

Molekulární metody pro studium reprodukční biologie**Datum:** 10. 3. 2014 9:00 – 17:00**Lektoři:** Mgr. Lukáš Děd, Mgr. Eva Žatecká, Mgr. Pavla Dostálová, Mgr. Andryi Dorosh**Anotace:** Tento kurz je zaměřen na studium samčí reprodukce, zvláště pak na proces vzniku a zrání spermií (spermatogeneze, spermiogeneze, zrání v samičím reprodukčním traktu) a na děje, které se odehrávají v testikulární tkáni.

Spermatogeneze je velmi komplexní hormonálně řízený děj, během kterého dochází k sérii po sobě jdoucích buněčných dělení a diferenciačních procesů. Během spermatogeneze dochází k expresi specifických genů, jejichž regulace je pro tento proces klíčová. Na spermatogenezi navazuje série diferenciačních procesů, které se souhrnně nazývají spermiogeneze. V průběhu spermiogeneze dochází k tvorbě struktur, které jsou specifické pro savčí spermie. Je tvořen bičík, akrosomový váček, dochází k výměně histonů za protaminy, kondenzaci DNA, odvržení velké části cytoplazmy a uvolnění spermie do lumen semenotvorného kanálku, odkud spermie putuje do epididymu, kde dále zraje. Ejakulované spermie však stále ještě nejsou schopny oplodnit vajíčko. Schopnost oplození získávají až při průchodu samičím reprodukčním traktem, kde podstupují dva klíčové procesy – kapacitaci a akrosomovou reakci. Izumo1 je fúzogení protein spermie zodpovědný za splynutí vajíčka a spermie v pozdní fázi procesu oplození. I přes tento známý fakt Izumo 1 není přítomen na povrchu spermie před akrosomovou reakcí a musí být translokován na její povrch v procesu známém jako relokalizace Izumo1 proteinu. V současné době je zároveň v centru pozornosti proces tzv. spontánní akrosomové reakce, kdy ke zmíněné reakci dochází mimo oblast *zona pellucida* vajíčka, přičemž takto zreagované spermie následně vajíčko oplozují.

Spermatogeneze je započata v pubertě, avšak prekurzory zárodečných buněk vznikají již v časném embryonálním vývoji. Primordiální germinální buňky (PGSc) jsou specializované buňky vznikající v časně fázi vývoje savčího organismu, které v dospělosti dávají vznik germinálním buňkám, které jako jediné mají potenciál dát vzniknout nové generaci potomků. DNA-metylační, chromatinový a mikro-RNA profil PGSc tak hraje významnou úlohu v procesu uchování epigenetické informace napříč generacemi. Během vývoje savčího organismu hraje významnou roli také apoptóza. Apoptóza, tj. regulovaná buněčná smrt, je jedním ze základních morfogenetických procesů probíhajících v časných stádiích vývoje a

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zároveň jeden z nejdůležitějších buněčných procesů obecně. Její precizní regulace je jedním ze základních předpokladů zdárného vývoje organismu včetně testikulární tkáně, kde hraje důležitou roli i v průběhu spermatogeneze.

V průběhu semináře budou prezentovány molekulární metody studia (samčí) reprodukce, s příklady uváděnými především na savčím modelovém organismu, jejich využití ve studiu reprodukce dalších modelových organismů, zejména ptáků a ryb, bude diskutováno.

Náplň kurzu:

- **Experimentální a statistický design studií, Izumo relokalizace:** Po teoretickém úvodu ke statistickým metodám návrhu experimentů a zpracování dat budou jednotlivé kroky experimentálního návrhu a jeho statistického zpracování demonstrovány na příkladu studie relokalizace proteinu akrosomové membrány Izumo 1 během indukované a spontánní akrosomové reakce. Účelem demonstrované studie je otestovat koincidence spontánní akrosomové reakce a Izumo1 relokalizace během *in vitro* kapacitace myších spermií.
- **Analýza apoptotického procesu v embryonálních testes:** Účelem této sekce je prezentovat metodiku analýzy apoptotického procesu v embryonálních testes metodou TUNEL, která umožňuje detekovat buňky podstupující apoptózu a v kombinaci se specifickými protilátkami i detekovat specifické buněčné populace, jichž se apoptotický proces týká.
- **Epigenetická analýza primordiálních germinálních buněk (PGSc):** Účelem této sekce je prezentovat metodiku analýzy epigenetického profilu PGSc buněk odebraných z několika generací myších jedinců a studium specifického vlivu endokrinních disruptorů na transgenerační přenos specifických změn v těchto profilech.
- **Analýza genové exprese:** Účelem této sekce je seznámit posluchače s využitím „high-throughput“ analýzou genové exprese s pomocí kvantitativního real-time PCR. Seznámení s unikátním přístrojem BioMark, který používá integrované fluidní obvody známé jako dynamické araje pro genovou expresi, genotypové analýzy a digitální PCR pro absolutní kvantifikaci nukleových kyselin a CNV analýzy.
- **Studium protaminů:** Během této sekce budou posluchači seznámeni s nukleárními proteiny - protaminy a s jejich důležitou funkcí v samčí reprodukci. Dále budou prezentovány metody pro studium protaminů a jejich využití v reprodukčních studiích.
- **Kapacitace a akrosomální reakce** – V této sekci bude ukázáno, jak je možné oba tyto děje simulovat v podmínkách *in vitro*. Budou prezentovány metody pro vyhodnocení kapacitačního experimentu.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- **Průtoková cytometrie na spermích** – Průtoková cytometrie je biofyzikální metoda umožňující analyzovat tisíce buněk v krátké době. Říká nám, které buňky a jak mnoho exprimují náš protein. V této sekci bude ukázáno využití průtokové cytometrie při analýze spermií.
- **Separace testikulárních buněk – FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)** – V této sekci bude ukázáno využití metody FACS při studiu jednotlivých buněčných typů, které se vyskytují v testikulární tkáni.
- **Příprava monoklonálních protilátek:** V této sekci se budeme zabývat produkcí monoklonálních protilátek, posluchači budou seznámeni se základními principy a různým použitím této metody. Dále budou prezentovány příklady produkce monoklonálních protilátek proti GAPDHS a endokrinním disruptorům.
- **Methylace DNA a její role v reprodukční biologii:** Budou vysvětleny obecné zásady methylace DNA metyltransferasami a jejich zapojení do modifikace CpG ostrůvků v promotorové oblasti genů. Příklady modifikace DNA v umlčování genů a genové inaktivace. Budou popsány metody analýzy DNA methylace. V praktické části bude s použitím on-line programu navrhování primerů pro bisulfidové sekvenování.