

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

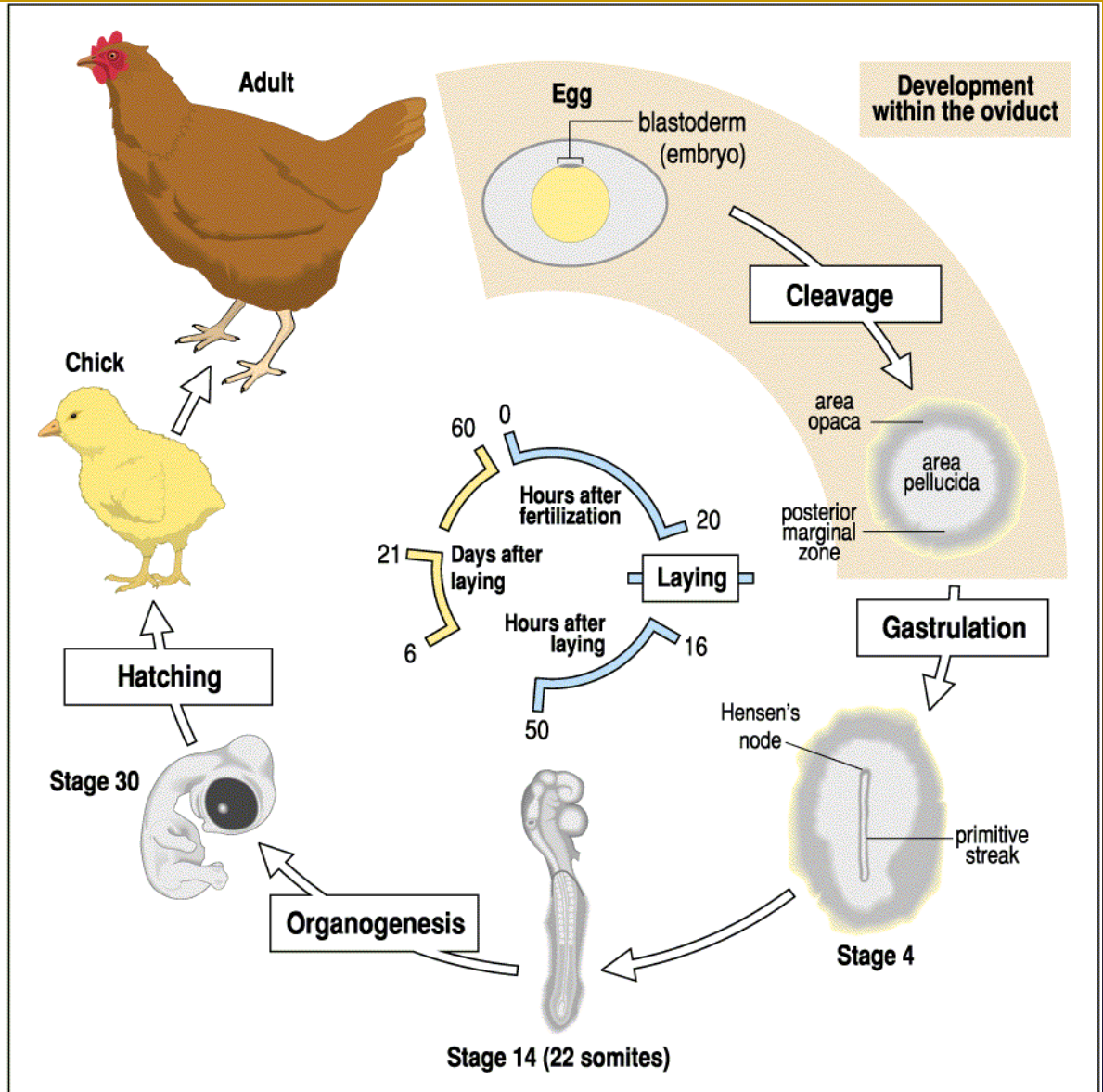
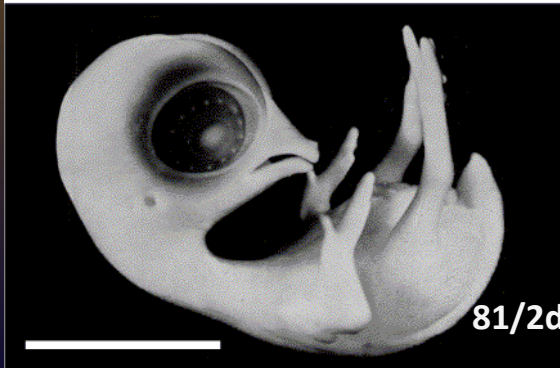
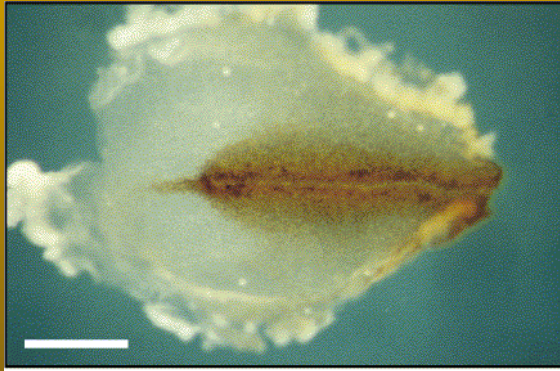
Ανάπτυξης



Ενότητα 7:

Η ανάπτυξη της όρνιθας

Gallus domesticus



Τα πλεονεκτήματα του *Gallus domesticus*

➤ Η εμβρυική ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με αυτή των θηλαστικών.

➤ Τα έμβρυα προσφέρονται πολύ περισσότερο από τα θηλαστικά για μια σειρά εμβρυολογικών χειρισμών (π.χ. Μεταμοσχεύσεις εμβρυϊκών τμημάτων)

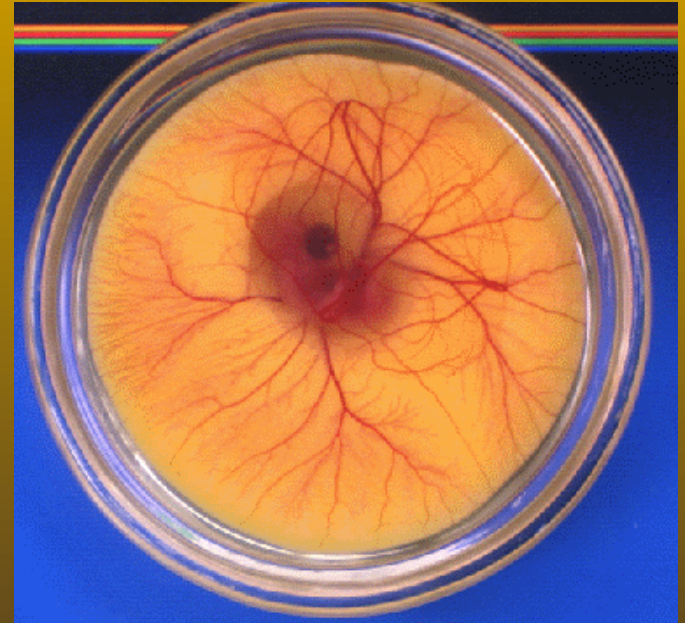
➤ Τα έμβρυα αναπτύσσονται γρήγορα.

➤ Οι χειρισμοί μπορούν να γίνουν και μέσα στο αυγό χωρίς την απομάκρυνση του εμβρύου η θρέψη εξακολουθεί και γίνεται από αυτό.

➤ Μπορεί κανείς να προμηθεύεται καθημερινά όσα έμβρυα θέλει σε χαμηλές τιμές από το ελεύθερο εμπόριο.

➤ Δεν απαιτούνται ιδιαίτερες εγκαταστάσεις (μόνο επωαστήρες)

➤ Αλληλούχηση γονιδιώματος, 2004



Τα μειονεκτήματα του *Gallus domesticus*

➤ Παντελής απουσία Γενετικής.

➤ Απουσία διαγονιδιακής Τεχνολογίας (υπάρχουν ωστόσο μέθοδοι υπερ/εκτοπικής έκφρασης).

Crispr/Cas9



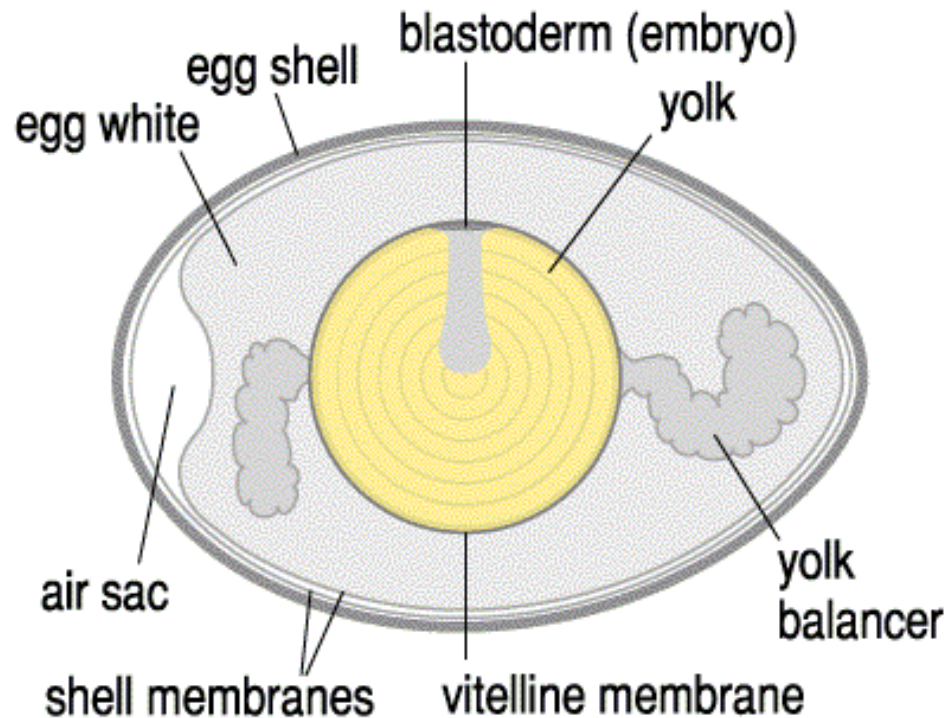
Το αυγό του *Gallus domesticus*

➤ Υψηλή περιεκτικότητα σε λέκιθο.

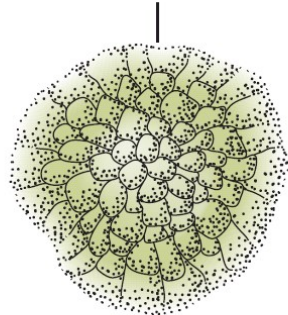
➤ Η αλβουμίνη και το κέλυφος εναποτίθενται καθώς προωθείται στον ωαγωγό μετά τη γονιμοποίηση.

➤ Η αυλάκωση λαμβάνει χώρα στον ωαγωγό. Μεροβλαστική

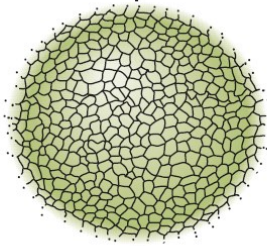
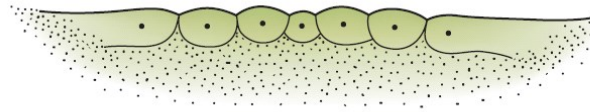
Structure of the fertilized hen's egg when laid



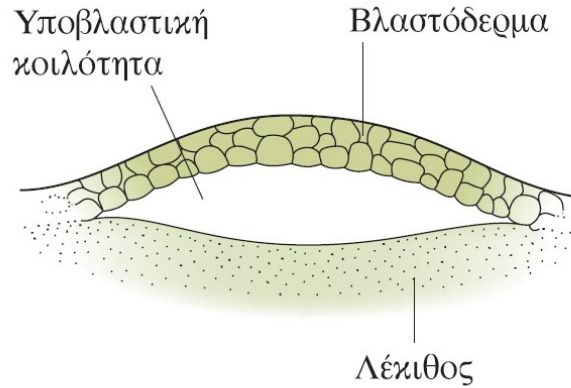
Αυλάκωση



(α) Αυλάκωση



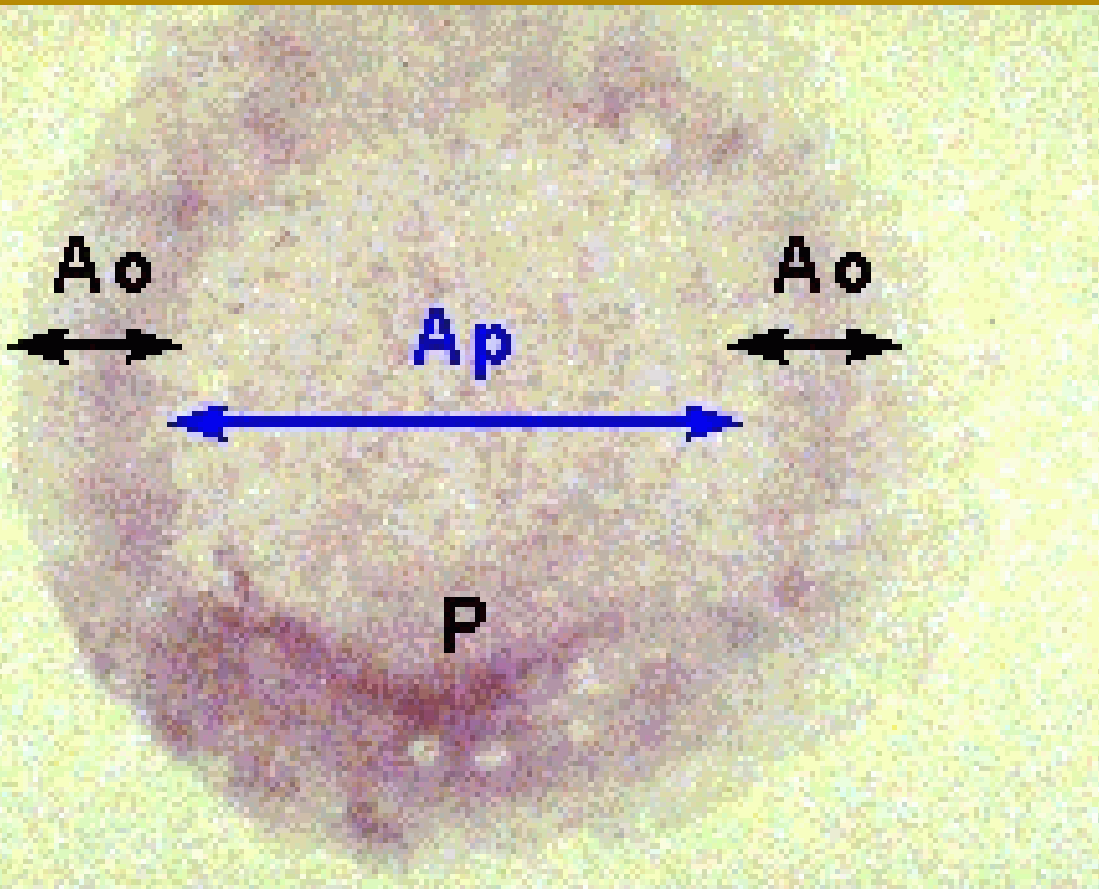
(β) Βλαστόδερμα, στάδιο V



➤ Μεροβλαστική
δισκοειδής αυλάκωση
οι κυτταρικές διαιρέ-
σεις περιορίζονται στο
ελάχιστο κυτταρό-
πλασμα που υπάρχει
στο ζωϊκό πόλο.

