

# Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

## FERTILIZACE A EMBRYOGENEZE

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Program přednášky:

- meióza a gametogeneze
- mechanismy fertilizace
- časná embryogeneze
- hybridy a chiméry

# Způsoby rozmnožování eukaryot

## Nepohlavní rozmnožování

- potomstvo geneticky identické s rodičovským organismem

## Pohlavní rozmnožování

- původní kombinace genů zanikají a vznikají nové → každý organismus je geneticky jedinečný
- kompetitivní selekční výhoda pro organismy v nepředvídatelně variabilním prostředí





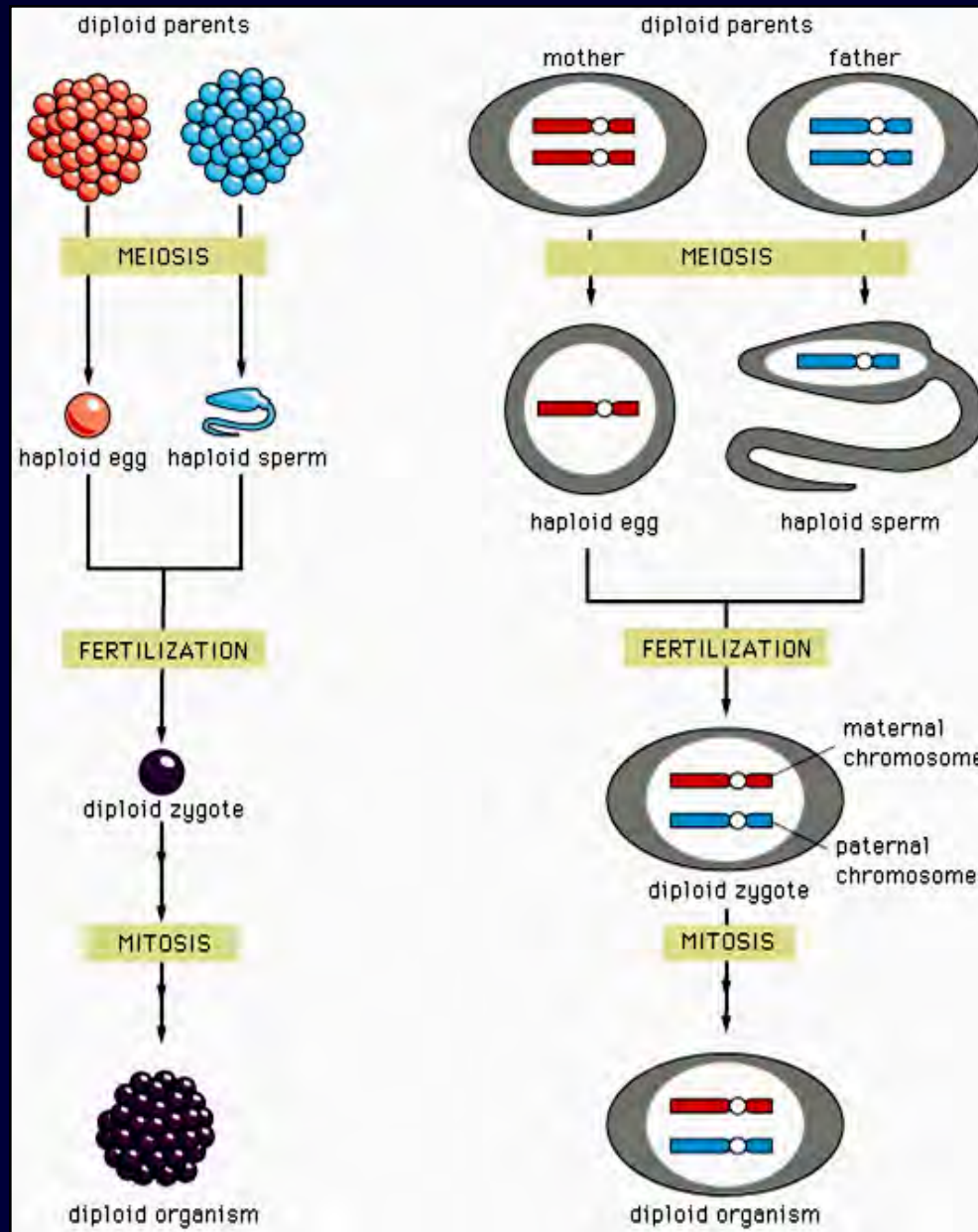
# MEIÓZA

# MEIÓZA

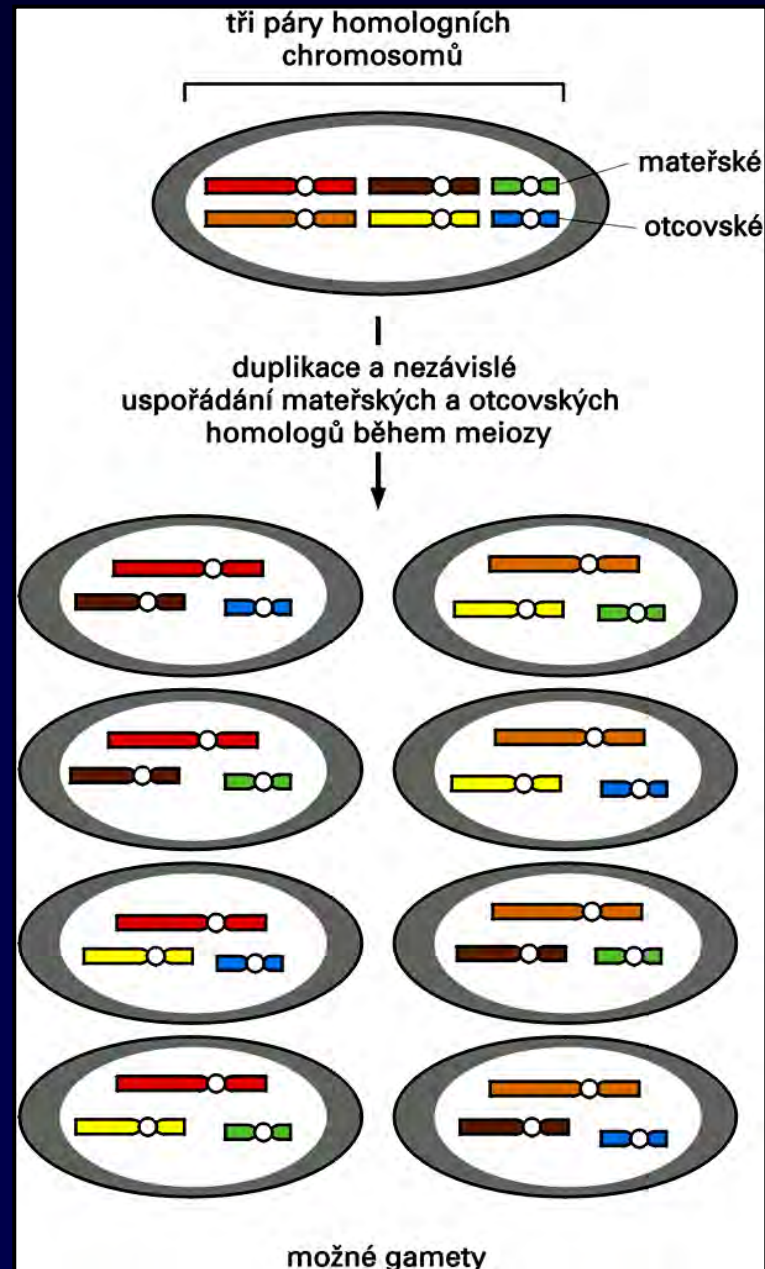
- dvě po sobě jdoucí dělení:
  - I. meiotické (heterotypické, redukční)
  - II. meiotické (homeotypické, ekvační)

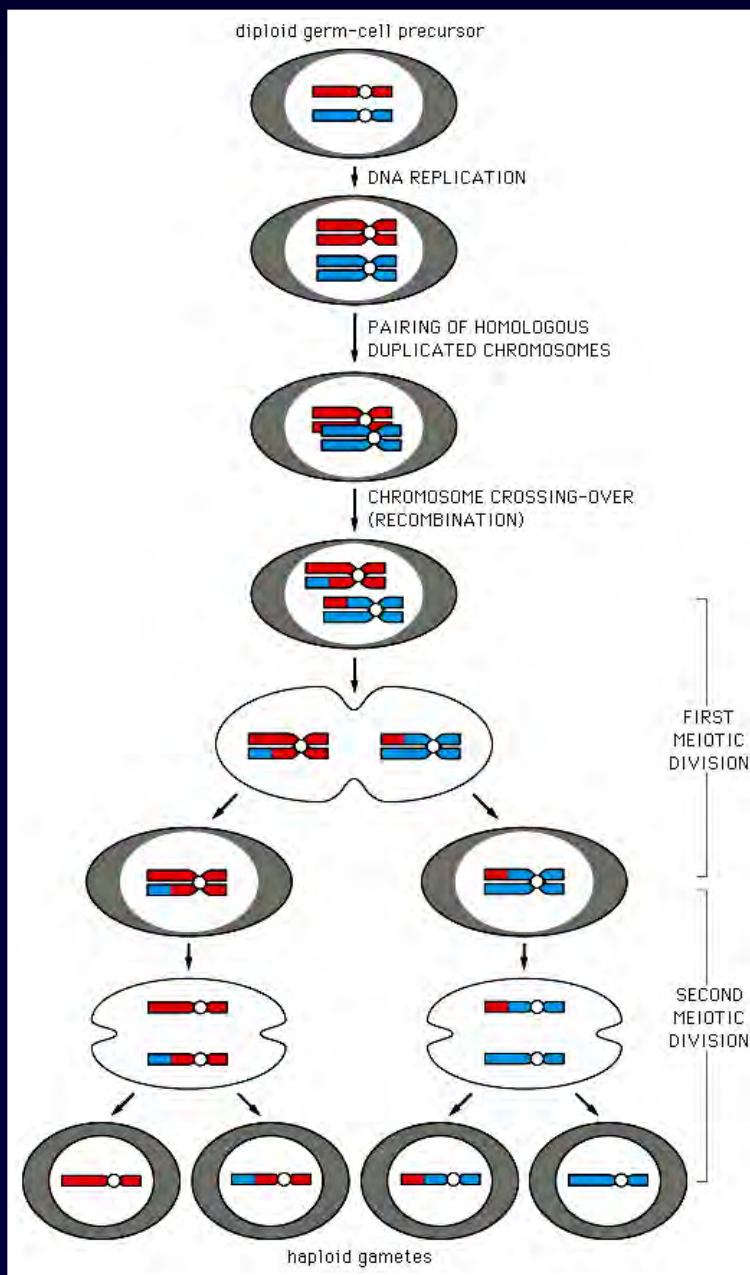
## Genetický význam meiózy:

- redukce počtu chromozomů při tvorbě pohlavních buněk
- v gametách  $2^n$  ( $2^{23} = 8.388.608$ ) možných kombinací chromosomů (pak ještě zvýšeno crossing-overem)
- párování homologických chromosomů, které umožňuje crossing-over a tím i rekombinaci genů



# Schéma kombinace chromozomů v gametách





# Stádia meiotického dělení

- Premeiotická interfáze

- Meióza I:

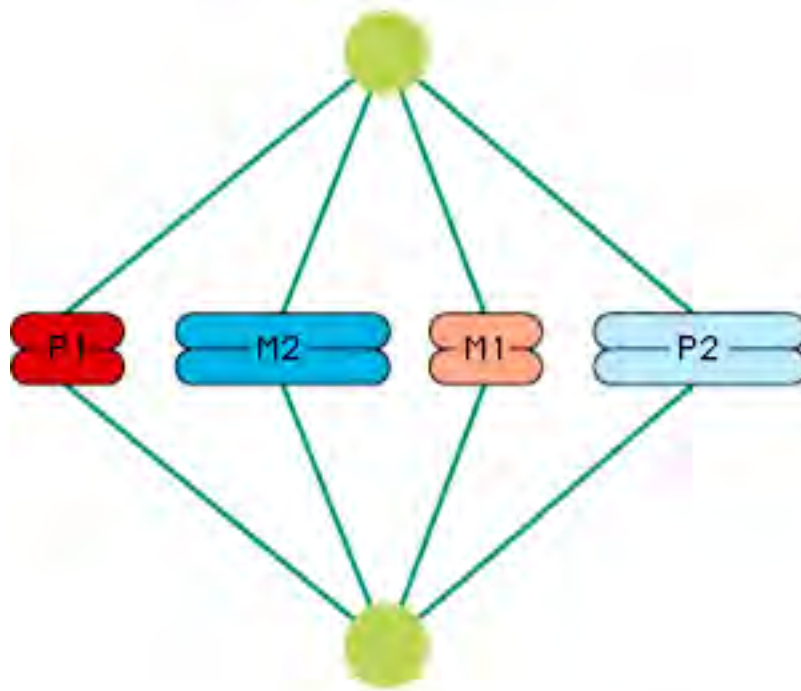
profáze I: leptotene  
zygotene  
pachytene  
diplotene  
diakineze

metafáze I, anafáze I, telofáze I

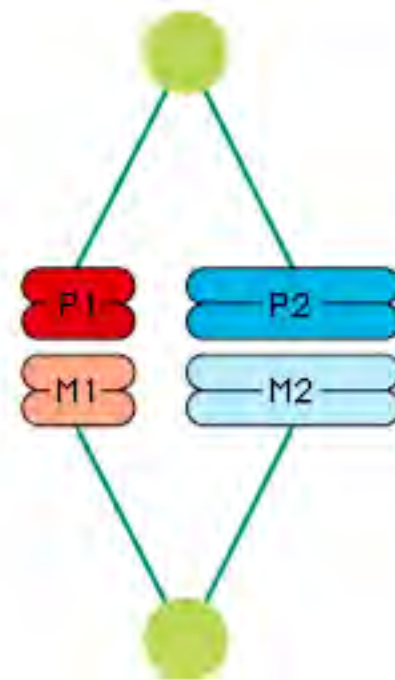
- Meióza II:

profáze II, metafáze II, anafáze II, telofáze II



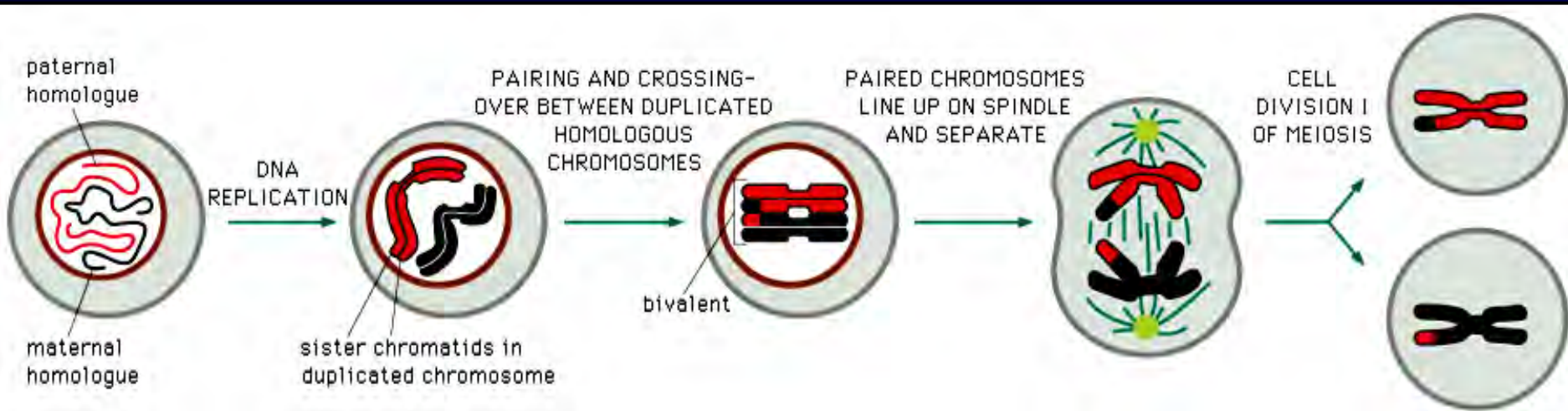


(A) Metaphase plate in **mitosis**:  
homologous chromosomes act  
independently



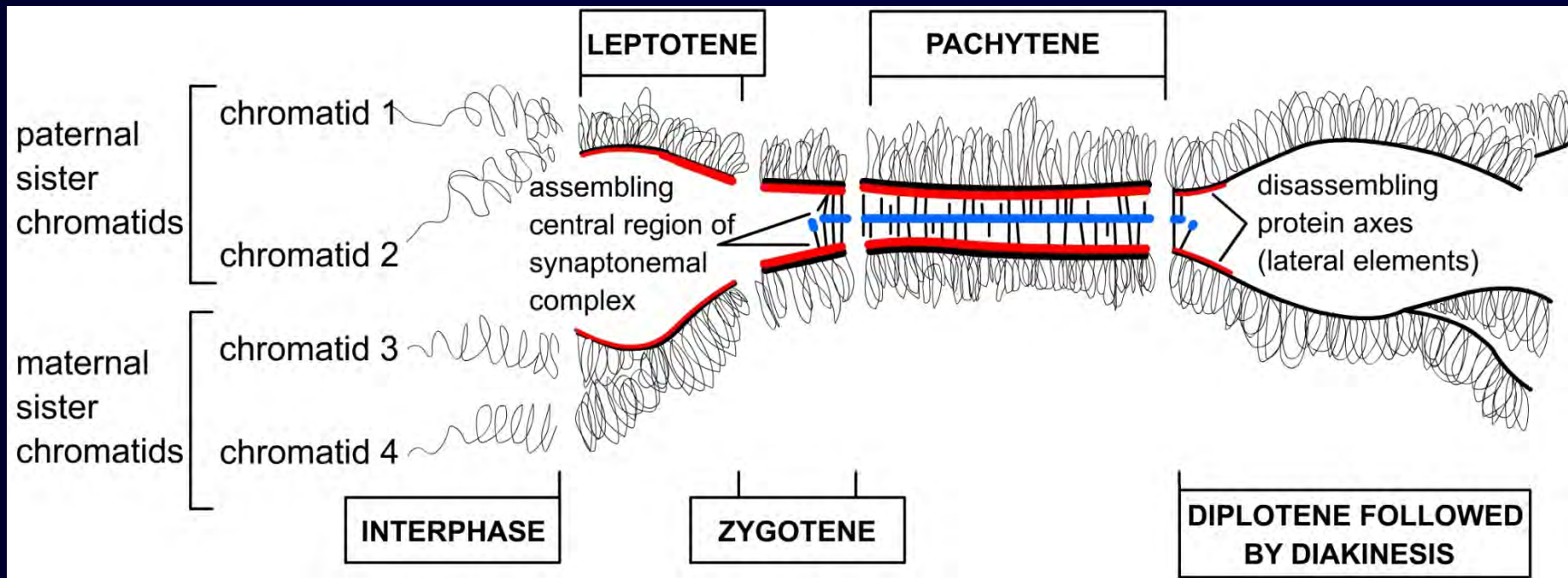
(B) Metaphase plate in **meiosis**:  
homologous chromosomes pair

