

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Michaela Fučíková

Mezidruhové transplantace embryonálních zárodečných buněk u ryb

Interspecies transplantations of embryonic germ cells in fish

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Děkuji mému školiteli Ing. Martinu Pšeničkovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc při vyhledávání odborné literatury a za jeho čas obětovaný opravám a kontrolování mé bakalářské práce. Poděkování patří i Ing. Romanu Fraňkovi, který se mi věnoval a pomáhal při práci v laboratoři. Děkuji i mé rodině a blízkým za podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Primordiální gonocyty (PGC), jsou embryonální zárodečné buňky, tedy prekurzory spermií a vajíček. Tyto buňky lze identifikovat, izolovat, pěstovat v buněčných kulturách, dlouhodobě uchovávat zamražené v tekutém dusíku a transplantovat do recipienta stejného nebo blízkého druhu, který je v ideálním případě sterilní. Transplantované buňky se v těle recipienta mohou vyvíjet a recipient pak může v dospělosti produkovat gamety donora. Takový jedinec se potom nazývá chiméra zárodečné linie. Manipulace se zárodečnými buňkami pak může přinášet řadu výhod jako je například uchování zárodečných buněk ohrožených nebo vzácných druhů v genových bankách, zkrácení generačního intervalu u pozdně dospívajících druhů v případě vhodně zvoleného recipienta apod. Cílem této bakalářské práce je shrnutí poznatků o PGC ryb a jejich možné využití.

Klíčová slova: primordiální gonocyty, zárodečné kmenové buňky, chiméra zárodečné linie, transplantace, náhradní rodiče

Abstract

Primordial gonocytes (PGC) are embryonic germ cells and they are precursors of sperm cells and oocytes. We can identify, isolate and grow them in cell's culture. We can store them in a frozen state in liquid nitrogen for long term. We can transplant these cells into recipient of the same or a close related species, which is sterile in the ideal case. The cells which are transplanted can develop in recipient's body so this recipient can produce the donor's gametes after maturation. Such individual is called germline chimera. The manipulation with germ cells can provide several benefits, for example preservation of germ cells from endangered or valuable species/stains in a gene bank. Or we can shorten generation interval that is convenient for late adolescent species in a case of appropriately chosen recipient. The aim of this thesis is to summarize knowledge about fish PGCs and a possible using of these cells for transplantations.

Keywords: primordial gonocytes, germ stem cells, germline chimera, transplantation, surrogate parents

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Vlastní literární rešerše.....	2
2.1	Primordiální zárodečné buňky (PGC).....	2
2.2	Specifikace PGC	4
2.3	Migrace PGC	5
2.3.1	Geny a molekuly kontrolující migraci.....	5
2.4	Vizualizace buněk.....	7
2.5	Chiméry zárodečné linie	9
2.6	Sterilizace.....	10
2.6.1	Hybridizace.....	10
2.6.2	Triploidizace.....	10
2.6.3	Chemická sterilizace.....	10
2.6.4	Potlačení exprese genů	10
2.7	Transplantace zárodečných buněk	11
2.7.1	Transplantace blastomery spolu s PGC	11
2.7.2	Transplantace PGC	12
2.7.3	Transplantace spermatogonií.....	13
2.8	Využití PGC.....	15
2.8.1	Ohrožené druhy a náhradní reprodukce	15
2.8.2	Kryoprezervace.....	16
3	Závěr.....	18
4	Použitá literatura	20

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CXCR4b	receptor 4b, chemokine (C-X-C motif)
CXCR7b	receptor 7b, chemokine (C-X-C motif)
FACS	průtoková cytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
GFP	zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)
HMGCoAR	hydroxymethyl-glutaryl-koenzym A reduktáza
MO	antisense morpholino oligonukleotid
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PGC	primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)
SDF-1	faktor (Chemokine stroma-cell derivated factor)

1 ÚVOD

Zárodečné buňky jsou jediným typem buněk schopných generovat zcela nový a jedinečný organismus. Aby ovšem mohly vykonávat tuto specifickou funkci a současně si zachovaly totipotenci, musí zárodečné buňky potlačovat somatickou diferenciaci pomocí specializovaného mikroenvironmentu a využití specifického systému RNA regulace (Cinalli et al., 2008). Prekurzory zárodečných buněk nazýváme primordiální zárodečné buňky (PGC). Tyto embryonální zárodečné buňky jsou prekurzory samčích a samičích pohlavních buněk (spermie a oocyty) a jsou proto velmi důležité z hlediska přenosu genetické informace z rodičů na potomky. Aby se ale toto vůbec uskutečnilo, je nutná migrace těchto buněk z extragonadální oblasti do místa, kde následně probíhá diferenciaci. Tímto místem je oblast budoucích gonád, zárodečná rýha. Charakteristika primordiálních zárodečných buněk je popsána u mnoha živočišných druhů od *Drosophily*, přes ptáky, až po člověka (Braat et al., 1999). Modely vzniku a migrace PGC se ovšem často výrazně liší. Modelovým druhem u ryb je především dánío pruhované (*Danio rerio*), mnoho experimentů je též prováděno na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*), karasu stříbřitém (*Carassius auratus*) a dalších (Xu et al., 2010).

Embryonální zárodečné buňky hrají významnou roli v oblasti transplantací, kdy jsou buňky z donora jednoho druhu ryb transplantovány do recipienta stejného (vnitrodruhová transplantace), nebo jiného druhu (mezidruhová transplantace). Výsledkem takové transplantace je vznik jedince, nazývaného chiméra zárodečné linie. Pro úspěšné získání chiméry zárodečné linie musí zárodečné buňky projít několika po sobě jdoucími procesy. Od značení a izolace, až po samotnou transplantaci zárodečných buněk. Transplantace zárodečných buněk ryb nalézá široké uplatnění v oblasti bioinženýrství, kryoprezervace a zefektivnění chovu pro komerční účely. Díky možnosti uchování rybích PGC v tekutém dusíku s následnou transplantací do vybraného recipienta je v současné době možné uchovat a obnovit kompletní genetickou informaci ohrožených druhů. Další uplatnění transplantace může být například zkrácení generačního intervalu při použití pozdně dospívajícího donora a recipienta s kratší dobou dospívání.

Cílem této bakalářské práce je vytvoření literární rešerše shrnující problematiku transplantace embryonálních zárodečných buněk se zaměřením na použití u ryb.

2 VLASTNÍ LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 PRIMORDIÁLNÍ ZÁRODEČNÉ BUŇKY (PGC)

Primordiální zárodečné buňky jsou embryonální prekurzory gamet (oocytů, nebo spermií). Gamety jsou po oplození v další generaci zodpovědné za vznik nového jedince (Yoshizaki et al., 2003) a přenášejí genetickou informaci rodičů na potomstvo. Toho se využívá právě během transplantací, kdy jsou PGC od donora izolovány a posléze transplantovány do určeného recipienta, čímž získáváme chiméru zárodečné linie (Yamaha et al., 2007). Vzhledem k tomu, že PGC ryb na rozdíl od těch u myši a žab, nemohly být dříve identifikovány pomocí molekulárních markerů, byly použity popisné studie PGC morfologie, vycházející z použití světelné a elektronové mikroskopie, díky níž je možné definovat morfologické charakteristiky primordiálních zárodečných buněk v embryích ryb (Koç & Yüce, 2012).

Ve srovnání se somatickými buňkami jsou primordiální zárodečné buňky větší (10-20 μm). Zároveň mají i větší jádra (6-10 μm), která obsahují jedno, nebo dvě prominentní jádérka s rovnoměrně distribuovaným chromatinem a zřetelnou jadernou membránou (Braat et al., 1999). Jádra primordiálních zárodečných buněk pokrývají většinu cytoplasmy buňky a jejich okraje jsou převážně nepravidelné. Cytoplazma je hustá, s mnoha glykogenovými granuly, ribozomy a mitochondriemi. Naopak endoplazmatické retikulum a Golgiho systém nejsou dostatečně vyvinuty (Yön & Akbulut, 2015). Během ultrastrukturální analýzy PGC byl nalezen i takzvaný „nuage“, tento termín pochází z francouzského slova a byl prvně zaveden roku 1957 (André & Rouiller, 1957). Nuage, neboli agregace RNA a proteinů, se jeví jako elektrodenzní cytoplazmatické inkluze, často pozorované ve spojení s mitochondriemi (mitochondrial cloud). Právě díky této specifické zárodečné cytoplasmě a velké velikosti, jsou zárodečné buňky dobře rozeznatelné (Eddy, 1975; Olsen et al., 1997).

