

# VILJASTUMINE

Marika Masso  
marika.mass@ut.ee

## ÕPPEMATERJALID

“BIOLOGIA PRAKTIKUM I” R. Masso, A. Saag, M. Masso. Tartu, 2022

MOODLE / Õppeaine BIOLOGIA / Arengubioloogia praktikumid / Biooloogia PRAKTIKUM I

□ ANIMATSIOONID: <https://lepo.it.dtu.ut.ee/~dyvno/> Viljastumine

Online course in embryology for medicine students. **Fertilization module.**  
developed by the universities of Fribourg, Lausanne and Bern.

Gametogenees, viljastumine, hormonaalne regulatsioon:  
<http://embryology.ch/en/embryogenesis/fertilization/>

UNSW Embryology. Human Embryology. **Fertilization**  
<https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Fertilization>

Movies - palju lihtsaid animatsioone

Valik histoloogilisi preparaate gametogeneesist ja varajasest arengust  
ATLAS OF DEVELOPMENTAL STAGES <http://it.stlawu.edu/~mtem/devbiol/db99atlas.htm>

### SKEEM: folliikuli areng. Viljastumine, lõigustumine ja blastotsüsti implantatsioon

The diagram illustrates the stages of follicle development and fertilization. It shows the progression from an oocyte in the ovary (Day 0) through fertilization (Day 0), cleavage stages (2-cell, 4-cell, 8-cell uncompact morula, 8-cell compact morula), and the formation of a blastocyst (Day 5) with its internal cell mass and trophoblast. The final stage shows the implantation of the blastocyst into the uterine wall (Day 8-9).

### Ootsüüdi valmistumine viljastumiseks

Enne ovulatsiooni toimuvad ~24 tunni jooksul samaaegselt **ovotsüüdi küpsemisjagunemised** I profaasist II metafaasini ja tsütoplasma ümberkorraldamine.

Kui kasvuperioodil paiknevad organellid ooplasm perifeerias, siis meiootilise jagunemise ehk **küpsemisperioodi ajal** koonduvad organellid munaraku keskele ning **moodustub organellivaba tsoon** ootsüüdi plasmamembraani alla.

**Erandiks** on kortikaalsed graanulid, mis migreeruvad ootsüüdi plasmamembraani alla (moodustuvad kasvuperioodil Golgi kompleksis ja viivad läbi kortikaalset reaktsiooni viljastumisel).

**TSÜTOSKELETT:** mikrotorukestest moodustub meioosi kääv; aktiivist mikrofilamentid osalevad käävi ankurdamisel ja tsütokineesil (polaarkehakese moodustumisel).

### Munarakk

The diagram shows a cross-section of an egg cell. Labels include: Kortikaalsed graanulid (cortical granules), Follikulaarsed rakud (follicular cells), Ootsüüdi tsütoplasma (oocyte cytoplasm), Zona pellucida, Kromosoomid II metafaasis (chromosomes in metaphase II), and Polaarkeha (polar body).

- suur, ~120 µm läbimõõduga rakk, mida ümbritseb **Zona pellucida**'t ja **follikulaarsed rakud** ehk *Corona radiata*;
- vahetult olemegi all paiknevad **kortikaalsed graanulid**;
- rakuorganellid on koondunud sekundaarse ootsüüdi keskele;
- ootsüüdi meioos on peatunud **II metafaasis** – on meioosi 2. blokaad

2015 Keefe D et al. Oocyte competency is the key to embryo potential.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028214025461>

### Seemnerakk

- väike asümmeetriline ja liikumisvõimeline gameet:

**pea:** kondenseerunud haploidne tuum, mille eesosa katab **akrosoom**

**kael:** sisaldab peamiselt tsentriooli

**keskosa:** spiraalselt ümber viburi telje on kümnekond mitokondrit, mis toodavad liikumiseks ATP-d

**saba:** ~50 mm pikkune eukarüooidi vibur, mille moodustavad 9 paari ringjalt ja 2 tsentraalselt paiknevat mikrotorukest (9x2+2)

The diagram labels the parts of a sperm cell: Pea (head), Kael (neck), Keskosa (midpiece), and Saba (tail). Specific structures labeled include Akrosoom (acrosome), Tuum (nucleus), Tsentriool (centriole), Spiraalselt paigutunud mitokondrid (spirally arranged mitochondria), and Aksooneem (axoneme). The tail is also labeled with Viburi risttõige (9 x 2 + 2) mikrotorukest (microtubule bundles).