# Tvorba bivalentů a crossing-over

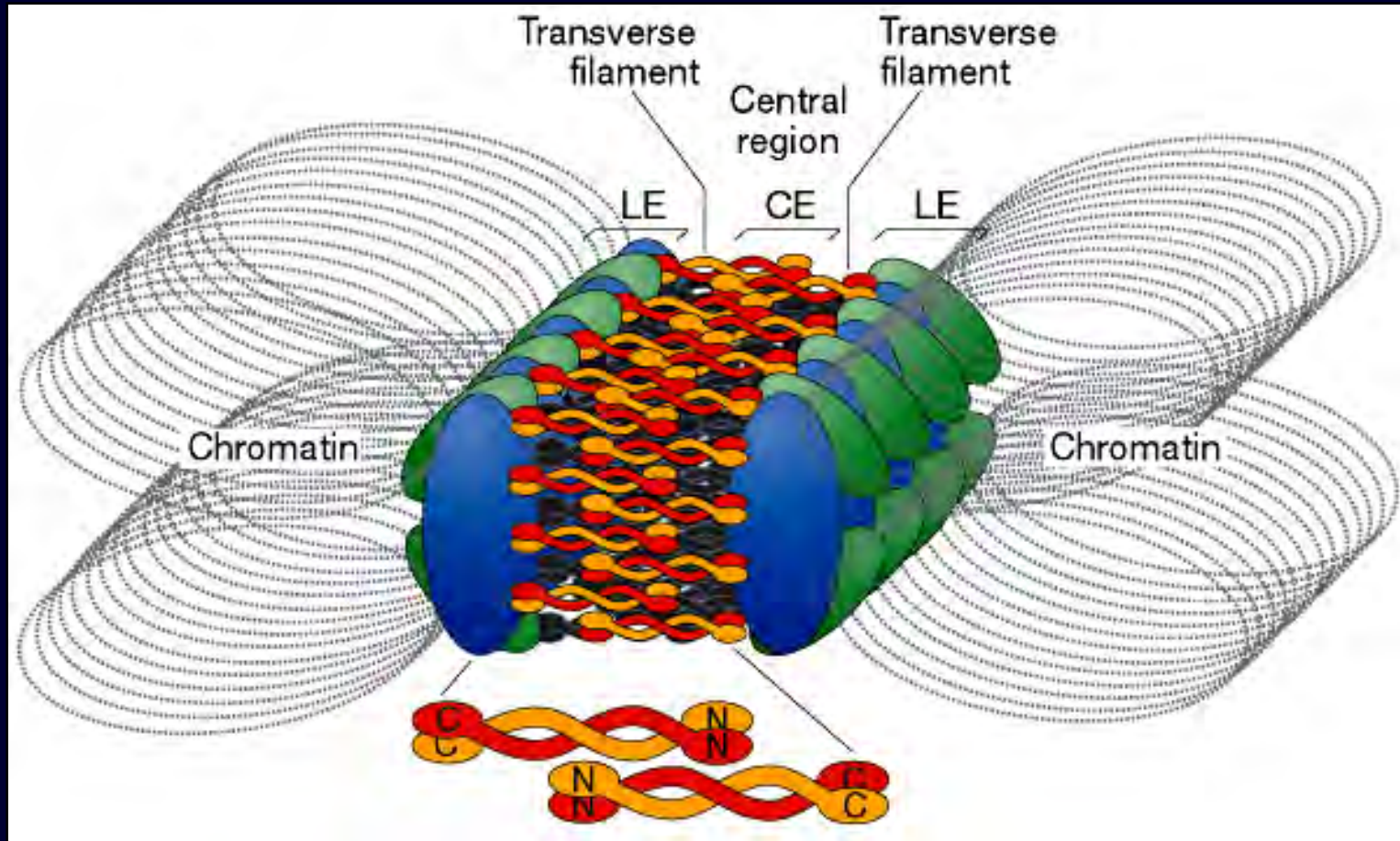




# Chromatidy v průběhu I. profáze



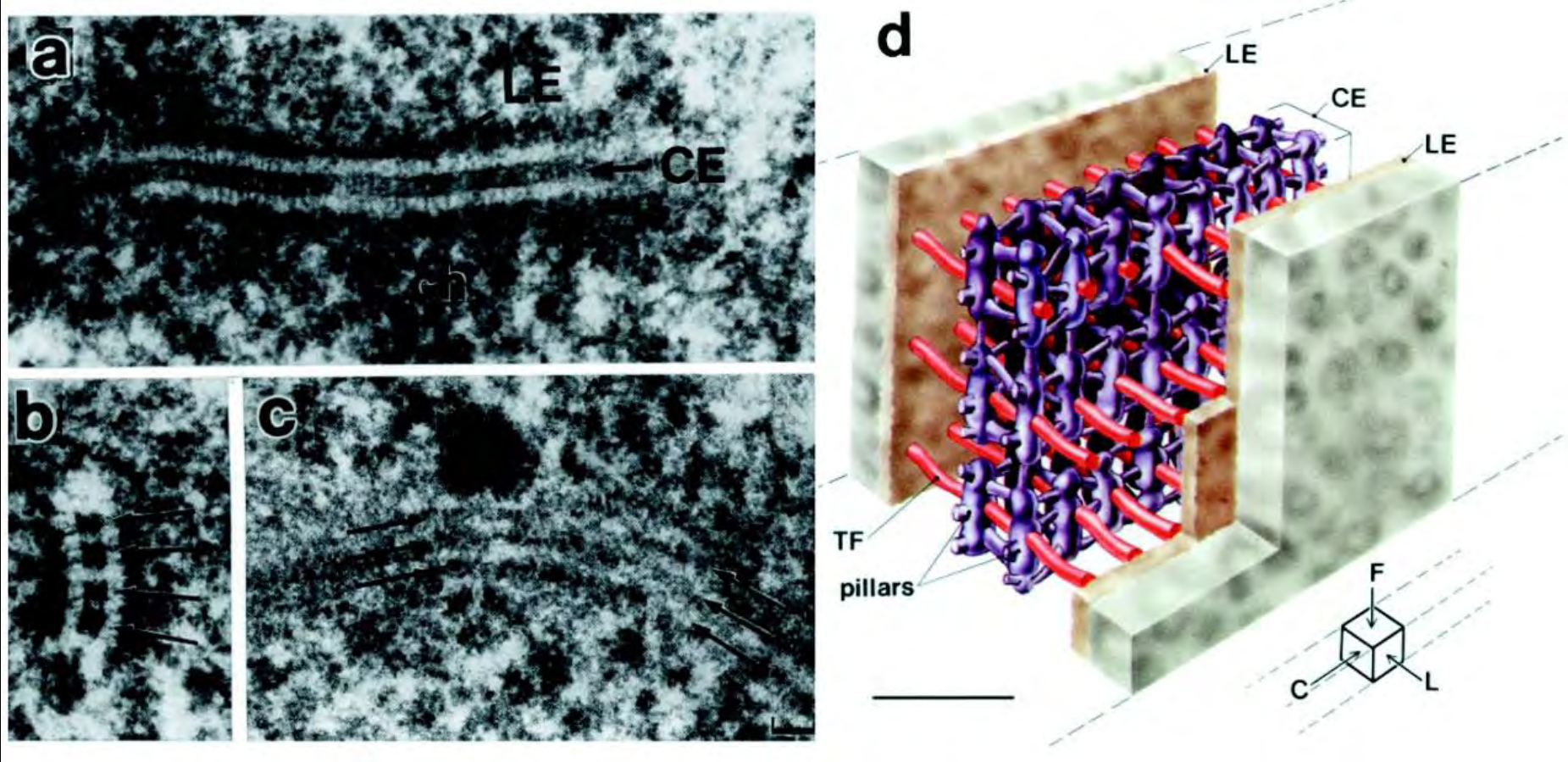
# Synaptonemální komplex

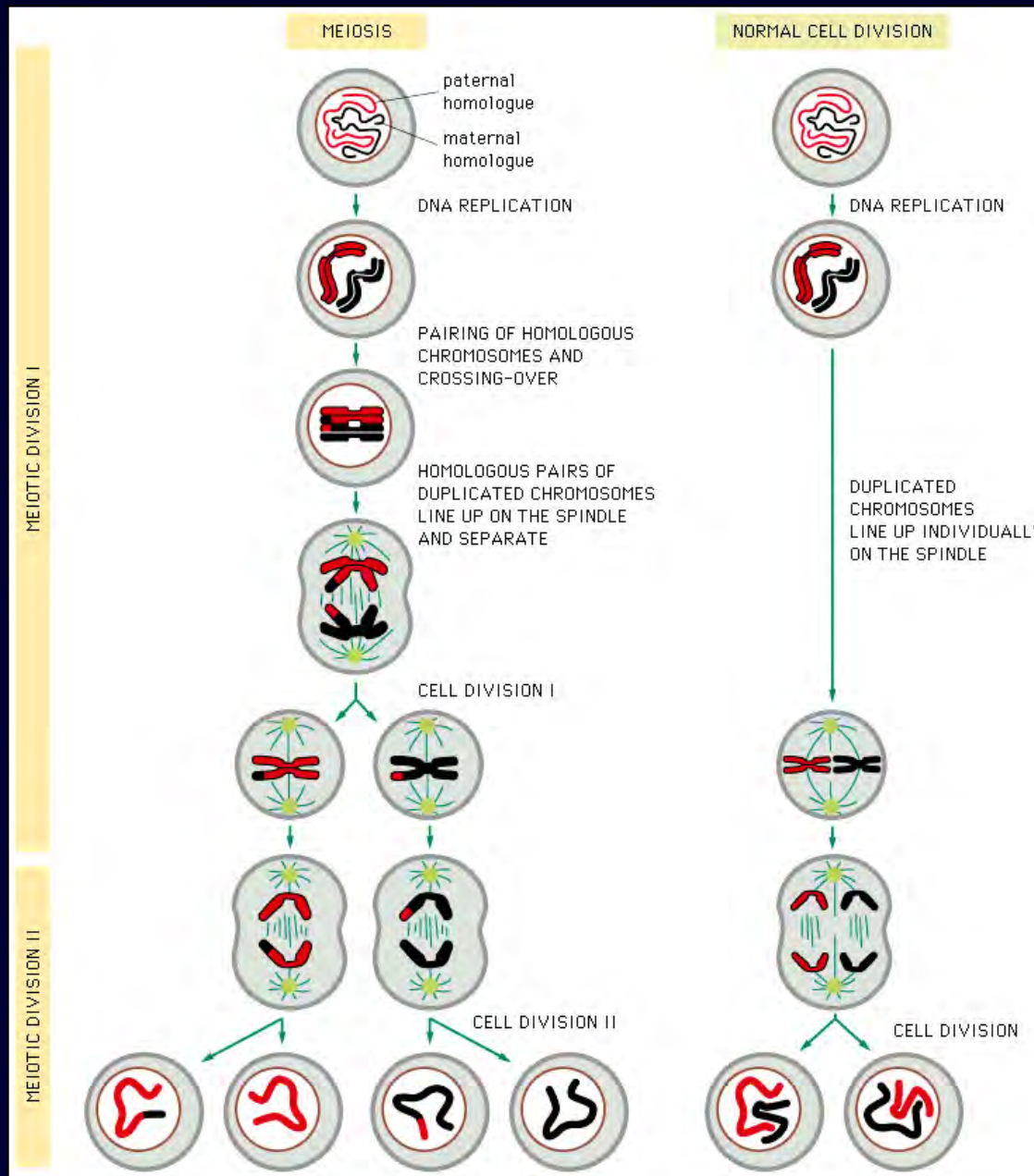


**SYCP** (synaptonemal complex protein) 1 - 3



# Synaptonemální komplex

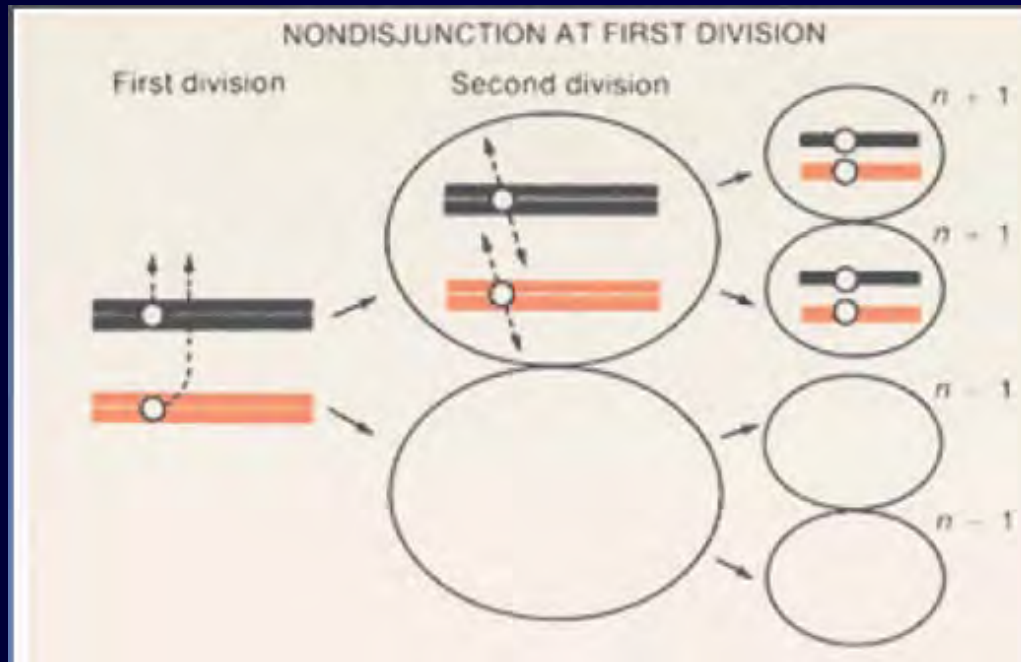




# Poruchy meiózy a jejich genetické důsledky

## a) Nerovnoměrný crossing-over

- v profázi I
- důsledek: delece a duplikace daného chromozomu v polovině gamet

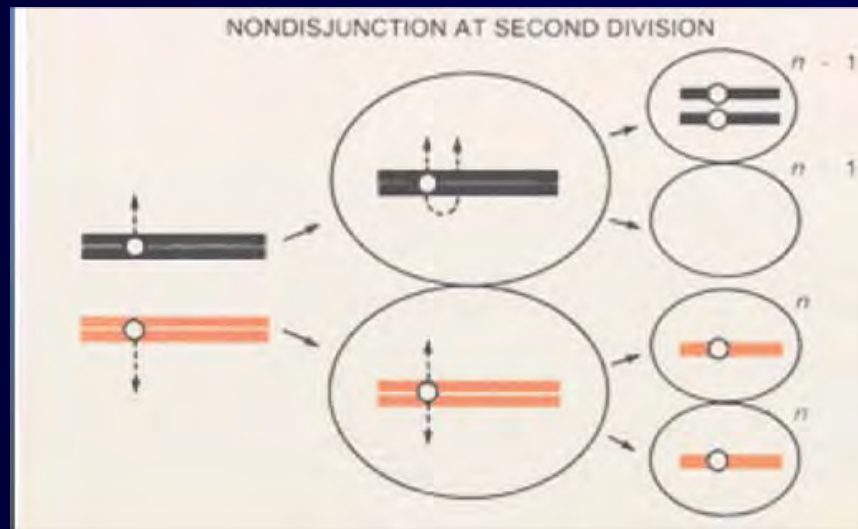




# Poruchy meiózy a jejich genetické důsledky

## b) Neoddělení (nondisjunkce)

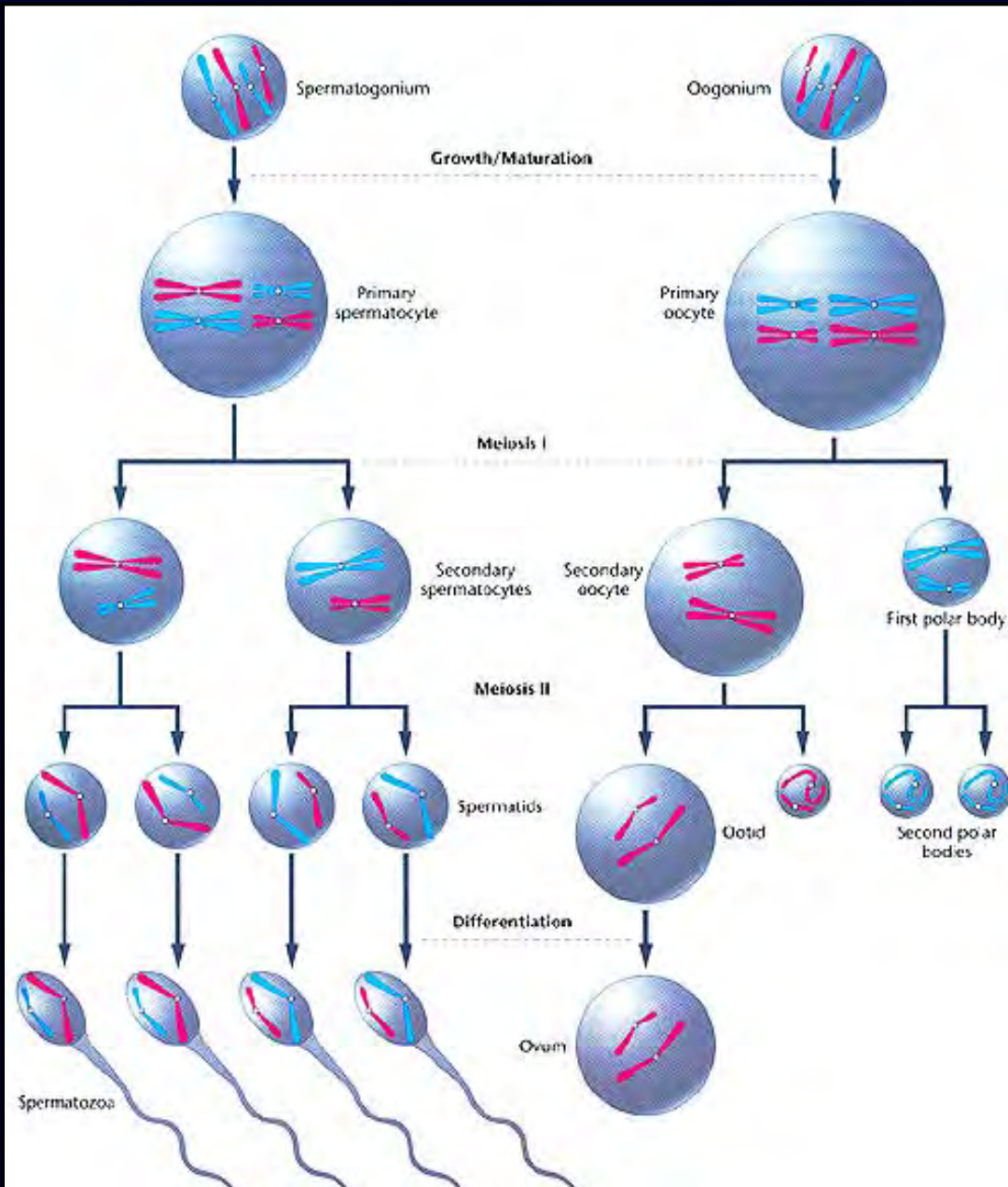
- sesterské chromatidy v anafázi II
- porucha centromer nebo porucha mitotického aparátu
- důsledek: aneuploidie



# GAMETOGENEZE



# Porovnání spermatogeneze a oogeneze





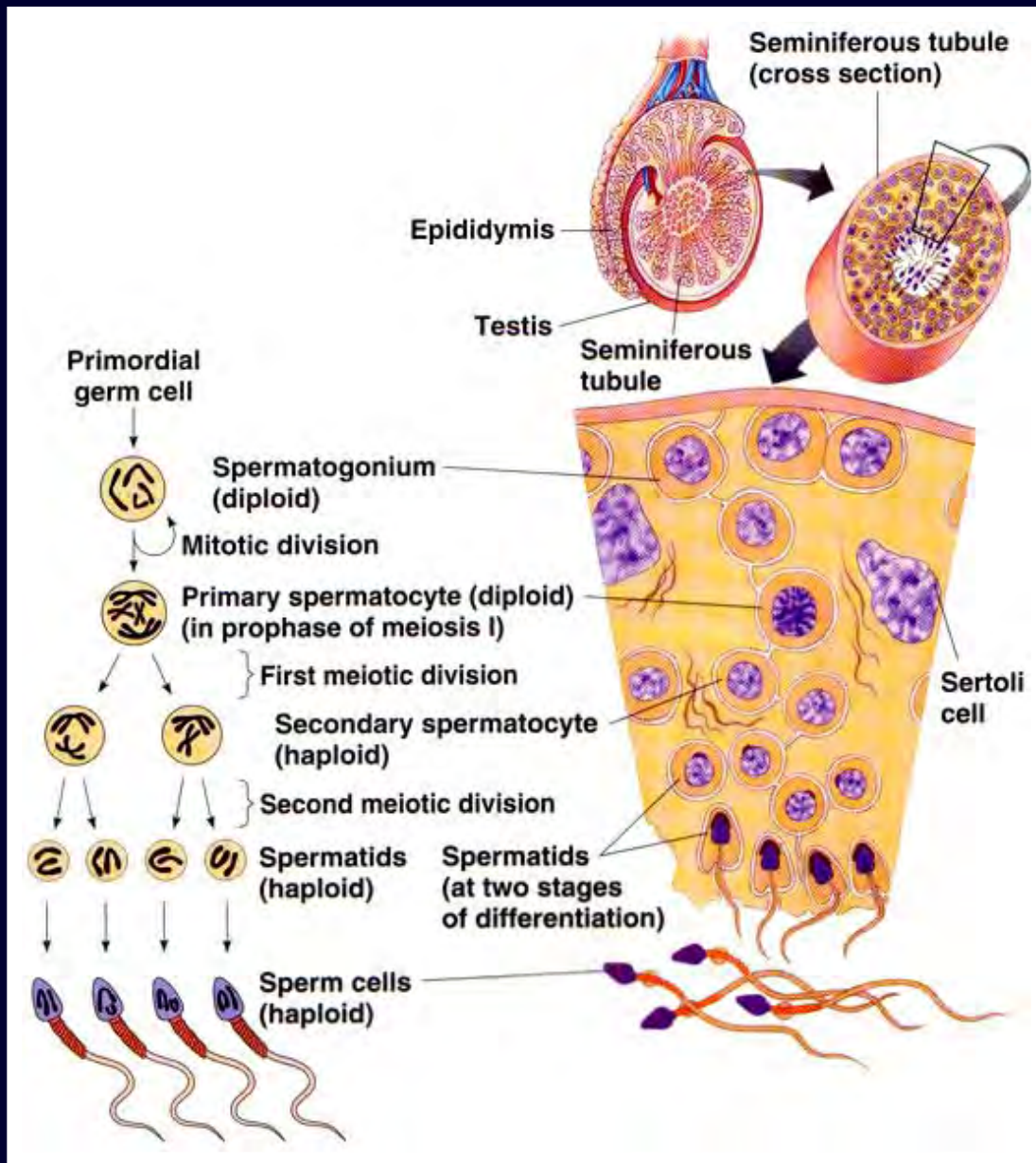
# GAMETOGENEZE: SPERMATOGENEZE

- **primordiální zárodečná buňka (spermatogonie)**  
(46, soustavně se mitoticky dělí)
- **spermatocyt I. řádu**  
(46, probíhá meióza I.)
- **spermatocyt II. řádu**  
(23, probíhá meióza II.)
- **spermatida**  
(23, dozrává bez dalšího dělení)
- **spermie**  
(23, uvolňují se do lumina semenných kanálků)

