

Embryologie člověka a základy teratologie

RNDr. Mária Hovořáková, PhD.

1.LF UK, Ústav Histologie a Embryologie, Albertov

E-mail: Maria.Hovorakova@lf1.cuni.cz

Přednáška 2:

Gametogeneze 2, Oogeneze I, II, Spermatogeneze, Spermioogeneze
Ovariální cyklus, Menstruační cyklus
Molekulární regulace

- **POHLAVNÍ (SEXUÁLNÍ, GENERATIVNÍ) ROZMNOŽOVÁNÍ** - nový jedinec se vyvíjí z jediné buňky (**zygoty**), která vzniká splynutím samčí a samičí pohlavní buňky (**gamety**).
- Gamety vznikají redukčním meiotickým dělením.

Oogeneze

- Oogeneze – vznik a vývoj vajíček v ováriu
- Vajíčka vznikají z diploidních zárodečných prvopohlavních buněk (primordiální gonocyty), které osídlily vaječník a diferencují v **oogonie**.
- oogonie se mitoticky dělí a diferencují v oocyty I. řádu (**primární oocyty**)

Oogeneze I

- Kolem 5. měsíce prenatálního vývoje maximální počet oogonií ve vaječníku – cca 7 milionů.
- Nastupuje apoptóza – koncem 7. měsíce již zůstávají pouze oogonie při povrchu.
- Primární oocyty vstupují do meiosis.
- Primární oocyt obklopený plochými epitelovými buňkami – primordiální folikul.
- Těsně před porodem vstupují primární oocyty (600 tis. – 800 tis.) do diplotenního stádia (klidové, síťovitý chromatin) – nedokončují I. meiotické dělení (inhibitor zrání oocyty – OMI).
- Primární oocyt zastaví své buněčné dělení v profázi meiosis I. (u ženy věk 12-45 let - primární oocyt roste až na konečný průměr 100 µm, pomocí endocytózy a folikulárních buněk (pomocné buňky obalující vajíčko) se v nich hromadí žloutek jako materiálová a energetická rezerva)

Oogeneze II

- Zrání oocytů pokračuje v pubertě (400 tis. oocytů).
- Pouze méně než 500 oocytů dospěje k ovulaci!
- Riziko chromozomových aberací stoupá s věkem – tj. primární oocyty jsou s věkem náchylnější na poškození.

Oogeneze II

- V pubertě vzniká skupina rostoucích folikulů, které se průběžně doplňují z primárních folikulů.
- Gonadotropní hormon vylučovaný z hypofýzy (**folikulostimulační hormon, FSH**) navodí v buňkách folikulů tvorbu pohlavních hormonů (estrogenů), které indukují pokračování zrání primárního oocytu.
- Každý měsíc v 28 denním cyklu začne vyzrávat 15-20 folikulů:
 1. Primární – preantrální stádium
 2. Sekundární – antrální (nejdelší)
 3. Preovulační (jen cca 37 hodin)
- Rostoucí primární oocyt tvoří primární folikul – folikulární buňky tvoří granulosové buňky – spolu s oocytem produkují glykoproteiny na povrch oocytu – zona pellucida. Přilehlé buňky stromatu tvoří theca folliculi – postupně se organizuje do TF interna a externa. Mezi granulosovými buňkami dutinky – splývají v antrum folliculi – antrální folikul – granulosové b. na povrchu tvoří cumulus oophorus – zralý sekundární folikul (Graafův folikul) – pouze jeden z rostoucích primárních folikulů dosáhne zralosti.

Oogeneze II

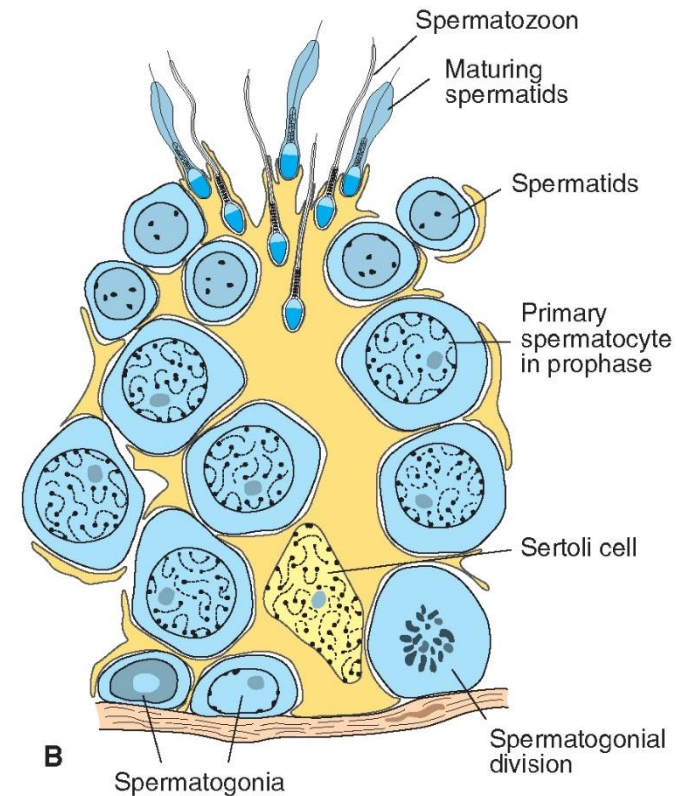
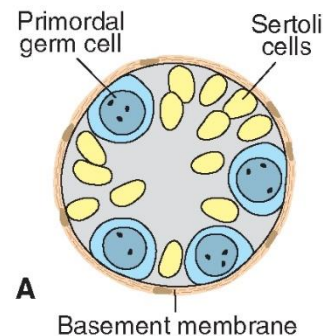
- Když sekundární folikul dozraje, vzestup LH (luteinizačního hormonu) navodí preovulační růstovou fází – meiosa I je dokončena – vznik 2 nestejně velkých dceřiných buněk – každá 23 chromozomů - sekundární oocyt – získává většinu cytoplazmy, první pólové tělísko prakticky žádnou (v perivitelním prostoru).
- Buňka vstupuje do 2. meiotického dělení – zůstává blokována v metafázi 2. meiotického dělení (cca 3 h. před ovulací) – meiosa II je dokončena pouze v případě oplození! Jinak oocyt degeneruje cca do 24 h.

