

Přednáška 3

Biologie reprodukce & Embryologie

Gamety

- Meióza
- Struktura a vývoj
- Rozdíly mezi vývojem vajíčka a spermie
- Regulace gametogeneze
- Ovariální a menstruační cyklus - vzájemný vztah
- Transport gamet, kapacitace spermií, akrozomová reakce

Oplození and časná embryogeneze

- Kortikální reakce
- Rýhování, morula, blastocysta
- Aktivace embryonálního genomu
- Embryonální kmenové buňky, přenos jádra (klonování)

Embryologie: co vše zahrnuje?

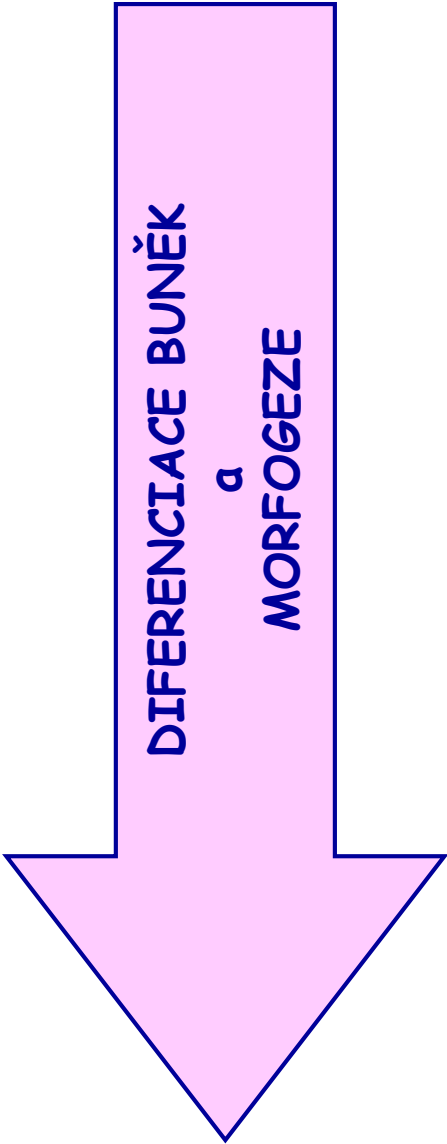
Zygota



Mnohobuněčné embryo



Dynamický mnohobuněčný organismus



STABILNÍ GENOM
↕
Genomická ekvivalence
(= stejné množství DNA a stejná nukleotidová sekvence ve všech buňkách organismu - klonování)



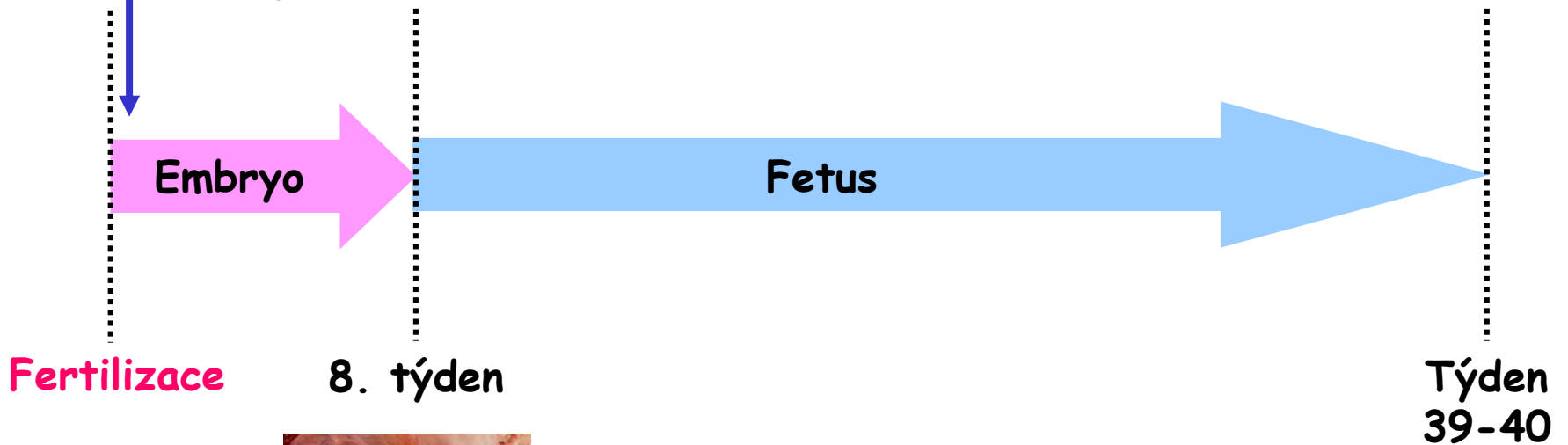
VARIABILNÍ TRANSKRIPTOM
↕
Regulátory transkripce

Embryonální x Fetální vývoj

Časné embryo
před implantací

Všechny orgány
jsou založeny

Porod



Fertilizace

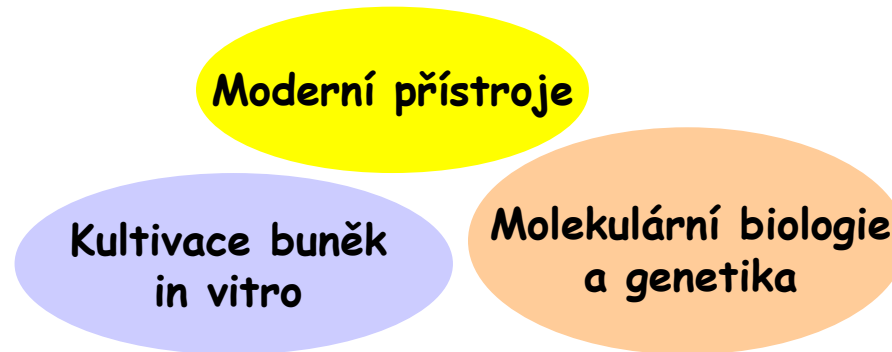
8. týden

Týden
39-40

Primitivní
srdce
začíná bít
ve
čtvrtém
týdnu.



K čemu je dobré pochopení principů reprodukce, vývoje gamet a embryonálního/fetálního vývoje?



- **Léčba neplodnosti**
- **Kontracepce**
- **Eliminace vývojových abnormalit**
 - Genetický základ vývoje gamet
 - Vyšetření genetického stavu plodu (amniová tekutina)
 - Porozumění efektům teratogenních agens
 - Vyšetření uvnitř dělohy - sonografie
 - Chirurgické zákroky uvnitř dělohy
 - Další

Proces rozmnožování

- zajišťuje kontinuální propagaci jedinců daného druhu a tedy jeho trvalou existenci
- klíčové pro rozmnožování je přenesení duplikátu DNA z rodičů na potomstvo
- u drtivé většiny druhů je tento přenos zajištěn pomocí vysoce specializovaných buněk - gamet

Jedinci odlišného pohlaví produkují odlišné gamety



Základní předpoklad pohlavního rozmnožování

Pohlavní rozmnožování prostřednictvím gamet

se může jevit jako zbytečně komplikované a méně efektivní než rozmnožování nepohlavní, ale

má velmi významnou adaptační úlohu.

Tato adaptační úloha se realizuje díky unikátním genetickým procesům, které se odehrávají během vývoje obou typů gamet - vajíček a spermií.

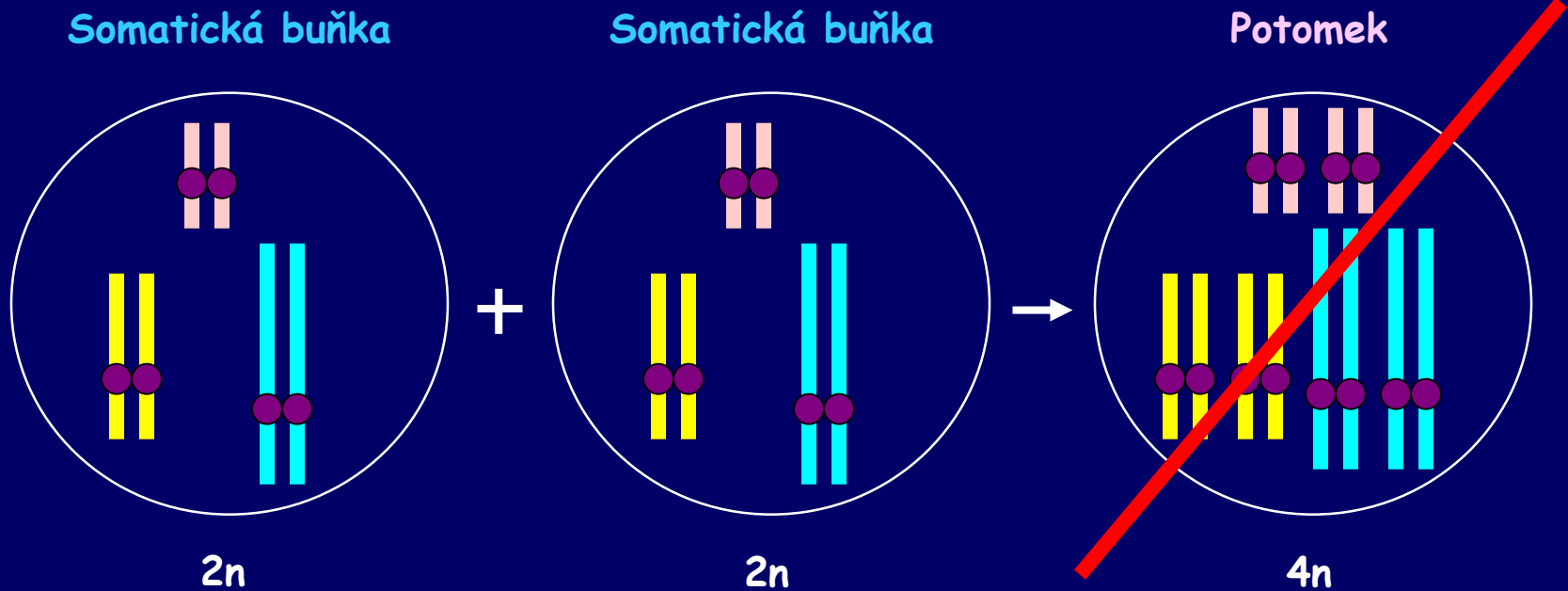
Přestože v mnoha morfogenetických detailech se vývoj vajíček a spermií mezi sebou výrazně liší, podstata klíčových genetických procesů je u obou shodná.

Genetické procesy klíčové pro gametogenezu se odehrávají během meiotického buněčného dělení -
MEIÓZY

Tyto genetické procesy zahrnují:

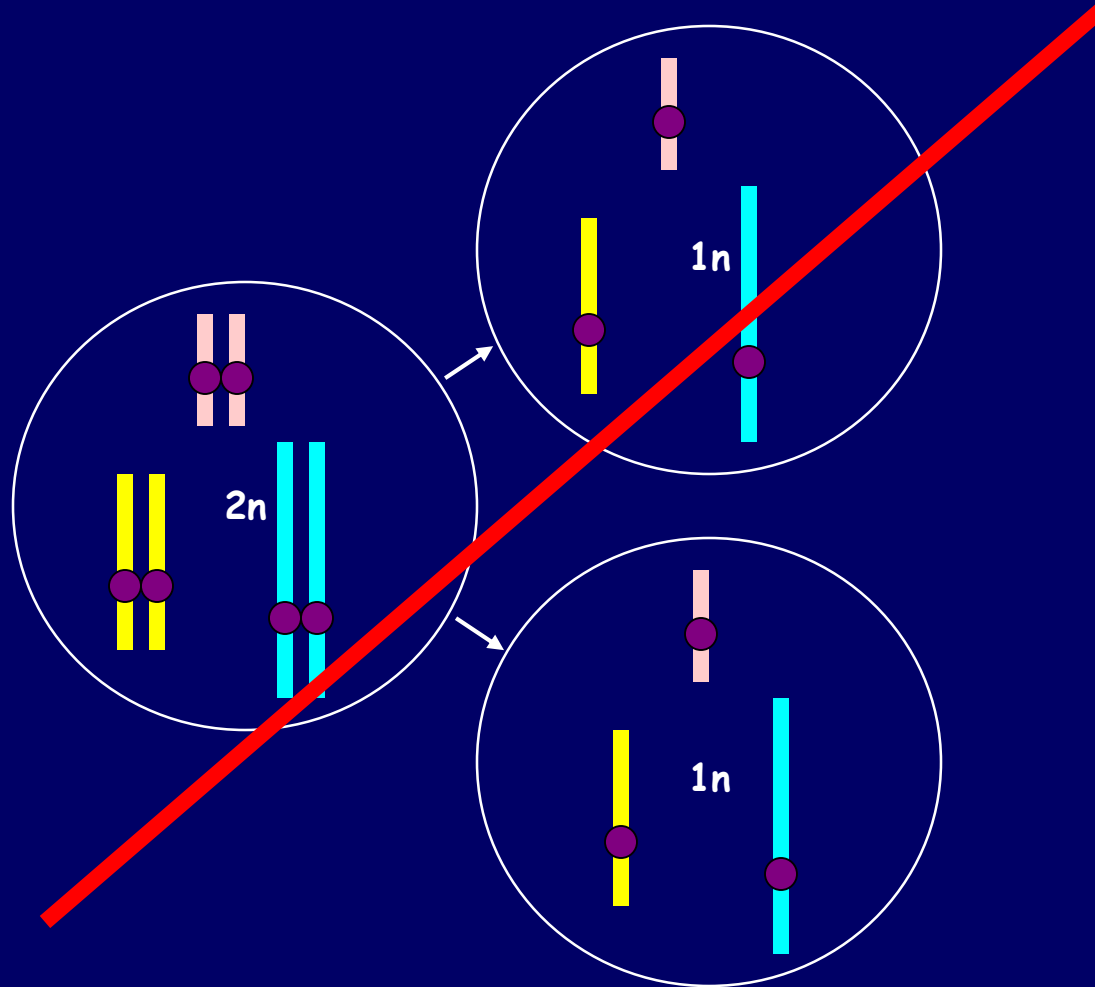
- „Crossing over“
- Nezávislou segregaci chromozomů
- Redukci počtu chromozomů