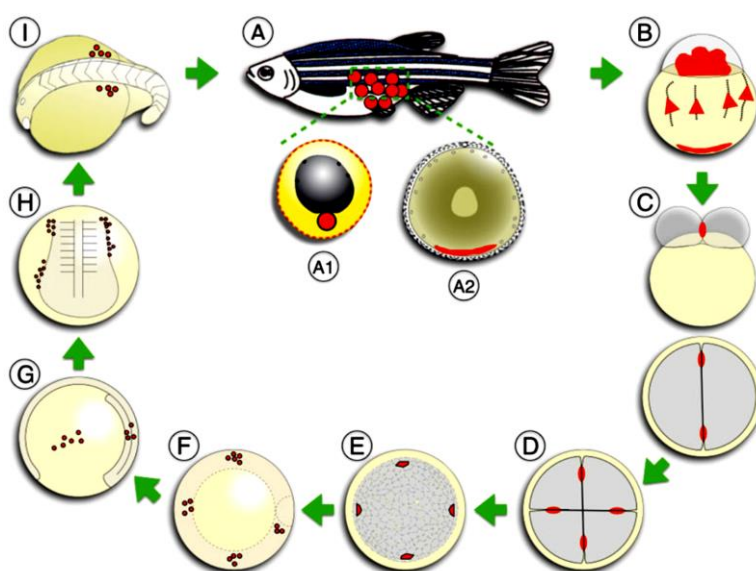
Zárodečná plazma obsahuje hned několik RNA molekul důležitých pro pozdější specifikaci PGC. Patří mezi ně *dead end*, *vasa*, *nanos*, nebo například *olvas* (homolog *vasa* RNA u medaky japonské). *Vasa* mRNA je ATP-dependentní RNA helikáza z rodiny DEAD-box (Herpin et al., 2007). Geny typu *nanos* byly zkoumány například u dánia pruhovaného, kde konkrétně *nanos-1*, který je exprimován v zárodečné plazmě, ovlivňuje pozdější migraci a přežití primordiálních zárodečných buněk (Kopranner et al., 2001). Periferní cytoplazma vykazuje vysokou aktivitu alkalické fosfatázy, která se používá jako enzymatický indikátor. Alkalická fosfatáza je enzym, který můžeme najít jak v buňce samotné, tak v její membráně.

Tento enzym je aktivní při pH 8,5-10 se schopností odštěpovat fosfátové skupiny. Aktivita alkalické fosfatázy byla pozorována i v periferní cytoplazmě primordiálních zárodečných buněk, za použití elektronového a světelného mikroskopu. V roce 1997 bylo u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) zjištěno, že PGC jsou, s mateřsky děděnou mRNA, lokalizovány v terminálních oblastech časné dělicí rýhy (Yoon et al., 1997).

PGC jsou morfologicky velmi podobné napříč různými druhy. Specifikace zárodečných buněk ryb byly zkoumány hlavně u ryb kostnatých (*Teleostei*) a to za použití, již zmíněné, elektronové a světelné mikroskopie (Koç & Yüce, 2012). Hlavním modelovým druhem pro studium zárodečných buněk, jejich migrace a vizualizace je dánío pruhované (*Danio rerio*). Experimenty prováděné na tomto druhu jsou výhodné z hlediska krátkého generačního intervalu, externího oplození a snadno pozorovatelných embryí, která jsou vhodná pro různé biologické manipulace, jako je transplantace, vizualizace a značení (Ma et al., 2001).

2.2 SPECIFIKACE PGC

Typy specifikace zárodečných buněk byly studovány převážně u ryb kostnatých (*Teleostei*) za použití světelné a elektronové mikroskopie. Na základě těchto studií byly objeveny dva typy specifikace PGC. Prvním typem je dědičnost asymetricky lokalizovaných cytoplazmatických determinantů od matky, uložených v malé části oocyty. Tyto cytoplazmatické determinanty nazýváme zárodečná plazma. Determinanty dále specifikuji buňky, které je zdědí, na buňky zárodečné. Na konci embryogeneze se pak takto vyvinuté primordiální zárodečné buňky stávají prekurzory pro reprodukční buňky a mohou dále diferenciovat v gamety. Druhým způsobem specifikace PGC je specifikace díky induktivním signálům (epigeneze) pocházejícím ze somatických buněk. U tohoto typu specifikace dochází k formování malého počtu zárodečných buněk, jako odpovědi na signály vycházející přímo z embrya (Dosch, 2015; Herpin et al., 2007).



Obrázek 1. Klíčová stádia embryonálního vývoje u dánia. Zárodečná plazma (A-D) a PGC (E-A) jsou znázorněny červeně. Zelený box značí klíčové stádium oogeneze a lokalizaci zárodečné plazmy. (A1,A2) stádia oocyty. (B) zygota po oplodnění se zárodečnou plazmou lokalizovanou na vegetativním pólu. (C) stádium dvou buněk. (D) stádium 4 buněk. (E) stádium 512-buněk, 2,75 h po oplodnění, zárodečná plazma generuje 4 shluky PGC. (F) 4 shluky PGC začínají migrovat. (G) stádium 80 % epibolie PGC migrují dorsálně. (H) PGC dorazily na dorsální stranu a dále migrují směrem k místu budoucích gonád. (I) stádium 15-somitů, PGC dorazily na místo diferenciace. Převzato a upraveno podle Roland Dosch (2015)

Právě u dánia pruhovaného byla potvrzena existence prvního typu specifikace, tedy pomocí maternální zárodečné plazmy spolu s několika RNA molekulami jako je *vasa* a *nanos*. Tento model specifikace je díky tomu považován za univerzální napříč různými druhy ryb, ovšem najde se i pár výjimek, u kterých nalzáme jisté odlišnosti. Patří mezi ně medaka japonská (*Oryzias latipes*) u které se místo RNA molekuly *vasa* vyskytuje její homolog *olvas*. Rozdíl se pak projevuje v místě lokalizace PGC, u medaky japonské se nacházejí ve struktuře nazývané embryonální štít. Spolu s tím bylo zjištěno, že právě *vasa* mRNA, která je lokalizována v zárodečné plazmě (platí pro dánio pruhované), neurčuje stejné struktury u medaky. Toto zjištění otevřelo cestu pro studium odlišných mechanismů řídicí PGC specifikaci u zmíněných druhů (Herpin et al., 2007).

2.3 MIGRACE PGC

Migrace je velmi důležitý děj uplatňující se v mnoha biologických procesech. Můžeme se s ní setkat například při imunitní odpovědi, hojení tkání, šíření nádorových buněk (metastáze) a hlavně při embryonálním vývoji (Knaut et al., 2003). Během časného embryonálního vývoje se PGC objevují v místě, které je velmi vzdálené od finálního místa jejich dalšího vývoje, jímž je rozvíjející se zárodečná rýha (García-Castro et al., 1997). Proto musí tyto buňky migrovat. Proces migrace PGC byl studován jak na daniu pruhovaném, tak na myších, kuřatech a dalších organismech. Díky tomu byly objeveny dvě cesty migrace PGC. První možností migrace, která je typická pro ptáky, je pomocí krevního systému. Druhou je využití střevního endodermu, z kterého začíná migrace do zárodečné rýhy (Saito et al., 2014; Xu et al., 2010). Migrace PGC u většiny druhů ryb je druhého typu, tedy probíhá přes střevní endoderm. Tento typ migrace je zároveň typický i pro myš a *Drosophila* (Braat et al., 1999).

