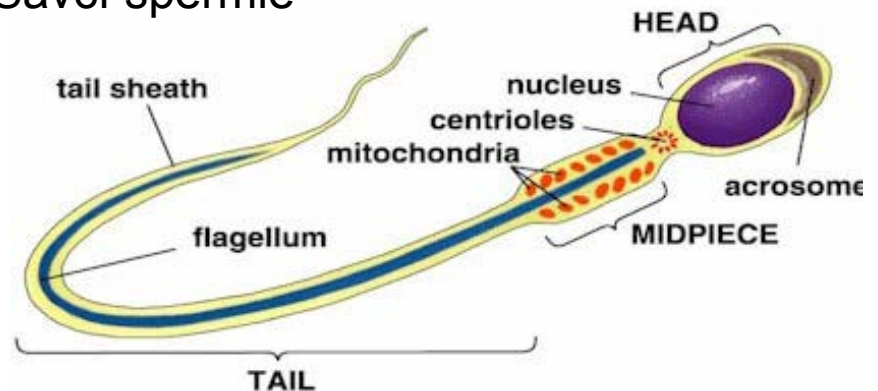
Vývoj spermatické buňky

Rybí spermie



Pšenička et al. 2006

Savčí spermie





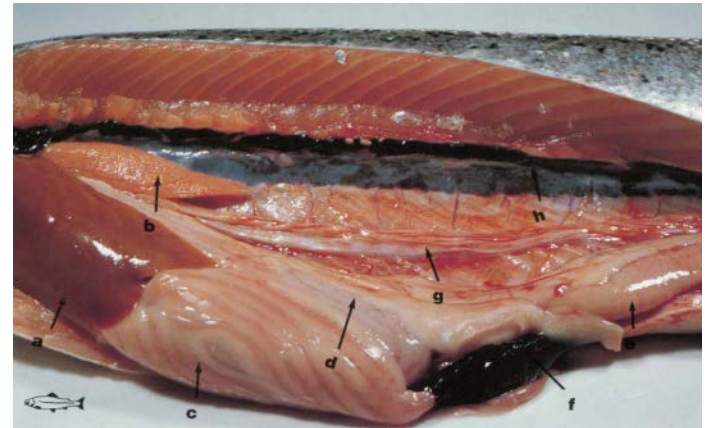
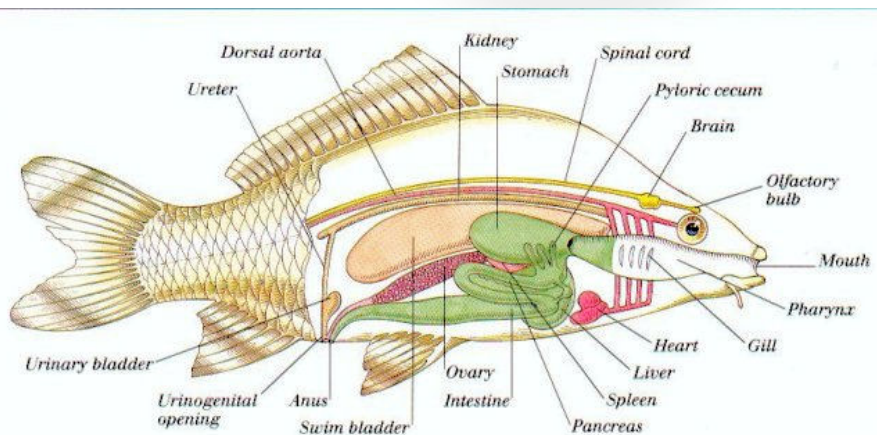
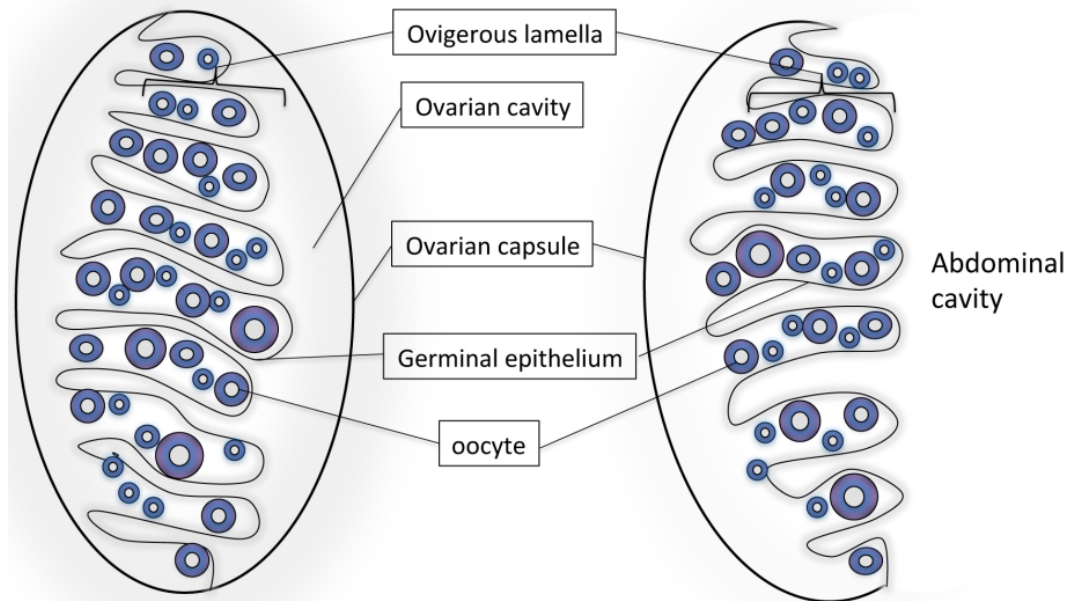
Oogeneze

Typy ovaria



Cystovarian type

Gymnovarian type





Oogeneze

Folikulární vrstvy

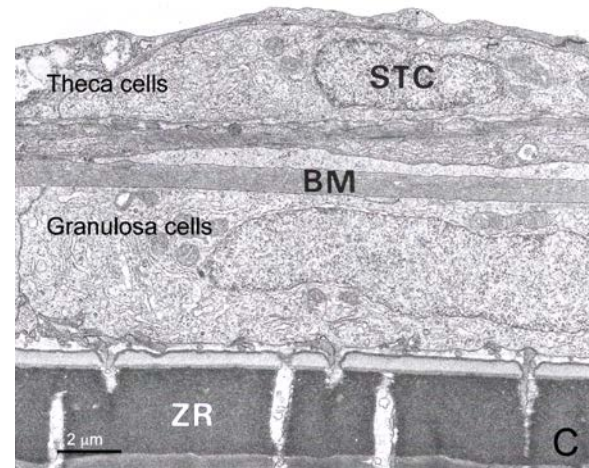
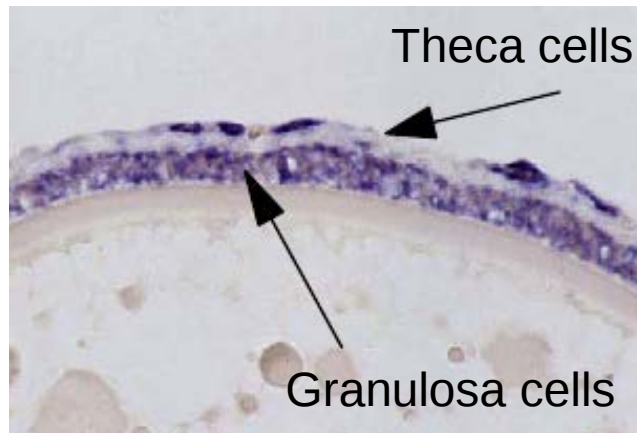
Theka and granulózní buňky

Obklopují oogoniální lůžko a později oocyt

Kontrolují celý proces oogeneze

Produkují steroidní hormony

Zprostředkovávají endocytózu (vitelogeneze)





Oogeneze

Je velmi komplexní a velice energeticky náročný proces (15-30% GSI).

Formování vajíčka a strategie výtěře se liší mezi druhy.