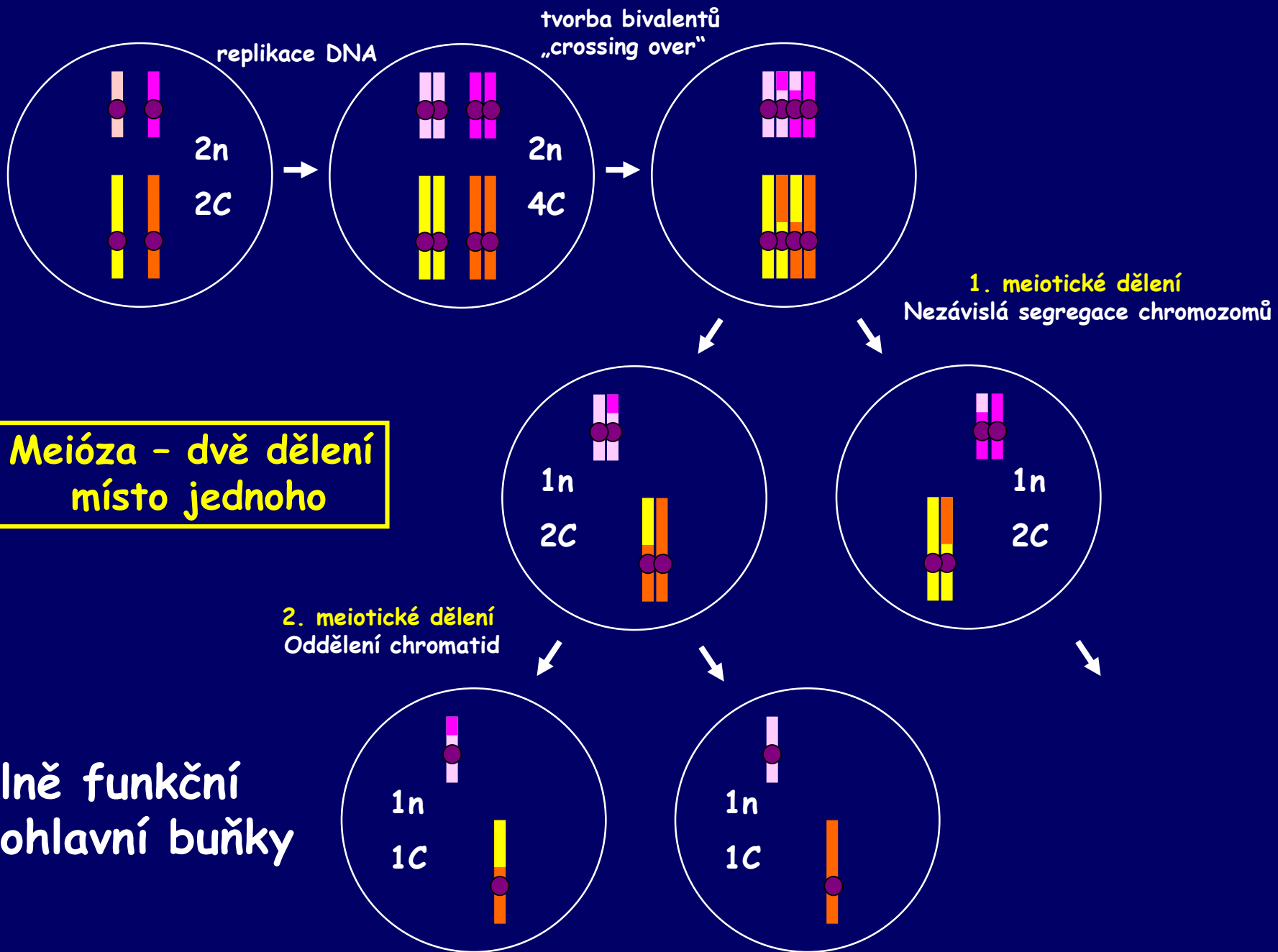
Redukce počtu chromozomů Proč?



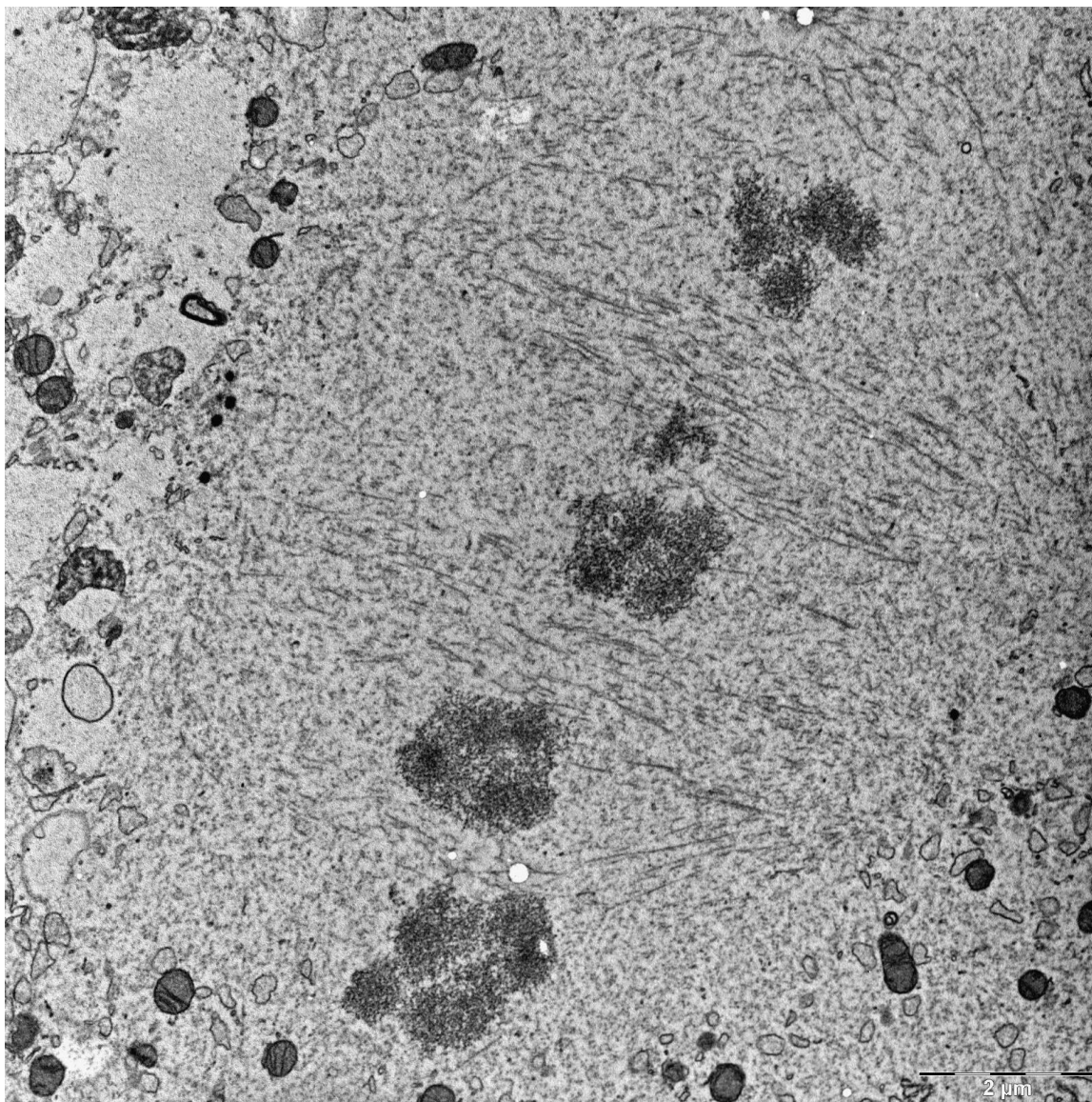
Gamety musí mít haploidní počet chromozomů (n), aby splynutí gamet nevedlo u potomků ke znásobení počtu chromozomů nad diploidní počet ($2n$).

Principiálně by se redukce počtu chromozómů mohla snadno odehrát v jednom kroku vynecháním replikace DNA s následnou separací homologních chromozómů při jednom dělení buňky.





MI oocyt - tetrády



- „Crossing over“
- Nezávislá segregace chromozomů
- Fertilizace

jsou zdrojem genetické diverzity, která je základem adaptace živých organismů včetně **ČLOVĚKA**

Genetická funkce

♂ Spermie

×

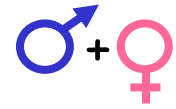
♀ Vajíčka

Význam pro
vývoj embrya
(reprodukcii)

Morfologické
a fyziologické
vlastnosti


Vývoj a mechanismy,
které jej řídí


Primordiální zárodečné buňky - PGC

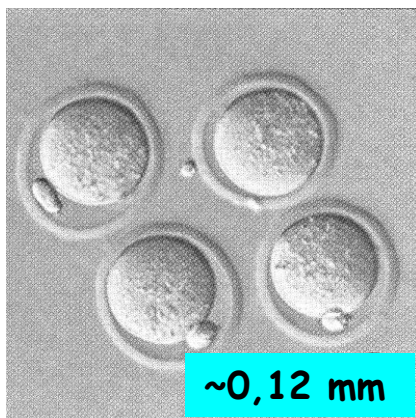


- kmenové buňky, které jsou společné spermiím i oocytům
- vznikají v žloutkovém vřetku (extraembryonálně)
- množí se mitotickým dělením a současně migrují do základu gonád (díky signálům z okolního prostředí - laminin, kit-ligand, TGF-beta1, ...)
- u člověka jsou pohlavně indiferentní až do ~6 týdne vývoje

VÝVOJOVÉ PROCESY

- spermie se ve varlatech tvoří nepřetržitě od dosažení pohlavní dospělosti až do velmi vysokého věku (dvě varlata muže mohou každou sekundu vyprodukovat více než 1000 spermatozoí) 

- počet oocytů (folikulů) v ováriu je v okamžiku narození neměnně dán (u ženy ~500 000)
- pouze malý počet oocytů se za život vyvine ve vajíčko schopné oplození (u ženy ~400) 
- v okamžiku menopauzy zůstává v ováriu díky atresii pouze malý počet oocytů (u ženy ~100-1000)



Oocyt

Jedna z největších a „nejvzácnějších“ (počtem i významem) buněk v těle.