## Spermi kapatsitatsioon

Toimub emasorganismi suguteedes.

Sperm muutub: hüpermotiilseks ja omandab võime läbiviia akrosomaalset reaktsiooni.

Inimesel kapatsiteerub ~10% spermidest!

## Viljastumisel

- seemnerakkude kontsentratsioon spermas, liikuvus ja morfoloogia olulised
- seemnerakke suunavad reotaksis, termotaksis ja kemotaksis
- inimese ejakulaadis (2-6 ml) on ~300 miljonit spermatoosoidi, ootsüüdini jõuab neist 200-300
- ootsüüti ümbritsevad corona radiata rakud sünteesivad progesterooni mille:
  - pikomolaarne kontsentratsioon mõjub spermidele kui kemoatraktant
  - mikromolaarne kontsentratsioon aktiveerib  $Ca^{2+}$  sisenemise → hüpermotiilseks
- ootsüüt valib välja õige välimusega seemnerakud, ka akrosoomi morfoloogia on oluline, ainult "ilusad spermid" saavad seonduda Zona pellucida-ga
- spermi plasmamembraanil eksponeeruvad liigspetsiifilised adhesioonimolekulid – need seostuvad Zona pellucida-ga

2016 Holt WV & Fazeli A. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15003775>

2018 Kekäläinen J, Evans JP. Gamete-mediated mate choice: towards a more inclusive view of sexual selection. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30051836>

## Reotaksis ja termotaksis ja kemotaksis

2006 Eisenbach & Giojalas. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. <https://www.nature.com/articles/nrm1893> Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(4):276-85.

## Viljastumisetapid imetajatel

1. Gameetide liigspetsiifiline seostumine
2. Akrosomaalne reaktsioon
3. Spermi tungimine läbi Zona pellucida
4. Spermi ja ootsüüdi plasmamembraanide ühinemine
5. Kortikaalne reaktsioon. Ootsüüdi aktivatsioon. Ooplasma segregatsioon.

Spermi plasmamembraanil eksponeeruvad liigspetsiifilised adhesioonimolekulid, need seostuvad Zona pellucida retseptoritega →  $Ca^{2+}$  vabanemine → AKROSOMAALNE REAKTSIOON

## Akrosomaalne reaktsioon spermil

Intakse spermi plasmamembraani seostumine Zona pellucida retseptoritega (seostumine on liigspetsiifiline) põhjustab kiiret kaltsiumiioonide ( $Ca^{2+}$ ) kontsentratsiooni tõusu spermi peas. Spermi plasmamembraan ja akrosoomi otsmine membraan lagunevad, vabaneb akrosoomi sisu.

### Kortikaalne reaktsioon imetajal

Spermi sisenemine ootsüüti põhjustab:

- kiiret kaltsiumi ionide -  $Ca^{2+}$  - kontsentratsiooni tõusu ootsüüdis;
- ootsüüdi kortikaalsed graanulid eksotsüteerivad oma sisu *Zona pellucida* ja ootsüüdi plasmamembraani vahele;
- ZP3 ja ZP2 modifitseeruvad ensüümide toimel;
- rohkem sperme ei saa ei seostuda ega siseneda ootsüüti.

**Kortikaalne reaktsioon on peamine polüspermiat tõkestav mehhanism imetajatel!**

### Izumo1 peab leidma Juno

ja seostuma sellega, et toimuks gameetide plasmamembraanide ühtesulandumine.