Obecně lze rozdělit vývoj do 4 fází:

1) Proliferace oogonií

2) Primární růstová fáze

a) Chromatin-nucleolus stage

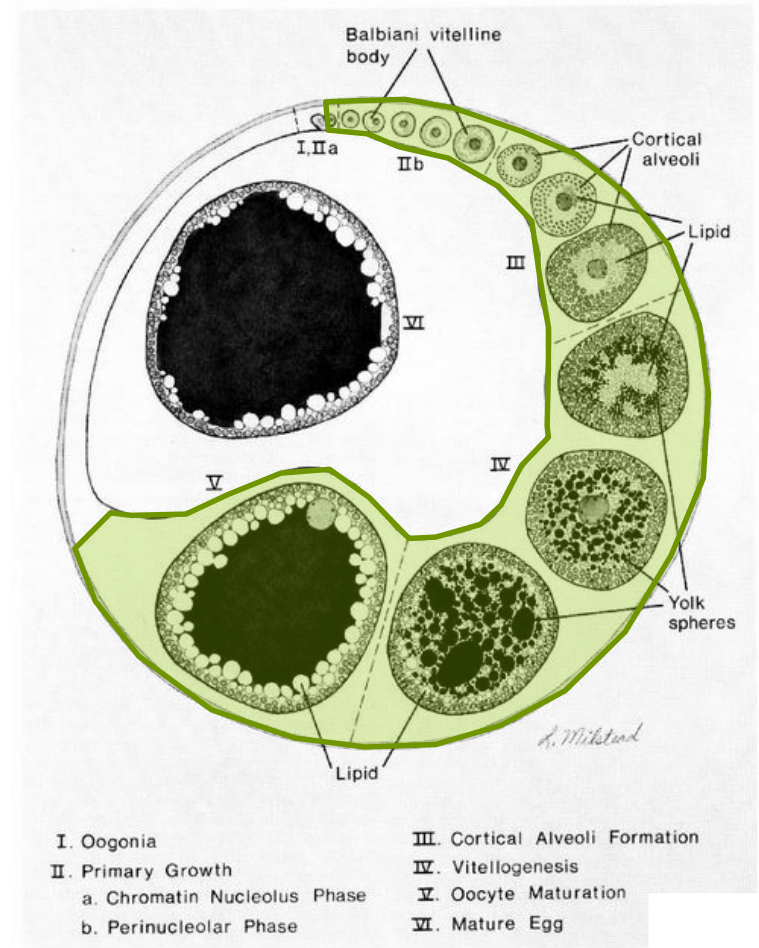
b) Perinucleolus stage

3) Sekundární růstová fáze

4) Zrání

5) Ovulace

Profáze
meiózy I

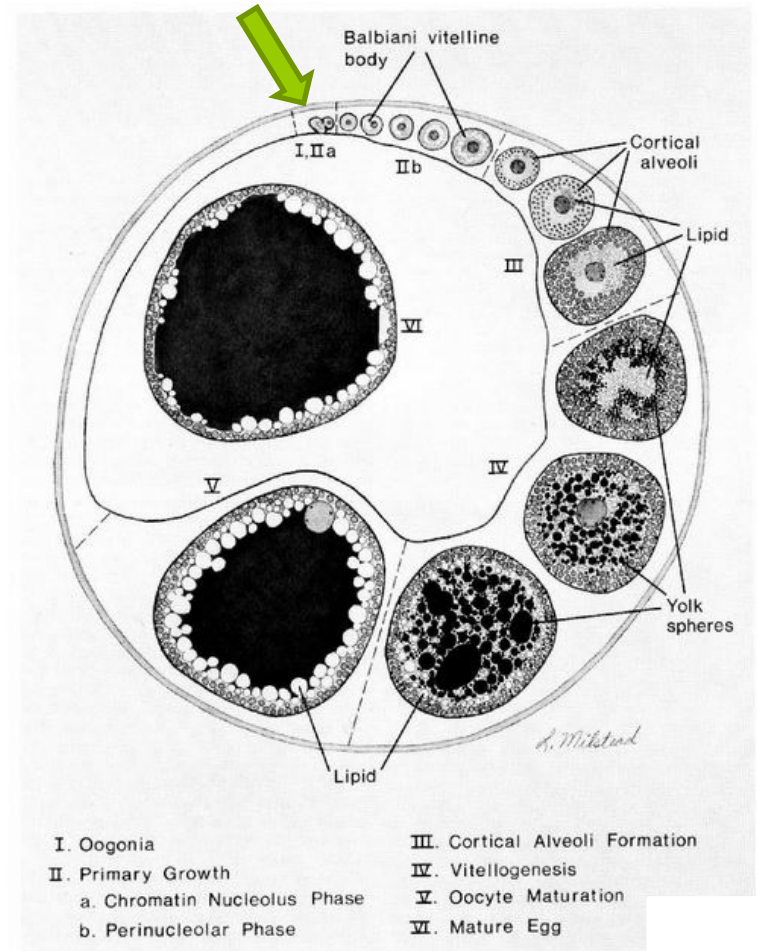
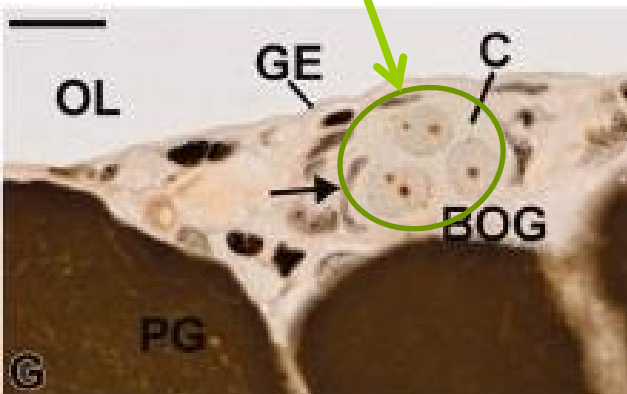
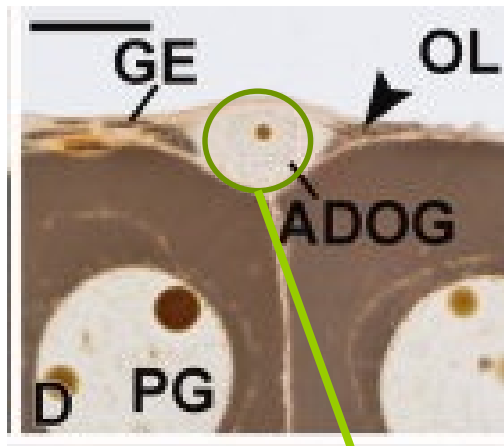




Oogeneze

Proliferace oogonií

Oogonie se mitoticky dělí a začínají je obklopotvat pre-granulózní buňky





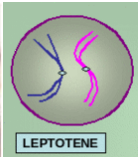
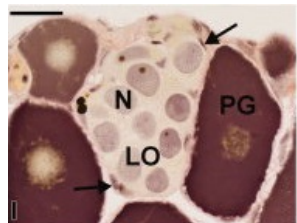
Oogeneze

Primární oocyt

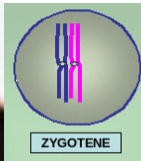
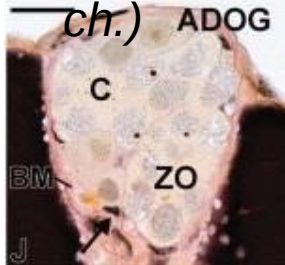
Primární růstová fáze (Chromatin-nucleolus stage)

Proliferované oogonie formují lůžko a přecházejí do profáze meiózy I

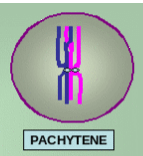
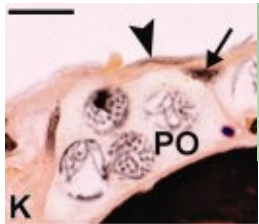
Leptotene (kondenzace ch.)