Paradoxní buňka

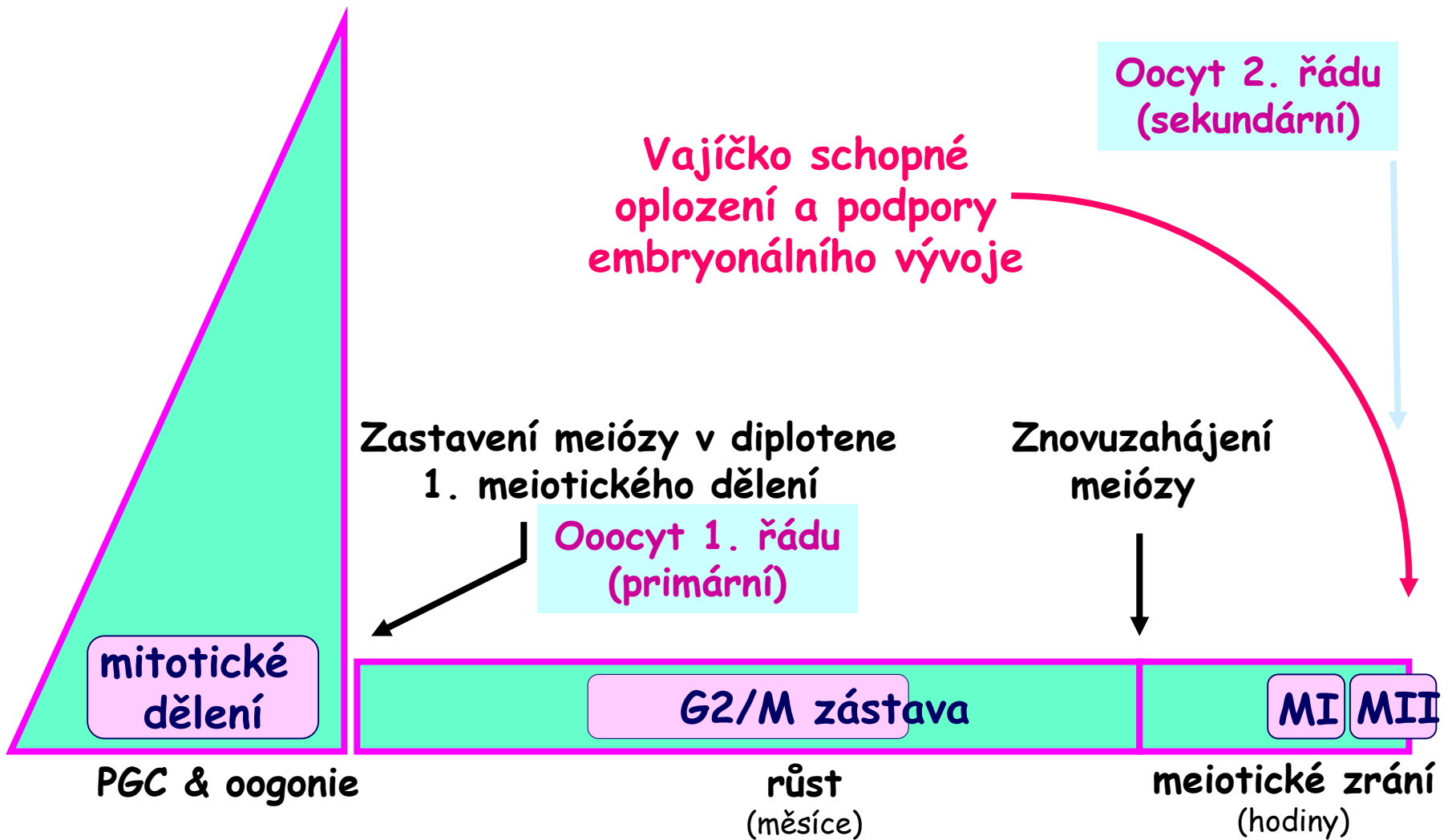
Vysoce specializovaná buňka
Jediná buňka v těle ženy, která je schopna projít meiózou a oplozením, a dát tak vznik novému individu.

&

„Totipotentní“ buňka
Je schopna generovat buněčnou různorodost mnohobuněčného organismu.

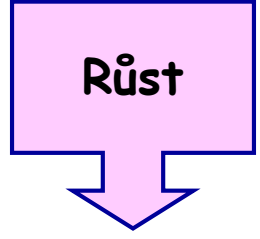
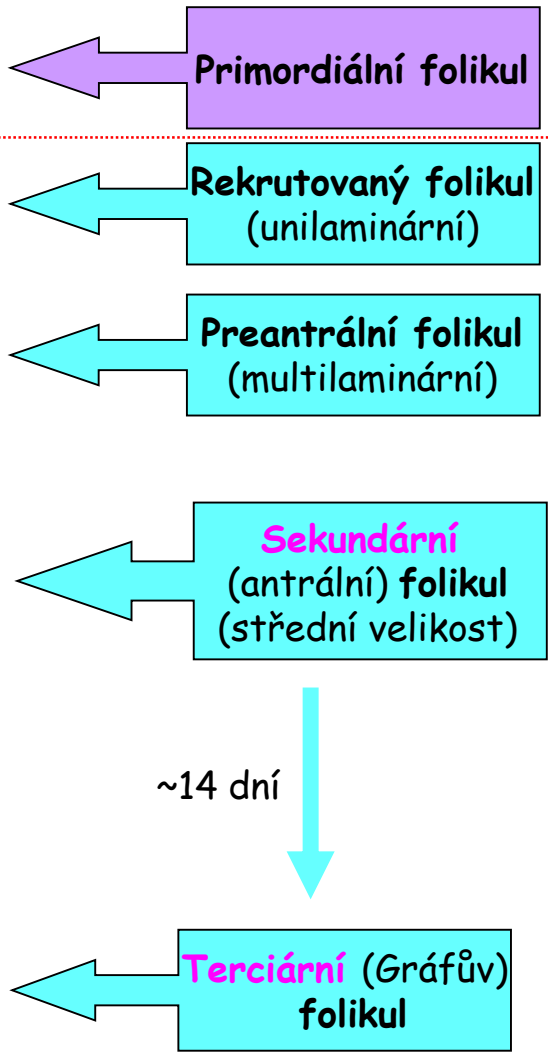
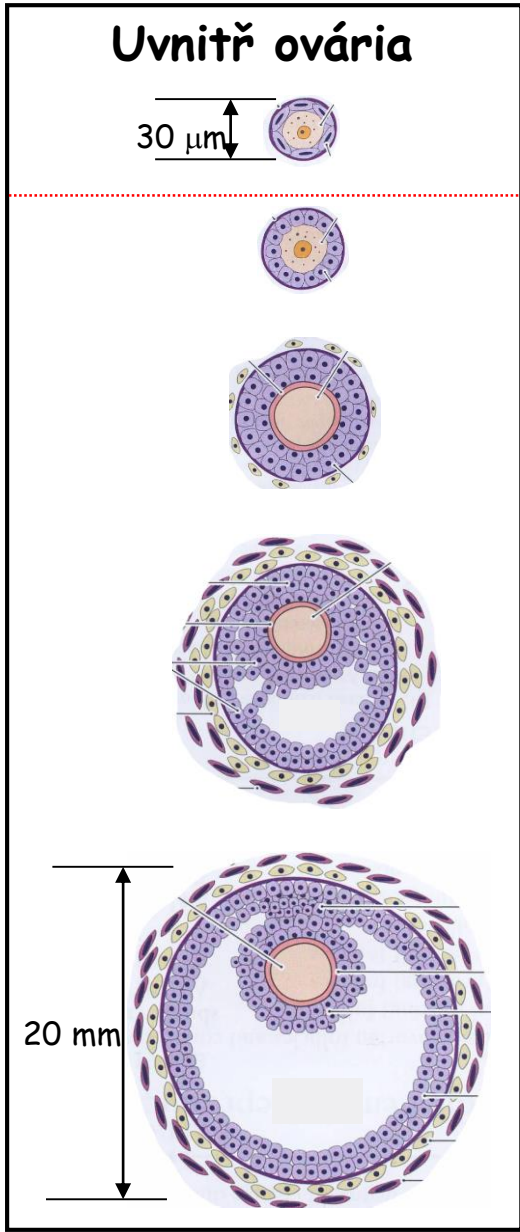
Ani éra klonování nedokázala vzít vajíčku jeho nenahraditelnou úlohu !

Klíčová období vývoje vajíčka



Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (1)

Diplotene I. meiotického dělení



Primární folikuly

Výběr **dominantního folikulu** (nejcitlivější k FSH)



Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (2)

Růst oocytu

Odehrává se **v ováriu** (současně s růstem folikulu)

&

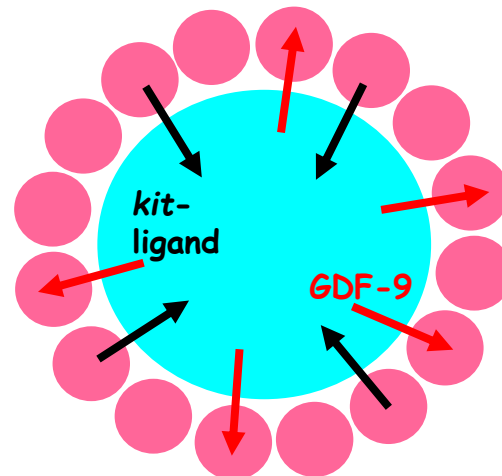
Signál, který iniciuje růst **není znám**
(není to FSH - hypofyzektomie nezabrání iniciaci růstu)

&

Je plně závislý na **kontaktu oocytu s granulózními buňkami** folikulu
(např. protein „gap junctions“ connexin-37)

&

Komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami je **obousměrná**



Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (3)

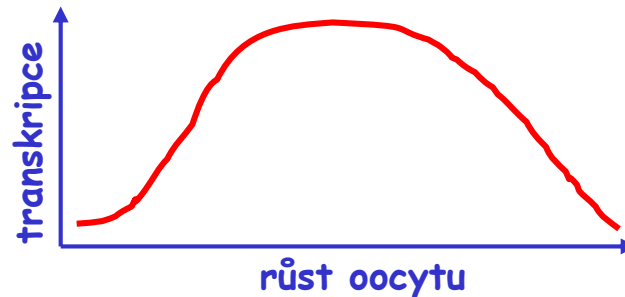
Růst oocytu

Pomalý, u člověka několikaměsíční proces

100x zvětšení objemu - **akumulace organel a molekul** dávajících vajíčku schopnost podporovat vývoj embrya až do okamžiku získání autonomie (asi 10^5 mitochondrií oocytu podporuje vývoj embrya až do stádia blastocysty)

Intenzivní transkripce -
akumulace mRNA v dormantním stavu (regulováno polyadenylací a ???)

Plně vyrostlý oocyt - ~2,5 ng RNA



Transkriptom
a proteom -
podmiňují
unikátní
vlastnosti
oocytu

Intenzivní translace - mnoho proteinů (velmi omezené znalosti)
Příklad: ZP1, ZP2, ZP3 - proteiny zona pellucida

Plně vyrostlý oocyt - ~120 ng proteinu

Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (4)

Epigenetické změny odehrávající-se během růstu

Reaktivace X chromozomu

- **somatické buňky** - jeden X chromozom inaktivován hypermetylací cytozinů v molekule DNA
- **rostoucí oocyt** - oba X chromozomy aktivní (nutné pro vývoj oocytu - karyotyp 45, X0 má za následek abnormální vývoj ovária)