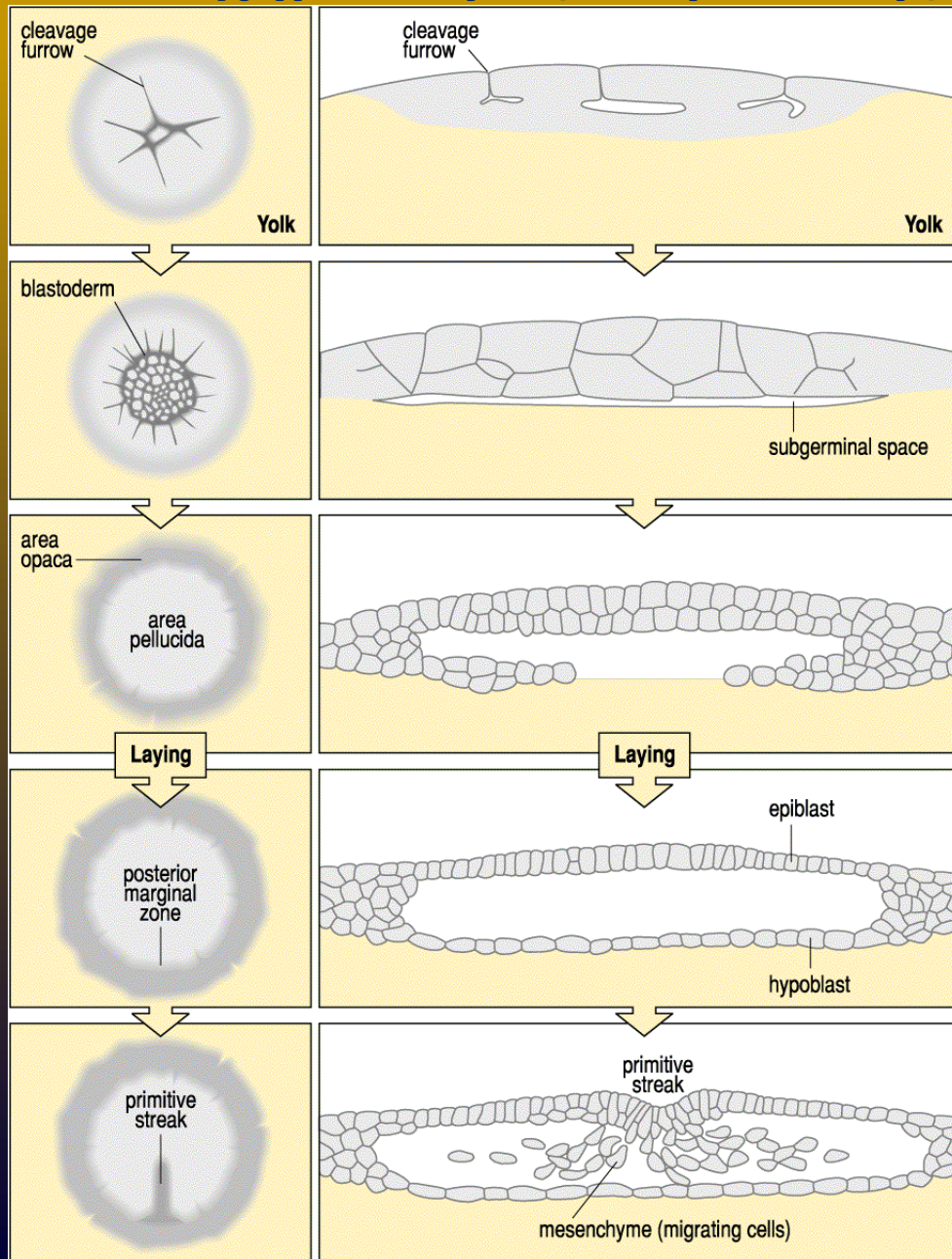
Η ανάπτυξη του βλαστοδέρματος στο έμβρυο της όρνιθας. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν τα επίπεδα στα οποία έχουν γίνει οι τομές που παρουσιάζονται στη δεξιά πλευρά.

Αυλάκωση



➤Μεροβλαστική
δισκοειδής αυλάκωση
οι κυτταρικές διαιρέ-
σεις περιορίζονται στο
ελάχιστο κυτταρό-
πλασμα που υπάρχει
στο ζωϊκό πόλο.

Αυλάκωση σχηματισμός επιβλάστης στο έμβρυο της ορνιθας



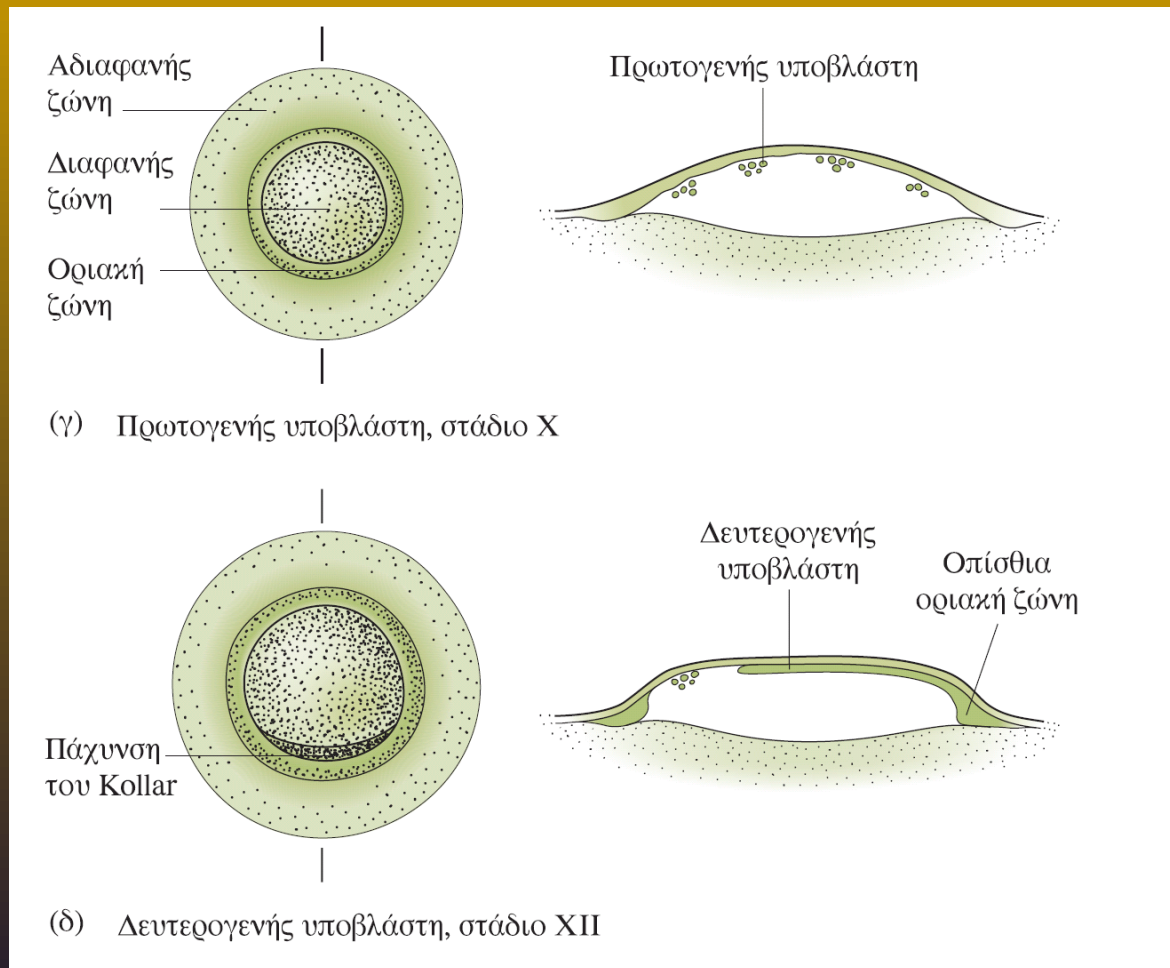
➤ Η πρώτη διαίρεση γίνεται κοντά στο κέντρο.

➤ Αρχικά τα κύτταρα είναι σε επαφή με τη λέκιθο, στη συνέχεια αποχωρίζονται (σχηματισμός υποβλαστικής κοιλότητας)

➤ Κατά τη γέννηση το βλαστόδερμα (βλαστίδιο) αποτελείται από 2×10^4 - 6×10^4 κύτταρα.

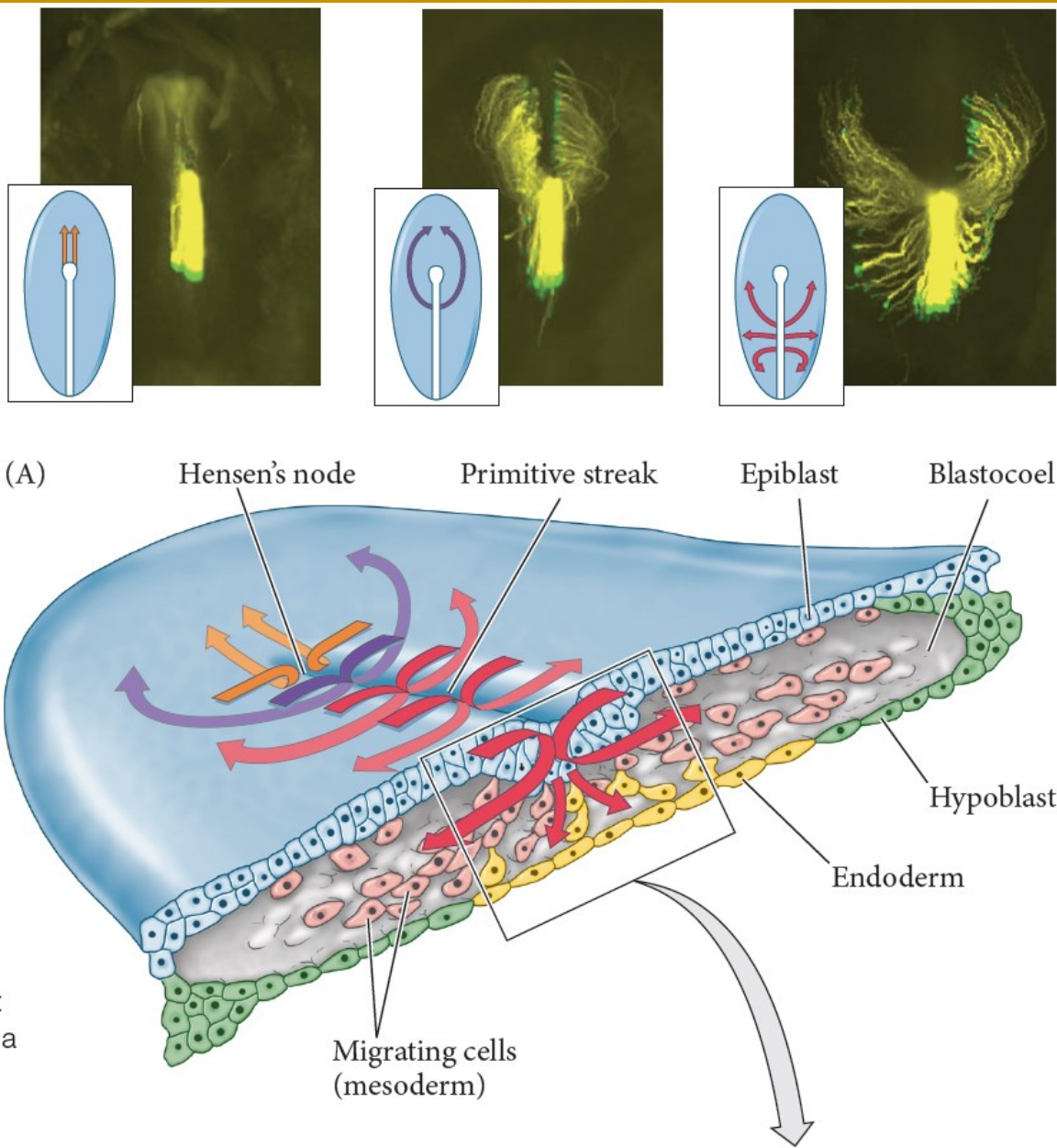
➤ Αποκόλληση - μετανάστευση κυττάρων από το βλαστόδερμα και την οπίσθια οριακή ζώνη οδηγεί στο δίστιβο έμβρυο (υποβλάστη-επιβλάστη).

Αυλάκωση - σχηματισμός επιβλάστης στο έμβρυο της ορνιθας



Η ανάπτυξη του βλαστοδέρματος στο έμβρυο της όρνιθας μέχρι τη στιγμή της ωοτοκίας. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν τα επίπεδα στα οποία έχουν γίνει οι τομές που παρουσιάζονται στη δεξιά πλευρά.

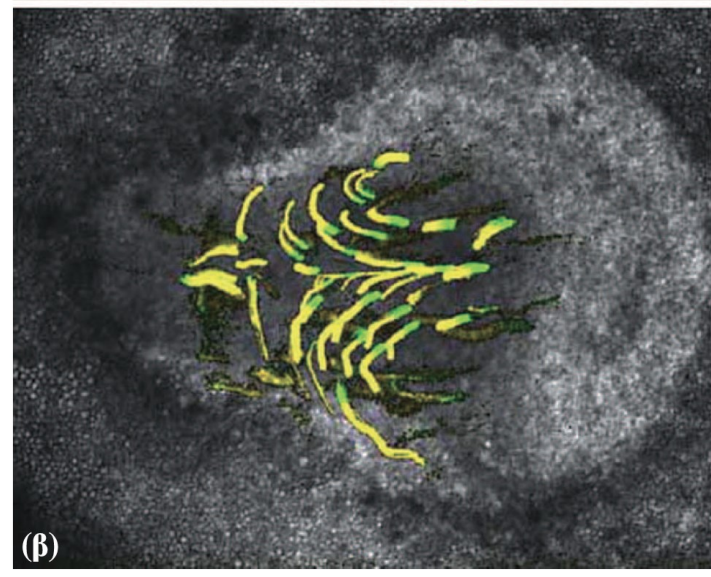
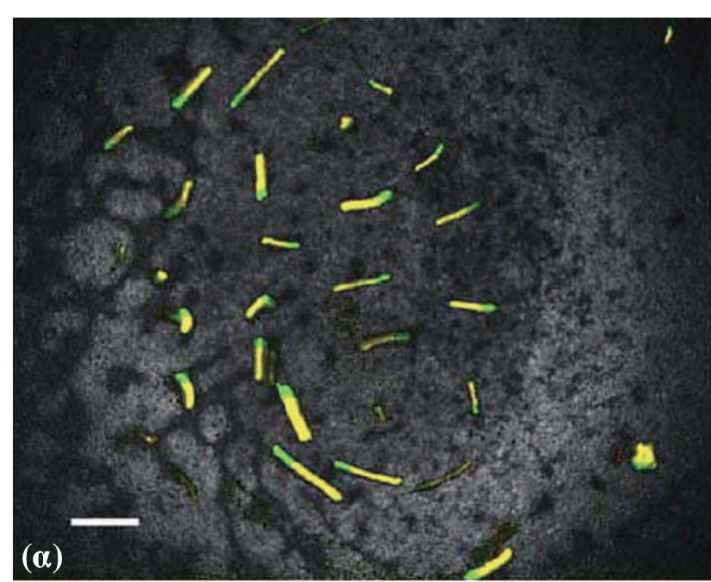
Γαστριδίωση στο έμβρυο της ορνιθας



➤ Η γαστριδίωση αρχίζει με το σχηματισμό της αρχικής γραμμής (primitive streak) που εκτείνεται από την οπίσθια οριακή ζώνη. Τα μελλοντικά ενδοδερμικά και μεσοδερμικά κύτταρα μεταναστεύουν μέσω της αρχικής γραμμής. Το εμπρόσθιο τμήμα της ονομάζεται κομβος του Hensen.