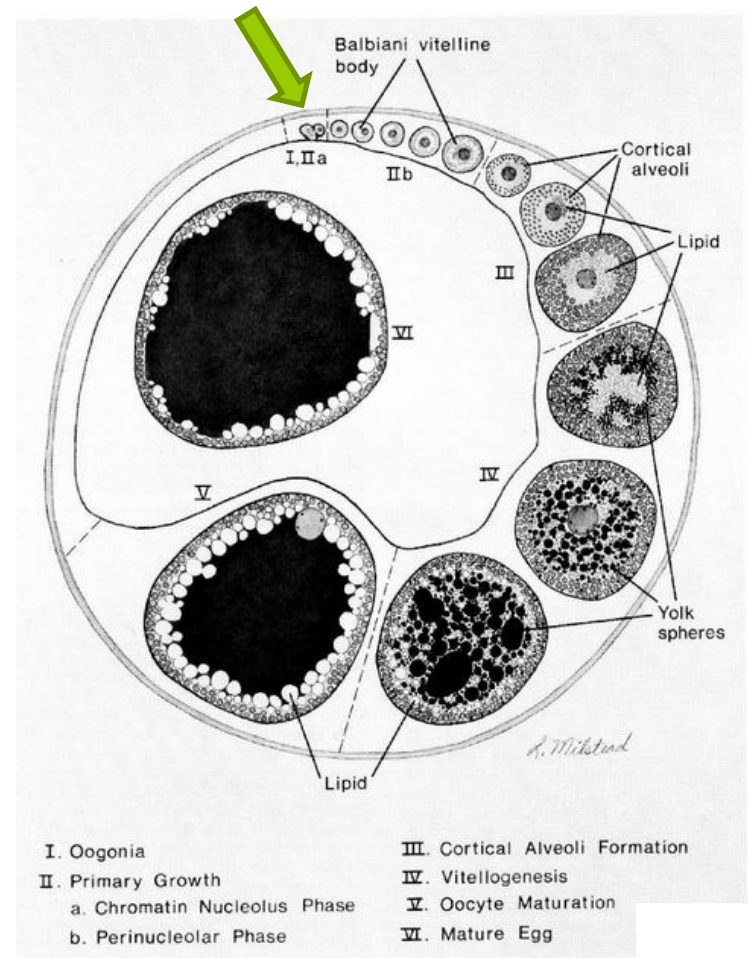
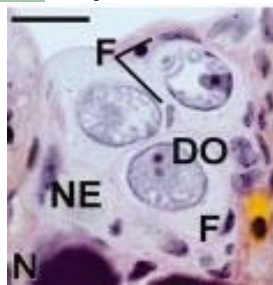
Zygotene (vyrovnání ch.)



Pachytene – (crossing over)



Diplotene (odstoupení ch.)



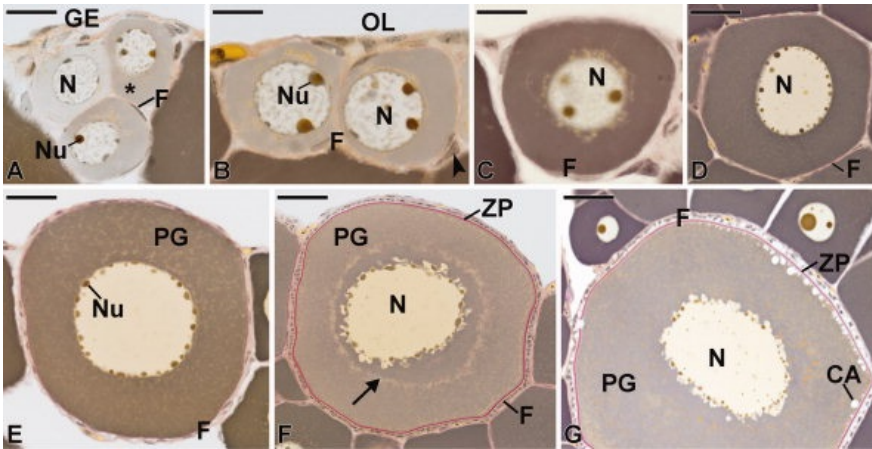


Oogeneze

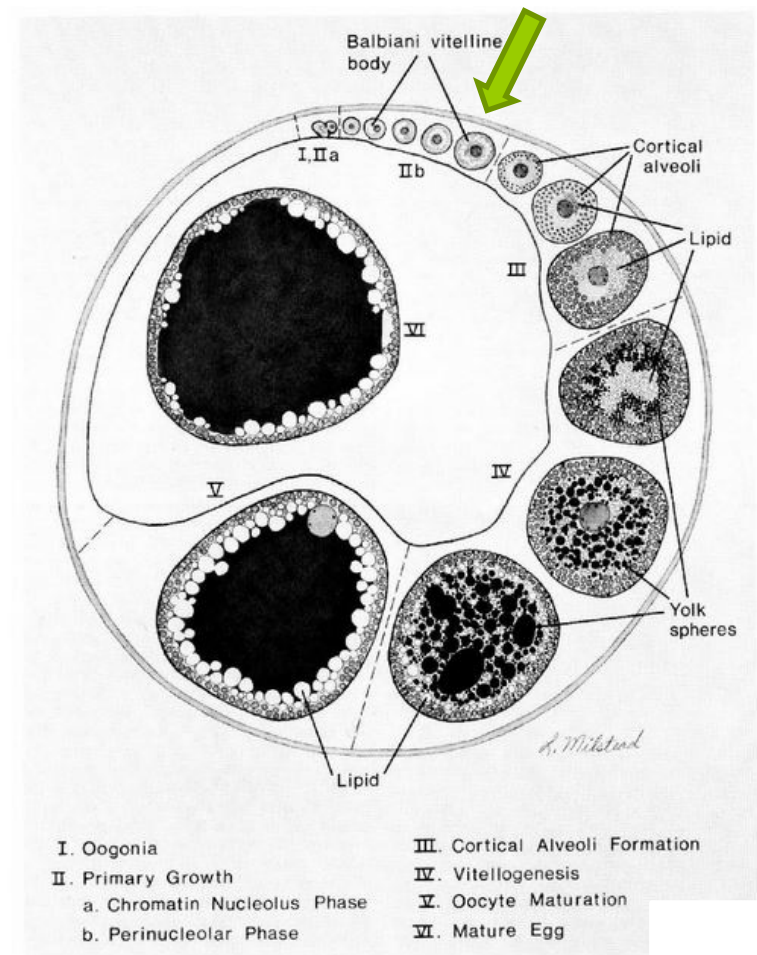
Primární oocyt

Primární růstová fáze (Perinucleolus stage)

- Meióza je zabrzděna v diplotene profáze I



- Syntéza organel, RNA a dalších molekul potřebných pro vývoj v dalších fázích
- Je dokončen vývoj granulózniých buněk a theka





