

**William Harvey**

**Tutti gli organismi si originano da un uovo (1651)**

**Karl Ernst von Baer nel XIX secolo identificò la cellula uovo**



**Figura 3.1** Frontespizio del libro di William Harvey sull'origine degli animali (1651). Rappresenta Giove che tiene in mano un uovo su cui è scritto "Tutti gli organismi viventi si originano da un uovo".

# RIPRODUZIONE SESSUATA

Evolutionary biology

---

## Why sex is good

Rolf F. Hoekstra

---

According to a proposal put forward many years ago, sexual reproduction makes natural selection more effective because it increases genetic variation. Experiments now verify that idea — at least in yeast.

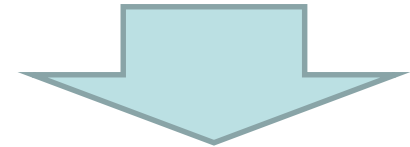
### Funzioni:

- Trasmettere il patrimonio genetico ai figli
- Permettere la variazione genetica
- Attivare l'uovo a procedere con lo sviluppo

# Gameti

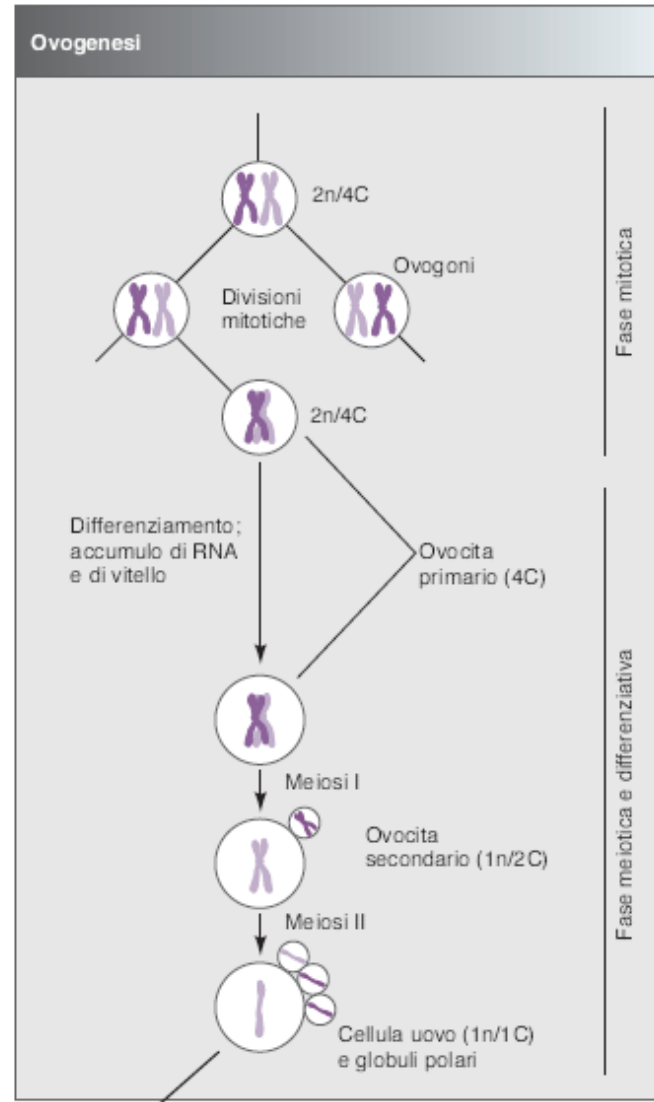
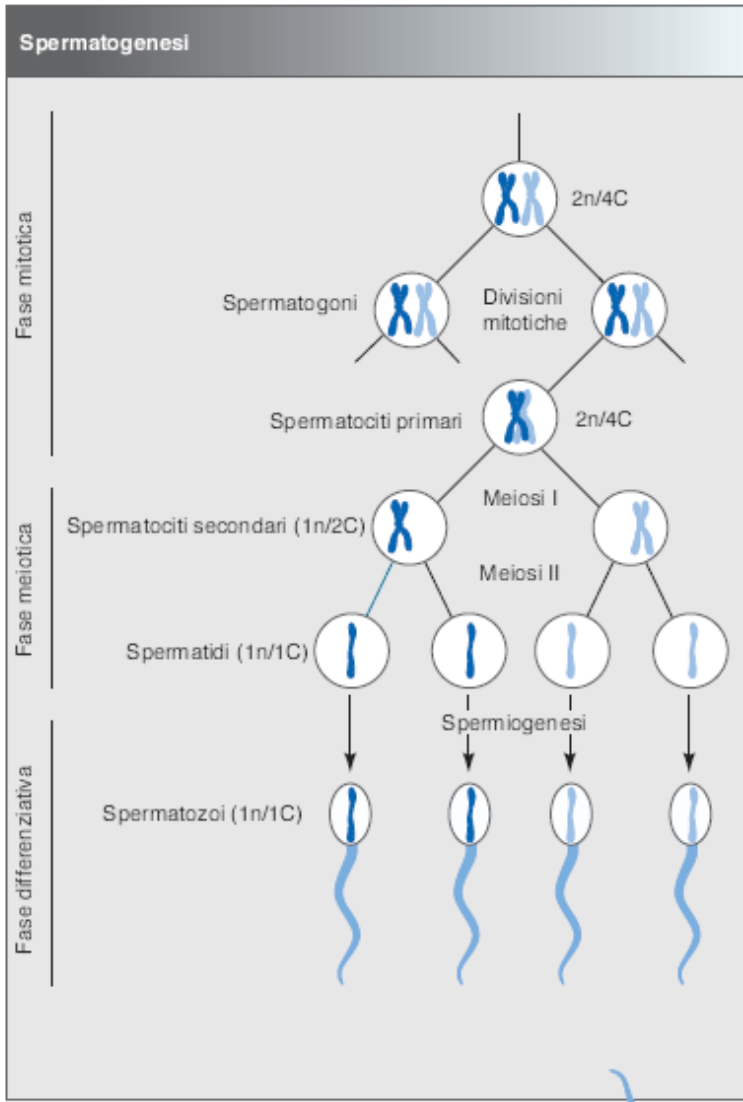
- Sono aploidi
- Derivano dalla linea germinale
- Vengono prodotti nelle gonadi
- Si differenziano in spermatozoi o oociti
- Sono destinati alla fecondazione

Gametogenesi  
➤ Spermatogenesi  
➤ Oogenesi

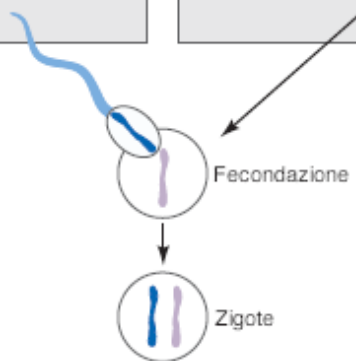


Fecondazione





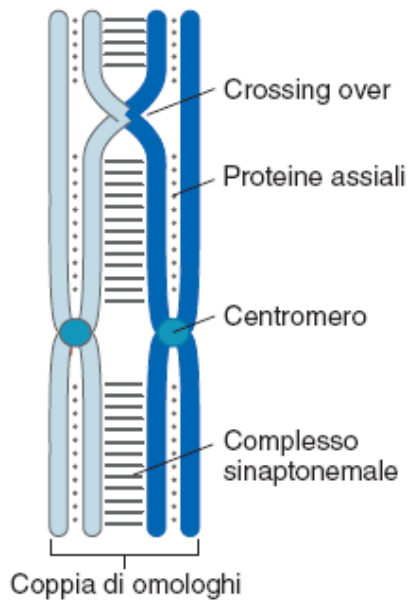
## SPERMATOGENESI E OOGENESI



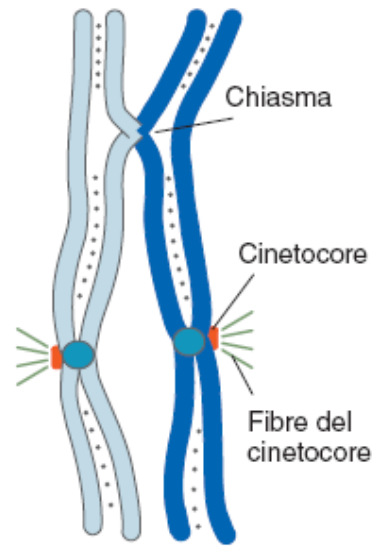
Nelle cellule diploidi ogni gene è presente in due copie: **alleli**.

**Omozigote:** i due alleli sono uguali

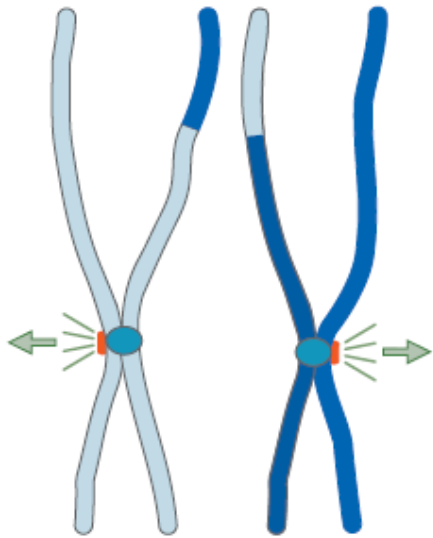
**Eterozigote:** i due alleli sono diversi



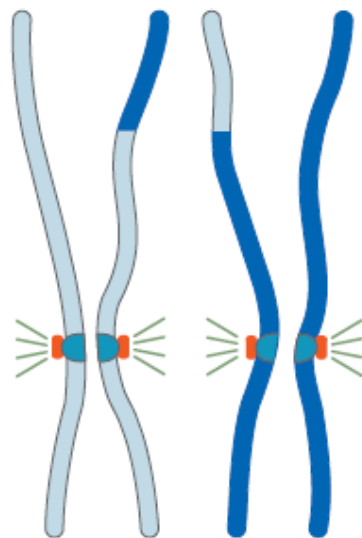
(a) Profase I



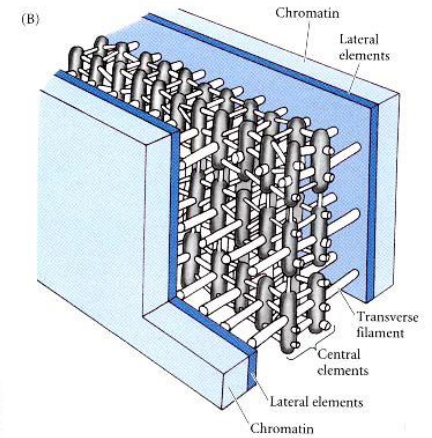
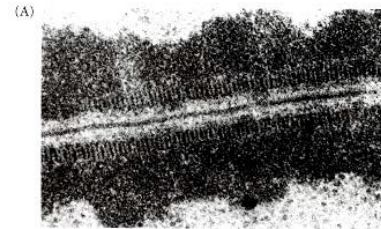
(b) Metafase I



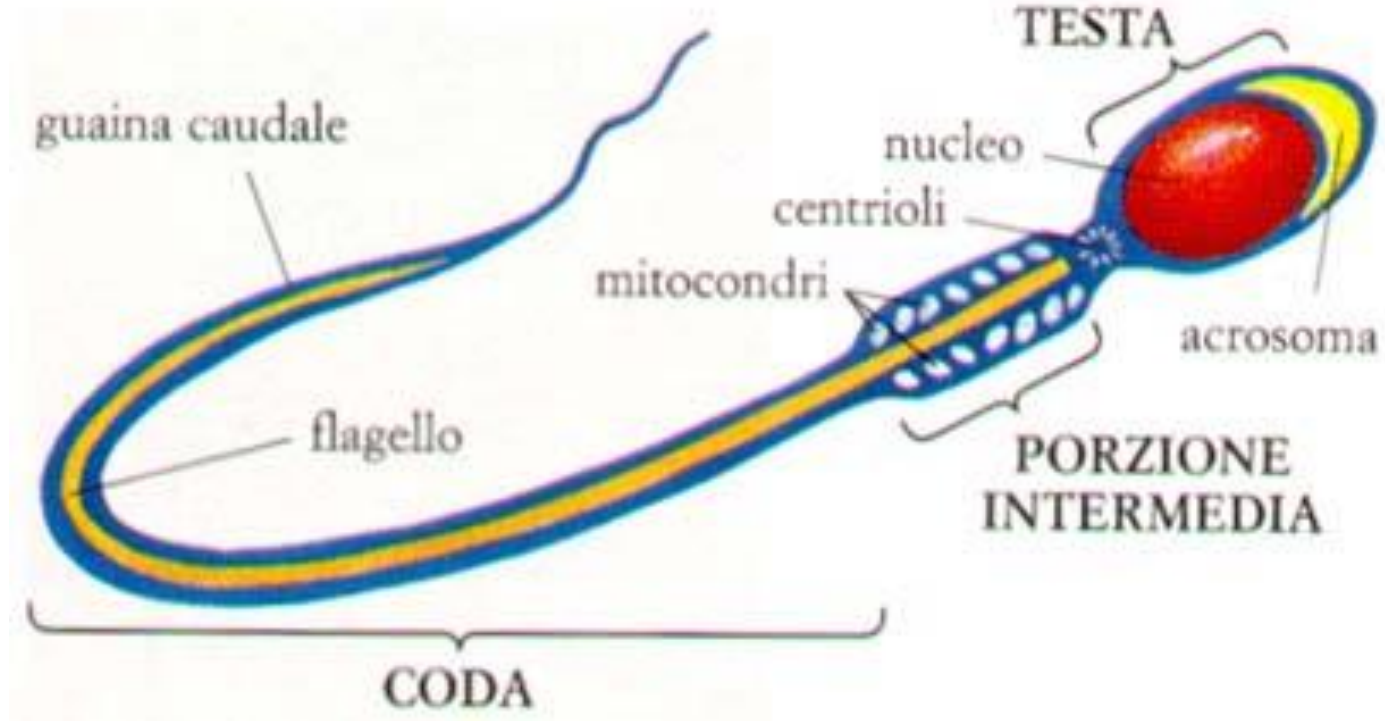
(c) Anafase I



(d) Metafase II



# SPERMATOOZOO MATURO



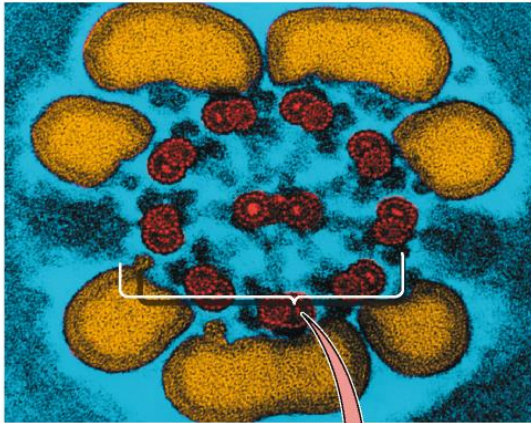
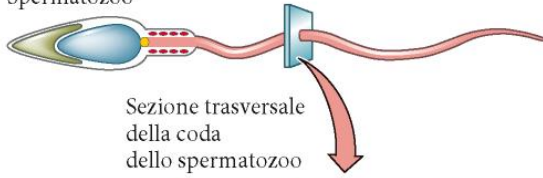
- Nucleo aploide molto condensato (istoni sostituiti con protammine)
- Citoplasma quasi assente
- Vescicola acrosomale: struttura derivata dal Golgi contentente enzimi degradativi
- Flagello e mitocondri per il movimento

# Flagello

**Microtubuli: tubulina e dineina**

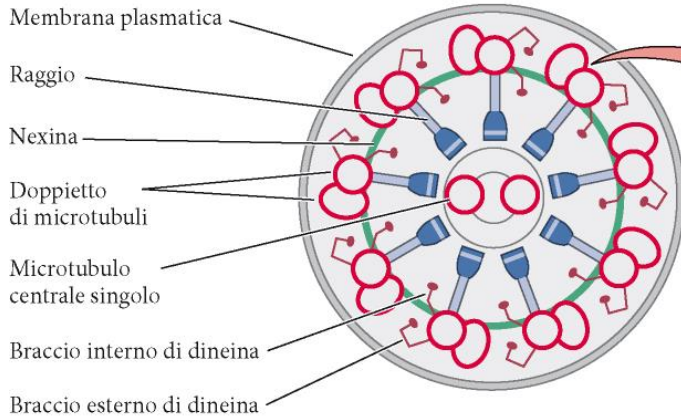
Motilità acquisita a contatto con l'esterno (acqua: fecondazione esterna, epididimo: fecondazione interna)

(A) Spermatozoo



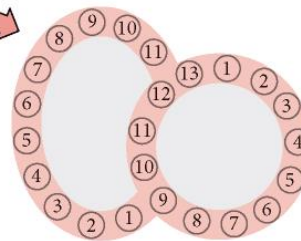
(B)

Assonema



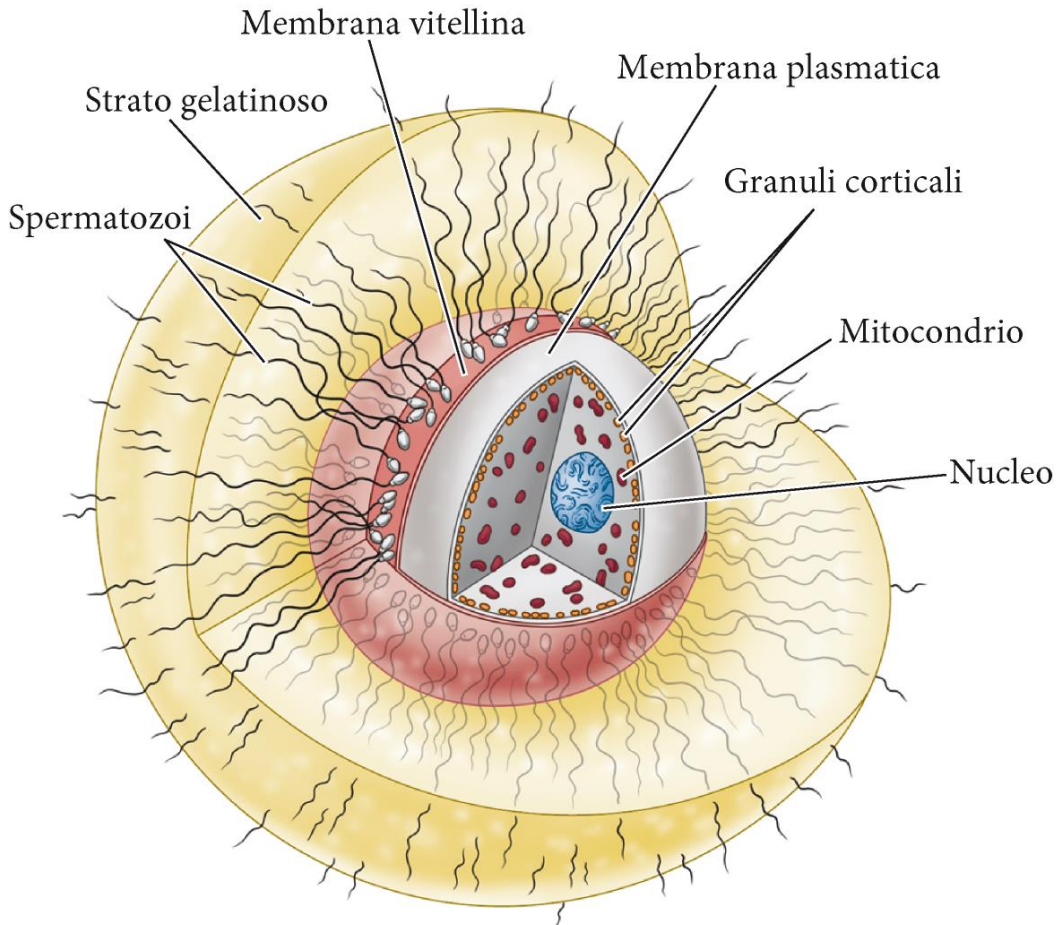
(C)

Doppietto di microtubuli



# STRUTTURA DELL'UOVO

- Nucleo non condensato aploide (prima o dopo la fecondazione)
- Abbondante citoplasma ricco di tutto il necessario per iniziare lo sviluppo (sintetizzato o acquisito):



