

# 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)

Brno, Březen 2016

# Embryologie: co vše zahrnuje?

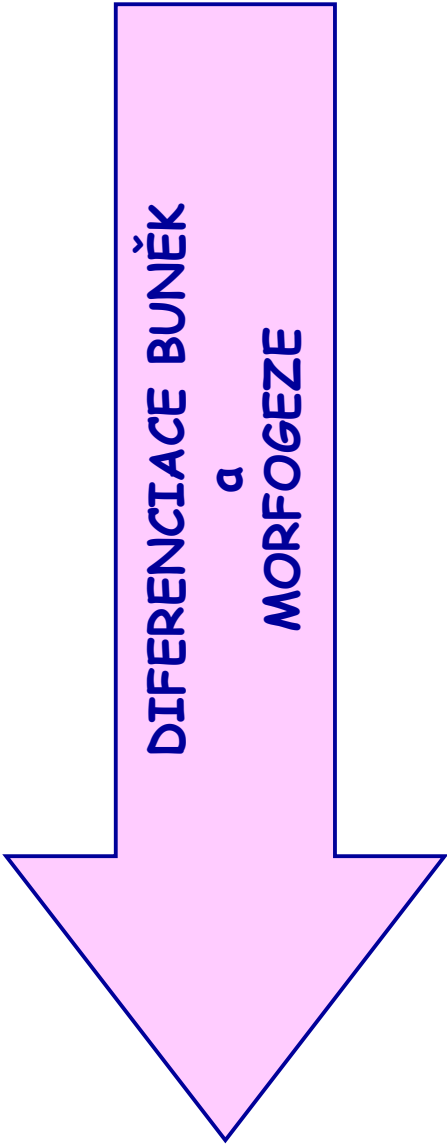
Zygota



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

Embryo

Fetus

Fertilizace

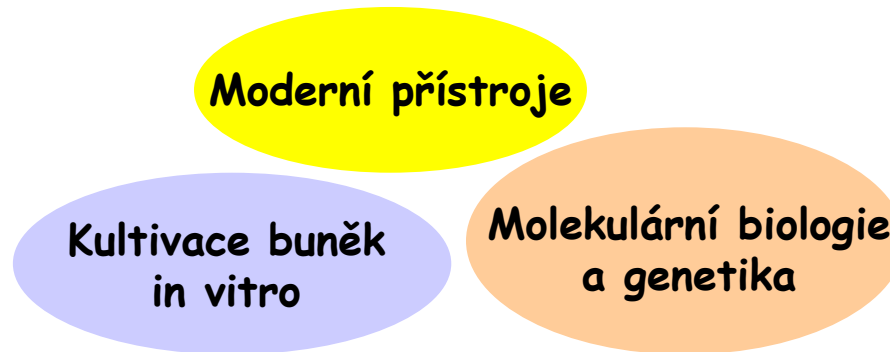
8. týden

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.

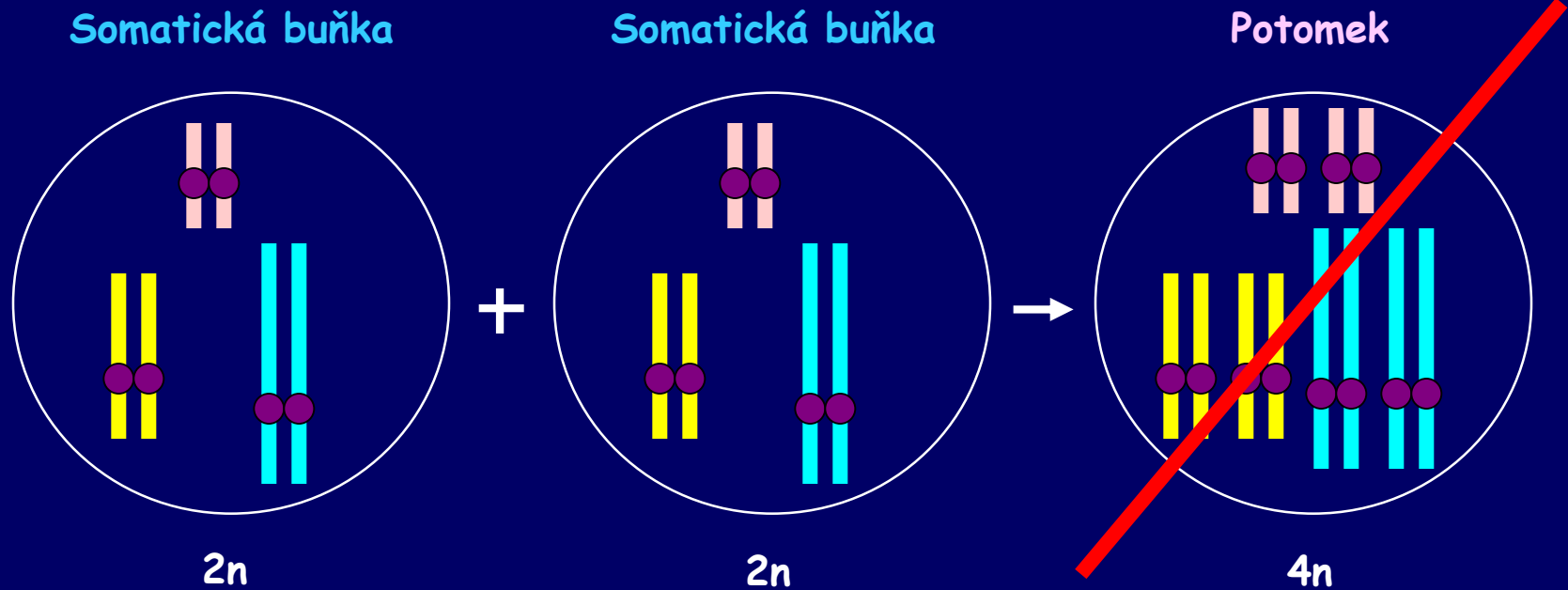
Přestože v mnoha morfo-genetických detailech se vývoj vajíček a spermií mezi sebou výrazně liší, podstata klíčových genetických procesů je u obou shodná.

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

Tyto genetické procesy zahrnují:

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

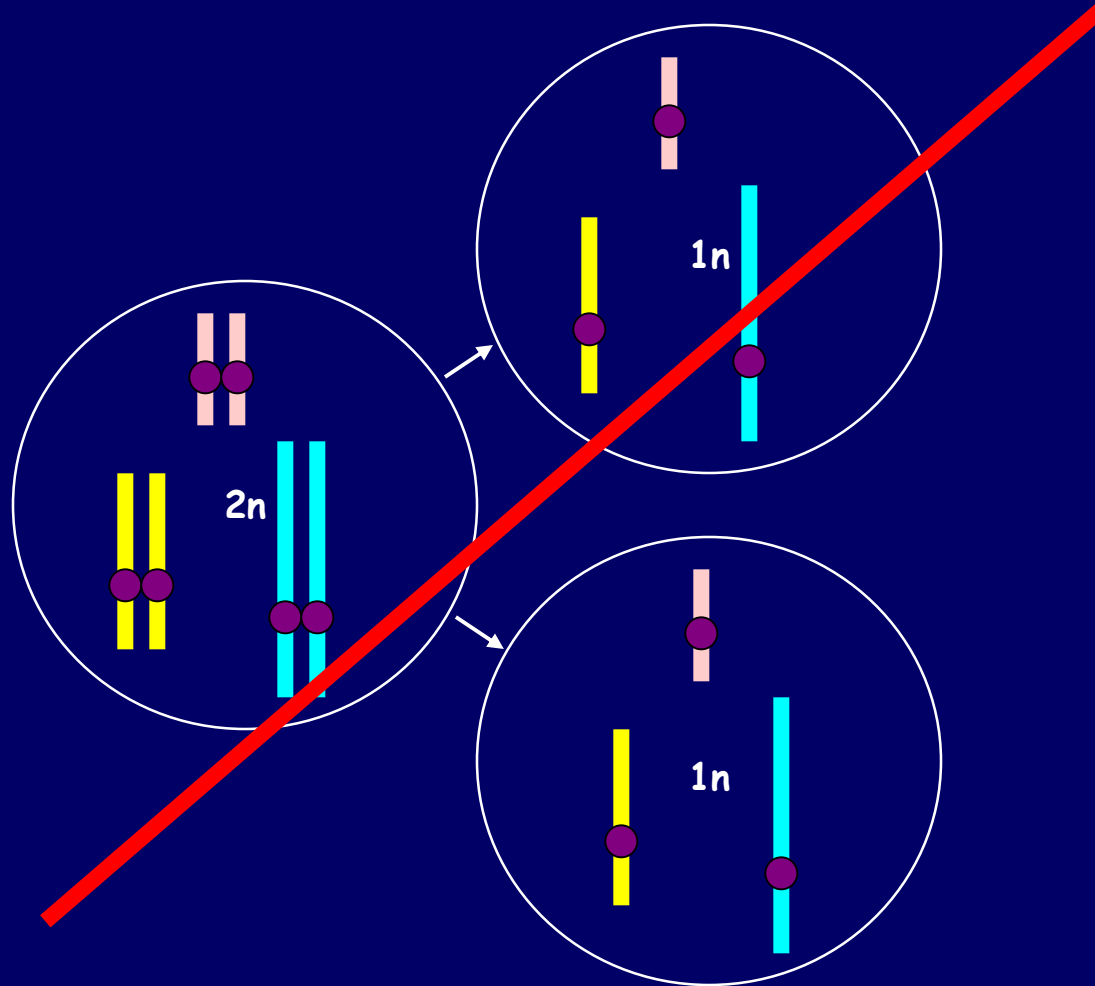
# Redukce počtu chromozomů Proč?

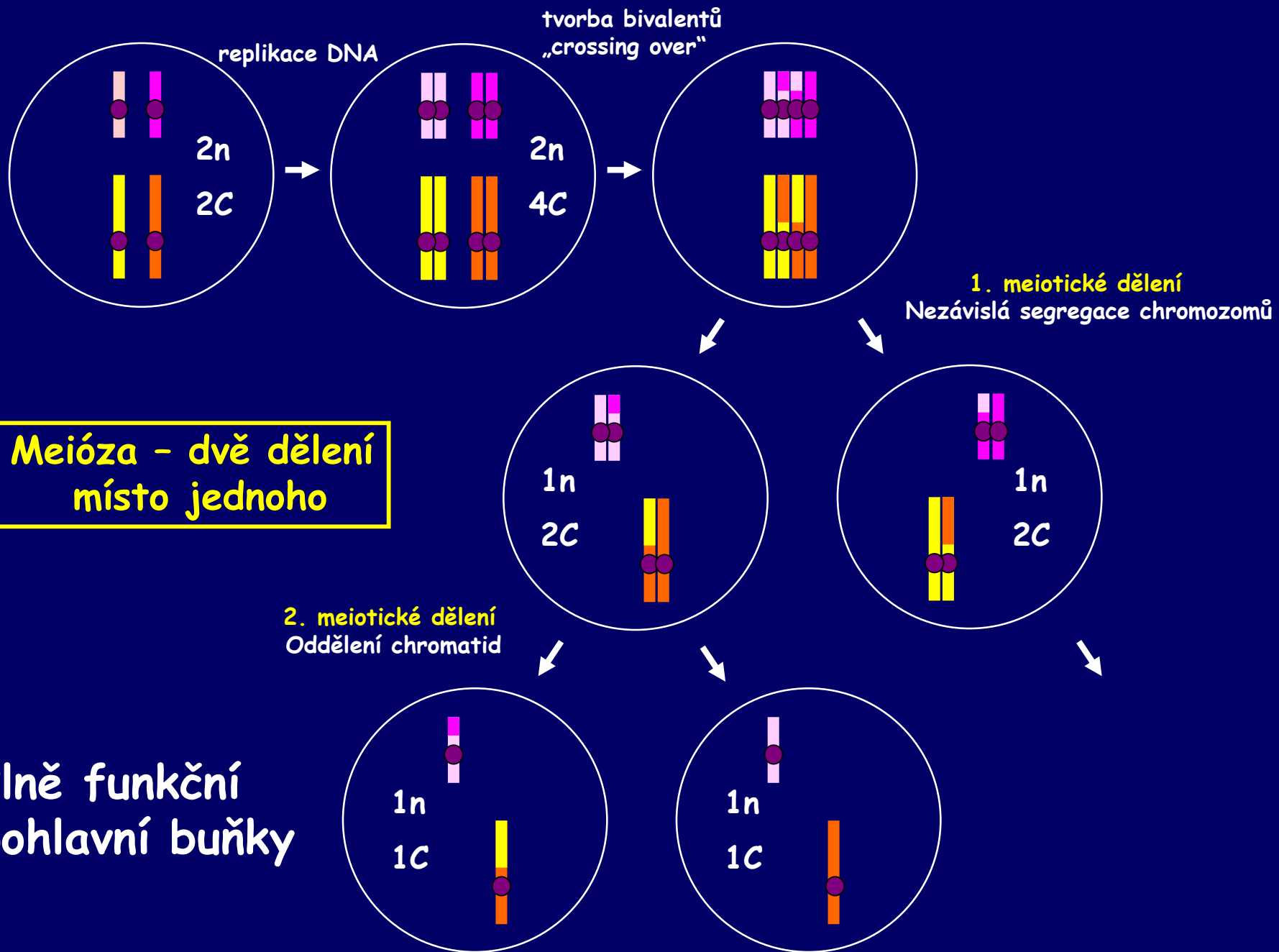


Gamety musí mít haploidní počet chromozomů ( $n$ ), aby splynutí gamet nevedlo u potomků ke znásobení počtu chromozomů nad diploidní počet ( $2n$ ).