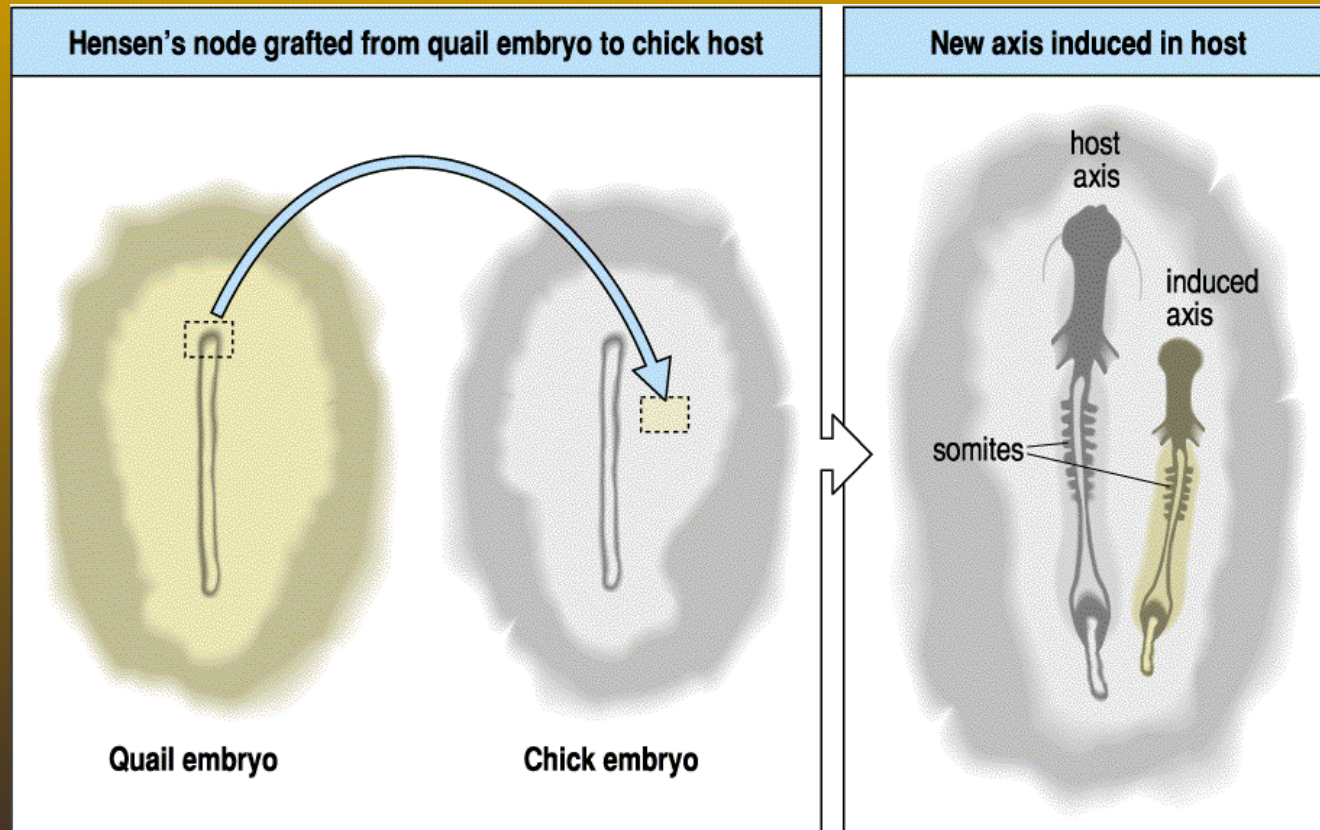
➤ Από τον κόμβο του Hensen διέρχονται πρώτα φαρυγγικό ενδόδερμα, προχορδιαία πλάκα, χορδομεσόδερμα (=κεφαλή και νωτοχορδή).

Οι κινήσεις του «πολωνικού χορού» των κυττάρων της επιβλάστης κατά τον σχηματισμό της αρχικής λωρίδας



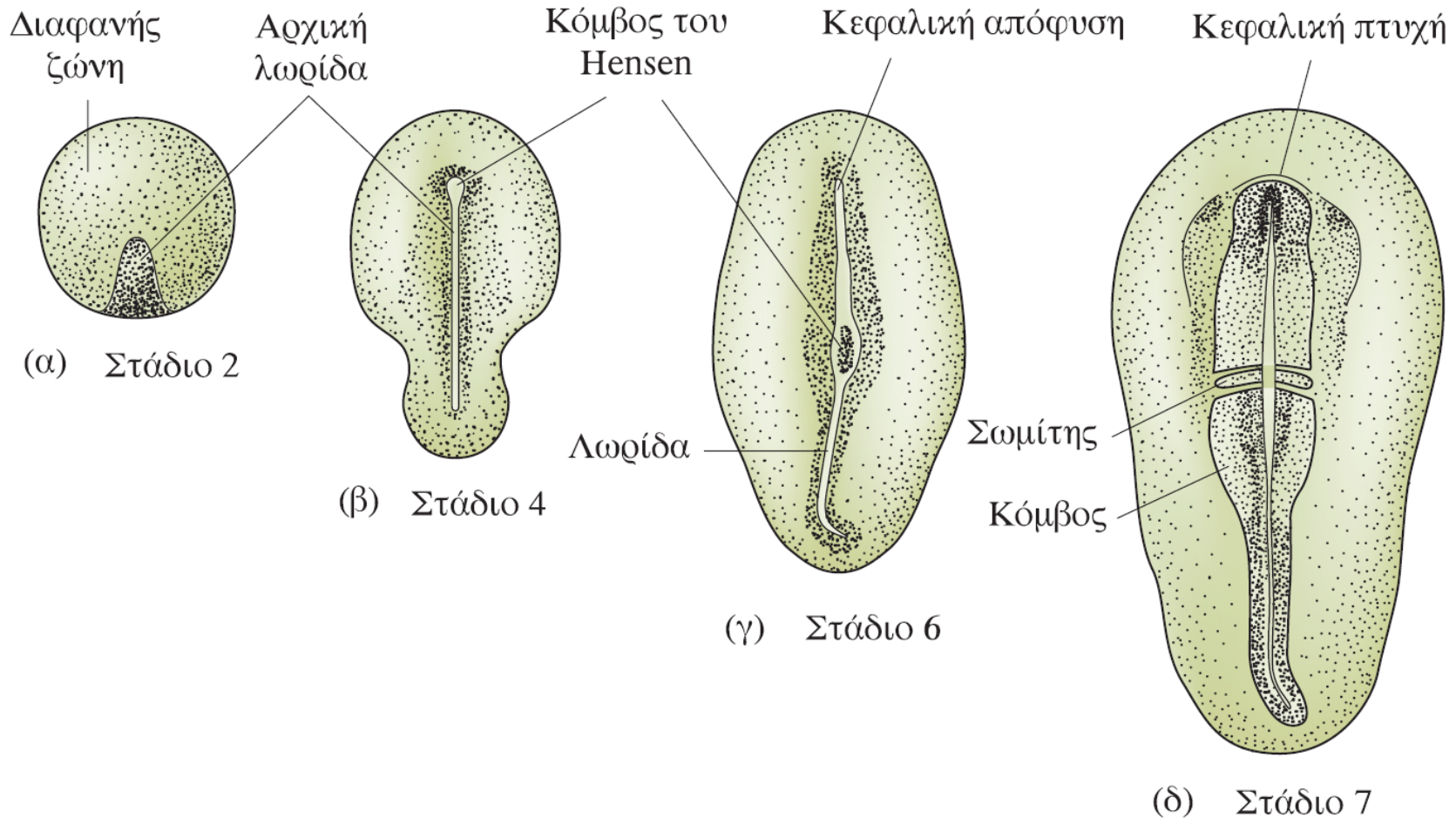
Το οπίσθιο είναι προς τα αριστερά. Στο πείραμα που παρουσιάζεται έχει γίνει σήμανση με ένεση Dil σε μικρές ομάδες κυττάρων και ακολούθησε κινηματογράφηση. Κάθε έγχρωμη γραμμή υποδεικνύει το μονοπάτι που ακολούθησε μια σημασμένη ομάδα σε διάστημα 160 λεπτών. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται η πορεία της ομάδας τα τελευταία 40 λεπτά. (α) Σήμανση στο στάδιο 1, (β) σήμανση στο στάδιο 3. Από τη δημοσίευση Cuia *et al.* (2005) *Developmental Biology* **284**, 37-47.

Ο κόμβος του Hensen επάγει το σχηματισμό νέου άξονα στο έμβρυο της ορνιθας



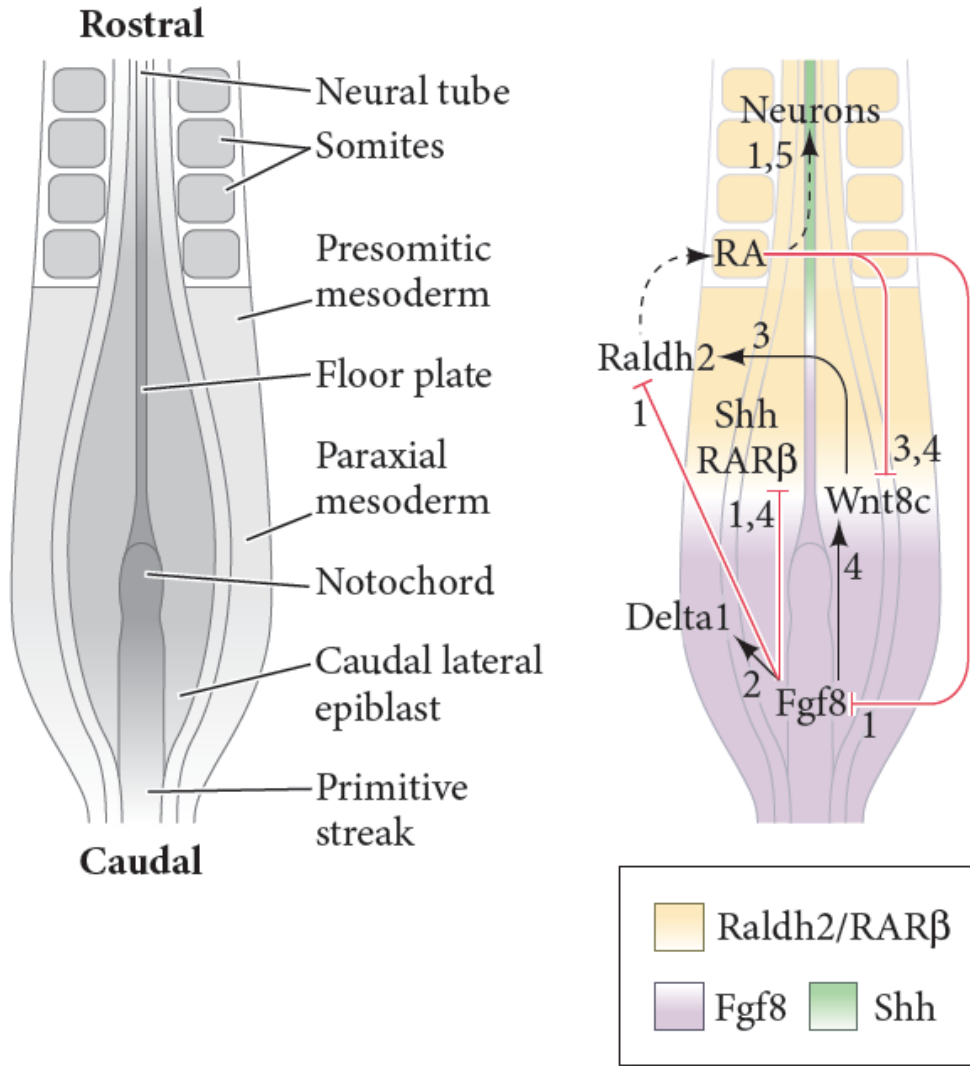
➤ Μεταμόσχευση κόμβου του Hensen από πέρδικα σε όρνιθα. Ο κόμβος του Hensen επάγει το σχηματισμό ενός πλήρους δεύτερου άξονα στον οποίο περιλαμβάνονται κύτταρα του κοτόπουλου των οποίων η τύχη έχει επαναπροσδιοριστεί (τα κύτταρα της πέρδικας ξεχωρίζουν από του κοτόπουλου με βάση τη μορφολογία του πυρήνα). Ο κόμβος του ποντικού δεν έχει αυτή τη δυνατότητα.

Γαστριδίωση



Φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Το έμβρυο φτάνει στο στάδιο 7 περίπου μετά από μία ημέρα επώασης. Στους παραπάνω χρόνους δεν έχει υπολογισθεί ο χρόνος παραμονής του εμβρύου στον ωαγωγό (περίπου μία ημέρα).

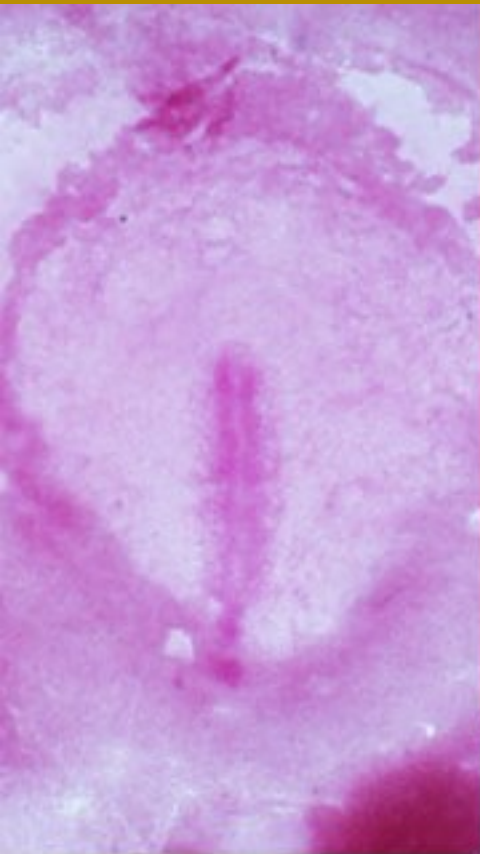
Γαστριδίωση



- Επιμήκυνση του εμβρύου
- Εμβryo στο στ 10. Η έκφραση του Fgf8 καταστέλλει την έκφραση του Raldh2 στο προσωμικό μεσόδερμα και την έκφραση του υποδοχέα του RA στο νευροεξώδερμα. Έτσι παρεμποδίζεται η διαφοροποίηση.
- Επιπλέον ο Fgf8 παρεμποδίζει τη σηματοδότηση shh από τη νωτοχορδή ενώ επάγει την έκφραση του προσδέτη Delta1 και του Wnt8c που στο όριο επάγει το Raldh2 οπότε παράγεται RA που καταστέλλει τη σηματοδότηση Fgf8 και Wnt8c

Wilson et al. 2009 (βλ. επόμενα μαθήματα)