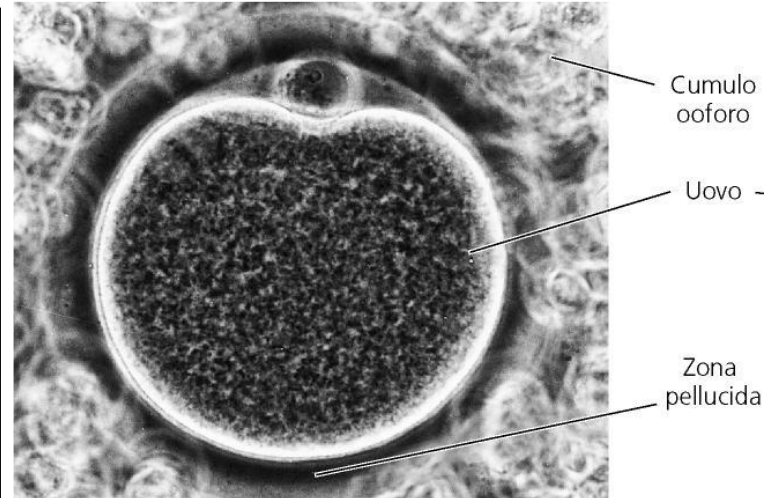
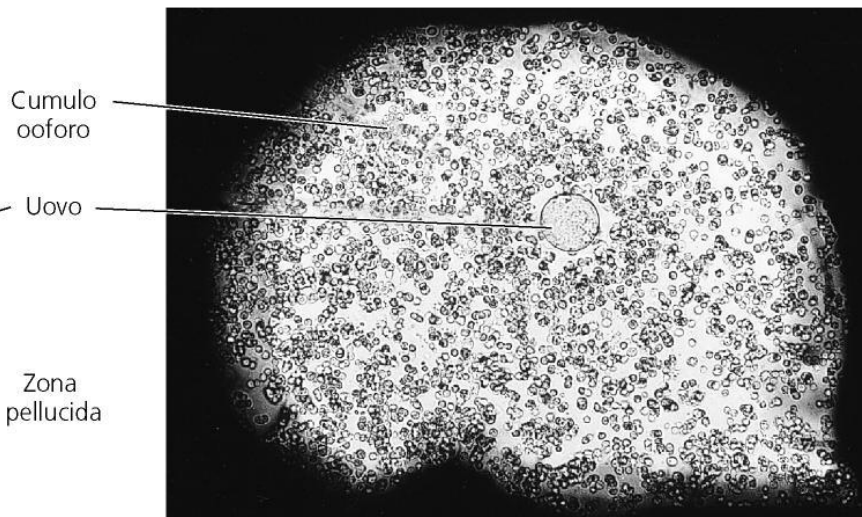
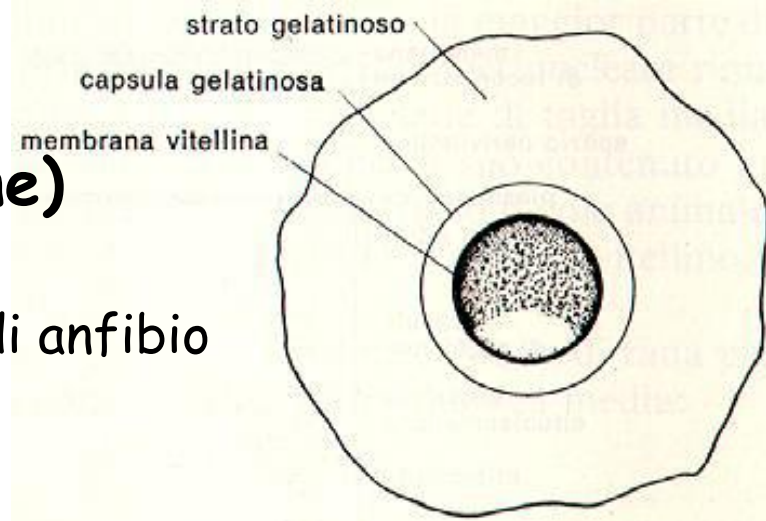
- Proteine per il nutrimento
- RNA messaggeri, Ribosomi e tRNA
- Fattori morfogenetici (es.: fattori trascrizionali)
- Sostanze chemioprotettive (es: a raggi UV o a predatori)



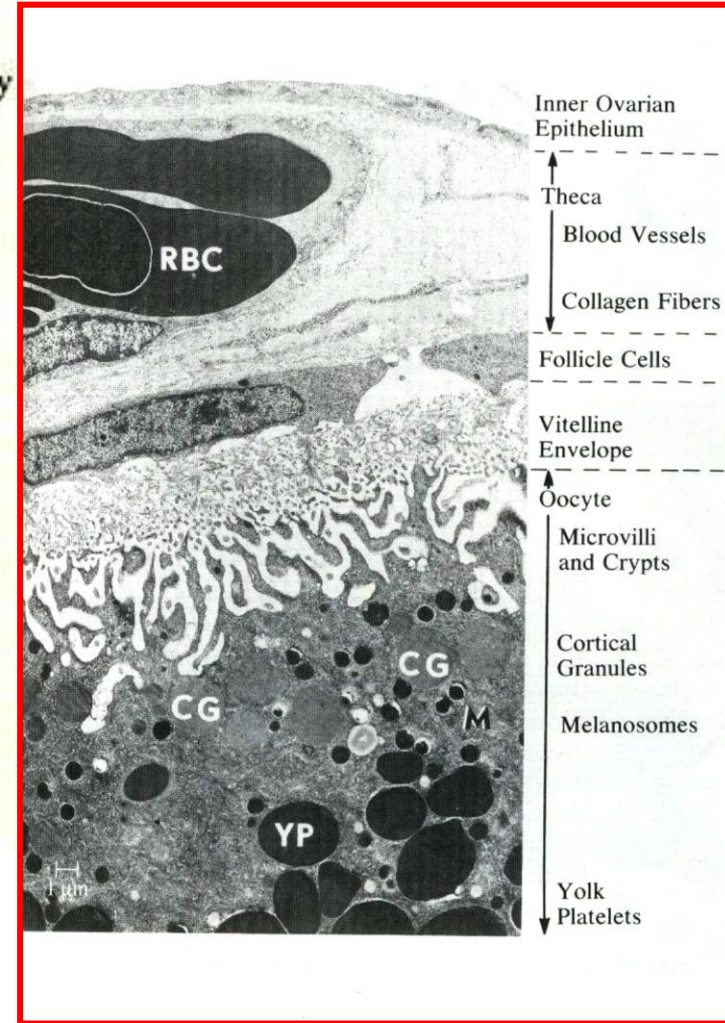
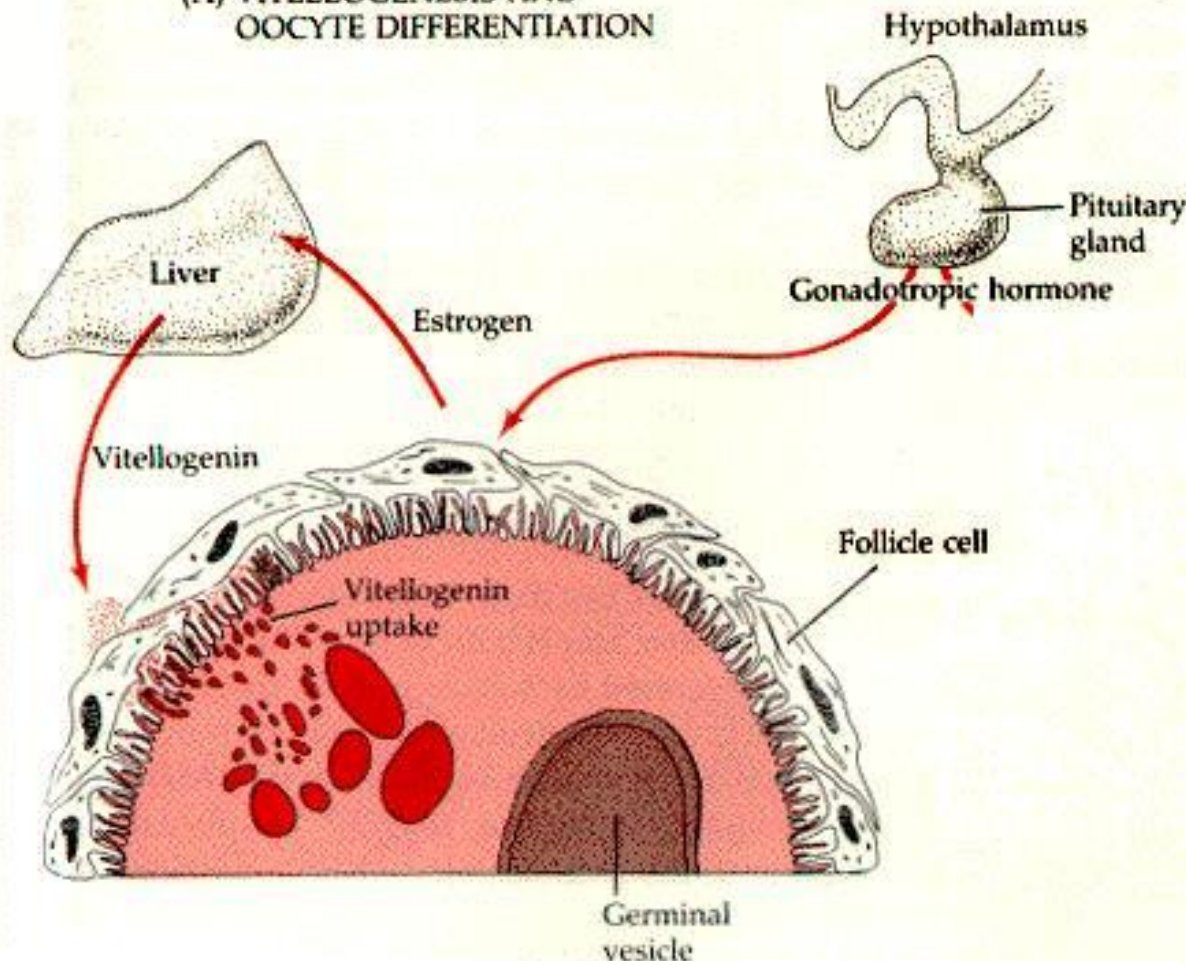
# INVOLUCRI DELL'OOCITA (protezione, ruolo nella fecondazione)

- Primari:
  - membrana vitellina,
  - + guscio gelatinoso (Anfibi)
  - zona pellucida (Mammiferi)
- Secondari:
  - albume, guscio (Rettili, Uccelli)
  - cumulo ooforo, formato da cellule follicolari

Uovo di anfibio



(A) VITELLOGENESIS AND OOCYTE DIFFERENTIATION

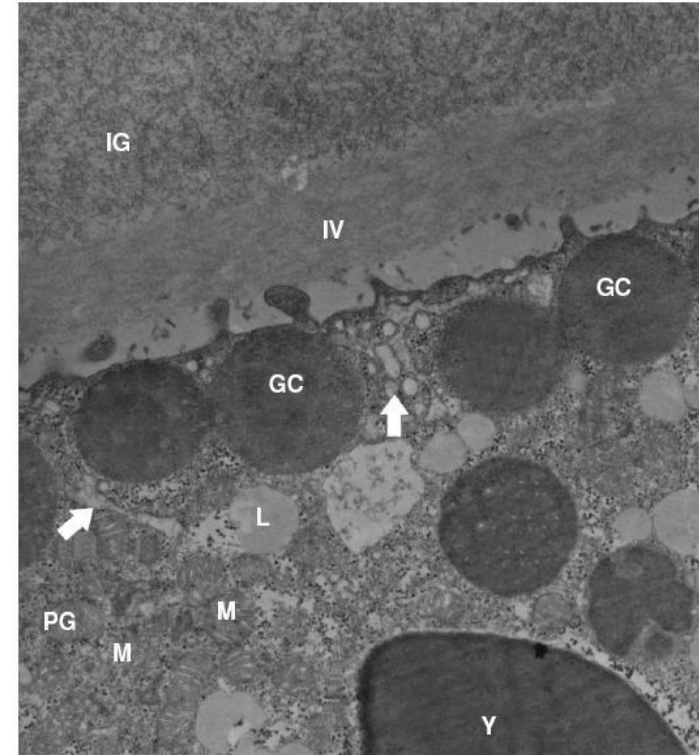
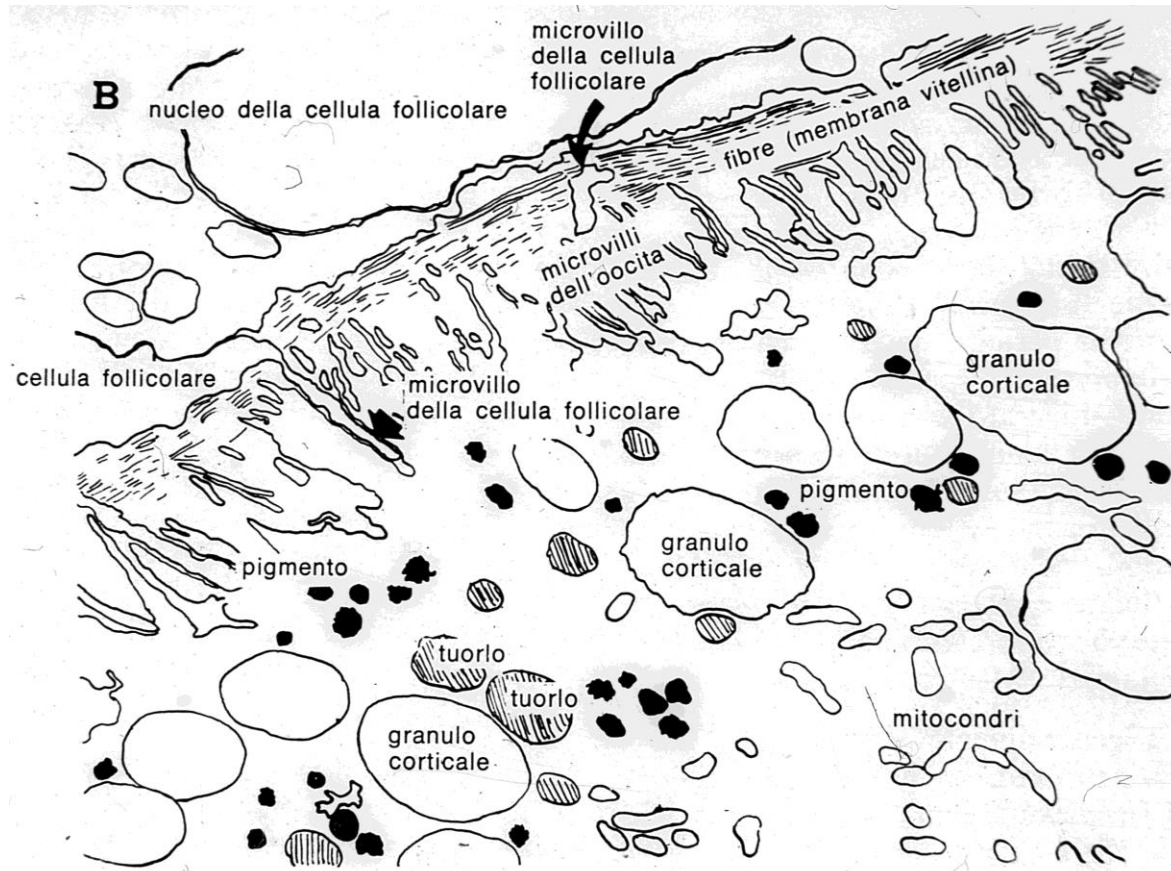


Il principale componente del tuorlo è una proteina chiamata **vitellogenina**.

Nella rana questa è sintetizzata dal fegato e trasportata nell'ovario dal flusso sanguigno. Viene incorporata dall'ocita mediante micropinocitosi.

# Granuli Corticali:

- Contengono enzimi lisosomiali e glicoproteine necessari subito dopo la fecondazione
- Derivano dal Golgi

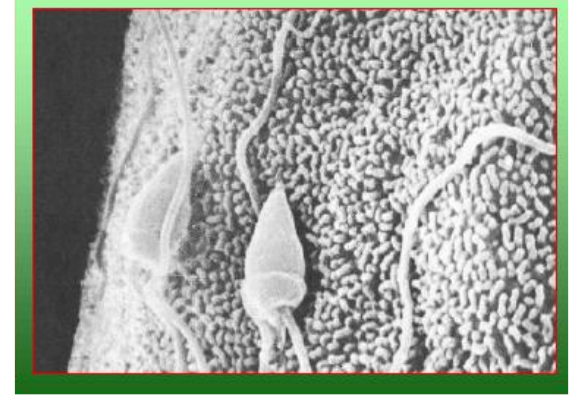


**Figura 3.32** Immagine al microscopio elettronico a trasmissione di un ovocita di *Xenopus laevis*. Nel cortex ovocitario è evidente una fila di granuli corticali circondati da cisterne di reticolo endoplasmatico liscio (frecche). Nella regione sottocorticale si riconosce il plasma germinale (PG), costituito da masse elettrondense circondate da numerosi mitocondri (M). Notare infine la presenza di liposomi (L) e di una placchetta di vitello (Y). IV = involucro vitellino; IG = involucro gelatinoso.

# FECONDAZIONE

## EVENTI:

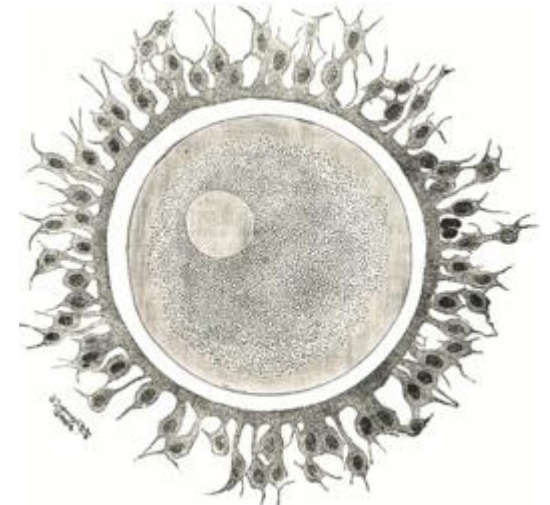
- RICONOSCIMENTO TRA SPERMATOZOO E UOVO  
(+EVITARE FECONDAZIONI CROSS-SPECIE)
- PENETRAZIONE DELLO SPERMATOZOO  
NELL'UOVO  
(+EVITARE CHE NE ENTRI PIU' DI 1)
- UNIONE DEI PATRIMONI GENETICI  
(RISTABILIRE LA DIPLOIDIA)
- ATTIVAZIONE DEL METABOLISMO DELL'UOVO  
(INIZIO DELLO SVILUPPO)



**Fecondazione esterna:  
Riccio di mare**



**Fecondazione interna:  
Topo**



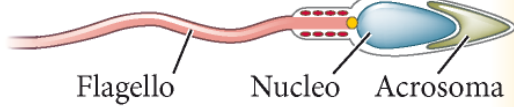
Membrana plasmatica dell'uovo

Zona pellucida (matrice extracellulare)

Strato del cumulo ooforo (rivestimento extracellulare)

(B) TOPO

1 Lo spermatozoo viene attivato nel tratto genitale femminile



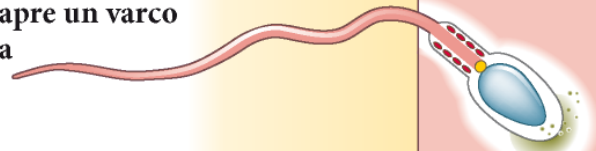
2 Lo spermatozoo si lega alla zona pellucida



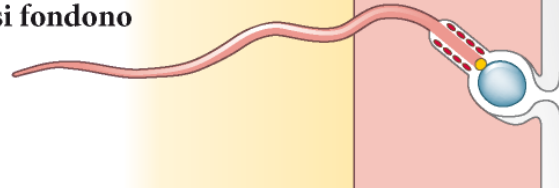
3 Reazione acrosomale



4 Lo spermatozoo si apre un varco nella zona pellucida



5 Le membrane plasmatiche di spermatozoo e uovo si fondono



Membrana plasmatica dell'uovo

Strato gelatinoso (involucro extracellulare)

Centriolo Actina Membrana vitellina (matrice extracellulare)  
Nucleo Acrosoma

(A) RICCIO DI MARE

1 Lo spermatozoo prende contatto con l'involucro gelatinoso



2 Reazione acrosomale

Processo acrosomale



3 Digestione dell'involucro gelatinoso



4 Legame alla membrana vitellina



5 Fusione della membrana plasmatica del processo acrosomale con quella dell'uovo



# Fecondazione esterna

## Problemi:

- Diluizione dei gameti
- Fusione di gameti di specie differente
- Polispermia

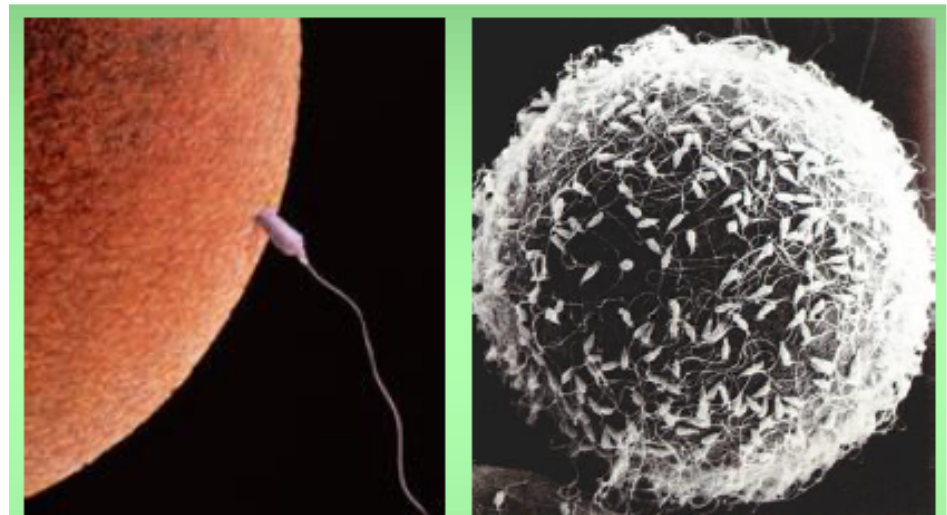


## Soluzioni:

- Aumentare il numero di gameti prodotti
- Permettere una attrazione tra spermatozoi e uova
- Garantire un riconoscimento specie-specifico
- Modificare la membrana dell'uovo dopo la fecondazione