Oogeneze

Primární oocyt

Sekundární růstová fáze

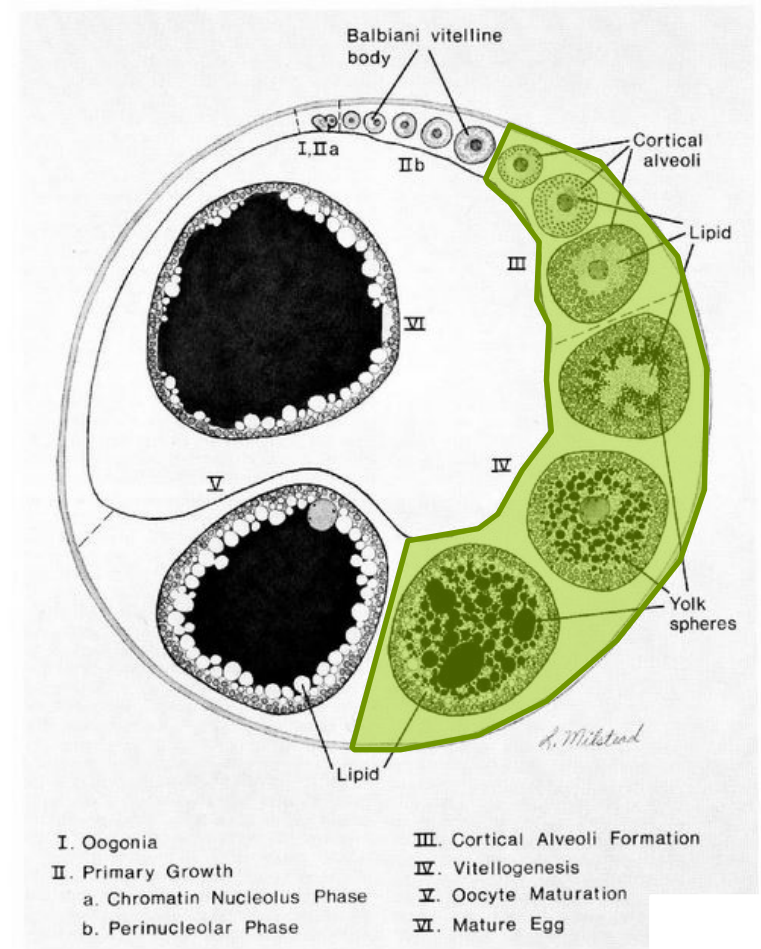
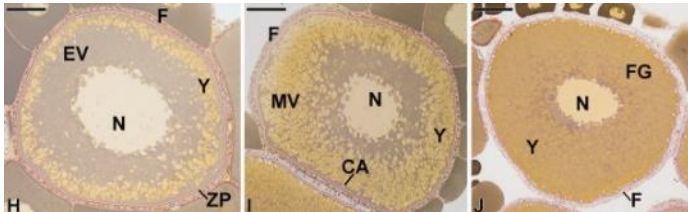
Oocyt začíná endocytozu a syntézu materiálu žloutku - **vitelogeneze**

1) Kortikální alveoly

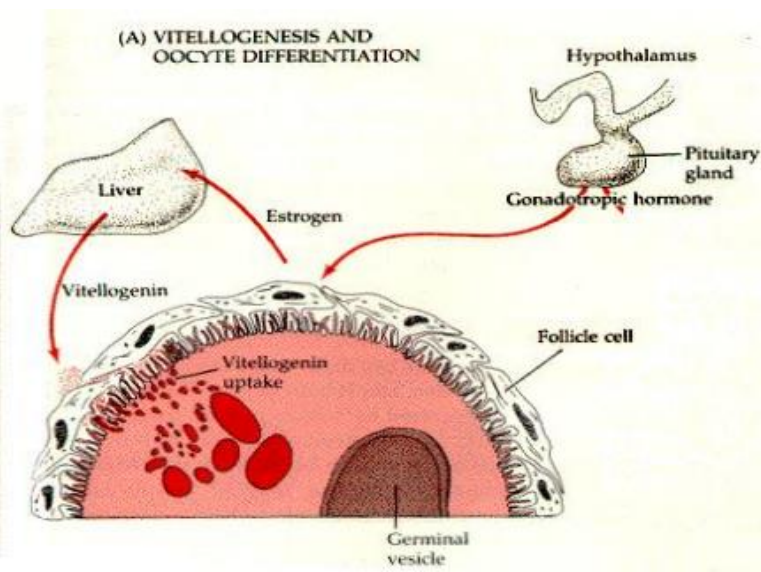
2) Vitelogenin (fosfolipoglycoprotein)

3) Proteiny zona radiata

4) Vitamíny (A, E...)



- I. Oogonia
- II. Primary Growth
 - a. Chromatin Nucleolus Phase
 - b. Perinucleolar Phase
- III. Cortical Alveoli Formation
- IV. Vitellogenesis
- V. Oocyte Maturation
- VI. Mature Egg



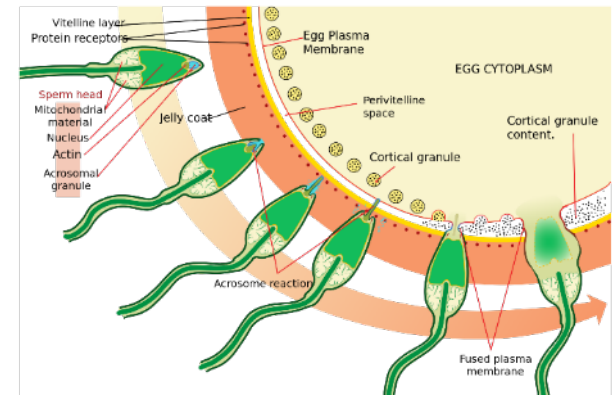
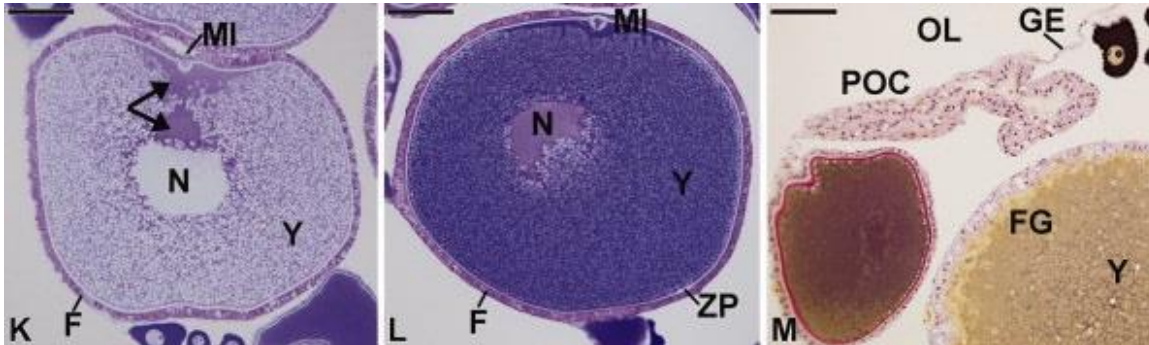