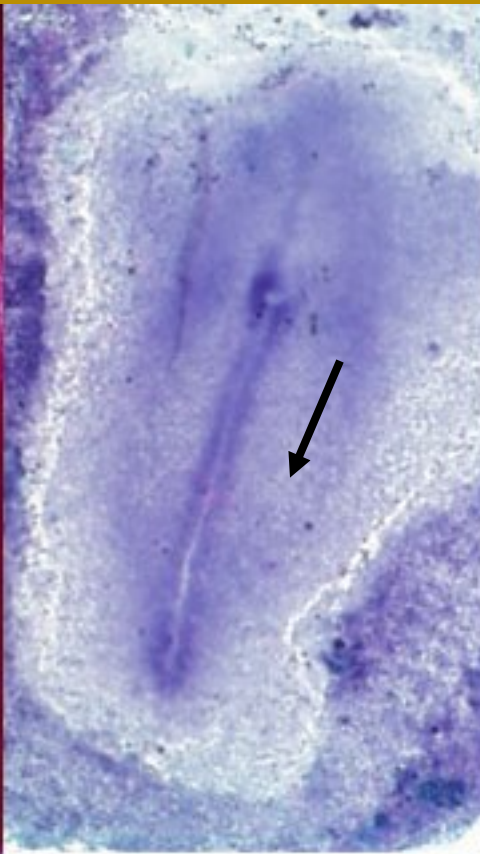
Γαστριδίωση



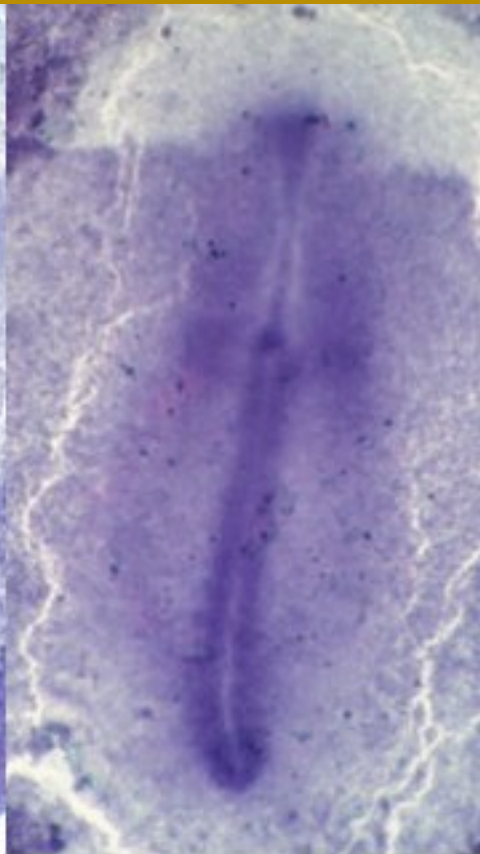
3



4



5



6

Γαστριδίωση



7



8-

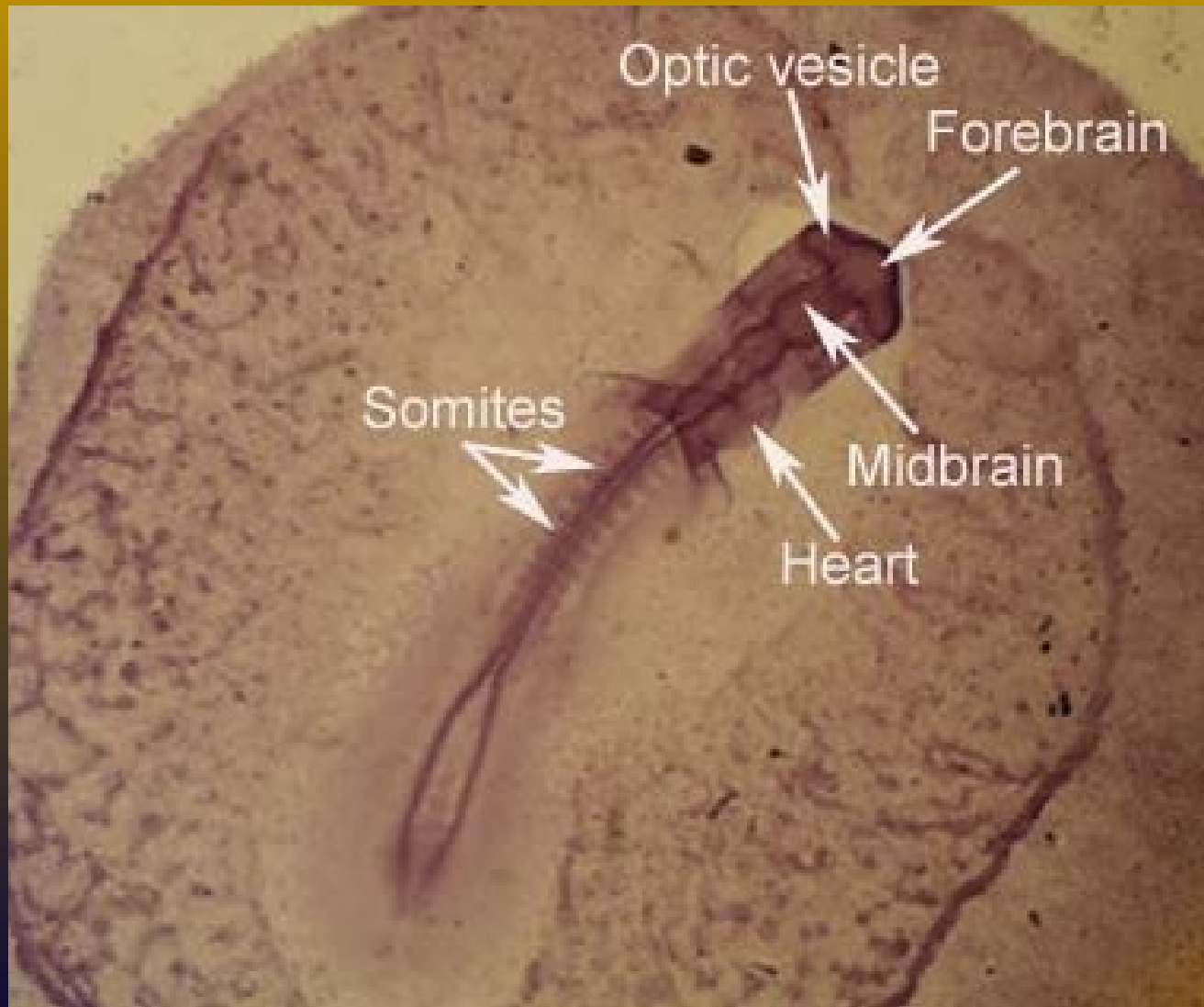


8

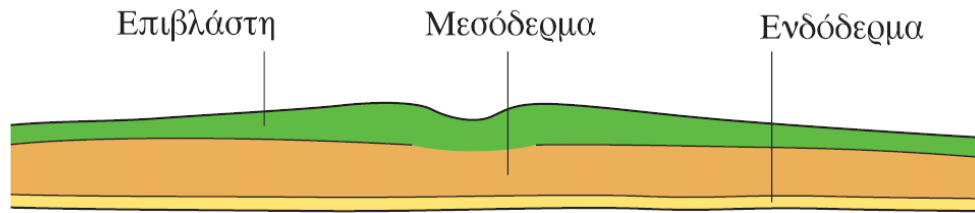


9

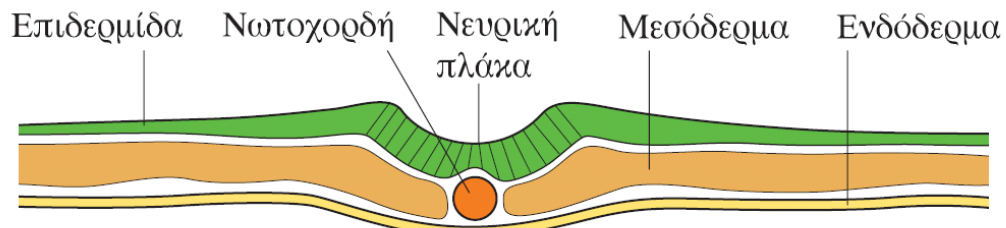
Γαστριδίωση



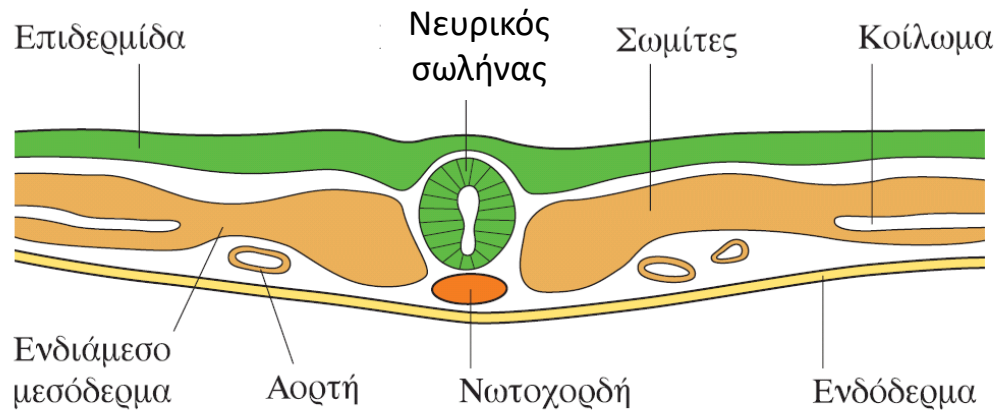
Φυσιολογική ανάπτυξη



(α) Αρχική λωρίδα



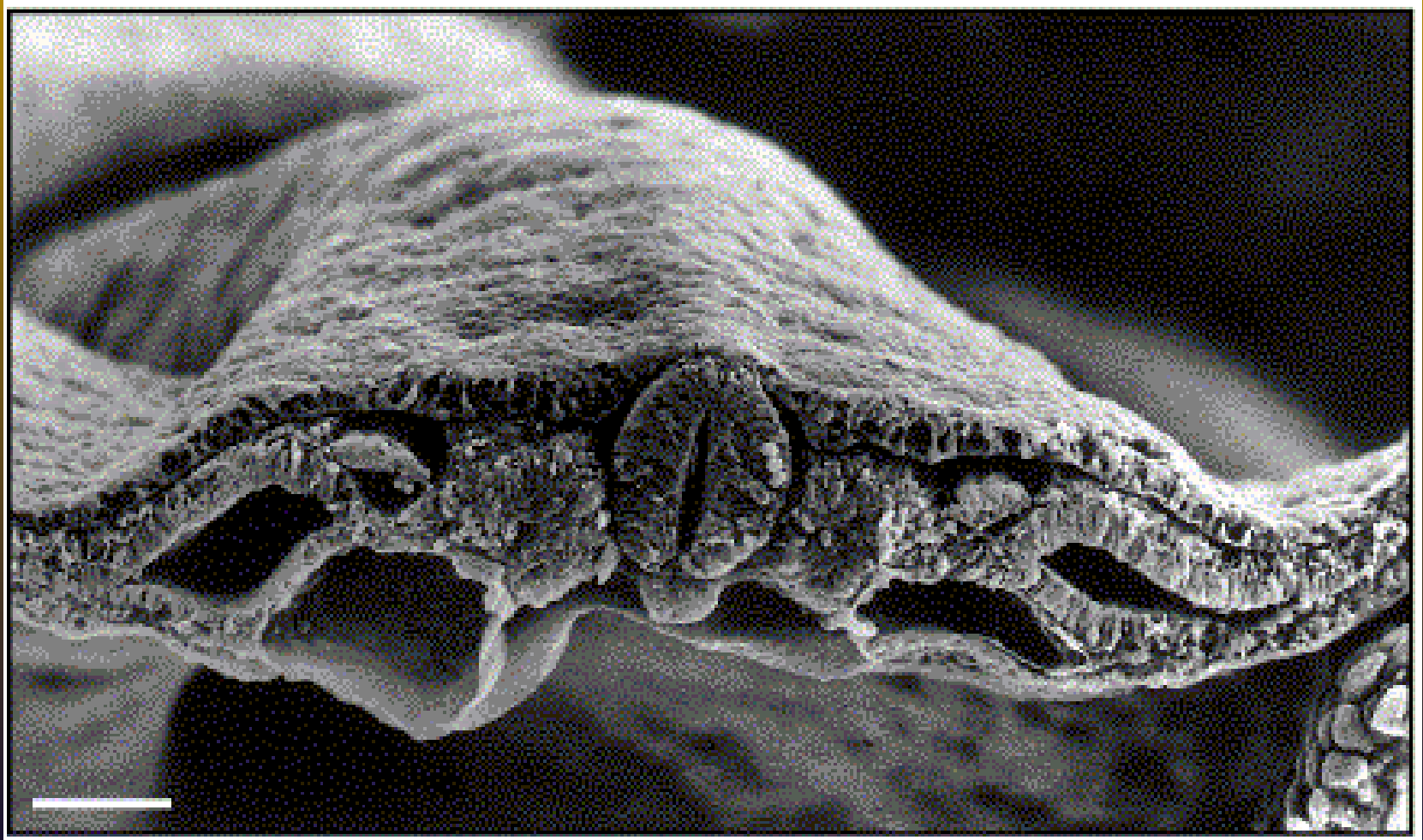
(β) Στάδιο νευρικής πλάκας



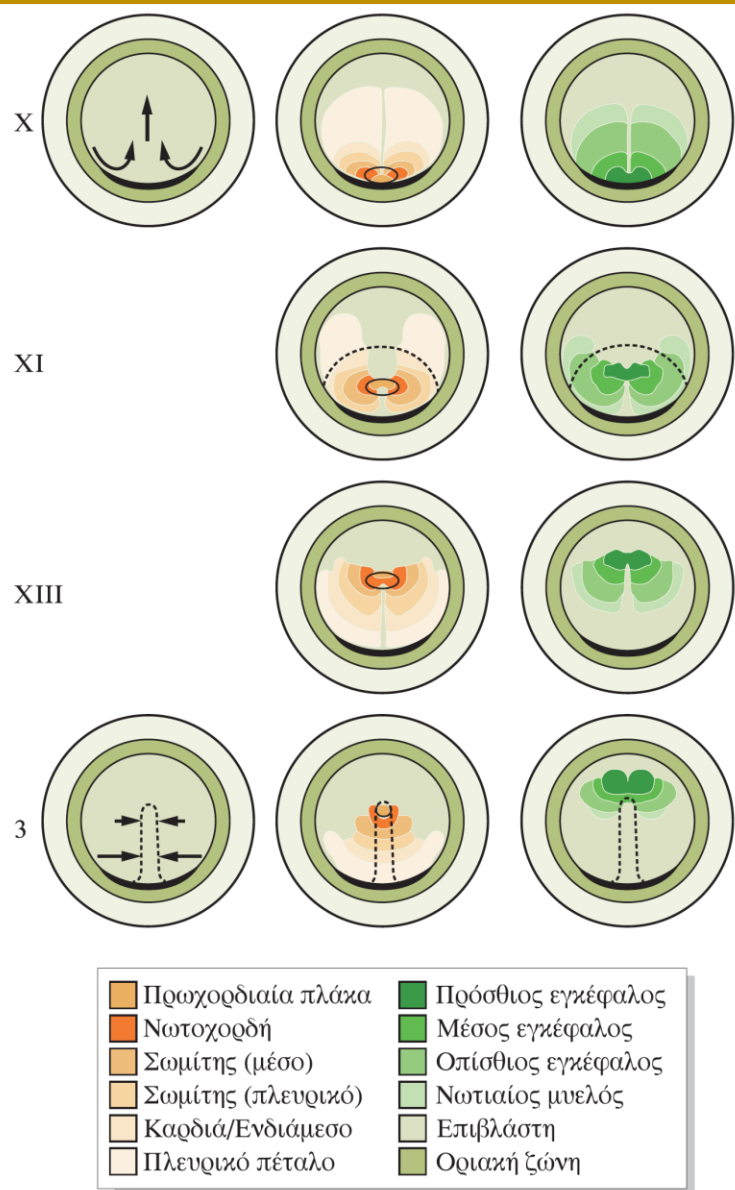
(γ) Στάδιο νευρικού σωλήνα

Φυσιολογική ανάπτυξη στο έμβρυο της όρνιθας. Εγκάρσιες τομές σε τρία στάδια του σχηματισμού των κυρίων αξονικών δομών.