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





**Meióza - dvě dělení místo jednoho**

**Plně funkční pohlavní buňky**

- „Crossing over“
- Nezávislá segregace chromozomů
- Fertilizace

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

Genetická funkce

♂ Spermie

X

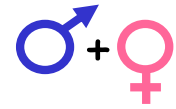
♀ Vajíčka

Význam pro  
vývoj embrya  
(reprodukcí)

Morfologické  
a fyziologické  
vlastnosti


Vývoj a mechanismy,  
které jej řídí

## Primordiální zárodečné buňky - PGC




- kmenové buňky, které jsou společné spermiím i oocytům
- vznikají ve žloutkovém vřívku (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

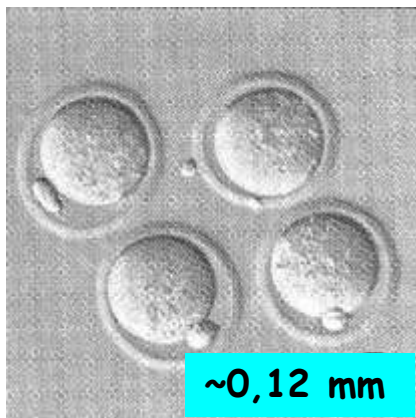
### VÝVOJOVÉ PROCESY

• 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

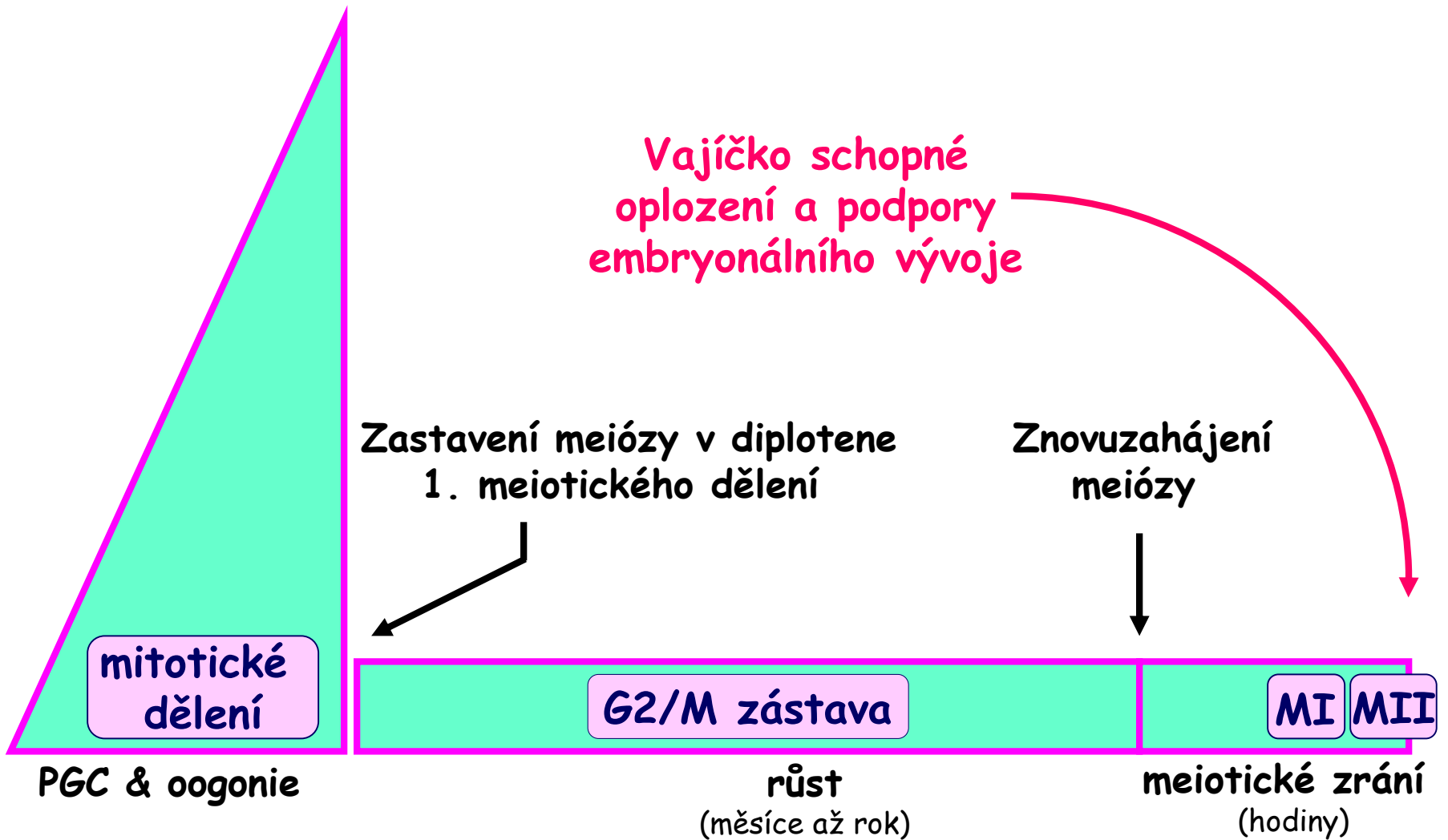
**Vysoce specializovaná buňka**  
Jediná buňka v těle ženy, která je  
schopna projít meiózou a oplozením,  
a dát tak vznik novému individu.

&

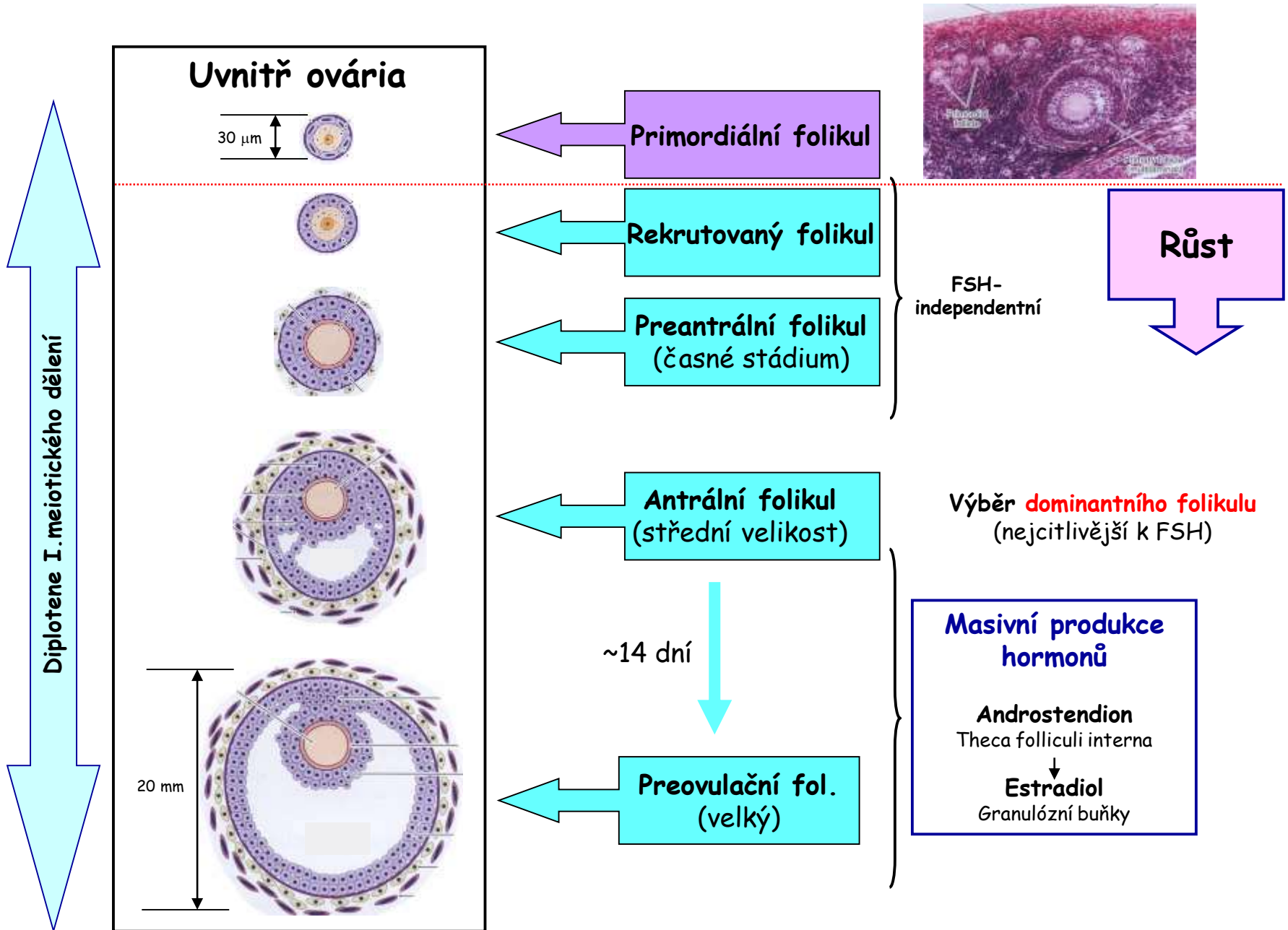
**„Totipotentní“ buňka**  
Je schopna generovat buněčnou  
různorodost mnohobuněčného  
organismu.