Järgnevalt kaob Juno munaraku plasmamembraanilt – rohkem sperme ei seostu – veelkordne polüspermiat blokk?

\*2014 Wassaran PM. Reproductive biology: Sperm protein finds its mate. NATURE <https://www.nature.com/articles/nature13227>  
2019 Jean C et al. JUNO, the receptor of sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30517645>

### Tsentrosoomi paternaalne päritolu

Enamikul imetajatest, sh ka inimesel, asetseb spermi kaelapiirkonnas tsentriool, mis siseneb viljastumisel ootsüüti, siis duplitseerub ning moodustab sügooti domineeriva tsentrosoomi.

Domineeriv tsentrosoom organiseerib pronukleuste lähenemist ja sügooti esimesel mitoosil käävisüsteemi moodustumist.

2006 Sathananthan AH et al. Rediscovering Boveri's centrosome in Ascaris (1888) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478594>

### Spermi tsentriooli → tsentrosoomi duplitseerumine ootsüüdis

Schatten and Sun, 2010; Debec et al 2010

2019 Avidor-Reis T et al. The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction - The Known and the Unknown. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31632960/>

### Spermi mitokondrite kurb saatus

Koos spermi keskosaga sisenevad ootsüüti kümnekond mitokondrit.

Pärast viljastumist, pronukleuste lähenemise ajal, lammutatakse need nt proteasoomidel.

**Vajalik on vältida spermatogeneesi ajal suure tõenäosusega kahjustunud mtDNA kaasumist ootsüüti → SÜGOOTI ehk edasikandumist järgnevale põlvkondadele.**

**Incorporation of the sperm head and midpiece into the oocyte cytoplasm (O) during fertilization.** Sperm mitochondria (M) from the midpiece (MP) will mingle with oocyte organelles but will later be extruded or degraded by the egg. The sperm brings its nuclear contents (N), the basal body (B) or centriole, and selenium in the midpiece to the early embryo. P, perivitelline space; I, inner acrosomal membrane; S, smooth endoplasmic reticulum. Sathananthan, 1986

### Keharaku tuuma DNA / mtDNA võrdlus inimesel

	Tuum DNA	Mitokondriaalne DNA
Genoomi suurus	~3 miljardit nukleotiidipaari	16 569 nukleotiidipaari
Struktuur	lineaarne (pakitud kromosoomidesse)	rõngasmolekul
Koopiate arv rakus	2 (1 alleel kummaltki vanemalt)	Võib olla >1000
Päritakse	emalt ja isalt	emalt
Rekombineerumine	jah	võib toimuda, aga määral mis evolutsiooni ei mõjuta
Unikaalsus	unikaalne (v.a ühemunakaksikud)	ei ole unikaalne
Muteeruvus	madal	5-10 x kõrgem

**Spermatosoidi DNA – nii tuuma DNA kui ka mitokondrite DNA (mtDNA), on eriti altis kahjustuma. Miks?**



2005 Krawetz S A. **Paternal contribution: new insights and future challenges.** *Nature Reviews Genetics* 2005, 6, 633-642  
<https://www.nature.com/articles/nrg1654>

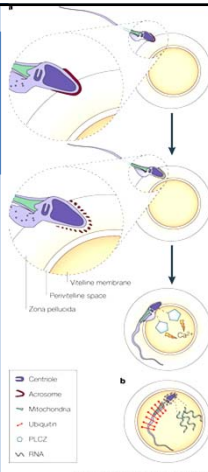
Essentially, the **entire contents of the sperm** are released into the ooplasm on fertilization =>

2009 Barroso G, et al. **Developmental sperm contributions: fertilization and beyond.** *FIG 3.*  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001502820901351X>

2013 Sato M, Sato K. **Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA.**  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913001092>