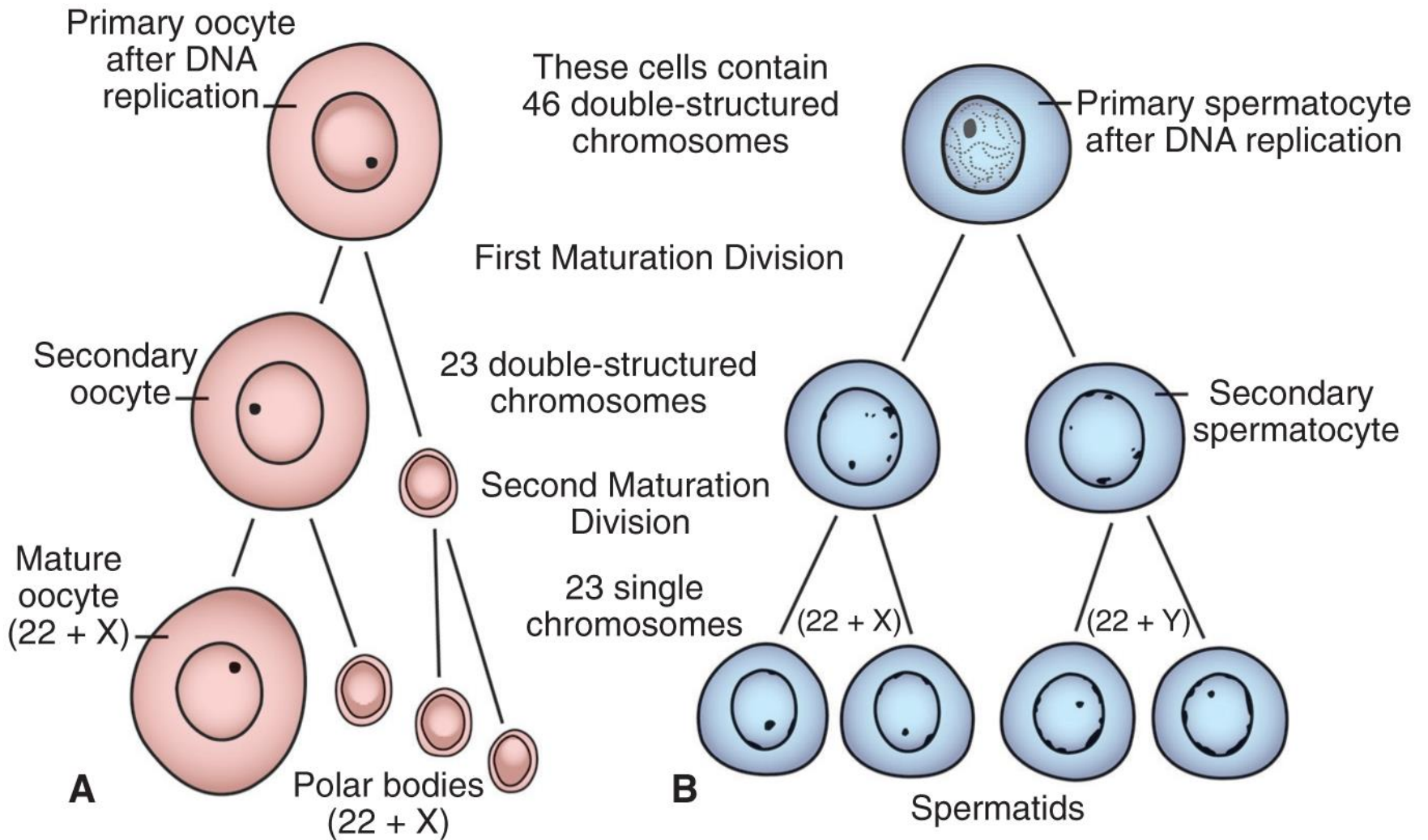
Spermatogeneze

- Začíná v pubertě.
- Vznik spermie ze spermatogonie.
- Při narození mužské pohlavní buňky v zárodečných pruzích varlat obklopené buňkami podpůrnými – **Sertoliho b.** (z povrchového epitelu pohlavní žlázy)
- Krátce před pubertou zárodečné pruhy luminisují – semenotvorné kanálky. Zároveň z prvopohlavních buněk vznikají spermatogoniové kmenové buňky – v pravidelných intervalech se z nich vydělují buňky – spermatogonie typu A – mitotická dělení – tvoří se buněčné klony – spermatogonie typu B – po jejich rozdělení vznikají **primární spermatocyty** – vstupují do prodloužené profáze (22 dní) – dokončení meiosis I – vytvoření **sekundárních spermatocytů**.

Spermatogeneze

- 2. meiotické dělení – haploidní **spermatidy**.
- Spermatogeneze je regulována LH z hypofýzy.
- Sertoliho buňky ochraňují a vyživují spermatogonie a spermatidy, pomáhají při uvolňování zralých spermií.



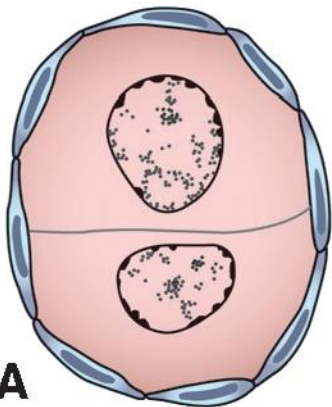


Spermiogeneze

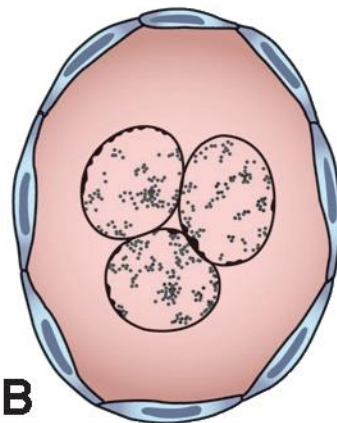
- Přeměna spermatid ve spermie.
 - A. Vytvoření akrosomu – pokrývá polovinu jádra, obsahuje enzymy pro snadnější průnik spermie do vajíčka
 - B. Kondensace jádra
 - C. Vytvoření krčku, středního oddílu a bičíku
 - D. Ztráta většiny cytoplazmy
- U člověka je od spermatogonie ke spermii potřeba cca 74 dní, denně vzniká cca 300 milionů spermií.
- Zralé spermie se uvolňují do lumina semenotvorných kanálků a jsou kontraktilními elementy posouvány do epididymis – zde dosahují plné pohyblivosti.