# RICONOSCIMENTO TRA SPERMATOZOO E UOVO

- **CHEMIOATTRAZIONE**
- **LEGAME ALLA MATRICE EXTRACELLULARE**
- **REAZIONE ACROSOMALE PER PASSARE ATTRAVERSO LA MATRICE EXTRACELLULARE E LEGARE LA MEMBRANA DELL'UOVO**
- **FUSIONE DELLE MEMBRANE DI SPERMATOZOO E UOVO**

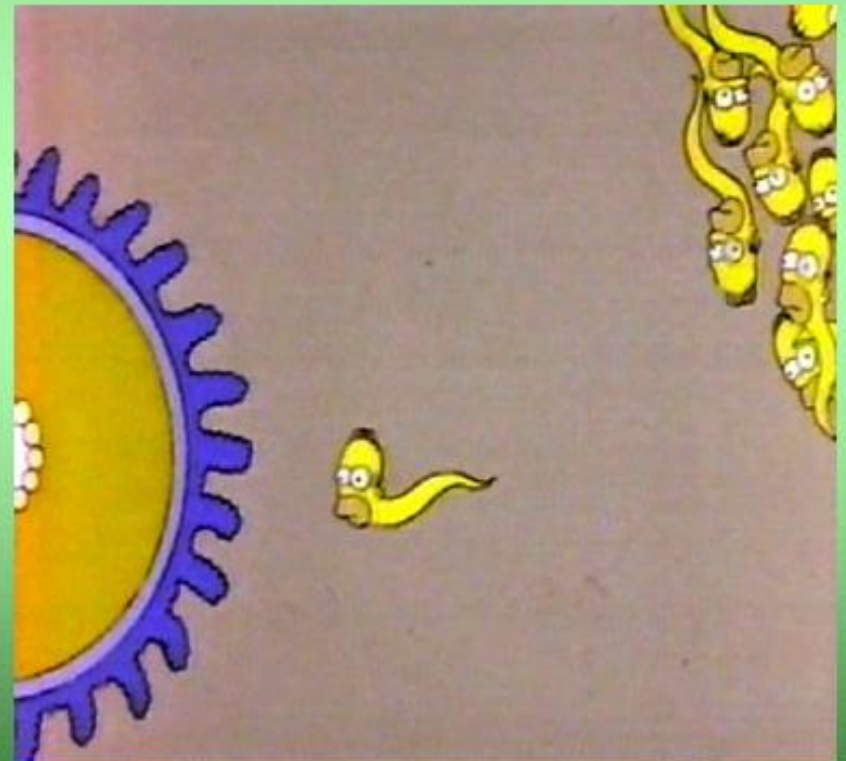




# FECONDAZIONE

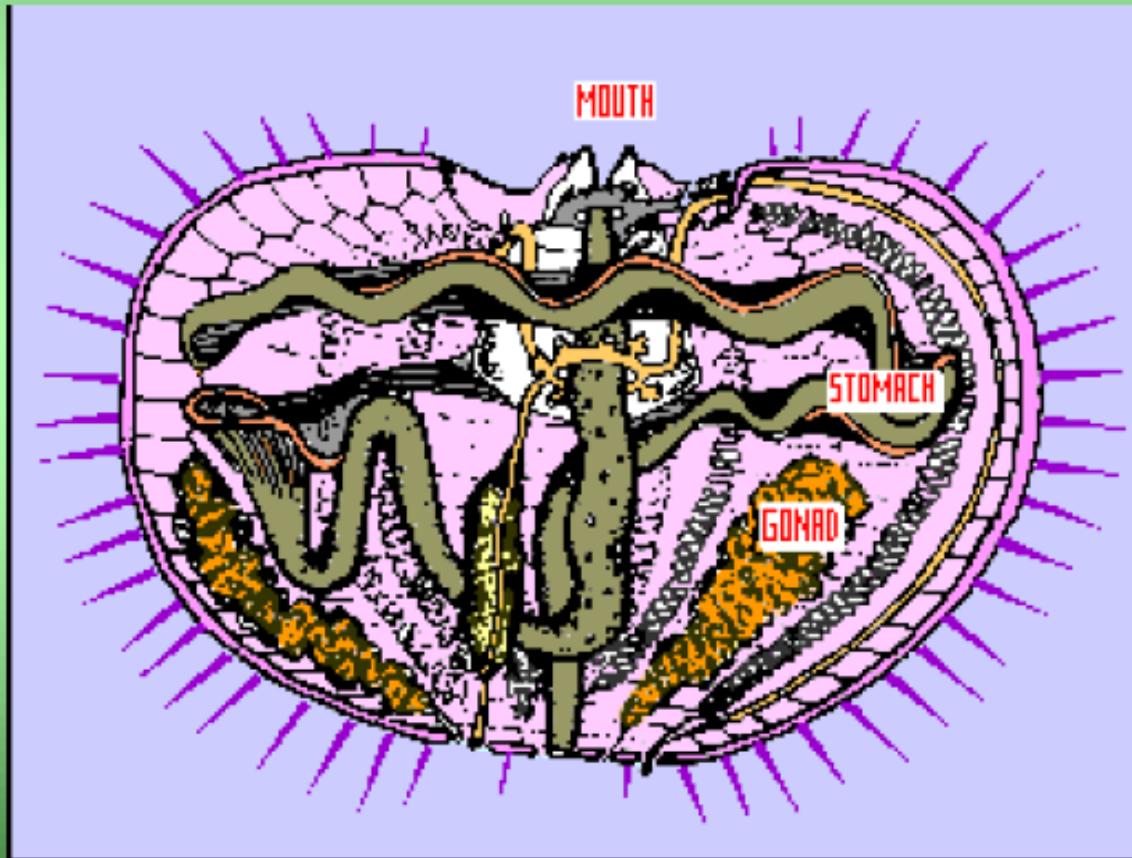
## RICONOSCIMENTO A DISTANZA

- Particolarmente importante per le specie a fecondazione esterna
- E' guidato da sostanze rilasciate dall'uovo o dai tessuti genitali femminili
- Coinvolge modificazioni soprattutto a carico dello spermatozoo
- Deve essere altamente specie-specifico



# FECONDAZIONE

## GAMETI DI RICCIO DI MARE



*E' sufficiente  
iniettare una  
soluzione di  
KCl 0.5 M per  
ottenere  
l'emissione  
dei gameti*

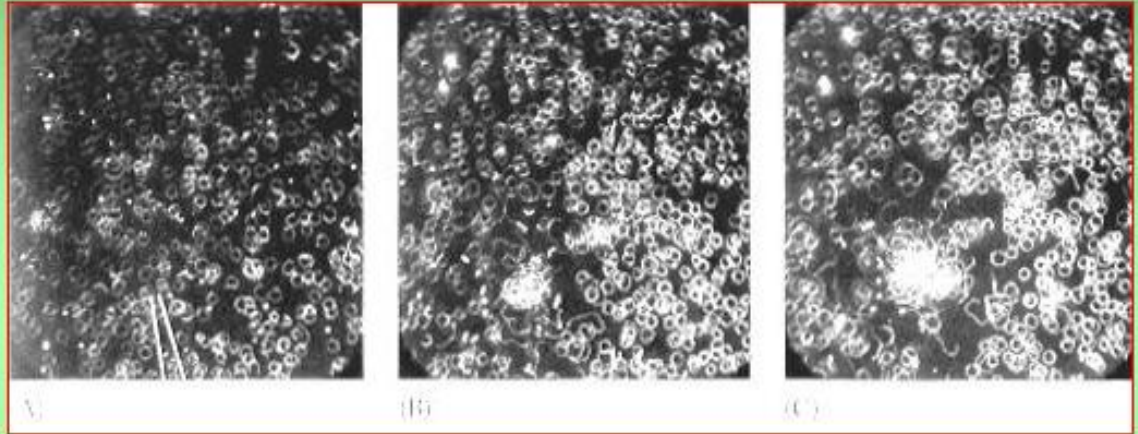
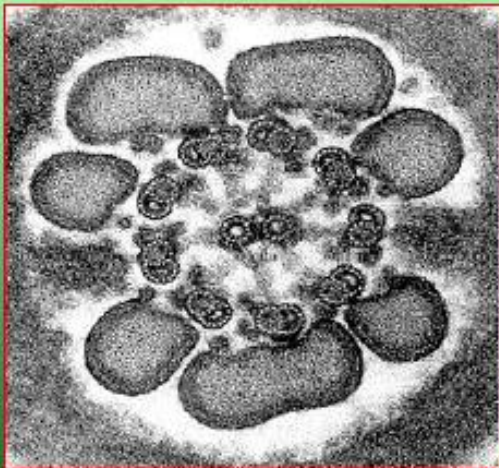
# FECONDAZIONE

## RICONOSCIMENTO A DISTANZA

CHEMIOTASSI  
NEL RICCIO DI  
MARE



Aumento motilità  
spermatozoo



Una sostanza (resact) presente nel guscio gelatinoso dell'uovo è in grado di attrarre gli spermatozoi

### MECCANISMI

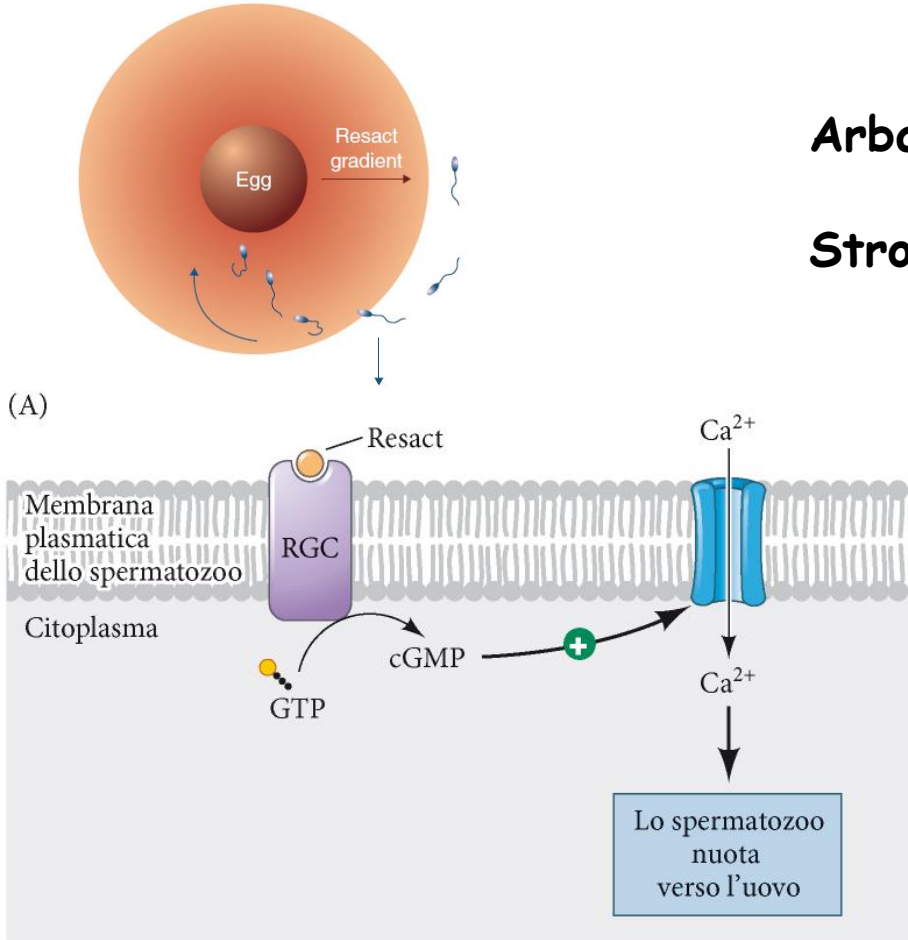
- *Interazione ligando-recettore*
- *Trasduzione del segnale*
- *Attivazione dineina*
- *Aumento metabolismo ossidativo*

Speract (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) or resact (Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>)

# Meccanismo molecolare delle sostanze chemioattrattanti

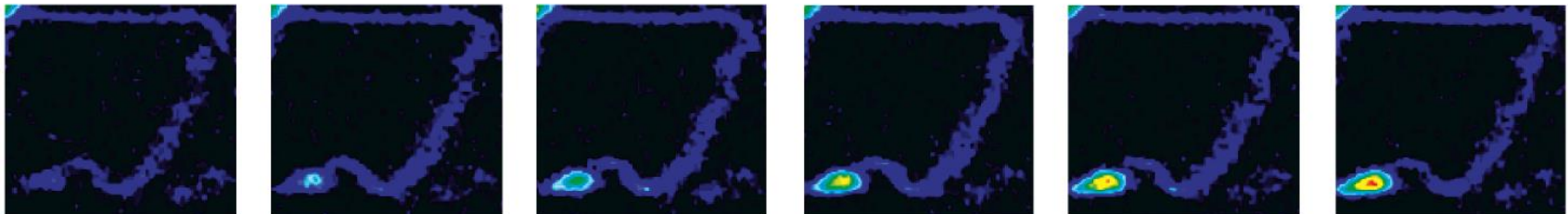
Arbacia punctulata: resact

Strongylocentrotus purpuratus: speract



Il Ca<sup>2+</sup> stimola il motore del flagello (la dineina) e la produzione di energia (ATP mitocondriale)

(B)



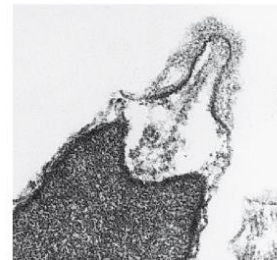
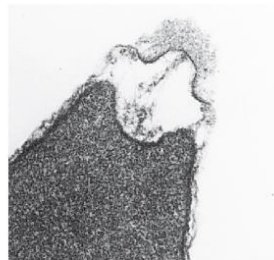
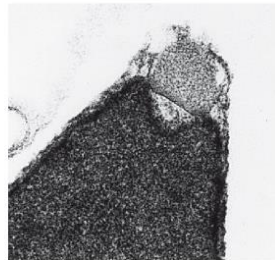
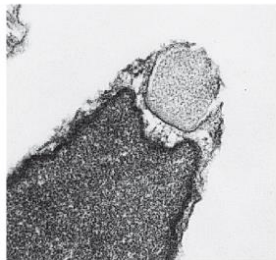
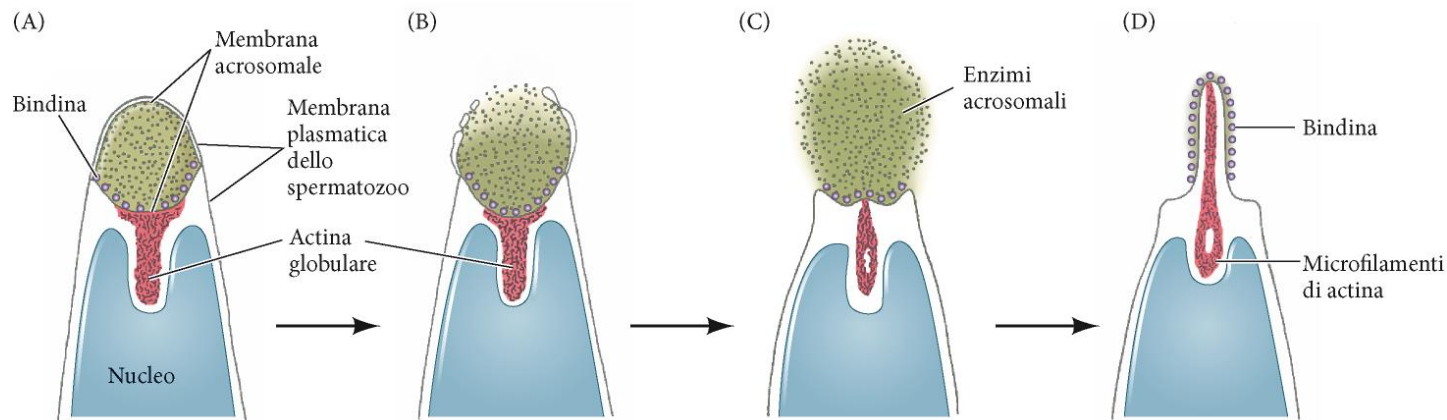
0 —————> 1 secondo

# Fecondazione

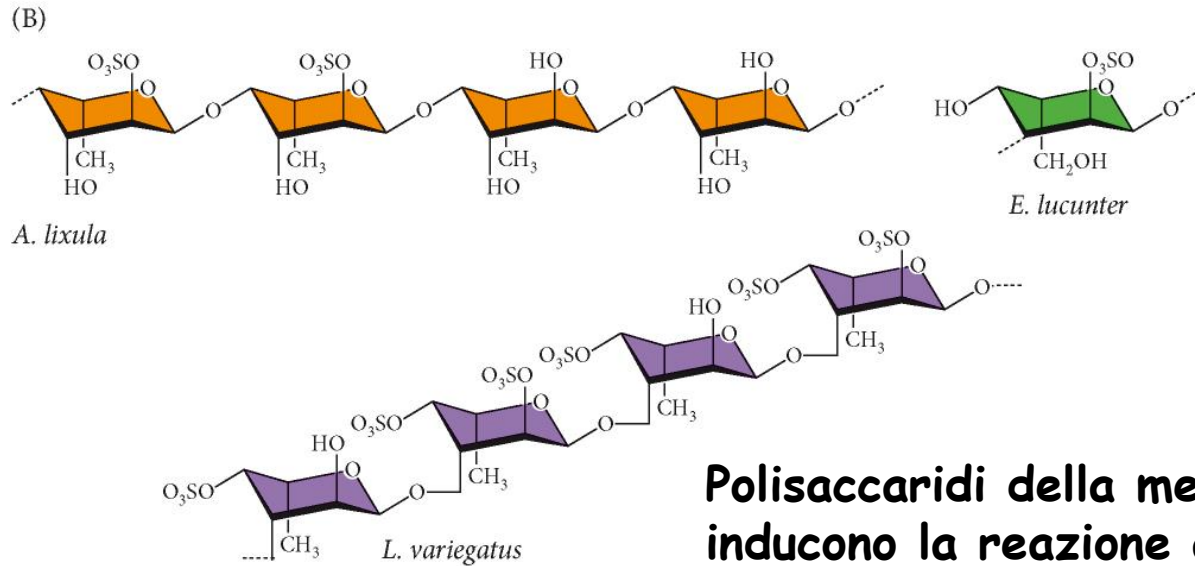
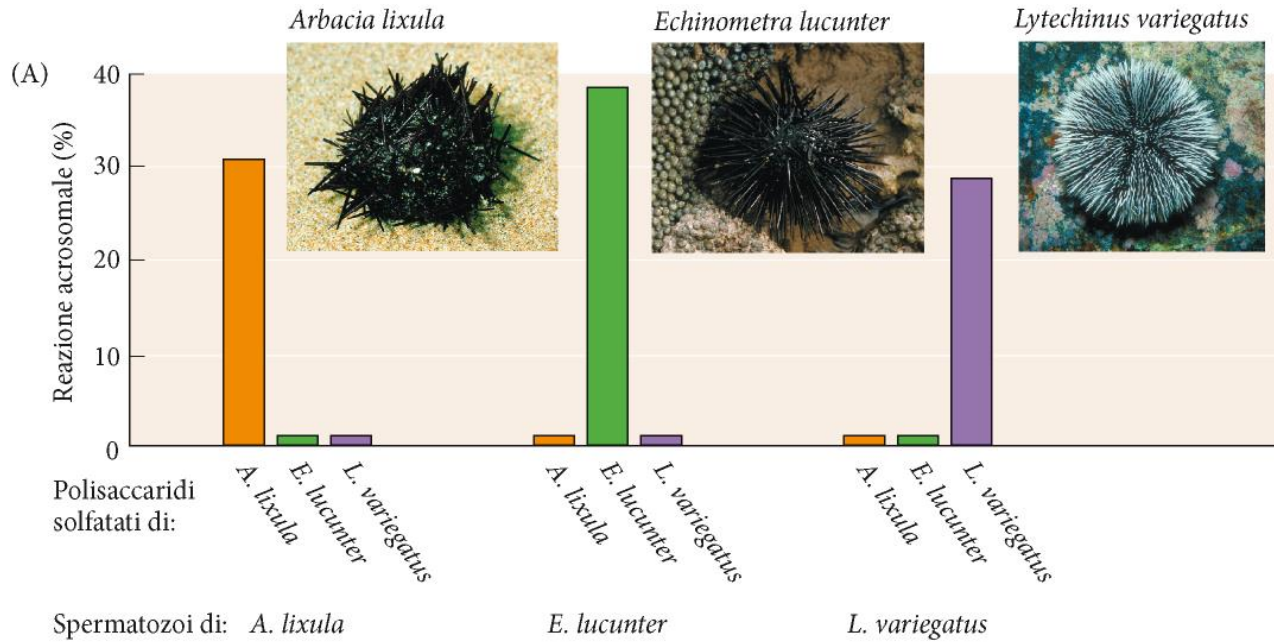
## Contatto e attivazione dello Spermatozoo

Contatto dello spermatozoo con la membrana vitellina induce:

- Esocitosi acrosoma
- Polimerizzazione actina
- Protrusione del processo acrosomale
- Esposizione della Bindina
- Legame della Bindina con un recettore sulla cellula uovo



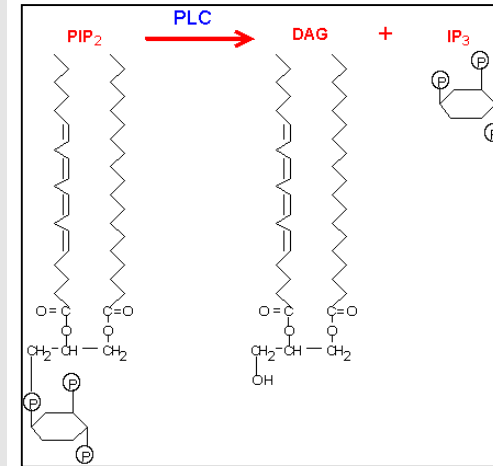
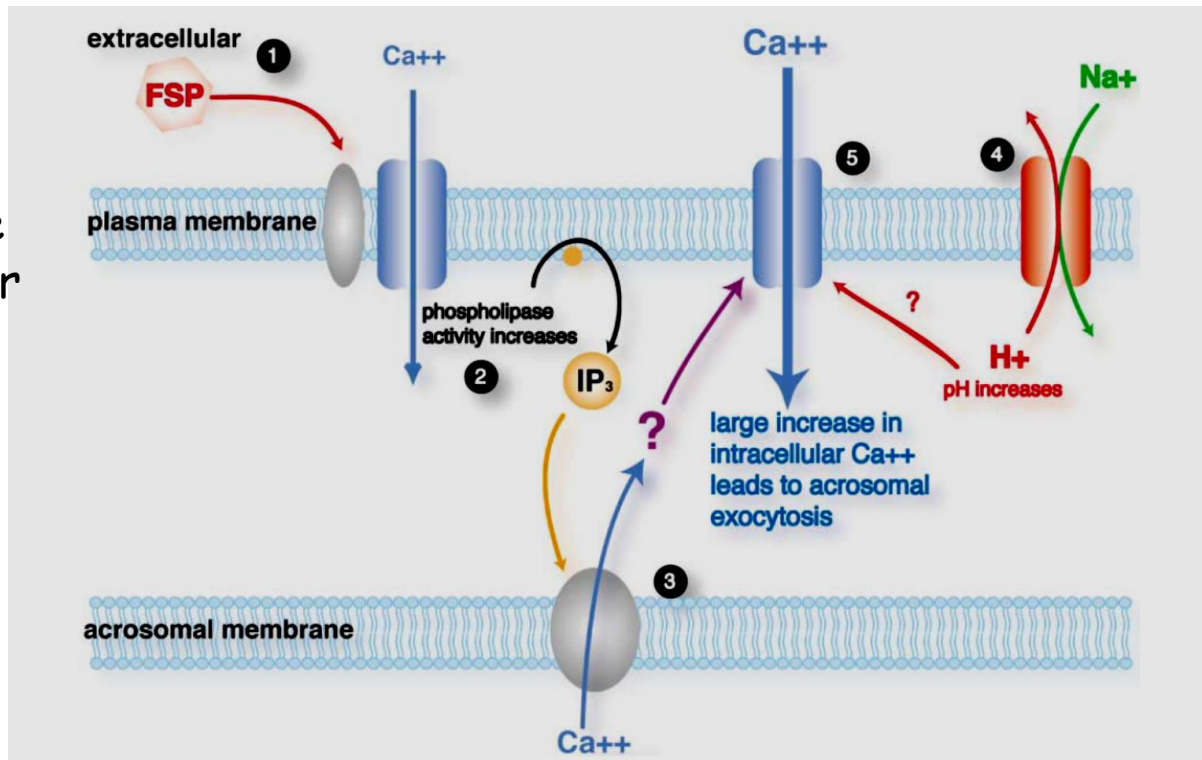
# Specie-specificità dell'induzione della reazione acrosomale



**Polisaccaridi della membrana vitellina inducono la reazione acrosomale**

# Meccanismo molecolare della reazione acrosomiale nel riccio di mare

fucose sulfate polymer (FSP)



Ca<sup>2+</sup> induce la fusione delle membrana acrosomiale con la membrana plasmatica

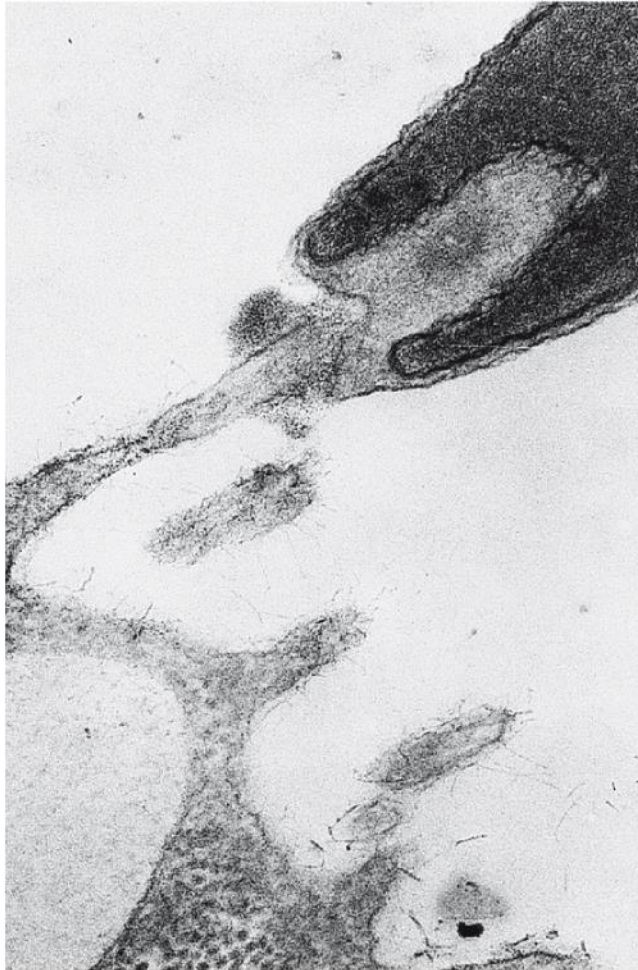
Rilascio enzimi litici

Esposizione della bindina

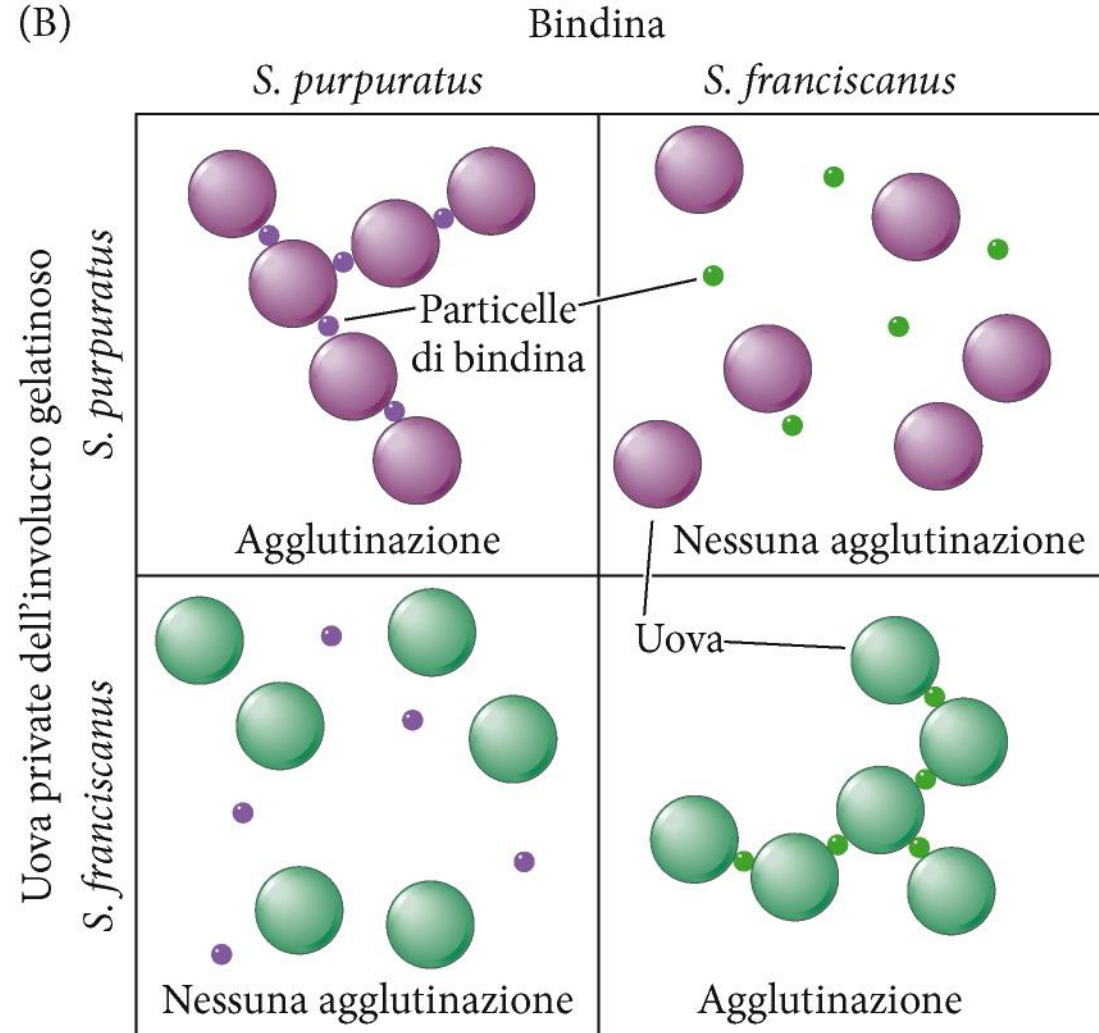
Polimerizzazione dell'actina (dipende dal cambio di pH e dal Ca<sup>2+</sup> che attiva RhoB)

# La bindina media il legame dello spermatozoo alla membrana vitellina in maniera specie specifica

(A)



(B)

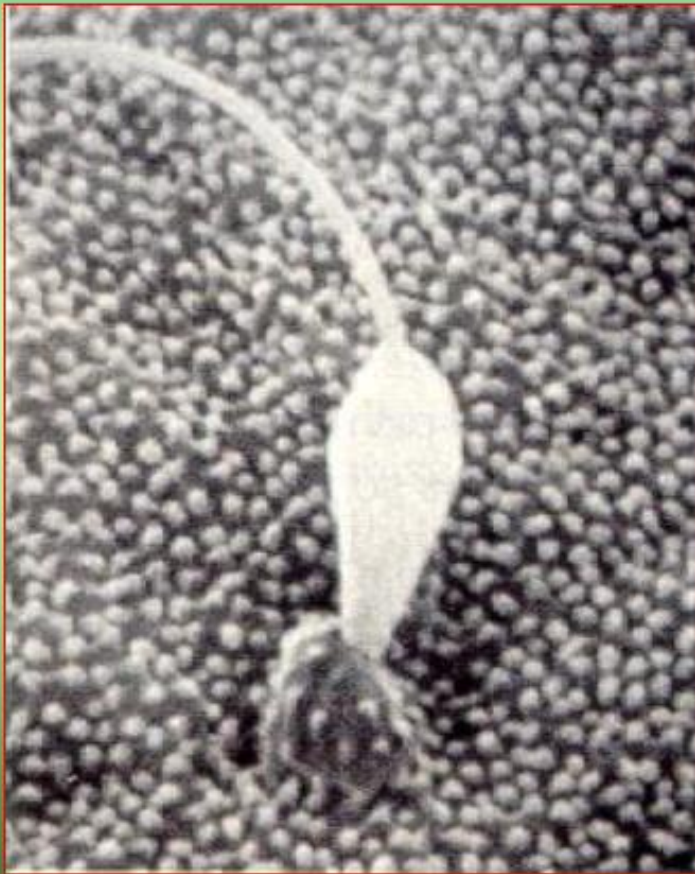




# FECONDAZIONE

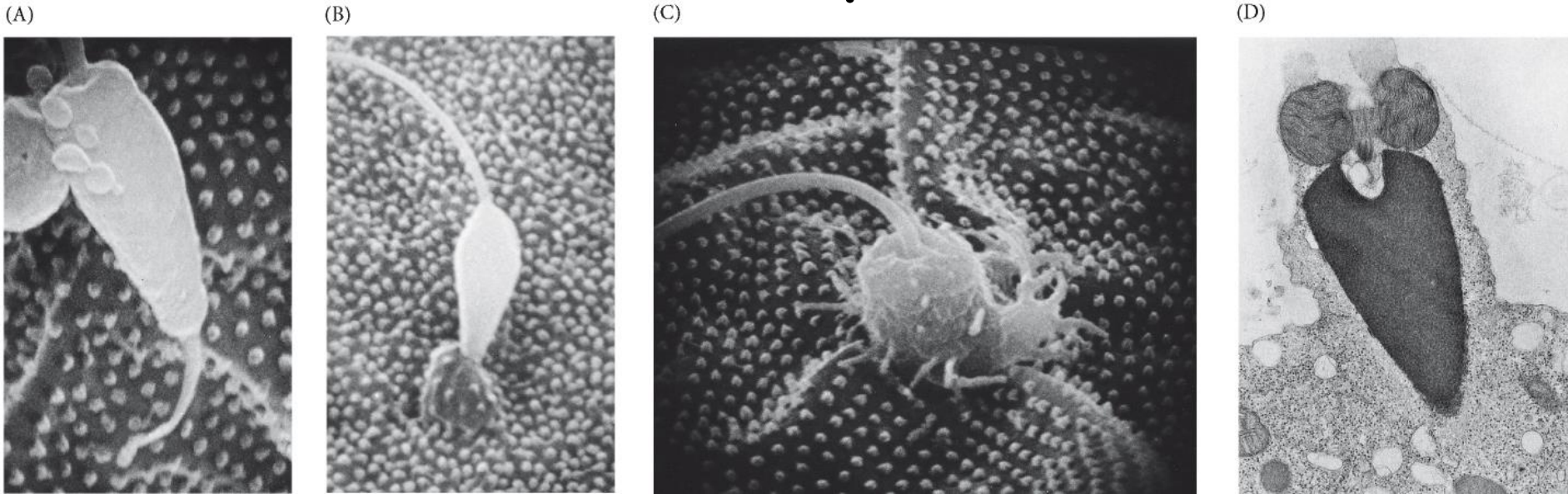
FUSIONE DELLE MEMBRANE PLASMATICHE

CONO DI FECONDAZIONE NEL RICCIO DI MARE



# Fecondazione

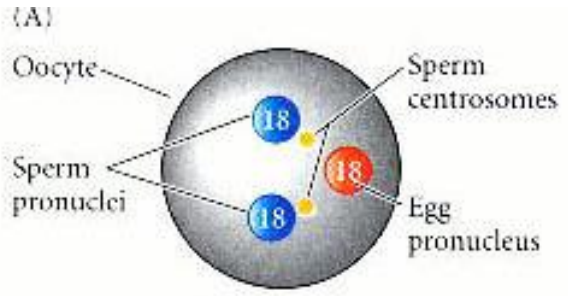
## Fusione delle membrane plasmatiche



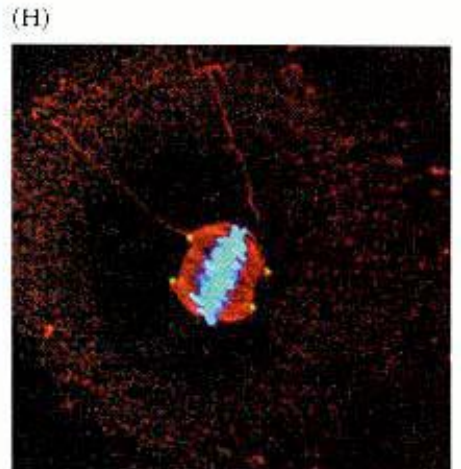
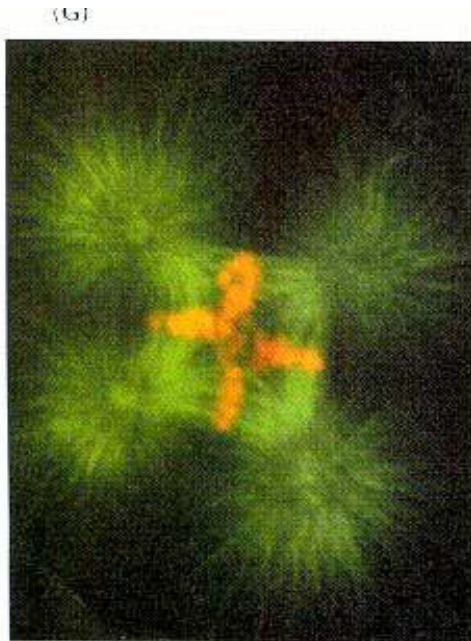
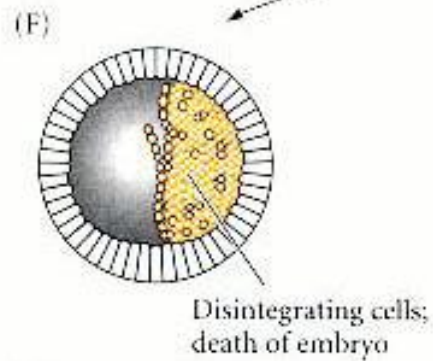
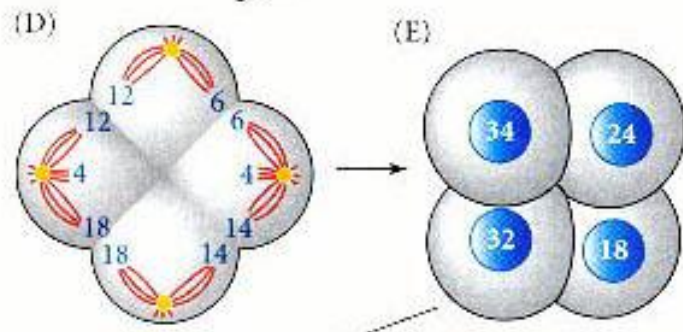
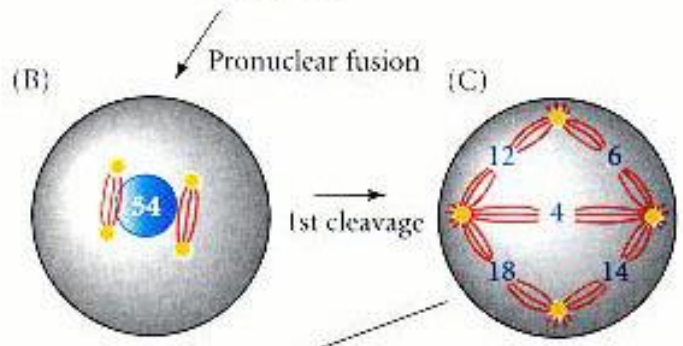
### Cono di fecondazione:

polimerizzazione actina al di sotto della membrana dell'uovo nel punto di contatto con lo spermatozoo per avvolgerlo e facilitarne l'ingresso

Possibile coinvolgimento della bindina anche nella fusione



# Il rischio durante la fecondazione: la polispermia



# FECONDAZIONE

## PREVENZIONE DELLA POLISPERMIA

### BLOCCO RAPIDO

- Legame sperma-uovo

Entrata  
Na<sup>+</sup>

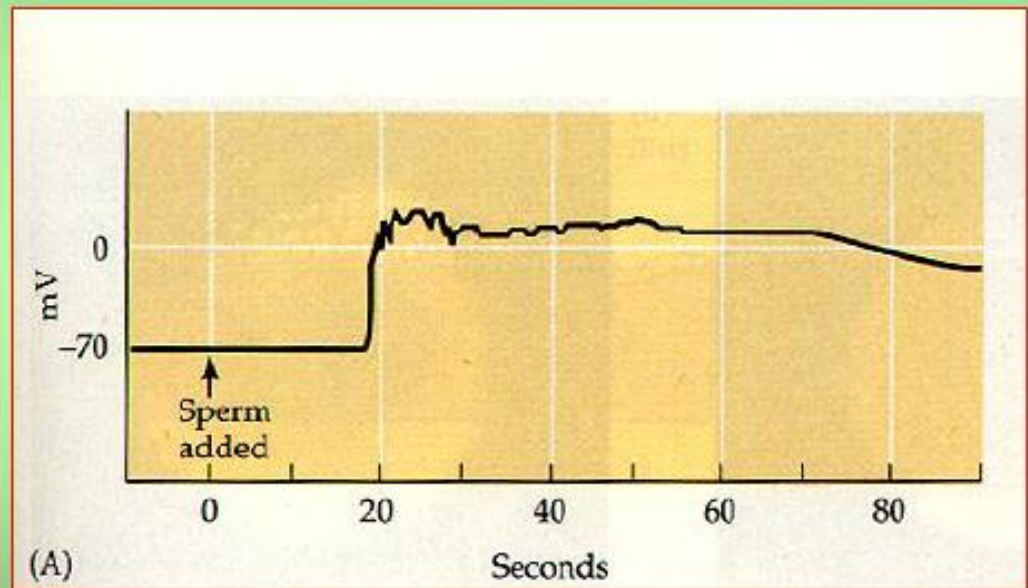


- Potenziale di membrana -70 mV

➡ +20mV



- Allontanamento degli altri spermatozoi (1')