Φυσιολογική ανάπτυξη

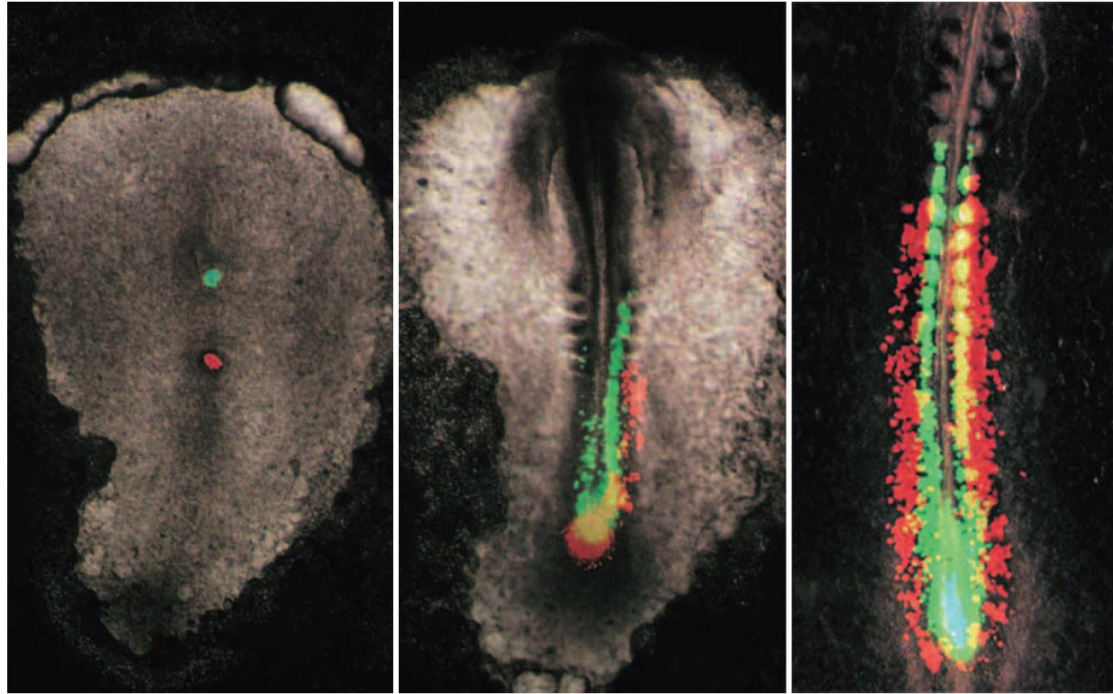


Χάρτης πεπρωμένου του πρώιμου βλαστοδέρματος του εμβρύου της όρνιθας



Χάρτης πεπρωμένου του πρώιμου βλαστοδέρματος του εμβρύου της όρνιθας, όπως προέκυψε από πειράματα σήμανσης με ζωτικές χρωστικές. Οι δομές μεσοδερμικής προέλευσης και οι δομές του νευρικού συστήματος παρουσιάζονται ξεχωριστά. Οι κύριες κυτταρικές κινήσεις που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό είναι στην αρχή οι κινήσεις του «πολωνικού χορού» και στο τέλος η εισδοχή των κυττάρων μέσω της αρχικής λωρίδας. Από τη δημοσίευση Stern (2004) *Gastrulation: From Cells to Embryo* 219-232.

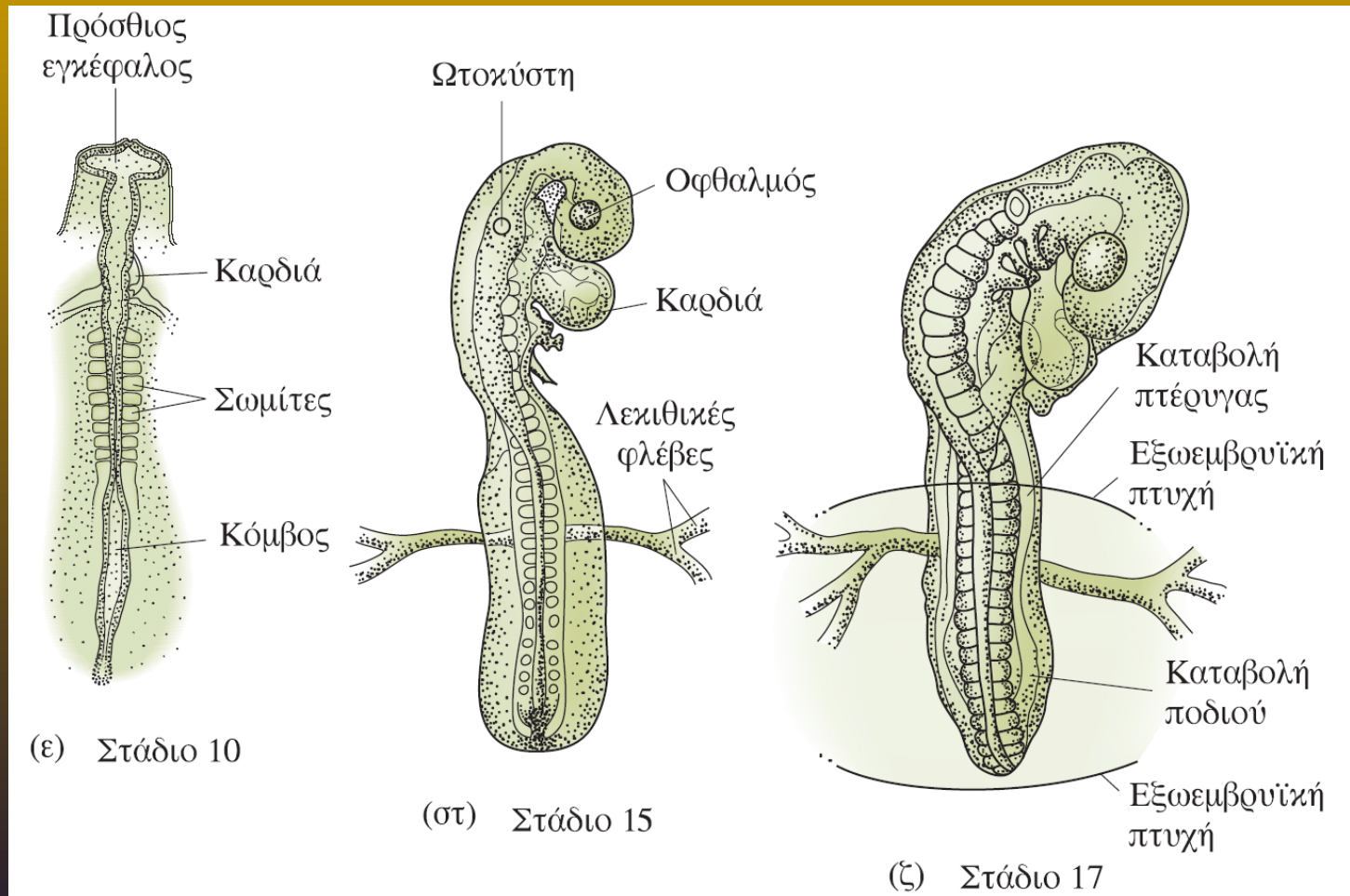
Χάρτης πεπρωμένου του εμβρύου της όρνιθας στο στάδιο της αρχικής λωρίδας



(α)

(α) Σήμανση σε διαφορετικά επίπεδα της αρχικής λωρίδας με τις χρωστικές Dil (κόκκινο χρώμα) και DiO (πράσινο χρώμα). Οι ραχιαίες δομές και οι δομές της μέσης γραμμής αναπτύσσονται από τον κόμβο, ενώ από το οπίσθιο τμήμα της αρχικής λωρίδας αναπτύσσεται το πλευρικό μεσόδερμα. Από τη δημοσίευση *limura et al. PNAS* (2007) **104**, 2744-2749.

Φυσιολογική ανάπτυξη



Φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Το έμβρυο φτάνει στο στάδιο 12 μετά από 2 ημέρες, στο στάδιο 17 μετά από 3 ημέρες. Στους παραπάνω χρόνους δεν έχει υπολογισθεί ο χρόνος παραμονής του εμβρύου στον ωαγωγό (περίπου μία ημέρα).

Φυσιολογική ανάπτυξη



14



15+

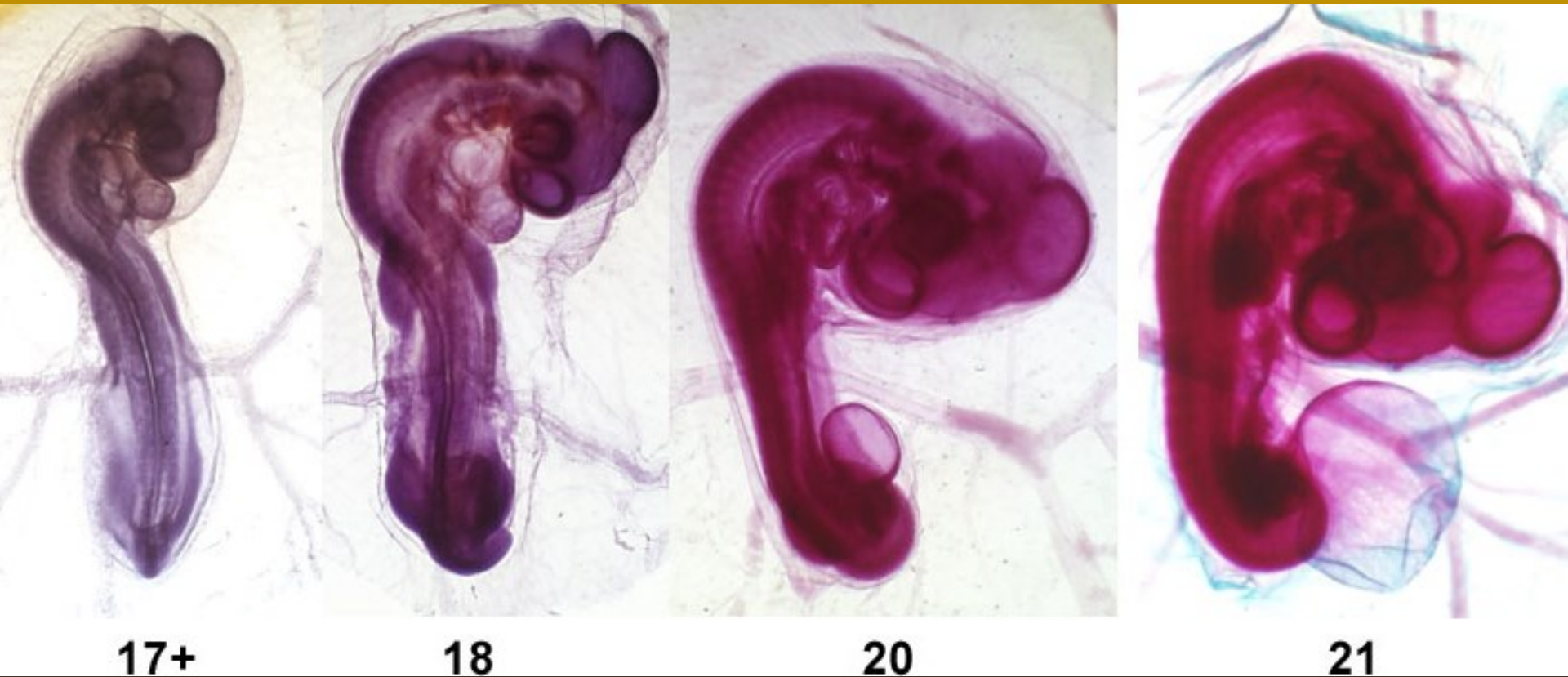


16+



17

Φυσιολογική ανάπτυξη

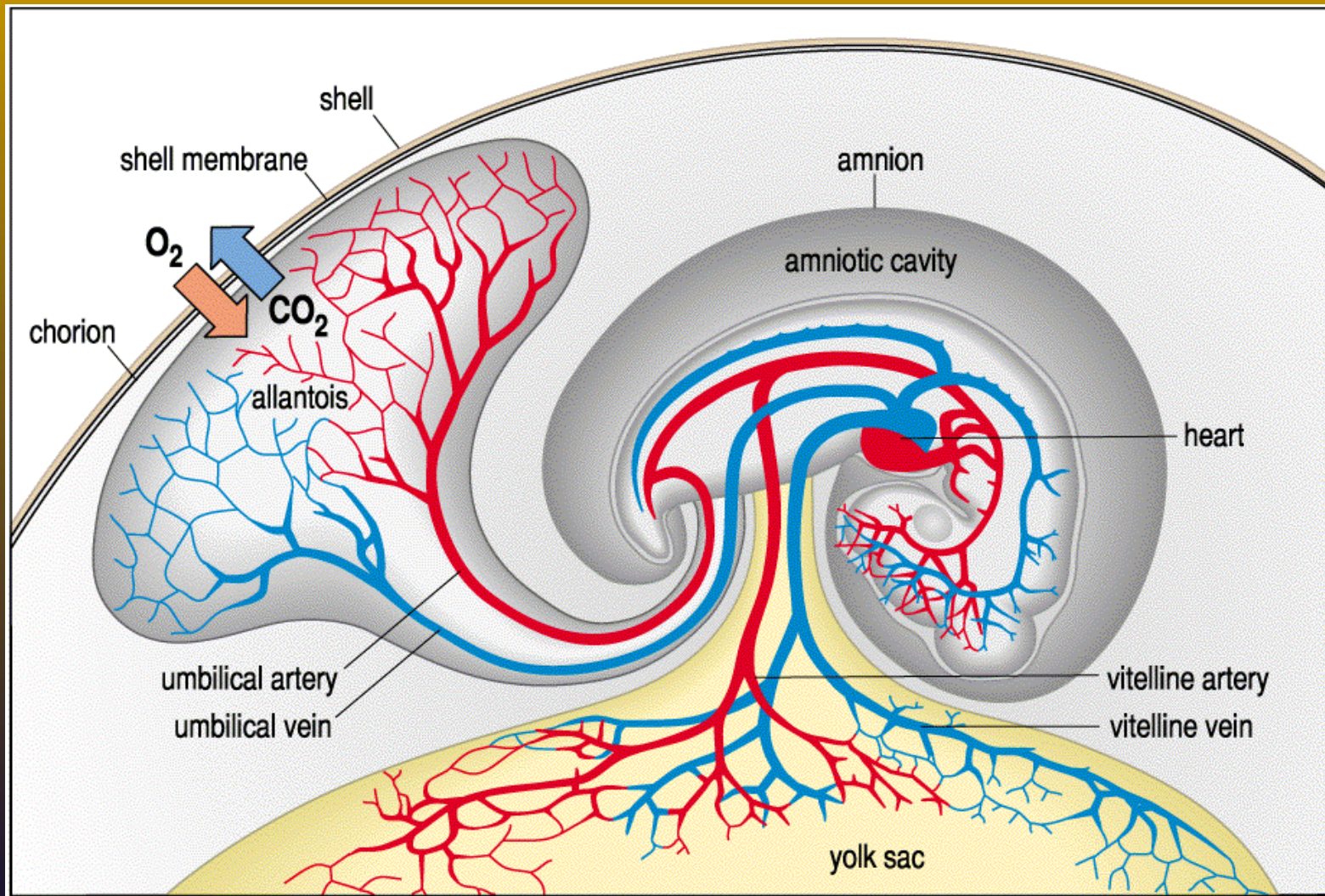


Φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Το έμβρυο φτάνει στο στάδιο 24 μετά από 4 ημέρες, στο στάδιο 35 μετά από 9 ημέρες. Στους παραπάνω χρόνους δεν έχει υπολογισθεί ο χρόνος παραμονής του εμβρύου στον ωαγωγό (περίπου μία ημέρα).

Φυσιολογική ανάπτυξη

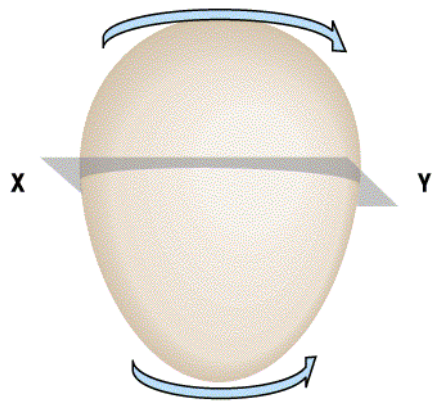


Φυσιολογική ανάπτυξη

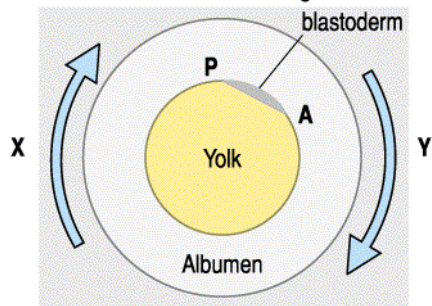


Σχηματισμός των εξωεμβρυϊκών δομών στο έμβρυο της όρνιθας.