&

Genomický imprinting

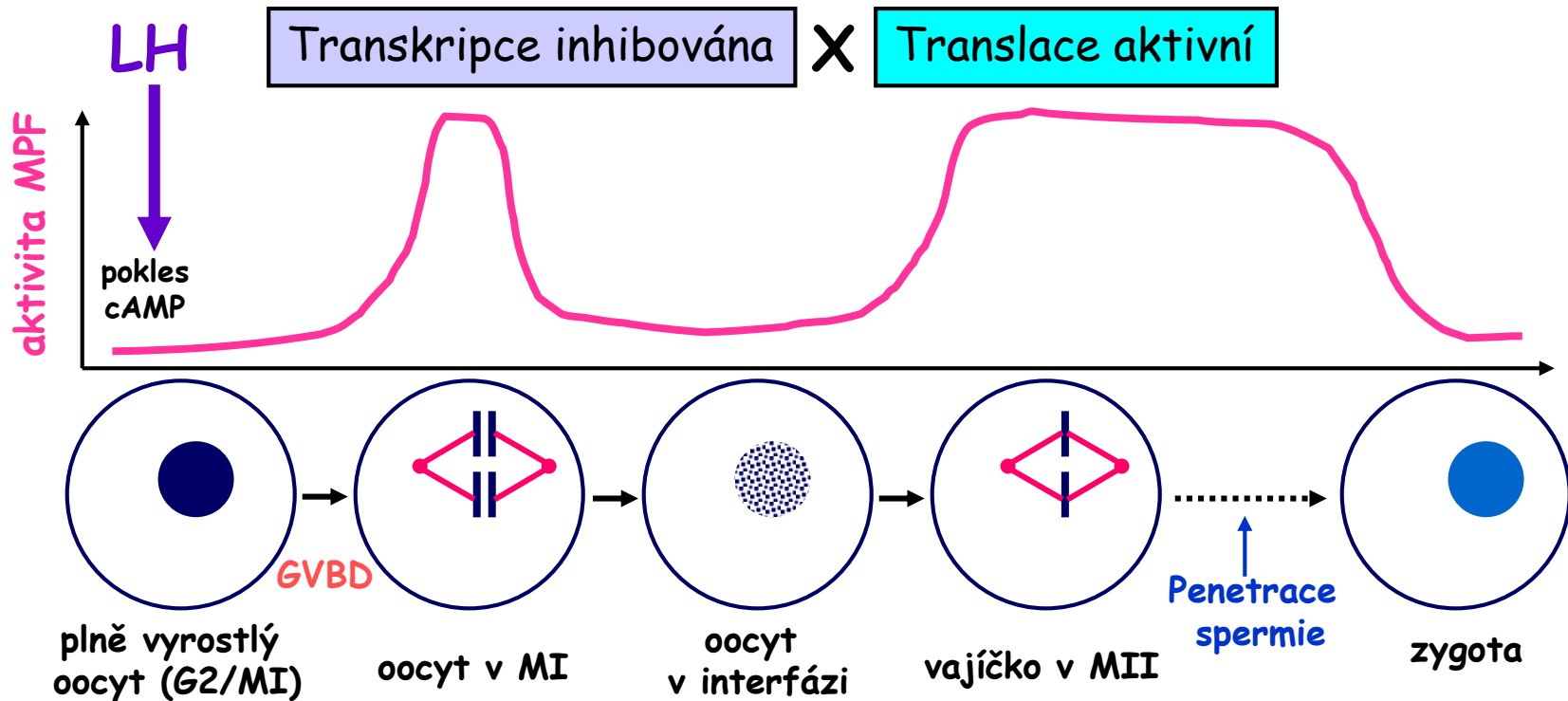
- epigenetická modifikace autozomálních chromozomů vedoucí k monoalelické expresi genů - umožněna aktivitou enzymu DNA metyltransferázy
- PGC jsou globálně demetylovány
- během růstu oocytu dochází k novému ustavení imprintingu (asi 40 genů)

Abnormality v imprintingu mohou být důvodem spontánních abortů při asistované reprodukci !!!

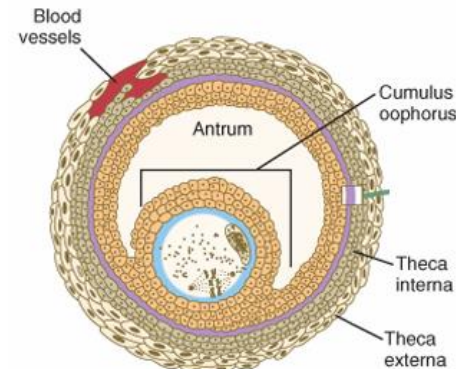
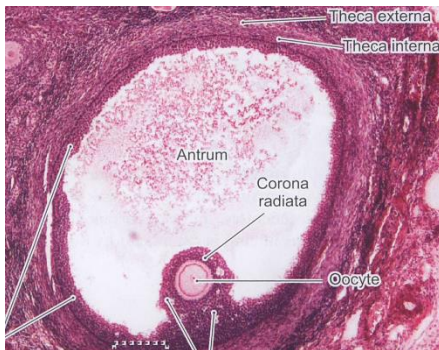
(in vitro manipulace s gametami a embryi může vést k abnormalitám v imprintingu)

Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (5)

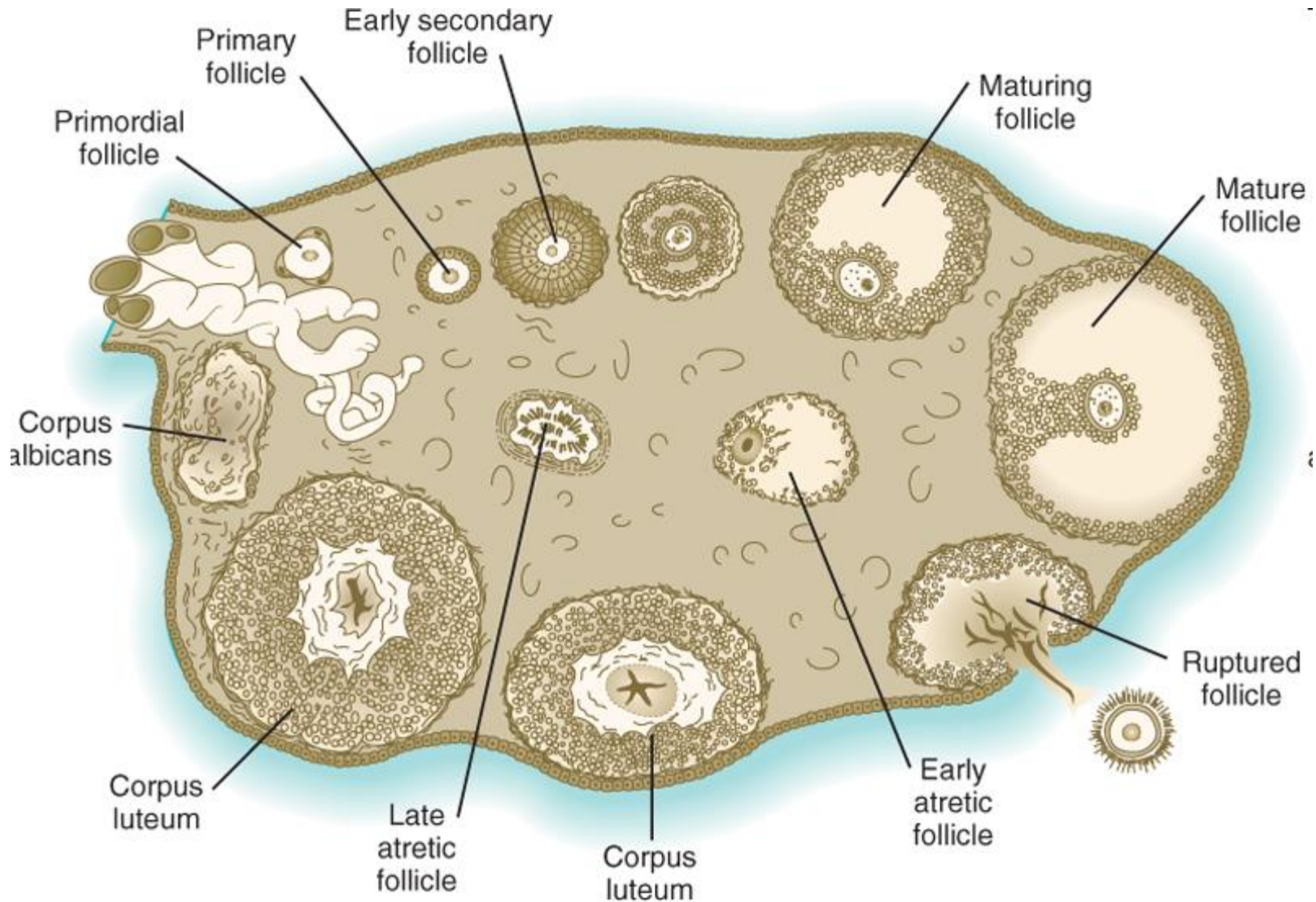
Poslední hodiny před ovulací - meiotická maturace



člověk ~ 25 hodin

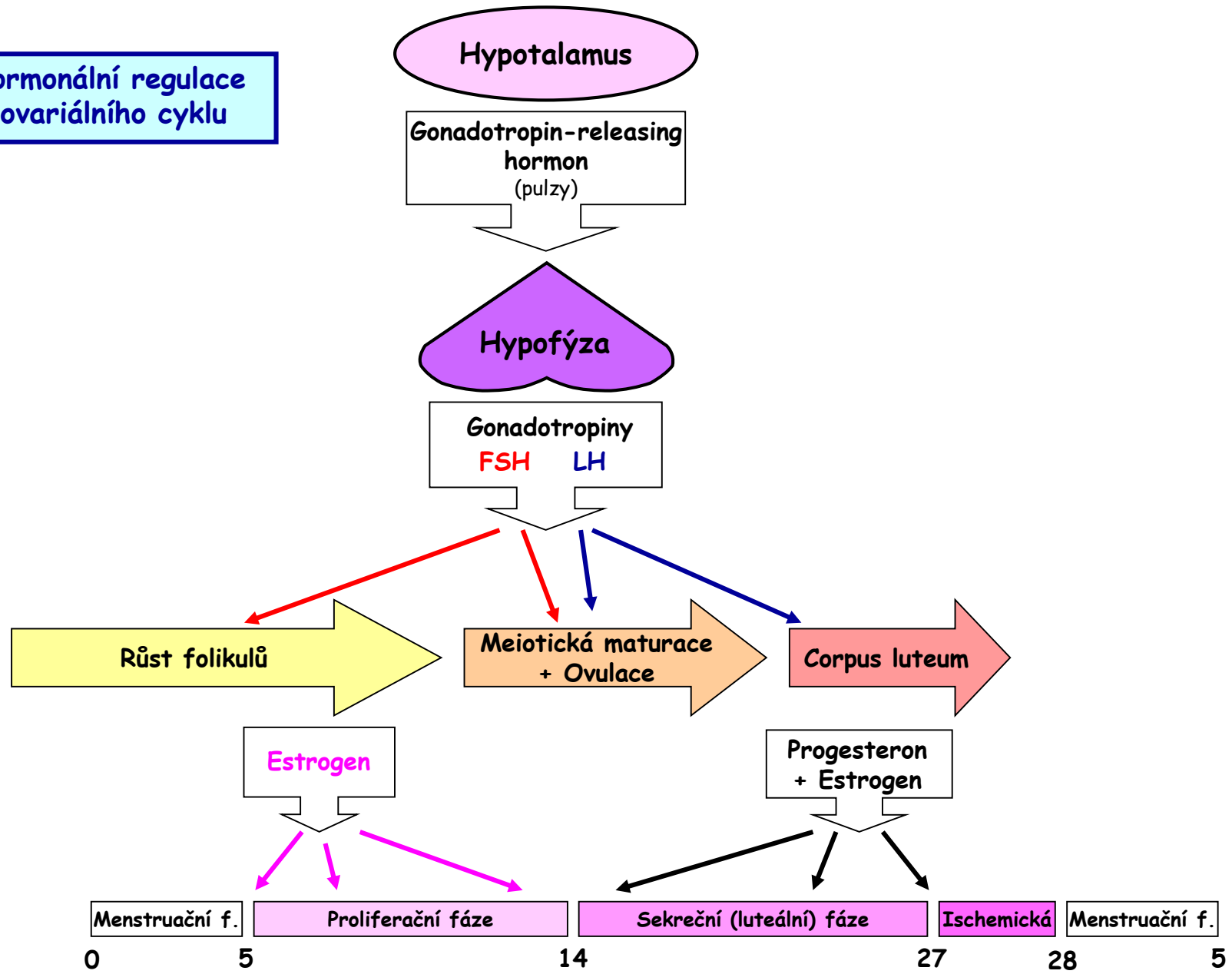


Poslední pohled na ovárium

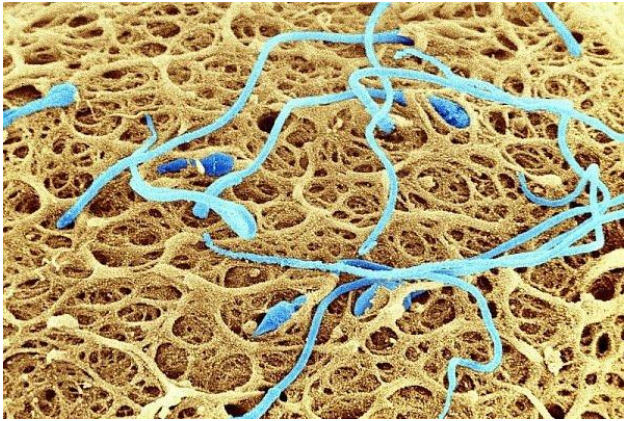


Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (6)

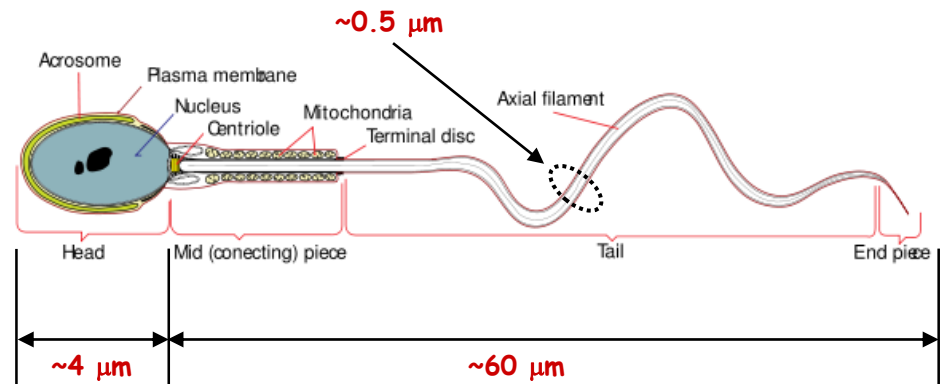
Hormonální regulace
ovariálního cyklu



Vývoj spermii - Spermatogeneze (1)