Oogenese

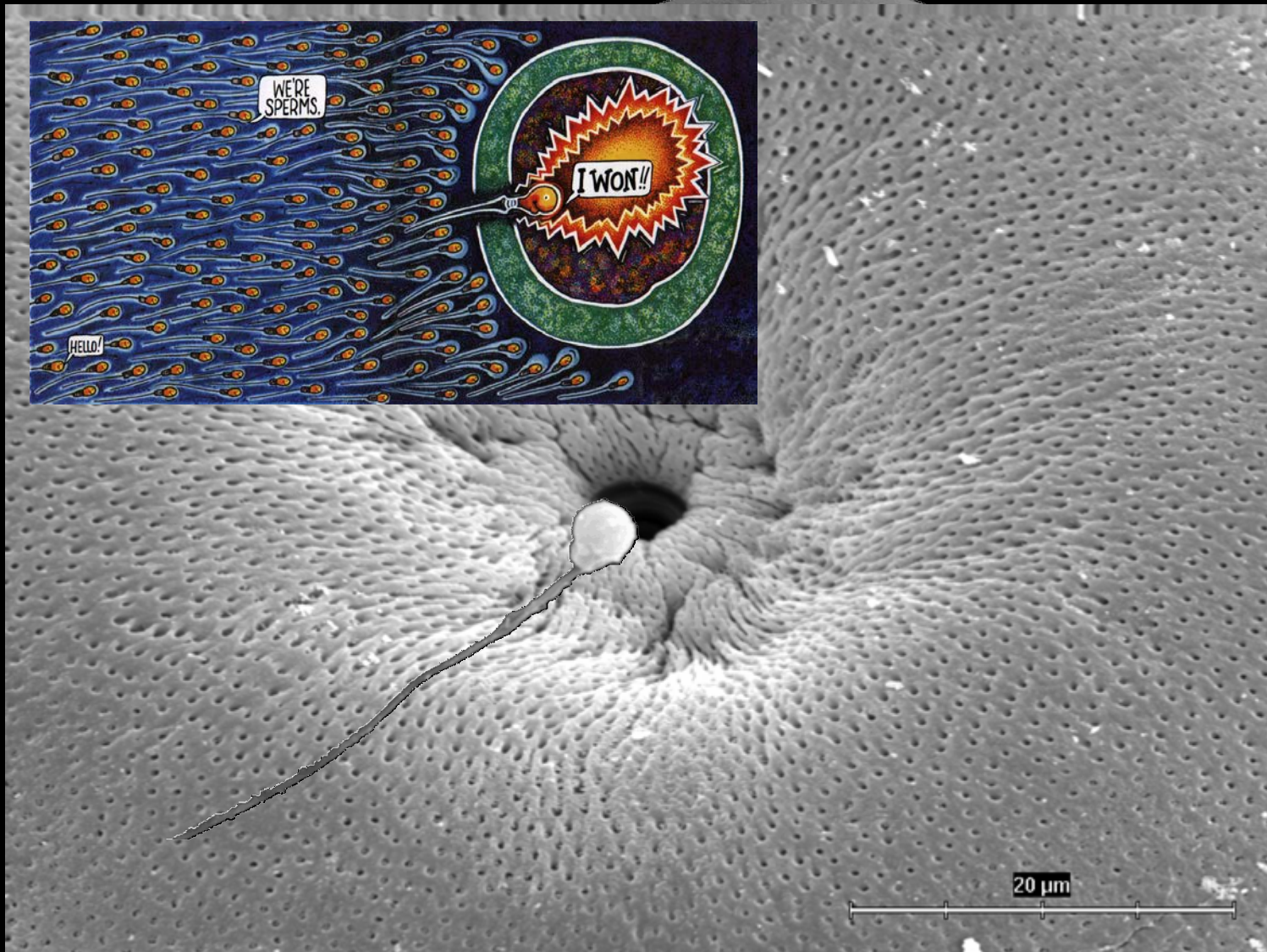
Sekundární oocyt

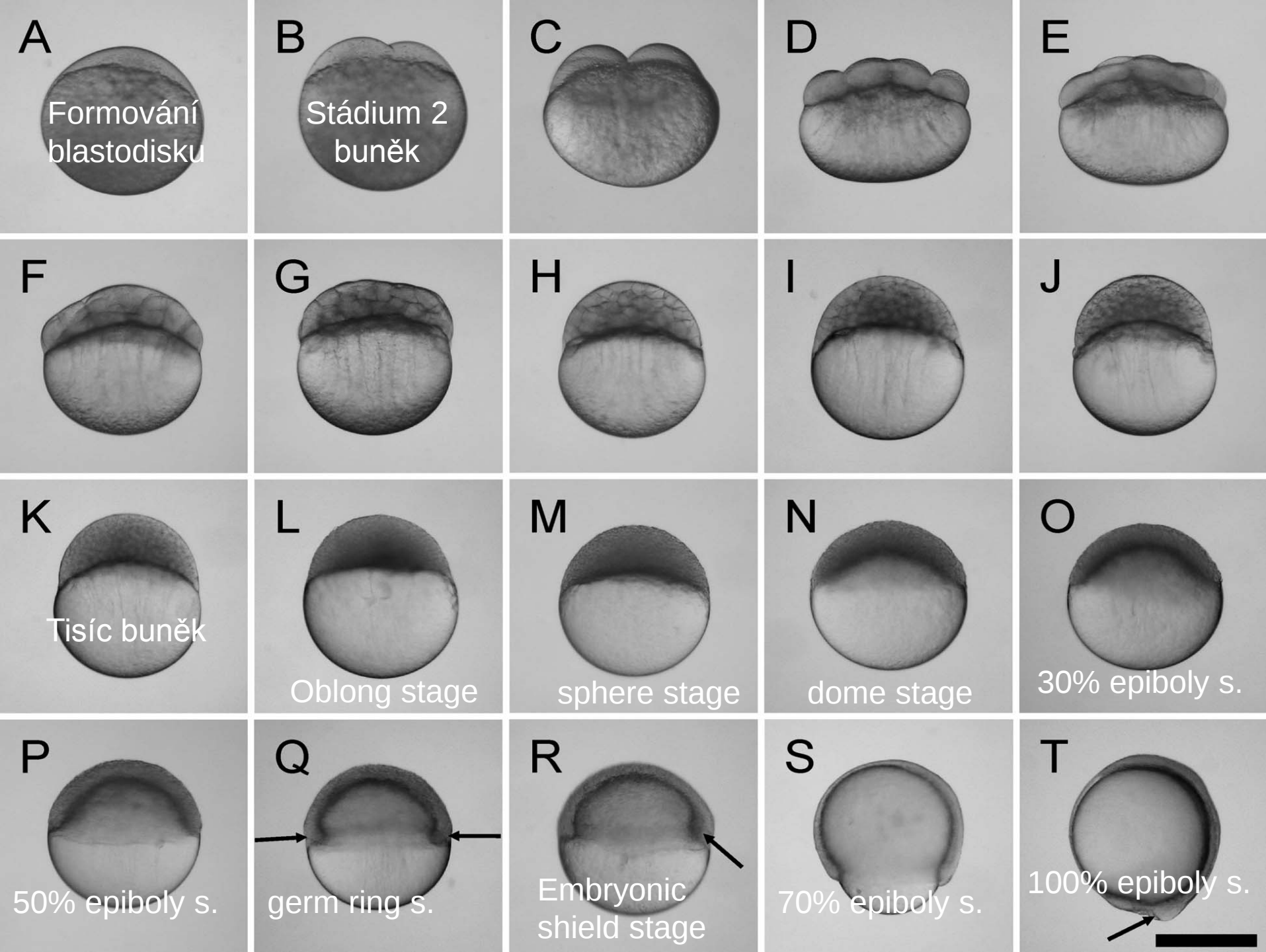
Zrání

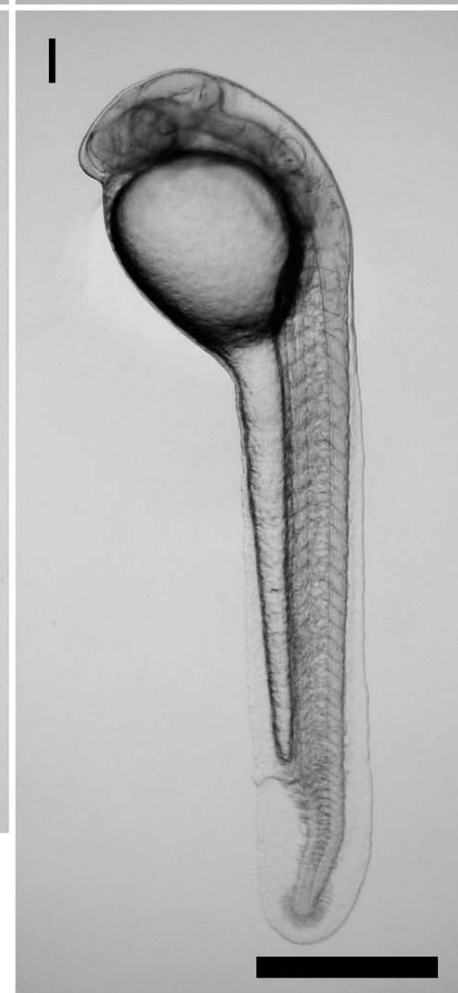
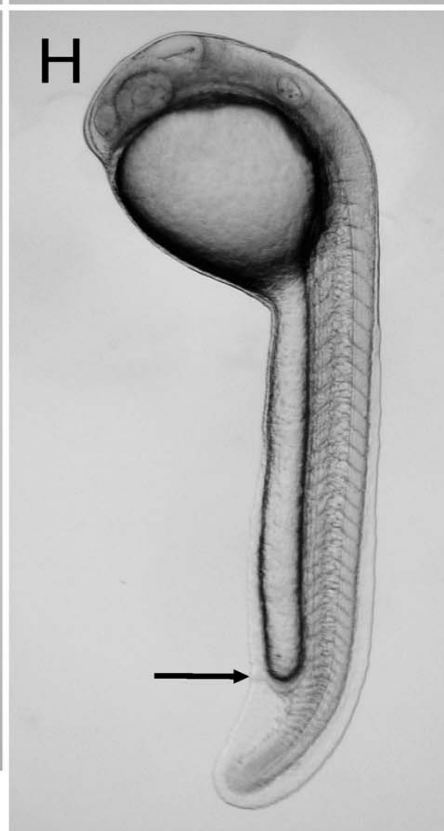
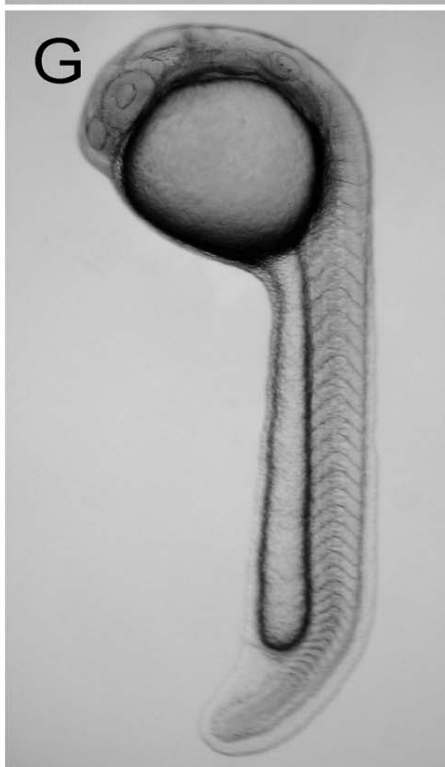
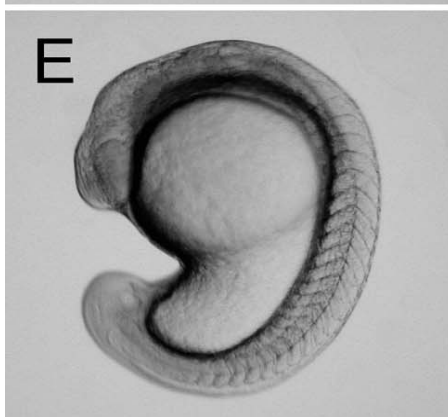
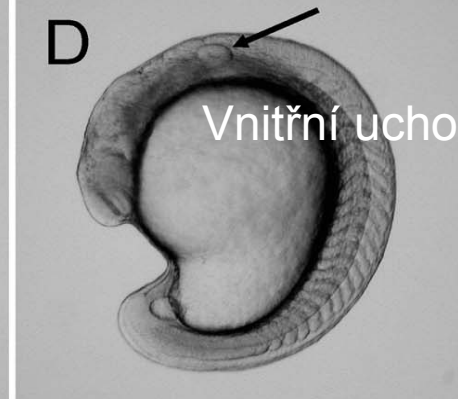
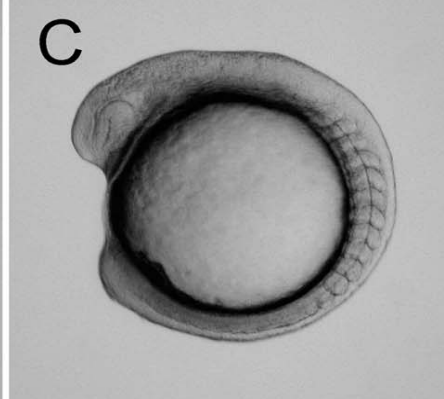
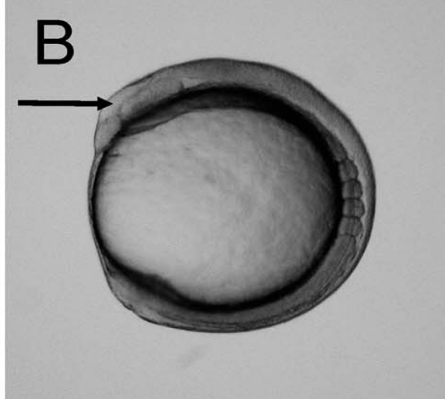
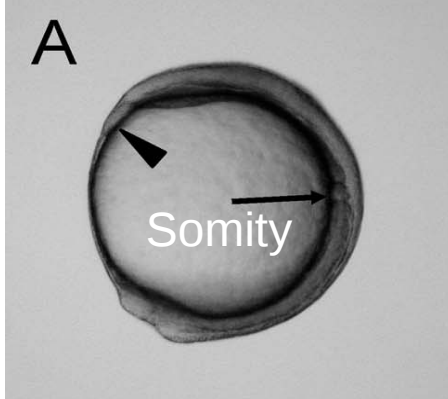
- Vitelogeneze je zastavena
- Kortikální alveoly jsou formovány do jedné vrstvy pod vitelinní membránou
- Jádru vajíčka se rozpadá - Germinal vesicle breakdown
- Znovu se spouští meióza I a je znovu zadržena v metafázi meiózy II až do oplození.
- Oocyt je uvolněn z folikulárních obalů do lumenu ovaria nebo břišní dutiny a opouští tělo skrze papilu.