Rotation in oviduct

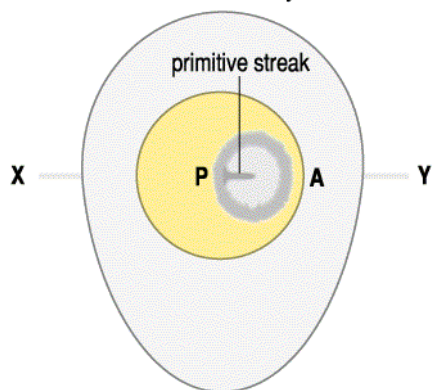


X-Y cross-section during rotation



Development after laying

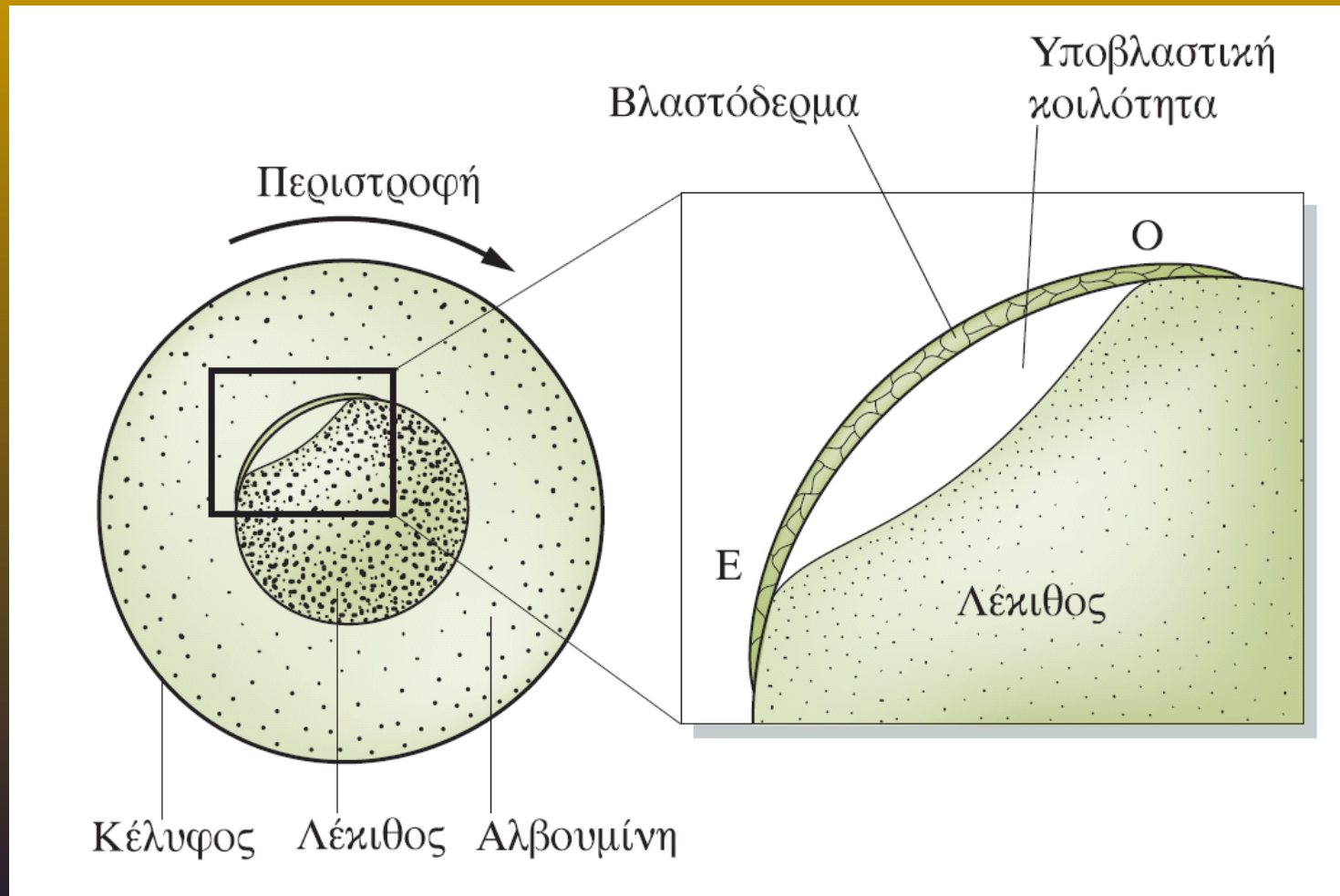
Surface view of yolk



Ο Εμπροσθοπίσθιος άξονας

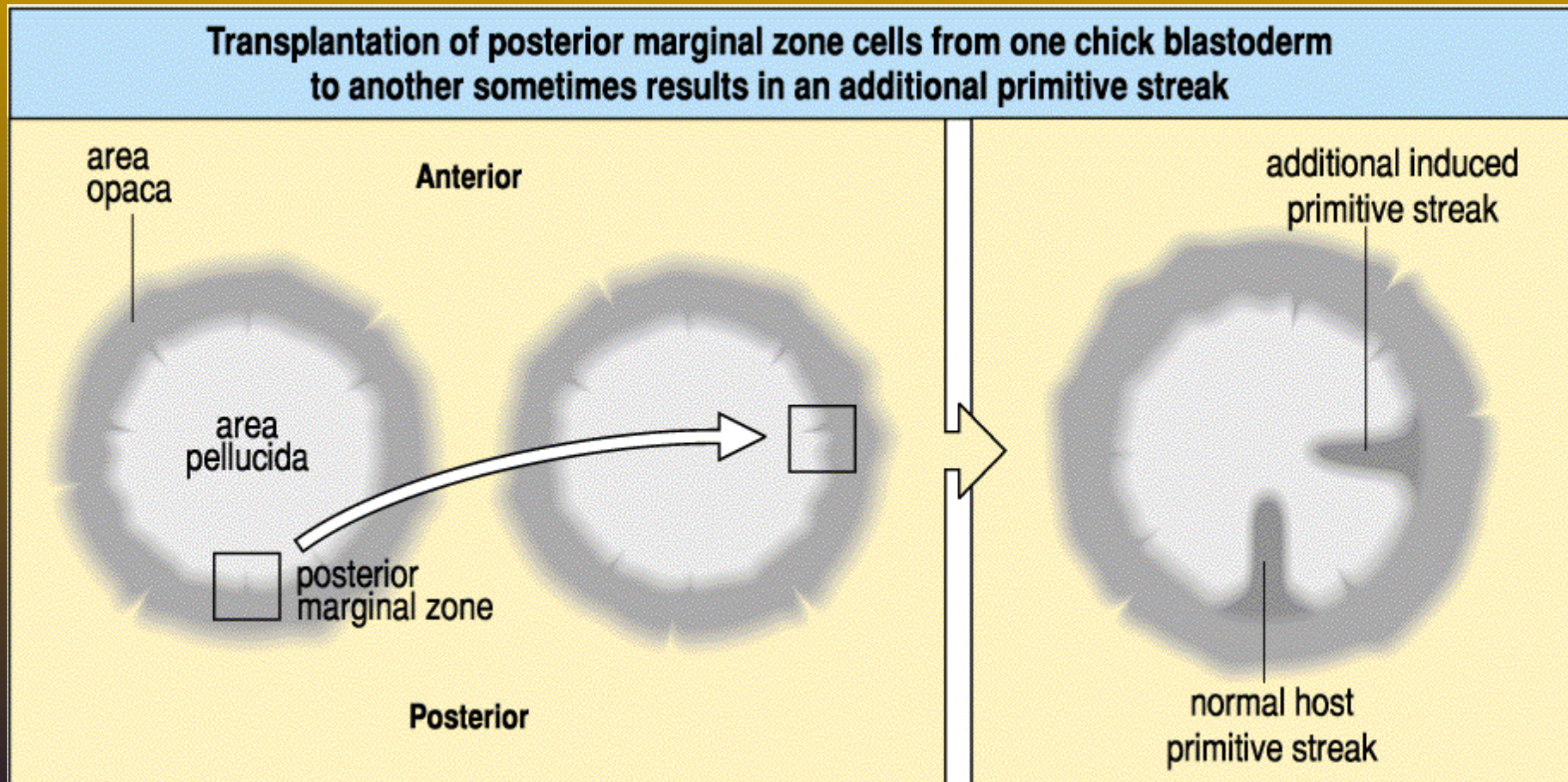
- Von Baer παρατηρησε ότι είναι δυνατόν να προβλεφθεί η θέση του Ε/Ο άξονα.
- Δημιουργία πολικότητας κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα στο βλαστόδερμα του εμβρύου της όρνιθας ως αποτέλεσμα της ενδομήτριας περιστροφής του αυγού. Ε=εμπρόσθιο, Ο=οπίσθιο
- Κάθε στροφή διαρκεί 6 λεπτά, Ολόκληρη η διαδικασία 20 ώρες.

Ο Εμπροσθοπίσθιος άξονας



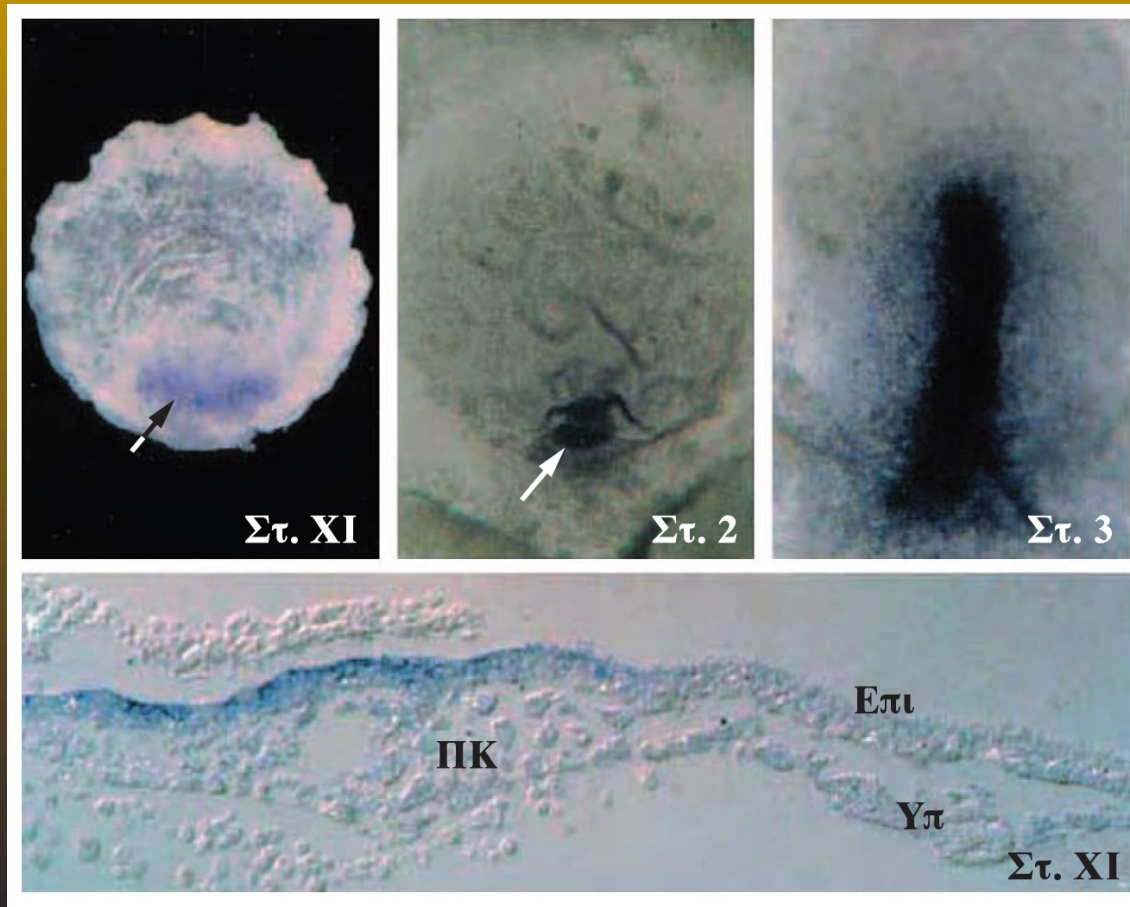
Δημιουργία πολικότητας κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα στο βλαστόδερμα του εμβρύου της όρνιθας ως αποτέλεσμα της ενδομήτριας περιστροφής του αυγού. E=εμπρόσθιο, O=οπίσθιο

Ο Εμπροσθοπίσθιος άξονας



Μεταμόσχευση οπίσθιας οριακής ζώνης.
Μετατόπιση της β-κατενίνης στον πυρήνα.

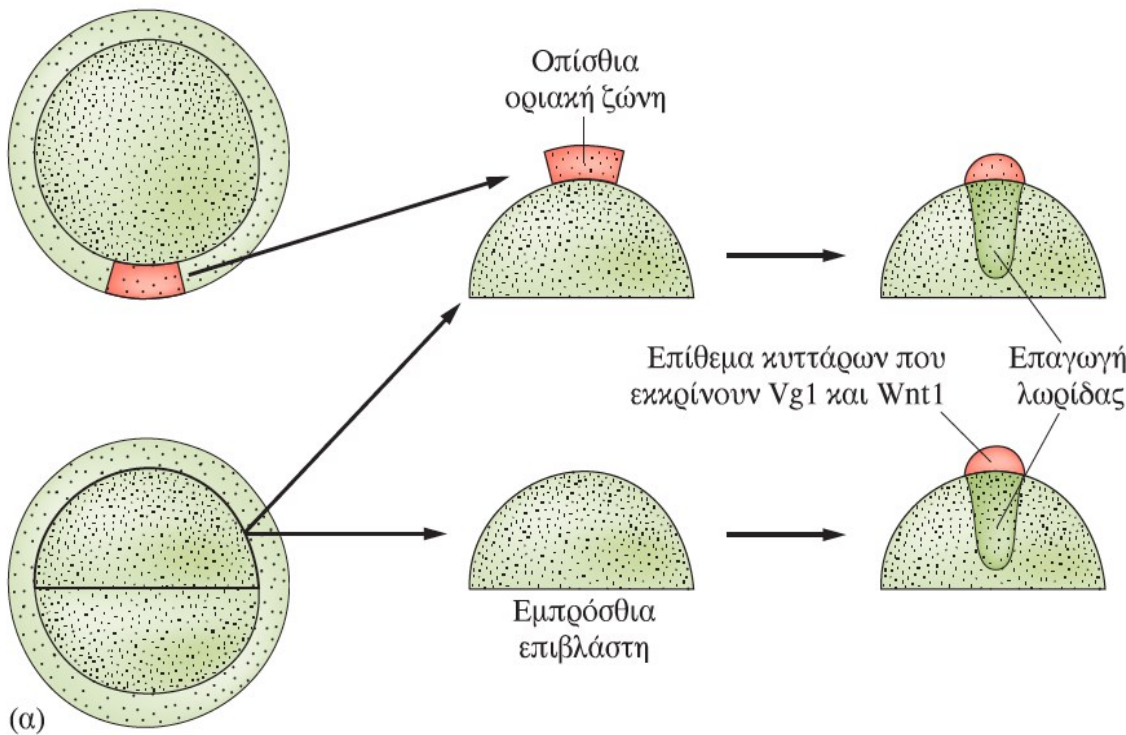
Η έκφραση του *VG1* στο βλαστόδερμα του εμβρύου της όρνιθας



Η έκφραση ξεκινά στην επιβλάστη της οπίσθιας οριακής ζώνης (βέλη) και αργότερα επεκτείνεται στην αρχική λωρίδα. ΠΚ: Πάχυνση του Kollar, Επι: επιβλάστη, Υπ: υποβλάστη. Από τη δημοσίευση Shah *et al.* (1997) *Development* 124, 5127-5138