**Ani éra klonování nedokázala vzít vajíčku jeho nenahraditelnou úlohu !**

# Klíčová období vývoje vajíčka



# Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (1)





# Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (2)

## Růst oocyty

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

&

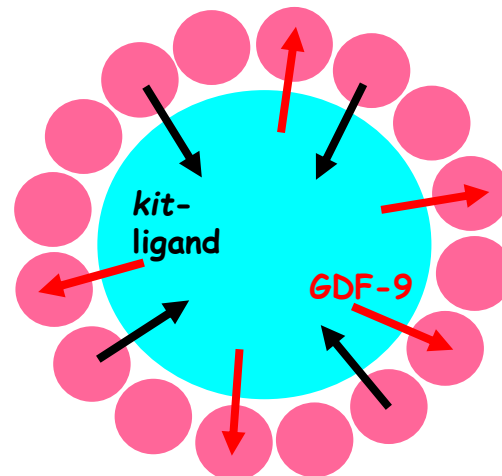
**Signál**, který iniciuje růst **není znám**  
(není to FSH - hypofyzektomie nezabrání iniciaci růstu)

&

Je plně závislý na **kontaktu oocyty 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)

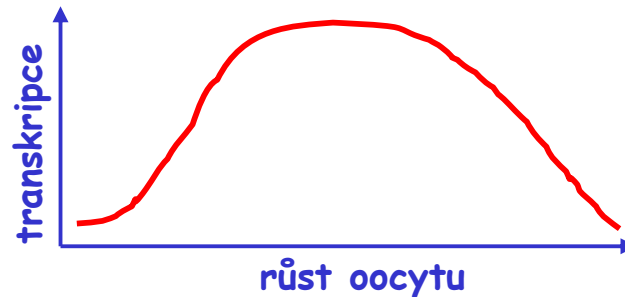
## Růst oocyty

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 oocyty 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 oocyty

**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 oocyty - karyotyp 45, X0 má za následek abnormální vývoj ovária)

&

### Genomický imprinting

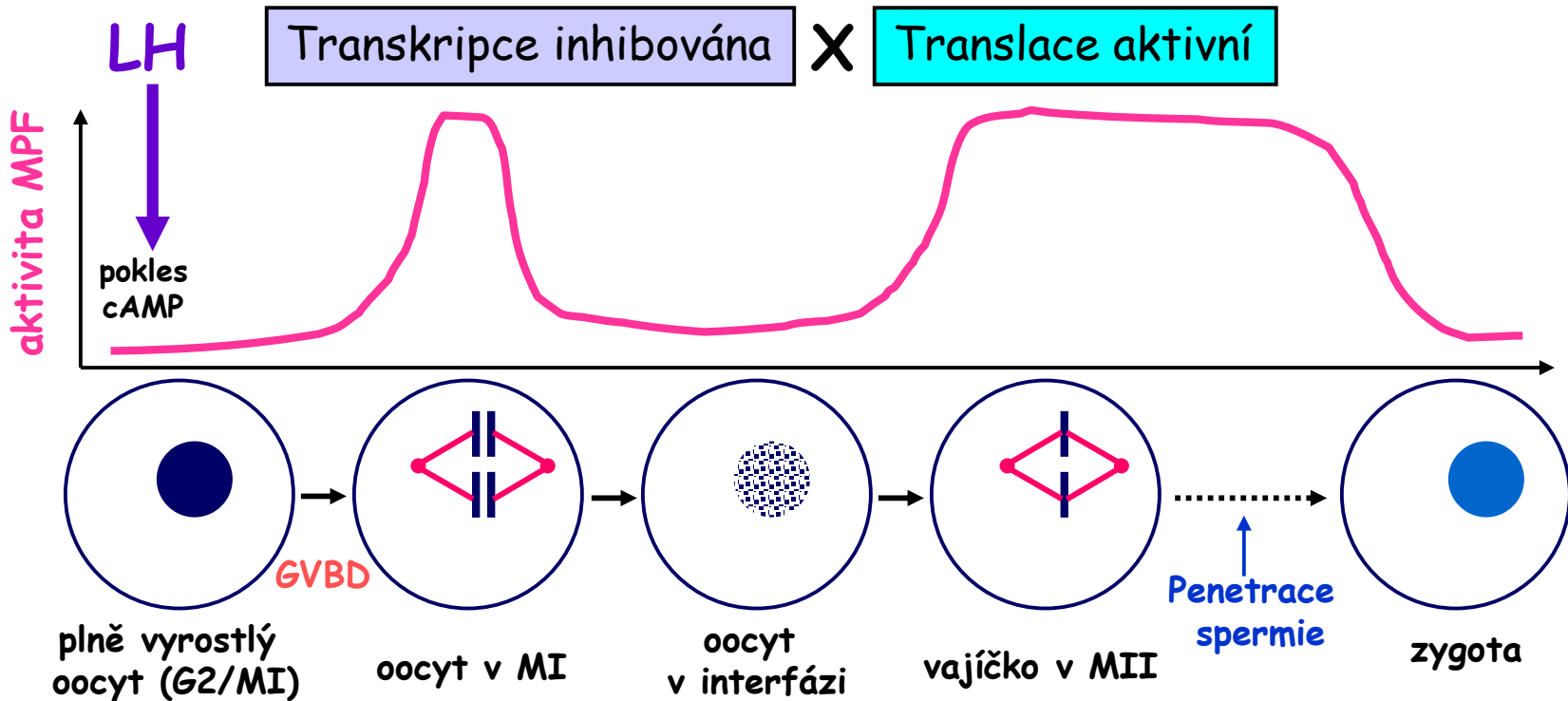
- epigenetická modifikace autozomálních chromozomů vedoucí k monoalelické expresi genů - umožněna aktivitou enzymu DNA metyltransferázy
- PGC jsou globálně demetylovány
- během růstu oocyty dochází k novému ustavení imprintingu (asi 40 genů)

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

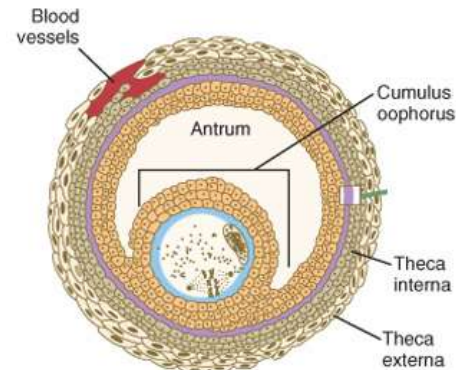
*(in vitro manipulace s gametami a embryi může vést k abnormalitám v imprintingu)*

# Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (5)

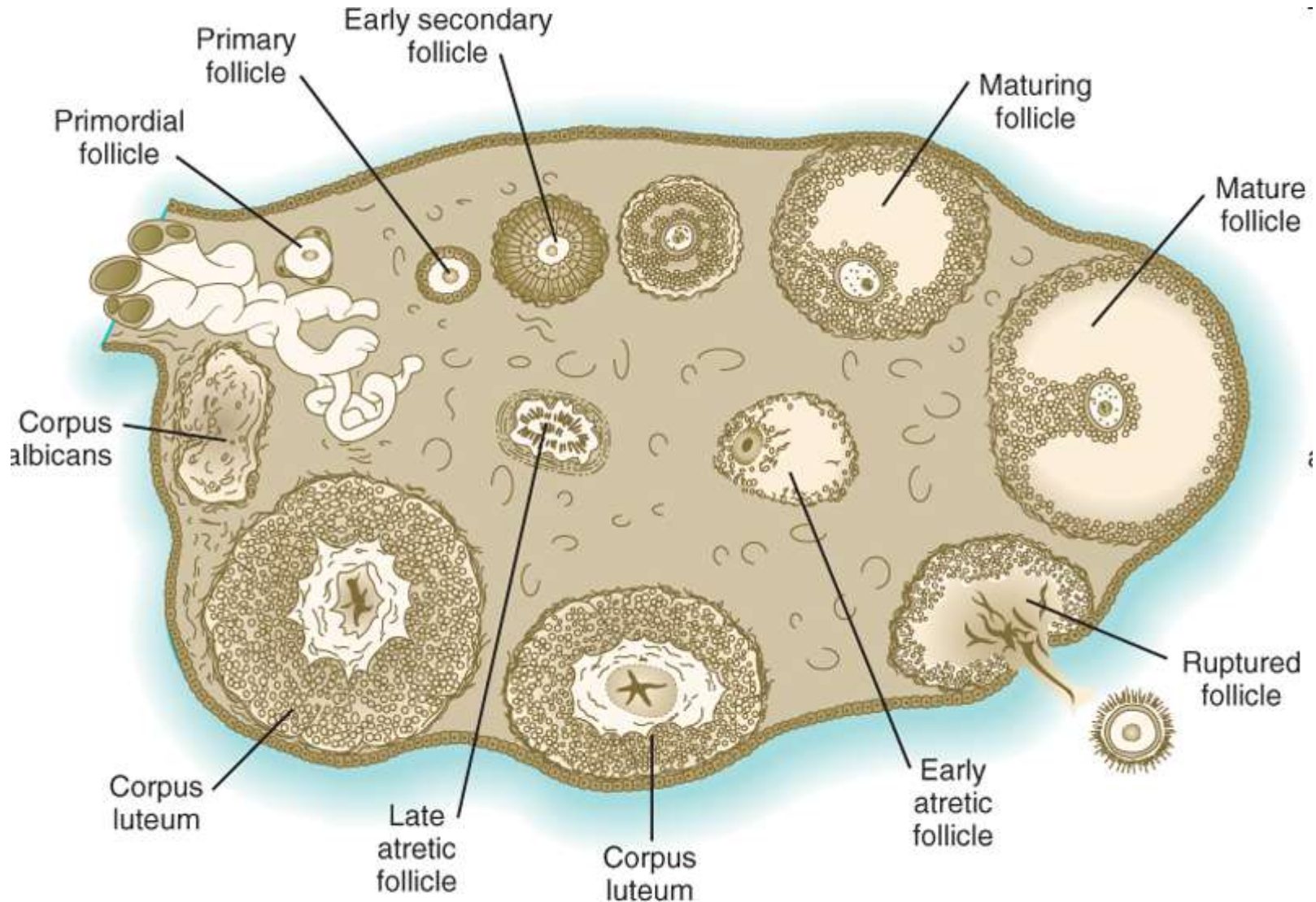
## Poslední hodiny před ovulací - meiotická maturace