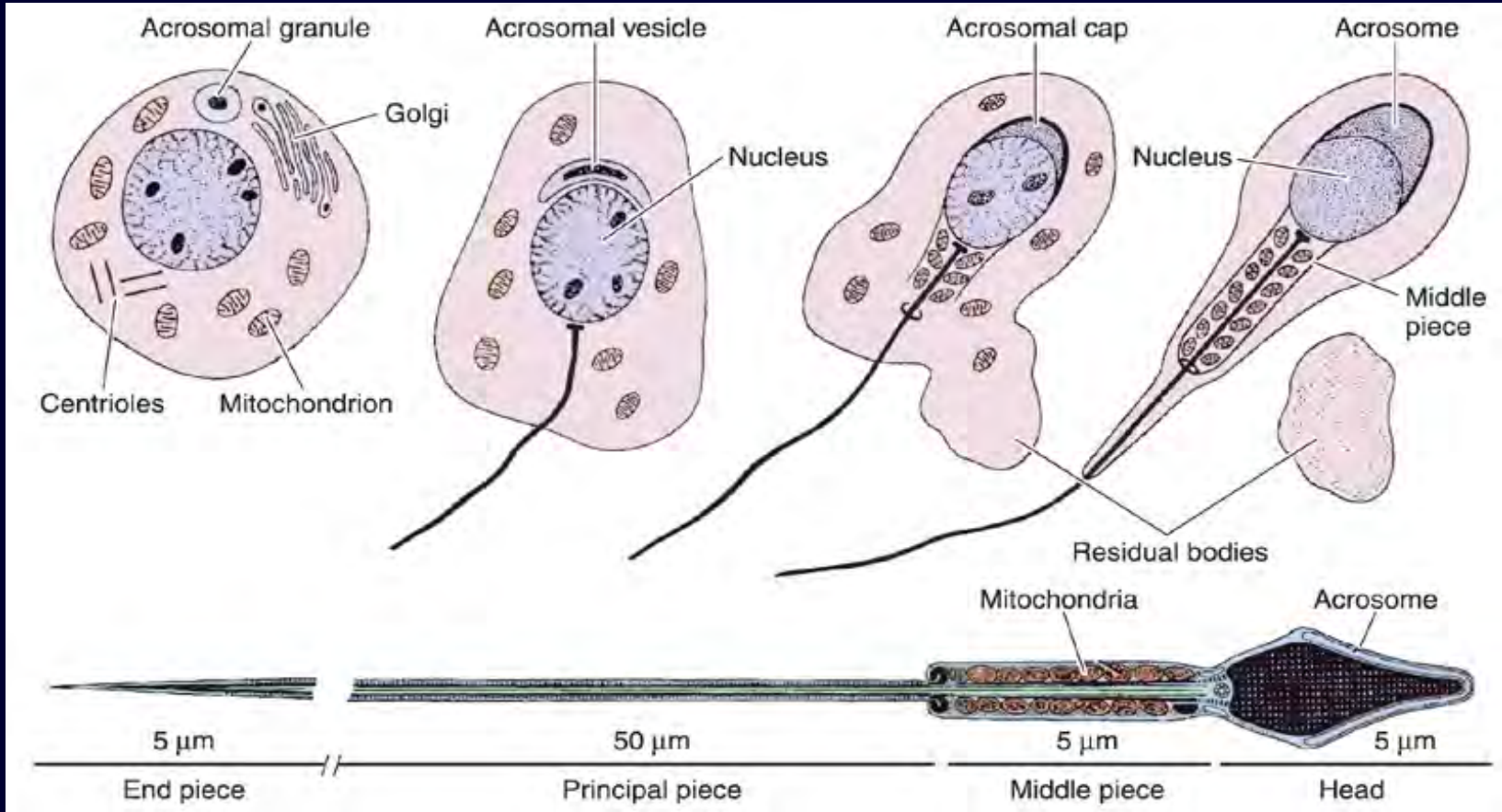
1 spermatogonie →

→ 4 haploidní rovnocenné spermie

# Průběh spermatogeneze



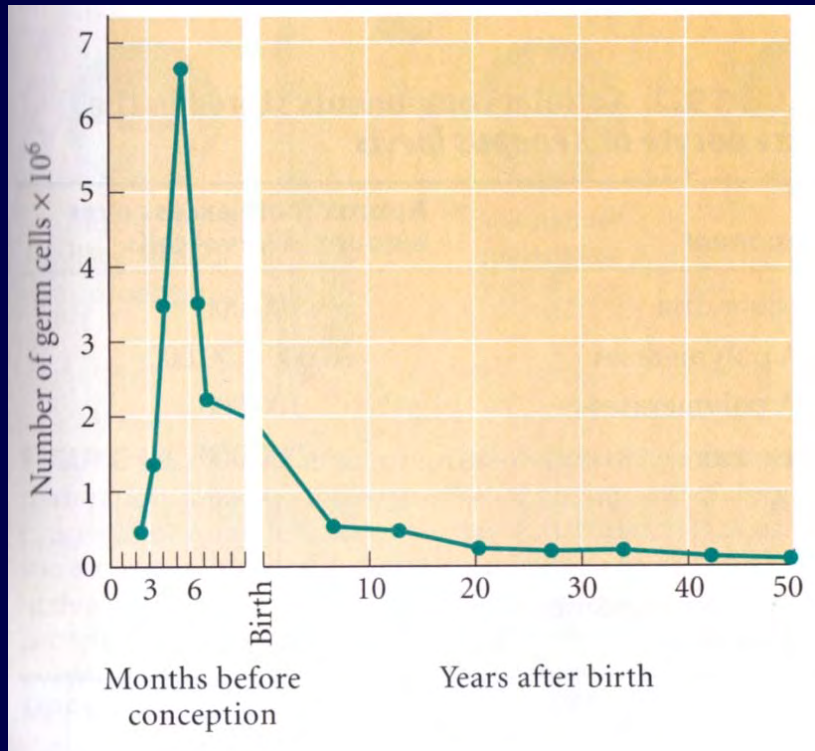
# Morfologie spermie



# GAMETOGENEZE: OOGENEZE

- **primordiální zárodečná buňka**  
(46, mitotické dělení)
- **oogonium**  
(46, mitóza, ve 3.měsíci po oplození vývoj v oocyty)

počet zárodečných  
buněk v ovariu  
během života





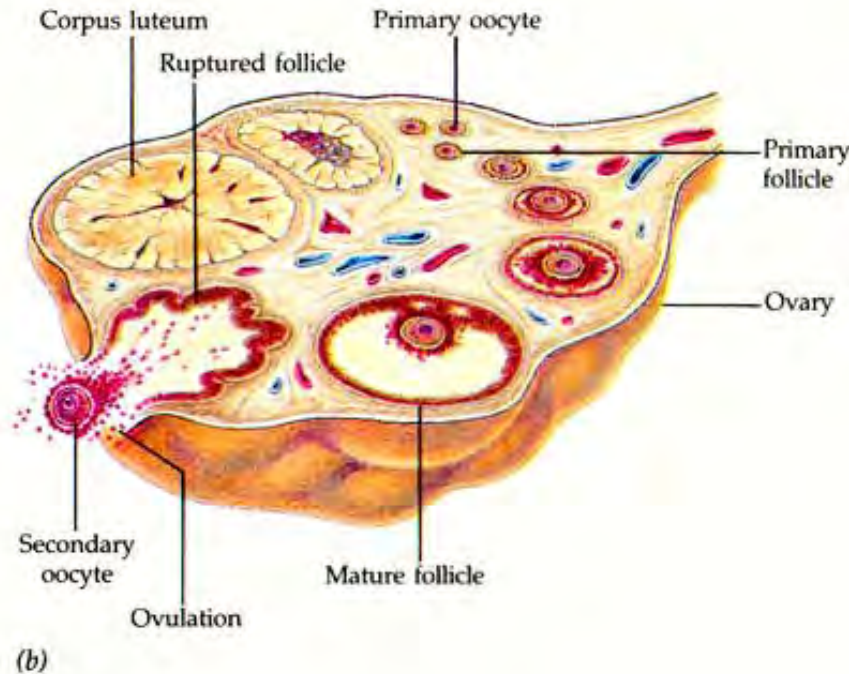
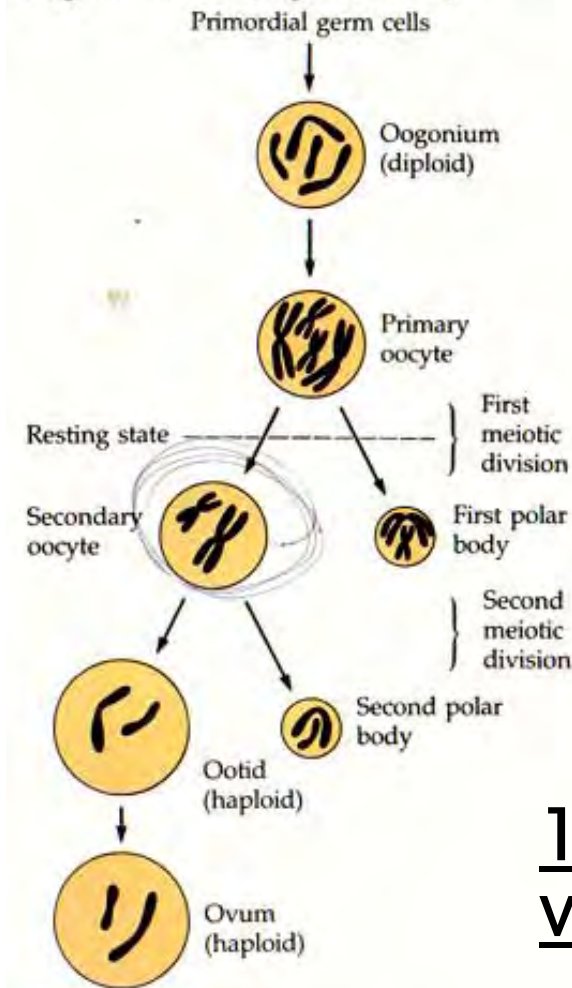
# GAMETOGENEZE: OOGENEZE

- **oocyt I. řádu**  
(46, začne meióza I, zastavení v profázi ještě před narozením, při dozrívání se dělicí vřeténko přesunuje k periferii buňky – nerovnoměrné dělení)
- **oocyt II. řádu (+ pólócyt)**  
(23, vstupuje do meiózy II, zastavení v metafázi II.)
- **ovum (+ pólócyt)**  
(23, meióza dokončena v případě oplození)



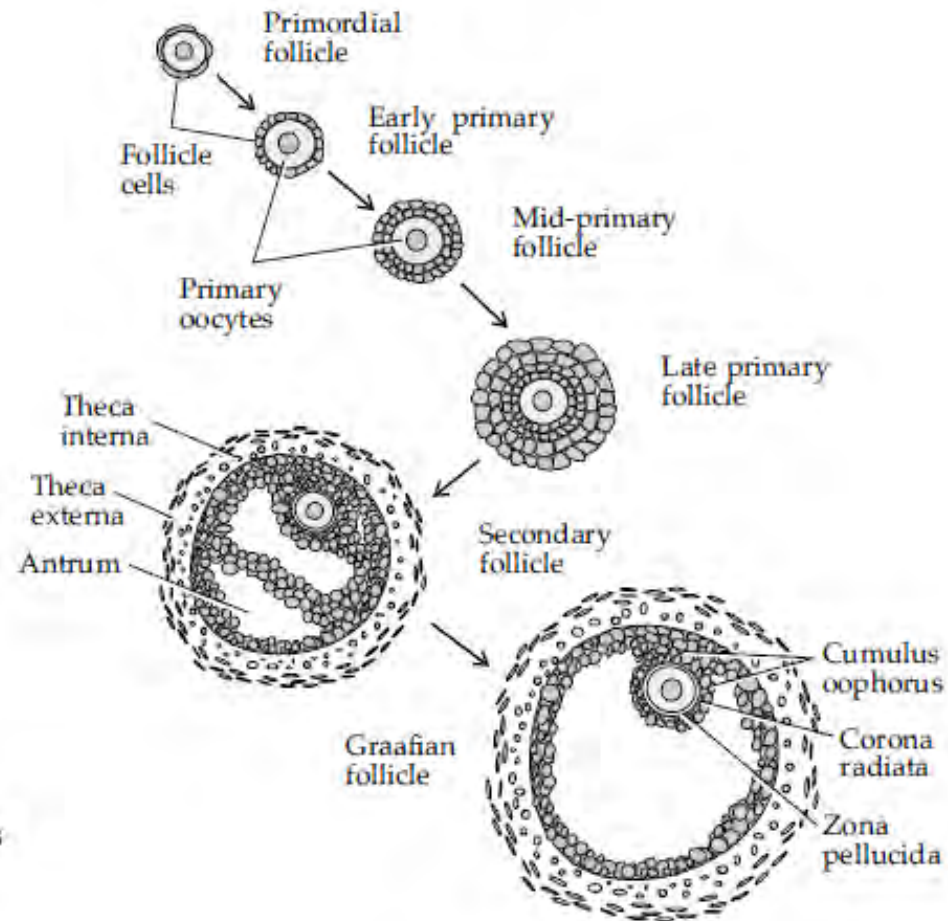
# Průběh oogeneze

## Oogenesis (Figure 42.14)



1 oogonium → 1 zralé vajíčko + 2-3 pólocyty

# Stádia folikulu

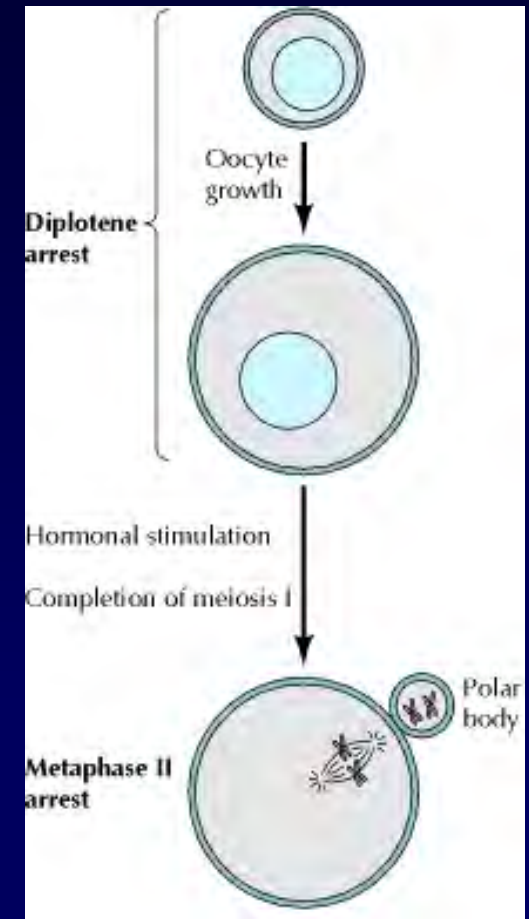


**Figure 5.6**  
Schematic diagram of stages  
in follicle development.

# REGULACE OOGENEZE

## 1. regulační bod = diplotene meiózy I

- dlouhodobé zablokování buněčného cyklu (u člověka až 50 let); u některých živočišných druhů až do fertilizace
- dekondezace chromosomů, počet =  $4n$
- transkripční aktivita → akumulace materiálu pro časnou embryogenezi, růst oocytu

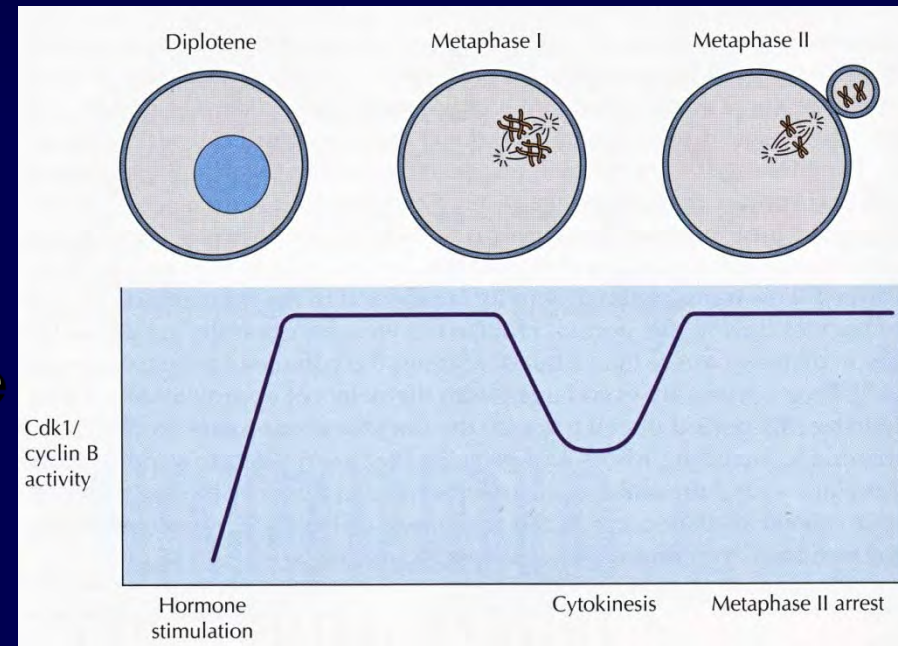




# REGULACE OOGENEZE

## 1. regulační bod = diplotene meiózy I

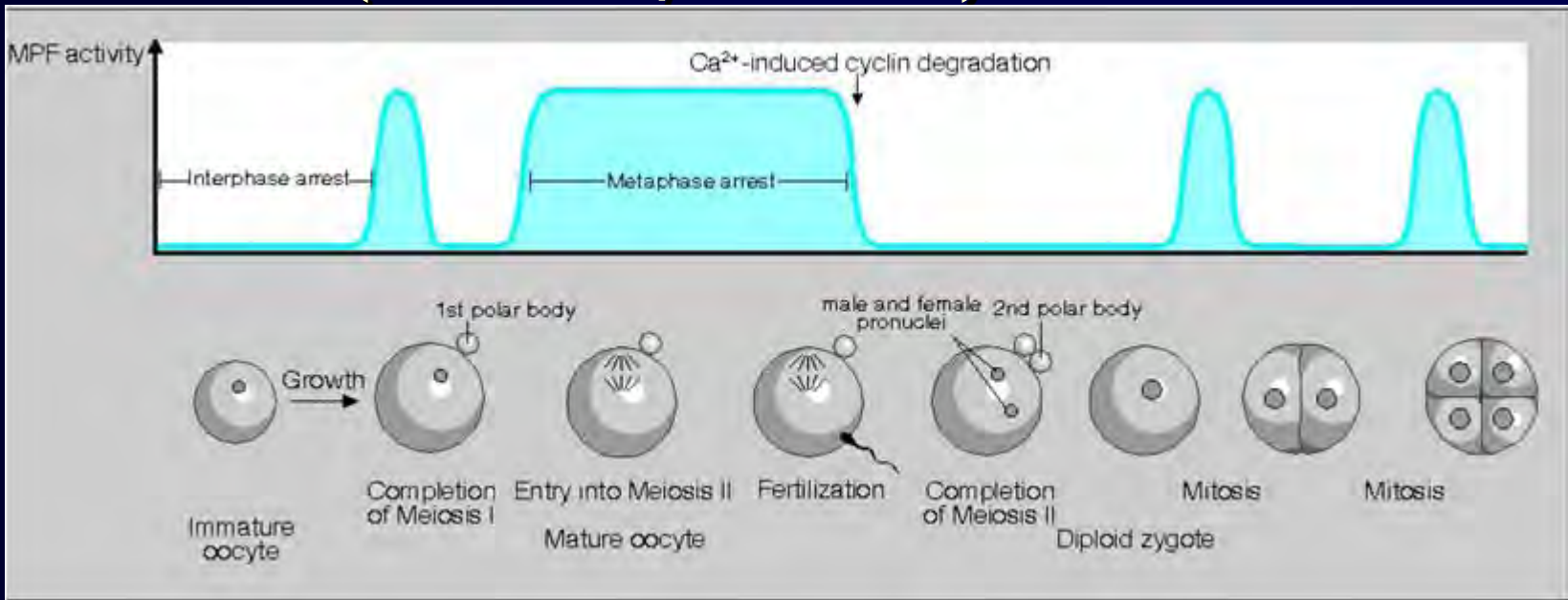
- hormonální stimulace (LH) → Cdk1/cyklin B (MPF = maturation promoting factor) → kondenzace chromosomů, rozpad jaderné membrány, formování spindlu
- anaphase - promoting complex → spouští anafázi
- pouze částečná deaktivace Cdk1 přetrvávající M-fáze (kondenzovaný chromatin, bez jaderné membrány)



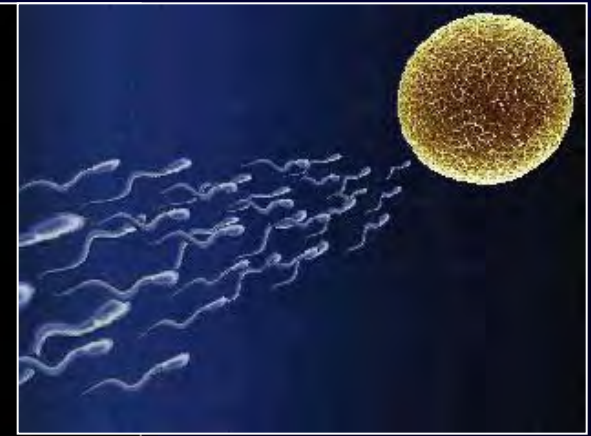
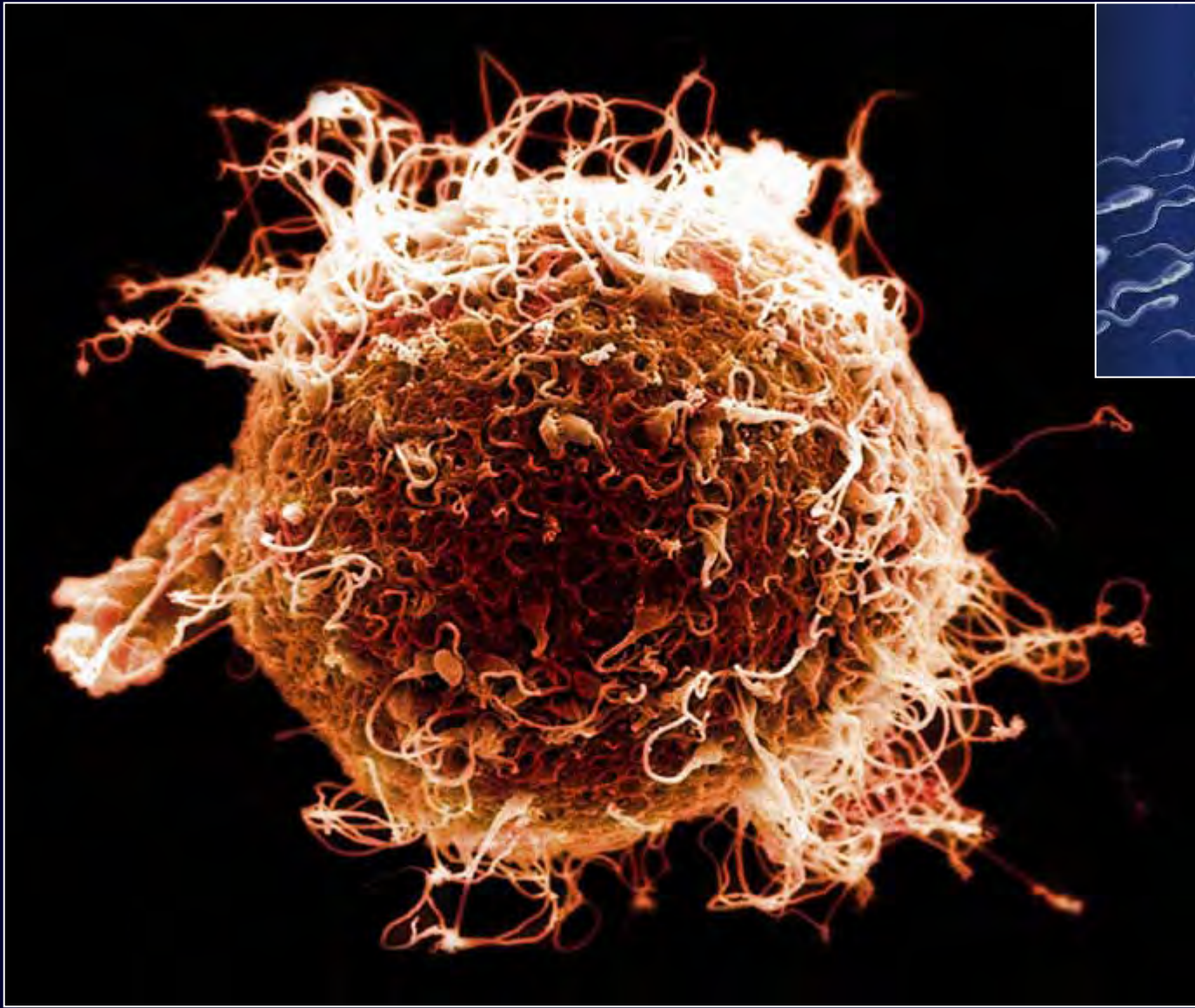
# REGULACE OOGENEZE