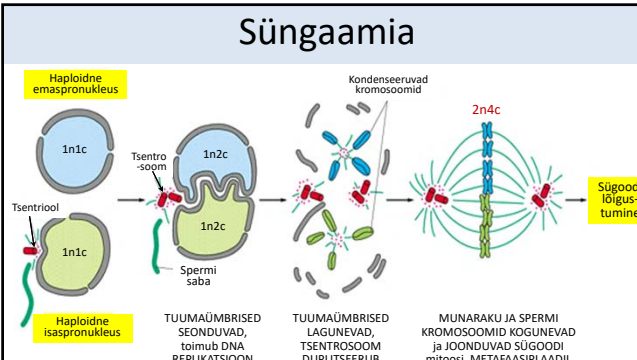
2015 Varner DD. **Odyssey of the spermatozoon.**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492040/pdf/AJA-17-522.pdf>

2017 Sutovsky P, Song WH. **Post-fertilisation sperm mitophagy: the tale of Mitochondrial Eve and Steve.**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29539303>



Legend:  
 - Centriole  
 - Acrosome  
 - Mitochondria  
 - Ubiquitin  
 - PLGZ  
 - RNA

## Süngaamia



**Haploidne emaspronukleus** (1n1c) + **Haploidne isaspronukleus** (1n1c) → **Tsentrosoom** (1n2c) + **Spermi saba** (1n2c) → **Kondenseeruvad kromosomid** (2n4c) → **Sügoodi lõigustumine**

TUUMAÜMBRISEID SEONDUVAD, toimub DNA REPLIKATSIOON

TUUMAÜMBRISEID LAGUNEVAD, TSENTROSOOM DUPLITSEERUB

MUNARAKU JA SPERMI KROMOSOOMID KOGUNEVAD ja JOONDUVAD SÜGOODI mitoosi METAFAASIPLAADIL

Ovotsüüt lõpetab meioosi ja moodustub **emaspronukleus**;  
 - spermiumi tuum dekontendseerub ja moodustub **isaspronukleus**;  
 - isas- ja emaspronukleus lähenevad üksteisele;  
 - samaaegselt toimub **DNA replikatsioon** ja **tsentrosoomi duplikatsioon**;  
 - algab mitoos: profaas, metafaas jne – sügoot alustab 1. lõigustumisjagunemist.

### KOKKUVÕTE, viljastumise etapid:

1. Spermiumi tungimine *Corona radiata* rakkude vahele
2. Spermiumi seostumine *Zona pellucida'* ga
3. Akrosomaalne reaktsioon
4. Spermiumi tungimine läbi *Zona pellucida*
5. Spermiumi ja ootsüüdi plasmamembraanide seostumine
6. Spermiumi sisenemine ootsüüti
7. Ootsüüdi aktiveerumine (metaboolne + ooplasmasegregatsioon)
8. Spermiumi tuuma dekontendseerumine
9. Ootsüüdi meioosi lõpetamine (viljastatud munarakk, mille tuum: 1n1c)
10. Pronukleuste moodustumine (isaspronukleus: 1n1c ja emaspronukleus: 1n1c)
11. Sügoodi pronukleuste lähenemine ja DNA-replikatsioon **2n2c → 2n4c**
12. Isapoolne ehk spermiumi tsentriool moodustab tsentrosoomi → selle duplikatsioon
13. Profaas ja mitoosikäivi moodustumine
14. Spermiumi ja munaraku kromosoomide kogunemine metafaasiplaadile
15. Sügoodi - 2n4c - esimene lõigustumine ehk esimene mitootiline jagunemine

**nucleus** Fertilization <https://catalog.nucleusmedicalmedia.com/view-item?ItemID=75011>

LIST: <https://catalog.nucleusmedicalmedia.com/animation-list?www.nucleuscatalog.com/animation-list>

## Oogenees ja mitokondrid

Ootsüüdi kasvuperioodil suureneb järsult **mitokondrite arv**: 8000 → 200 000.  
 Ovuleerivas ootsüüdis on vähemalt **200 000 mitokondrit**.