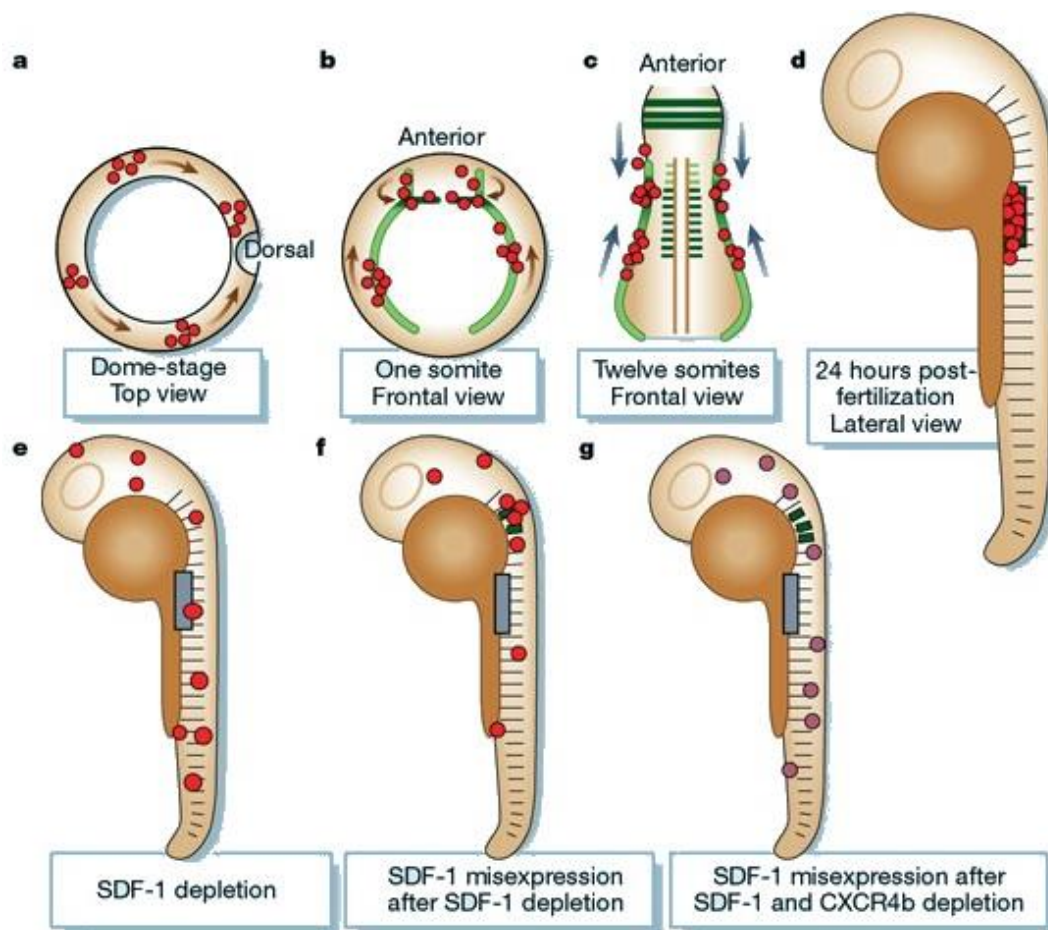
2.3.1 GENY A MOLEKULY KONTROLUJÍCÍ MIGRACI

Díky práci se značením PGC a funkční analýzou různých regulátorů zárodečných buněk, bylo nalezeno mnoho genů a signálních drah uplatňujících se při migraci PGC. Prokázalo se, že migrace rybích PGC závisí převážně na součástech zárodečné plazmy a na její celkové integritě (Xu et al., 2010).

Hlavní komponentou řídící migraci PGC je chemokininový faktor SDF-1. Tento faktor je sekretován somatickými (tělními) buňkami (Saito et al., 2011). Právě SDF-1 je exprimován v oblastech kam migrace PGC směřuje. Receptorem pro SDF-1 je CXCR4b, který je naopak exprimován přímo migrujícími PGC. CXCR4b se neuplatňuje pouze v migraci PGC u ryb, ale například už v roce 1996 bylo zjištěno, že u člověka hraje tento receptor důležitou roli při vstupu HIV-1 do buněk (Feng et al., 1996). Druhým důležitým receptorem pro správný chod migrace PGC je Receptor CXCR7b. Ten se uplatňuje především v somatických tkáních a je exprimován prakticky v celém embryu (Blaser et al., 2005; Doitsidou et al., 2002; Minina et al., 2007; Richardson & Lehmann, 2010).

Pro přesné řízení migrace je důležitý gradient vznikající odjímáním SDF-1 pomocí endocytického příjmu (Saito et al., 2011). Pokud je narušena funkce Receptoru CXCR7b, tak můžeme u PGC zjistit narušenou buněčnou polaritu spolu s nesprávnou migrací. To je zajímavé vzhledem k faktu, že CXCR7b je prvotně důležitý především pro somatické buňky. Tyto zjištění utvrzují v tom, že Receptor CXCR7b váže faktor SDF-1 a naopak odjímá

v buňce chemokiny jako výsledek internalizace (Boldajipour et al., 2008). Právě internalizace a kontrola intenzity signalizace jsou více než důležité pro kontrolu migrace *in vivo*, což umožňuje bezchybný přesun PGC do jejich cílového místa, kde se posléze rozvíjejí gonády (Minina et al., 2007). Existují i další mechanismy řídící migraci PGC, například u dánia pruhovaného (*Danio rerio*), u kterého se uplatňuje řízení migrace díky faktoru hydroxymethyl-glutaryl-koenzym A reductázy (HMGCoAR) (Thorpe et al., 2004).



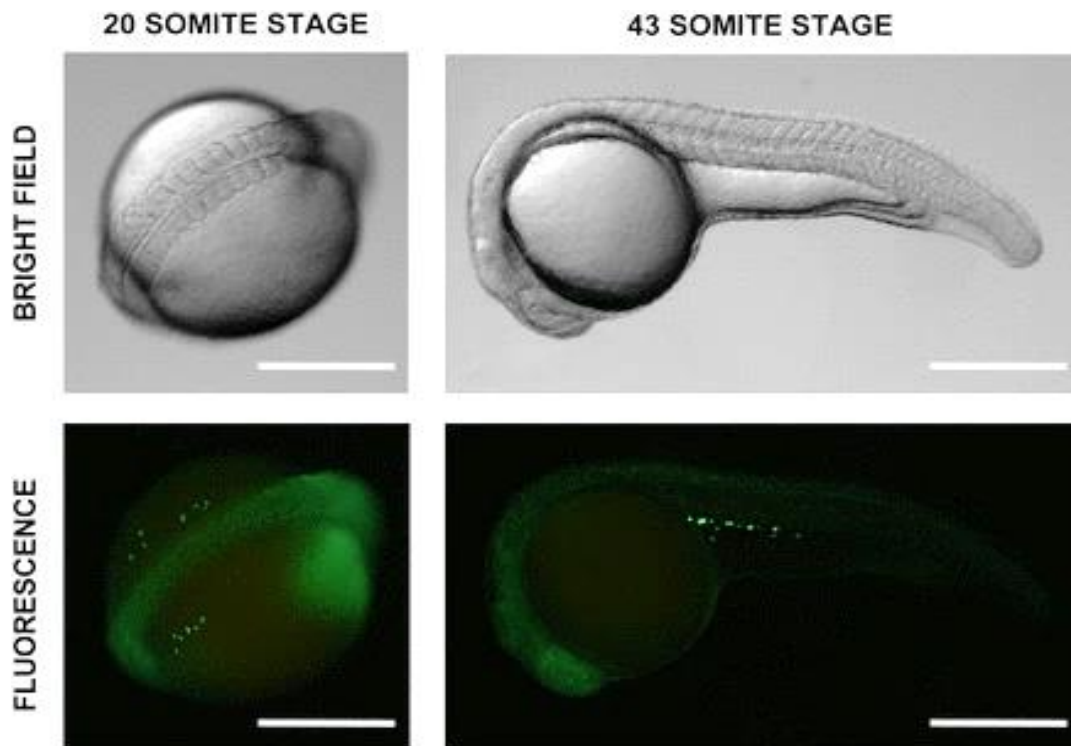
Obrázek 2. (a-d) normální migrace PGC (červené tečky) podle výsledků Doitsidou et al 2002 a Knaut et al. 2003. (a) čtyři shluky PGC pocházející z náhodných míst podél okrajů embrya a migrující směrem k dorsální středové linii. (b) Na začátku somitogeneze (formování segmentů), SDF-1 RNA (zeleně) je silně exprimováno blízko prvního segmentu a právě sem PGC směřují. (c) Během somitogeneze se čtyři shluky PGC pohybují směrem k místu s vyššími hodnotami SDF-1. (d) Na konci embryonálního vývoje PGC asociují s buňkami exprimující SDF-1 v místě budoucích gonád (zelený pruh). (e-g) studie SDF-1 a příslušného receptoru CXCR4b. (e) po tom co je SDF-1 vyčerpáno (modro-šedý pruh) se zárodečné buňky rozptýlí po celém embryu. (f) Následné exprimování SDF-1 na jiném místě láká PGC na novou pozici. (g) PGC, které vyčerpaly CXCR4b (fialově) již nemigrují směrem k SDF-1, které je exprimováno na nové pozici. Převzato a upraveno podle Kunwar a Lehmann (2003)

2.4 VIZUALIZACE BUNĚK

Nejběžnějším způsobem vizualizace PGC u rybích embryí je použití uměle syntetizované GFP-nos1 3'UTR mRNA, která se injikuje do embrya ve stádiu 1-4 buněk (Higaki et al., 2010). Pro úspěšnou injikaci je potřeba embrya nejdříve dechorionovat. Tato dechorionace probíhá nejčastěji za použití 0,1% trypsinu, 0,4% močoviny v Ringerově roztoku, ten se skládá ze 128 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂ a 0,1 M TAPS s pH 8,5. Použití buď trypsinu, nebo kombinace trypsinu a močoviny závisí na druhu ryb, například pro dánío pruhované je vhodné použití pouze 0,1% trypsinu. Naopak pro karase stříbřitého (*Carassius auratus*) je typické použití 0,1% trypsinu v kombinaci s 0,4% močovinou (Yamaha et al., 1986). Dechorionovat jikry lze i manuálně za použití pinzet (Kobayashi et al., 2004).

