

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

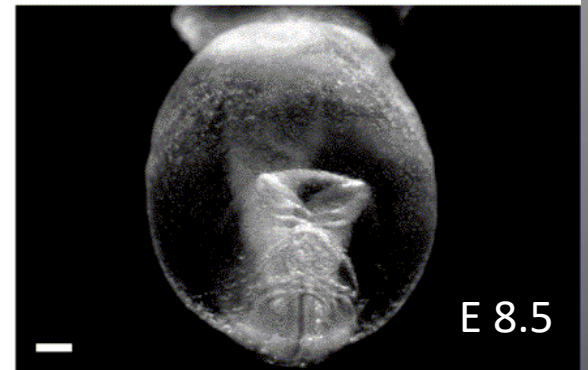
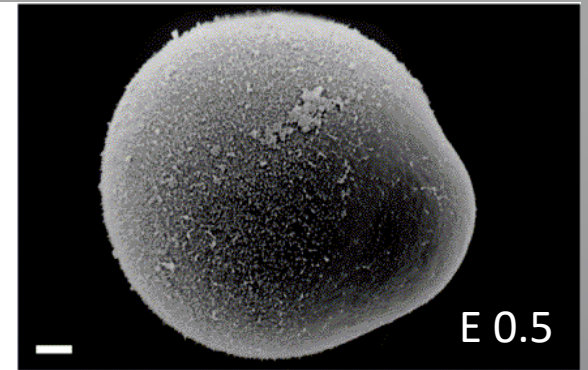
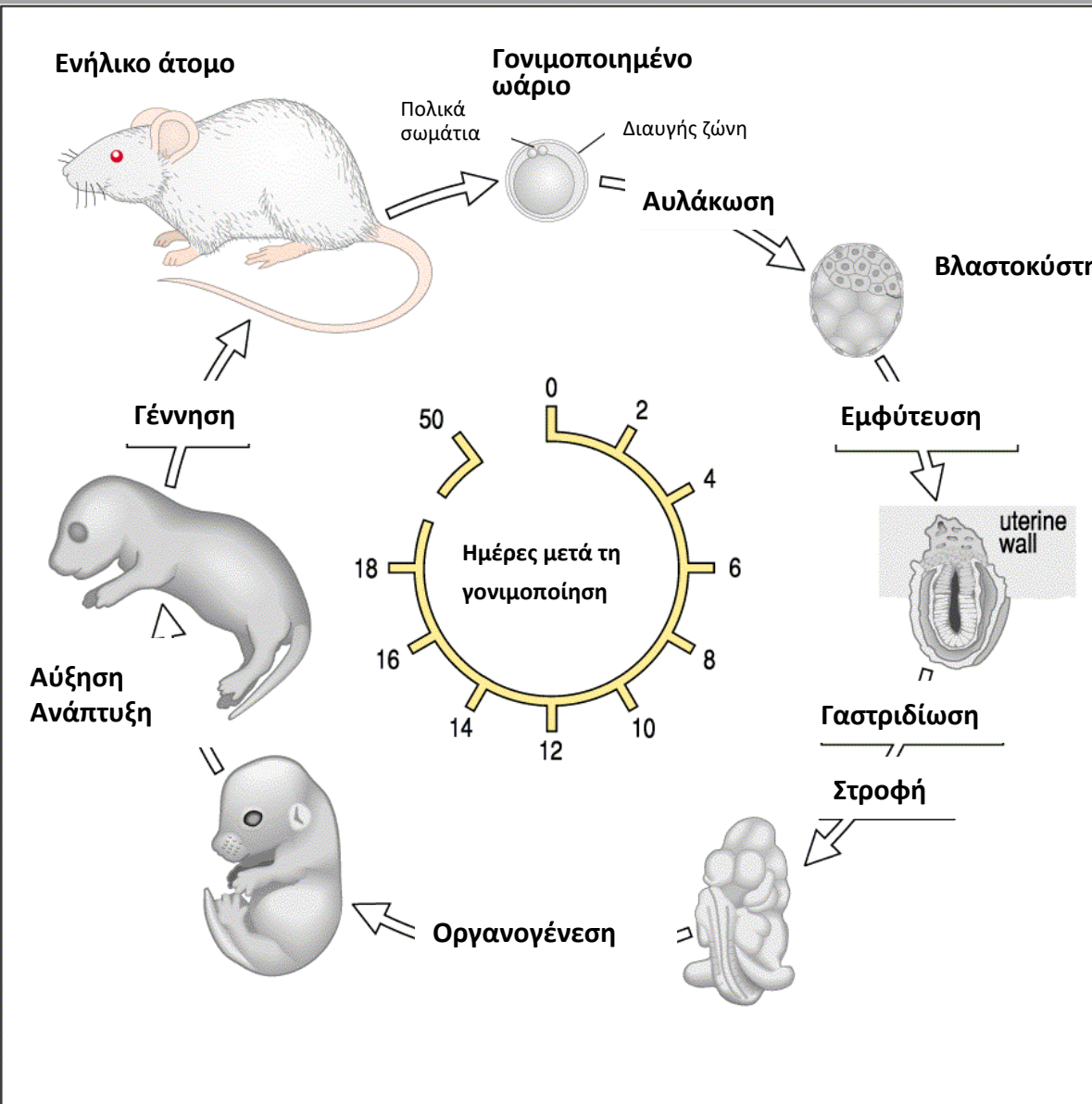
Ανάπτυξης