Abnormální gamety

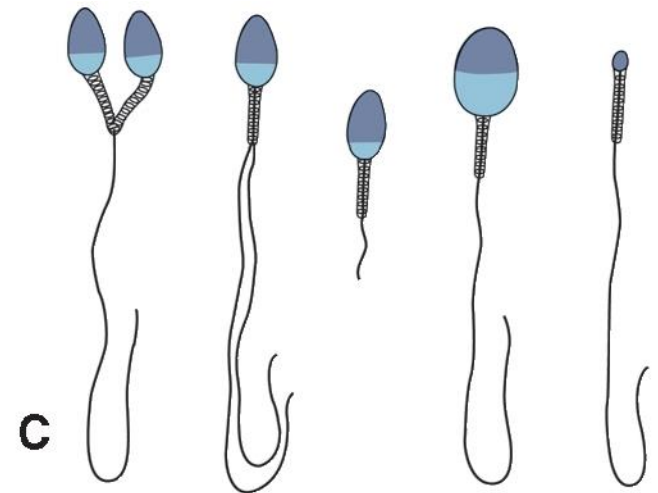
- Ovariální folikul může obsahovat 2-3 primární oocyty – zpravidla degenerují před dosažením zralosti, ale mohou z nich vzniknout **vícečetná těhotenství**.
- Vzácně obsahuje **primární oocyt dvě nebo tři jádra** – zanikají před dosažením zralosti.
- **Abnormální spermie** – až 10% (častější než abnormální oocyty)
- Abnormální hlavička či bičík
- Spermie propojené, gigantické, trpasličí
- Abnormalita u spermie **ovlivňuje pohyblivost** a pravděpodobně nemůže oplodnit oocyt.



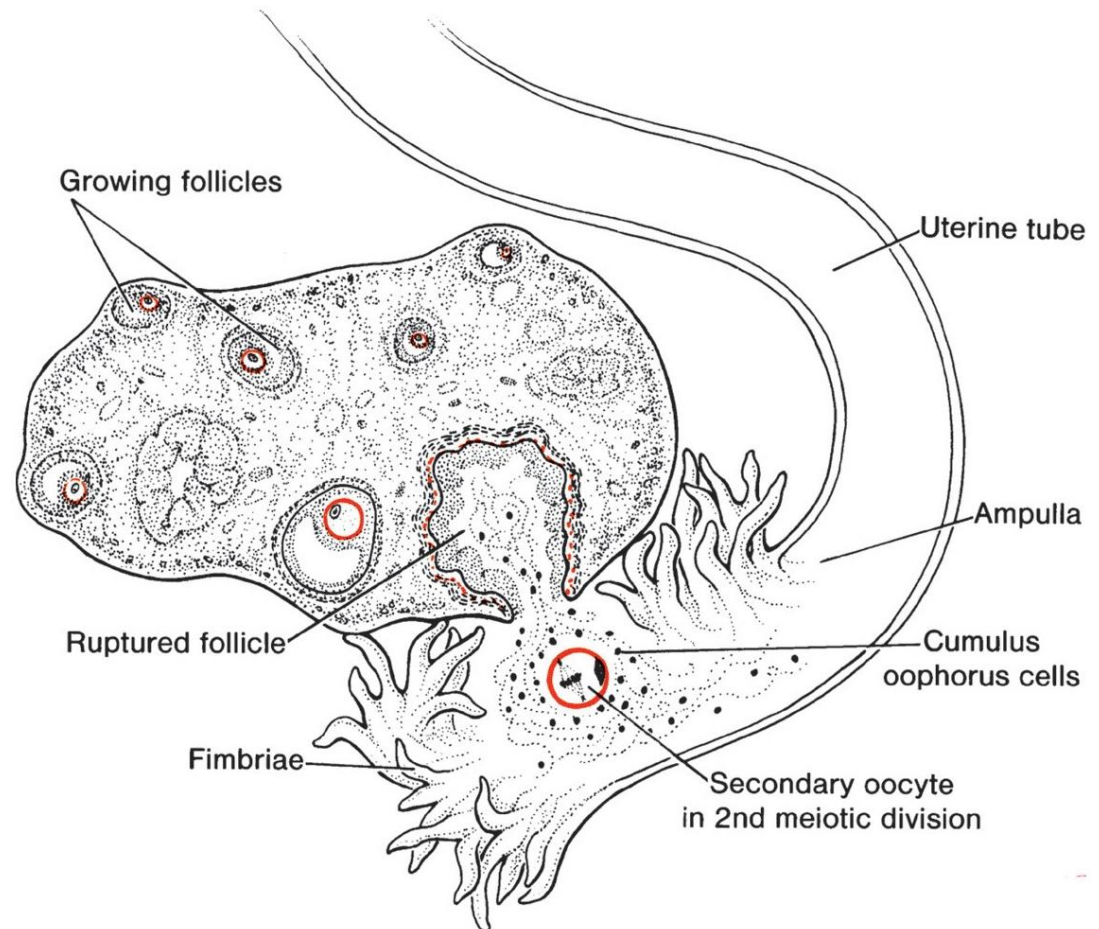
A
Primordial follicle with
two oocytes



B
Trinucleated oocyte



- Ovariální cyklus



Ovariální cyklus

- V pubertě – menstruační cyklus řízený hypothalamem (tvoří GnRH – Gonadotropiny uvolňující hormon – způsobuje vylučování FSH a LH z buněk předního laloku hypofýzy)
- Gonadotropiny (FSH, LH) podněcují a řídí cyklické procesy ve vaječníku.