člověk ~ 25 hodin

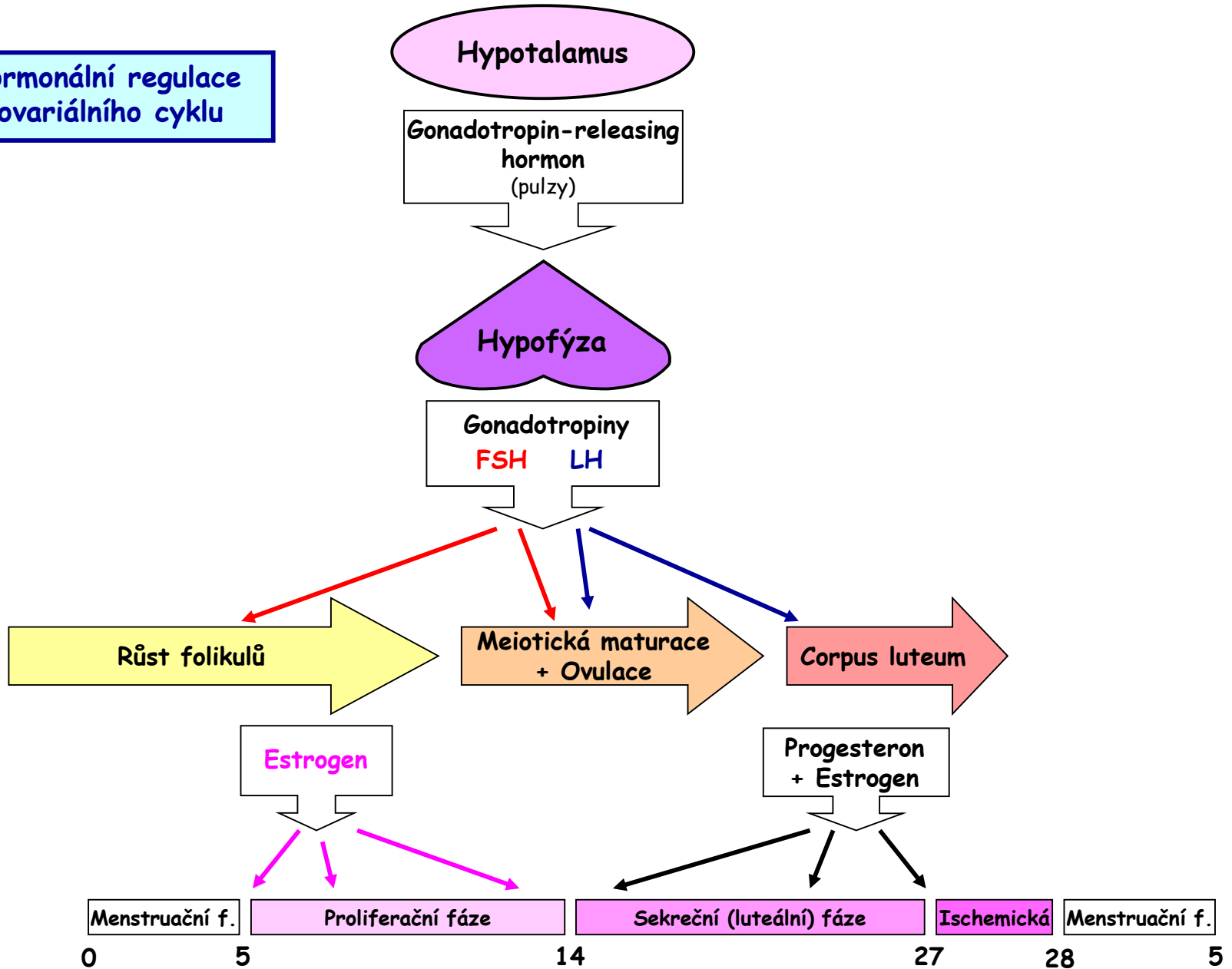


# Poslední pohled na ovárium

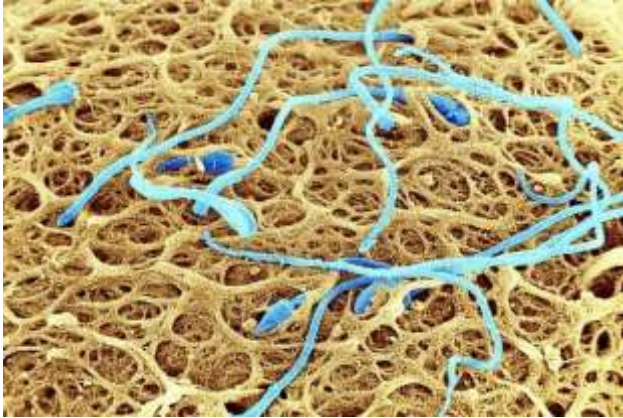


# Kde a jak se vývoj vajíčka odehrává ? (6)

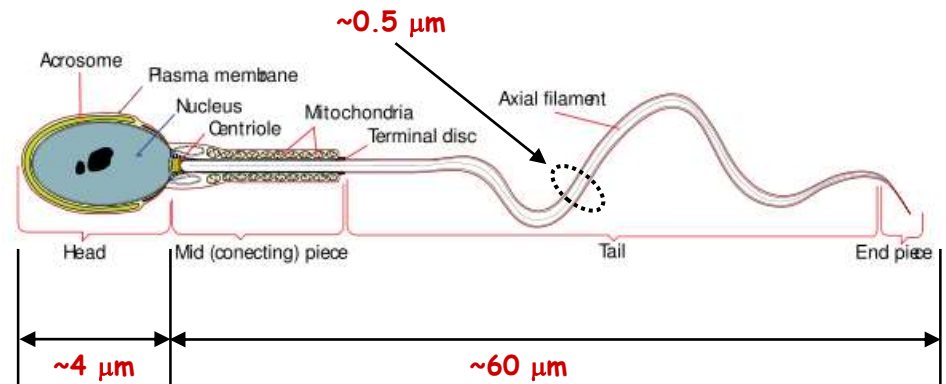
Hormonální regulace  
ovariálního cyklu



# Vývoj spermii - Spermatogeneze (1)



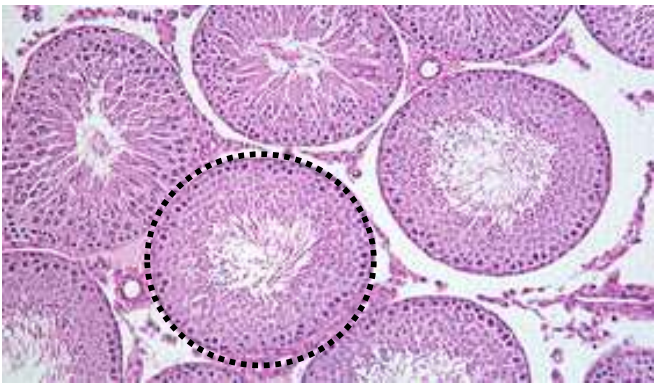
Spermie na vajíčku



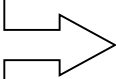
## Minimální ejakulát (WHO)

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

# Vývoj spermií (2)

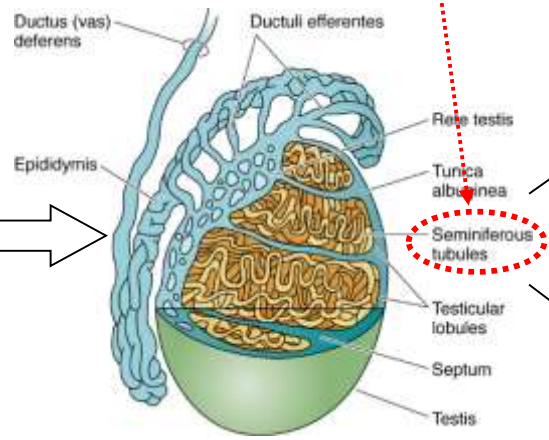
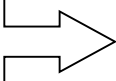