## 2. regulační bod = metafáze meiózy II

- u většiny obratlovců až do fertilizace
- po cytokinezi I.meiózy - zvýšení aktivity MPF
- anaphase-promoting komplex syntetizován až po fertilizaci (do té doby blokován)



# MECHANISMY FERTILIZACE





## Kapacitace

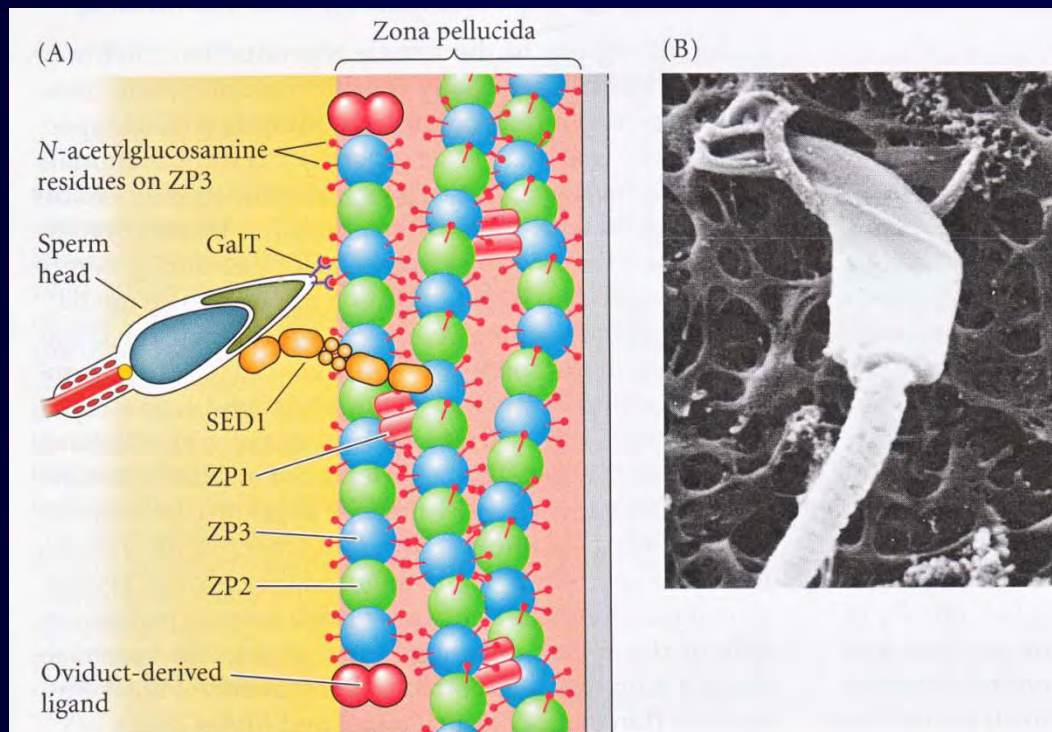
- 5-6 hodin (člověk)
- změny lipidů a glykoproteinů plazmatické membrány (ztráta cholesterou → zvýšení fluidity)
- změna membránového potenciálu (efflux  $K^+$ )
- **influx  $Ca^{2+}$  a  $HCO_3^-$**  → aktivace **adenylátcyklázy** → syntéza **cAMP** → indukce kapacitace
- zvýšení metabolismu a pohyblivosti spermie

## Kontakt spermie a oocyty

- 300 miliónů spermií v ejakulátu → 200 spermií v místě fertilizace ve vejcovodu
- **termotaxe**, změna teploty až o  $+2^\circ C$
- **chemoatraktanty** uvolňované folikulárními buňkami

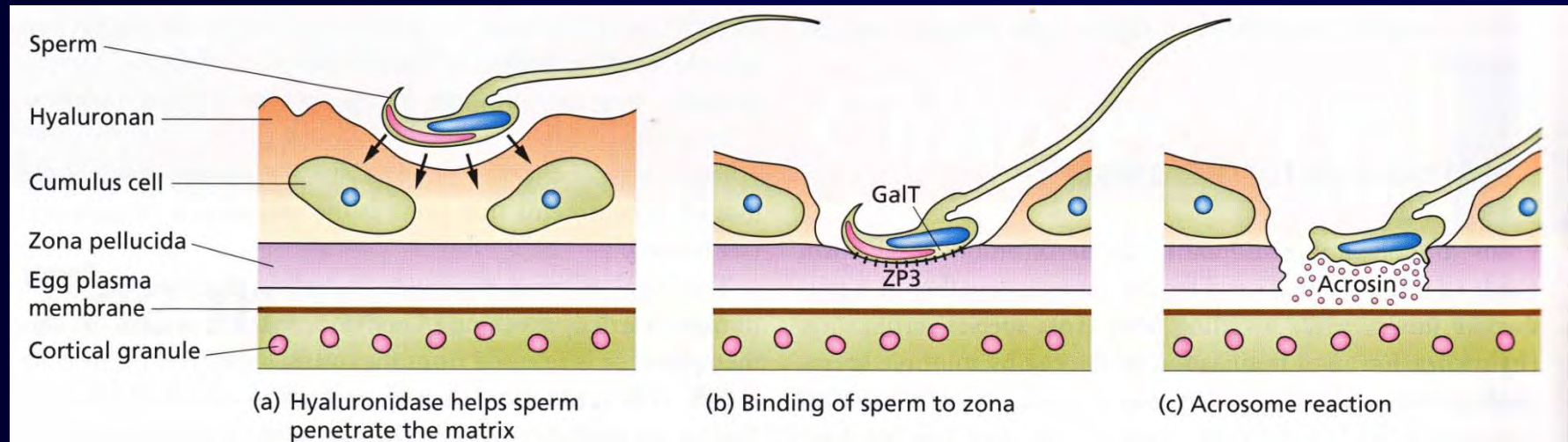
# Zona pellucida

- extracelulární matrix oocyty (specifické složení)
- 3 typy glykoproteinů (ZP2+ZP3, ZP1)
- bariéra mezidruhové fertilizace
- **ZP3** - receptor druhově specifické vazby, na něj se váže **GalT** (galaktosyl transferáza) spermie

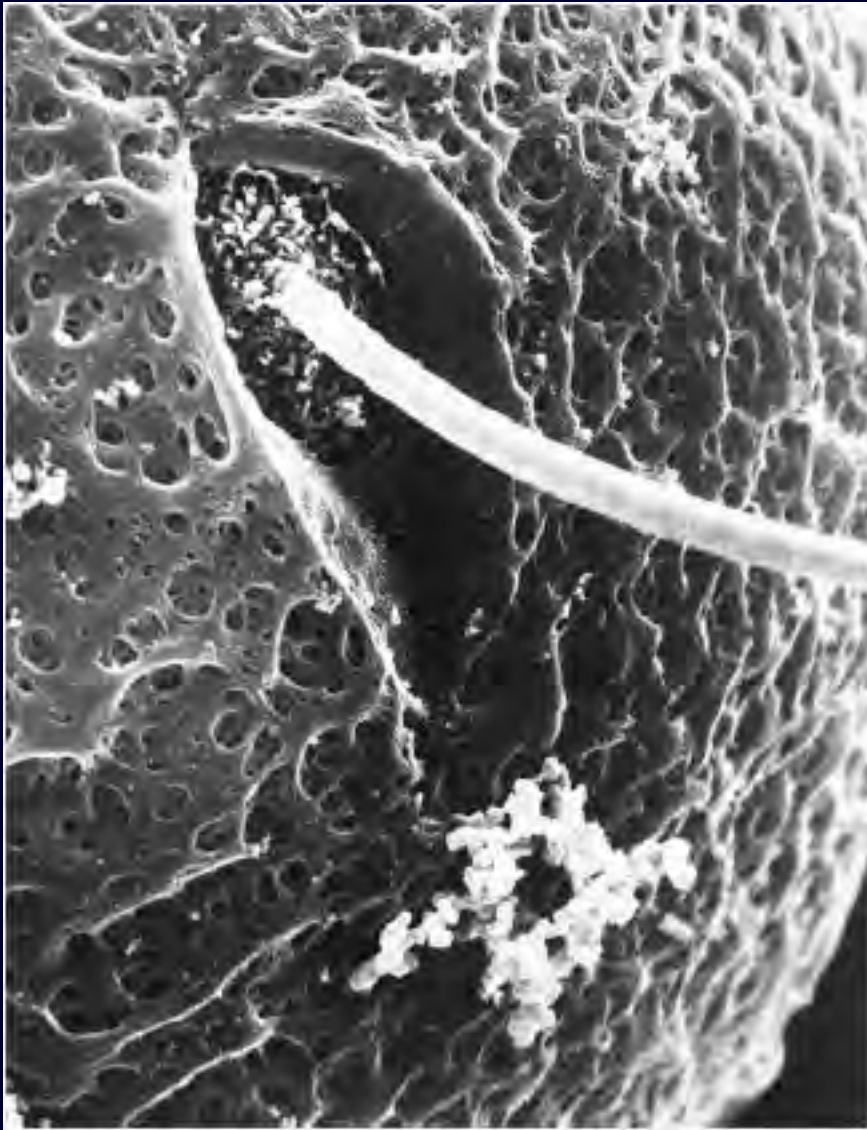


# Akrosomální reakce

- obsah akrosomu uvolněn exocytózou
- **vazba na ZP3** - indukuje zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě spermií → exocytóza
- **hydrolytické enzymy** → průchod zónou pellucidou
- vazba proteinů vnitřní akrosomální membrány spermie na ZP2



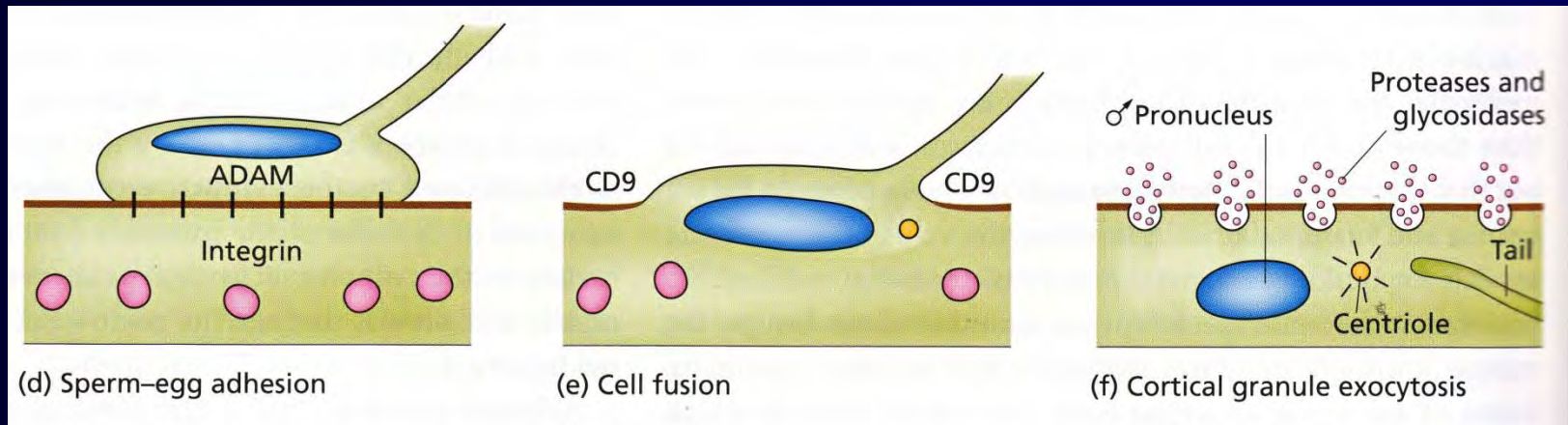




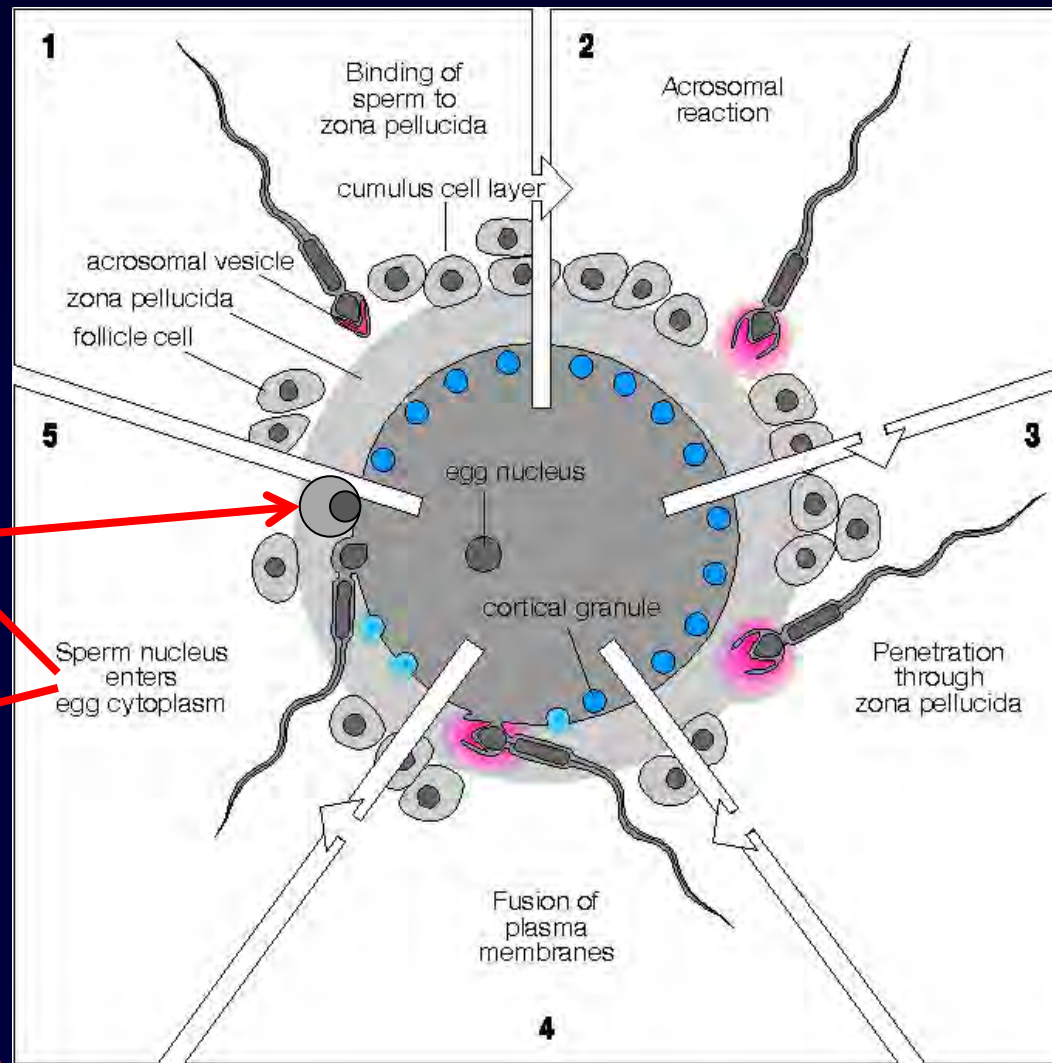


# Mechanismus fúze spermie a oocytu

- u většiny druhů nejasný
- u myši: vazba proteinů **ADAM** na **integriny** oocytu
- **Fertiliny** ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) – patří do skupiny ADAM, transmembránové proteiny spermií s vazebnou doménou pro integriny oocytu
- **CD9** nutný pro fúzi plazmatických membrán
- po fúzi exocytóza **kortikálních granulí**

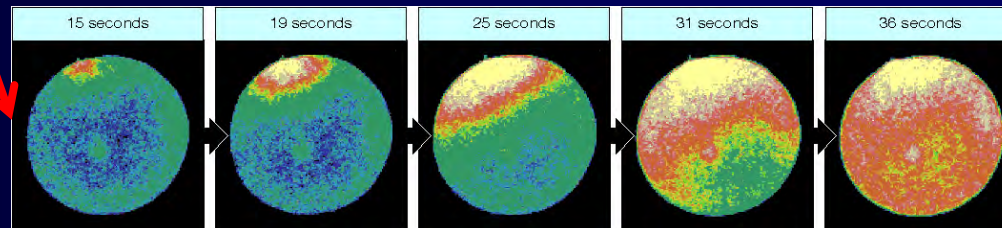


# Průběh fertilizace



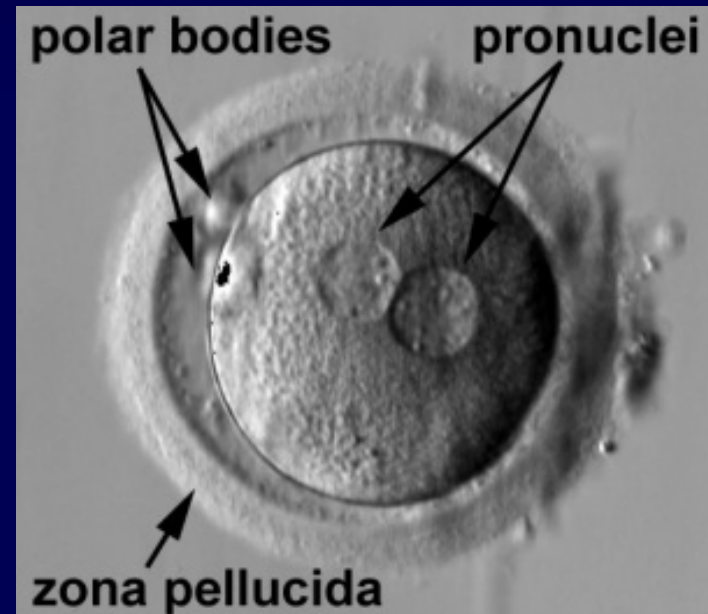
vznik polárního tělíska

změna konc.  $\text{Ca}^{2+}$



# Fúze prvojader

- u nižších živočichů ihned po fúzi gamet
  - u savců pouze prostorové přiblížení prvojader
  - dekondezace chromatinu, replikace DNA
  - přiblížení prvojader pomocí MT z centriolu spermie
  - rozpad jaderných membrán až při prvním mitotickém dělení zygoty
  - navázání chromozomů na spindl tvořený z centriolu spermie
- spermie



# Mechanismy blokující polyspermii

- **primární blok:**  
depolarizace plazmatické membrány oocyty po fúzi s první spermii
- **sekundární blok - kortikální reakce oocyty:**  
uvolnění obsahu kortikálních granulí → enzymy měnící vlastnosti zony pellucidy (štěpení ZP2, hydrolýza cukerných zbytků na ZP3)
- intracelulární zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$   
(vede k dokončení II. meiotického dělení)