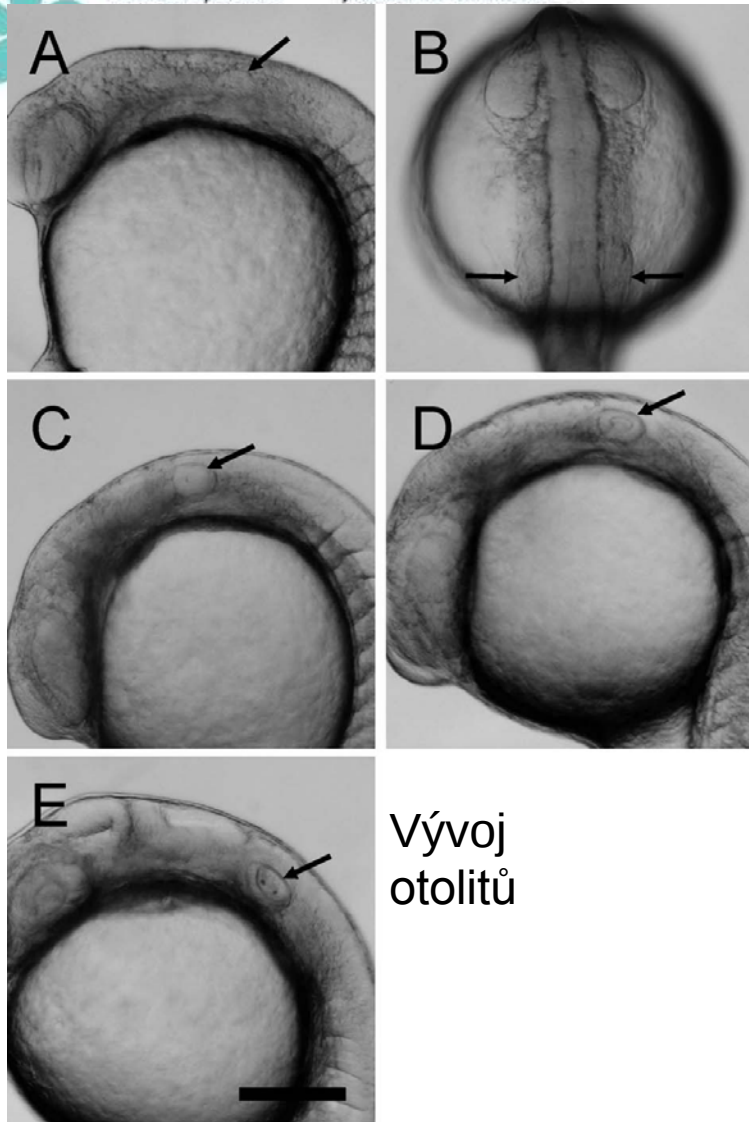


Fertilization

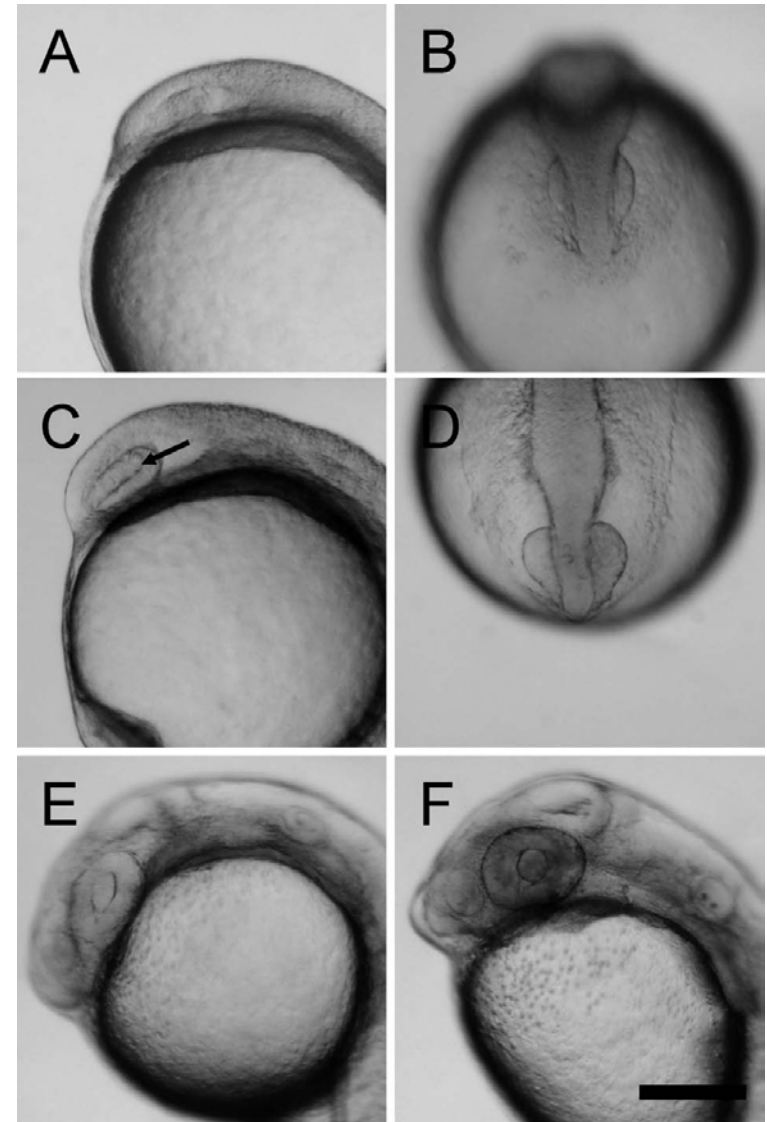








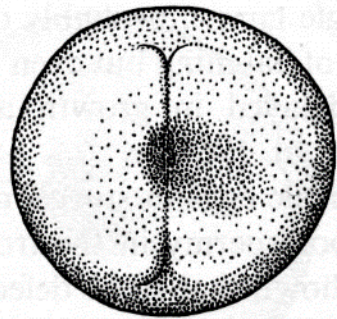
Vývoj
otolitů



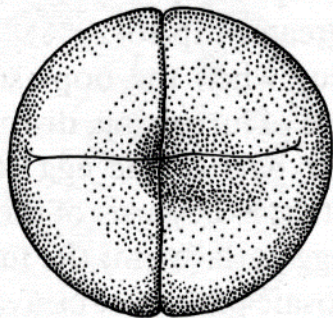
Fujimoto T., et al. (2006) Developmental Stages and Germ Cell Lineage of the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). ZOOLOGICAL SCIENCE 23: 977–989



Normal cleavage

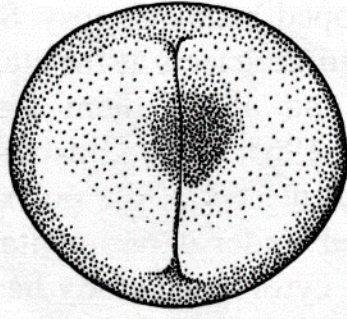


A

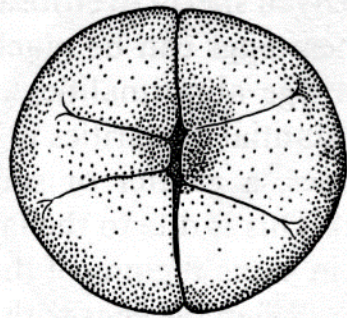


A'

Polyspermic

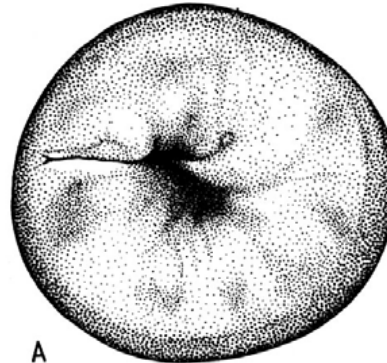


B

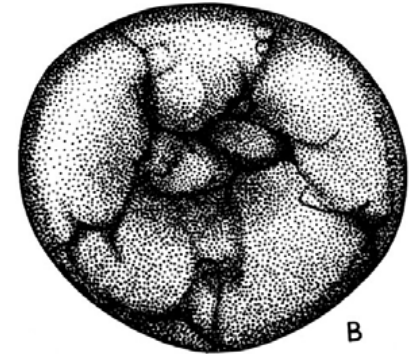


B'