Před pubertou

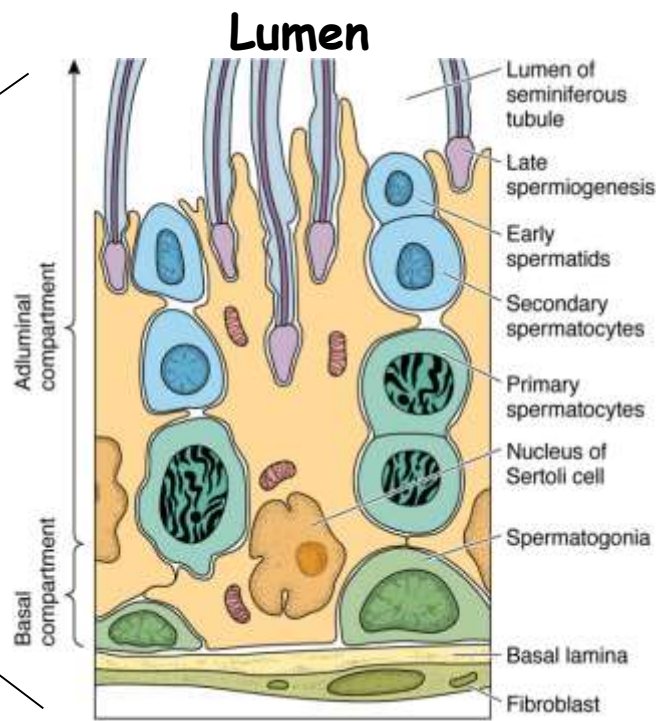


Mitotické dělení spermatogonií v zárodečných pruzích

Po dosažení puberty

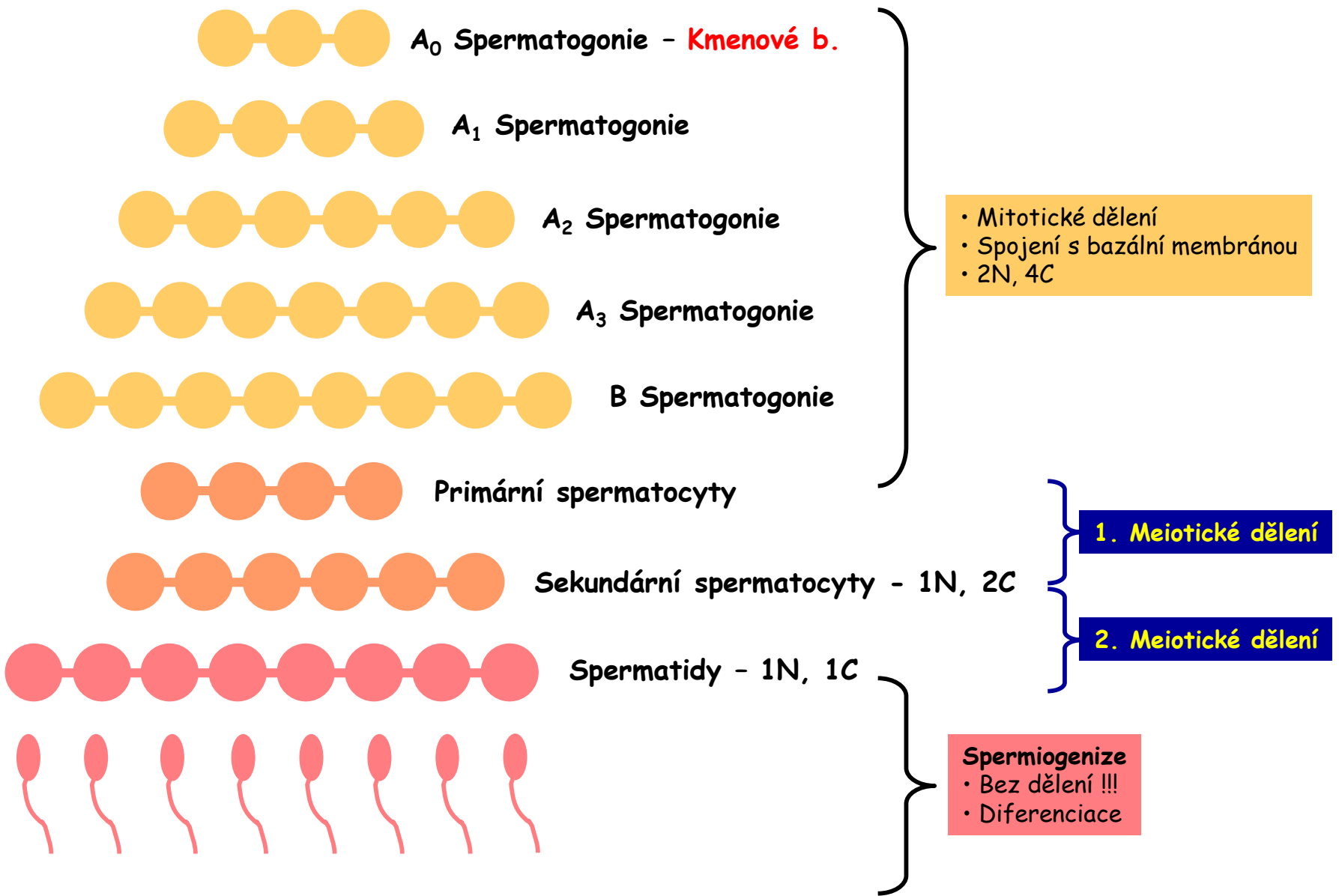


~0.25 mm  
~0.5 km

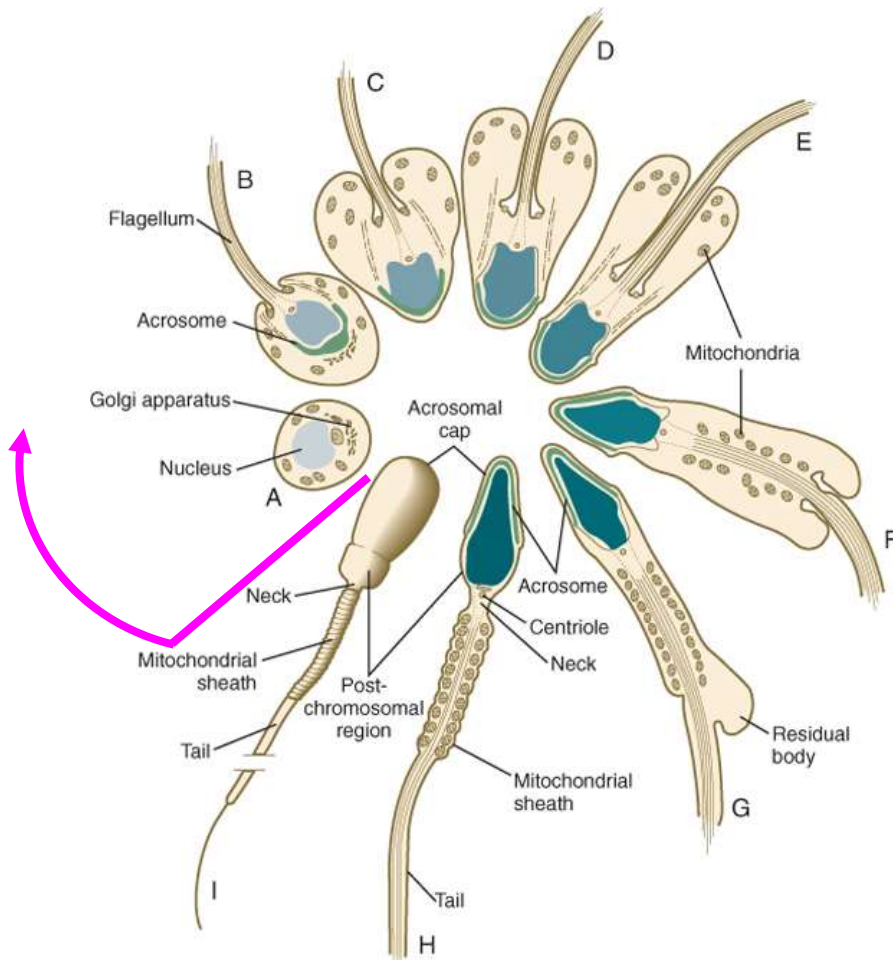




# Vývoj spermií (3)



# Vývoj spermií (4) - Spermiogeneze

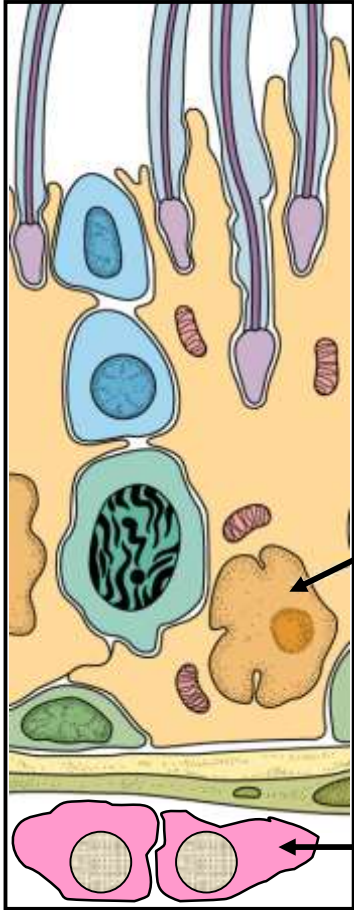


**Histony na Protaminy**  
**Inaktivace genomu**  
**Ztráta cytoplasmy**

## 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

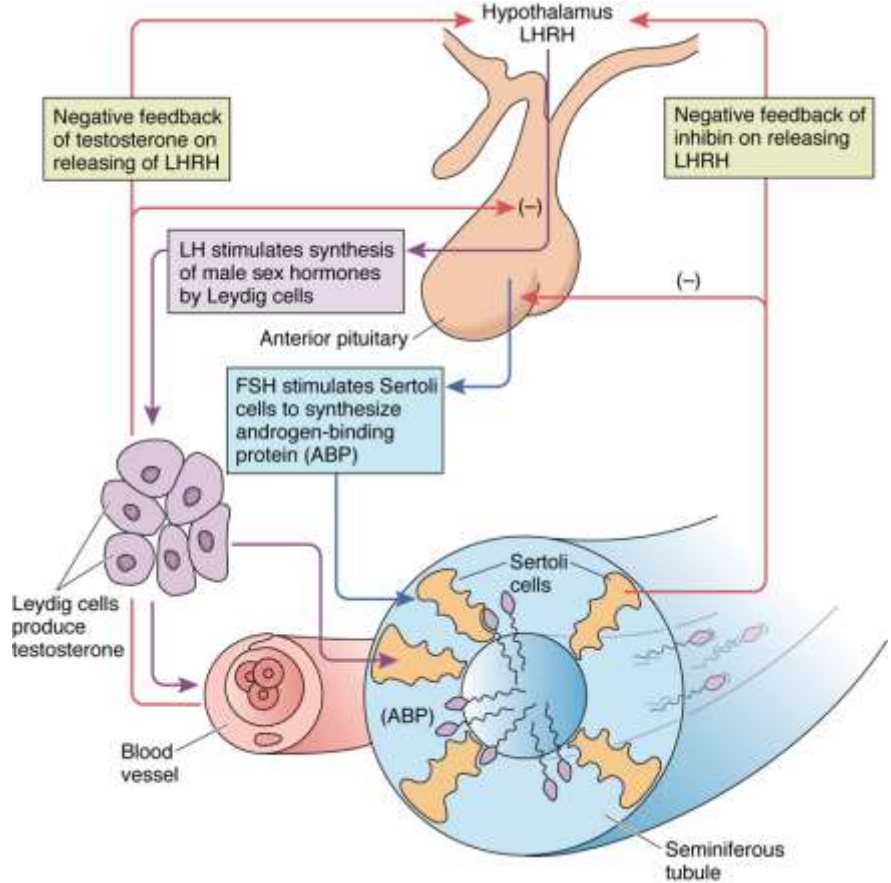


**Sertoliho buňky**

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

**Leydigovy buňky**

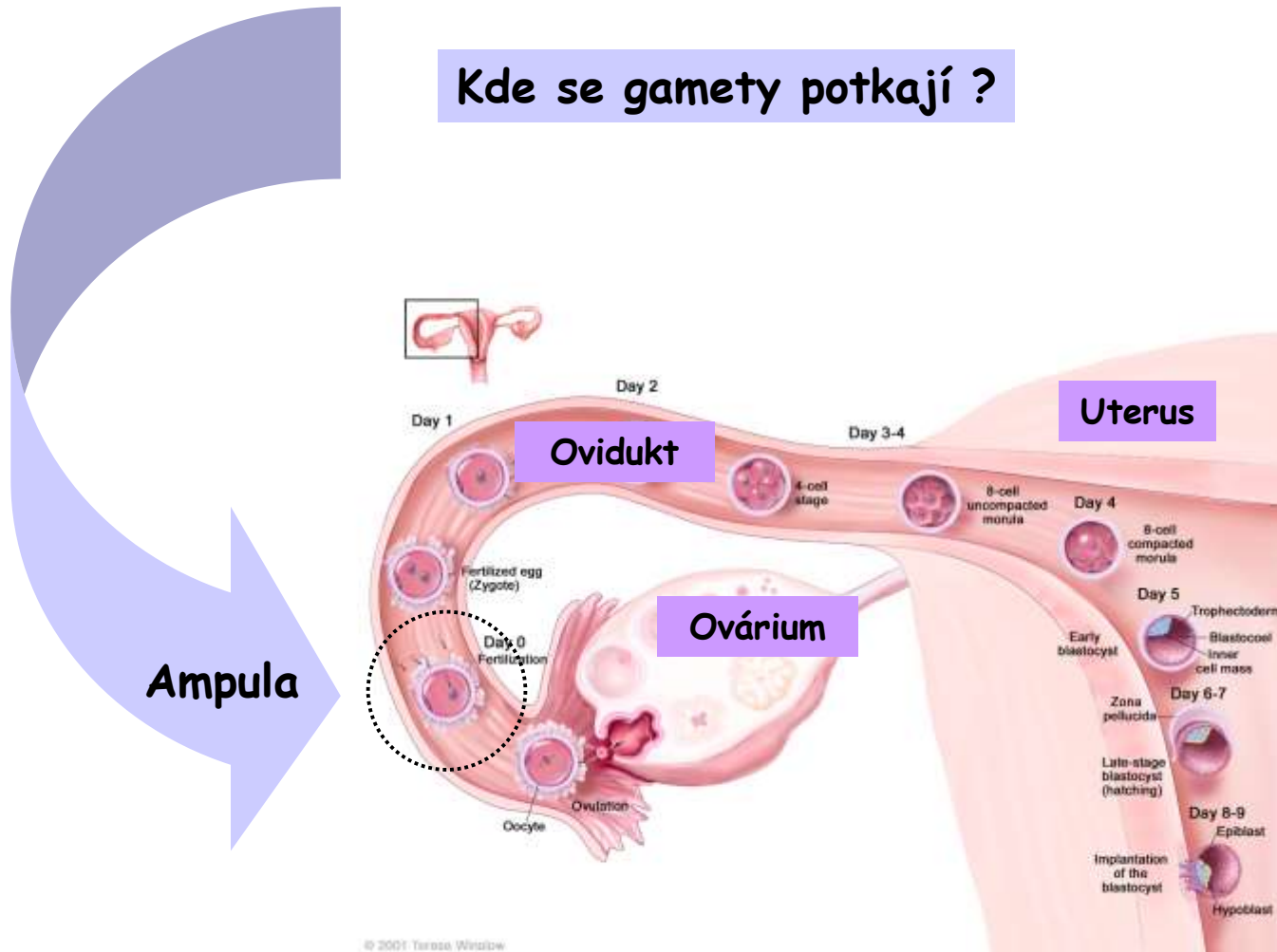
- V intersticiu
- 10 % hmoty varlete
- Produkce testosteronu