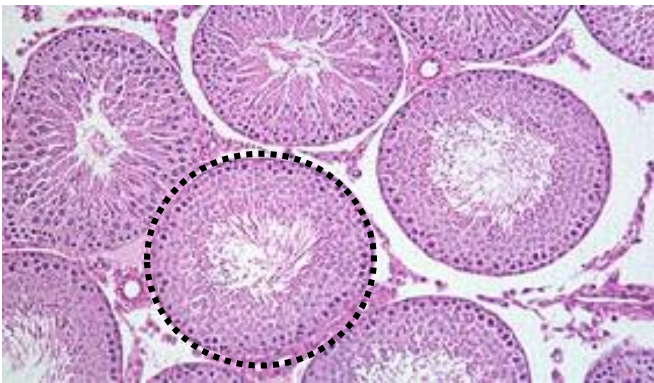
Spermie na vajíčku



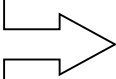
Minimální ejakulát (WHO)

- Objem - 1.5 ml
- Koncentrace spermii - 15.1 millions/ml
- Motilita - 40%

Vývoj spermií (2)

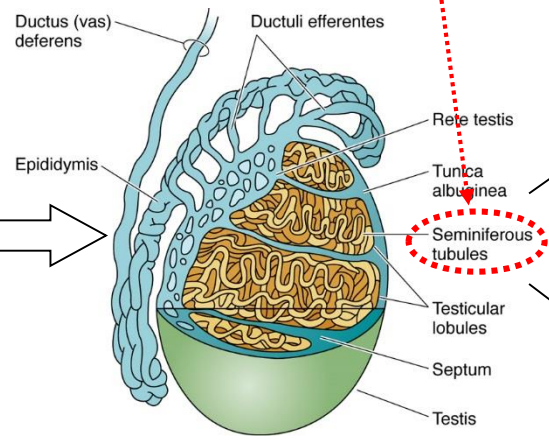
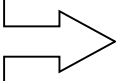


Před pubertou

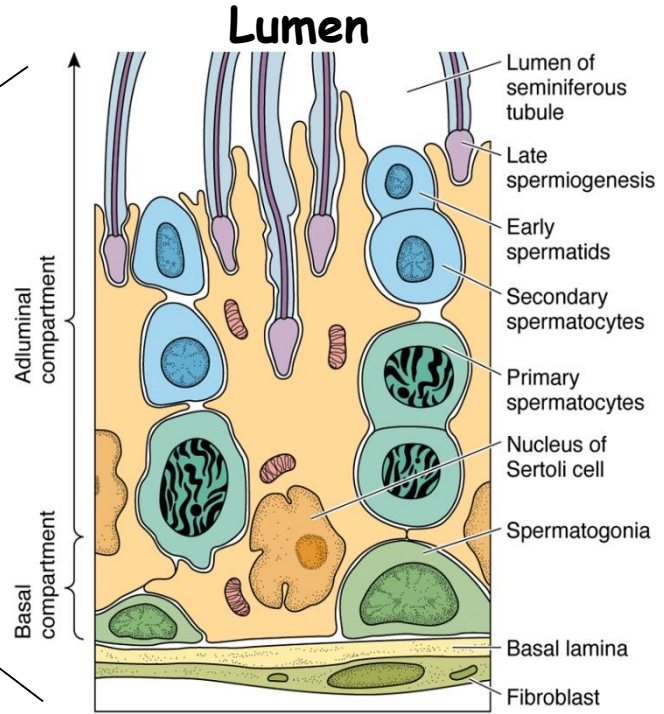


Pomalé mitotické dělení spermatogonií v semenotvorných kanálcích

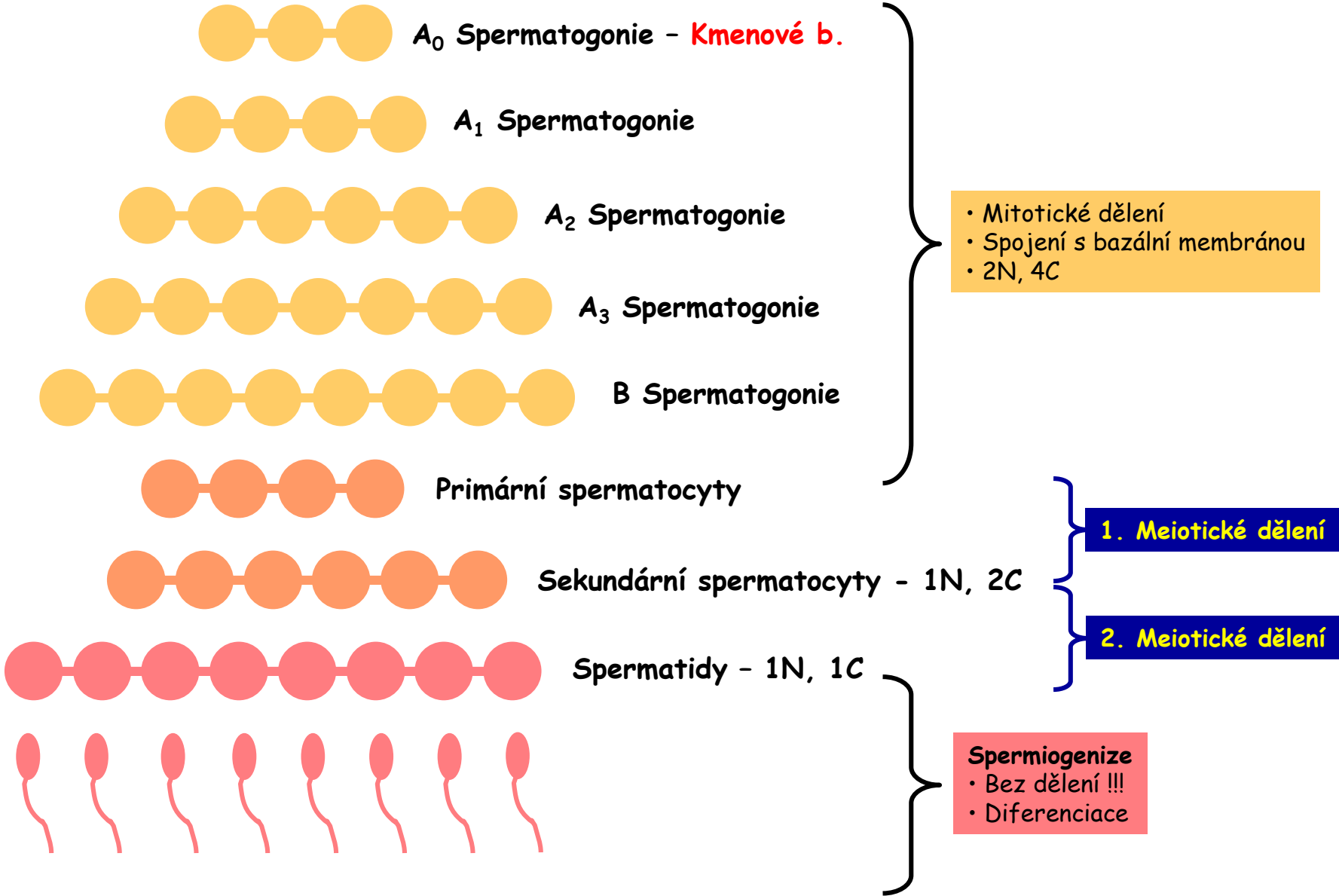
Po dosažení puberty



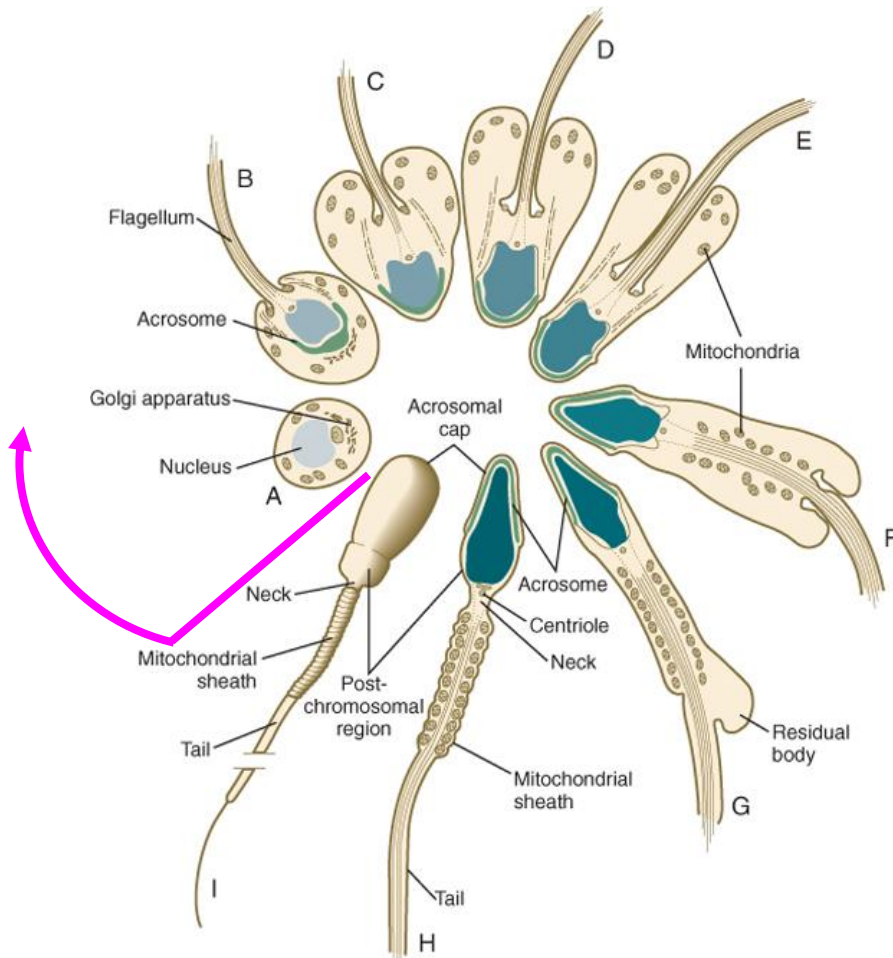
~0.25 mm
~0.5 km



Vývoj spermií (3)