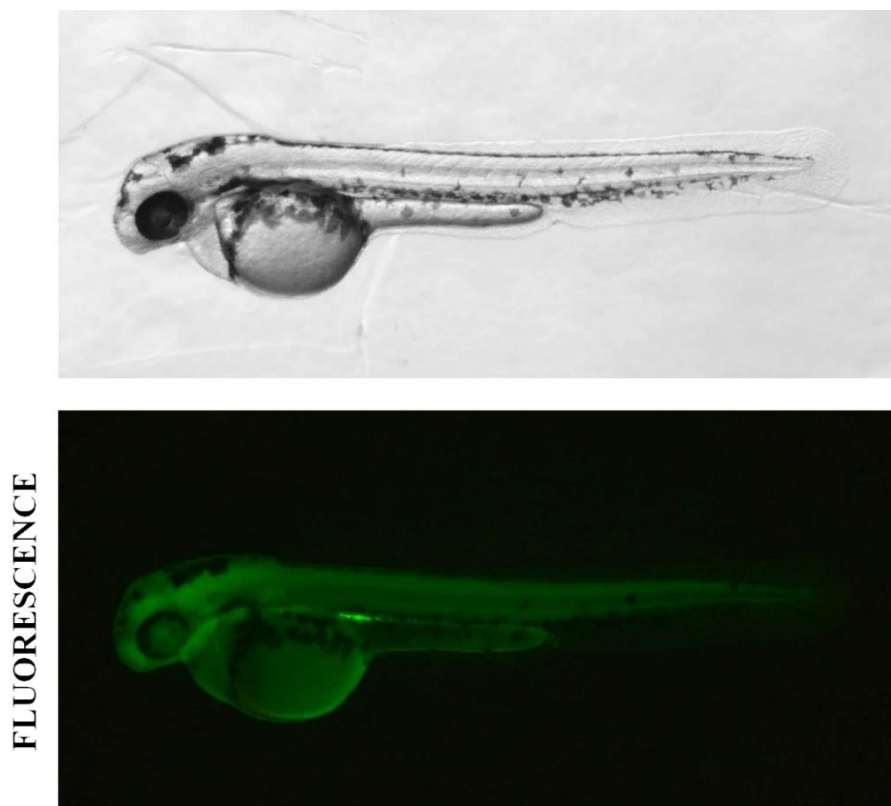
Jelikož pracujeme s živými zárodečnými buňkami, je důležité provádět vizualizaci neinvazivní metodou, tedy značením pomocí GFP, která buňky nikterak nepoškodí. Pro značení je důležité použít GFP geny řízené regulačními oblastmi v daných buňkách. Jedním z těchto genů je například *vasa*, ten je exprimován v různých organismech od *Drosophily* až po člověka. Pro zkoumání *vasa* genu je vhodným druhem pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), ať už z hlediska komerčního, tak z hlediska snadné manipulace (Okutsu et al., 2006).

Využitím transgenní linie nesoucí *gfp* řízený promotorem *vasa* (*vasa::gfp*) můžeme pozorovat následnou expresi *gfp* v zárodečné linii buněk a to i v dalších generacích (Goto-Kazeto et al., 2010). Kromě pstruha duhového jsou rozsáhlé studie vizualizace za pomoci *vasa* genu prováděny i u modelového dánía pruhovaného (Fan et al., 2008). U ryb chrupavčitých, pod něž spadají jeseteři, byla nově vyvinuta metoda vizualizace PGC *in vivo* za použití FITC-dextran (fluorescein isothiocyanate-dextran). FITC-dextran je injikován přímo do vegetativního pólu embrya, místa lokalizace zárodečné plasmy, ve stádiu 1-4 buněk (Saito & Pšenička, 2015). Techniky vizualizace PGC jsou využívány pro studium vývoje PGC zahrnující migrační a proliferační znaky v embryích, larvách a juvenilech (Robles et al., 2015).



Obrázek 3. Lokalizace PGC u dvou různých vývojových stádií embryí lina (*Tinca tinca*). Po injikování EGFP mRNA do embryí ve stádiu 1-4 buňky, emitují PGC zelenou fluorescenci. Měřítka 500 μ

Převzato a upraveno z Linhartova et al. (2014)



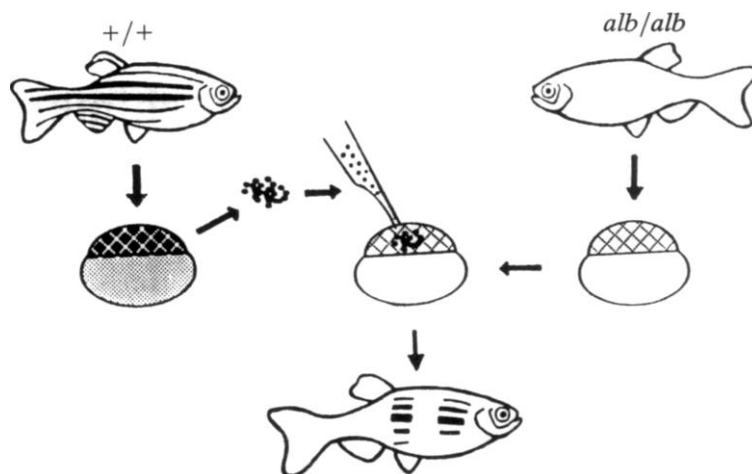
Obrázek 4. Transgenní gfp::vasa larva dánia pruhošaného (*Danio rerio*).

Vyfocono v laboratoři zárodečných buněk, VÚRH, Vodňany (2016)

2.5 CHIMÉRY ZÁRODEČNÉ LINIE

Chiméra je jedinec, který se skládá z buněk pocházejících z různých jedinců. Pokud se u jedince chimérismus týká pohlavních buněk, nazýváme tohoto jedince chimérou zárodečné linie. Takový jedinec může vzniknout transplantací PGC, nebo transplantováním spermatogonií/oogonií. Chiméry zárodečné linie jsou důležité pro techniku takzvané produkce pomocí náhradních rodičů, kdy získáváme gamety cílového druhu pomocí druhu hostitelského. Produkce těchto chimér je výhodná například z hlediska získání gamet ohrožených druhů, u kterých díky využití náhradních rodičů (chiméry zárodečné linie), můžeme rapidně snížit dobu sexuálního vývoje a tím i zkrátit generační interval (Lacerda et al., 2013; Okutsu et al., 2006). Aby byl vznik chiméry efektivní, musí být recipient sterilizován.

Pokusy o vytvoření chimér zárodečné linie jsou prováděny u mnoha druhů ryb. Například u dánia pruhovaného, byl v roce 1992 proveden experiment transplantace blastomer z geneticky pigmentovaného jedince (donora), do albinotického recipienta ve stádiu mid-blastuly. Po několika desítkách hodin byla pozorována pigmentace v těle embrya recipienta a tudíž úspěšný vznik chiméry (Alvarez et al., 2007; Lin et al., 1992).



Obrázek 5. Diagram experimentu vytvoření pigmentované chiméry u dánia pruhovaného (*Danio rerio*)
Převzato a upraveno podle Lin et al. (1992).

U medaky japonské (*Oryzias latipes*) byl také proveden experiment, založený na vytvoření chiméry z transplantovaných blastomer (Hong et al., 1998). Zároveň byly u tohoto druhu též pokusy s transplantací wild-type buněk do albinotického recipienta (Alvarez et al., 2007).

2.6 STERILIZACE

Při produkci chimér zárodečné linie je nezbytné, aby byl recipient sterilní. Mohlo by totiž docházet ke kompetici mezi PGC donora a endogenními PGC recipienta a nebyl by tudíž zajištěn zisk pouze donorových gamet. Existuje několik metod jak sterilizaci provést. Patří mezi ně sterilizace pomocí operace, ozařování, chemické/hormonální ošetření, nebo manipulace s genovou expresí (Robles et al., 2015; Saito & Pšenička, 2015).