# 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“

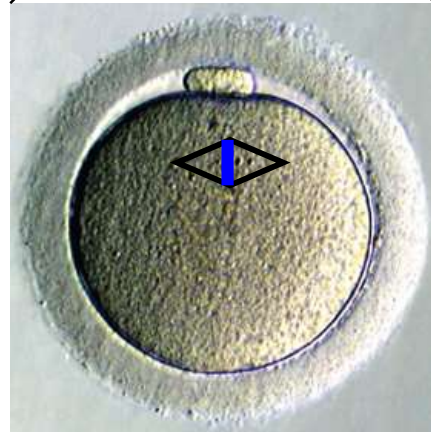


35-40 h

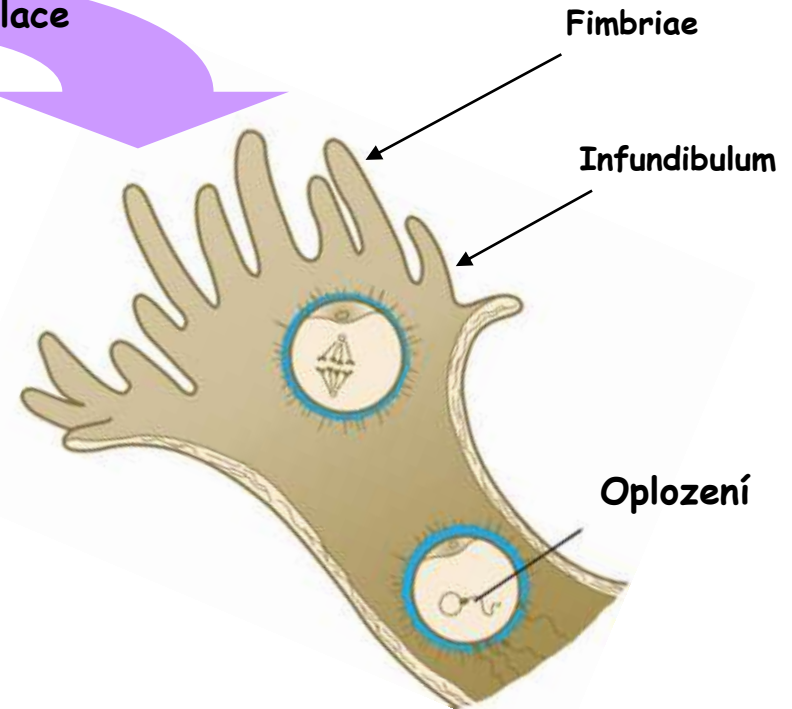


Ovulace

Preovulační stádium

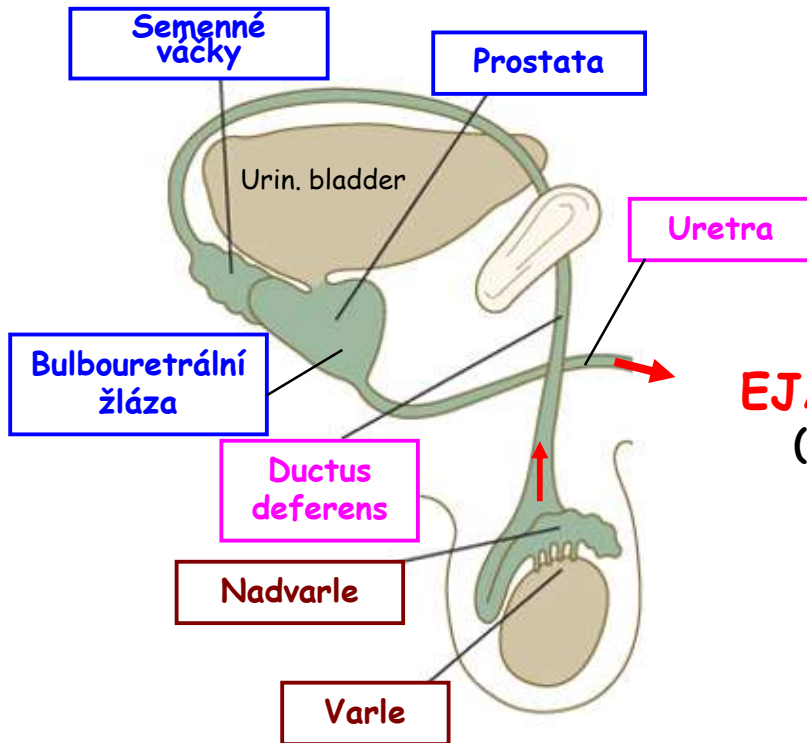


Oocyt je schopen oplození  
pouze 12 až 16 hodin



# Oplození (3)

## Cesta spermií do místa oplození



**EJAKULÁT**  
(2-6 ml)

### Spermie

200 - 600 milionů

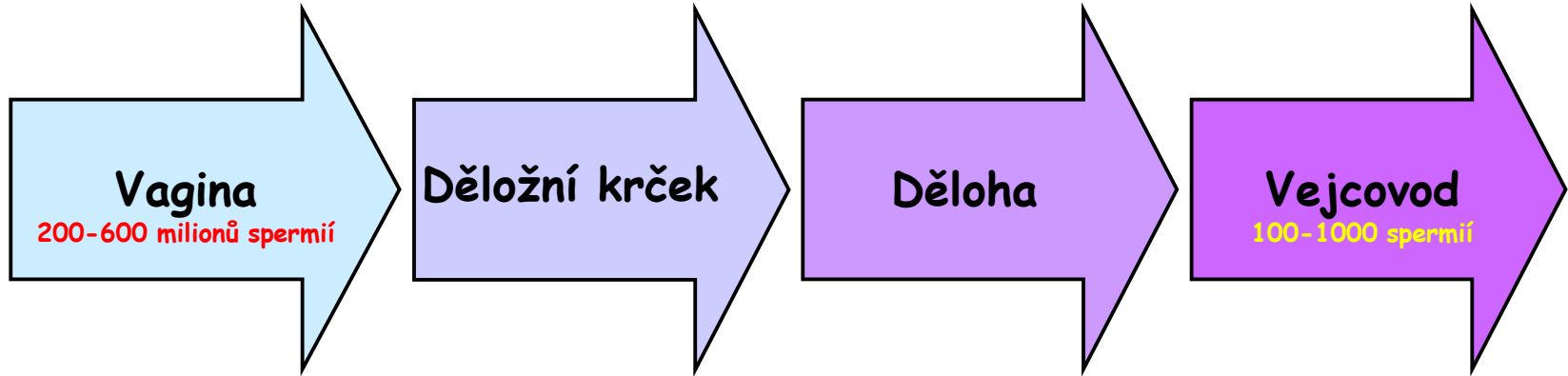
### Producty přídatných pohlavních žláz

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

# Oplození (4)

## Cesta spermií do místa oplození

2 - 7 hodin



### Vagina

200-600 milionů spermií

- Kyselé prostředí
- Aktivní pohyb spermií

### Děložní krček

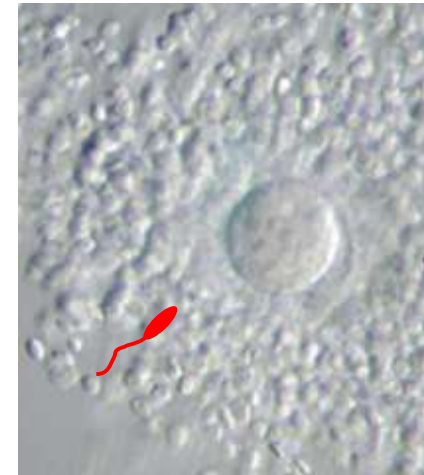
- Čistí spermie
- Cervikální hlen stabilizuje spermie
- Zahajuje **kapacitaci**