Vývoj spermií (4) - Spermiogeneze

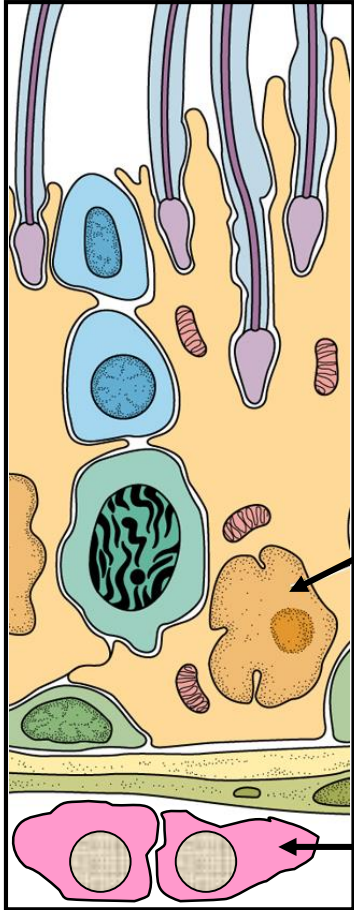


Histony na Protaminy
Inaktivace genomu
Ztráta cytoplasmy

Produkce spermií

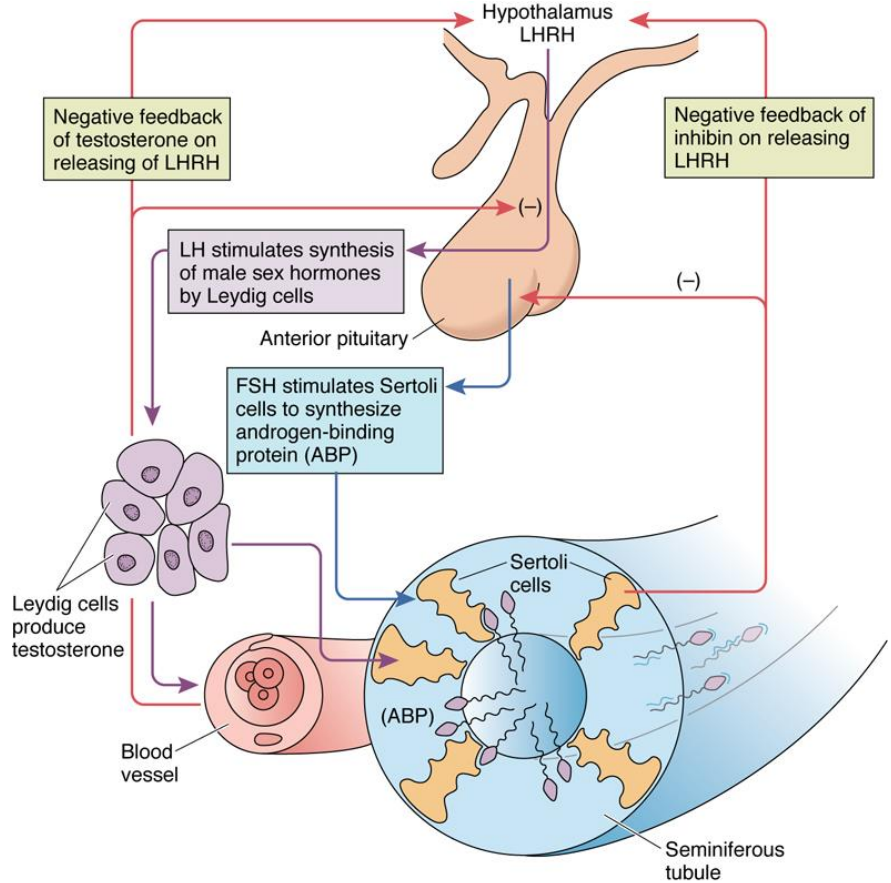
- 1 milion spermií každou hodinu
- Spermatogeneze trvá ~70 dní
- Transport nadvarletem trvá ~8-17 dní
- Cyklický charakter
(Cyklus semenotvorného epitelu - 16 dní
- stejné vývojové stádium na stejném místě)

Vývoj spermií (5) - Regulace



- Sertoliho buňky**
- Podpora , ochrana, výživa
 - Fagocytóza
 - Bariéra krev-varle (zon. occlud.)
 - Anti-mullerian hormon
 - Produkce fruktózy
 - Produkce inhibinu (inh. FSH prod.)

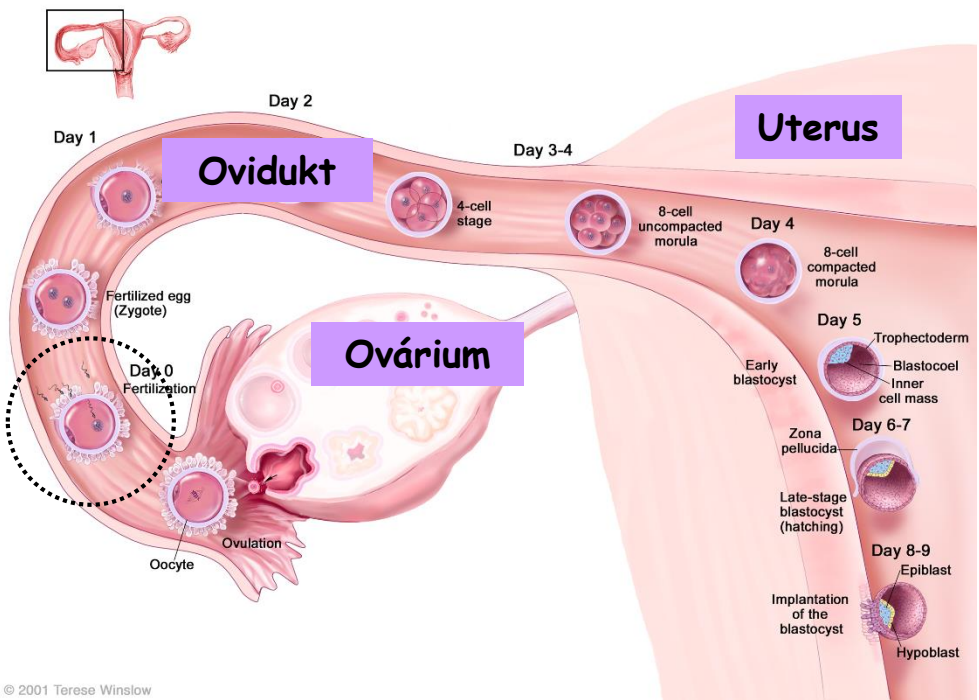
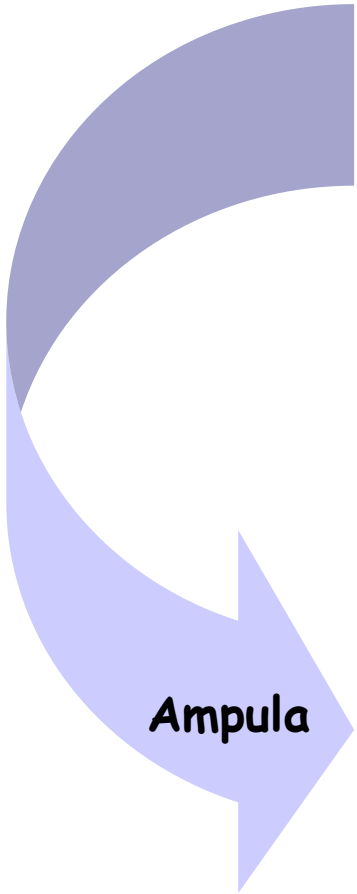
- Leydigovy buňky**
- V intersticiu
 - 10 % hmoty varlete
 - Produkce testosteronu



Oplození (1)

= proces, který kulminuje spojením jádra spermie s jádrem vajíčka v jeho aktivované cytoplasmě

Kde se gamety potkají ?



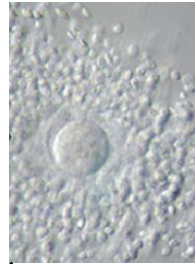
Oplození (2)

Oocyt se připravuje na penetraci spermií

LH
„peak“

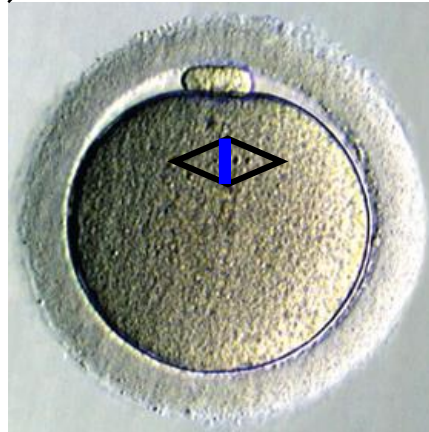


35-40 h

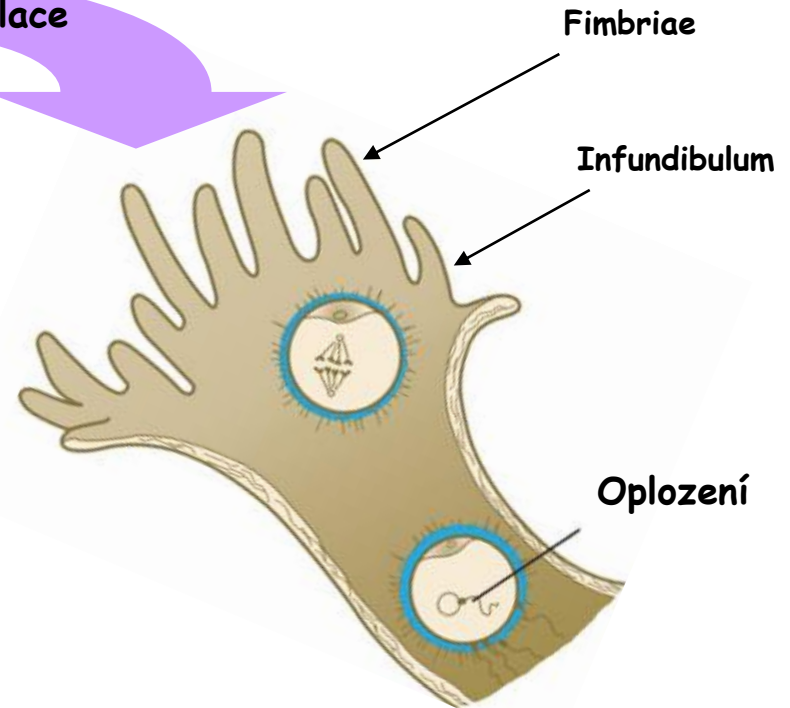


Ovulace

Preovulační stádium

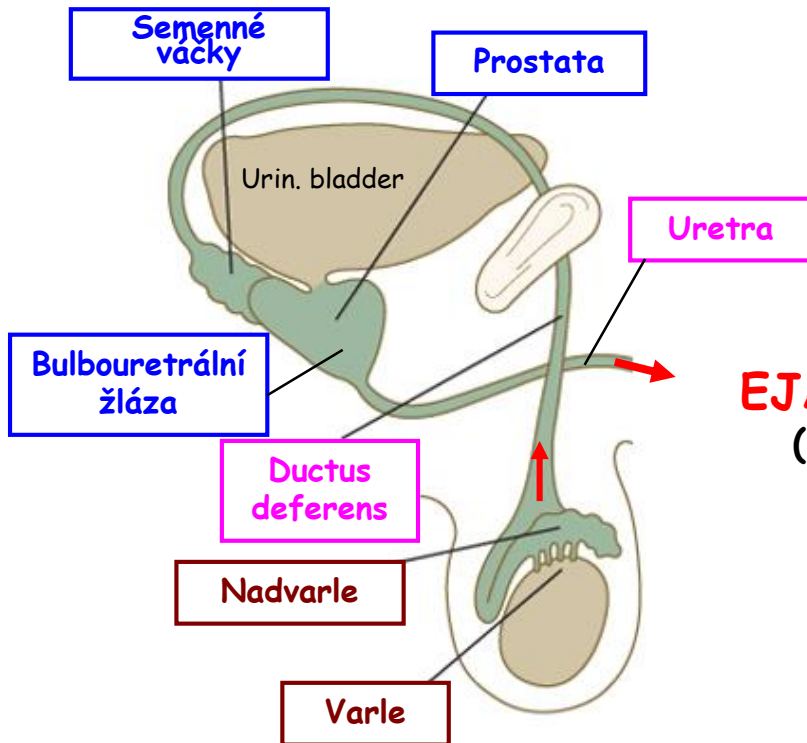


Oocyt je schopen oplození
pouze 12 až 16 hodin



Oplození (3)

Cesta spermií do místa oplození



EJAKULÁT
(2-6 ml)

Spermie

200 - 600 milionů

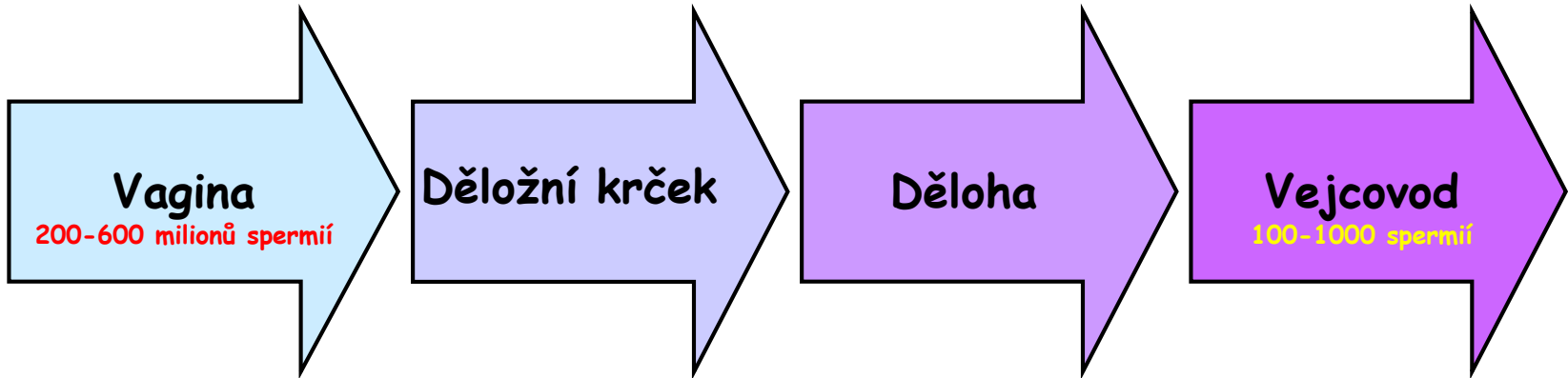
Producty přídatných pohlavních žláz

- Cholesterol (v prostasomech)
 - Prostaglandin
 - Fruktóza
- Vesikuláza (koaguluje ejakulát)