## Důsledky polyspermie:

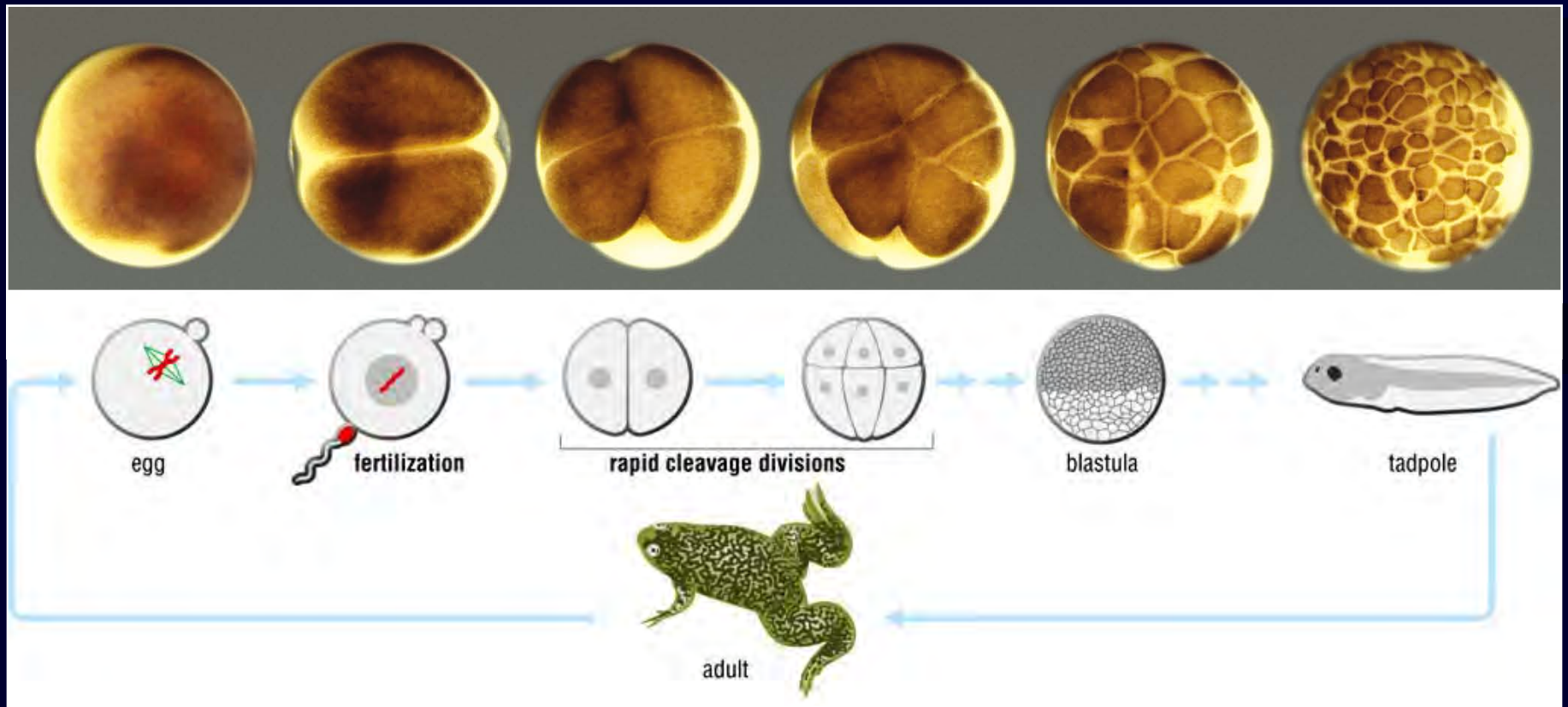
více centriolů → multipolární spindl → porucha segregace chromosomů → nondisjunkce → aneuploidie → zástava vývoje

# ČASNÁ EMBRYOGENEZE



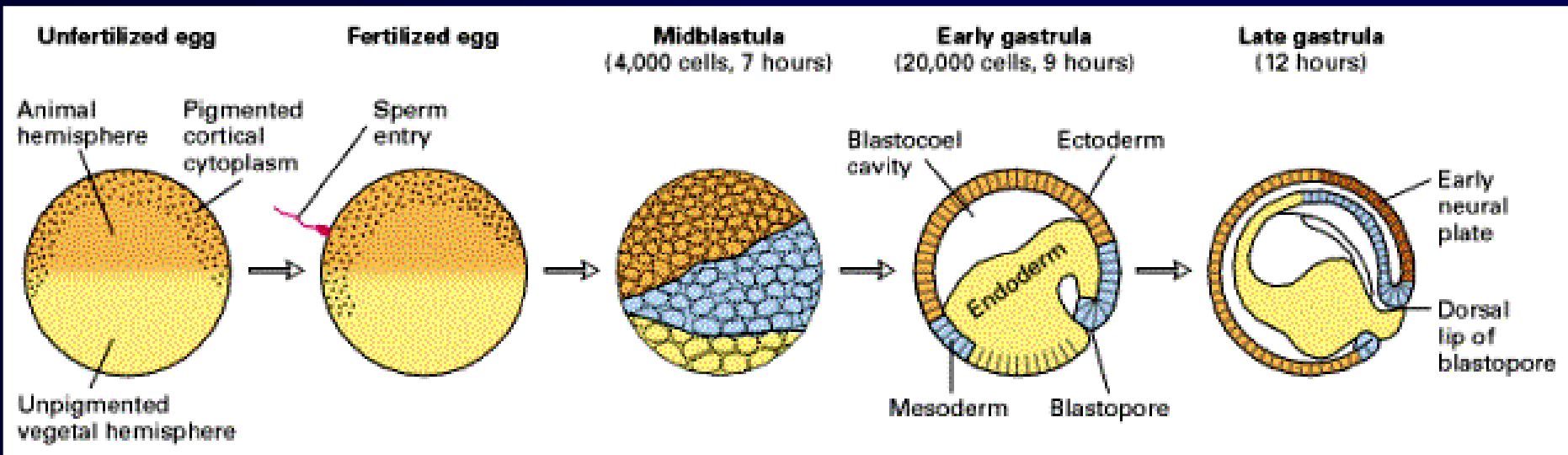
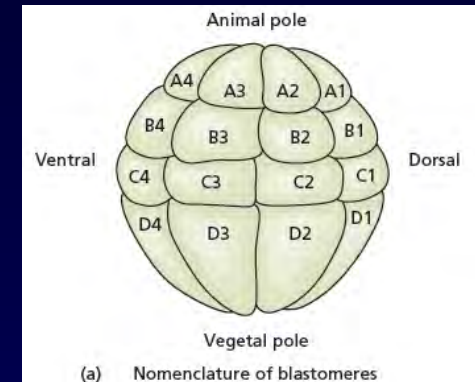
# Časná embryogeneze u obojživelníků:

- velmi krátký buněčný cyklus (30 min)
- zmenšování objemu dceřinných buněk



# Časná embryogeneze u obojživelníků:

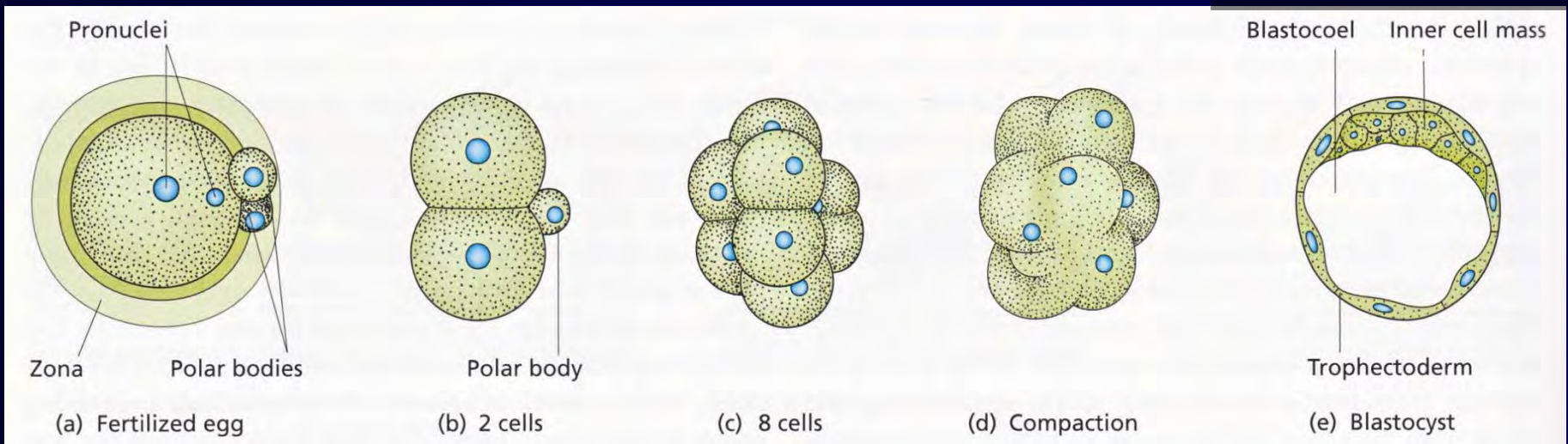
- 3 fáze vývoje: rýhování, gastrulace, neurulace
- celkem 24h
- 1. a 2. dělení vertikálně, 3. ekvatoriálně
- 5. dělení = 32 buněk = blastula
- 12. dělení =  $\pm 4000$  buněk = midblastula
- dělení už nejsou synchronizována, zpomalují se





# Časná embryogeneze u savců:

- zygota – 1. dělení po 24h, 2. a 3. po dalších 12h
- vznik blastomer
- morula - do 32 buněk
- blastocysta – od 64 buněk,  
trofoektoderm (3/4), inner cell mass  
= ICM (1/4), blastocoel, zona pelucida

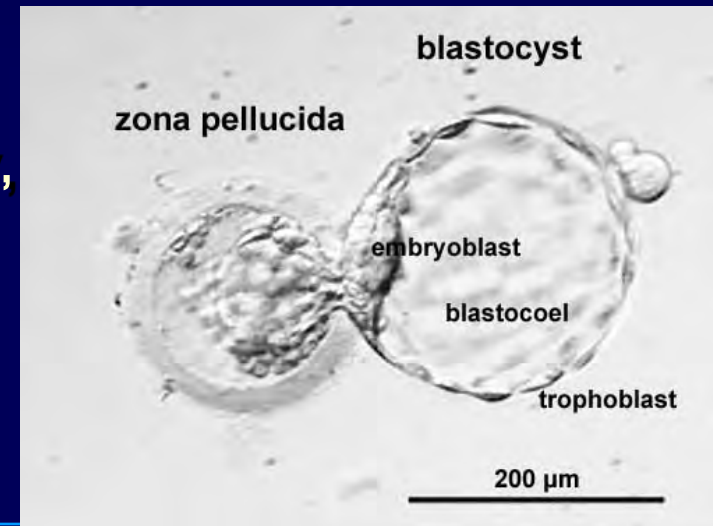


# Gustav Klimt – Danae (1908)

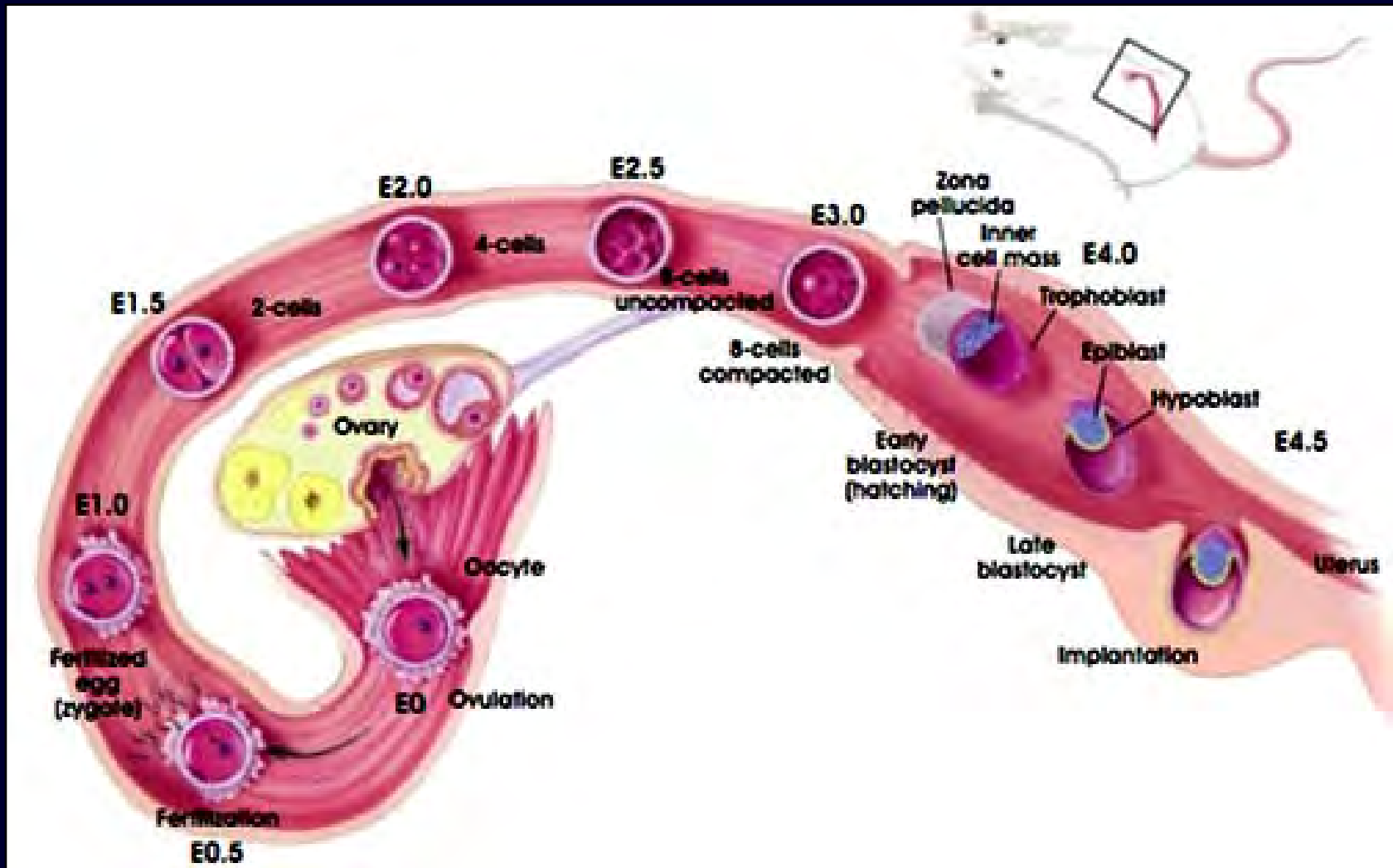


## Časná embryogeneze u savců:

- diferenciace trofoektodermu
  - a) polární část – přiléhá k ECM, proliferuje
  - b) murální část – kolem blastocoelu, velké polyploidní b.
- diferenciace ECM
  - a) epiblast – základ pro 3 zárodečné vrstvy
  - b) hypoblast – extraembryonální tkáň
- **Hatching** – opuštění zony pelucidy, v děloze, proteolytické enzymy produkované trofoblastem

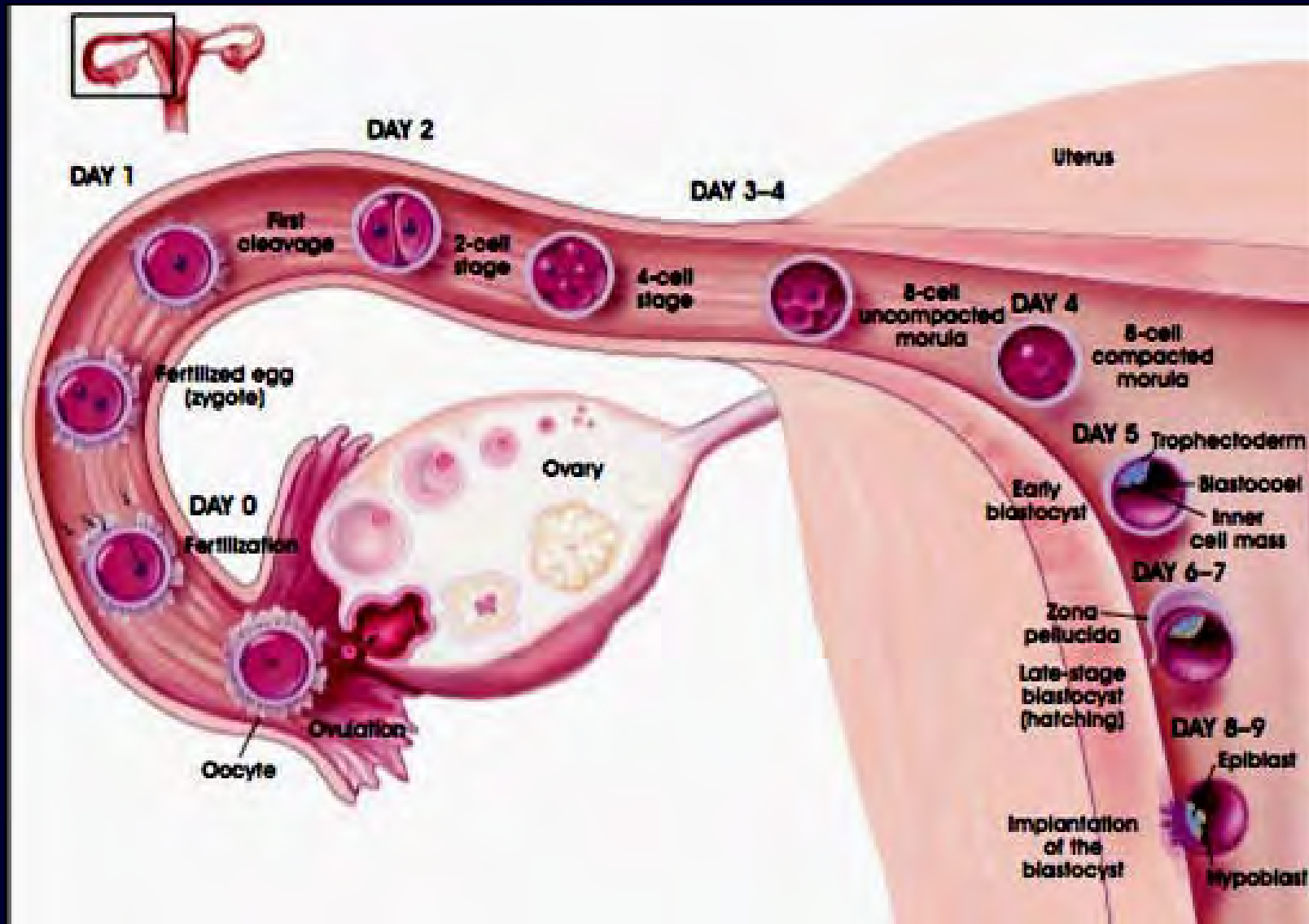


# Průběh časně embryogeneze u myši



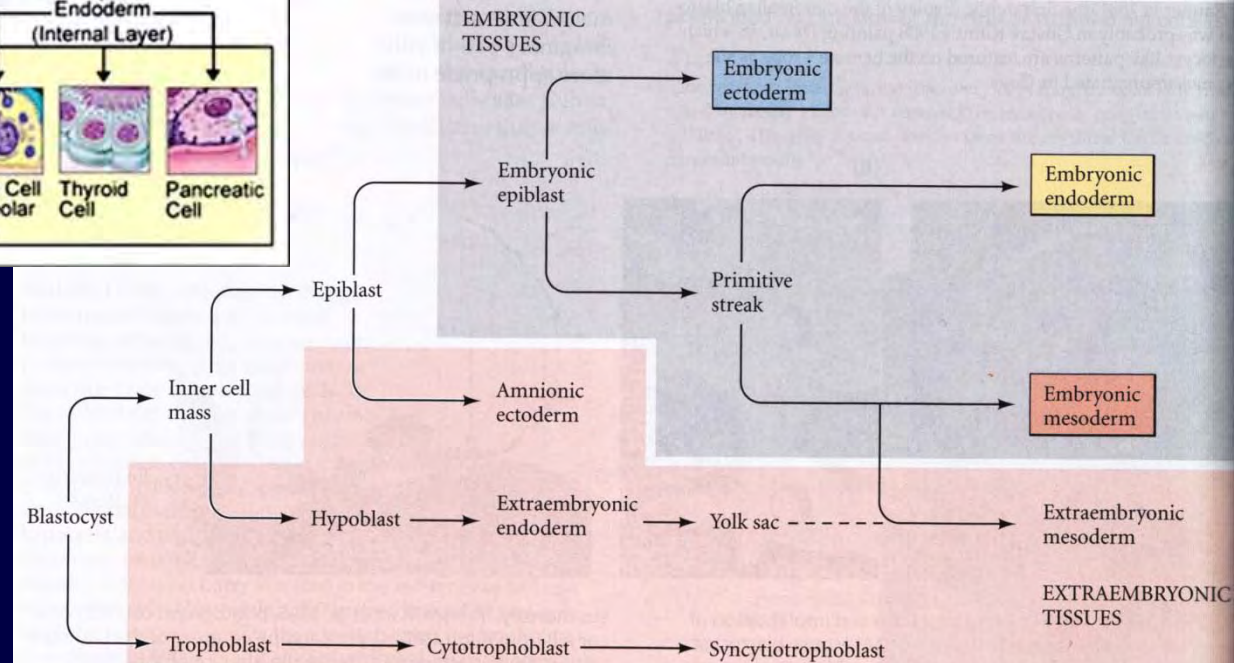
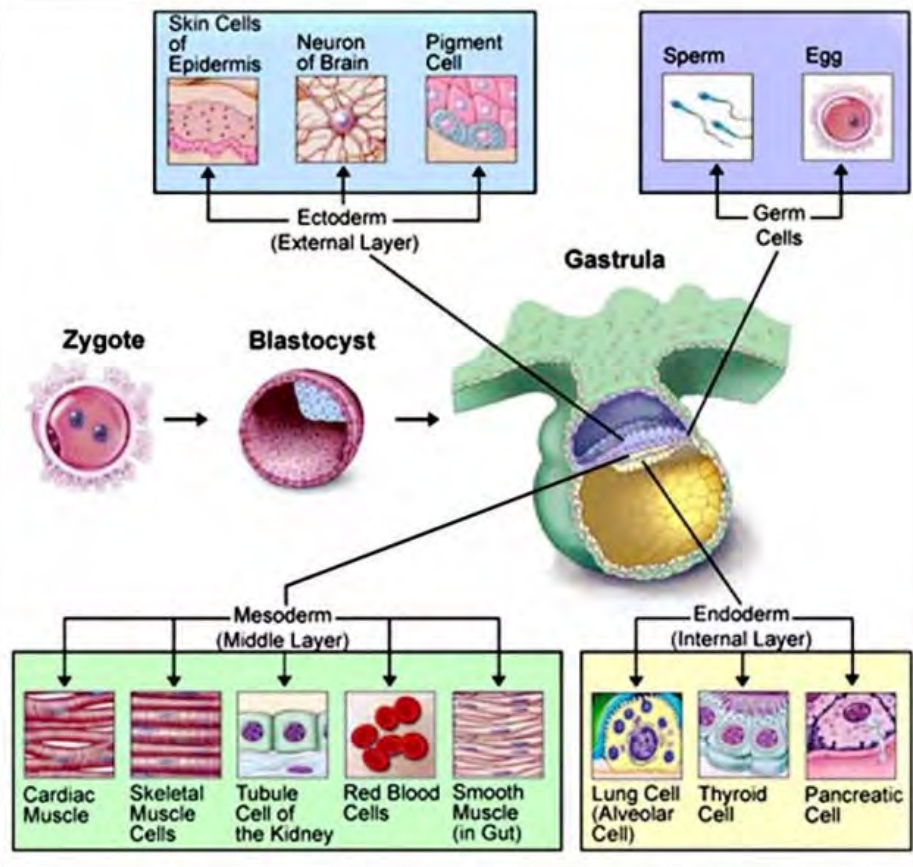