# FECONDAZIONE

## PREVENZIONE DELLA POLISPERMIA

### BLOCCO LENTO

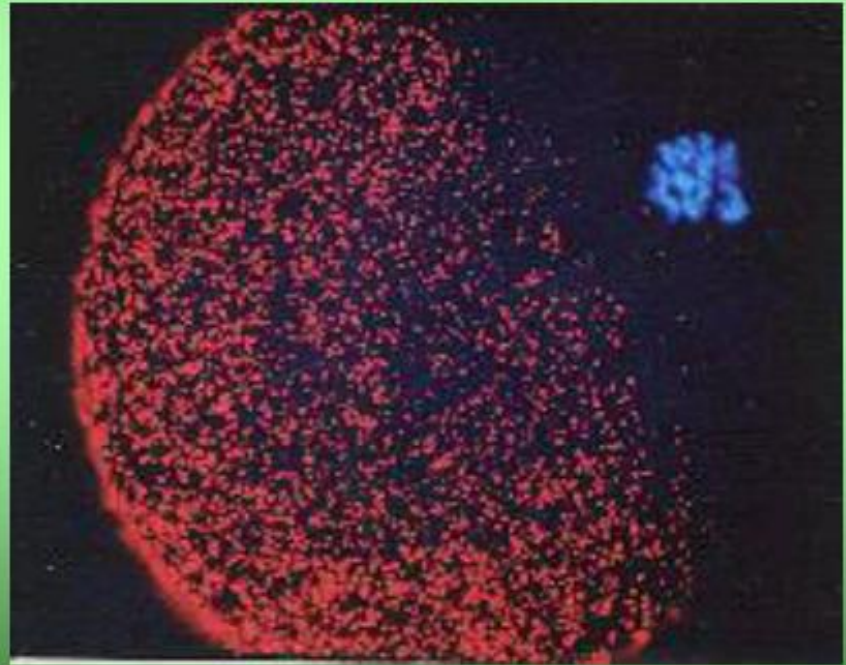
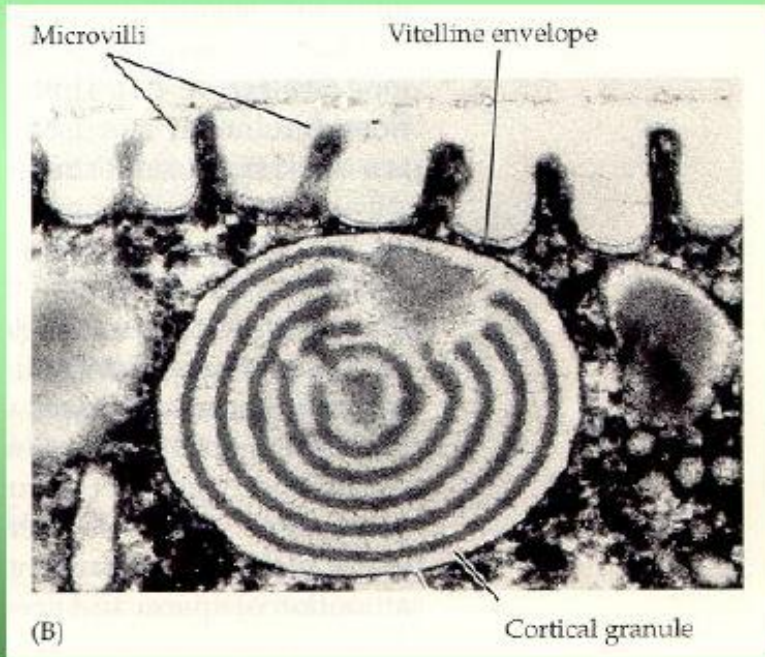
- Legame sperma-uovo
- Trasduzione del segnale
- Secondi messaggeri
- Onda di rilascio del  $Ca^{++}$  dal RE
- Esocitosi dei granuli corticali

### GRANULI CORTICALI

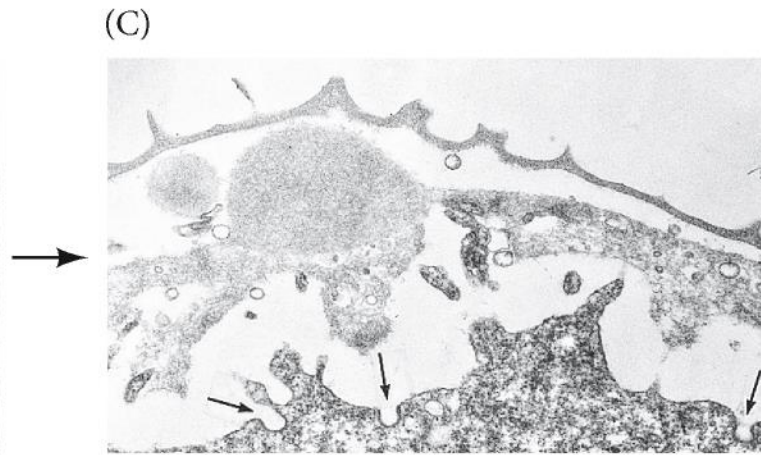
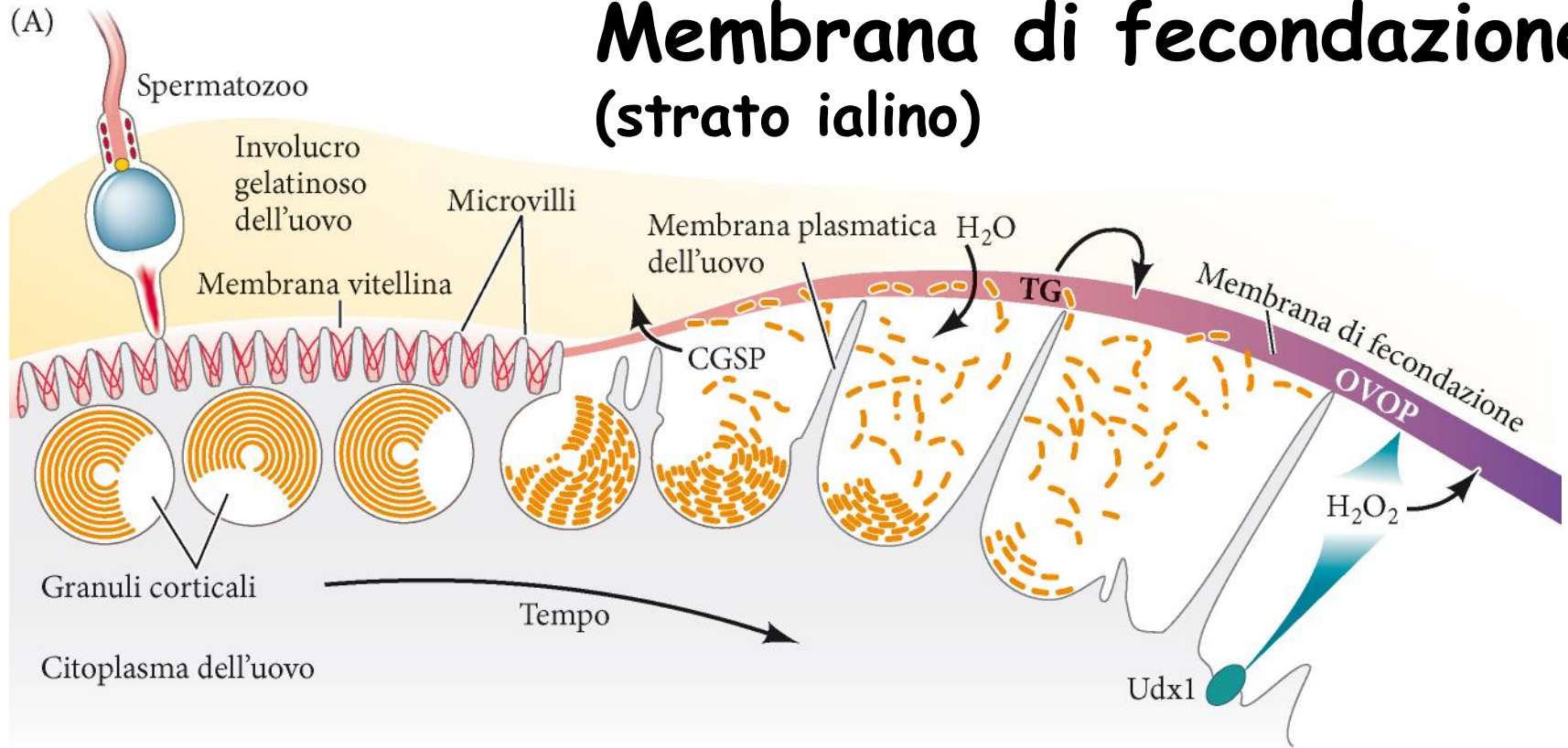
- Proteasi → distacco spermatozoi
- Mucopolisaccaridi → sollevamento involucro vitellino → distacco spermatozoi
- (Proteina ialina → strato ialino)

# FECONDAZIONE

## GRANULI CORTICALI

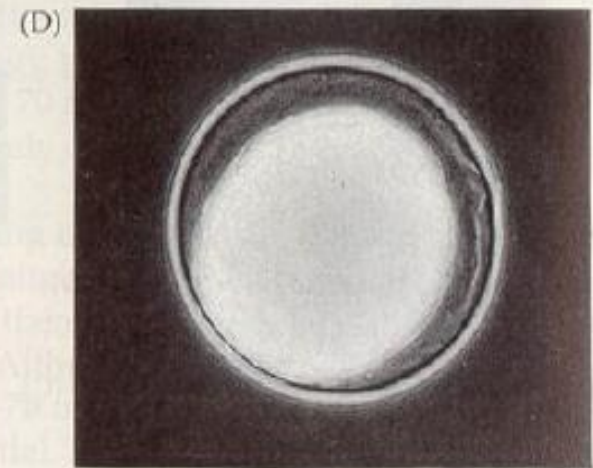
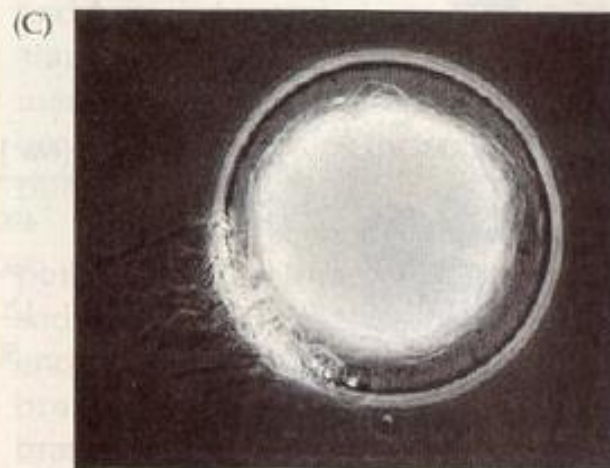
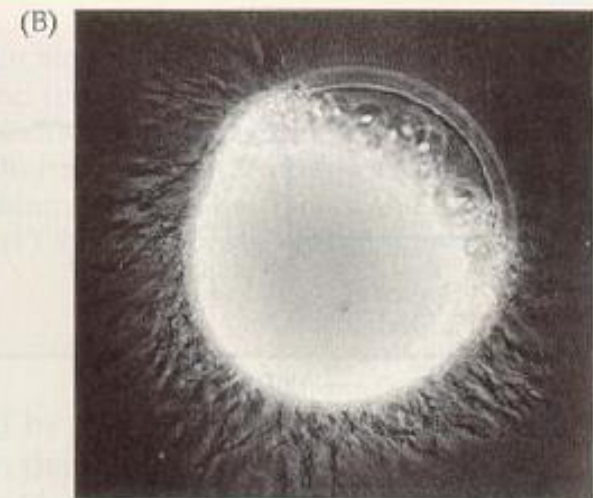
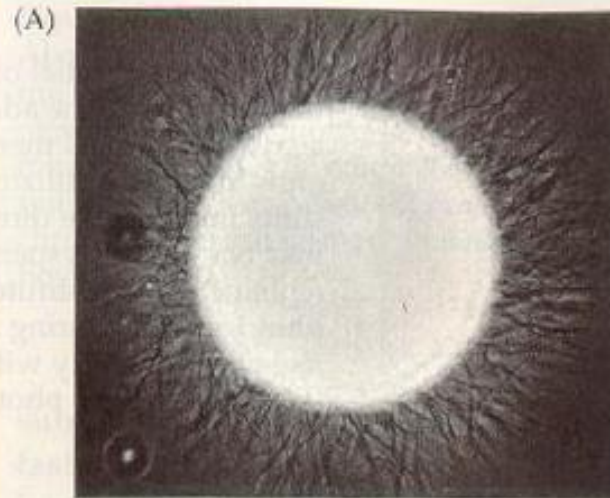
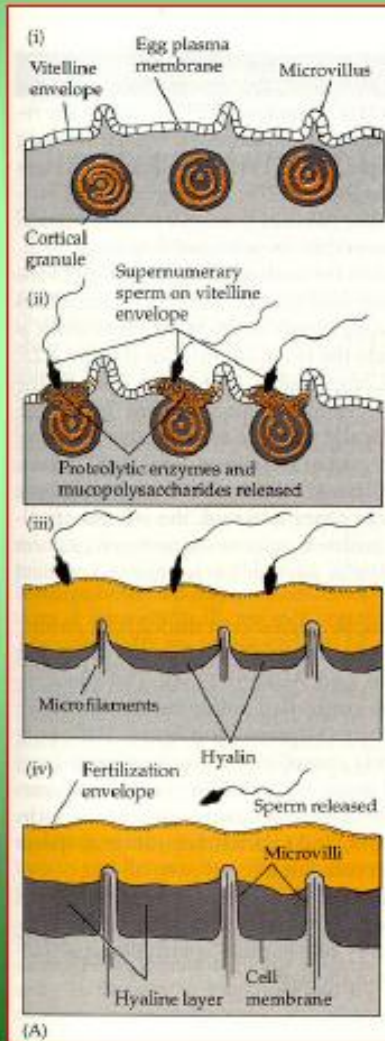


# Membrana di fecondazione (strato ialino)



# FECONDAZIONE

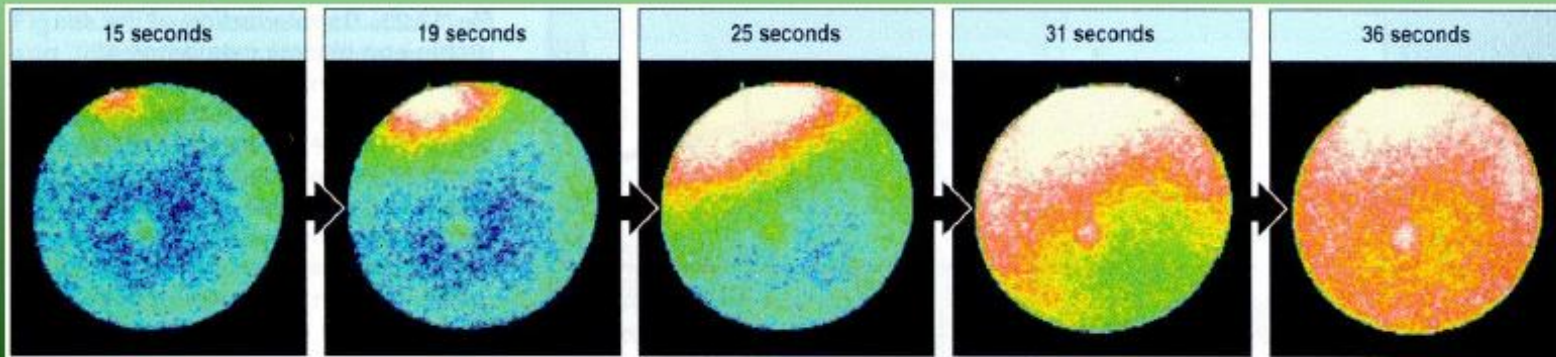
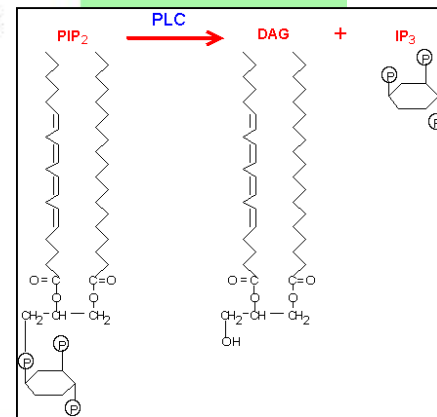
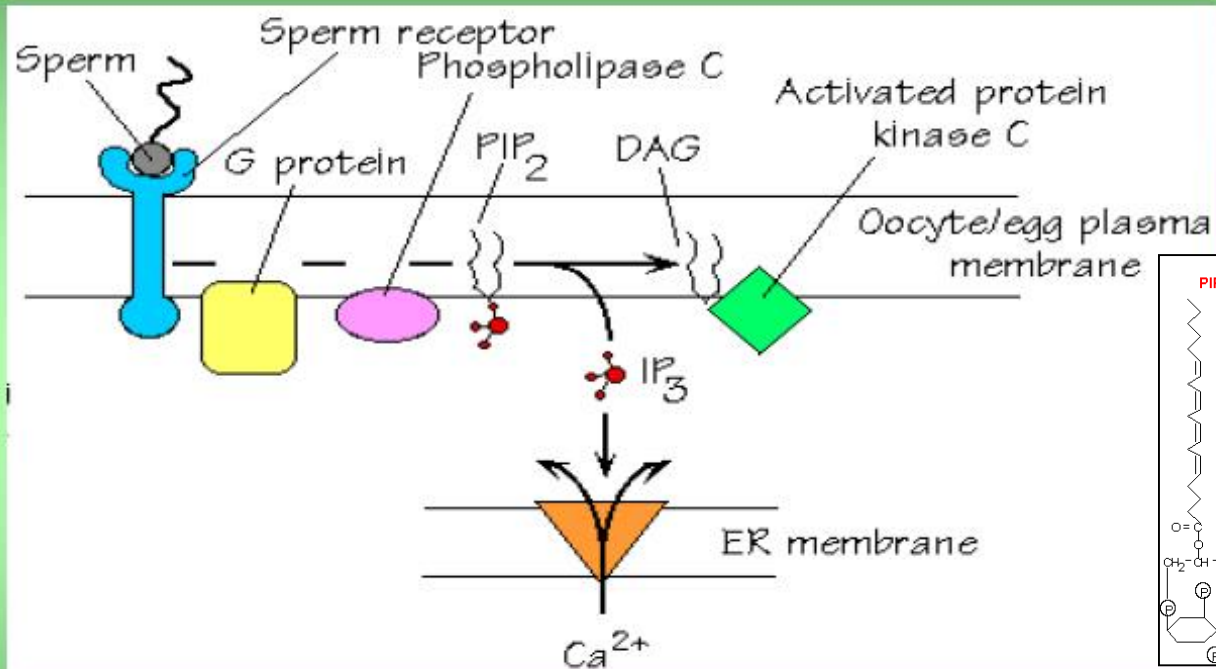
## PREVENZIONE DELLA POLISPERMIA