Ενότητα 6

Η πρώιμη ανάπτυξη του ποντικού

Mus Musculus



Η ηλικία των εμβρύων του ποντικού εκφράζεται ως ο ακέραιος αριθμός των ημερών που έχουν παρέλθει από το ζευγάρωμα συν μισή μέρα.

Τα πλεονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

- ✓ Τα ζώα διατηρούνται σχετικά εύκολα στο εργαστήριο.
- ✓ Έχει σχετικά μικρό κύκλο ζωής (9 εβδομάδες).
- ✓ Καθώς μελετάται εντατικά επί δεκαετίες υπάρχει διαθέσιμη μια τεράστια ποικιλία μοριακών και μη τεχνικών.
- ✓ Είναι θηλαστικό .
- ✓ Αλληλούχηση, 2002

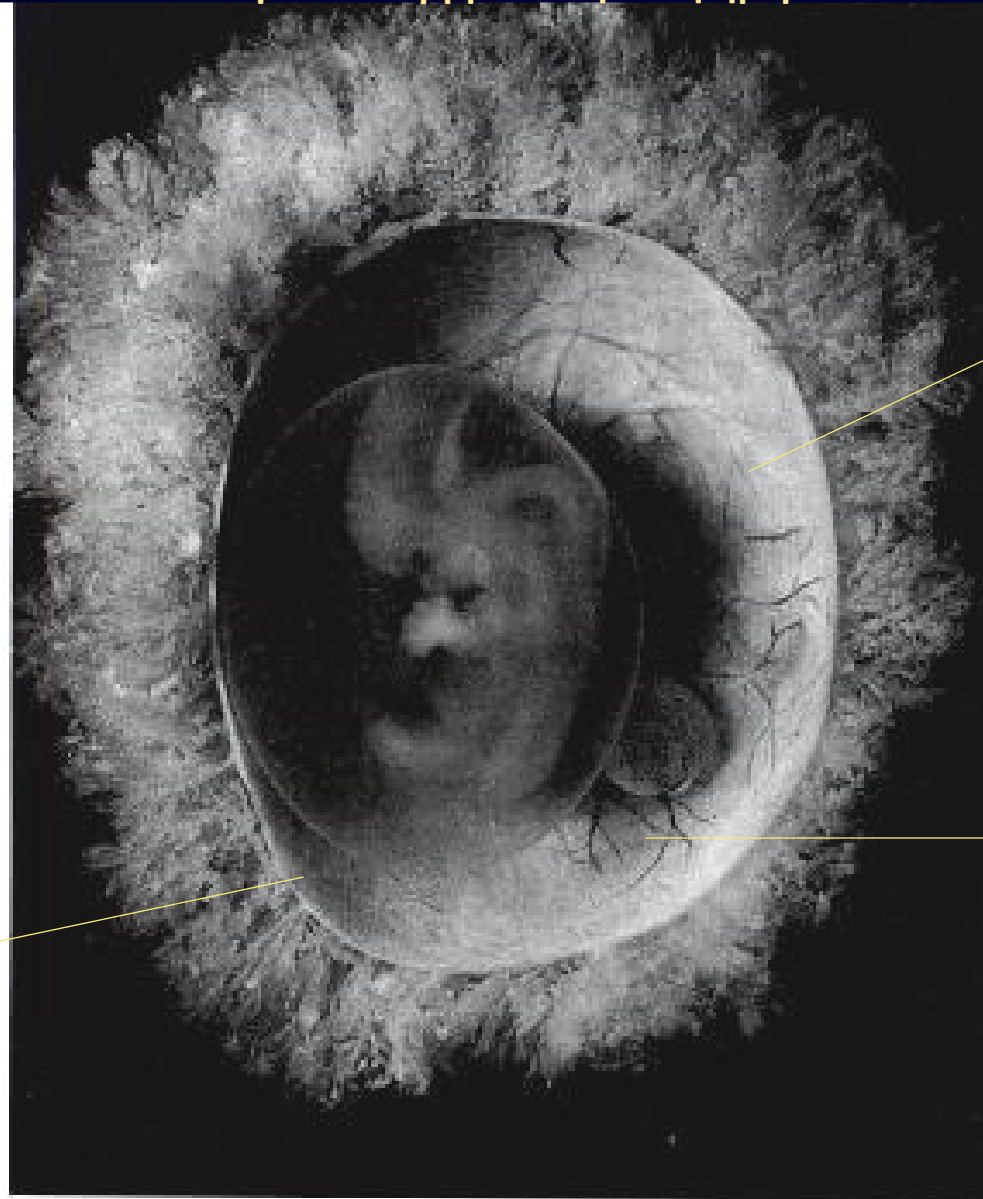
(«An unfortunate feature of genetic model organisms is that the easier they are to work with, the worse they are as models for the animal that most funding agencies find most interesting, namely ourselves.» Daniel St Johnston)