FSH

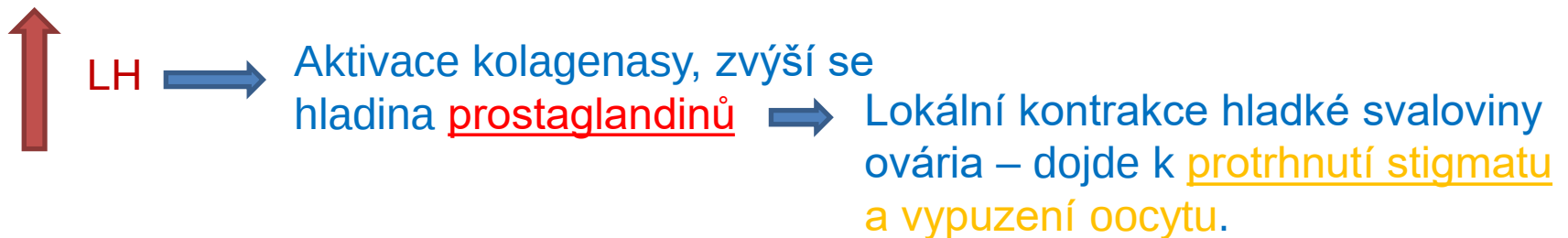


Zareaguje 15-20 primárních folikulů
Z nich však dozraje pouze jeden, ostatní degenerují

- FSH rovněž podněcuje dozrávání folikulárních buněk tvořících membrana granulosa – proliferaci řídí GDF9 (růsový diferenciační faktor 9 – ze skupiny TGFβ).
- Membrana granulosa a theca folliculi interna vylučují estrogeny – navozují proliferační fázi v endometriu, působí na sekreci a kvalitu cervikálního hlenu (průchodnost spermií) a stimulují tvorbu LH v předním laloku hypofýzy.
- Uprostřed cyklu prudce vzroste krevní hladina LH – dokončení meiosis I a vstup do 2. dělení, stimuluje tvorbu progesteronu ve folikulárních buňkách (luteinisace) a způsobí rupturu stěny folikulu a uvolnění vajíčka - ovulaci

Ovulace

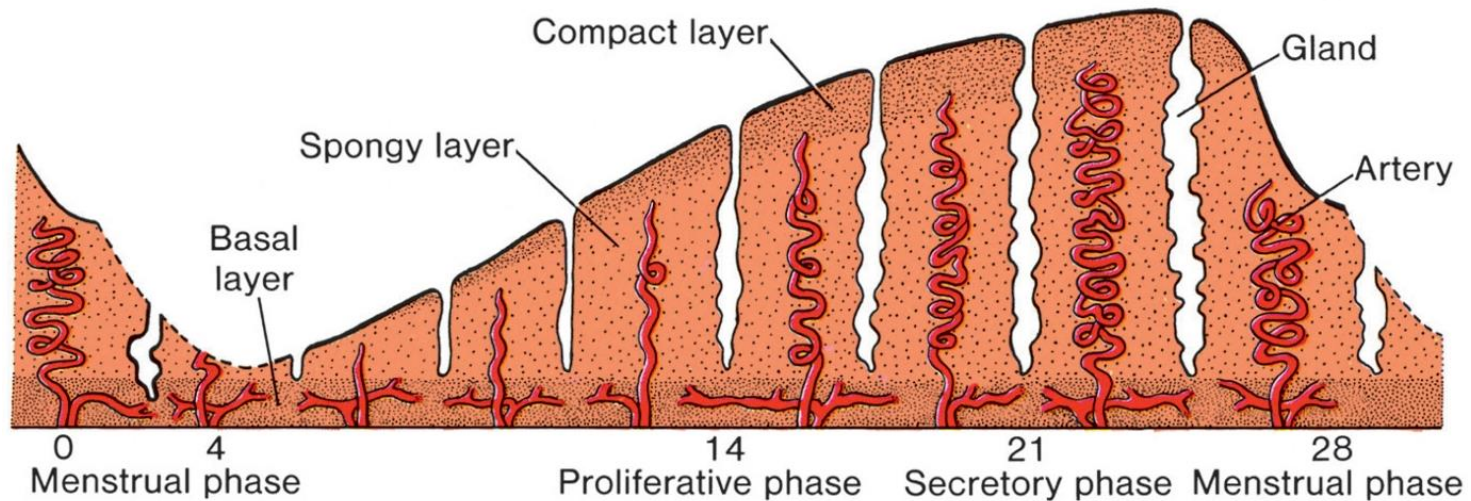
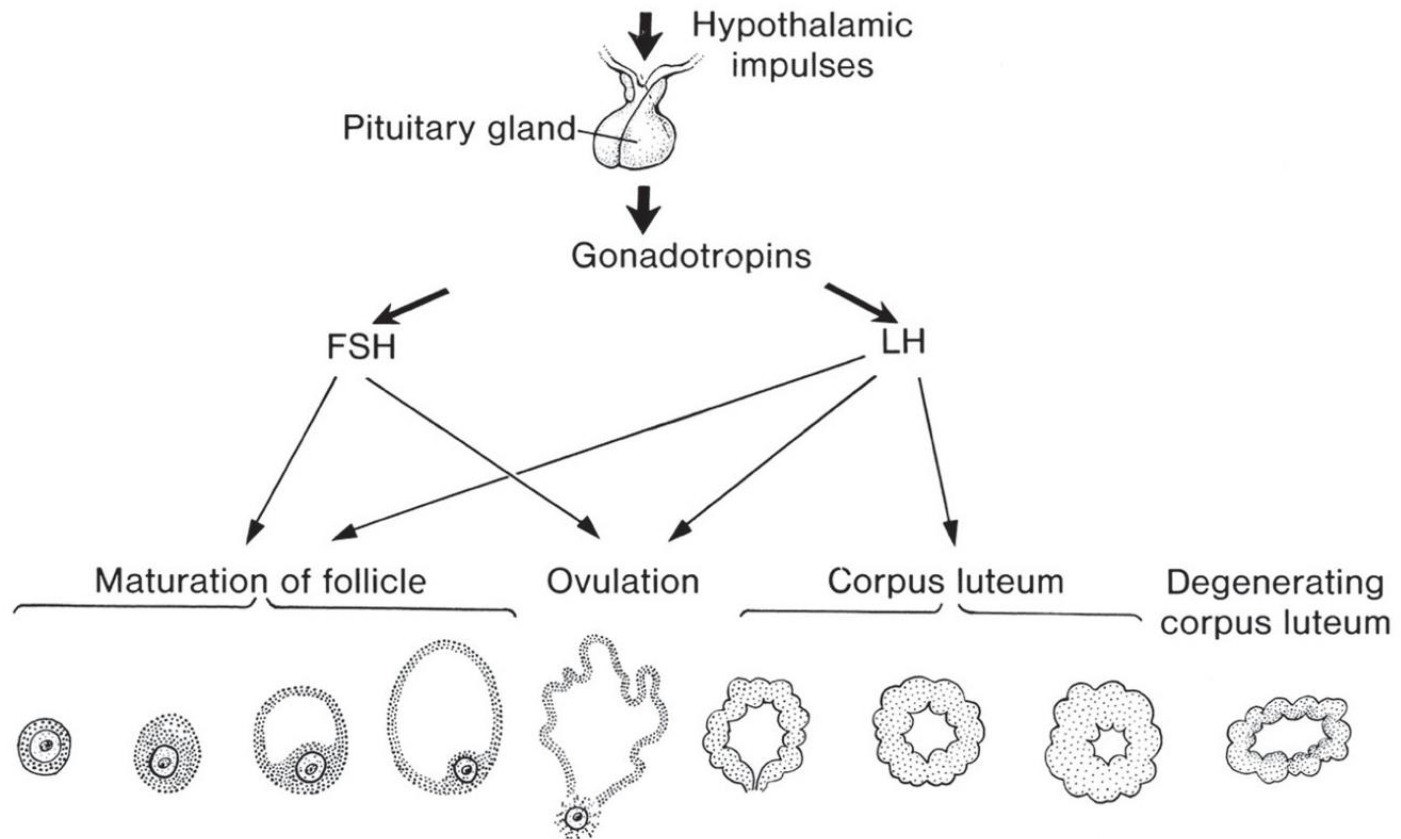
- Průměr folikulu dosáhne až 25mm (vliv FSH a LH)
- Náhlé zvýšení LH – oocyt Graafova folikulu dokončí 1. meiotické dělení a folikul vstoupí do preovulačního stádia.
- Druhá fáze meiotického dělení je iniciována, ale asi 3h před ovulací je oocyt zablokován v metafázi.
- Povrch ovária se v místě dozrávání GF vyklene – bezcévná ploška – stigma