Esineb nn **"MITOKONDRIAALNE PUDELIKAEEL"**:  
 sugurakkude eellasrakkudes - primordiaalses sugurakkudes ehk **idurakkudes**, mis eristuvad 2. arengunädalast, on mitokondreid alles ~10, seega **üliväike hulk** ehk **0,01% ootsüüdi mitokondritest** saab eellasteks ootsüüdi → sügoodi → embrüo → **isendi mitokondrite populatsioonile**.

Selle mehhanismiga **vähendatakse** kõrge muteeruvusega **mtDNA vigade kandumist järgmisesse generatsiooni!**

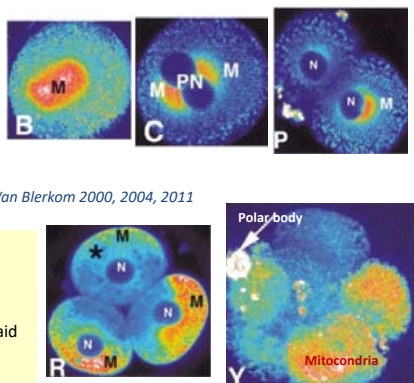
2022 Podolak A et al. *The Role of Mitochondria in Human Fertility and Early Embryo Development.*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8909547/>

2016 Babayev & Sell *Oocyte mitochondrial function and reproduction.*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4590773/>

## Mitokondrite olulisus varajases arengus

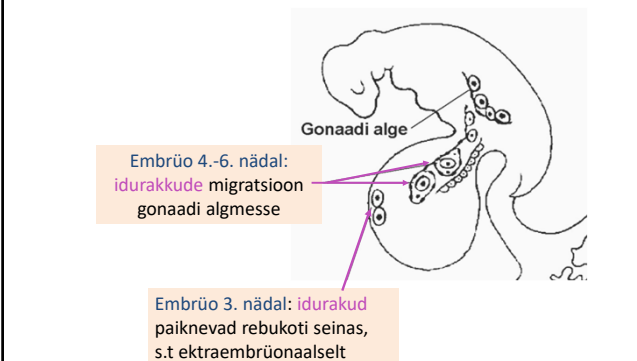
Kõige määravamaks **embrüo edukal implanteerumisel** ja varajases arengul on **mitokondrite õige jaotumine** tütarakkude vahel ja nende, (ainult) emalt saadud **mitokondrite kvaliteet**.

Van Blerkom 2000, 2004, 2011



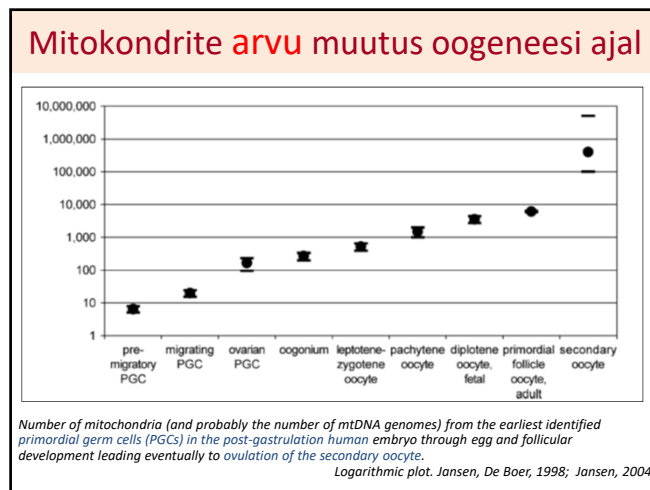
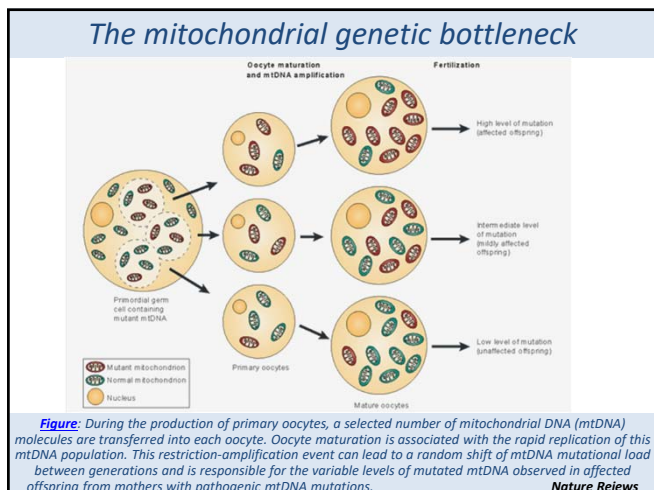
Mitokondrite jagunemine algab 2. arengunädalal (implantatsiooni ajal). Samal ajal saab eristama hakata ka kõige varajasemaid sugurakkude eellasrakke - igaihes ~10 mitokondrit - MITOKONDRIAALNE PUDELIKAEEL!