# Průběh časně embryogeneze u člověka



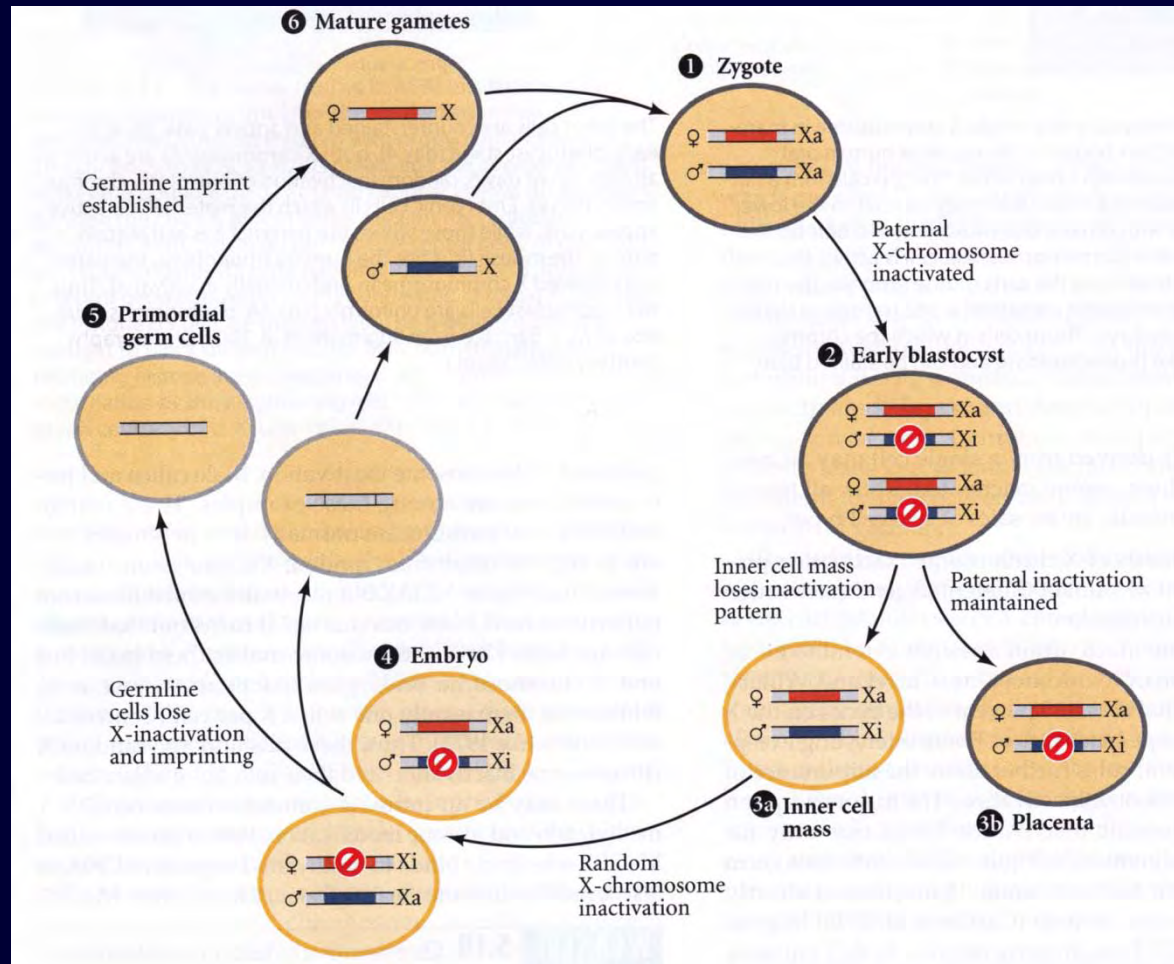


# Tvorba a umístění zárodečných listů u lidského embrya



# Inaktivace chromozomu X

- v časně blastocystě inaktivace paternálního X
- zůstává inaktivován v extraembryonálních tkáních
- v ICM se inaktivace ztrácí - později náhodná inaktivace



# TVORBA HYBRIDŮ A CHIMÉR

# HYBRID

- z genetického pohledu  
potomek vzniklý pohlavním rozmnožováním dvou odlišných homozygotů stejného druhu => heterozygot
- z taxonomického pohledu  
potomek vzniklý z křížení mezi 2 jedinci odlišného taxonu
  - v rámci druhu (poddruhy)-tygr bengálský x sibiřský
  - mezi druhy - tygr x lev
  - mezi rody - ovce x koza
  - mezi čeleděmi - výjimečně
  - mezi řády - u živočichů není známo



# MEZIDRUHOVÝ HYBRID

- křížení v rámci rodu
- potomek fenotypově podobný rodičům
- často infertilní (různý počet chromosomů)
- odlišnosti v námluvních rituálech, páření a chování
- jiná sezóna páření
- antigenní reakce na spermie

**mul, mezek** (63 chr.)  
osel (62 chr.) x kůň (64 chr.)



klisna x osel



oslice x hřebec

## zeedonk, zonkey

osel (62 chr.) x zebra (32- 46 chr.)





# liger, tigon

lev (38 chr.) x tygr (38 chr.)





# MEZIRODOVÝ HYBRID

- křížení odlišných rodů
- přirozeně výjimečný výskyt (Toast of Botswana)
- možnost (nutnost) asistované inseminace (cama)

**„Toast of Botswana“** (57 chr.) r.2000  
ovce (54 chr.) x koza (60 chr.)  
odliš Geep = chiméra



**cama**

velbloud (74 chr.) x lama (74 chr.)



# CHIMÉRA

řecky Χίμαιρα (Chímaira); latinsky *Chimaera*





# CHIMÉRA

organismus obsahující alespoň 2 geneticky odlišné buněčné populace původem z odlišných zygot

## Vznik:

- ze 4 buněk- dvě zygoty (tetragametická ch.)
- ze 3 buněk – (partenogenetická ch.)
- transplantací kostní dřeně (přenos kmenových buněk)
- spojením cévních oběhů (anastomózy) u dvojvaječných dvojčat
- z časného embrya a diploidních buněk (fúzí, injekcí)

# Tetragametický chimerismus

- vrožený chimerismus - u lidí výjimečně (běžné u primátů)
- spojením dvou zygot (časných embryí)
- riziko i při asistované reprodukci
- organismus obsahuje dvě odlišné sady chromozomů
- orgány a tkáně mají jiný původ
- viditelné rozdíly: barva očí, vlasů, „Hitchhiker's thumb,„ (AR), Blaschkovy linie, pohlaví může být hermafroditní (46,XX/46,XY), 2 populace krvinek (imunologická tolerance obou skupin)

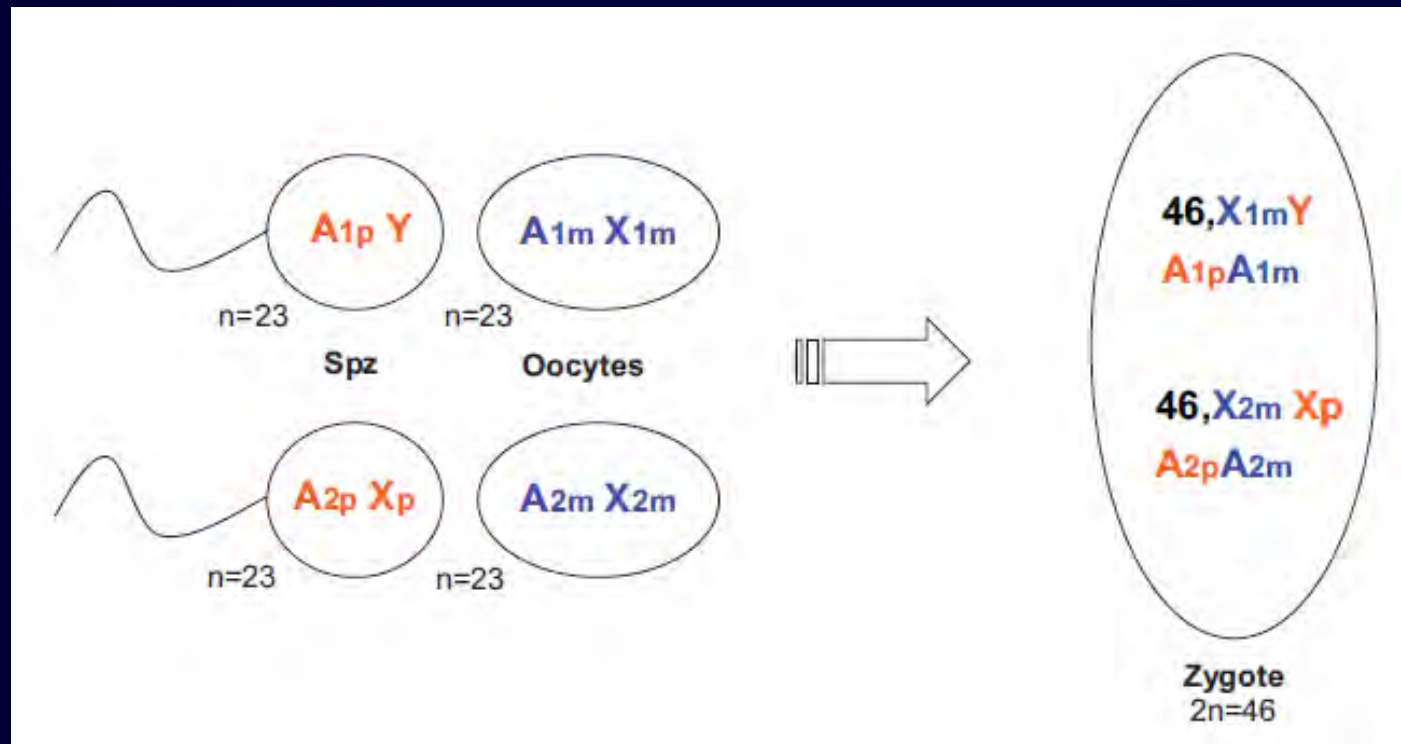
## Hitchhiker's thumb



## Blaschkovy linie



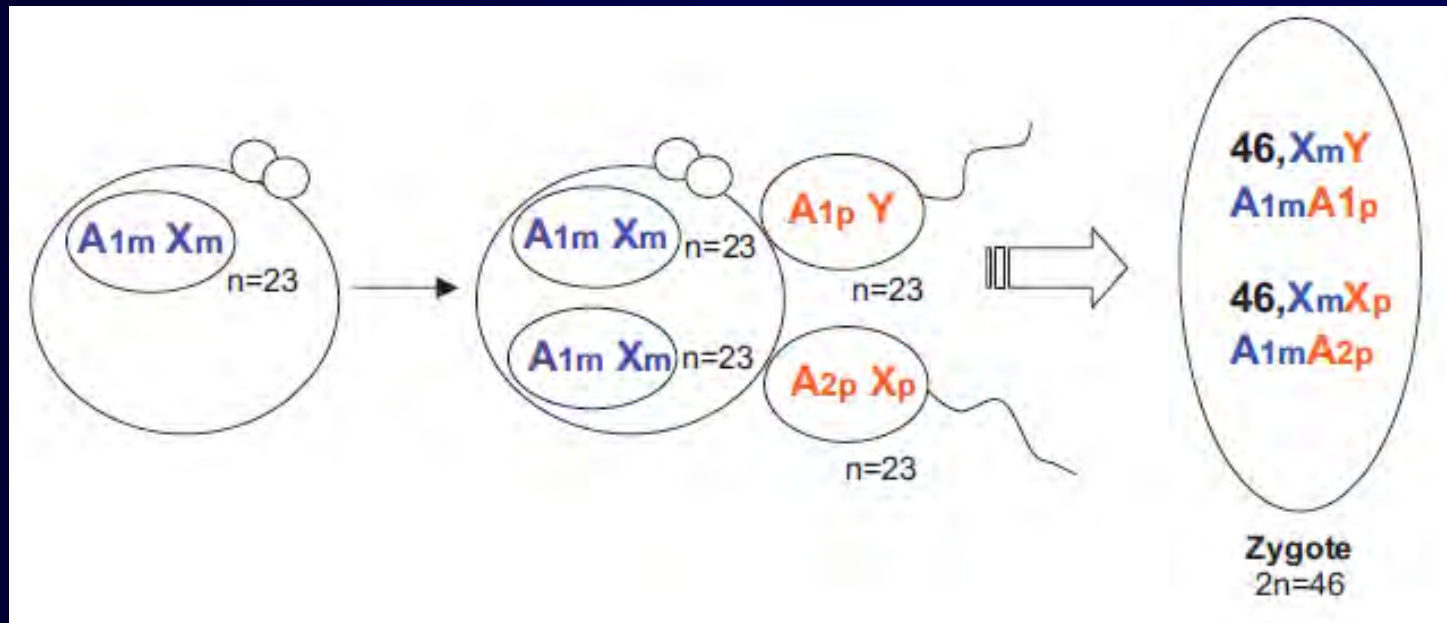
# Tetragametický chimerismus





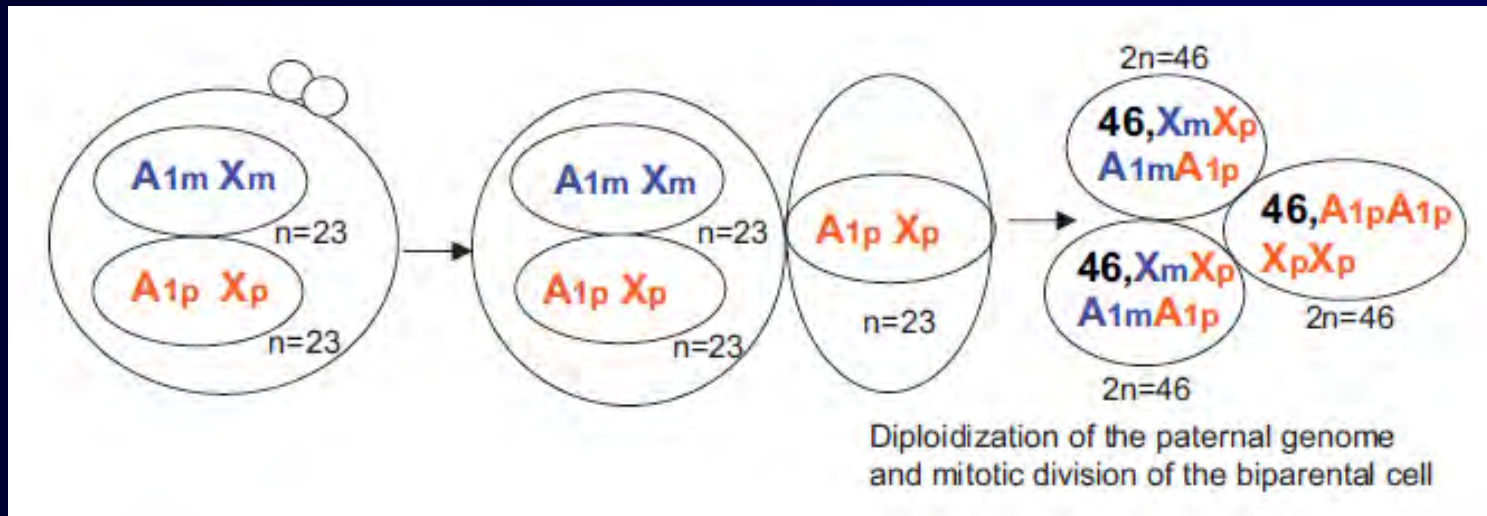
# Partenogenetický chimerismus

- oocyt podléhá partenogenezi a rozdělí se
- vznik 2 haploidních buněk
- oplozeny 2 spermii



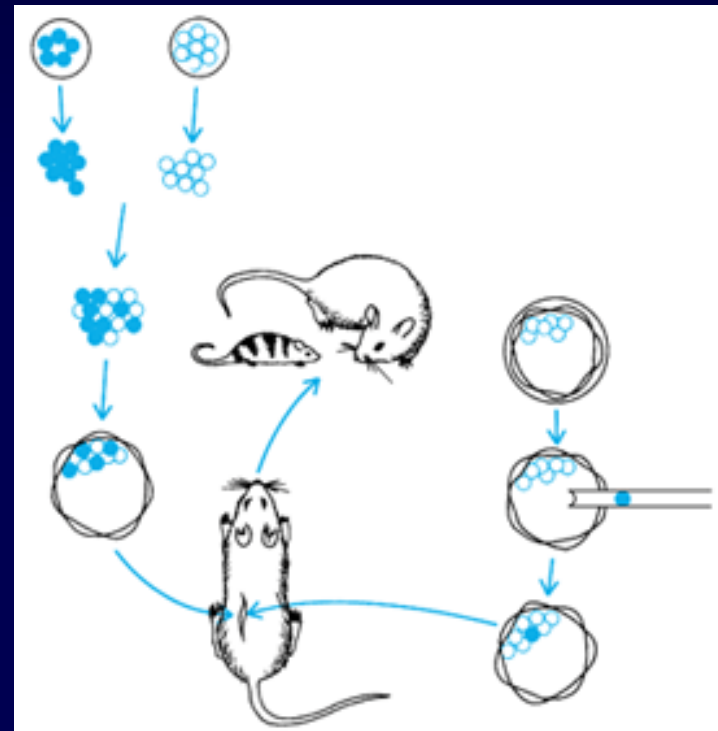
# Androgenetický chimerismus

- standardní fertilizace oocyty spermií (23,X)
- vznik sekundárního polárního tělíska
- endoreplikace parentálního prvojádra
- vznik 1 diploidní buňky (46,XX) a 1 haploidní (23,X)
- haploidní buňka podléhá endoreplikaci  
-> androgenetická linie



# VYUŽITÍ CHIMÉR VE VÝZKUMU

- studium vývoje savčího embryogeneze
- ověření podílu kmenových buněk na vývoji embrya
- tvorba „nových druhů“
- medicínský význam
- příprava - agregačně  
- injikačně



Embryo ↔ Embryo ES cells ↔ Embryo ES cells ↔ 4N embryo TS cells ↔ Embryo **Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development**

Patrick P. L. Tam<sup>1</sup> and Janet Rossant<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embryology Unit, Children's Medical Research Institute, University of Sydney, Westmead, New South Wales, Australia