2.6.1 HYBRIDIZACE

Alternativní metoda sterilizace, kdy dochází k vytvoření hybrida, díky vzdáleně příbuzným rodičovským druhům. Tito hybridy jsou sterilní z důvodu komplikací vzniklých párováním chromozomů během meiózy. Touto metodou ale není vždy zajištěn úspěch, jelikož mnohdy jsou i vzniklí hybridy stále plodní (Robles et al., 2015).

2.6.2 TRIPLOIDIZACE

Je druh genomové manipulace, který patří mezi nejčastější a nejjednodušší způsoby sterilizace recipienta. Pro indukci triploidie je nutné použít hydrostatický tlak, teplotu, nebo chemický šok ihned po oplození, což zajistí narušení zadržení druhého meiotického pólového tělíska, které obsahuje haploidní sadu mateřských chromozomů (Robles et al., 2015). Nesprávný vývoj reprodukčního systému u triploidních ryb je způsoben právě přítomností třetí sady chromozomů, která zabraňuje normálnímu procesu párování homologních chromozomů (Gomelsky, 2003). Dalším způsobem vzniku triploidie je křížení mezi diploidním a tetraploidním jedincem (Piferrer et al., 2009).

2.6.3 CHEMICKÁ STERILIZACE

Při této metodě sterilizace se využívá spojení vysoké teploty (35 °C), která obecně aktivuje proliferaci spermatogonií, spolu s chemickým ošetřením. V tomto případě spolu s použitím busulfanu (1,4-dimethanesulfonyloxybutane), neboli nespecifického alkylačního činidla používaného i při léčbě rakoviny. Tato kombinace způsobuje zánik rychle se dělících buněk (Iwamoto et al., 2004; Lacerda et al., 2013; Robles et al., 2015).

2.6.4 POTLAČENÍ EXPRESE GENŮ

Dočasná inhibice exprese genů důležitých pro vývoj PGC je také jednou z používaných metod sterilizace. Mezi cílové geny patří například již zmíněné *vasa*, *nanos*, nebo *dead end (dnd)*. Potlačení exprese se může provádět za použití antisense morpholino oligonukleotidů (MO). Často využívaným postupem sterilizace je pomocí *dnd* MO, který je

injikován do embryí nejlépe ve stádiu 1-2 buněk. *dnd* MO následně blokuje translaci *dead end* mRNA a způsobuje ztrátu migrační schopnosti PGC (Ciruna et al., 2002; Saito et al., 2008).

2.7 TRANSPLANTACE ZÁRODEČNÝCH BUNĚK

Transplantace můžeme rozdělit na několik typů. Pokud transplantujeme buňky od dárce geneticky identického s recipientem, hovoříme o transplantaci syngenní. Druhým typem je transplantace buněk od geneticky neidentického jedince, ale z téhož živočišného druhu nazývaná alogenní. Poslední možností je transplantace mezi jedinci pocházejícími z odlišných druhů, nazývaná transplantace xenogenní (Hořejší & Bartůňková, 2009).

V případě, že transplantujeme primordiální zárodečné buňky, hovoříme o vzniku chiméry zárodečné linie (Yamaha et al., 2007). Chiméry zárodečné linie jsou poté použity k získání potomstva pocházejícího ze zárodečných buněk donora (Gossler et al., 1986; Saito et al., 2010). Pro získání této chiméry existují různé metody transplantace zárodečných buněk. Patří mezi ně transplantace blastomer, neboli buňky vzniklé dělením zygoty (Yamaha et al., 2007), transplantace blastodermálního štěpu (Yamaha et al., 1998) a transplantace, při které jsou PGC vizualizovány pomocí GFP, izolovány a následně transplantovány do recipienta (Saito et al., 2008). Další velmi používanou metodou transplantace zárodečných buněk je transplantace spermatogonií (Lacerda et al., 2006), případně oogonií (Yoshizaki et al., 2010).

2.7.1 TRANSPLANTACE BLASTOMERY SPOLU S PGC

Poprvé byl tento způsob transplantace PGC proveden na dániu pruhovaném v roce 1992 (Lin et al., 1992). Metoda probíhá za použití skleněné mikrokapiláry a mikromanipulátoru, kterými jsou postupně nasávány blastomery donora (přibližně po 5-20 blastomerách) obsahující jak PGC, tak somatické buňky. Tyto vyčleněné blastomery jsou dále transplantovány do blastodisku recipienta. (Yamaha et al., 2007; Zou & Wei, 2010). Embryo recipienta je dechorionované a nachází se ve stádiu blastuly o počtu přibližně 1000 buněk (Alvarez et al., 2007). Recipienta je nutno před transplantací ještě sterilizovat, aby nedocházelo ke kompetici buněk a vznik chiméry byl úspěšný (Lacerda et al., 2013). Viz kapitola Sterilizace. Blastomery rybího embrya jsou v časném vývoji vysoce pluripotentní. Tato vlastnost byla prokázána na experimentu s karasem stříbřitým (*Carassius*

auratus), kdy bylo využito metody nazývané „sandwiching“, při které se část blastodermu, ze spodní části blastomery, mikrochirurgicky odřízla a byla vložena mezi dvě části blastodisku embrya donora. Následně bylo možné sledovat vývoj embrya s transplantovaným štěpem blastodermu, které se vyvíjelo úplně normálně, jako by byl blastoderm původní (Yamaha et al., 1998; Yamaha et al., 2007). Jediným problémem, této jinak jednoduché metody transplantace, je přítomnost mnoha somatických buněk, odříznutých spolu s malým množstvím PGC. Tyto somatické buňky pak snižují úspěšnost produkce gamet donora (Robles et al., 2015).

2.7.2 TRANSPLANTACE PGC

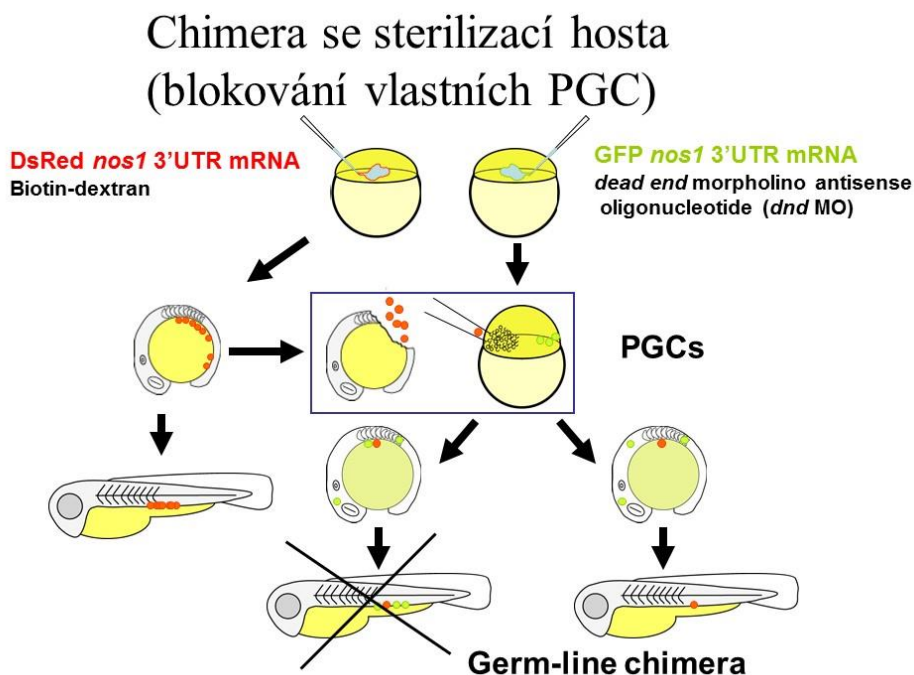
Transplantace samotných PGC je výhodná především při transplantaci mezi různými druhy ryb, kde není omezena migrace PGC somatickými buňkami donora (Saito et al., 2010). Tento způsob transplantace byl poprvé popsán v roce 2008 (Saito et al., 2008), kdy bylo zvoleno dánío duhové (*Danio albolineatus*) v roli donora a dánío pruhované (*Danio rerio*) jako recipient. Nejprve se provedlo značení PGC embryí ve stádiu somitogeneze za pomoci GFP-nos1 3'UTR mRNA. Díky tomu bylo možné rozeznat jednotlivé PGC. Ty byly nasávány skleněnou mikrokapilárou z embryí ve stádiu 10-15 somitů. Vždy jediné PGC bylo transplantováno do marginální oblasti blastodisku embrya recipienta, které se nacházelo ve stádiu blastuly. Samozřejmě musel být zastaven vývoj vlastních PGC v embryích recipienta (dánío pruhované), to bylo zajištěno díky injikování *dnd* MO.