- Buňky přímo naléhající na oocyt zakotvené do zona pellucida tvoří corona radiata

- Anovulační cyklus – příliš nízká hladina gonadotropinů v krvi
(dozrávání folikulů lze stimulovat léky – časté dozrávání více oocytů
– desetinásobná pravděpodobnost mnohočetného těhotenství)

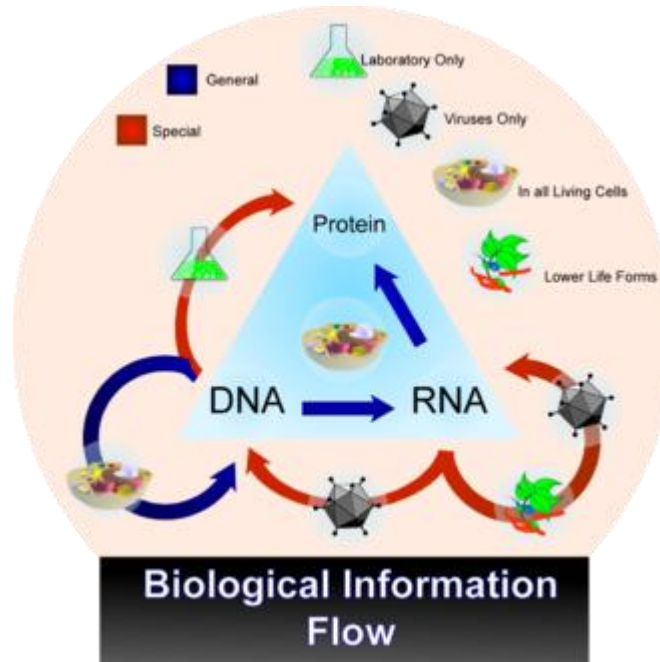
- Corpus luteum (b. membrana granulosa a theca folliculi interna) – b. secernují progesteron – spolu s estrogeny indukuje v endometriu rozvoj sekreční (progesteronové) fáze menstruačního cyklu – příprava sliznice na implantaci embrya (v případě, že dojde k oplození, jeho degeneraci zabraňuje hCG – produkuje progesteron až cca do konce 4. měsíce – corpus luteum graviditatis)
- Před ovulací fimbrie vejcovodu obemknou klenoucí se folikul – vejcovod se rytmicky stahuje – posun oocyту obklopeného b. membrana granulosa. Po ovulaci – oocyt se dostane do lumina vejcovodu, b. tvořící corona radiata stáhnou své výběžky a ztratí kontakt s oocytem.
- Transport vajíčka vejcovodem (pod endokrinní kontrolou) – průchod oplozeného vajíčka u člověka do dělohy trvá 3-4 dny.
- V případě, že nedošlo k oplození – corpus luteum dosáhne maxima vývoje cca 9 dní po ovulaci – mění se v corpus albicans (luteinní b. degenerují a jsou nahrazeny fibromatózním vazivem), zároveň klesá produkce progesteronu – menstruační krvácení



- Molekulární regulace

Molekulární regulace a signalizace

- 2004 – 20 tis. – 25 tis. genů lidský genom
- Neplatí hypotéza jeden gen = jeden protein (centrální dogma molekulární biologie), jeden gen může dát vznik několika různým proteinům – různé mechanismy



Molekulární regulace a signalizace

- **kyselina deoxyribonukleová (DNA)** – je obsažena v jádrech všech eukaryotických buněk, slouží k uchování genetické informace
- **kyselina ribonukleová (RNA)** – zajišťuje přenos genetické informace z DNA do struktury bílkovin
- **mRNA (mediátorová RNA)** – obsahuje přepis informací z DNA o primární struktuře bílkovinné molekuly, je matricí pro syntézu bílkovin
- **rRNA (ribozomová RNA)** – je součástí ribozomů, v nichž probíhá proteosyntéza
- **tRNA (transferová RNA)** – přenáší aminokyseliny z cytoplazmy na místo syntézy bílkovin (ribozomy)

Molekulární regulace a signalizace

- **přenos genetické informace** z jedné buněčné generace do druhé (z mateřské buňky do dceřiných) je umožněn **schopností DNA se replikovat (zdvojovat)** a tvořit dceřiné molekuly, které jsou předávány do dceřiných buněk při mitotickém dělení
- **exprese genu** = vyjádření genetické informace proteosyntézou (syntézou bílkovin) – 2 procesy: **transkripce** – přepis genetické informace z DNA do RNA (mRNA) a **translace** – překlad genetické informace do pořadí aminokyselin