Oplození (4)

Cesta spermií do místa oplození

2 - 7 hodin



Vagina
200-600 milionů spermií

Děložní krček

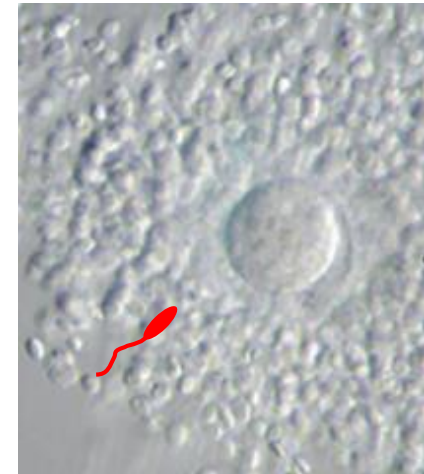
Děloha

Vejcovod
100-1000 spermií

- Kyselé prostředí
- Aktivní pohyb spermií

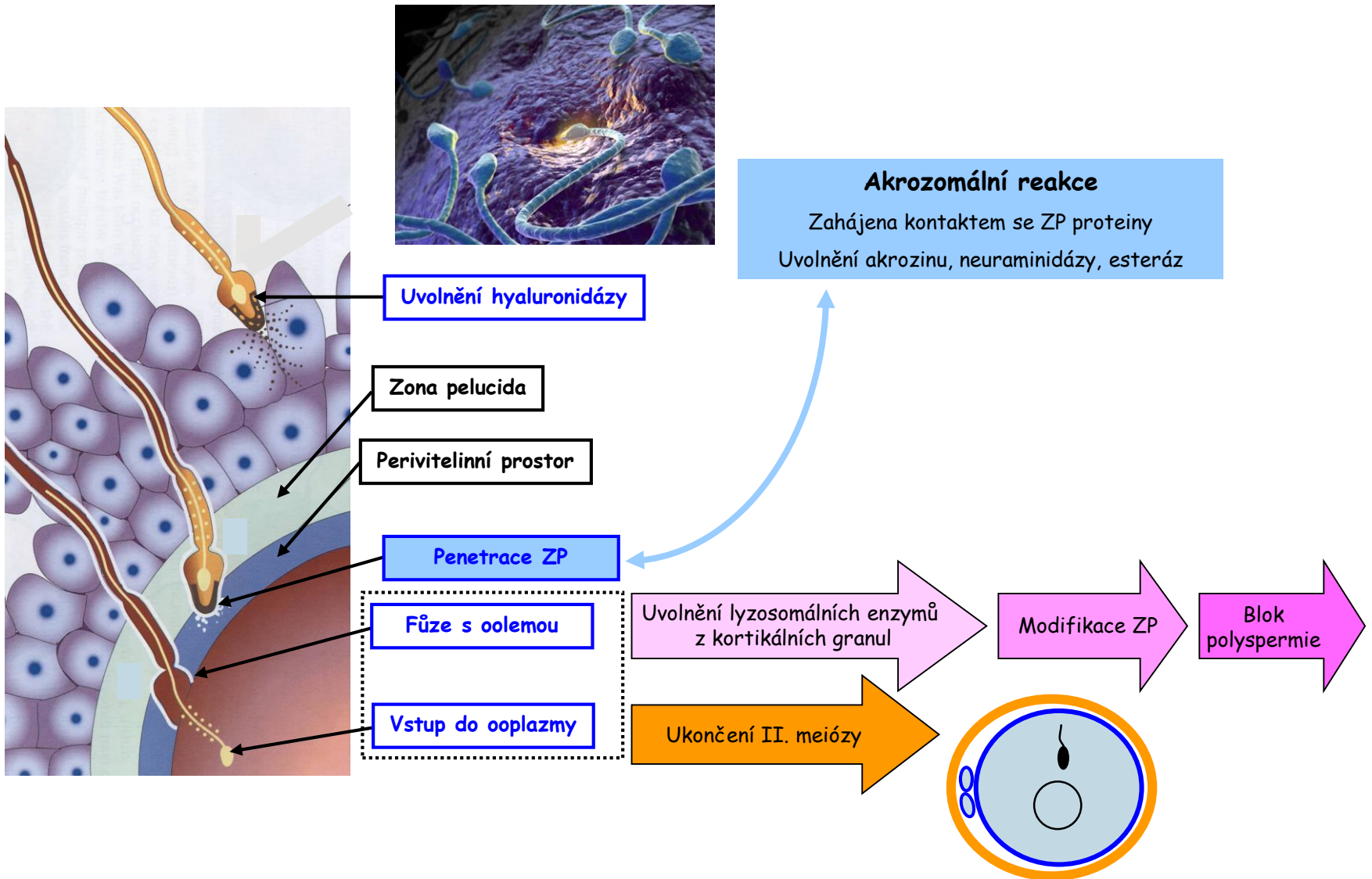
- Čistí spermie
- Cervikální hlen stabilizuje spermie
- Zahajuje **kapacitaci**

- Odstranění glykoproteinů z hlavičky
- Změna složení buněčné membrány
- Vzrůst pohyblivosti



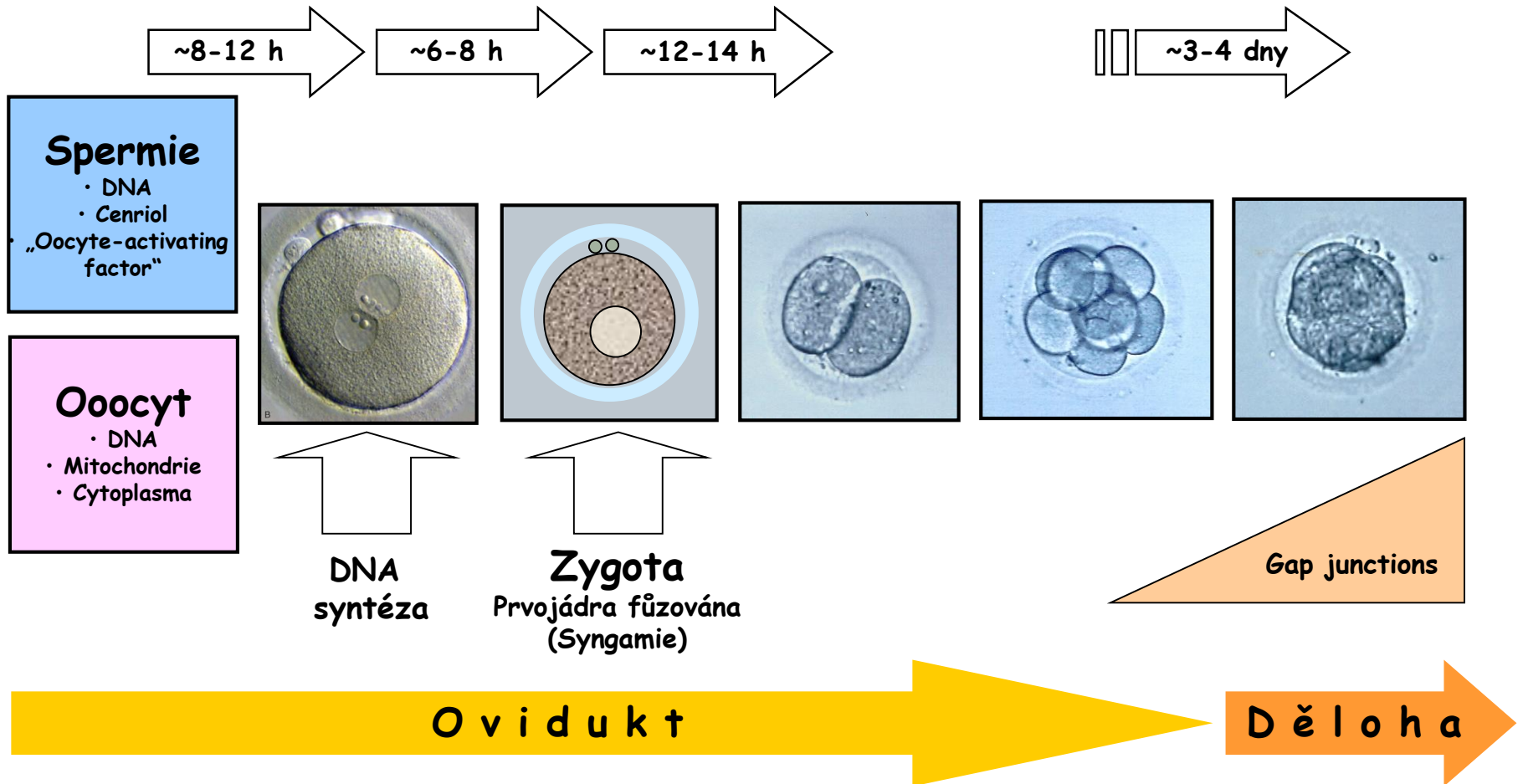
Oplození (5)

Proniknutí spermie do vajíčka

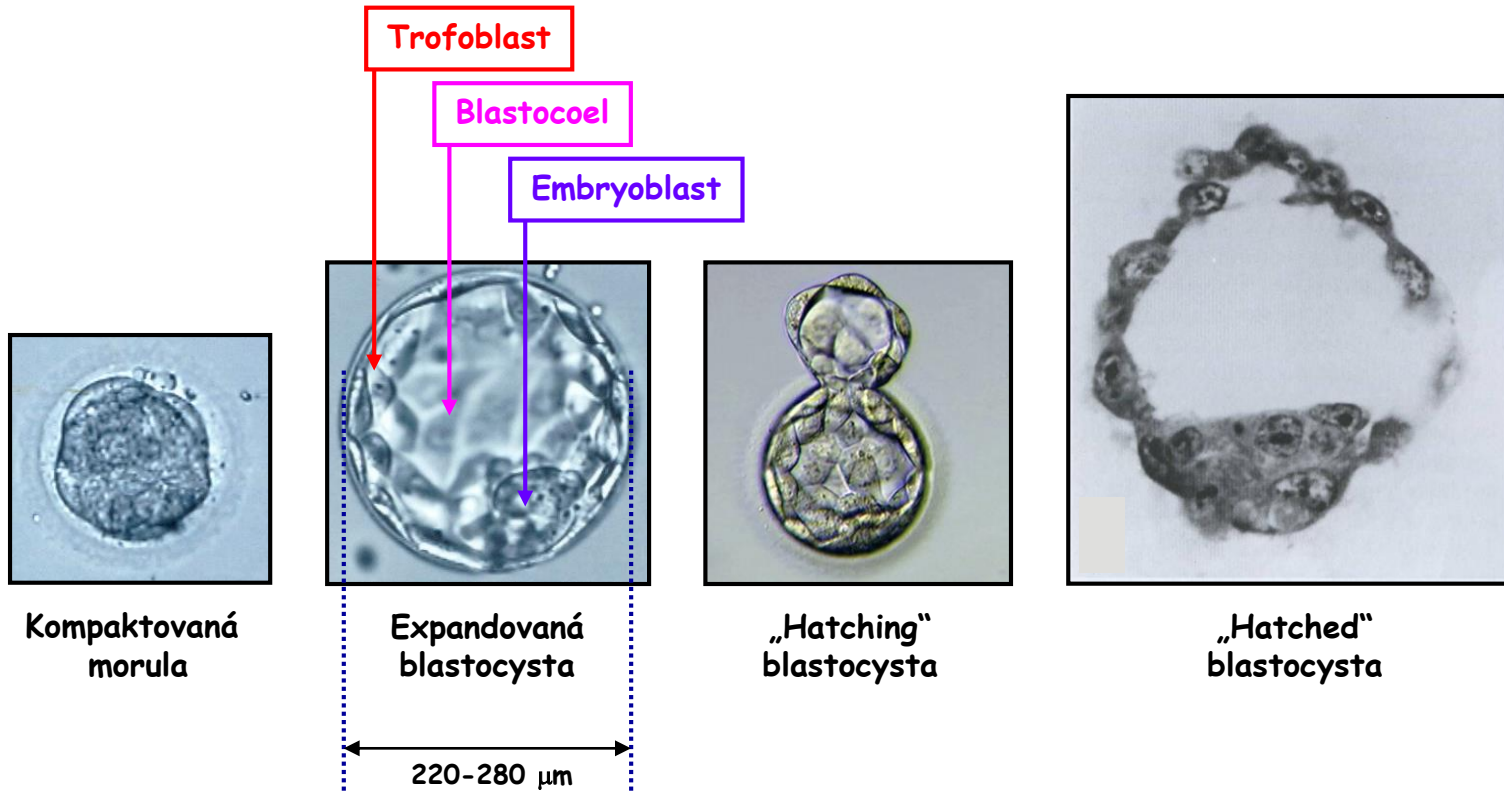


Oplození (6)