### Děloha

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

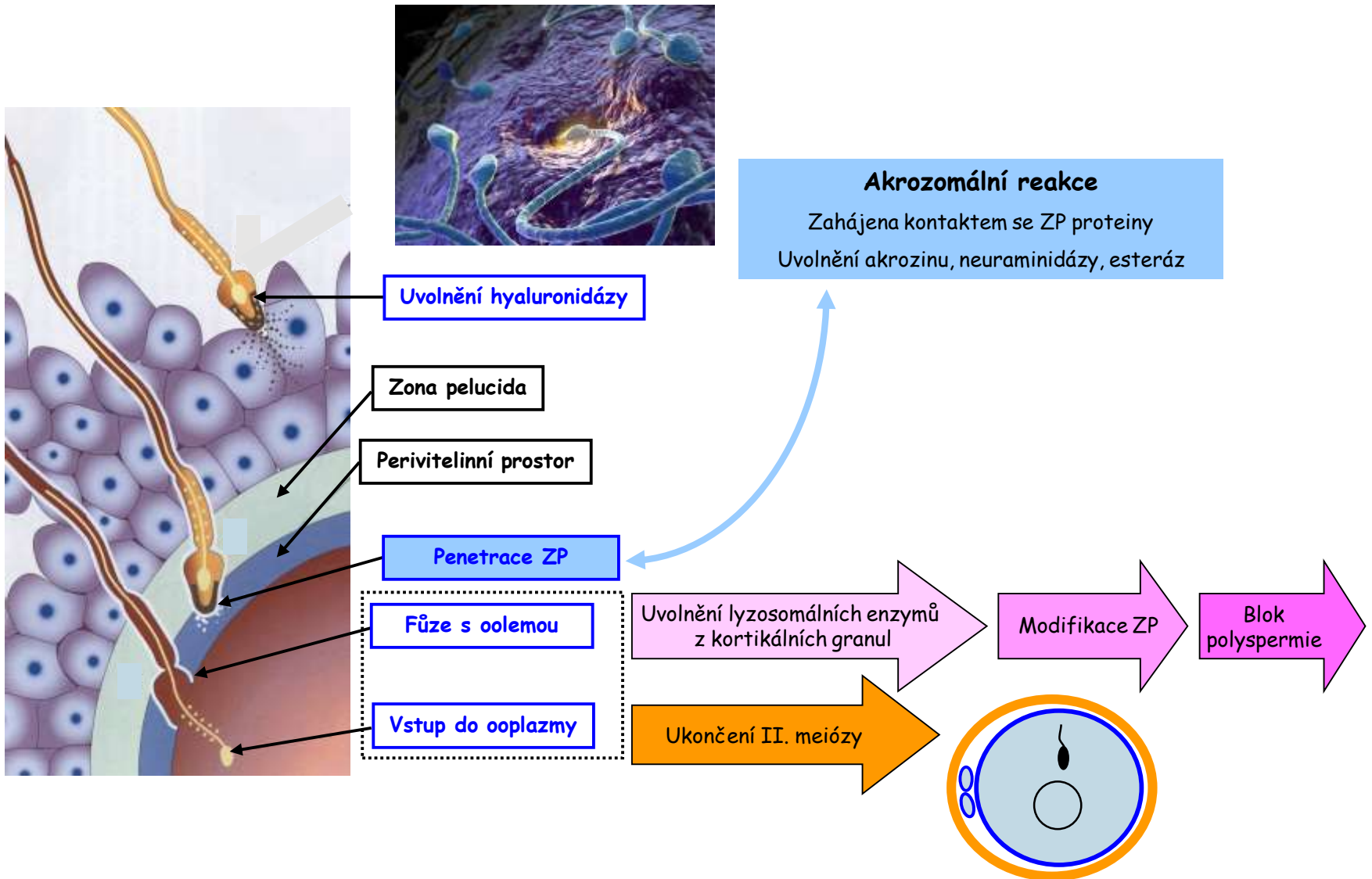
### Vejcovod

100-1000 spermií



# Oplození (5)

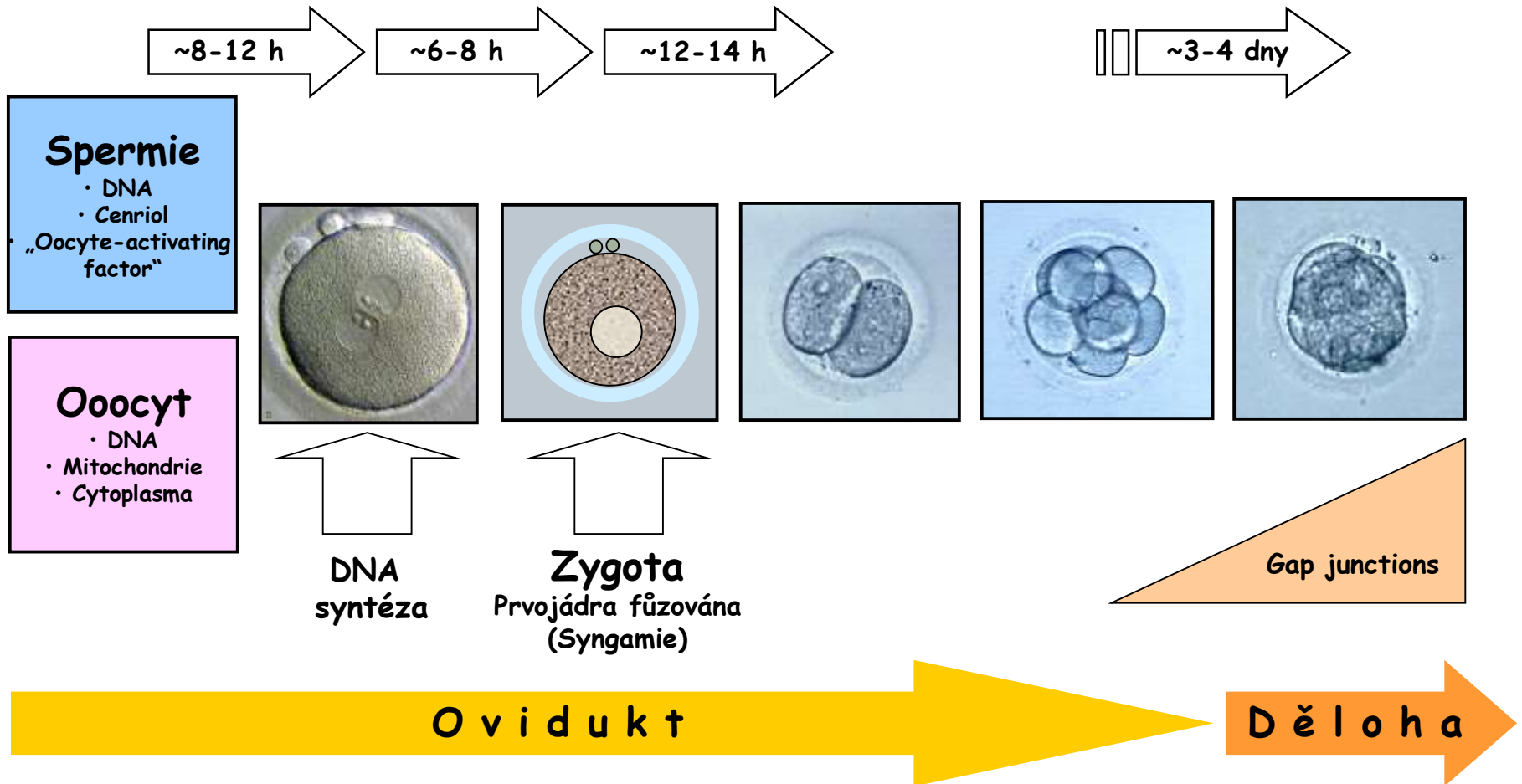
## Proniknutí spermie do vajíčka



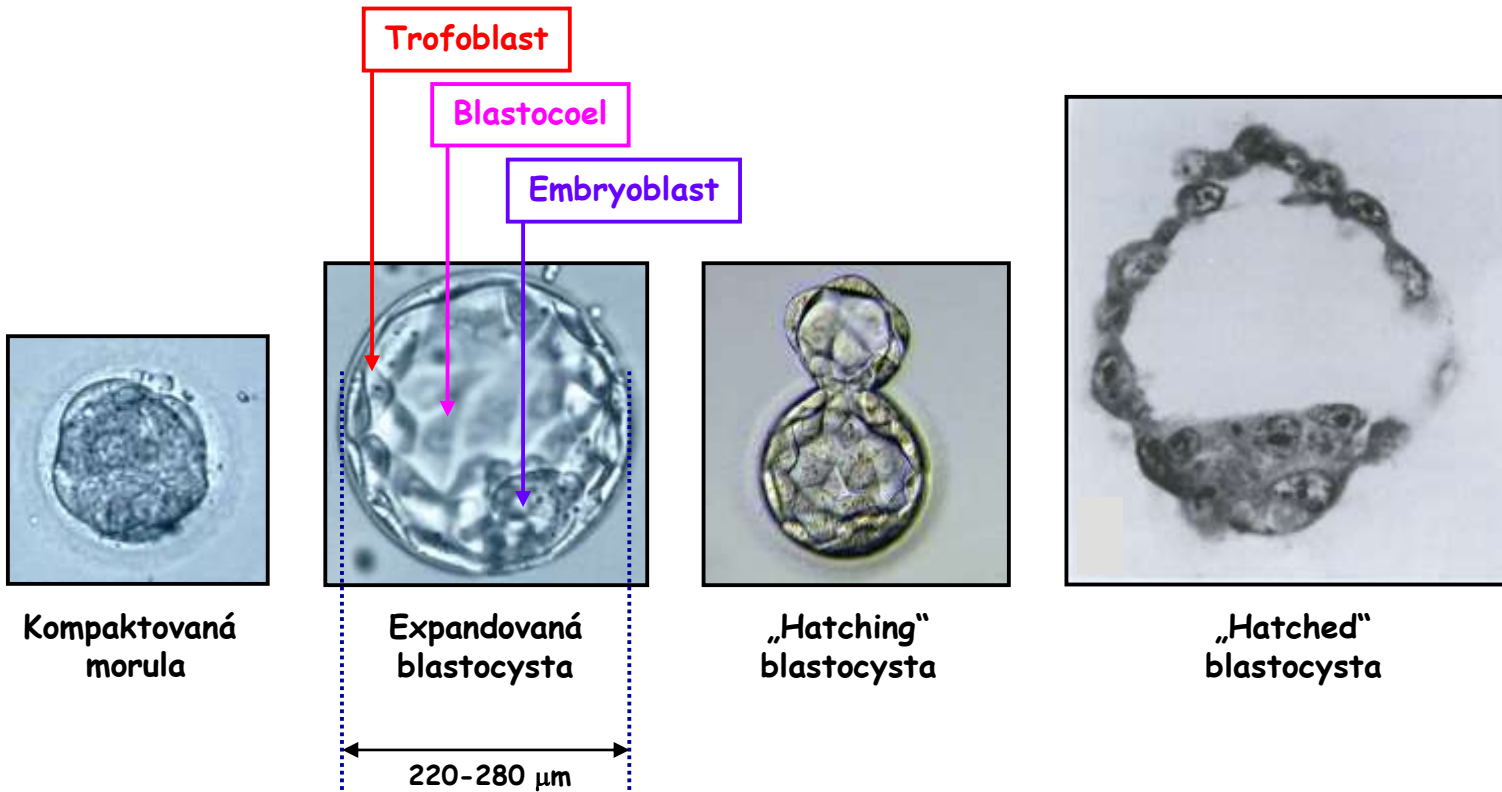


# Oplození (6)

## Vznik zygoty a první buněčná dělení

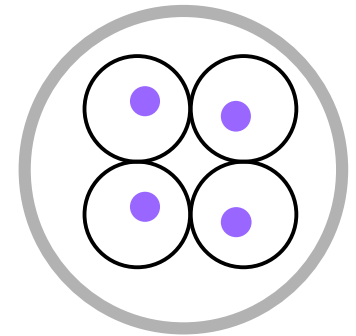
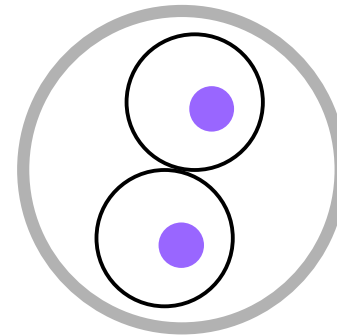
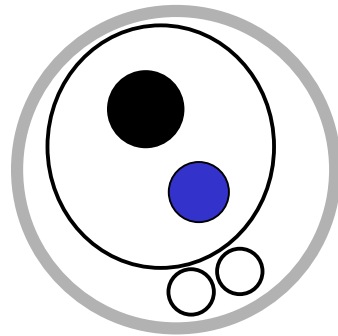
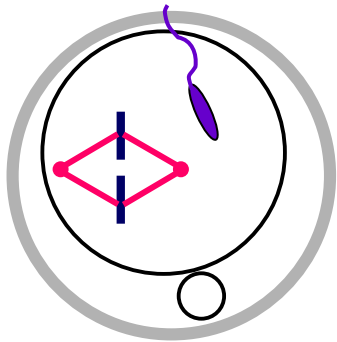
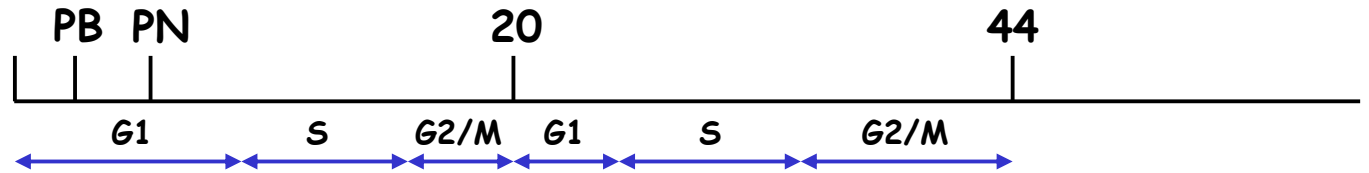


# Vývoj blastocysty



**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)

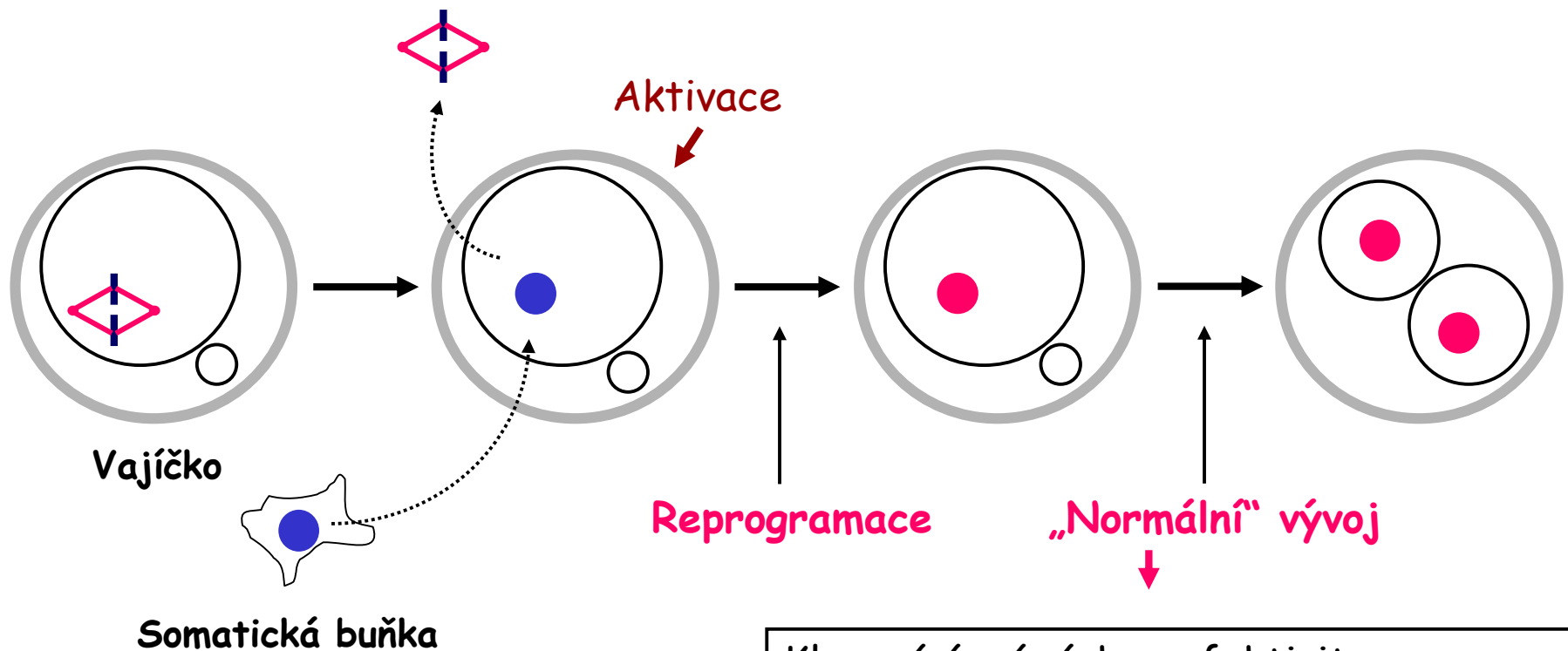
Dva typy transkriptů

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, ...)

# Implantace blastocysty

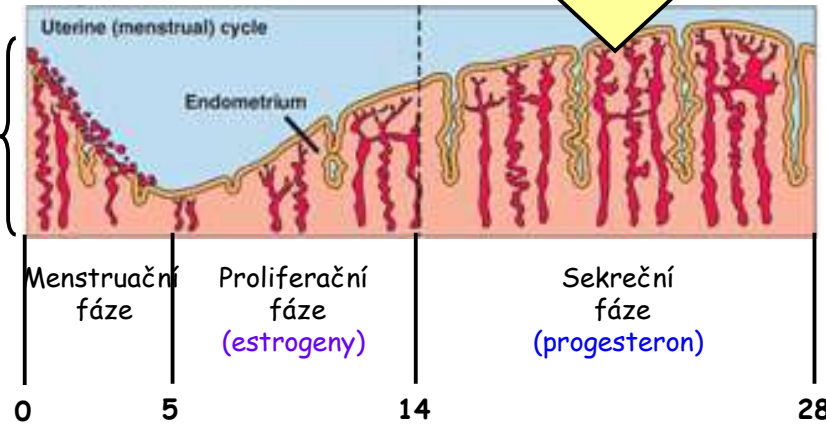


**Molekulární hráči**

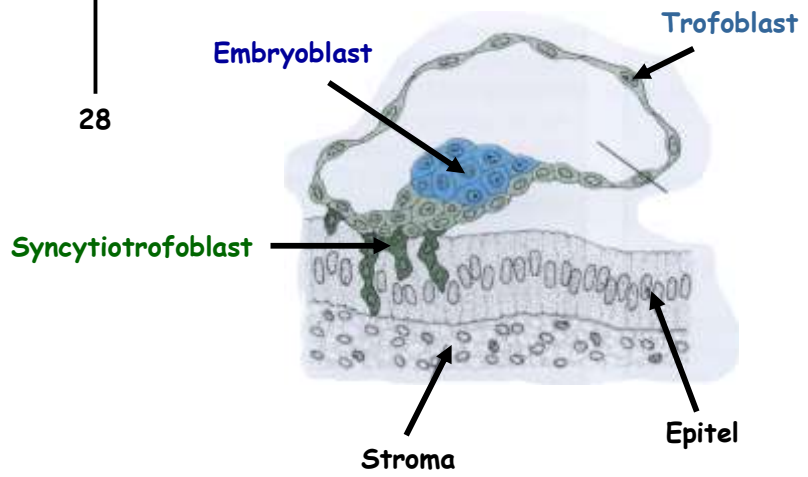
Selektin na trofoblastu + glykoproteiny na epitelu  
 Integriny + Laminin, Fibronektin  
 IGF1, IGF2, VEGF  
 Metaloproteinázy + jejich tkáňové inhibitory