Molekulární regulace a signalizace

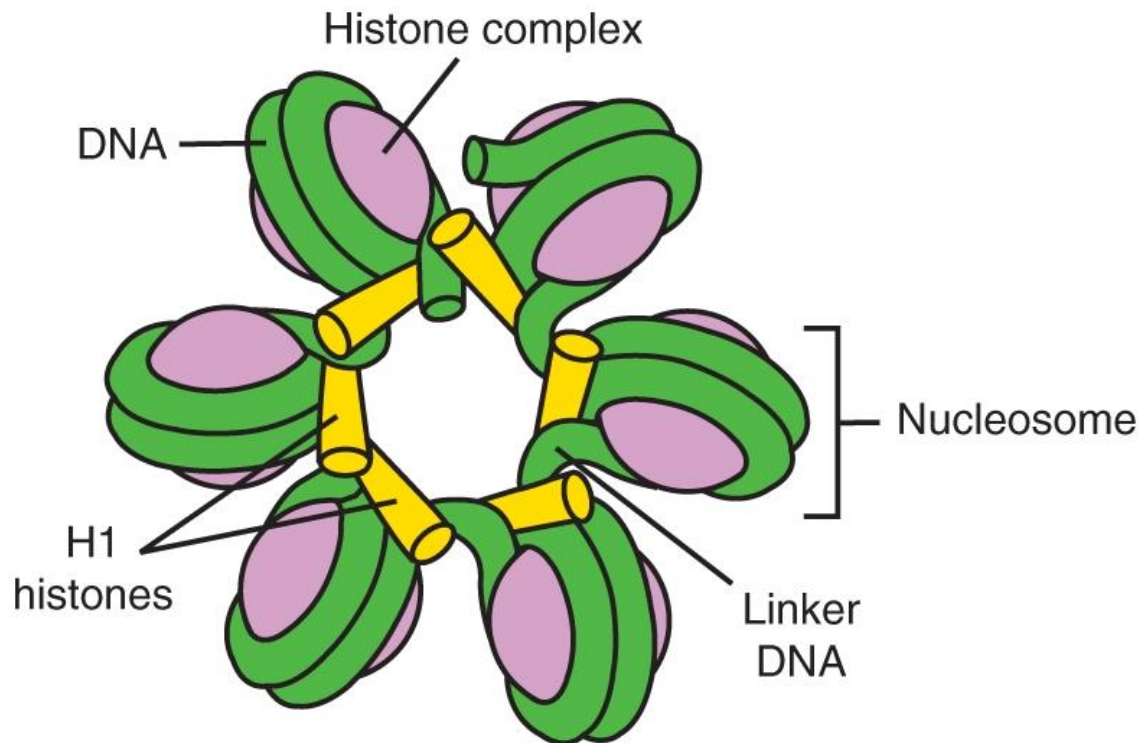
- Regulace genové exprese probíhá na několika úrovních:
 - I. V dané buňce jsou přepisovány jen určité geny
 - II. Jaderná RNA přepsaná z genu může být selektivně upravovaná – jen určité RNA dosáhnou cytoplasmy a stanou se messenger RNA (mediátorovou mRNA)
 - III. Různé mRNA mohou být selektivně překládány (translatovány)
 - IV. Proteiny vytvořené podle nějaké mRNA mohou být různě modifikovány

Genová transkripce

- Geny obsaženy v DNA
- DNA spolu s proteiny (histony) tvoří chromatin
- Základní jednotkou chromatinu je nukleosom - každý nukleosom se skládá z *oktameru tvořeného histonovými proteiny*, kolem něhož se obtáčí DNA o délce 146 párů basí (tvoří jádro nukleosomu) a *spojovacího úseku* DNA (linker DNA) – na jedné straně do nukleosomu vstupuje a na druhé z něho vystupuje

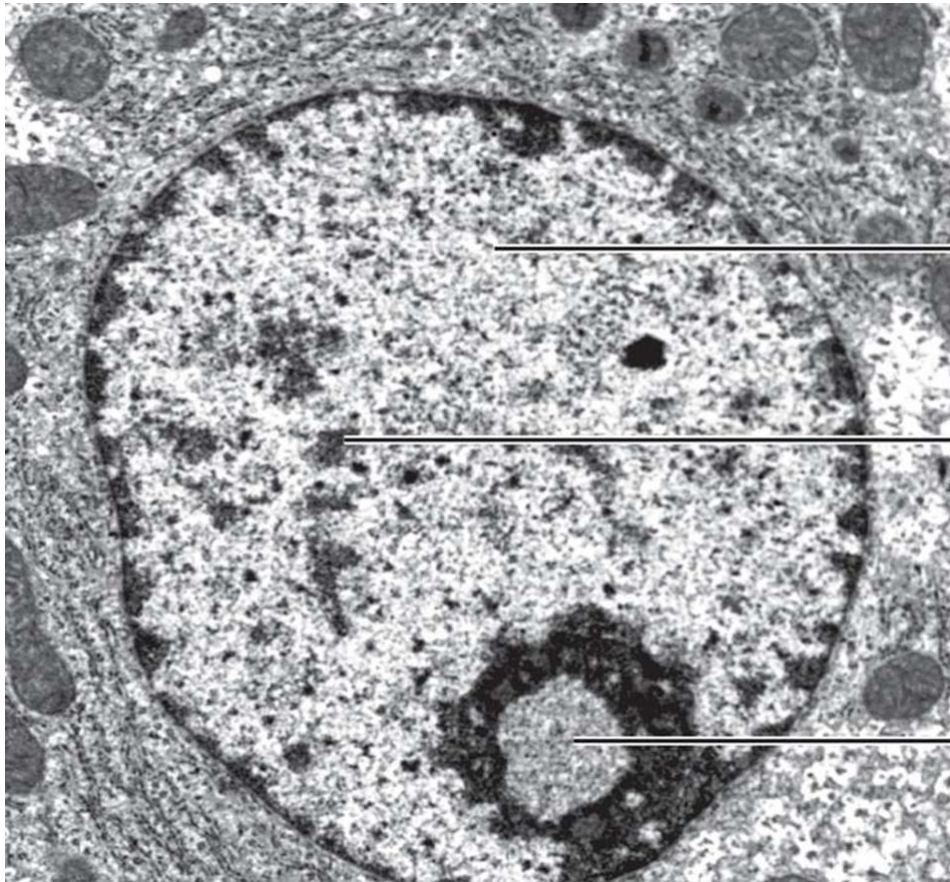
Genová transkripce

- Vazba histonu H1 na linker DNA vyvolá **kondensaci chromatinu** – sdružování nukleosomů a tím spiralizaci nukleosomového řetězce do **solenoidní struktury**