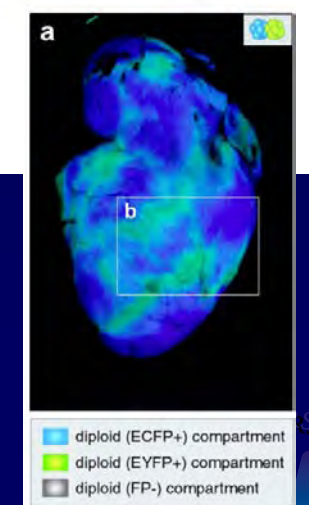
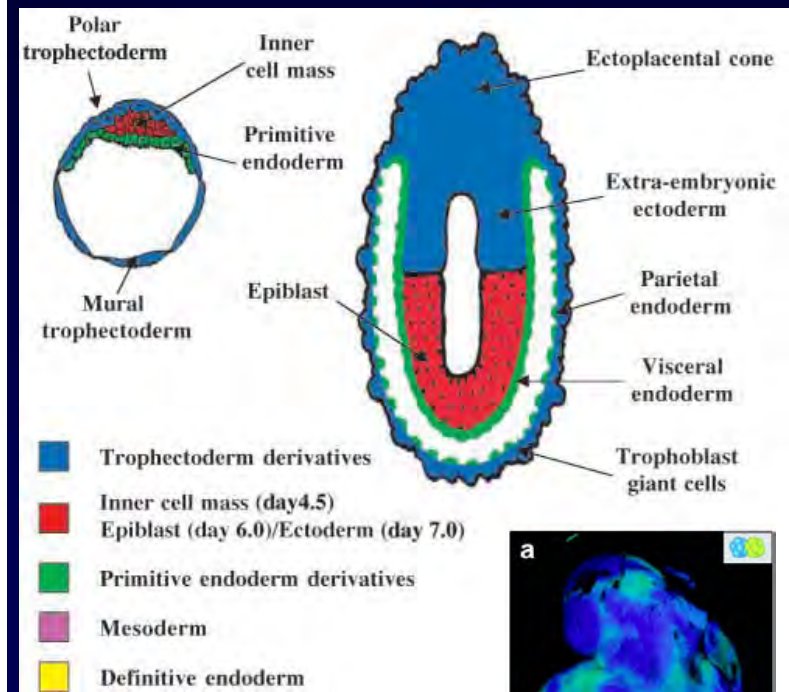
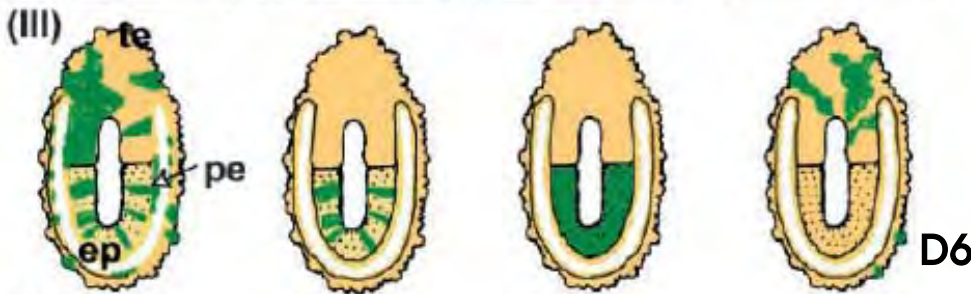
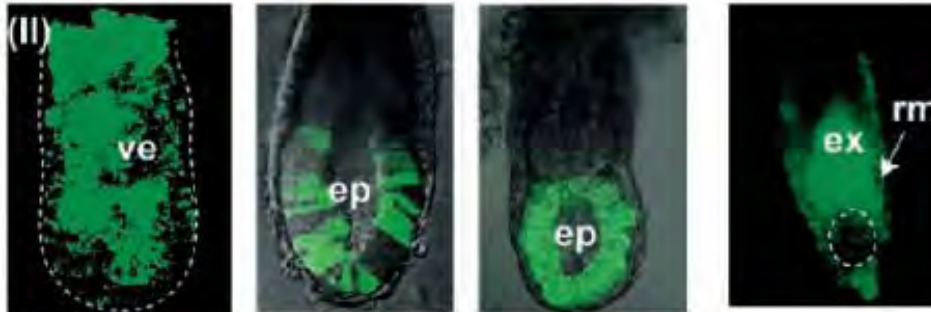
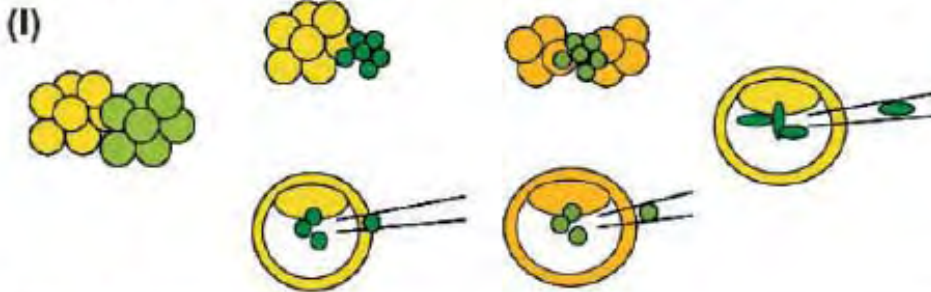
<sup>2</sup>Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

e-mail: ptam@cmri.usyd.edu.au and rossant@mshri.on.ca

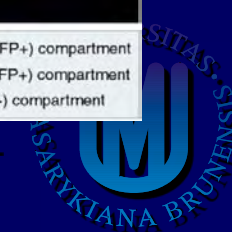
Development 130, 6155-6163

Published by The Company of Biologists 2003

doi:10.1242/dev.00893



srdce chimerické  
myši





## Original Article

*Leukemia* (2006) **20**, 857–869. doi:10.1038/sj.leu.2404171; published online 23 February 2006

# A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4<sup>+</sup>SSEA-1<sup>+</sup>Oct-4<sup>+</sup> stem cells identified in adult bone marrow

M Kucia<sup>1</sup>, R Reca<sup>1</sup>, F R Campbell<sup>1</sup>, E Zuba-Surma<sup>1</sup>, M Majka<sup>1</sup>, J Ratajczak<sup>1</sup> and M Z Ratajczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Biology Program at James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, KY, USA

Correspondence: Professor MZ Ratajczak, Stem Cell Biology Program, James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA. E-mail: [mzrata01@louisville.edu](mailto:mzrata01@louisville.edu)

Received 29 January 2006; Accepted 10 February 2006; Published online 23 February 2006.

počet: cca 0,02% BM MNC

definice: Sca-1<sup>+</sup> (stem cell antigen-marker HSC)

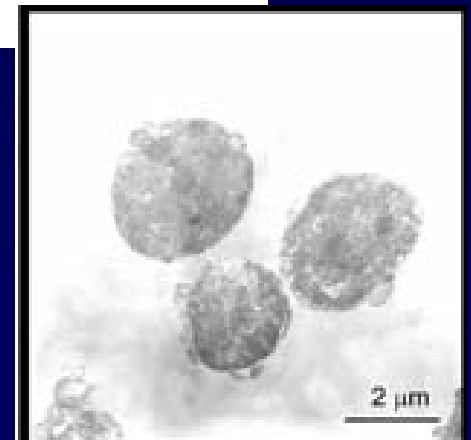
lin<sup>-</sup> (lineage-negative)

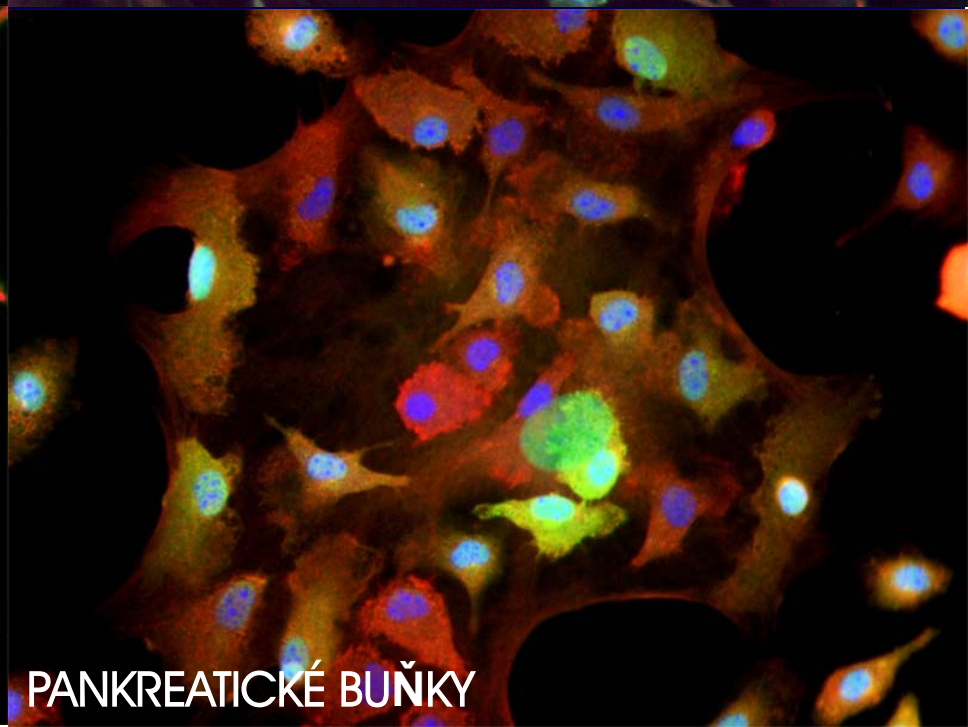
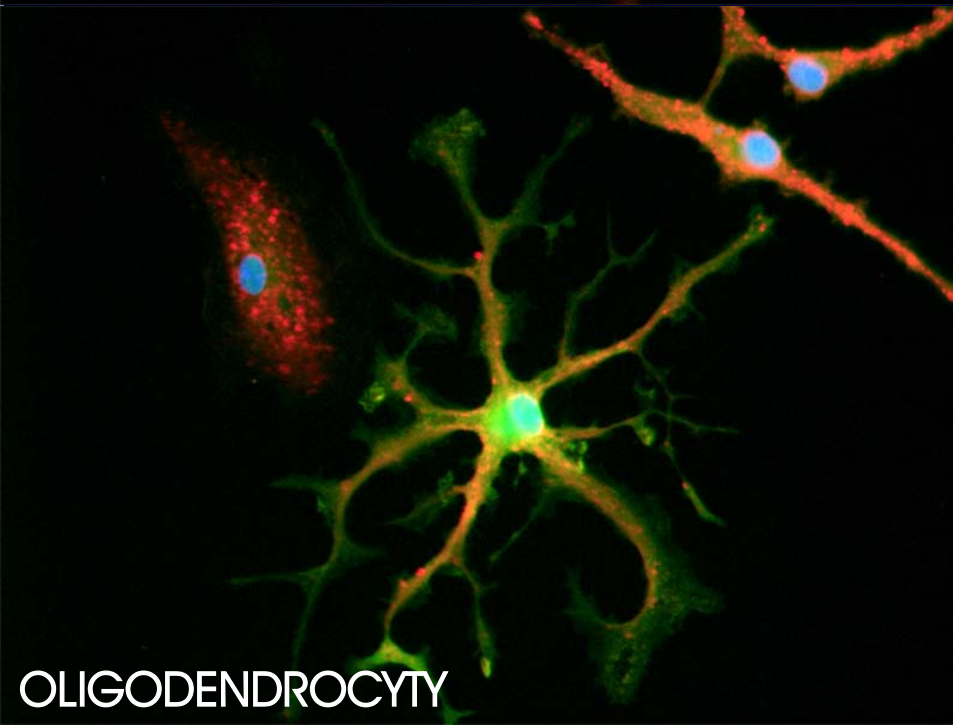
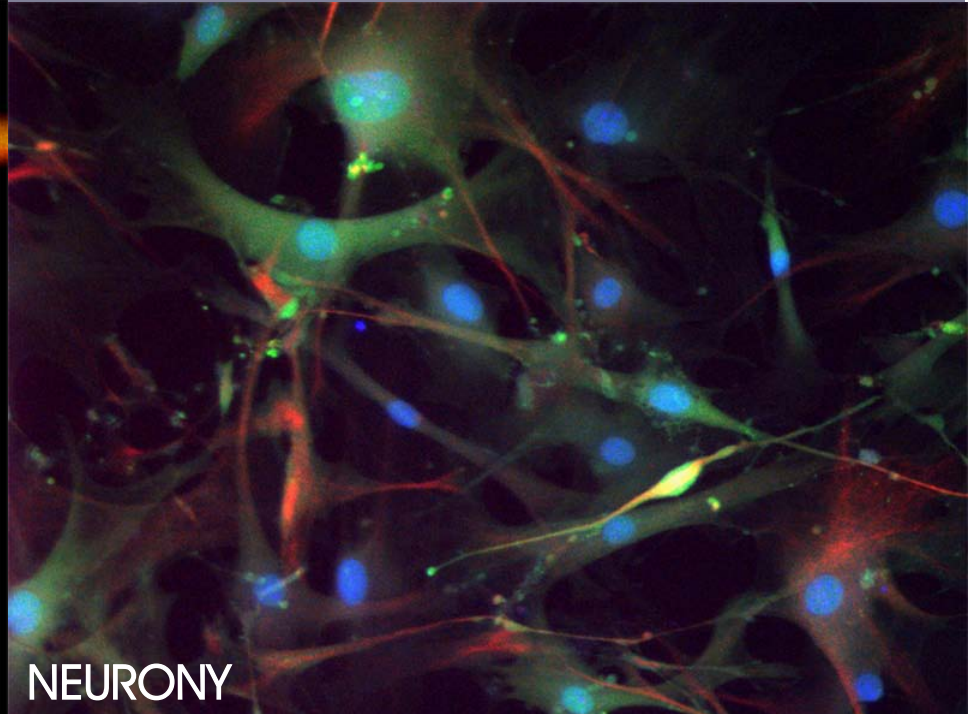
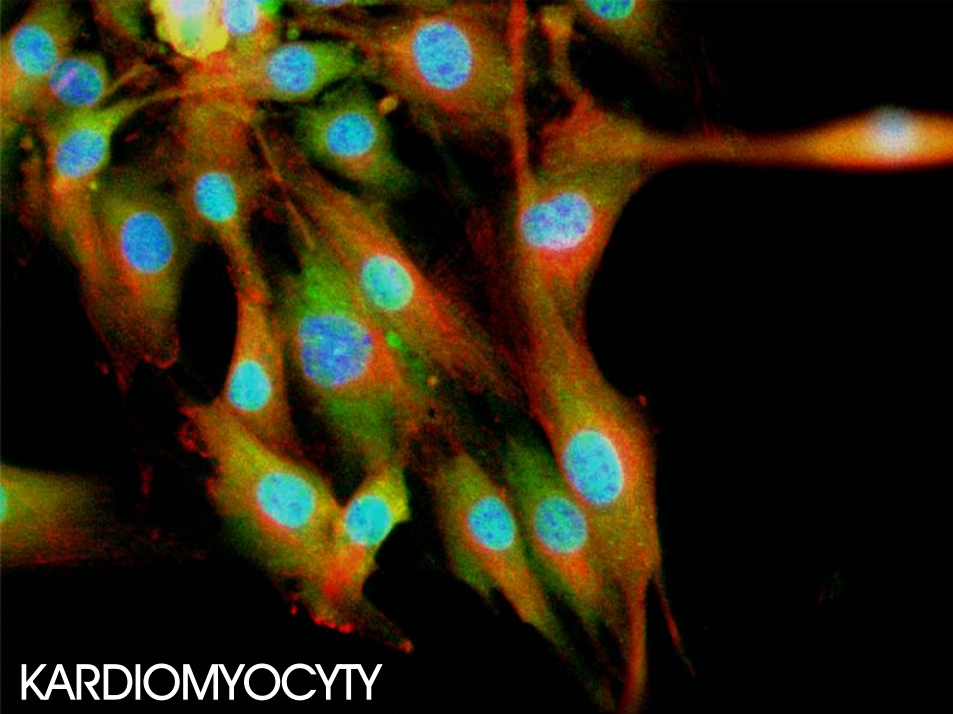
CD45<sup>-</sup> (Leukocyte Common Antigen)

exprimují: SSEA-1, Oct-4, Nanog, Rex-1

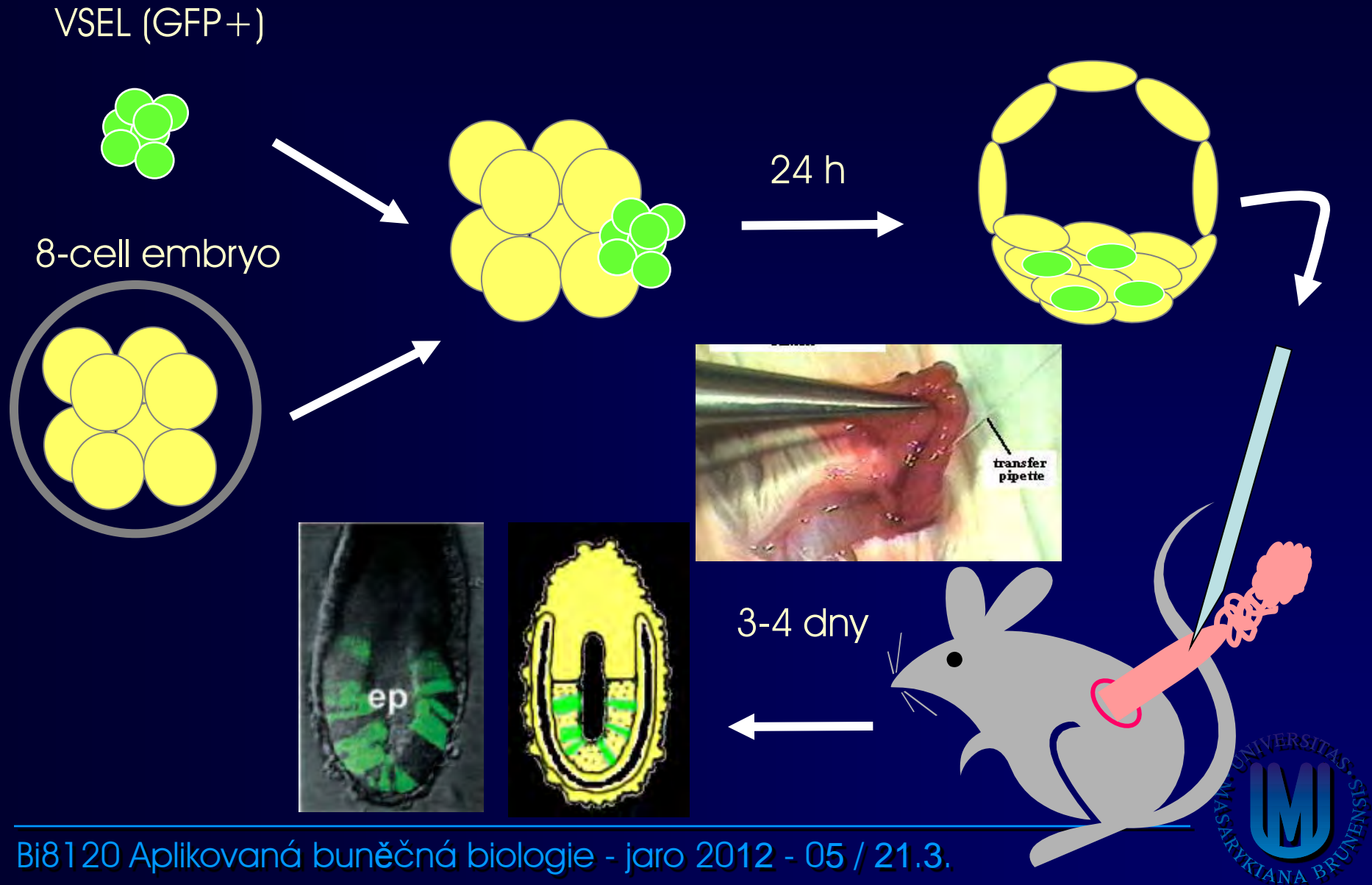
velikost: 2-4 μm

schopnost diferenciacie do různých linií 3 zárodečných vrstev

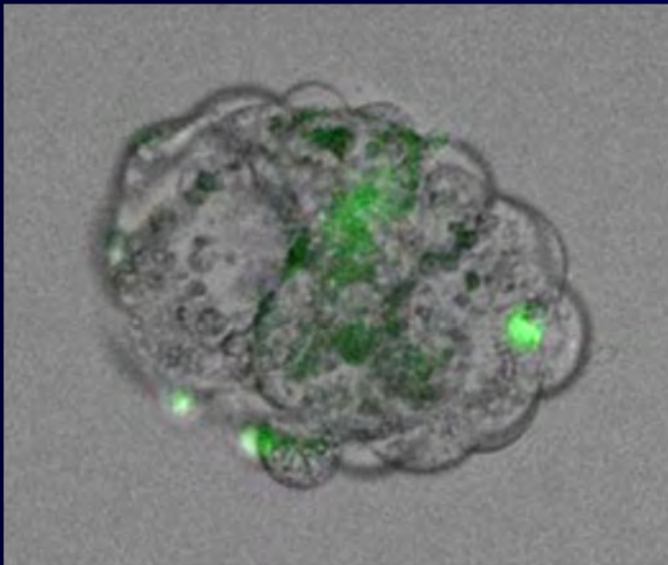
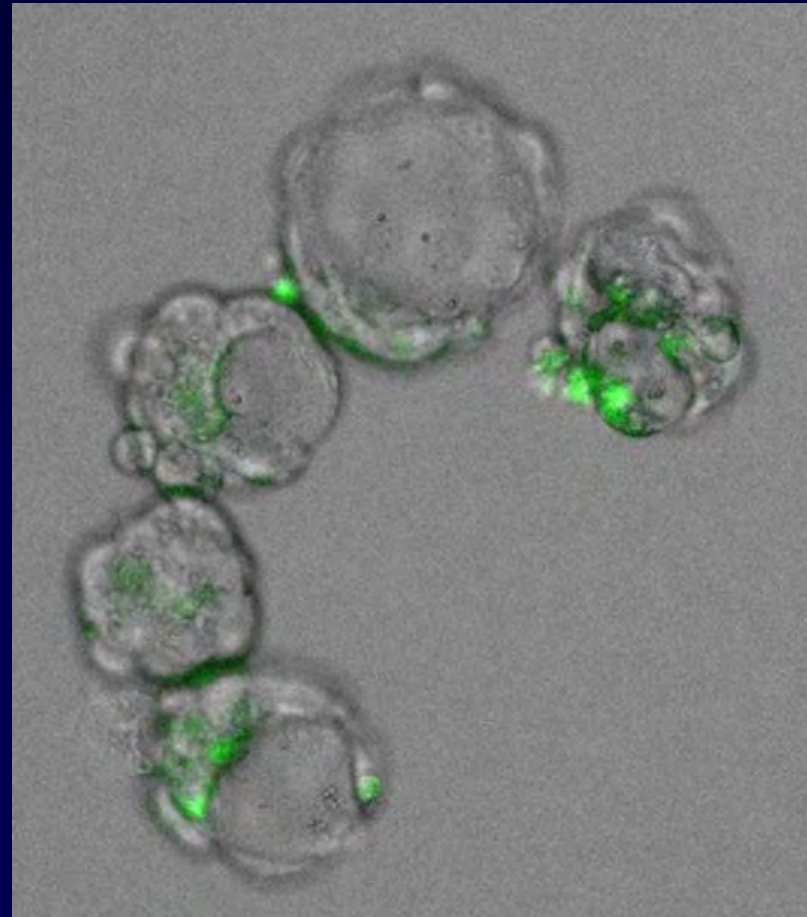
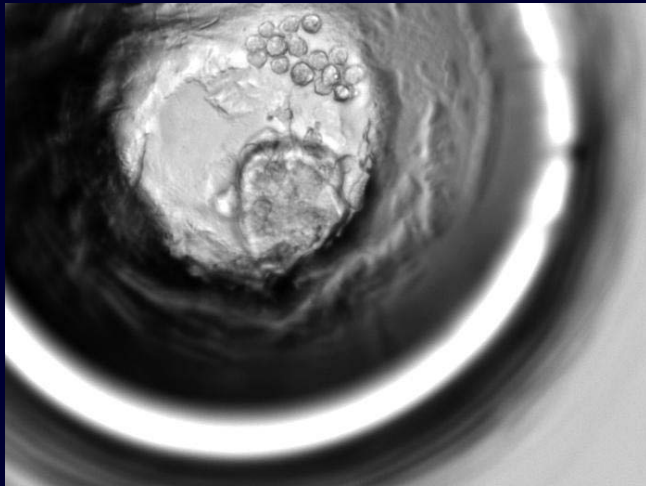