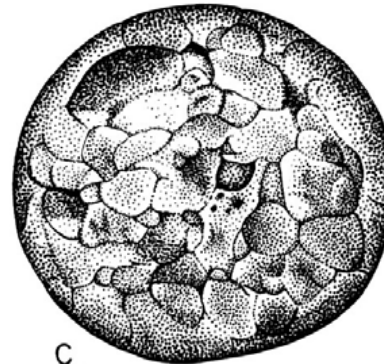
Partenogenetic



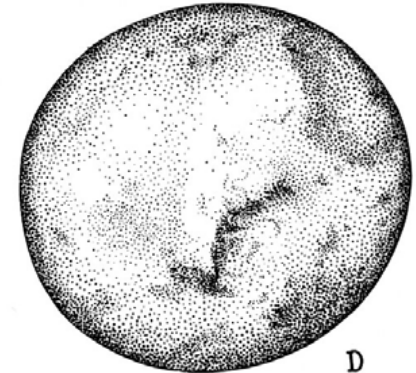
A



B



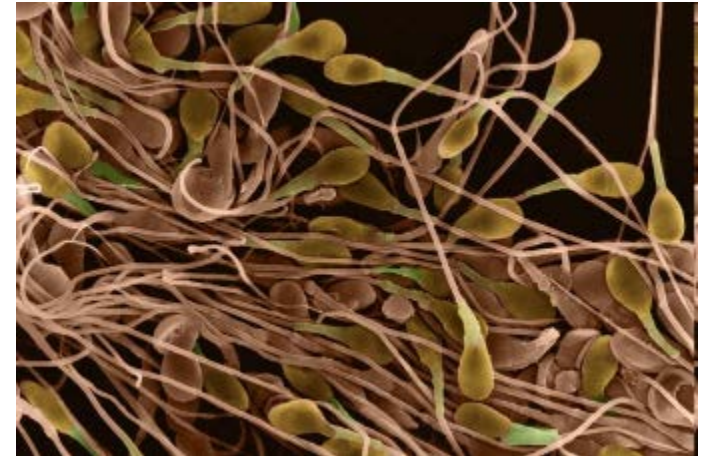
C



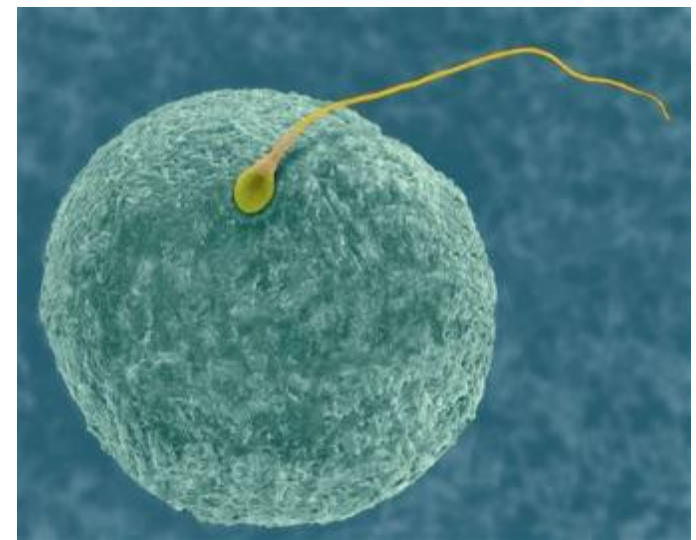
D



Artificial sperm

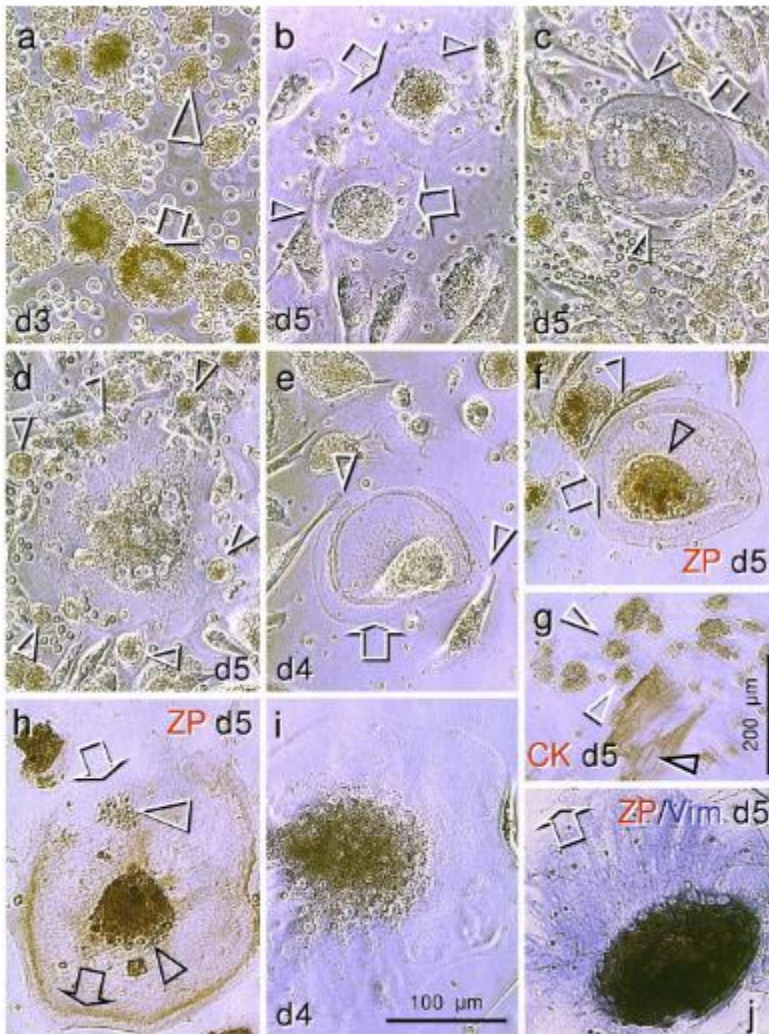


- Karim Nayernia 2009 Anglie – artificial spermatozoa were cultured *in vitro* from embryonic stem cells



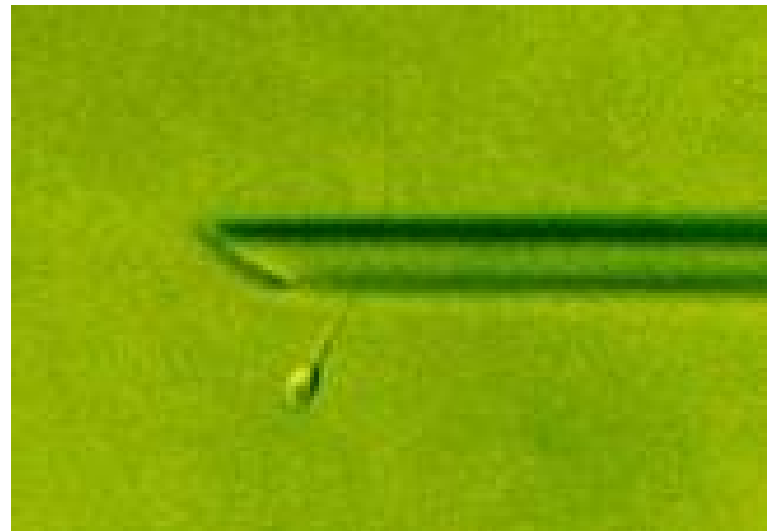
Artificial egg

- **Jonathan Tilly**
isolated germ stem
cells from women a
cultured functional
oocytes.



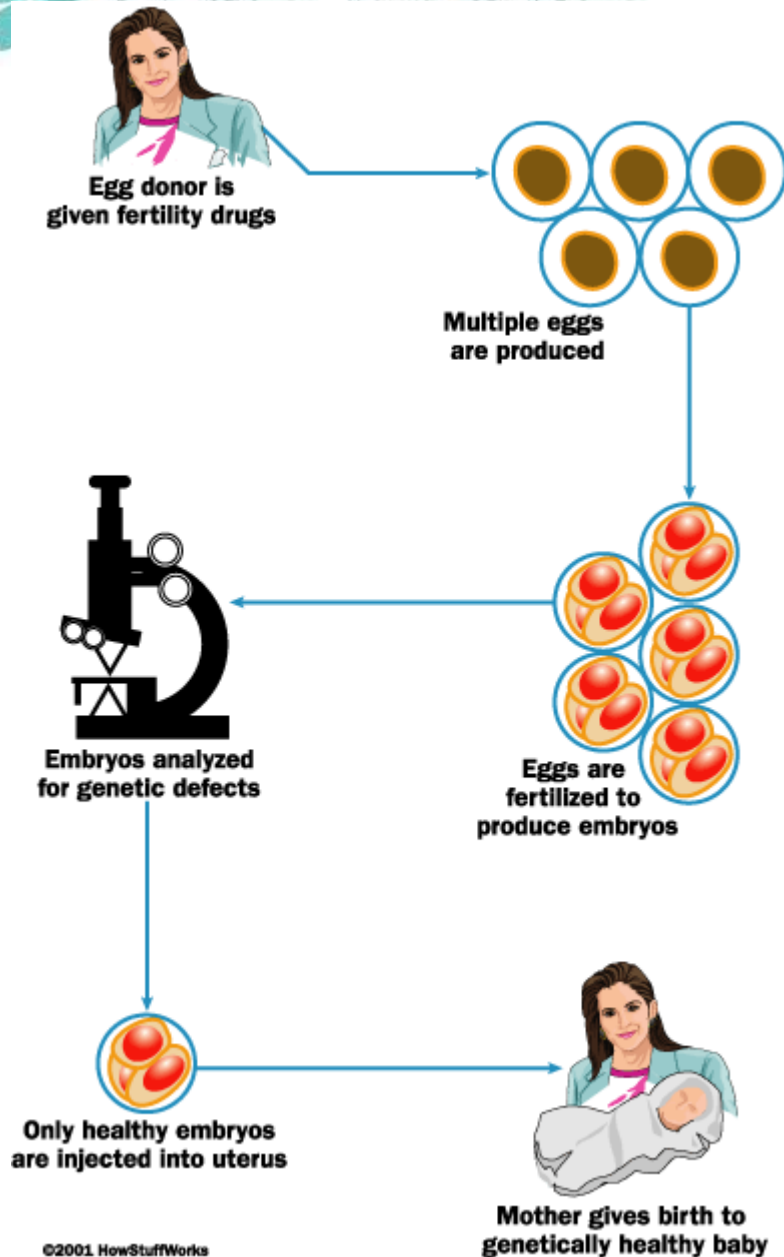


Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI)





Pre-implantation genetic diagnostics



Naturally only $\frac{1}{4}$ of eggs are able to develop. The transfer is conducted in blastula.

Genetic analysis of a polar body



**Thank you for your
attention**