## Idurakud ehk primordiaalsed sugurakud (primordial germ cells – PGC)



Embrüo 4.-6. nädal: **idurakkude migratsioon** gonaadi algmesse

Embrüo 3. nädal: **idurakud** paiknevad rebukoti seinas, s.t ekstraembrüonaalselt



# Sügoodi lõigustumine

## Moorula

## Blastula

### Sügoodi lõigustumine

on rida KIIREID MITOOTILISI jagunemisi ilma kasvamiseta. Mahult väga suure ootsüüdi tsütoplasma jaotatakse paljude väiksemate rakkude vahel ning taastub tuuma-tsütoplasma normaalne suhe.

Lõigustumise ajal mitooside vahelistes interfaasides:

- ei toimu rakkude kasvu;
- ei "toodeta juurde"organelle - see taastub 2. arengunädalal;
- organelid jaotuvad tütarakkude vahel ebavõrdsetl.

Rakutsükkel koosneb lõigustumise ajal peamiselt mitoosi faasist ja S-faasist (S-faas on DNA-sünteesi faas, kus toimub tütararkmatide moodustumine).

SÜGOODI GENOOM aktiveerub inimesel hiljemalt 8-raku st, s.o 3. arengupäeval. Enne sügoodi genoomi aktiveerumist on kogu regulatsioon ootsüüdi poolne ja halveneb vanusega (transkriptsioon, DNA stabiliseerimine, kaitse oksüdatiivse stressi vastu jne).

### Centriole / basal body and Embryo polarity

Egg fertilization in animals involves the **resetting of egg polarity** through the **conversion of the sperm associated basal body into the male pronucleus-associated CENTROSOME** (centrosome =2 centrioles + pericentriolar material).

**Egg symmetry breaking.**  
The sperm centrosome triggers the cortical flow that establishes the **anterior and posterior** cortical polarity domains through two redundant mechanisms.

**Blastomere individuation.**  
Unfertilized *Xenopus* egg cleavage can be triggered by the injection of a somatic centrosome. Whereas activation of the egg by **pricking** triggers cell cycle resumption but **does not lead to cleavage**.  
**Centrosome-dependent astral organization of the microtubule array is thus necessary for egg cleavage!**

2012 Borens M. The Centrosome in Cells and Organisms. <http://www.sciencemaq.org/content/335/6067/422.long>

### Sügoodi lõigustumine

2010 Chen L et al. **Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis.** *Cell Res.* 2010 Sep;20(9):982-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628366>

Schematic illustration → for different types of cell division.

**A - Equatorial and meridional cleavages in the two-cell embryo.** The red circle is the second polar body. The dashed lines mark the cleavage planes.

**B - Symmetric and asymmetric divisions in the eight-cell embryo.** Only four blastomeres in the eight-cell embryo are shown. Symmetric division results in two polarized blastomeres with equal position in the embryo, while asymmetric division produces one polarized outer cell and one apolar inside cell.

2011 Li L, Zheng P, Dean J. **Maternal control of early mouse development.** *Development.* 2010 Mar;137(6):859-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179092>