Aby byla ověřena správná funkce gamet chimérických jedinců, byli chimérická samice a samec umístěni do třecí nádrže. Získaná oplodněná vajíčka byla na pohled shodná s vajíčky dánía pruhovaného, ovšem vzor zbarvení se shodoval s donorem, tedy dáníem duhovým. Původ dánía duhového byl rovněž potvrzen genetickými markery. Bylo tím prokázáno, že metodu transplantace samostatných PGC lze využít i u blízce příbuzných druhů (Saito et al., 2008).

2.7.2.1 Izolace PGC pomocí FACS

Existuje několik způsobů jak izolovat PGC. Nejběžnější metodou je manuální izolace. Alternativní metodu izolace PGC popsala ve své práci Goto-Kazeto v roce 2010. Jedná se o metodu izolace buněk za použití průtokové cytometrie (FACS). Izolace se provádí u embryí ve stádiu somitogeneze. Tyto embrya jsou nejprve dechorionována, zároveň je za použití fosfátového pufru (PBS) odstraněn žloutek. Následně je pak možné, pomocí enzymatické

disociace, izolovat fluorescenčně značené PGC (Goto-Kazeto et al., 2010). Díky průtokové cytometrii je možné rozdělit buňky na GFP-positivní a GFP-negativní s tím, že PGC lze vedle GFP-positivního signálu odlišit rovněž díky rozdílné velikosti (přibližně 20 µm průměr), excentricky umístěným jádrům a na granule bohaté cytoplazmě (Kobayashi et al., 2004; Yoshizaki et al., 2003).



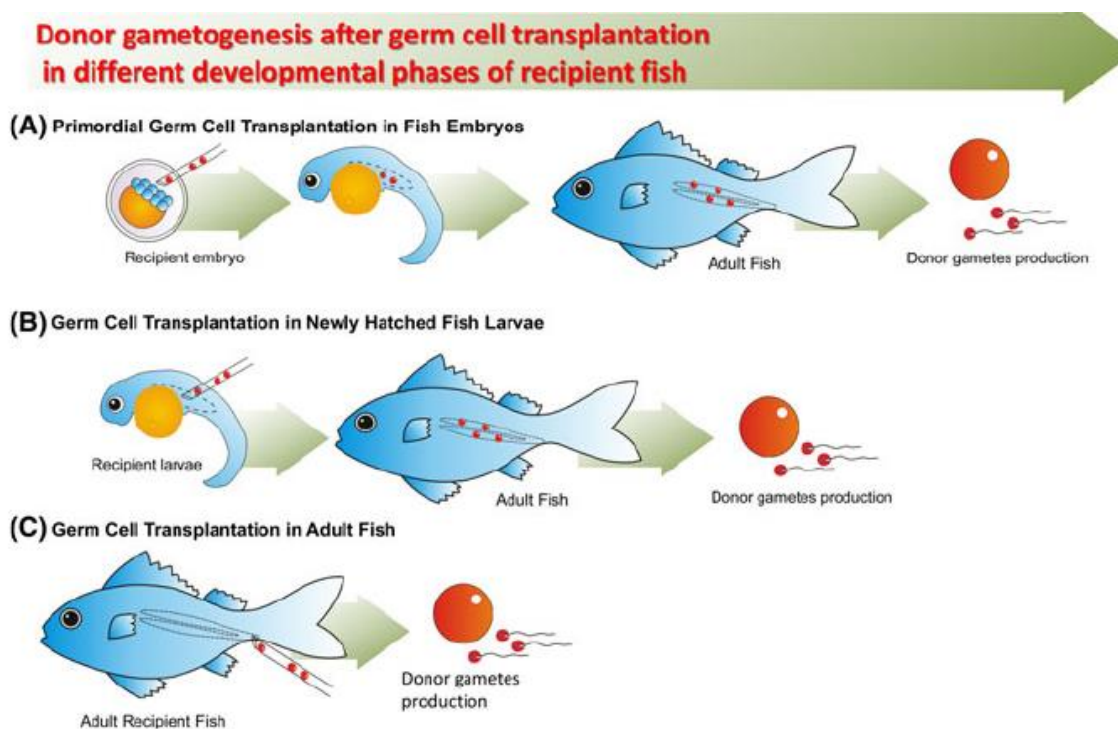
Obrázek 6. Experiment transplantace PGC značených DsRed nos1 3'UTR mRNA. Embrya recipienta byla sterilizována pomocí injekce *dead end* morpholino antisense oligonucleotidu. GFP nos1 3'UTR mRNA bylo použito pro kontrolu eliminace PGC. DsRed nos1 3'UTR mRNA značené larvy (červeně) jsou výsledkem úspěšné transplantace.

Převzato z prezentace k předmětu Biotechnologie akvakultury, FROV JČU

2.7.3 TRANSPLANTACE SPERMATOGONIÍ

Tato metoda transplantace zárodečných buněk je dnes nejvíce používanou. Poprvé byla vyzkoušena v roce 1994 (Brinster a kol.) na myším modelu. Úspěšnost transplantací spermatogoniálních zárodečných buněk přímo do *testes* recipienta je velmi vysoká a umožňuje z recipienta získávat nejen sperma, ale i vajíčka pocházející od donora. Jako modelový druh pro transplantaci spermatogonií byl použit v roce 2006 pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Spermatogoniální zárodečné buňky, uložené v testikulárních buňkách a izolované z dospělého samce pstruha duhového, byly transplantovány do peritoneální dutiny čerstvě vylíhnutých embryí obou pohlaví. Testikulární buňky posléze diferencovaly do spermií u samců a funkčních vajíček u samic recipientů. Jak spermie, tak vajíčka získaná od recipientů byla schopná produkce normálního potomstva (Okutsu et al.,

2006). Stejně transplantační experimenty se spermatogoniálními buňkami byly provedeny i u tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*), kde byly spermatogonie transplantovány pomocí urogenitální papily do dospělého (Lacerda et al., 2006). Stejně jako u všech metod transplantace je nutné recipienta sterilizovat, jinak může docházet ke kompetici zárodečných buněk.



Obrázek 7. Ukázka různých technik transplantace zárodečných buněk, za současného využití donorů a recipientů v různých vývojových stádiích. (A) transplantace PGC z embryí donora ve stádiu blastuly. PGC jsou injikována do blastodisku. Takto vzniklé chiméry jsou chovány až do dosáhnutí pohlavní dospělosti, kdy jsou schopny produkce gamet donora. (B) Transplantace zárodečných buněk do nově vylíhlých larev. (C) Transplantace zárodečných buněk do dospělého. Při této metodě jsou spermatogoniální kmenové buňky transplantovány přímo do *testes* pohlavně dospělých jedinců, kde se posléze obnoví gametogeneze a produkce životaschopných gamet donora.

Převzato a upraveno podle Lacerda et al. (2013)

2.8 VYUŽITÍ PGC

Primordiální zárodečné buňky mohou nalézt široké spektrum využití. Díky možnosti transplantace, vzniku chimér zárodečné linie, kryoprezervace a vizualizace, se stávají důležitým nástrojem pro výzkum. Výzkum PGC ryb má mnoho výhod, ryby patří do velmi početné skupiny obratlovců, jejich embryonální vývoj je zároveň relativně jednoduchý a probíhá mimo tělo samice, je tudíž vhodný pro různé experimenty týkající se embryonálních zárodečných buněk. Mezi rybami je i mnoho ohrožených druhů, které lze v dnešní době pomocí náhradní reprodukce úspěšně zachovávat. Náhradní reprodukce navíc umožňuje mnoho genetických vylepšení u recipienta jako je zkrácení generačního cyklu (transplantace mezi druhem s dlouhým generačním cyklem a druhem s krátkým generačním cyklem), zvýšení počtu produkovaných gamet, zachování genetické různorodosti díky transplantaci směsi zárodečných buněk pocházející z různých jedinců do jednoho, který se stává chimérou zárodečné linie (např. u pstruha), nebo zvýšení rozsahu adaptace na vodu mezi mořskými a sladkovodními druhy ryb (Robles et al., 2015).

Kromě ohrožených druhů najdeme mezi rybami i řadu komerčně důležitých druhů, jejichž chov je možné díky transplantacím a studiím PGC zefektivňovat. Příkladem může být losos keta (*Oncorhynchus keta*) patřící do kostnatých ryb, které se třou jen jednou za život. Pokud by bylo sperma tohoto druhu možné získávat od náhradních rodičů opakovaně, tak by bylo možné snadnější genetické vylepšení zmíněného druhu. Jako náhradní rodič (recipient) by zde mohl být zvolen pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) (Yamaha et al., 2007).