Progesteron  
 hCH  
 Prostaglandiny

Funkční zóna endometria  
 kompaktní + spongiózní bazální



Ovulace následovaná Oplozením



# Časná embryogeneza - Druhý týden (1)

Ukončení implantace + Další embryonální vývoj

## Trofoblast

- Pokračující invaze do endometria
- Destrukce kapilár a žlázek
- Pohlcování apoptotických buněk (Fas/Fas ligand)

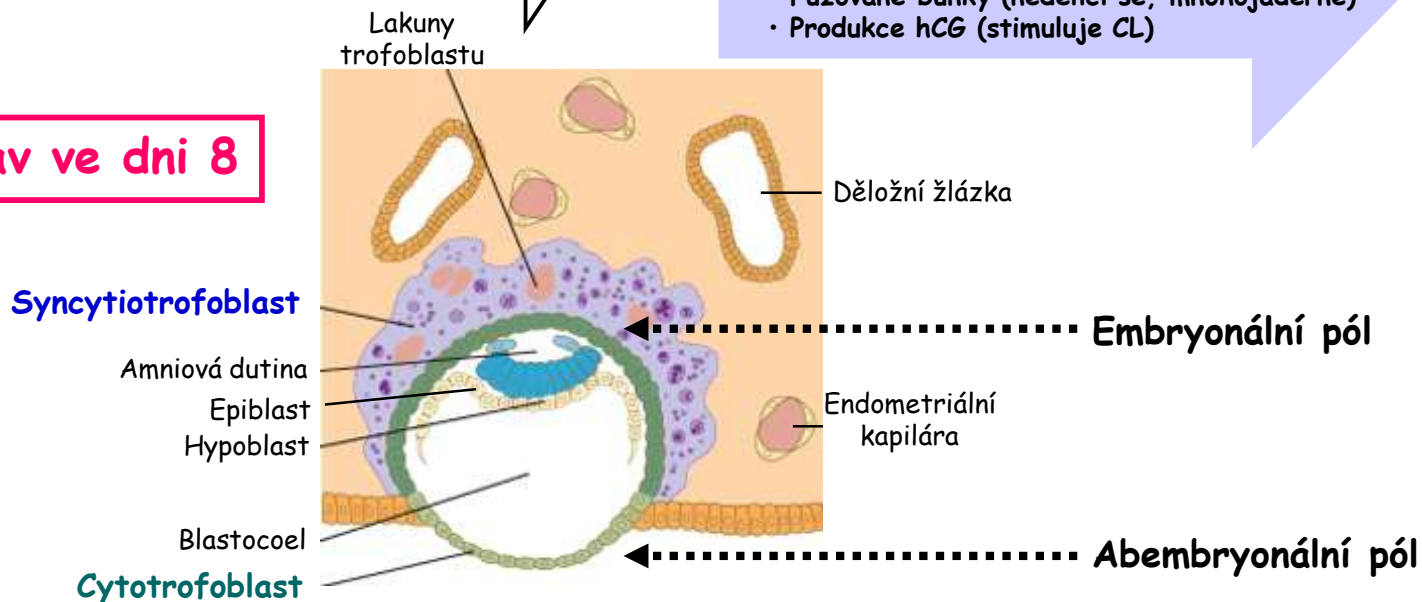
## Cytotrofoblast

- Mitoticky se dělicí buňky (jedna vrstva)
- Zdroj buněk syncytiotrofoblastu

## Syncytiotrofoblast

- Fúzané buňky (nědělicí se, mnohjaderné)
- Produkce hCG (stimuluje CL)

Stav ve dni 8



# Časná embryogeneza - Druhý týden (2)

## Deciduální reakce endometria

Rozrůstání kapilár

Diferenciace fibroblastů,  
akumulace glykogenu a lipidů

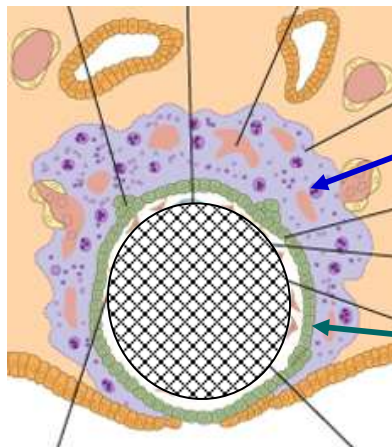
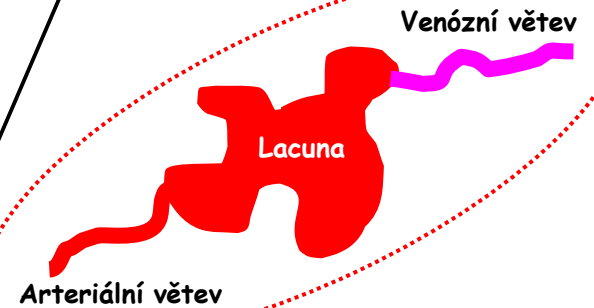
Fúze lakun - vznik sítě dutin

+

Eroze endometr. kapilár

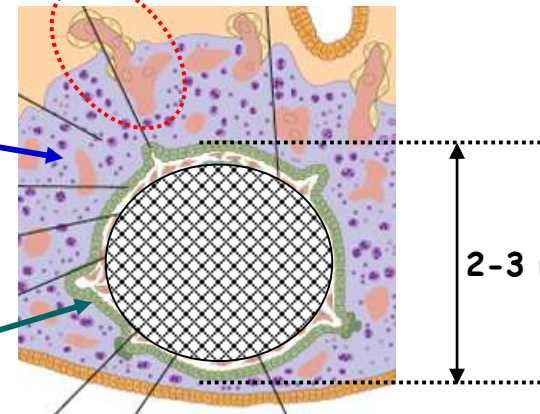


**Uteroplacentární  
cirkulace**



**Syncytiotrophoblast**  
Houbovitá struktura

**Cytotrophoblast**



2-3 mm

Epitelizace  
místa implantace

**Stav ve dni 10**

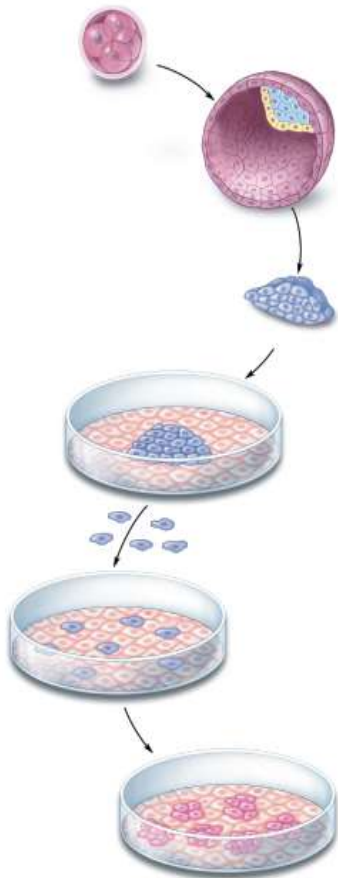
**Stav ve dni 12**





# Lidské embryonální kmenové (hES) buňky

(Thompson et al, 1998)

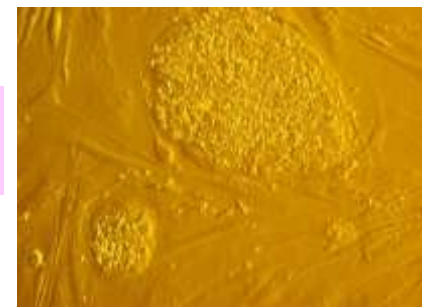


Časné embryo ve stadiu blastocysty

Izolace embryoblastu (ICM - Inner Cell Mass)

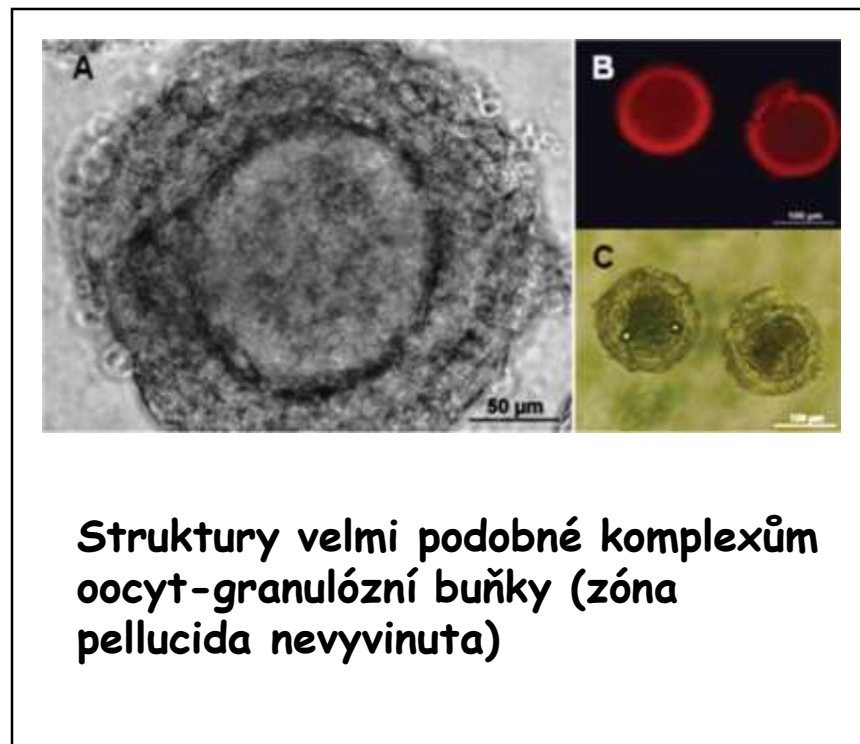
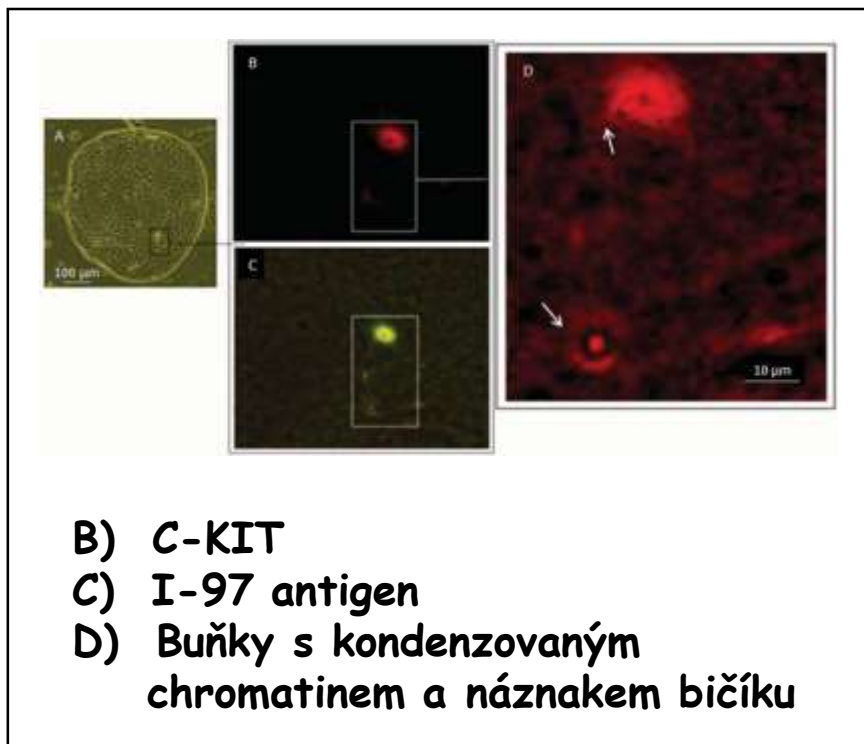
Přenesení izolovaného embryoblastu do  
*in vitro* podmínek (+ podpůrné buňky + FGF-2)

Propagace v kultuře mechanickou či enzymatickou  
disagregací (opakovaným pasážováním)



# Derivace postmeiotických zárodečných buněk z lidských ES buněk

Prof. Harry Moore, University of Sheffield, 2009



**Děkuji za pozornost !**

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