Genová transkripce

- Kondensovaný chromatin = heterochromatin – transkripčně inaktivní, nejvyšší stupeň kondensace – mitotické chromozomy
- Euchromatin – nižší stupeň kondensace chromatinu – transkripčně aktivní



euchromatin

heterochromatin

nucleolus

Genová transkripce

- Geny jsou obsaženy v řetězci DNA – obsahují:
 - ❑ kódující oblasti – exony a mezi nimi nekódující introny – do proteinů se nepřepisují
 - ❑ Oblast **promotoru** – na ni se váže RNA polymeráza – **iniciační místo transkripce** (obvykle obsahuje TATA – TATA box)
 - ❑ **Iniciační místo translace** – určuje první aminokyselinu v proteinu
 - ❑ **Terminační kodon translace**
 - ❑ 3' nepřekládanou oblast – sekvence s **polyA konec** – stabilizační funkce v molekule mRNA, napomáhá jejímu exportu z jádra a translaci do proteinu
- Přepis **negativního řetězce DNA** od 3' k 5', RNA roste od 5' k 3'.

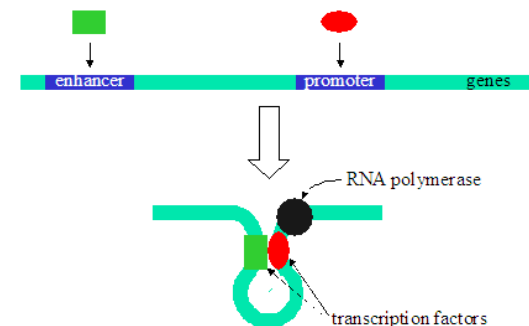
Genová transkripce

- Oblast promotoru – na ni se váže RNA polymeráza – iniciační místo transkripce (obvykle obsahuje **TATA – TATA box**)

Pro vazbu RNA polymerázy k promotoru jsou nezbytné proteiny – **transkripční faktory** – aktivují **genovou expresi** – rozvolňují heterochromatin, uvolňují RNA polymerázu, brání kondensaci chromatinu, obsahují specifickou **DNA vazební doménu** – vazba na promotory nebo enhancery, a **transaktivační doménu** – aktivace anebo inhibice transkripce příslušného genu

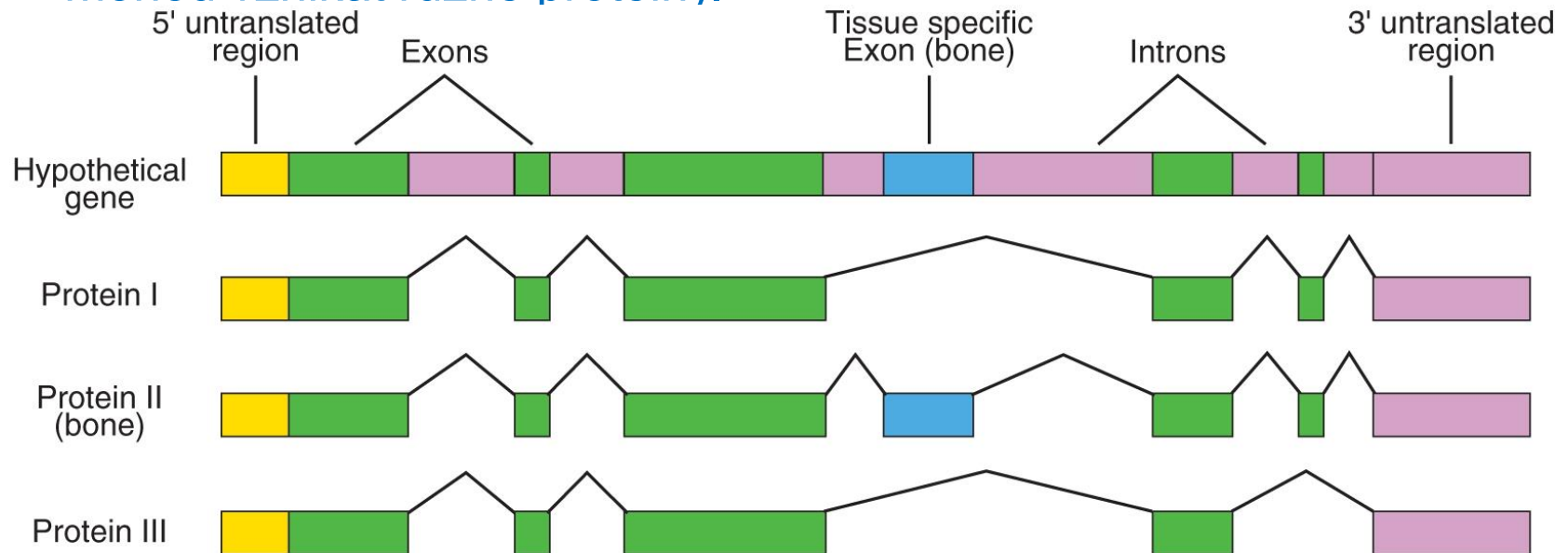
Zesilovače transkripce – **enhancery** – regulační elementy DNA – aktivují promotory (k řízení exprese jednoho genu mohou v různých tkáních být použity různé enhancery)