Existují i pokročilejší metody týkající se práce s rybími PGC, jako například vytváření izogenních, nebo transgenních linií.

2.8.1 OHROŽENÉ DRUHY A NÁHRADNÍ REPRODUKCE

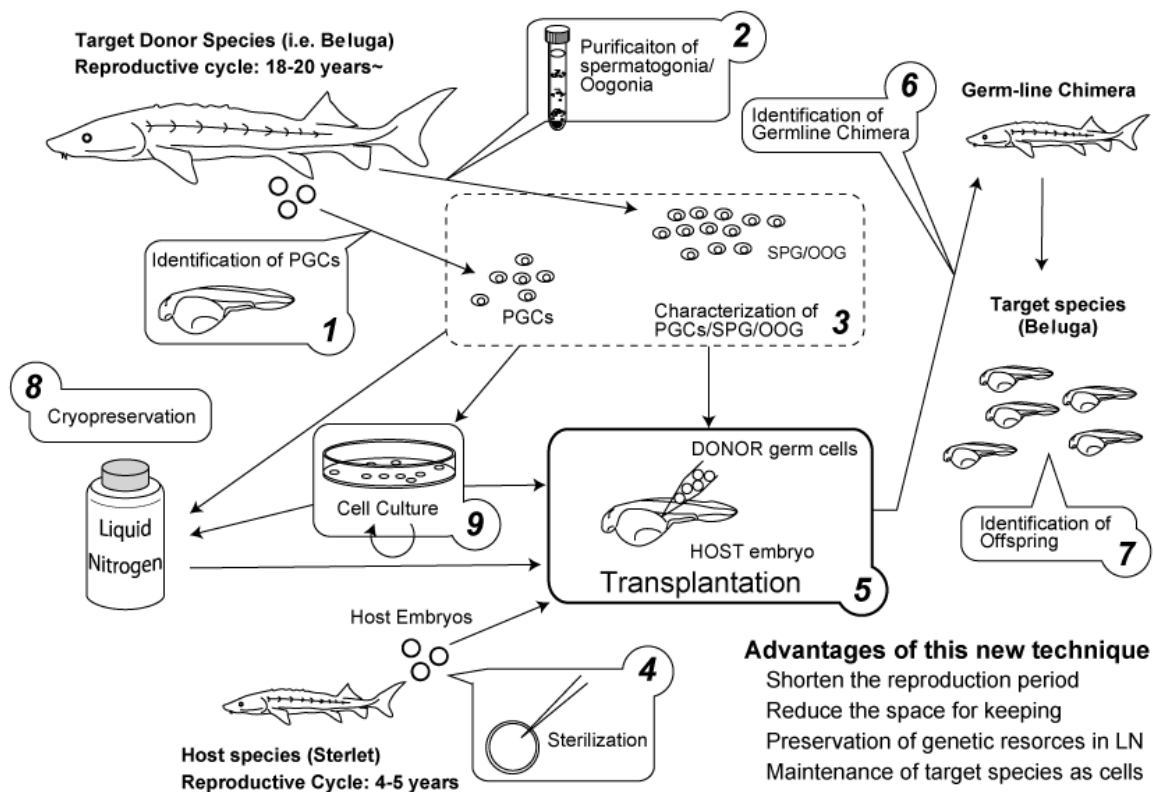
Díky transplantaci je možné zachovat ohrožené druhy ryb. Transplantace může proběhnout jak mezi embryi, tak i v pozdějších stádiích vývoje, jako je larvální, juvenilní a dospělé stádium. Pro ohrožený druh většinou platí nějaká biologická nevýhoda v podobě dlouhého generačního intervalu, malého počtu produkovaných gamet, nebo celkové velikosti ryby (je nevýhodné dlouhodobě udržovat velké ryby v nádržích). PGC ohrožených druhů se proto transplantují do jiných druhů s opačnými vlastnostmi. Transplantace je tedy xenogenní (transplantujeme do jiného, nepříbuzného druhu) a probíhá za použití náhradních rodičů (Robles et al., 2015). Mnoho pokusů bylo provedeno u čeledi lososovitých

(*Salmonidae*) (Lacerda et al., 2013; Okutsu et al., 2006; Takeuchi et al., 2004). Například v roce 2004 byl proveden experiment u lososa masu (*Oncorhynchus masou*), jako recipienta a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), jako donora. Oba druhy sice spadají pod lososovité ryby, ale fylogeneticky jsou oddělené více než 8mil let. Výsledkem transplantace bylo úspěšné přijetí PGC donora v těle recipienta, bez jakéhokoliv imunitního odmítnutí a tudíž vytvoření chiméry zárodečné linie, která produkovala normální potomstvo se znaky donora (Takeuchi et al., 2004).

2.8.2 KRYOPREZERVACE

Toto využití PGC, v podobě uchování v tekutém dusíku v genových bankách, je výhodné hlavně z hlediska zachování druhů ryb, kterým hrozí vyhynutí nebo u jinak vzácných druhů, linií či jedinců. Takto uchované PGC lze využít později díky technice transplantace PGC po rozmražení přímo do xenogenního recipienta a to dokonce i tehdy, když už donor vyhynul (Hiemstra et al., 2005; Kobayashi et al., 2003; Okutsu et al., 2006). Naproti tomu kryoprezervace rybích oocytů není v současné době možná z důvodu nízké permeability membrány oocytů pro kryoprotektant, velkému obsahu žloutku a vysoké citlivosti na ochlazení (Guan et al., 2010; Higaki et al., 2010). Nyní jsou proto genové banky ryb odkázány pouze na uchování spermií, z toho důvodu není šance uchovat specifickou maternální genetickou informaci jako je mtDNA, případně samičí sex chromozomy. Zamrazování PGC je tudíž vhodnější alternativou uchování kompletní genetické informace jedince. Příkladem je metoda kryoprezervace prováděná u dánia pruhovaného (*Danio rerio*), kdy se uchovávají pouze zeleně značená PGC těchto ryb. Tyto PGC jsou izolovány z embryí ve stádiu 10-15 somitů a následně mohou být transplantovány do sterilního recipienta. Bohužel tato možnost je stále diskutabilní vzhledem ke ztrátám buněk během kryoprezervace a celkovému malému množství získaných buněk, těch je kolem dvaceti z jednoho embrya (Higaki et al., 2010).

V tekutém dusíku ovšem nemusí být uchovány vždy jen izolované PGC. Je mnoho úspěšných experimentů s uchováním celých zamražených embryí různých druhů ryb jako je dáanio pruhované, kapr, nebo platýs, ze kterých se PGC izolovaly až po rozmražení (Higaki et al., 2010).



Obrázek 8. Diagram manipulace se zárodečnými buňkami. Nejdříve dochází k výběru vhodného donora a recipienta s odpovídajícími charakteristikami (zkrácení reprodukčního cyklu, menší velikost). Prvním krokem je identifikace a izolace PGC, nebo spermatogonií/oogonií (2,3) a následně transplantace do sterilního hosta (4,5). Následně vzniká chiméra (6), která produkuje potomstvo identifikovatelné díky testům křížení, pigmentaci, nebo genotypu (7). Navíc mohou být buňky uchovány v tekutém dusíku (8), nebo v kultuře (9).

Převzato a upraveno podle V. Robles et al. (2015)

3 ZÁVĚR

Práce shrnuje problematiku transplantace embryonálních zárodečných buněk se zaměřením na použití u ryb. Pro studium zárodečných buněk je tato početná skupina obratlovců velmi důležitá, ať už z hlediska snadno realizovatelných experimentů s embryi ryb, tak pro mnoho existujících možností jak dále s rybími PGC v laboratoři pracovat. Samotné transplantaci zárodečných buněk předchází mnoho úkonů a procesů, kterými musí PGC, pro efektivní výsledek transplantace, projít.

Důležitost PGC tkví v přenosu genetické informace z rodičů na potomky. Primordiální zárodečné buňky jsou totiž prekurzory samčích a samičích pohlavních buněk (spermii a oocytů). Pro správný vývoj musí tyto buňky migrovat embryem do cílového místa, ve kterém následně probíhá diferenciace a vývoj budoucích gonád. Charakteristika PGC je popsána u mnoha živočišných druhů od *Drosophily*, zástupce ptáků, myší, až po samotného člověka (Braat et al., 1999). Modely vzniku a migrace jsou ovšem u různých druhů rozdílné. Jako modelový druh pro práci s rybími PGC je používáno dánio pruhované (*Danio rerio*), na kterém byl proveden nespočet experimentů týkajících se práce se zárodečnými buňkami.