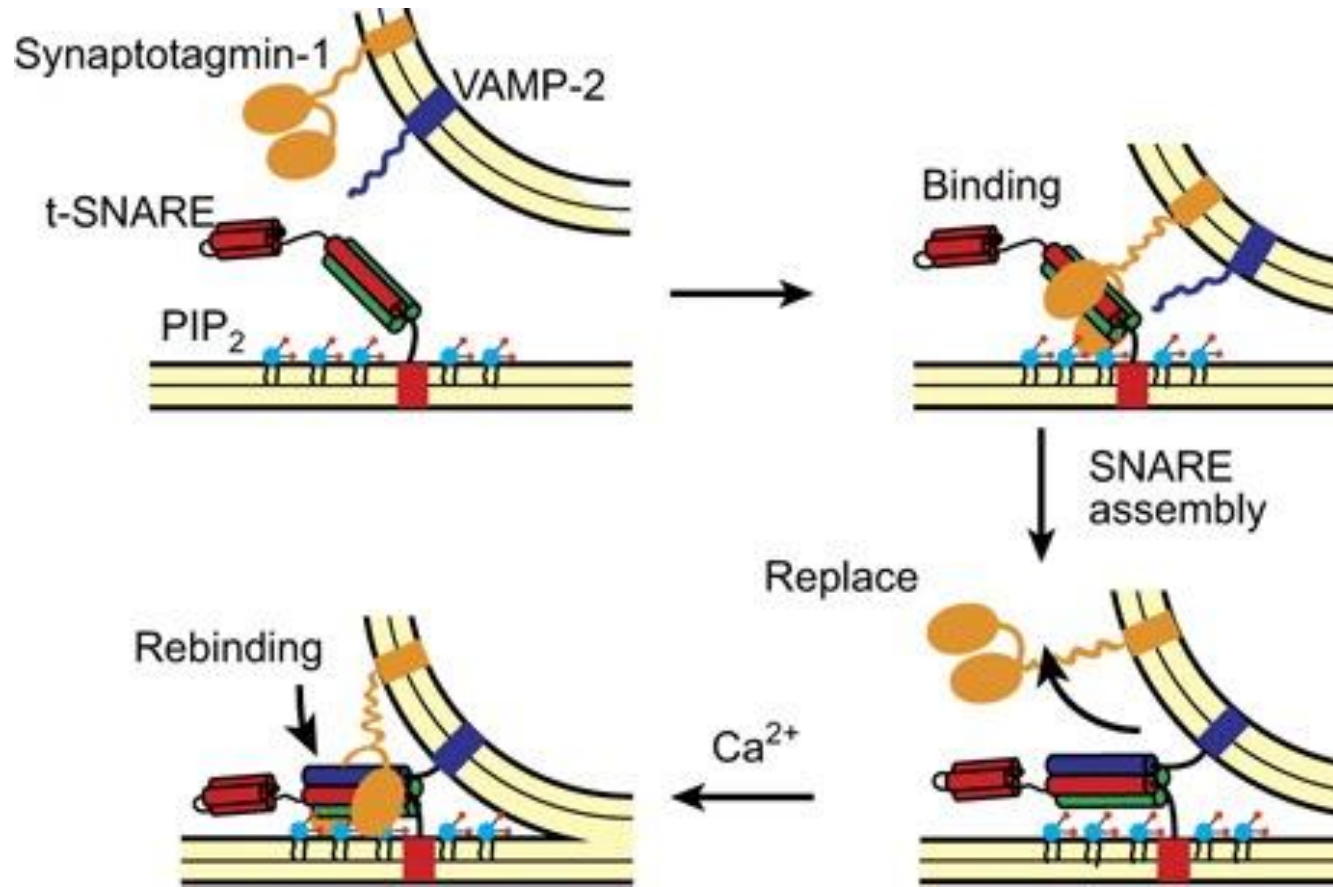


# FECONDAZIONE

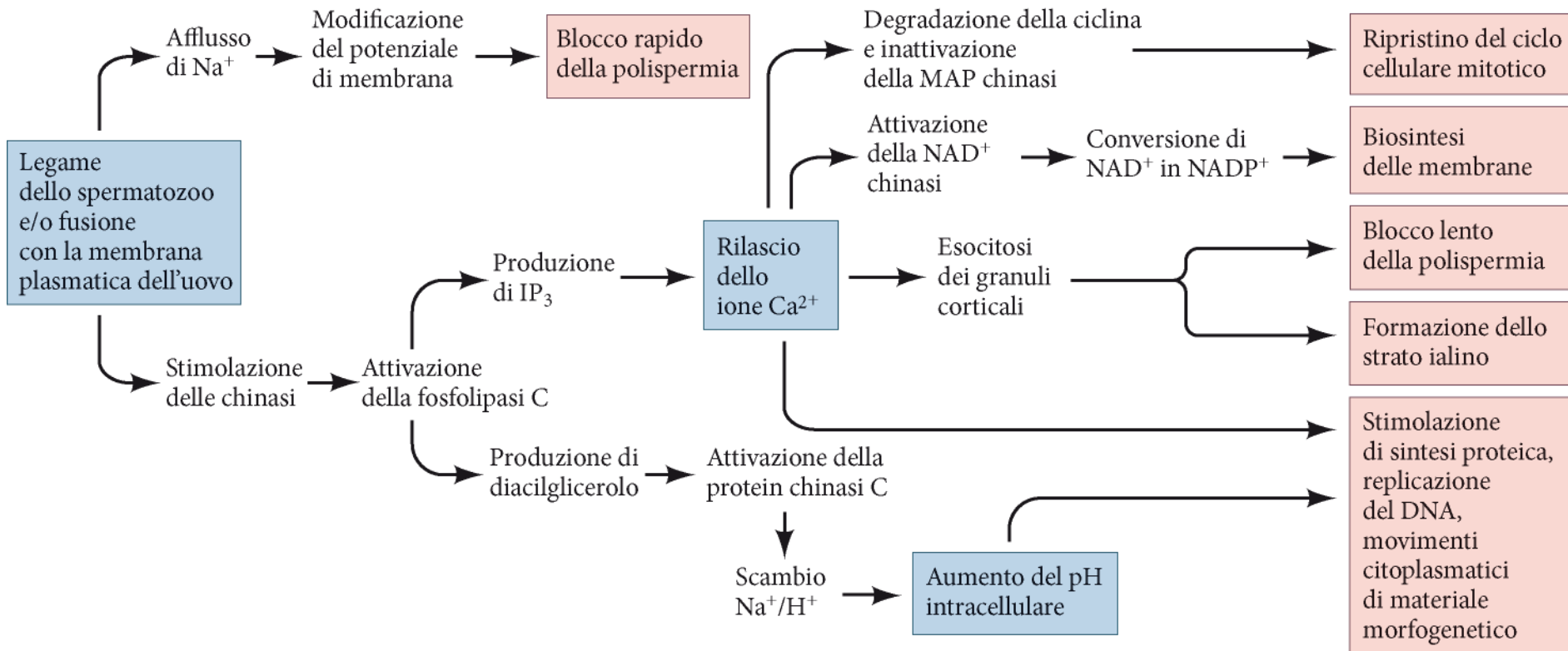
## TRASDUZIONE DEL SEGNALE E ONDA DI CALCIO



# Il $\text{Ca}^{2+}$ attiva la sinaptotagmina che favorisce l'ancoraggio e la fusione delle vescicole

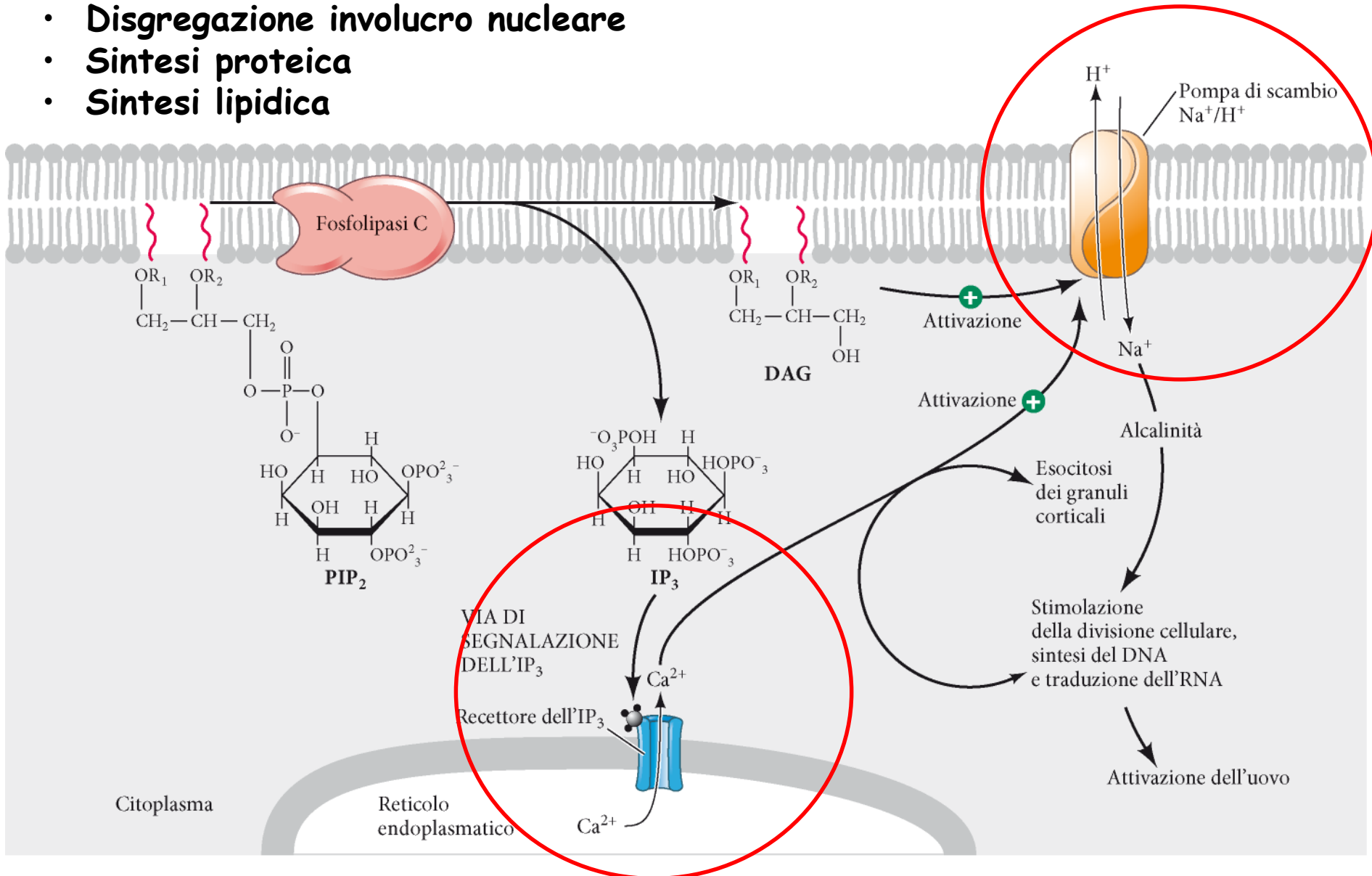


# Il $\text{Ca}^{2+}$ media sia il blocco lento della polispermia che l'attivazione del metabolismo dell'uovo



# L'incremento di $\text{Ca}^{2+}$ e di pH nel citosol regola:

- Inizio sintesi DNA
- Progressione ciclo cellulare
- Disgregazione involucro nucleare
- Sintesi proteica
- Sintesi lipidica

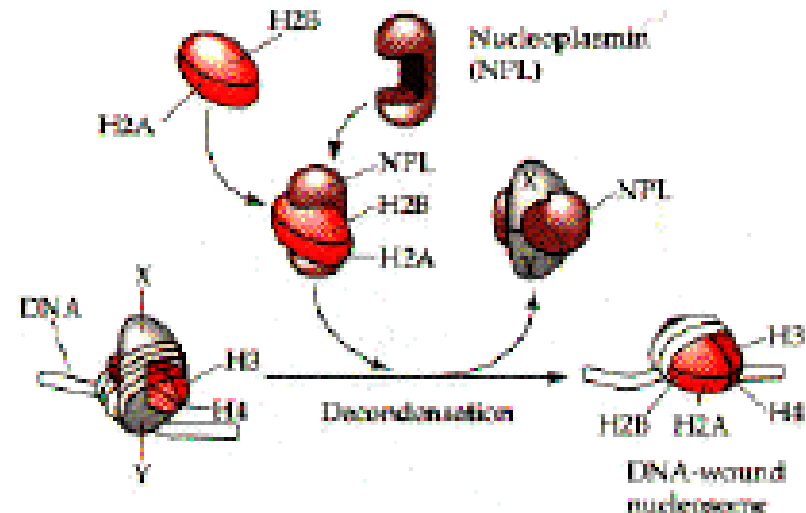


# FECONDAZIONE

## EVENTI NUCLEARI

### PRONUCLEO MASCHILE

- Dissoluzione dell'involucro nucleare
- Sostituzione proteine istoniche con quelle dell'uovo
- Riarrangiamento della cromatina in forma più lassa
- Ricostituzione della membrana nucleare



Il **pronucleo** maschile perde la propria membrana nucleare e **si riveste di cisterne del RE dell'uovo**

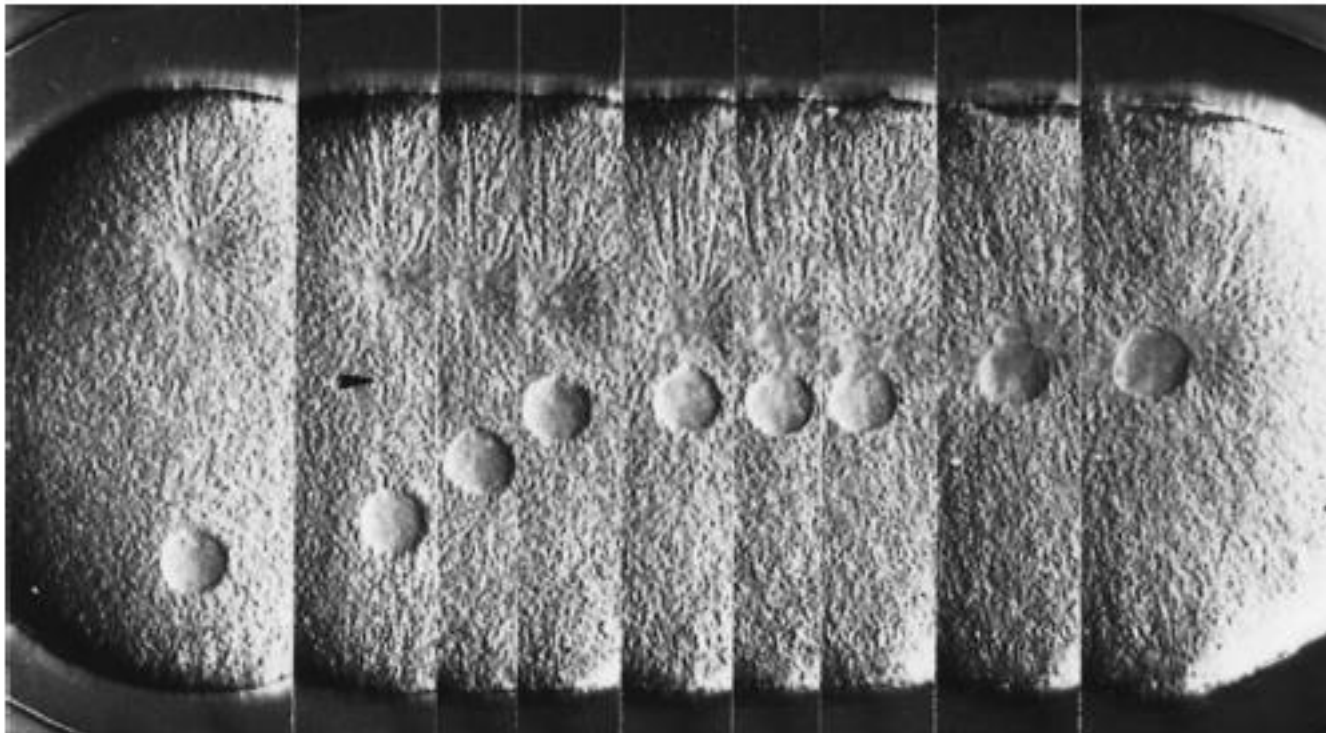
# Cariogamia:

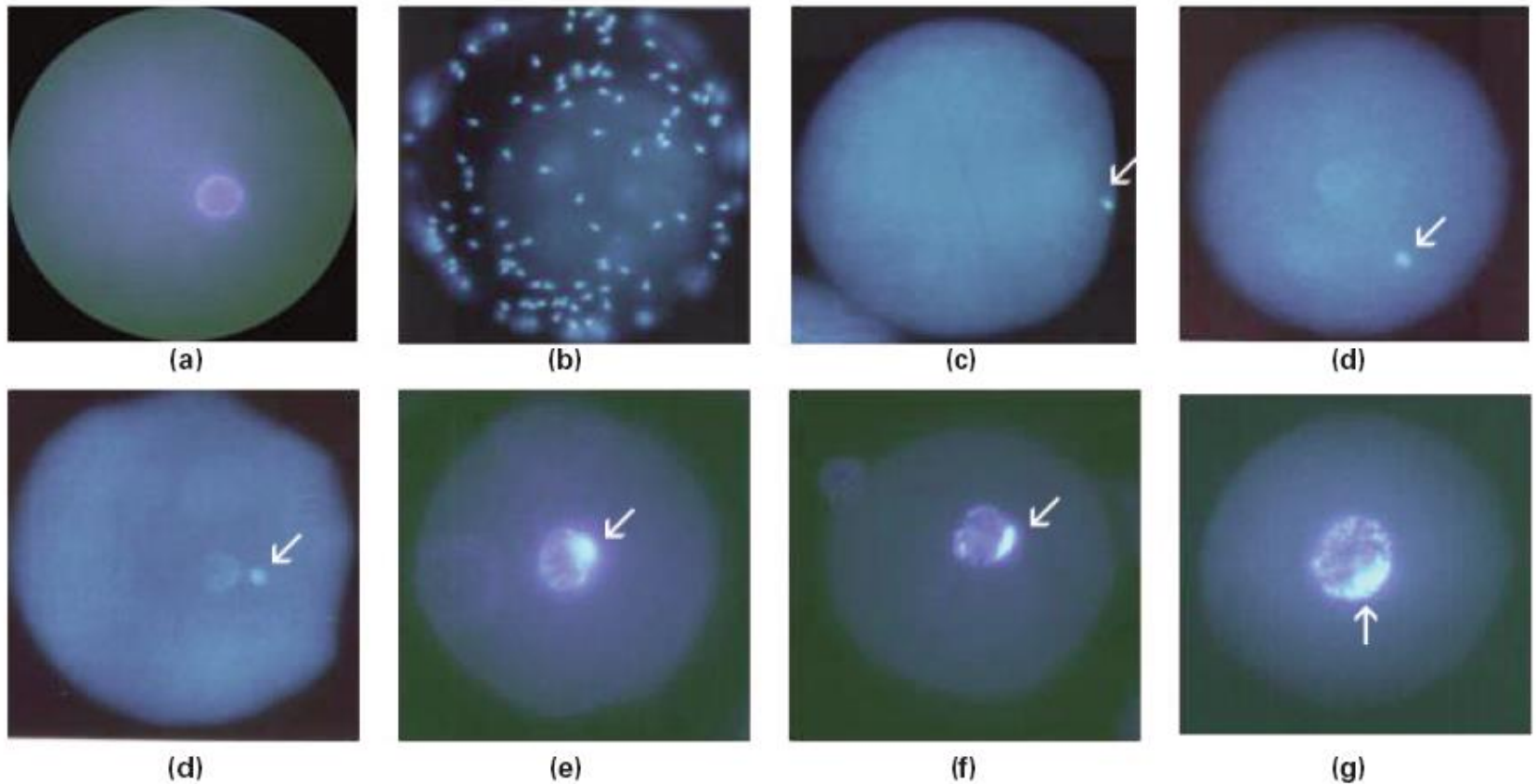
Rotazione di 180° del pronucleo maschile

Il centrosoma dello spermatozoi formerà lo sperm-aster (microtubuli per agganciare i pronuclei e avvicinarli)

Fusione dei due nuclei, formazione del nucleo zigotico

Inizio della segmentazione (mitosi)