Utlumovače transkripce – **silencery**



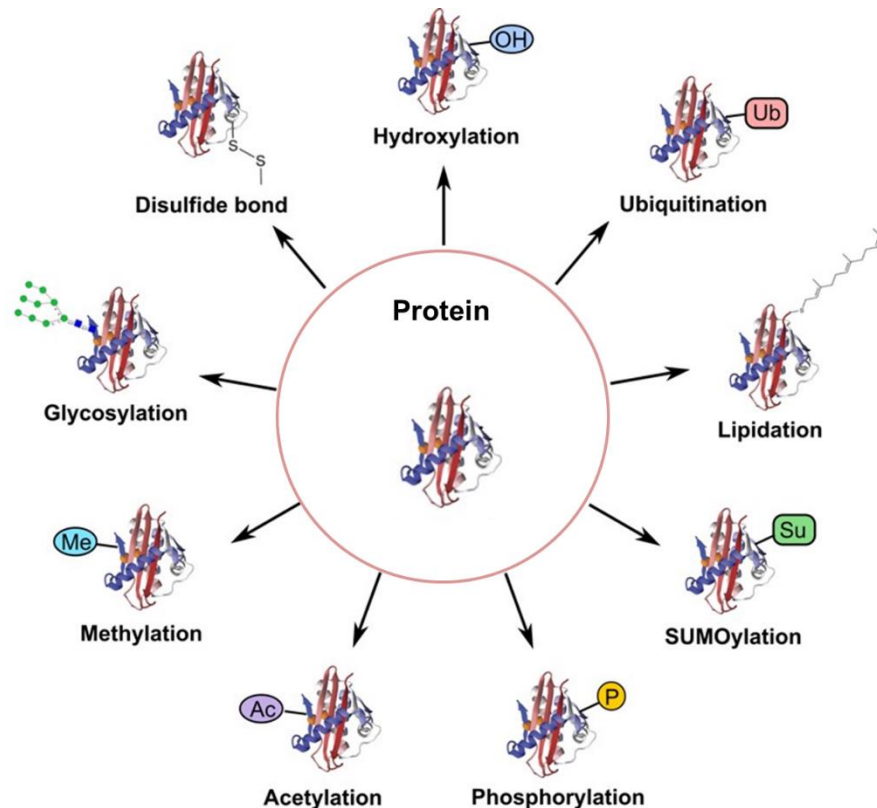
Další regulátory genové exprese

- Primární transkript genu = jaderná RNA (nRNA) – premesengerová RNA – je delší než mRNA, protože obsahuje introny – jsou odstraňovány při přenosu z jádra do cytoplazmy – splicing (sestřih) – v spliceosomech (komplexy malých jaderných RNA – snRNA a proteinů, které rozeznávají specifická místa sestřihu)
- Alternativní splicing – odstraněním různých kombinací intronů mohou vznikat různé proteiny.



Další regulátory genové exprese

- Posttranslační úpravy – modifikace – po syntéze nového proteinu – ovlivňují jeho funkci (některé proteiny musí být nejprve štěpeny, aby se aktivovaly, případně fosforylovány....) – počet proteinů se blíží 5-násobku počtu existujících genů!



Indukce a tvorba orgánů

- Orgány vznikají interakcemi mezi tkáněmi – jedna složka indukuje druhou
- Jeden buněčný typ při interakci působí jako induktor – vysílá signál, druhý – responder – odpovídá na signál
- Schopnost odpovídat – indukční vnímavost (kompetence)
- Často – interakce epithelo-mezenchymové
- Aby však pokračovala diferenciací a vývoj orgánu, je mezi tkáněmi potřebný tzv. cross-talk – vzájemné ovlivnění!

Buněčná signalizace

- **Parakrinní reakce** – přenos se děje prostřednictvím proteinů (parakrinní faktory – či růstové a diferenciační faktory – **GDF** – growth and differentiation factors) syntetizovaných jednou buňkou, které **difundují na krátké vzdálenosti**
- **Kontaktní interakce** – nezahrnují difundující proteiny

Růstové a diferenciační faktory – GDF

- Většinou se řadí do 4 rodin:
 - ❑ FGF (fibroblast growth factor)
 - ❑ WNT
 - ❑ Hedgehog
 - ❑ TGF β – transforming growth factor β
- Regulují vývoj orgánů v celé živočišné říši

□ FGF (fibroblast growth factor)

- Známo více než 20 genů *FGF*
- Proteiny z nich odvozené aktivují receptory s tyrozinkinázovou aktivitou FGFR (receptory fibroblastových růstových faktorů)
- Odpovědné za angiogenezi, růst axonů, diferenciaci mesodermu

□WNT

- 15 různých druhů WNT proteinů
- Receptory z řady Frizzled (PCP)
- Utváření končetin
- Rozvoj středního mozku
- Diferenciace somitů
- Urogenitální systém

□ Hedgehog

- Desert, Indian, Sonic hedgehog
- SHH – regulace řady vývojových dějů – předozadní osa končetin, indukce nervové trubice, diferenciace somitů, regionalizace střeva
- Receptorem je Patched – váže se na Smoothed – přenáší (transdukuje) signál Shh a je inhibován receptorem Patched, dokud se hedgehog na tento receptor nenaváže

☐ nadrodina TGF β – transforming growth factor β

- Přes 30 členů
- Patří sem významná rodina Bmp (bone morphogenetic protein), rodina aktivinů, inhibinů...
- Tvorba extracelulární matrix a diferenciace epitelu plic, ledvin a slinných žláz
- Rodina BMP indukuje vývoj kostí, zapojuje se do regulace dělení buněk, buněčné smrti (apoptosy) a migrace buněk

Buněčná signalizace – signální dráhy

- Parakrinní faktory působí prostřednictvím signálních drah – aktivují dráhu přímo nebo blokují inhibitory dráhy (např. hedgehog)
- Signální dráhy zahrnují **signální molekulu (ligand)** a **receptor** – prochází membránou – má extracelulární, transmembránovou a cytoplasmatickou doménu
- Ligand se naváže a receptor, čímž indukuje v něm změnu, která aktivuje cytoplasmatickou doménu – výsledkem je aktivace enzymatické složky cytoplasmatické domény receptoru (např. kináza), která fosforyluje další proteiny pomocí ATP, čímž tyto proteiny aktivuje, aby fosforylovaly další – kaskáda proteinových reakcí nakonec aktivuje transkripční faktor – ten aktivuje nebo inhibuje genovou expresi

Juxtakrinní (kontaktní) signalizace

- Také zprostředkovaná signálními drahami, ale nepodílejí se na ní difundující faktory.
- 3 způsoby:
 - ❑ Protein na povrchu jedné buňky reaguje s receptorem na sousední buňce (dráha proteinu Notch – diferenciace neuronů, segmentace somitů, specifikace krevních cév)
 - ❑ Ligandy v extracelulární matrix vyloučené jednou buňkou reagují s receptory na sousedních buňkách (receptory – integriny – vážou extracelulární molekuly jako fibronectin a laminin – spojují molekuly matrix s cytoskeletem umožňují buňkám migrovat – např. tvorba chrupavky)
 - ❑ Přímý přenos signálů z jedné buňky do druhé (gap junctions – komunikační spojení) – kanály mezi buňkami, jimiž procházejí malé molekuly a ionty (např. epitel střeva a nervová trubice)
- Členové příslušné proteinové rodiny mohou ztrátu funkce signálního proteinu kompenzovat!