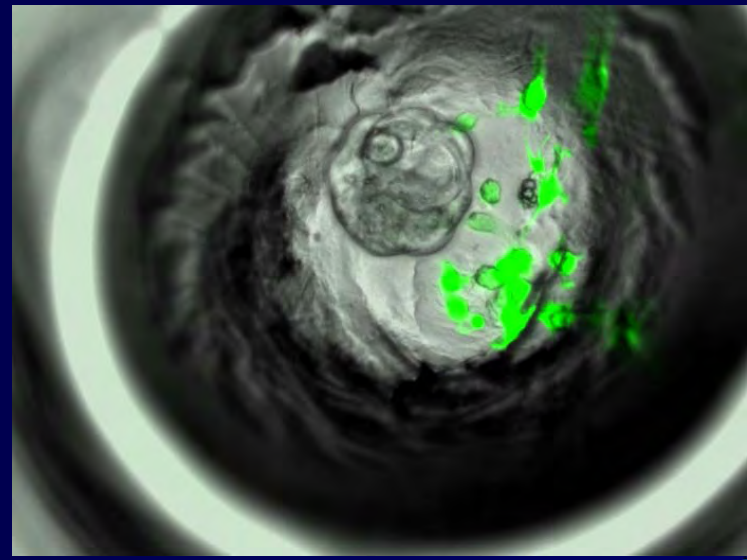
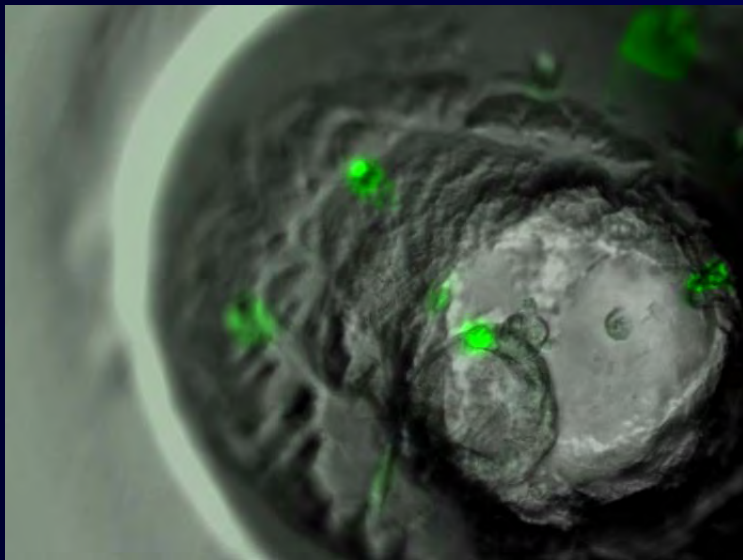
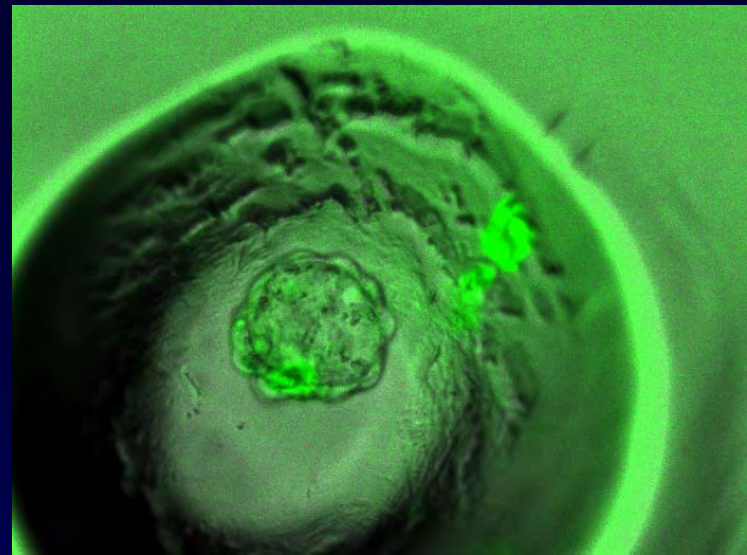
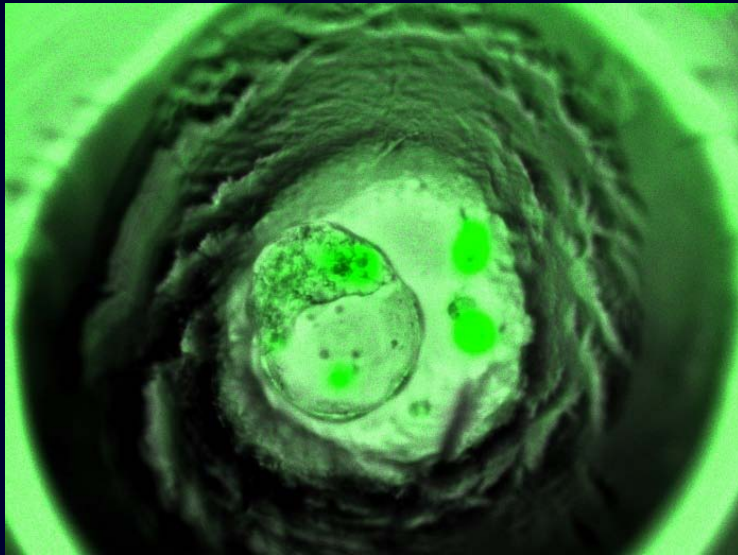
# Schéma experimentu











# Chiméry: tvorba „nových druhů“

**geep** (kovce?) chiméra kozy a ovce (ne hybrid)  
poprvé v roce 1978 Austrálie, Dr R.S. White



# Chiméry: medicínský význam



Critical Reviews in Oncology/Hematology 15 (1993) 35–48

Critical Reviews in  
*ONCOLOGY/  
HEMATOLOGY*

## In utero transplantation of hematopoietic stem cells

Alan W. Flake<sup>a</sup>, Esmail D. Zanjani<sup>\*.b</sup>

<sup>a</sup>Department of Surgery, Division of Pediatric Surgery, Fetal Treatment Program, University of California, San Francisco and <sup>b</sup>Department of Medicine, Veterans Affairs Medical Center, Reno, NV and Fetal Treatment Program, University of California, San Francisco, USA

## Výzkum krvetvorby a krevních chorob:

- hematopoetické kmenové b. z lidských fetálních jater
- intraperitoneální injekce do fetu ovce
- lymfoidní prekurzory přetrvávaly až 3,5 roku po transplantaci



# Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep

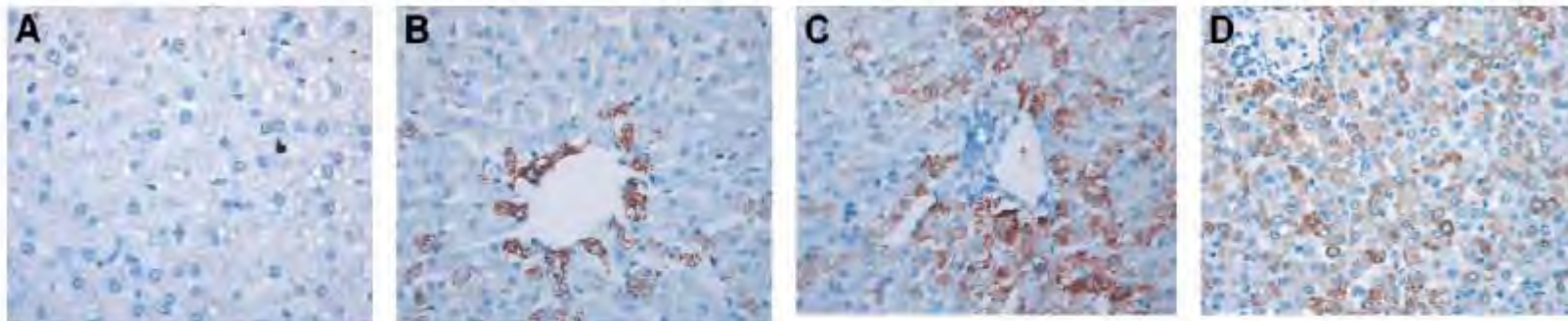
Graça Almeida-Porada, Christopher D. Porada, Jason Chamberlain, Ali Torabi, and Esmail D. Zanjani

We took advantage of the proliferative and permissive environment of the developing preimmune fetus to develop a non-injury large animal model in sheep, in which the transplantation of defined populations of human hematopoietic stem cells resulted in the establishment of human hematopoiesis and led to the formation of significant numbers of long-lasting, functional human liver cells, with some animals exhibiting levels as high as 20% of donor (human) hepatocytes 11 months after transplantation. A direct correlation

was found between hepatocyte activity and phenotype of transplanted cells, cell dose administered, source of cells used on a cell-per-cell basis (bone marrow, cord blood, mobilized peripheral blood), and time after transplantation. Human hepatocytes generated in this model retained functional properties of normal hepatocytes, constituted hepatic functional units with the presence of human endothelial and biliary duct cells, and secreted human albumin that was detected in circulation. Transplanting popu-

lations of hematopoietic stem cells can efficiently generate significant numbers of functional hepatic cells in this non-injury large animal model and thus could be a means of ameliorating or curing genetic diseases in which a deficiency of liver cells or their products threatens the life of the fetus or newborn. (*Blood*. 2004;104: 2582-2590)

© 2004 by The American Society of Hematology

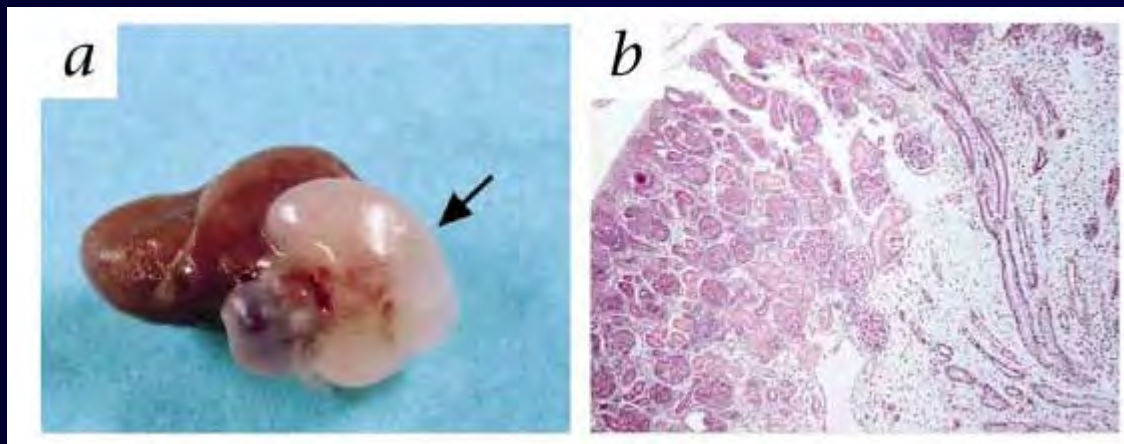


**Figure 1. Adult human HSCs generate significant numbers of hepatocytes in a noninjury fetal model.** (A) Control sheep liver section (nontransplanted) stained with an antibody antihuman hepatocyte (clone OCH1E5) as described in "Materials and methods." (B-C) Liver sections obtained at 3 weeks (B) and 4 months (C) after transplantation from sheep that received transplanted human BM CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> cells, stained with the same antibody showing a higher number of human hepatocytes in the latter (C). (D) Liver section obtained at 11 months after transplantation from sheep that received transplanted CB-derived CD34<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> cells, stained with antihuman hepatocyte antibody. Human hepatocytes in all sections can be identified by the dark brown coloration.



## Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation

Benjamin Dekel<sup>1</sup>, Tatyana Burakova<sup>1</sup>, Fabian D. Arditti<sup>1</sup>, Shlomit Reich-Zeliger<sup>1</sup>, Oren Milstein<sup>1</sup>, Sarit Aviel-Ronen<sup>3</sup>, Gideon Rechavi<sup>3, 4</sup>, Nir Friedman<sup>5</sup>, Naftali Kaminski<sup>3</sup>, Justen H. Passwell<sup>2</sup> & Yair Reisner<sup>1</sup>



### Náhrada orgánů

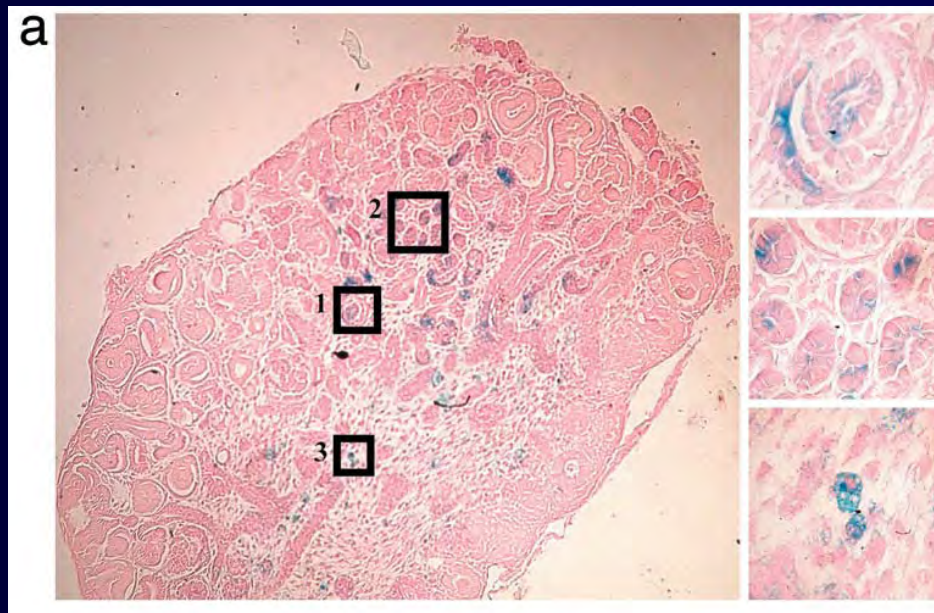
- prekurzorové ledvinové b. z lidské fetální tkáně
- transplantace do myšího embrya
- diferenciaci ve funkční nefrony a podpůrné tkáně
- tvorba miniaturního funkčního orgánu - produkce moči

# Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues

Takashi Yokoo<sup>\*,†,‡</sup>, Toya Ohashi<sup>†§</sup>, Jin Song Shen<sup>†</sup>, Ken Sakurai<sup>†§</sup>, Yoichi Miyazaki<sup>\*,†</sup>, Yasunori Utsunomiya<sup>\*</sup>, Masanori Takahashi<sup>¶</sup>, Yoshio Terada<sup>¶</sup>, Yoshikatsu Eto<sup>†§</sup>, Tetsuya Kawamura<sup>\*</sup>, Noriko Osumi<sup>¶</sup>, and Tatsuo Hosoya<sup>\*</sup>

Departments of <sup>\*</sup>Internal Medicine and Gene Therapy and <sup>§</sup>Pediatrics, <sup>†</sup>Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine, 3-25-8, Nishi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan; <sup>¶</sup>Division of Developmental Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1, Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan; and <sup>‡</sup>Department of Homeostasis Medicine and Nephrology, Tokyo Medical and Dental University, 5-45 Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

Edited by Erkki Ruoslahti, The Burnham Institute, La Jolla, CA, and approved January 4, 2005 (received for review September 16, 2004)

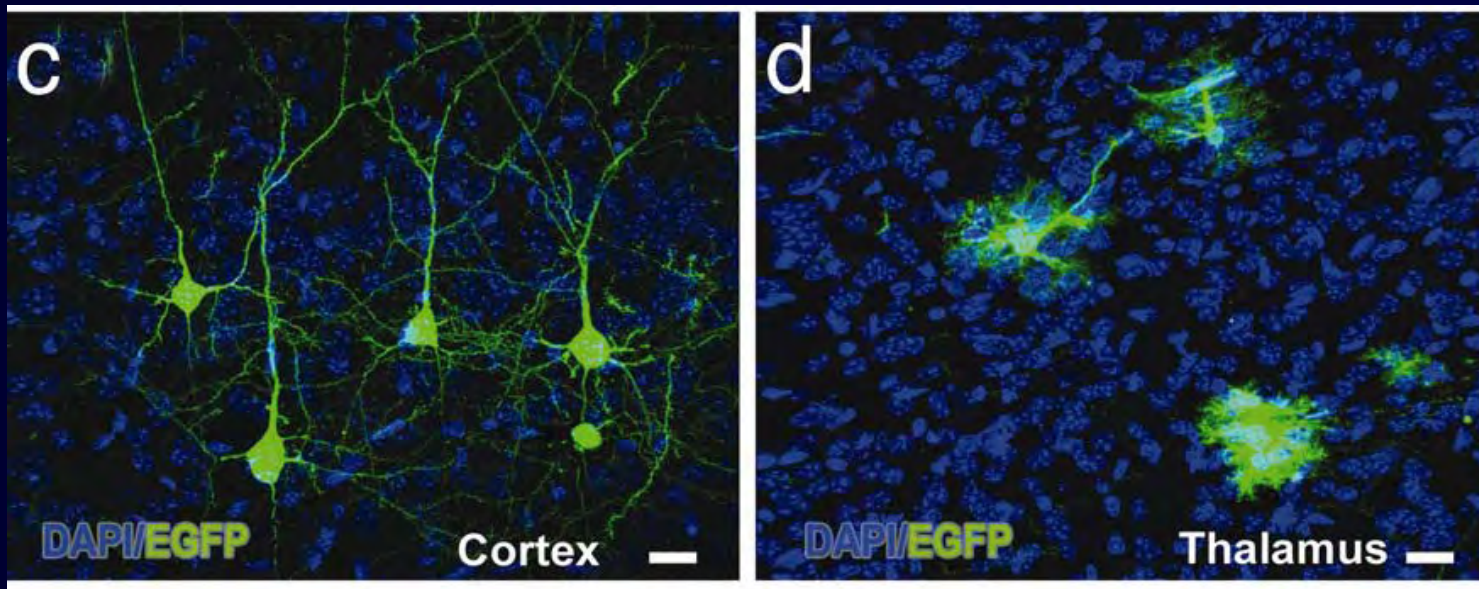


# Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain

Alysson R. Muotri<sup>\*†</sup>, Kinichi Nakashima<sup>\*\*‡</sup>, Nicolas Toni<sup>\*</sup>, Vladislav M. Sandler<sup>\*</sup>, and Fred H. Gage<sup>\*§</sup>

<sup>\*</sup>Laboratory of Genetics, The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037; and <sup>†</sup>Laboratory of Molecular Neuroscience, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma 630-0101, Japan

Contributed by Fred H. Gage, October 27, 2005



## Výzkum neurodegenerativních chorob:

- hESCs implantovány do myšího fetálního mozku
- diferenciace ve funkční linie neurálních buněk



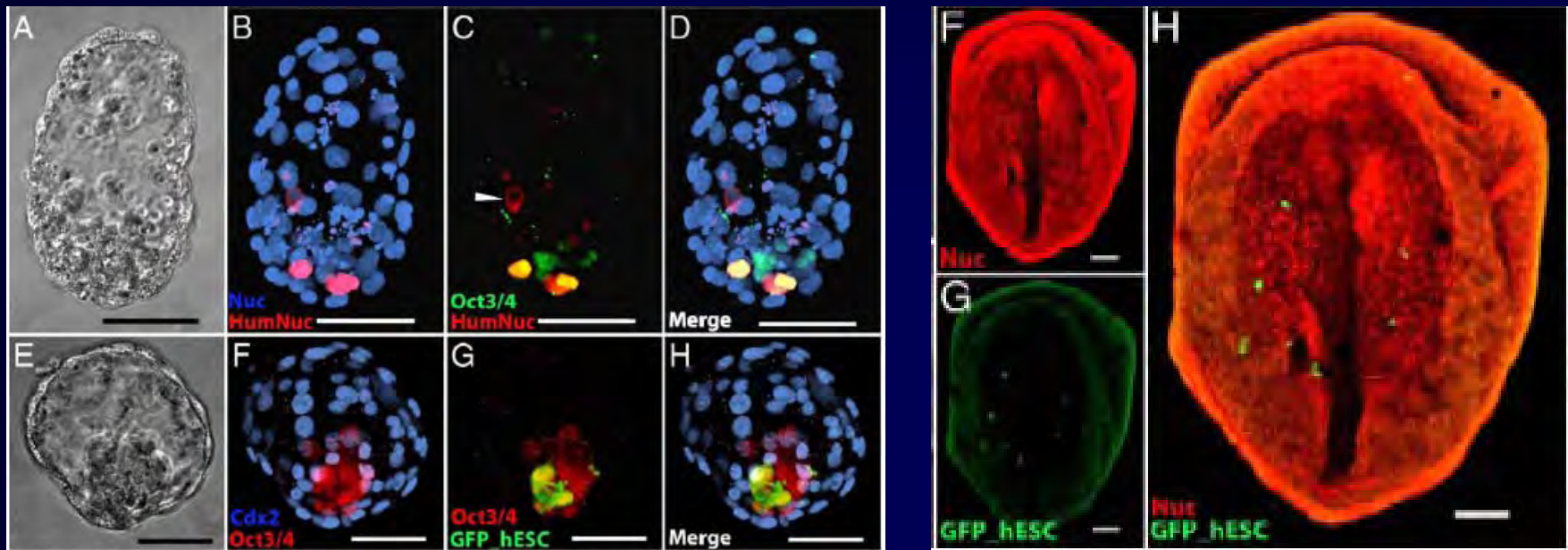
## Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts

Daylon James<sup>1</sup>, Scott A. Noggle<sup>1</sup>, Tomasz Swigut, Ali H. Brivanlou<sup>\*</sup>

*Laboratory of Molecular Embryology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021, USA*

Received for publication 18 January 2006; revised 13 February 2006; accepted 16 March 2006

Available online 12 June 2006



2 dny po injekci

D 8,5