Aby bylo docíleno úspěšné transplantace, musí PGC projít několika kroky. Jedná se o samotný výběr vhodného donora a recipienta splňující stanovené charakteristiky pro transplantaci (reprodukční cyklus, počet produkovaných gamet, velikost), následně o vizualizaci a izolaci PGC z embrya donora. Vizualizace se provádí díky injikování GFP-nos1 3'UTR mRNA přímo do buněk embrya. Izolované a označené PGC jsou pak transplantovány do embrya recipienta. Stádium embrya pro transplantaci se odvíjí od samotné metody transplantace. Například pro metodu transplantace blastomer se embryo donora i recipienta musí nacházet ve stádiu blastuly.

Úspěšným výsledkem transplantací je vznik chiméry nazývané chiméra zárodečné linie. Tyto chiméry v sobě nesou a nechají vyvíjet zárodečné buňky donora a při reprodukci produkují gamety obsahující znaky donora. I pro efektivní vznik chiméry zárodečné linie je několik podmínek, jako je sterilizace hosta. Pokud by se totiž recipient nesterilizoval, mohlo by docházet ke kompetici buněk donora a endogenních buněk recipienta, což by snižovalo úspěšnost vzniku chiméry zárodečné linie.

Chiméry zárodečné linie nalézají široké uplatnění v oblasti bioinženýrství. V současné době patří mnoho druhů ryb k ohroženým a právě v takové situaci se může využít chimér zárodečné linie, přes něž se, například díky xenotransplantacím, docílí opětovné produkce ohroženého druhu. Jinou metodou, jak zachovat ohrožené druhy, je kryoprezervace, při které

se izolované zárodečné buňky uchovávají v tekutém dusíku. Chiméry hrají důležitou roli i v komerčním využití ryb. Právě díky chimérám je možnost jak tuto efektivitu chovu komerčně důležitých druhů ryb, jako je například čeleď lososovití, vylepšit.

Zárodečným buňkám se dostává velké pozornosti a zajisté ještě přijde mnoho nových objevů týkající se jak jejich vývoje, migrace, specifikace, tak dalšího možného využití.

4 POUŽITÁ LITERATURA

- Alvarez, M. C., Béjar, J., Chen, S., & Hong, Y. (2007). Fish ES cells and applications to biotechnology. *Marine Biotechnology*, 9(2), 117–127.
- André, J., and C. H. Rouiller (1956) "L'ultrastructure de la membrane nucléaire des ovocytes del l'araignée (*Tegenaria domestica* Clark). *Proc. European Conf. Electron Microscopy, Stokholm, Acad. Press, New York.*
- Blaser, H., Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichman-Fried, M., Thisse, B., Thisse, C., & Raz, E. (2005). Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *Journal of Cell Science*, 118(17), 4027–4038.
- Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina et al., (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132(3), 463–473.
- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H. J. T. H., & Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics*, 216(2), 153–167.
- Braat, A., Speksnijder, J. E., & Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *The International Journal of Developmental Biology*, 43(7), 745–60.
- Cinalli, R. M., Rangan, P., & Lehmann, R. (2008). Germ Cells Are Forever. *Cell*, 132(4), 559–562.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., & Schier, A. F. (2002). Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14919–14924.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D. et al., (2002). Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell*, 111(5), 647–659.
- Dosch, R. (2015). Next generation mothers: Maternal control of germline development in zebrafish. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(1), 54–68.
- Eddy, E. M. (1975). Germplasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol*, 43:261–276
- Fan, L., Moon, J., Wong, T., Crodian, J., & Collodi, P. (2008). Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa::RFP transgenic embryos. *Stem Cells and Development*, 17(3), 585–597.

- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872–877.
- García-Castro, M. I., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (1997). Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *Journal of Cell Biology*, 138(2), 471–480.
- Gomelsky, B. (2003). Chromosome set manipulation and sex control in common carp: A review. *Aquatic Living Resources*, 16(5), 408–415.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., & Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23), 9065–9.
- Goto-Kazeto, R., Saito, T., Takagi, M., Arai, K., & Yamaha, E. (2010). Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1487–92.
- Guan, M., Rawson, D. M., Zhang, T., & Marlings, G. (2010). Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification, 31(3), 230–238.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., & Schartl, M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology*, 7, 3.
- Hiemstra, S. J., Lende, T. Van Der, & Woelders, H. (2005). The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources. *The Role of Biotechnology*, 25–36.
- Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M. et al., (2010). Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction*, 139(4), 733–740.
- Higaki, S., Mochizuki, K., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2010). Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(2), 212–218.
- Hong, Y., Winkler, C., & Schartl, M. (1998). Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3679–84.
- Hořejší, Václav a Jiřina Bartůňková (2009). *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.

- Iwamoto, T., Hiraku, Y., Oikawa, S., Mizutani, H., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2004). DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Science*, *95*(5), 454–458.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., & Nüsslein-Volhard, C. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor CXCR4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature*, *421*(6920), 279–282.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., & Takeuchi, T. (2003). Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiology and Biochemistry*, *28*(1), 479–480.
- Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., & Takeuchi, T. (2004). Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, *67*(1), 91–100.
- Koç, N. D., & Yüce, R. (2012). A light- and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebra fish (*Danio rerio*). *Biological Research*, *45*(4), 331–336.
- Kopranner, M., Thisse, C., Thisse, B., & Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & Development*, *15*, 2877–2885.
- Lacerda, S., Batlouni, S., Silva, S., Homem, C., & França, L. (2006). Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim Reprod*, *3*(2), 146–159.
- Lacerda, S., Costa, G., Campos-Junior, P., Segatelli, T. M., Yazawa, R., Takeuchi, Y. et al., (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, *39*(1), 3–11.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(10), 4519–4523.
- Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., Bols, N., & Collodi, P. (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(5), 2461–2466.
- Minina, S., Reichman-Fried, M., & Raz, E. (2007). Control of receptor internalization, signaling level, and precise arrival at the target in guided cell migration. *Current Biology*, *17*(13), 1164–1172.

- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2725–2729.
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., & Yoshizaki, G. (2006). Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *The Journal of Reproduction and Development*, 52(6), 685–693.
- Olsen, L. C., Aasland, R., & Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 66(1-2), 95–105.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3), 125–156.
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), 37–49.
- Robles, V., Riesco, M. F., Pšenička, M., Saito, T., Valcarce, D. G., Cabrita, E., & Herráez, P. (2015). Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*.
- 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. *Biology of Reproduction*, 78(1), 159–166.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., & Yamaha, E. (2010). Interspecies transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1479–1484.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., Adachi, S. et al., (2011). The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. *PLoS ONE*, 6(9), 1–8.
- Saito, T., & Pšenička, M. (2015). Novel technique for visualizing primordial germ cells in sturgeons (*Acipenser ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii*, and *Huso huso*). *Biology of Reproduction*, 93(4), 96.
- 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.

- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., & Takeuchi, T. (2004). Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, *430*(7000), 629–30.
- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S., Raz, E., & Farber, S. A. (2004). Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation short Article, *6*(Figure 2), 295–302.
- Xu, H. Y., Li, M. Y., Gui, J. F., & Hong, Y. H. (2010). Fish germ cells. *Science China Life Sciences*, *53*(4), 435–446.
- Yamaha, E., Mizuno, T., Hasebe, Y., Takeda, H., & Yamazaki, F. (1998). Dorsal specification in blastoderm at the blastula stage in the goldfish (*Carassius auratus*). *Development, Growth & Differentiation*, *40*(3), 267–275.
- Yamaha, E., Saito, T., Goto-Kazeto, R., & Arai, K. (2007). Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *Journal of Sea Research*, *58*(1), 8–22.
- Yamaha, E., Usui, K., Onozato, H., & Hamada, K. (1986). A Method for Dechoriation in Goldfish (*Carassius auratus*). *Nippon Suisan Gakkaishi*, *52*(11), 1929–1934.
- Yön, N. D., & Akbulut, C. (2015). Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *58*(2), 222–228.
- 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 (Cambridge, England)*, *124*(16), 3157–65.
- Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., & Okutsu, T. (2010). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, *137*(8), 1227–1230.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., & Takeuchi, T. (2003). Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiology and Biochemistry*, *28*(1-4),
- Zou, J., & Wei, X. (2010). Transplantation of GFP-expressing blastomeres for live imaging of retinal and brain development in chimeric zebrafish embryos, 3–5.