Vznik zygoty a první buněčná dělení

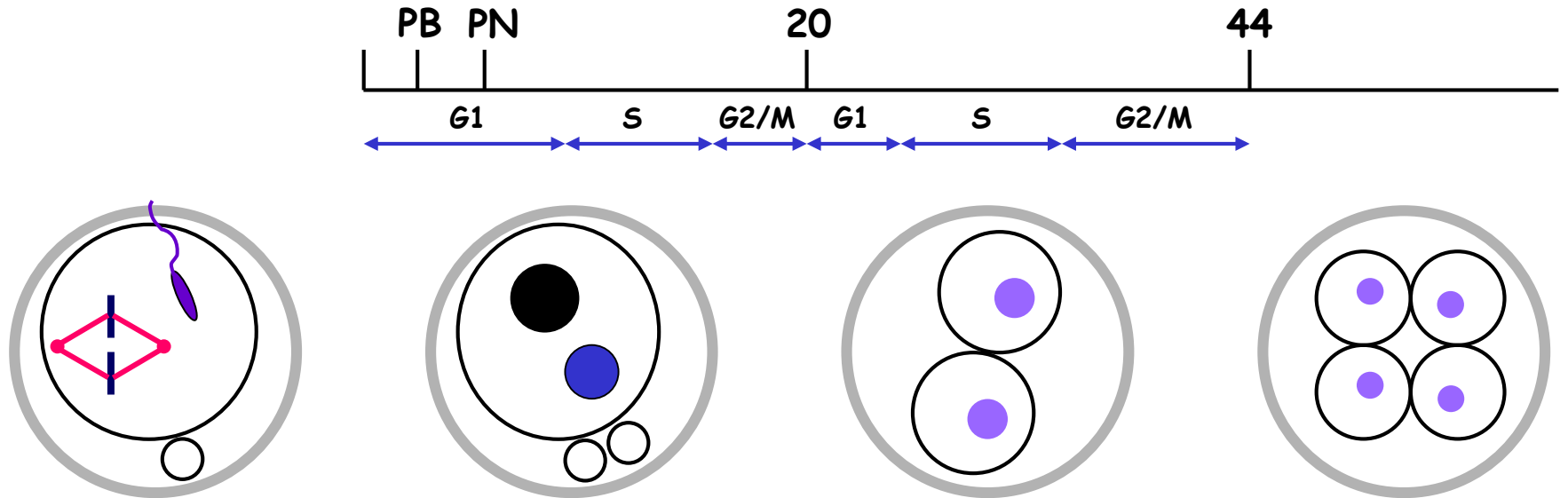


Vývoj blastocysty



Den 5 - 6
(60 až 80 buněk)

Vajíčko - výkonný regulátor exprese genů



Translace maternální mRNA

Translace zygotické mRNA

Zygotická transkripce

Represe transkripce

Význam „enhancerů“

Aktivace embryonálního genomu

Aktivace embryonálního genomu

Nepředstavuje jednu diskrétní událost
(první známky již v zygotě, u člověka maximum ve
4- až 8-buněčném embryu)

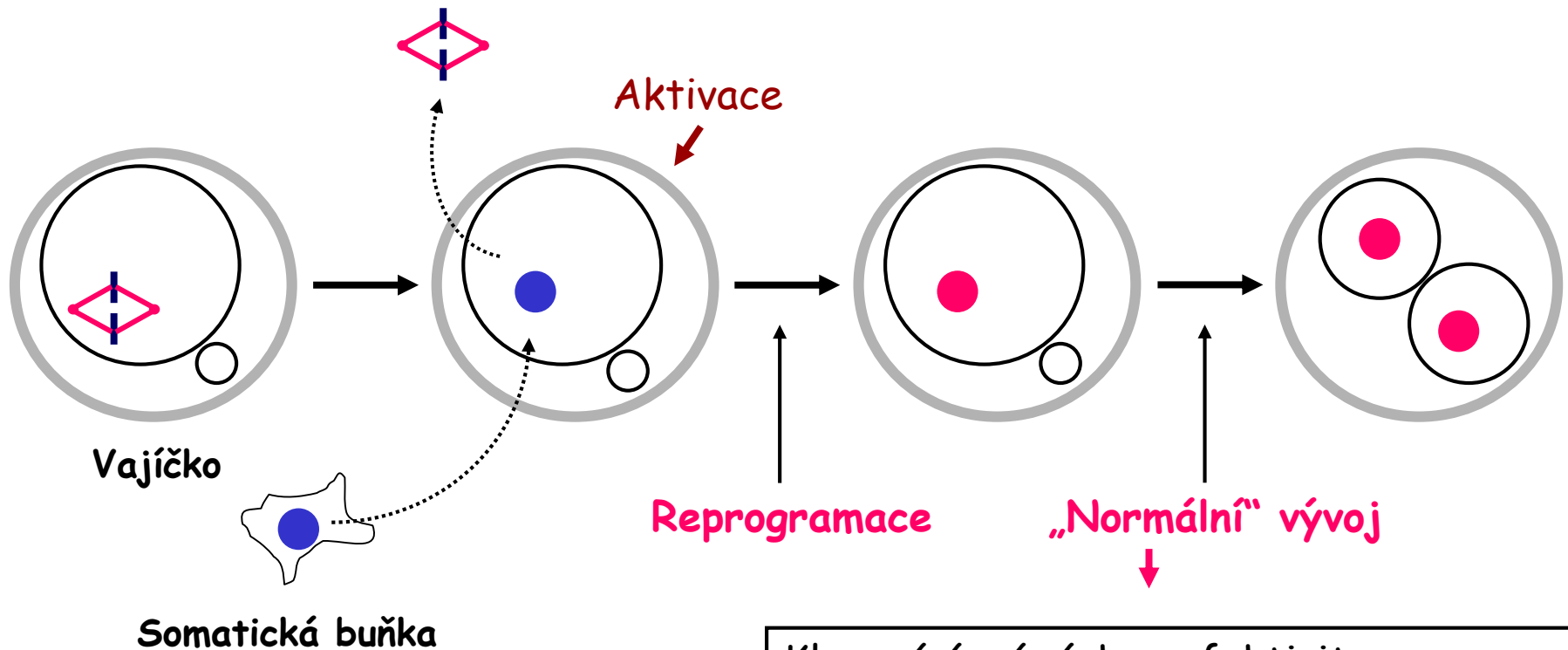
Dva typy transkriptů

Transkripty nahrazující
degradované maternální
mRNA

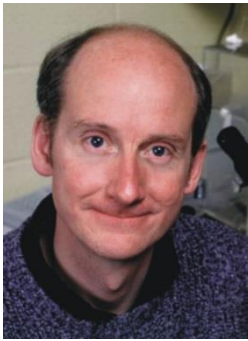
Nové transkripty určující
zcela nový vzor genové
exprese

Je „zodpovědný“ za ustavení stavu totipotence blastomer
&
Představuje fenomem označovaný REPROGRAMACE genomu

Přenos jádra (klonování) - princip

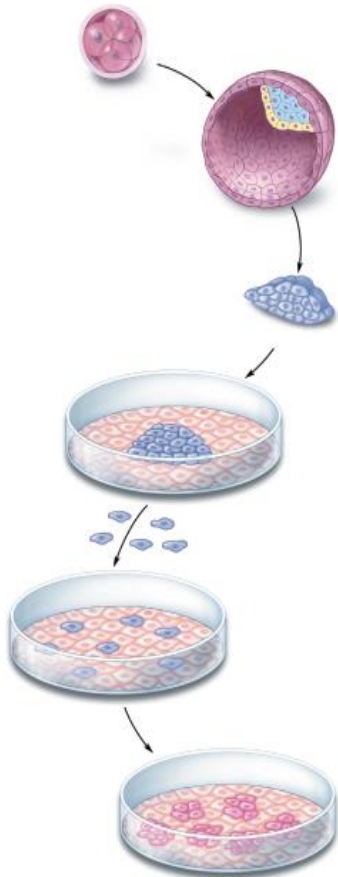


Klonování má nízkou efektivitu (1-3%)
Reprogramace je pomalá a nejspíš nekompletní (výsledkem je abnormální exprese genů,)
Účinnost reprogramace je závislá na mnoha faktorech (typ somatické buňky, stadium buněčného cyklu, ...)



Lidské embryonální kmenové (hES) buňky

(Thompson et al, 1998)

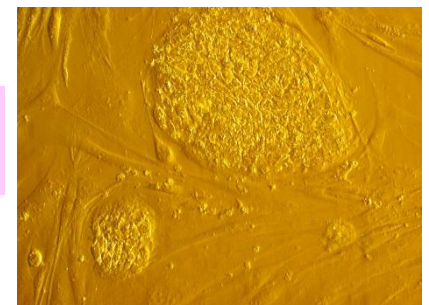
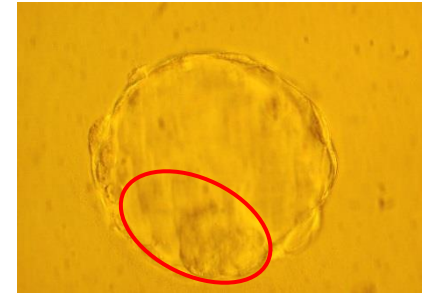


Časné embryo ve stadiu blastocysty

Izolace embryoblastu (ICM - Inner Cell Mass)

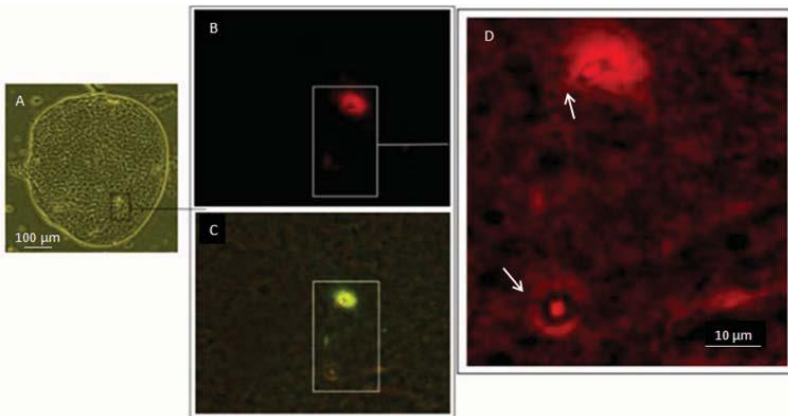
Přenesení izolovaného embryoblastu do
in vitro podmínek (+ podpůrné buňky + FGF-2)

Propagace v kultuře mechanickou či enzymatickou
disagregací (opakovaným pasážováním)

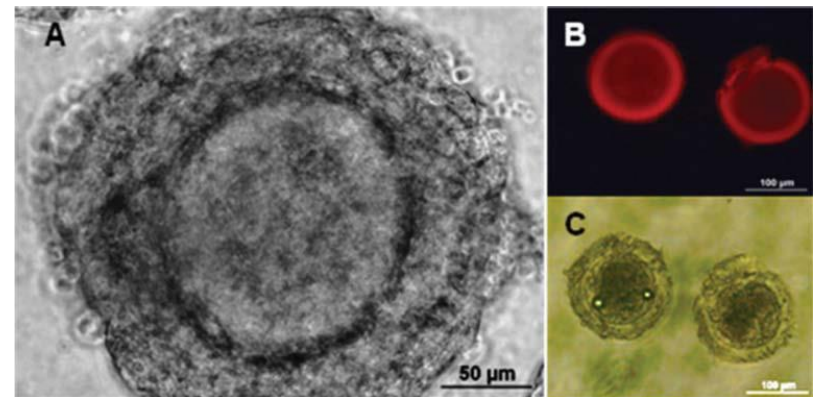


Derivace postmeiotických zárodečných buněk z lidských ES buněk

Prof. Harry Moore, University of Sheffield, 2009



- B) C-KIT
- C) I-97 antigen
- D) Buňky s kondenzovaným chromatinem a náznakem bičíku



Struktury velmi podobné komplexům oocyt-granulózní buňky (zóna pellucida nevyvinuta)

Děkuji za pozornost !

**Otázky a komentáře na:
ahampl@med.muni.cz**