Επαγωγή μεσοδέρματος

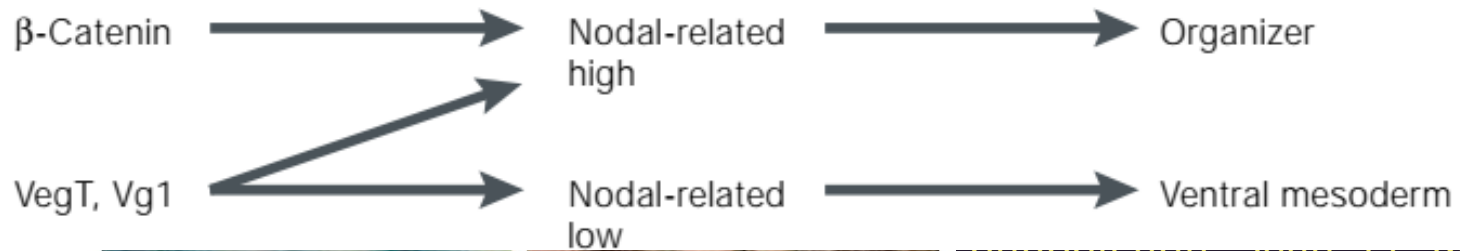
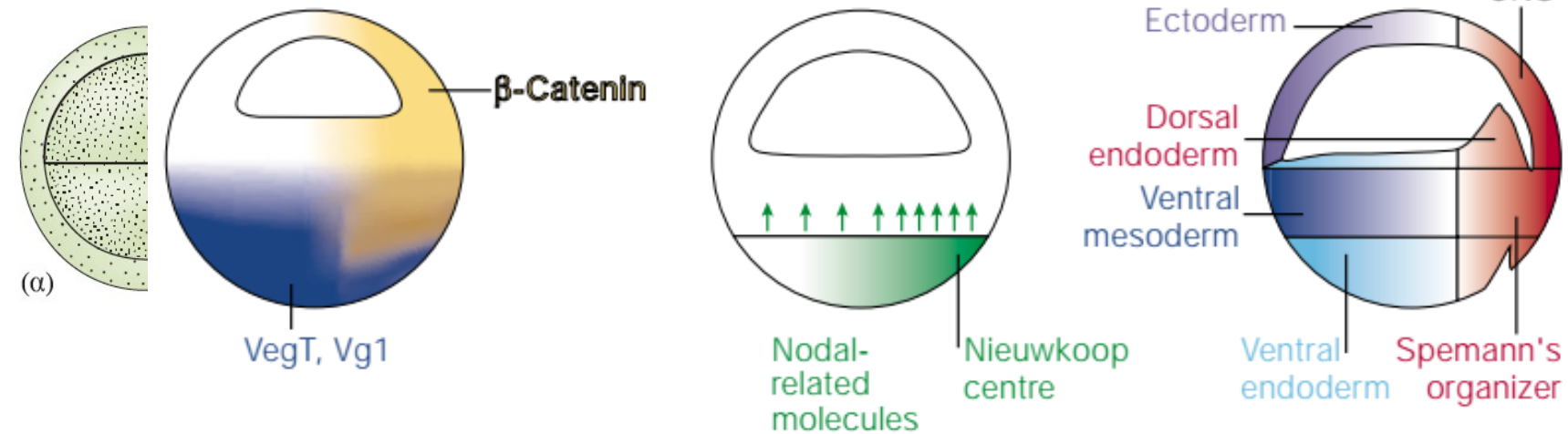
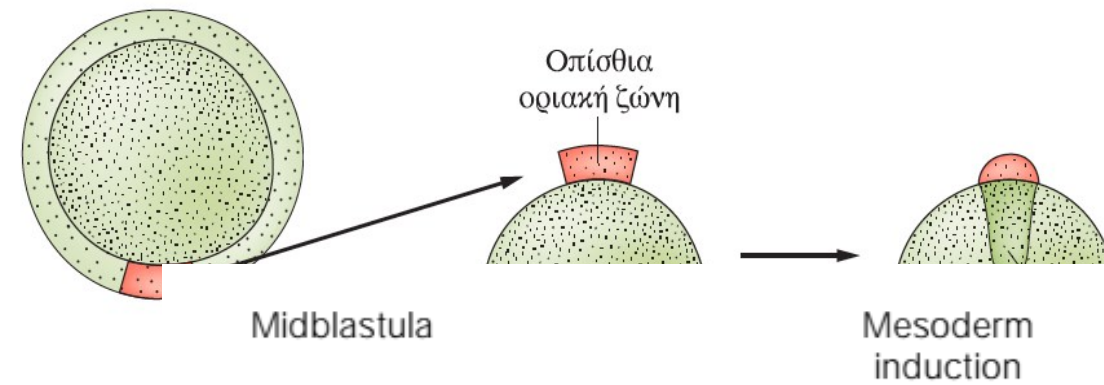
(α) Επαγωγή της αρχικής λωρίδας από την οπίσθια οριακή ζώνη ή από ένα ίζημα κυττάρων που εκκρίνει Vg1 και Wnt1 = επαγωγή της nodal (β, γ) Επαγωγή σχηματισμού αρχικής λωρίδας από κυτταρικά ιζήματα που εκφράζουν Vg1 στην οριακή ζώνη, η οποία ήδη εκφράζει παράγοντες Wnt. Οι αρχικές λωρίδες φαίνονται στις 24 ώρες μετά από πείραμα υβριδοποίησης *in situ* με ιχνηθέτη το *goosecoid*. Στο (γ) παρουσιάζονται αρχικές λωρίδες στις 48 ώρες μετά από πείραμα υβριδοποίησης *in situ* με ιχνηθέτη το *brachyury*. (Από τη δημοσίευση Shah *et al.* (1997) *Development* **124**, 5127.



Επαγωγή μεσοδέρματος

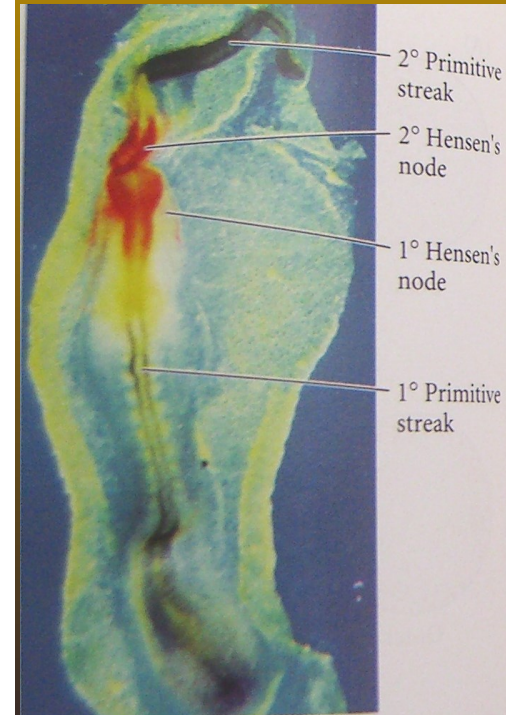
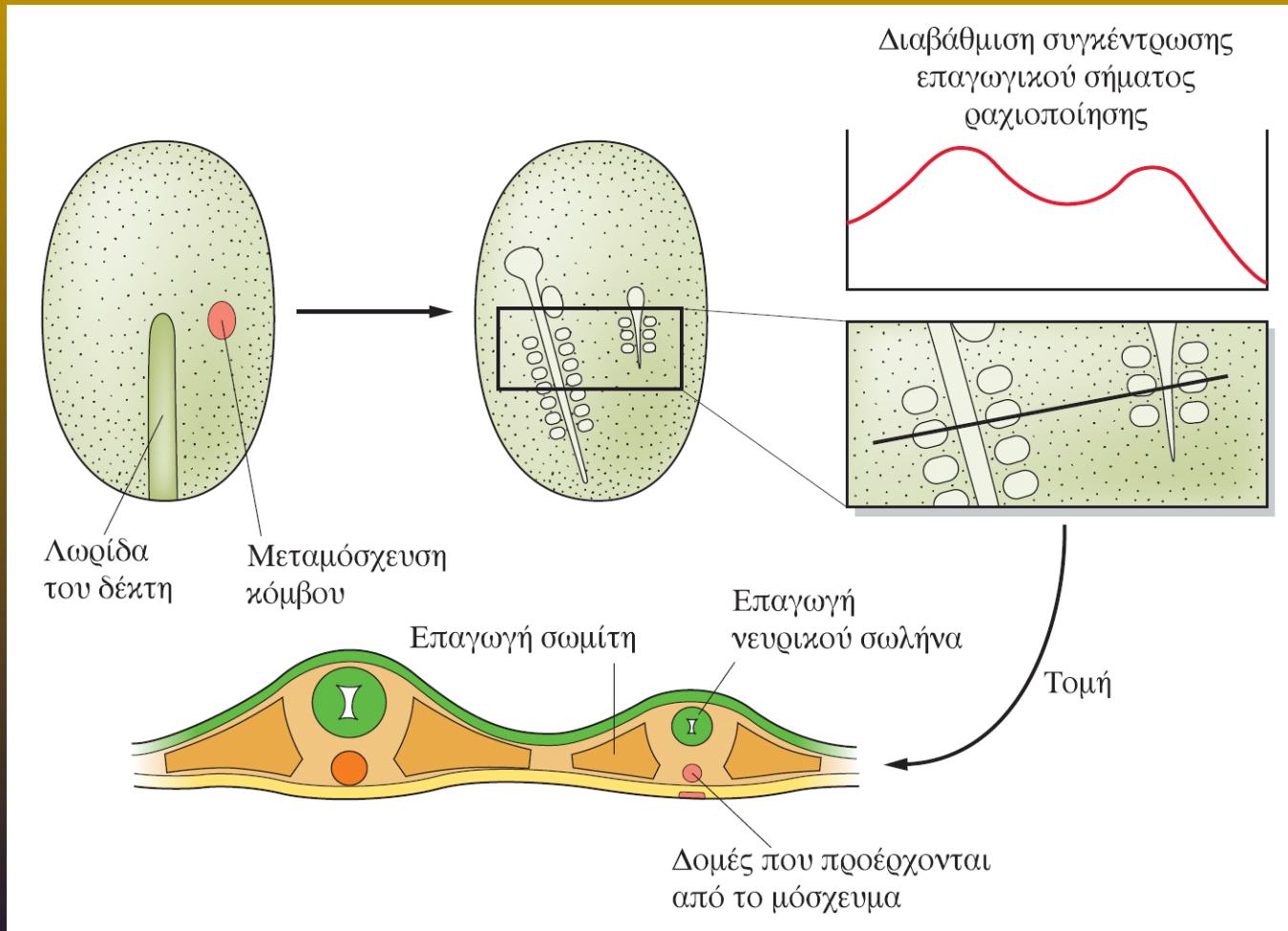
(α) Επαγωγή της αρχικής λωρίδας

ζώνη ή
που
αγωγή
σχημα-
από
εκφρά-
ζώνη, η
γοντες
ωρίδες
τά από
situ με
το (γ)
ωρίδες
είραμα
/ με
πό τη
(1997)



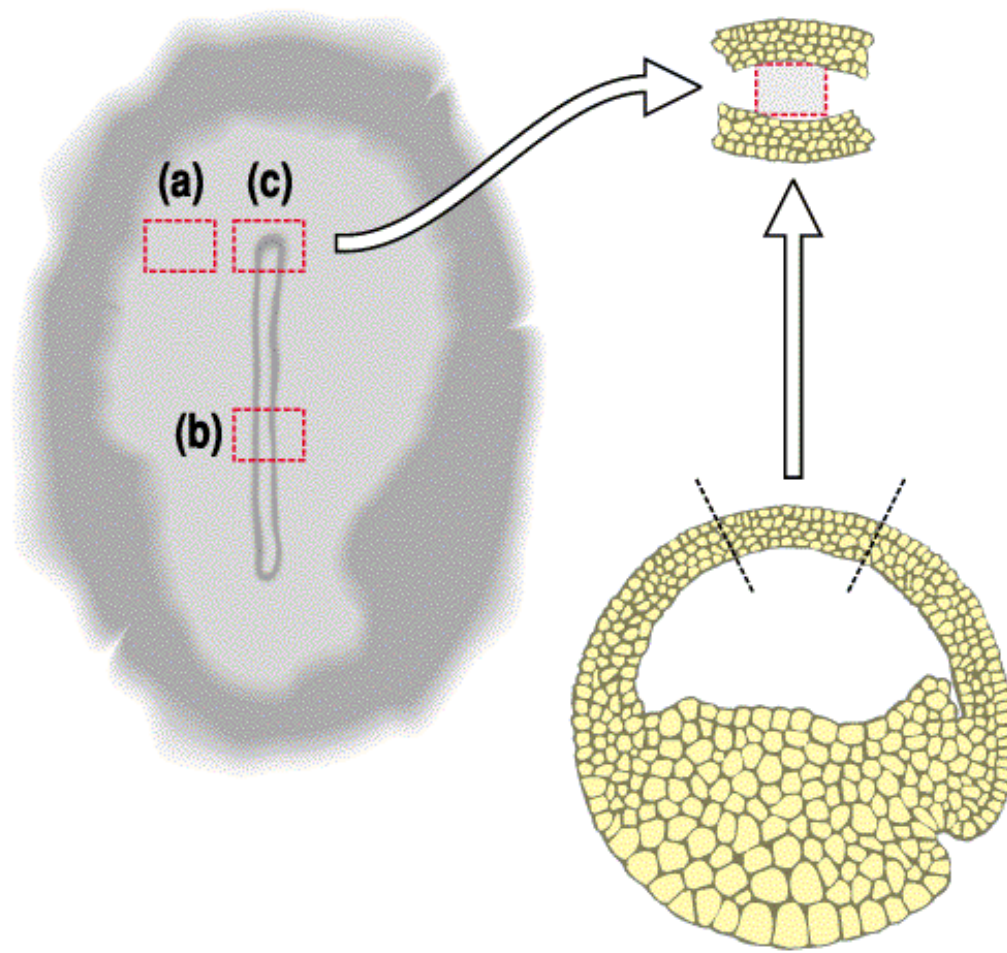
σημειώσεων στην ενότητα (1997)
Development **124**, 5127.

Μεταμόσχευση κόμβου

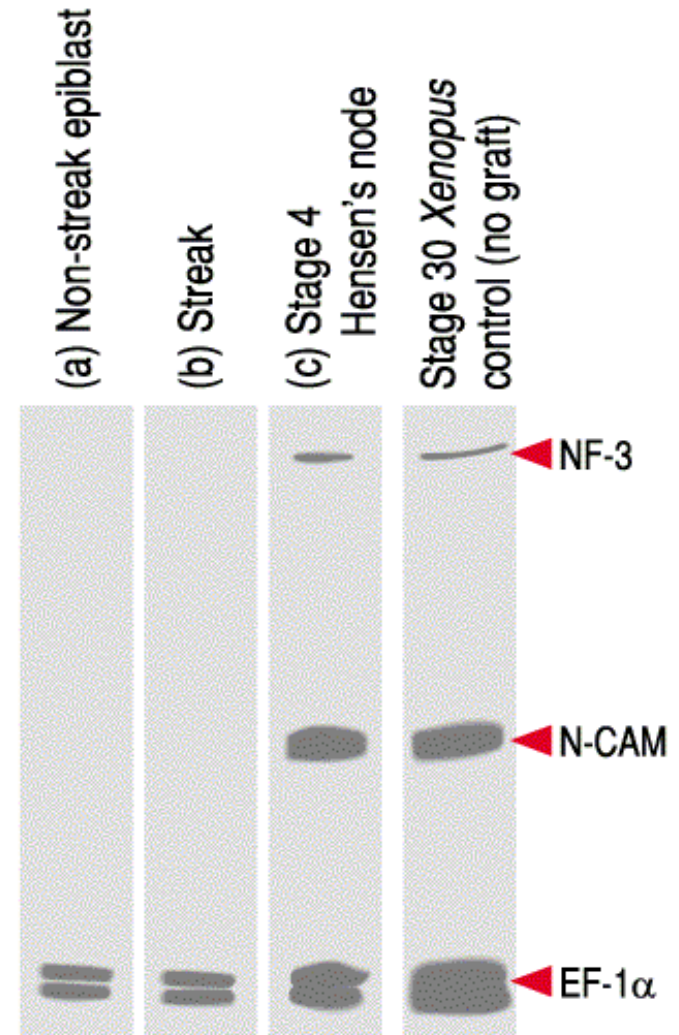


Η μεταμόσχευση ενός κόμβου στη διάφανη περιοχή επάγει τη δημιουργία ενός δεύτερου, μερικώς ανεπτυγμένου άξονα στον οποίο η νωτοχορδή προέρχεται από το μόσχευμα και ο νευρικός σωλήνας και οι σωμίτες προέρχονται από τον δέκτη.