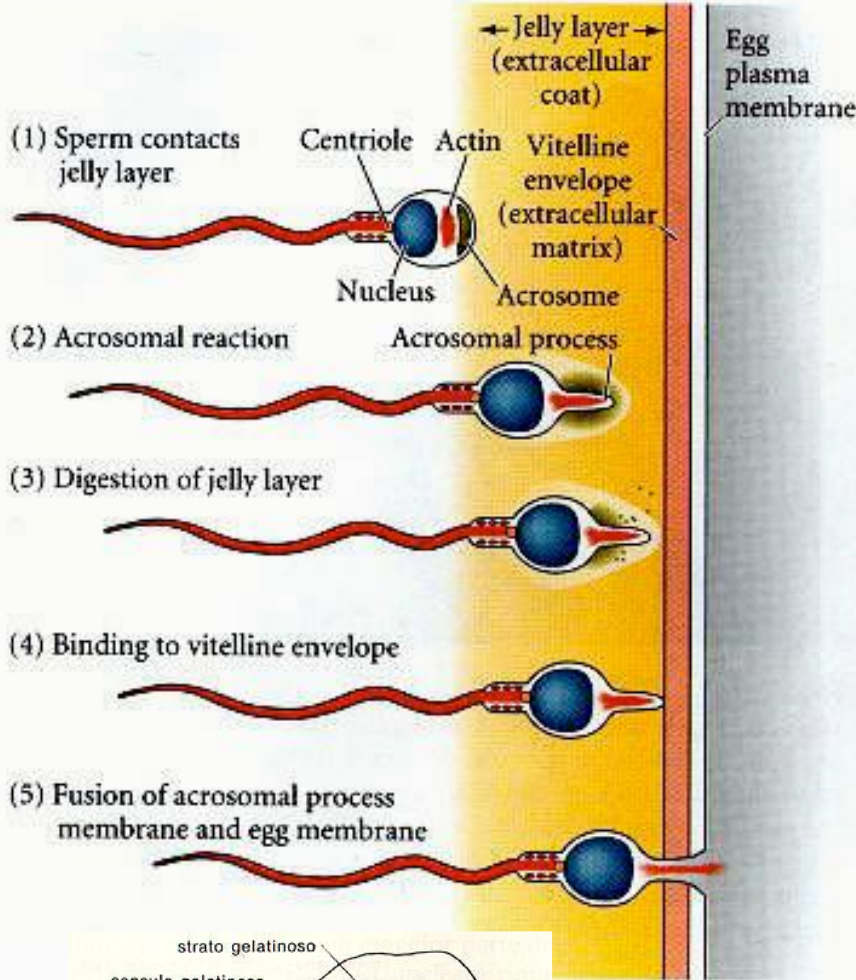




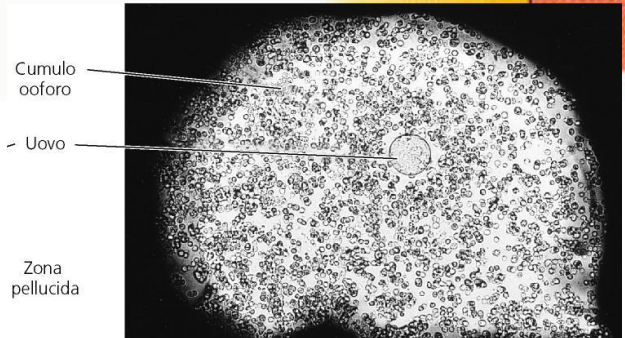
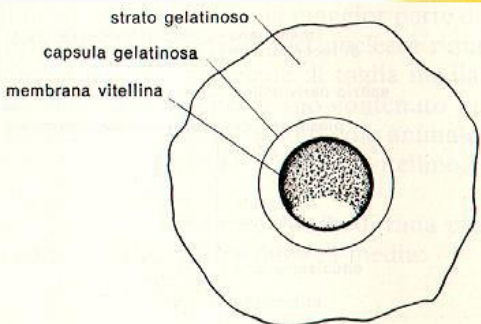
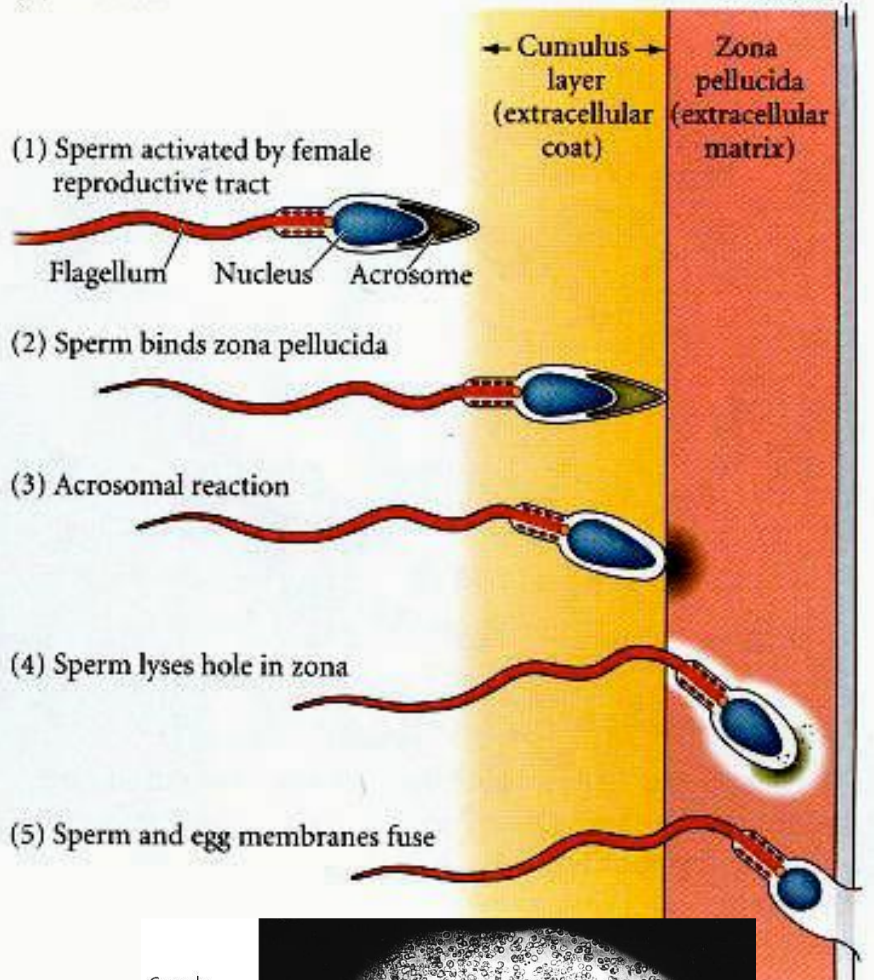
**Figura 4.10** Visione delle fasi della fecondazione del riccio di mare *Paracentrotus lividus*. La colorazione con DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) rende fluorescente il DNA dei pronuclei. La freccia segue sempre il pronucleo maschile nell'avvicinamento e successiva fusione con il pronucleo femminile. **(a)** uovo vergine; **(b)** gli spermatozoi attorno all'uovo; **(c)** un solo spermatozoo è entrato nel citoplasma dell'uovo (2 minuti); **(d)** il pronucleo maschile procede verso l'interno (15 minuti); **(e)** il pronucleo maschile è vicino a quello femminile (30 minuti); **(f)** 40 minuti: il pronucleo maschile si è fuso con quello femminile; **(g, h)** i cromosomi cominciano a mescolarsi per formare la piastra metafasica.

# Fecondazione nel riccio di mare e nel topo: similitudini e differenze

(A) SEA URCHIN

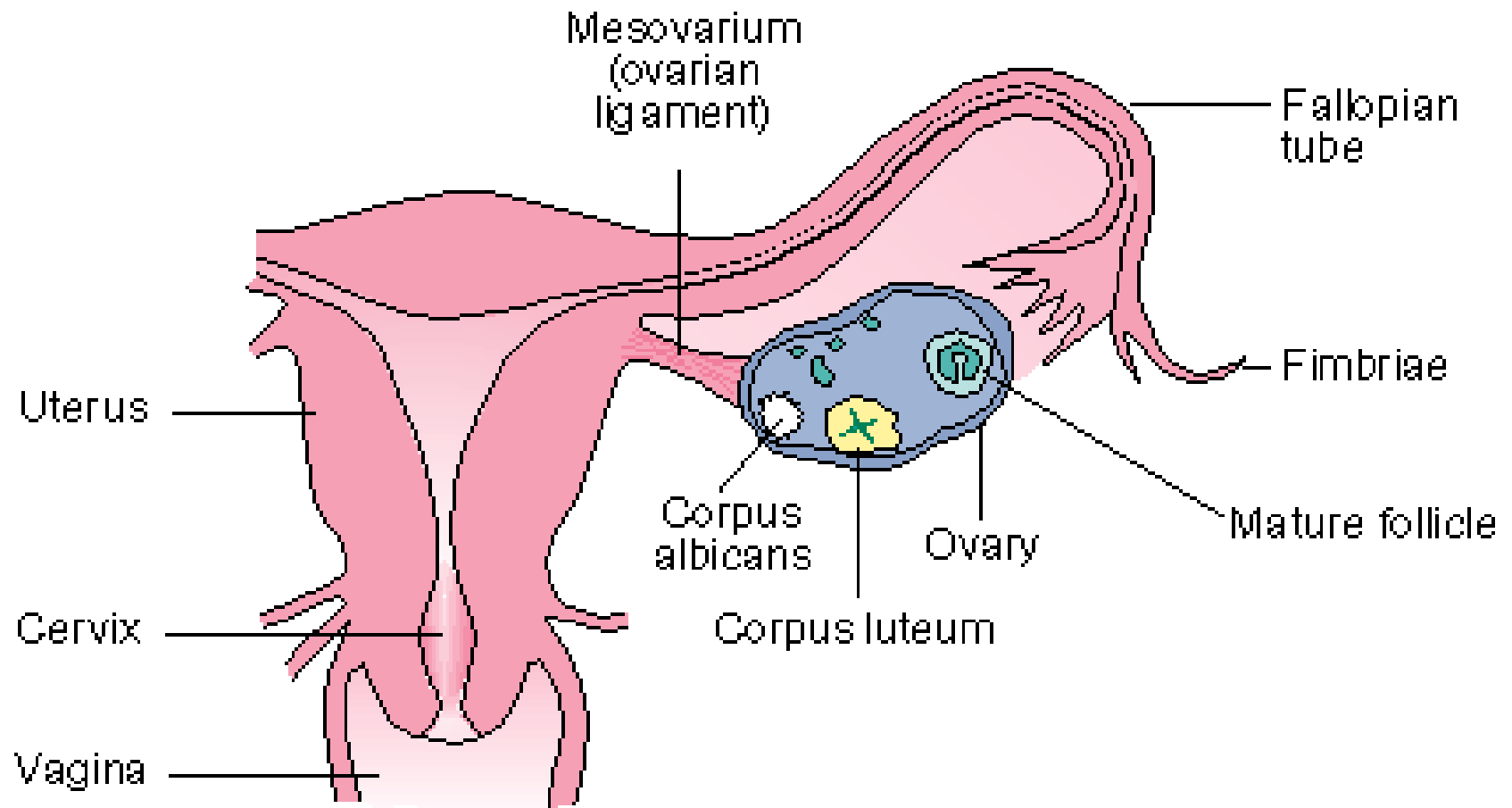


(B) MOUSE





# Fecondazione interna: Topo



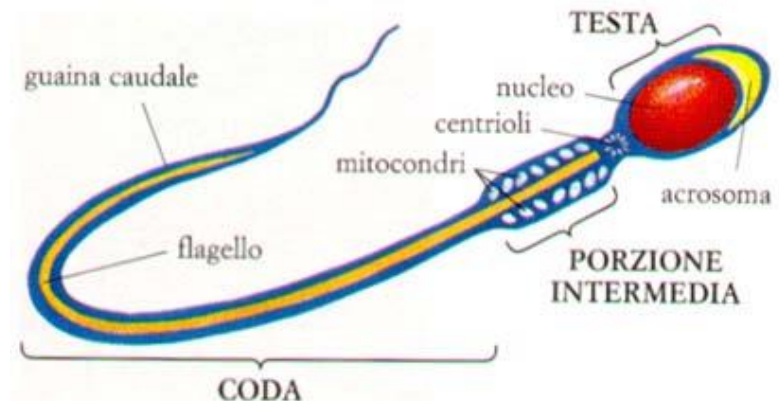
# Fecondazione nei mammiferi: TRASLOCAZIONE E CAPACITAZIONE

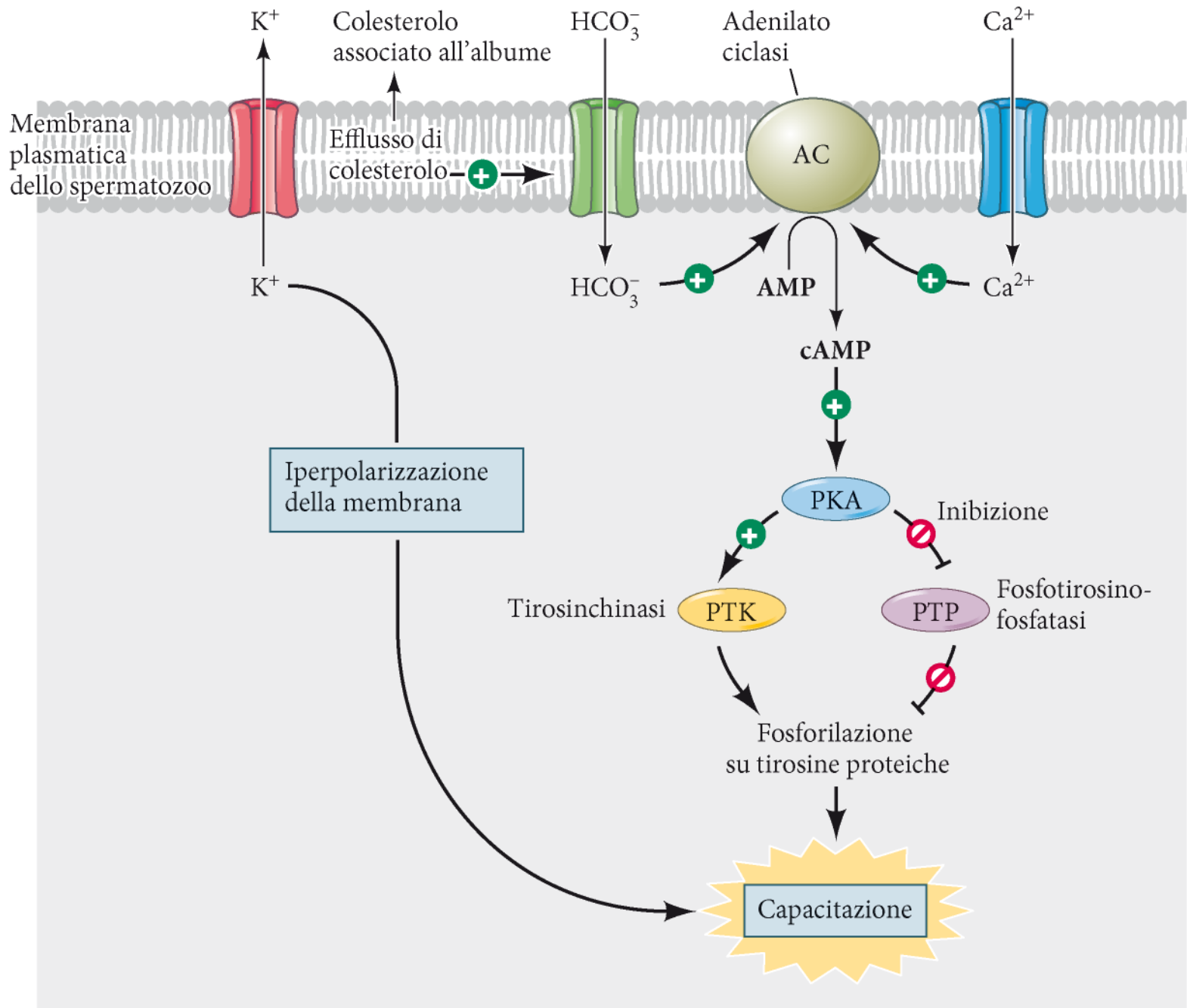
**TRASLOCAZIONE:** L'**ovidotto** controlla sia il numero di spermatozoi che raggiungono l'**ampolla** uterina che il tempo di passaggio e la loro sopravvivenza.

**CAPACITAZIONE:** il passaggio nell'ovidotto modifica alcune caratteristiche degli spermatozoi:

- Rimozione **colesterolo** dalla membrana da parte delle **albumine**
- **Smascheramento** sulla membrana dei siti di legame all'uovo tramite rimozione di alcuni carboidrati e alcune proteine
- **Iperpolarizzazione** della membrana ed entrata di **Ca<sup>2+</sup>** attivano il **movimento** e preparano lo spermatozoo alla **reazione acrosomale** (la vescicola acrosomale si avvicina alla membrana plasmatica).

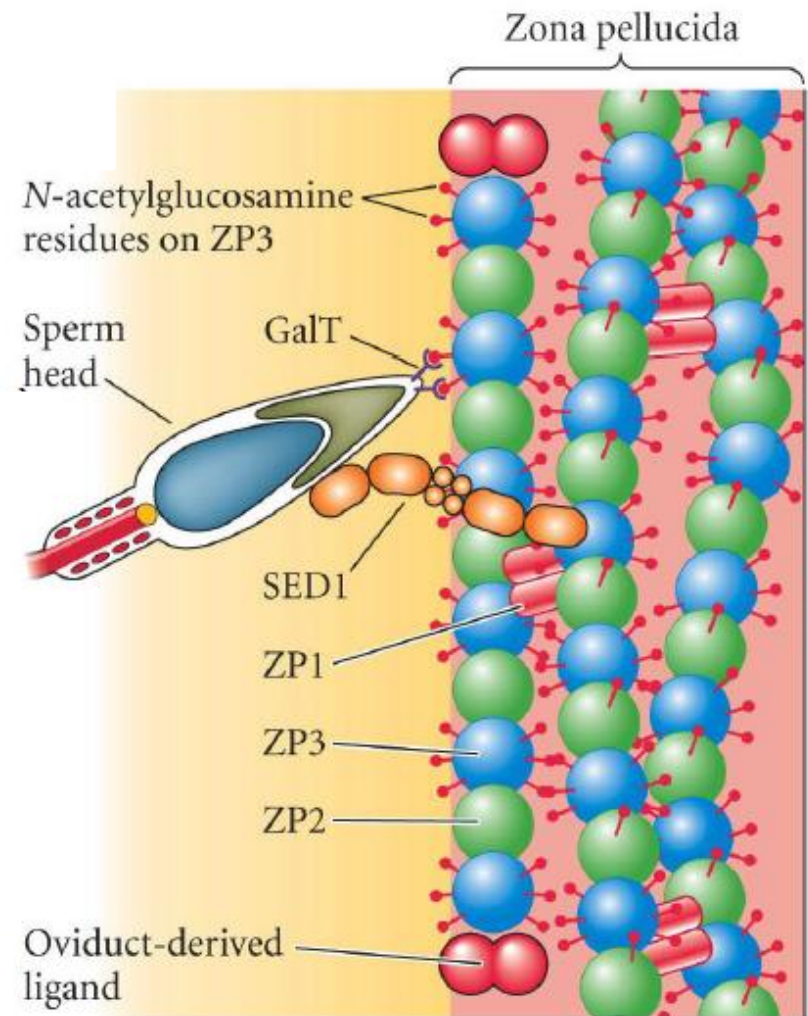
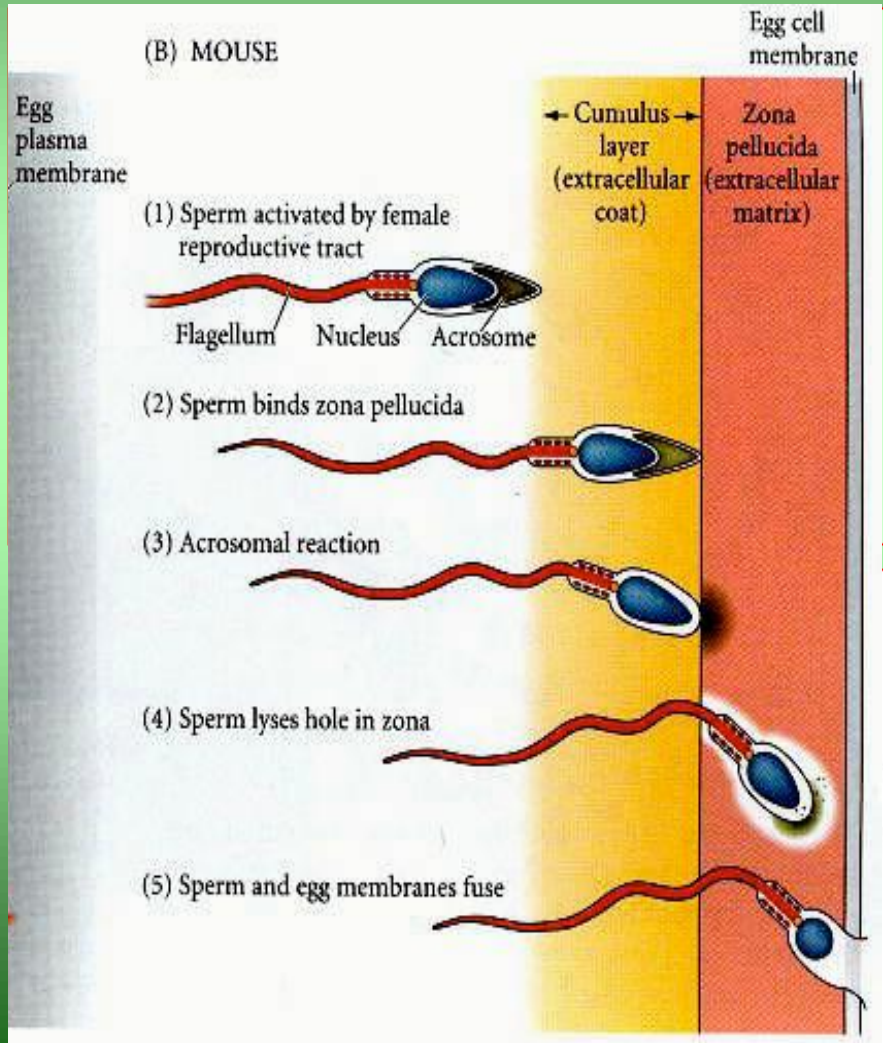
Nell'ultimo tratto lo spermatozoo è attratto dal gradiente di **calore** e dal **progesterone** prodotto dal cumulo ooforo