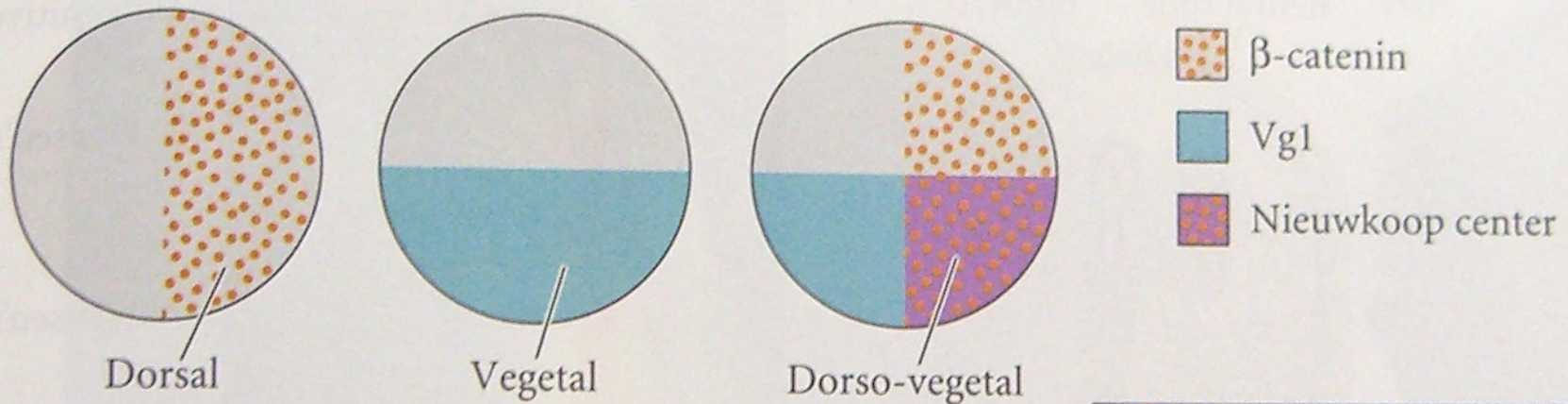
Pieces of chick epiblast are sandwiched between pieces of *Xenopus* animal cap tissue



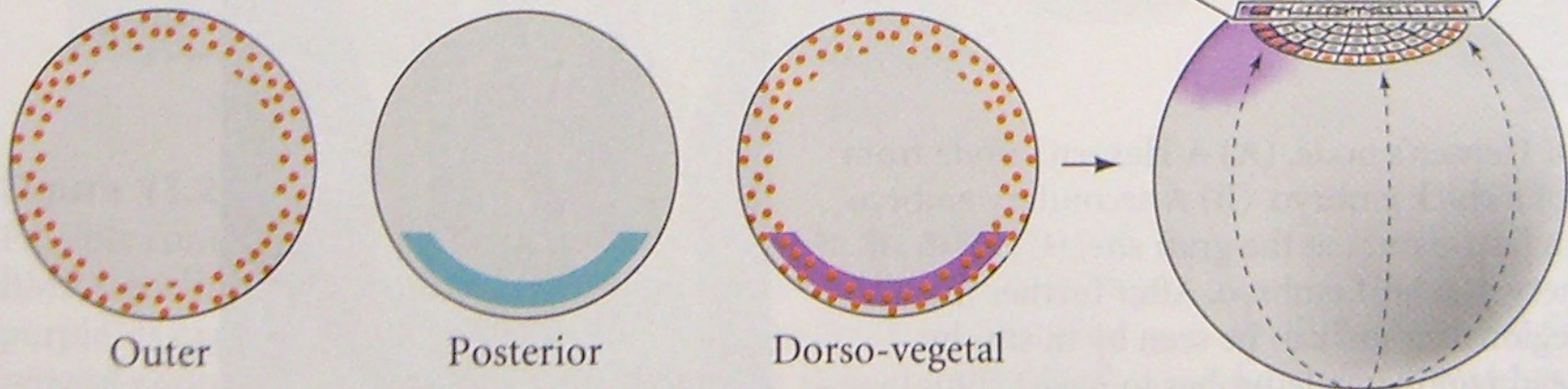
mRNAs expressed in *Xenopus* ectoderm in response to chick grafts



(A) *Xenopus laevis*

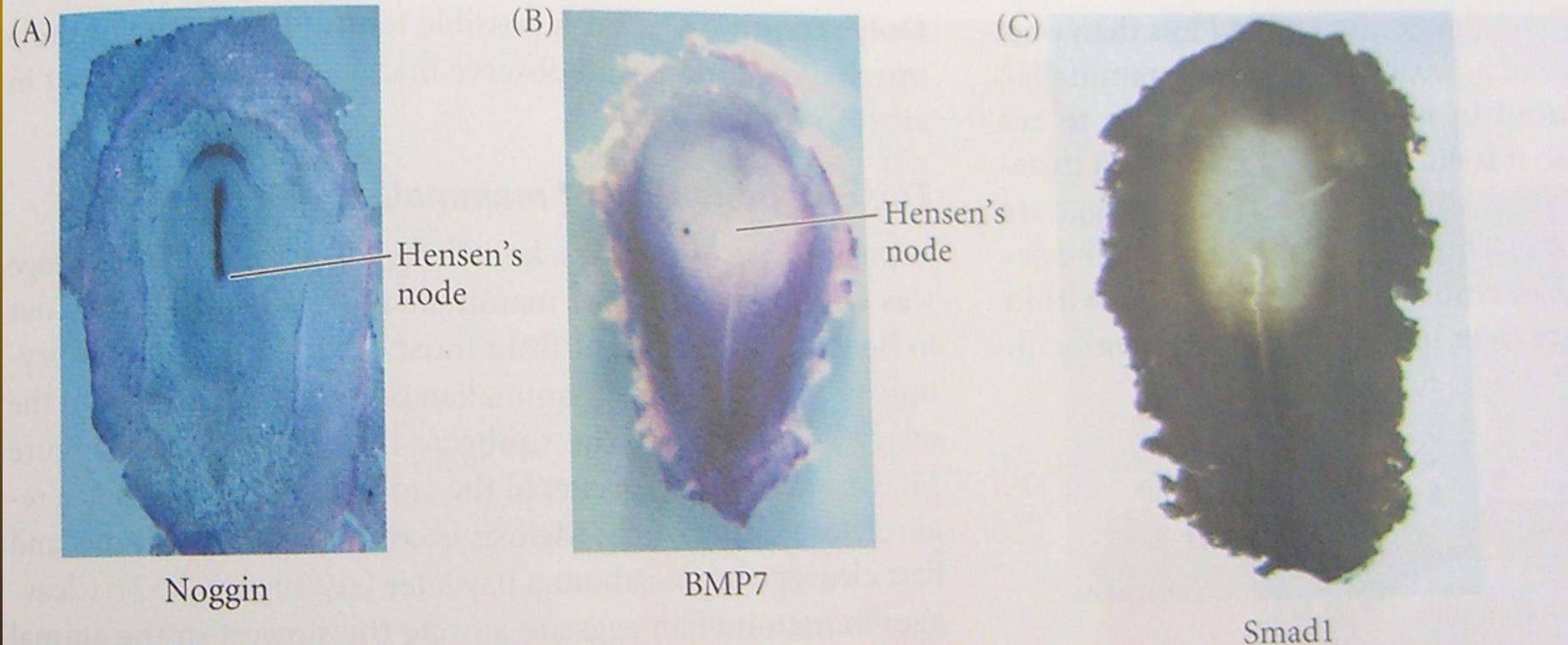


(B) *Gallus domesticus*



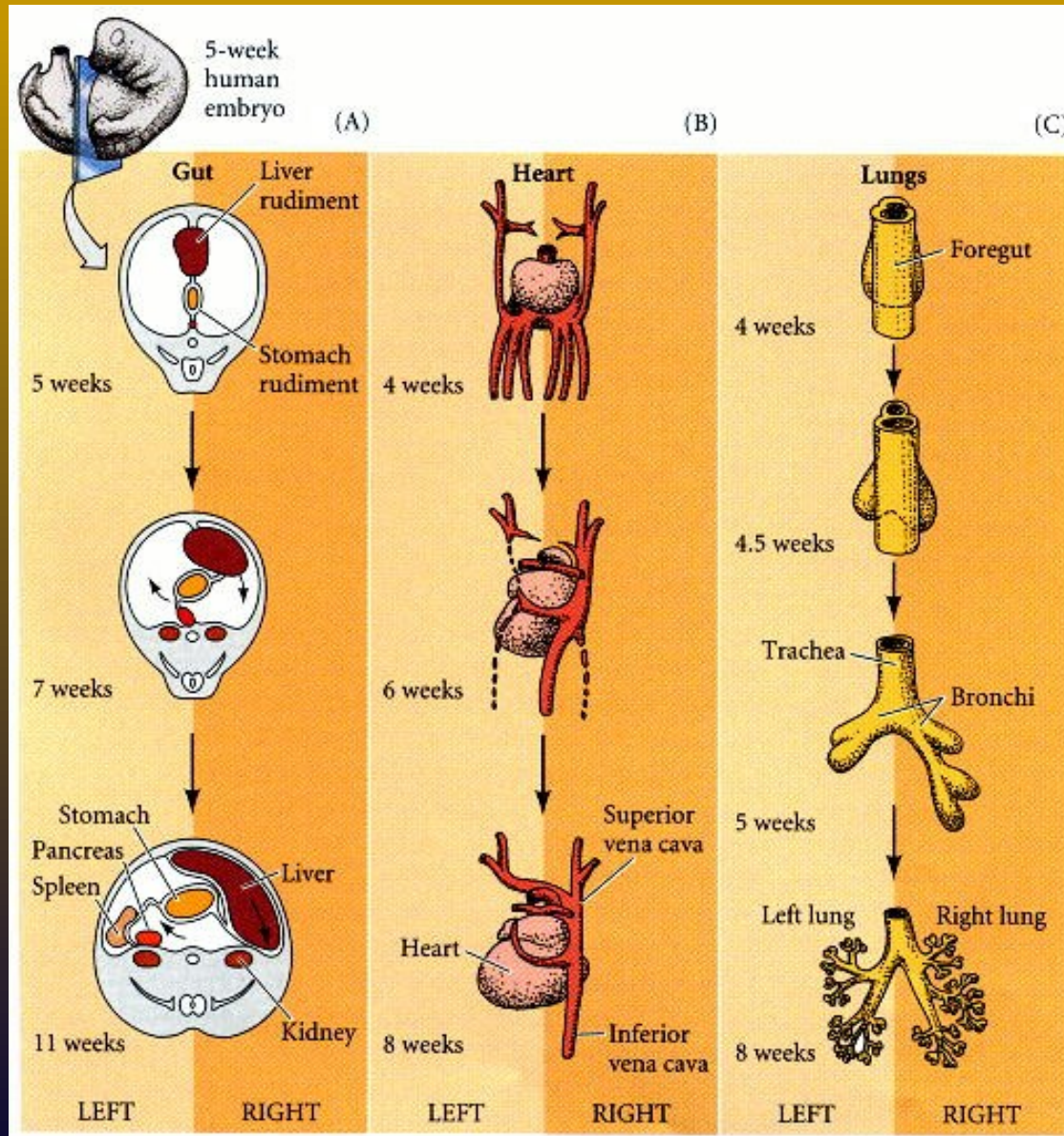
Οπίσθια οριακή ζώνη και κέντρο Nieuwkoop χαρακτηρίζονται από τα ίδια μόρια, τα οποία οργανώνουν τον κόμβο του Hansen και τον οργανωτή αντίστοιχα.

Τοπική εξειδίκευση του πρώιμου εμβρύου

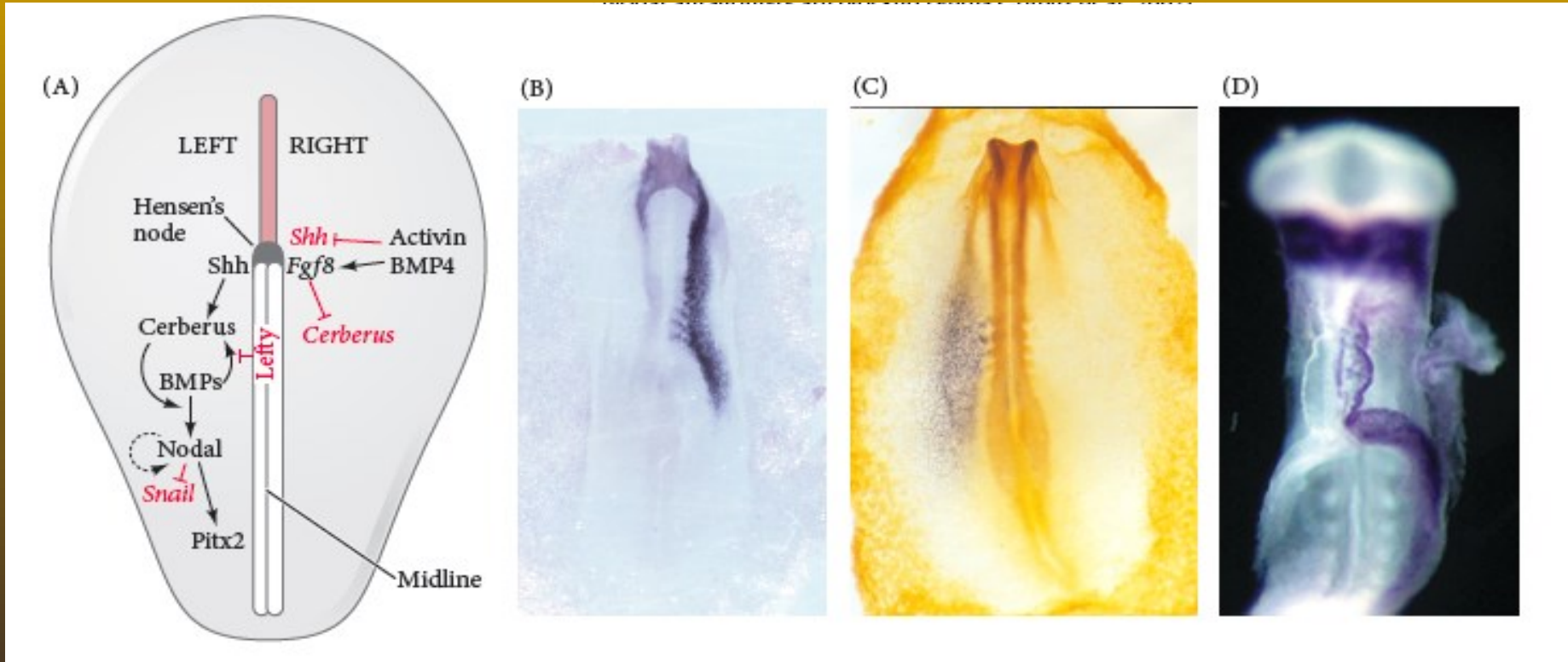


Επικράτειες έκφρασης: (α) ενός καταστολέα του BMP, (β) ενός παράγοντα BMP, (γ) απεικόνιση της σηματοδότησης BMP μέσω εντοπισμού φωσφορυλιωμένης smad1.

Ασυμμετρία ανάμεσα στην αριστερή και τη δεξιά πλευρά



Οργάνωση της ασυμμετρίας ανάμεσα στην αριστερή και τη δεξιά πλευρά



(A) Η Shh ενεργοποιεί τη *Cerberus*, που ενεργοποιεί παράγοντες BMP με αποτέλεσμα την επαγωγή της *Nodal*. Η *Nodal* ενεργοποιεί το *Pitx2* = αριστερή πλευρά. Στη δεξιά πλευρά η *activin* ενεργοποιεί τον *Fgf8*, που καταστέλλει την έκφραση του *Cerberus*

(B) Whole-mount in situ hybridization για το *Cerberus* -κοιλιακή άποψη (γιαυτό φαίνεται δεξιά)

(C) Whole-mount in situ hybridization για το nodal (ραχιαία άποψη)

(D) Whole-mount in situ hybridization για το *Pitx2* κοιλιακή άποψη σε όψιμο στάδιο φαίνεται η καταβολή της καρδιάς.