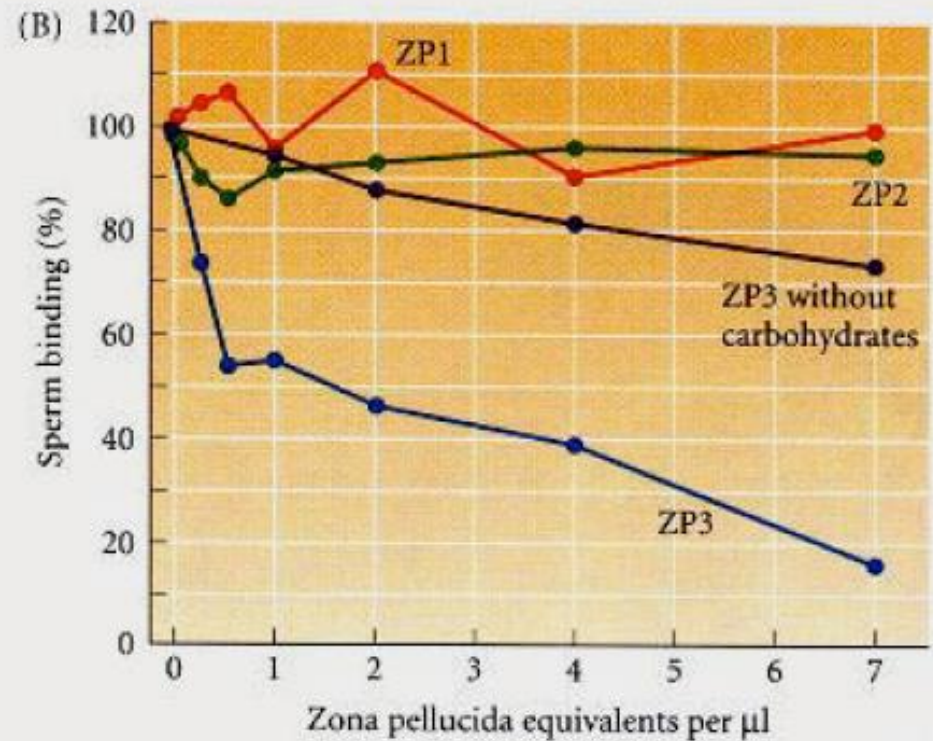
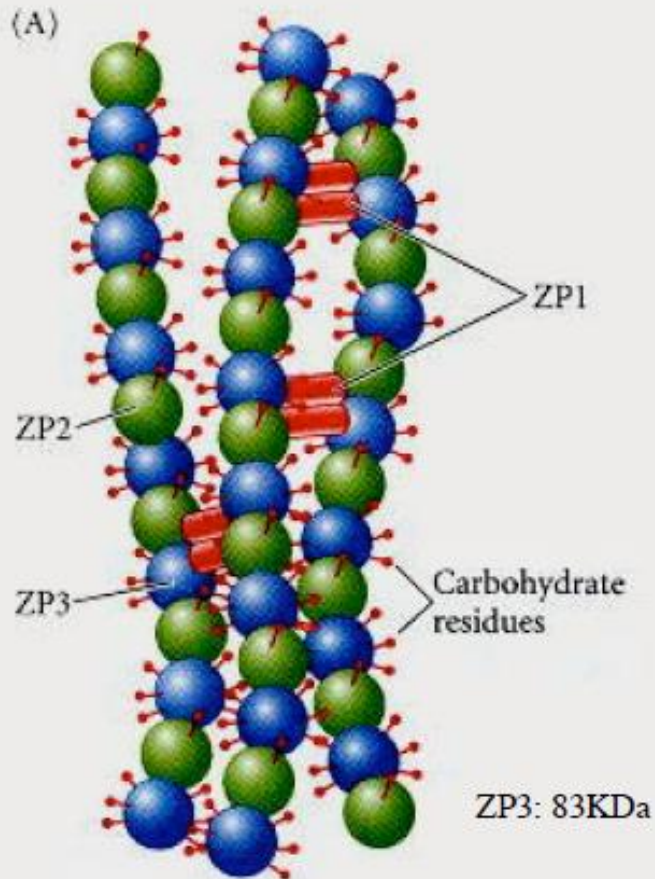
# FECONDAZIONE

## CONTATTO E ATTIVAZIONE SPERMATOZOO



# Meccanismo molecolare di attivazione della reazione acrosomiale nei mammiferi

## La proteina ZP3

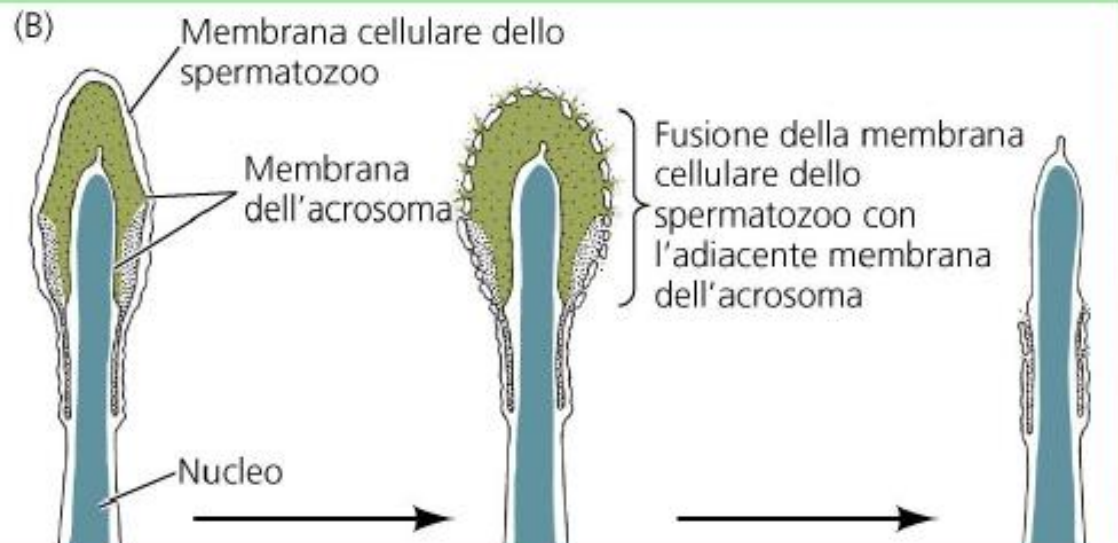
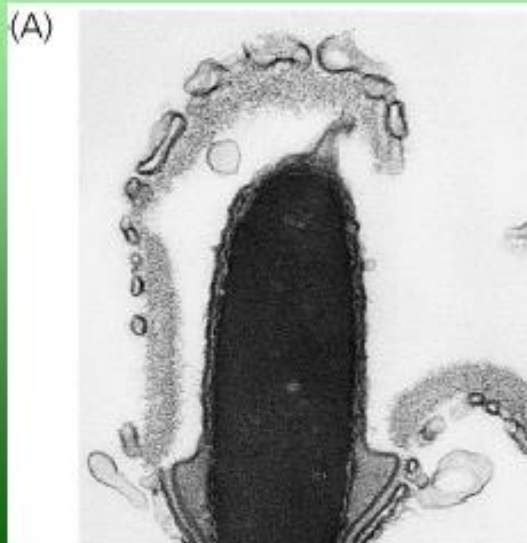


Saggio di inibizione

# FECONDAZIONE

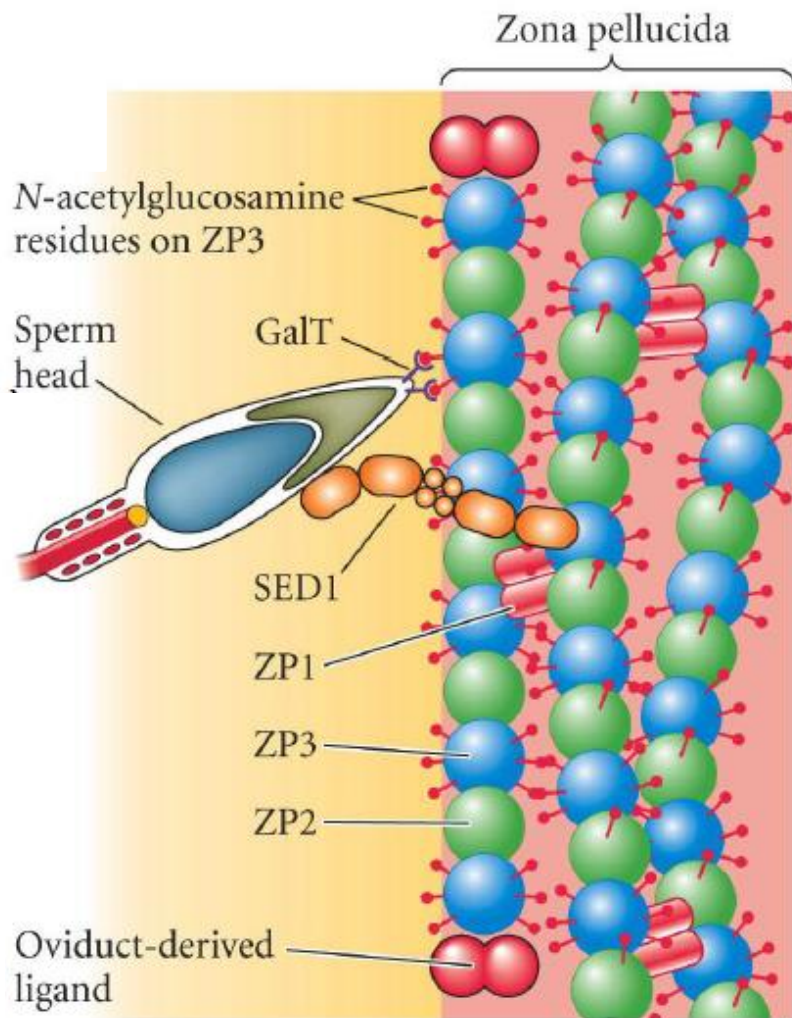
## REAZIONE ACROSOMIALE

### MAMMIFERI



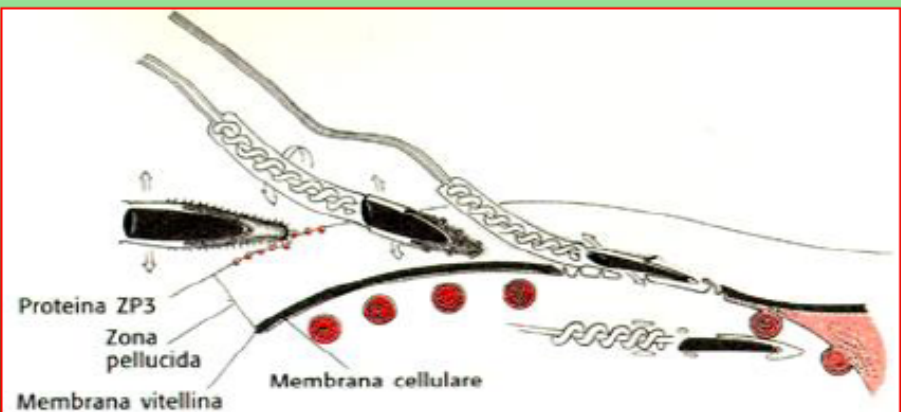
# FECONDAZIONE

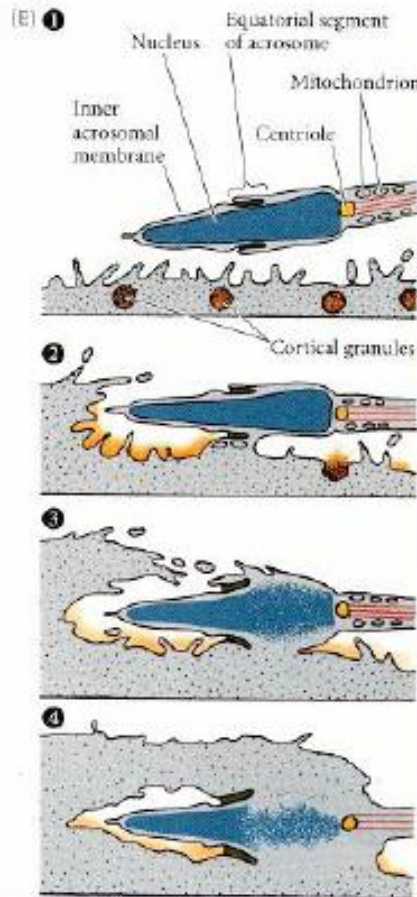
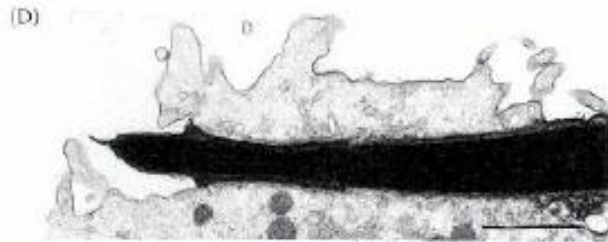
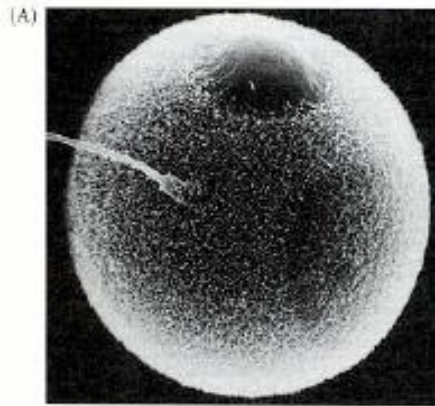
## CONTATTO E ATTIVAZIONE SPERMATOZOO



### MAMMIFERI

- Attività ialuronidasi per digestione matrice cumulo ooforo
- Riconoscimento zona pellucida e legame (ZP3)
- Esocitosi acrosoma
- Legame con ZP2





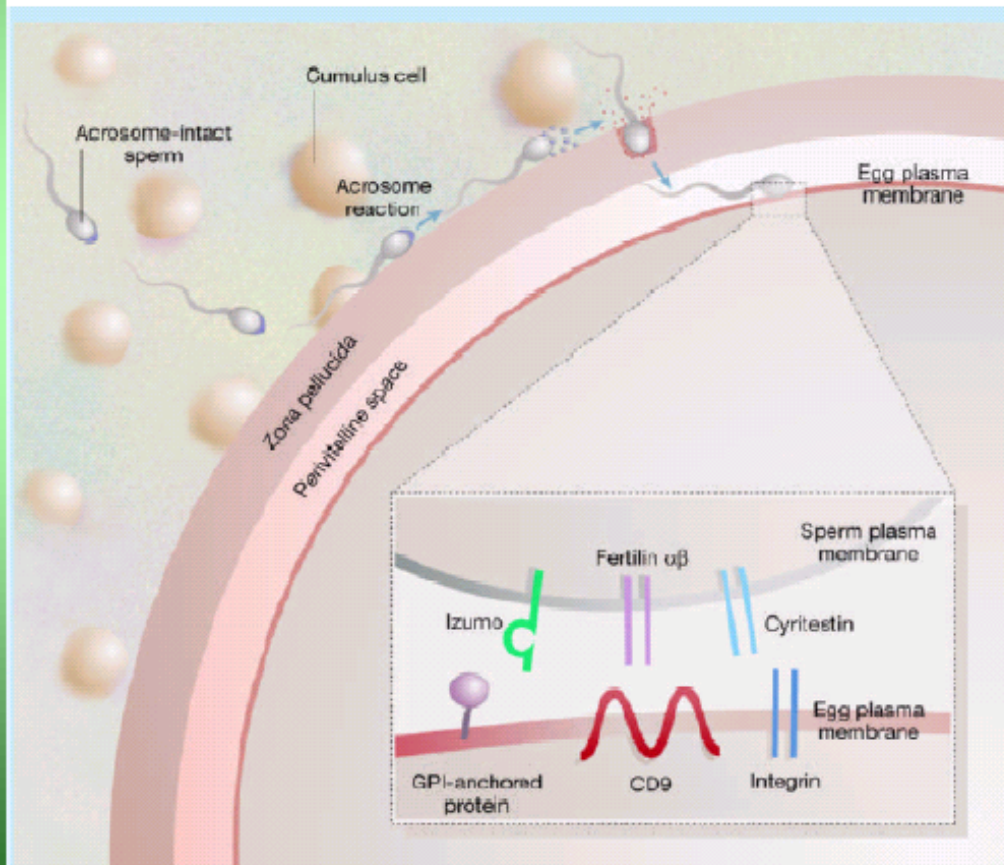
L'ingresso degli spermatozoi nell'uovo dei mammiferi



# FECONDAZIONE

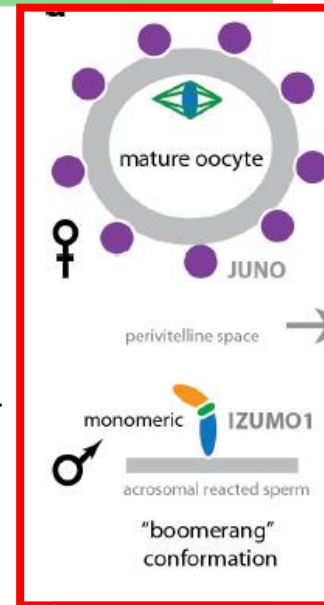
## FUSIONE DELLE MEMBRANE PLASMATICHE

### FUSIONE DELLE MEMBRANE NEI MAMMIFERI



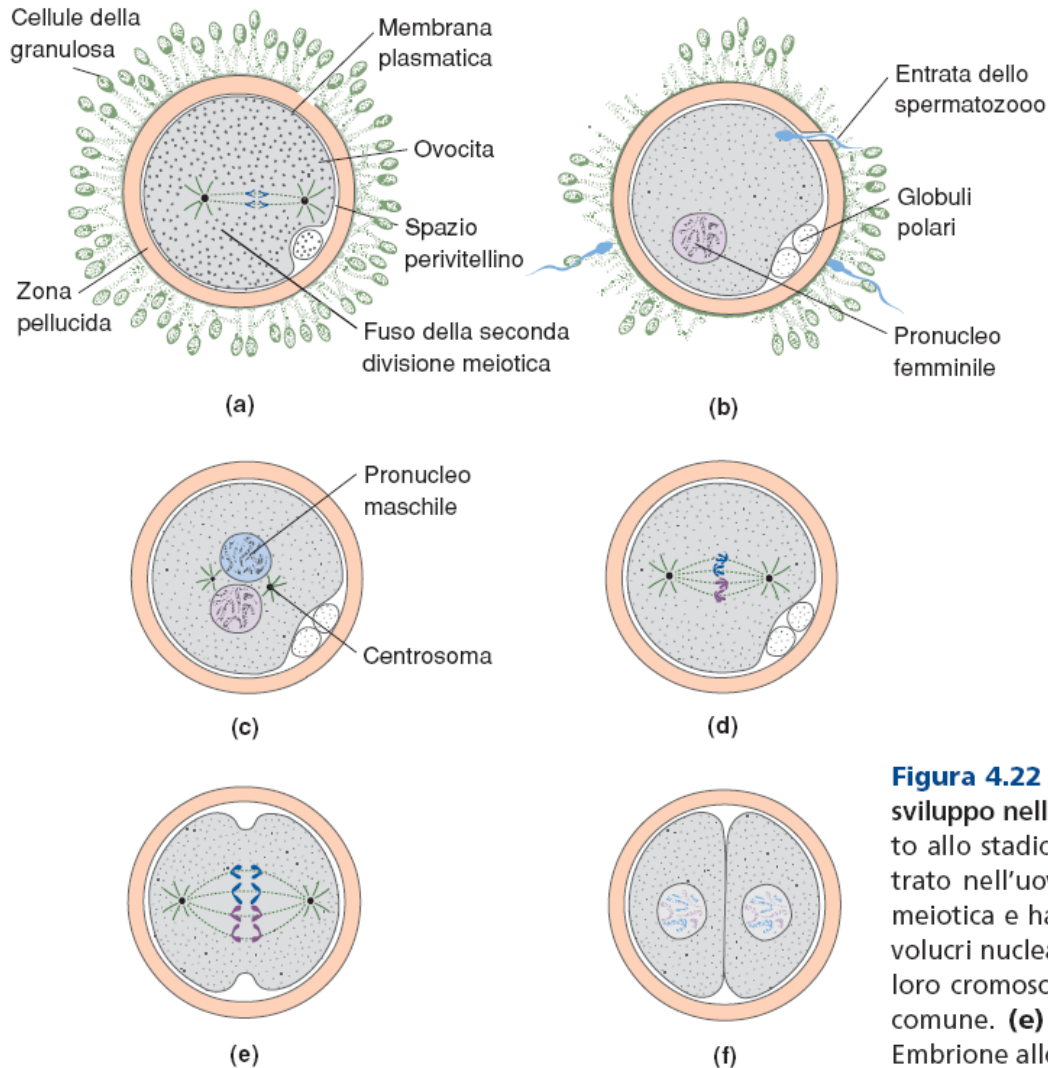
Giocano un ruolo nella fusione:

- **Izumo-1**, le **integrine  $\alpha_6\beta_1$**  e la **tetraspannina CD9** sull'**uovo**,
- **Juno**, le **fertiline** (eterodimeri di fertilina- $\alpha$  [ADAM1B] e fertilina- $\beta$  [ADAM2]) sullo **spermatozoo**.



Da *Nature*, 2005, 434: 152  
"Sperm-egg fusion unscrambled"

# L'ovocita completa la meiosi solo una volta fecondato



Nei mammiferi NON si ha fusione dei pronuclei.

I pronuclei maschili e femminili autonomamente entrano in mitosi disponendo i cromosomi in una piastra metafasica comune

**Figura 4.22** Fecondazione dell'uovo e prima parte dello sviluppo nella specie umana. **(a)** Ovocita ovulato arrestato allo stadio di metafase II. **(b)** Uno spermatozoo è entrato nell'uovo, che ha completato la seconda divisione meiotica e ha formato il pronucleo femminile. **(d)** Gli involucri nucleari di entrambi i pronuclei si disintegrano e i loro cromosomi si dispongono in una piastra metafasica comune. **(e)** Anafase della prima divisione cellulare. **(f)** Embrione allo stadio di 2 cellule.

# ATTIVAZIONE DELL'UOVO

- Non ci sono evidenze di un blocco rapido della polispermia
- Oscillazione di  $Ca^{++}$ , coinvolgimento di enzimi dello spermatozoo (PLC: fosfolipasi C)
- **Blocco lento della polispermia (granuli corticali)**
- **Smascheramento degli mRNA** per permettere un **picco di sintesi proteica prima della trascrizione**
- Aumento della **respirazione mitocondriale**
- Elevata **produzione di membrane** tramite l'attivazione di coenzimi della sintesi lipidica
- **Cambiamenti strutturali** (es.: spostamenti determinanti citoplasmatici)