Τα μειονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

- Έχει μεγάλο κύκλο ζωής (για πειραματόζωο).
- Μικρός αριθμός ωαρίων / θηλυκό άτομο .
- Απαιτείται πολύς χώρος και ειδικές εγκαταστάσεις για τα ζώα.
- Το έμβρυο αναπτύσσεται μέσα στη μητέρα, έτσι είναι δύσκολη η συνεχής παρατήρηση.
- Δεν είναι εύκολο να γίνουν χειρισμοί στο έμβρυο, καθώς μπορεί να επιβιώσει έξω από το σώμα της μητέρας για μικρό χρονικό διάστημα - υπερηχογράφημα-παρέμβαση

Το έμβρυο των θηλαστικών

Ανθρώπινο έμβρυο στην 40η ημέρα

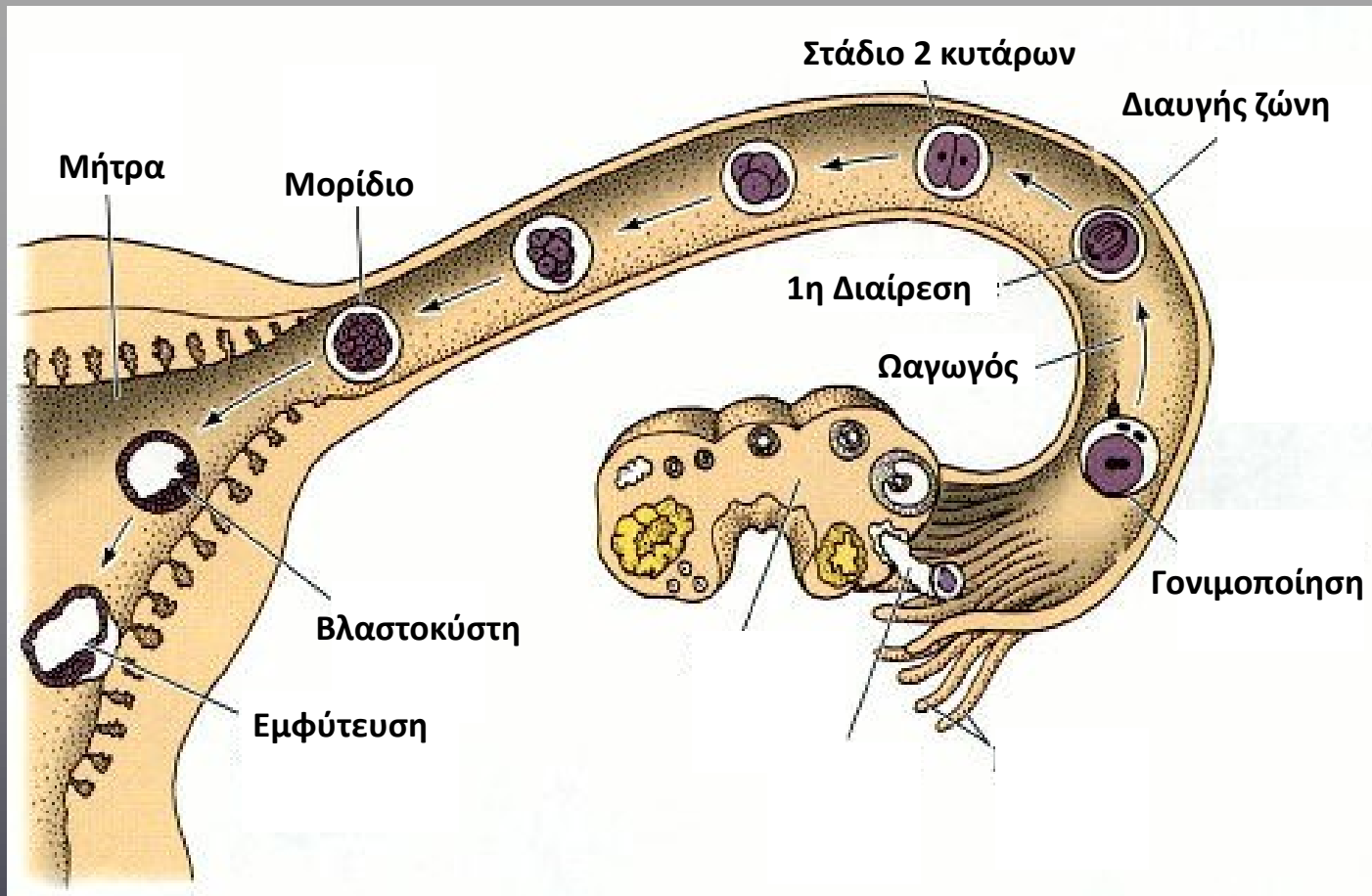


χόριο

Λεκιθικός
σάκος

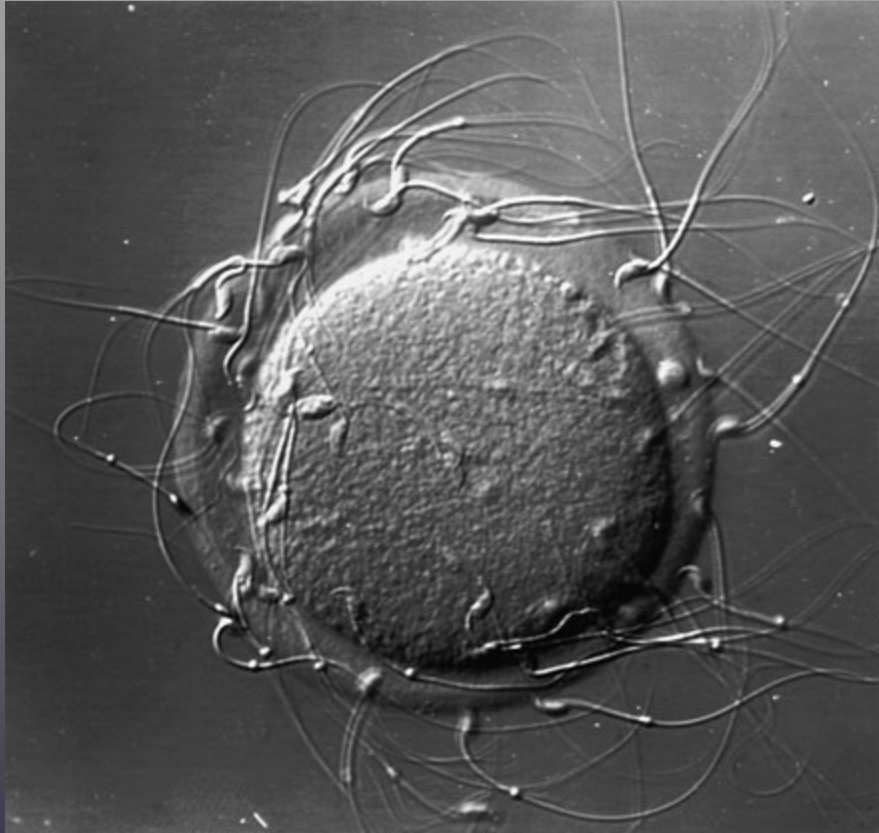
άμνιο

Γονιμοποίηση - Αυλάκωση



Το ωάριο απελευθερώνεται από την ωοθήκη στον ωαγωγό (σάλπιγγα). Η γονιμοποίηση γίνεται στον ωαγωγό, κοντά στη ωοθήκη. Ολοκληρώνεται η μείωση και η αυλάκωση αρχίζει περίπου 24 ώρες μετά, καθώς το έμβρυο ωθείται από τις βλεφαρίδες του ωαγωγού προς τη μήτρα .

Γονιμοποίηση



Η γονιμοποίηση περιλαμβάνει τέσσερα γεγονότα:

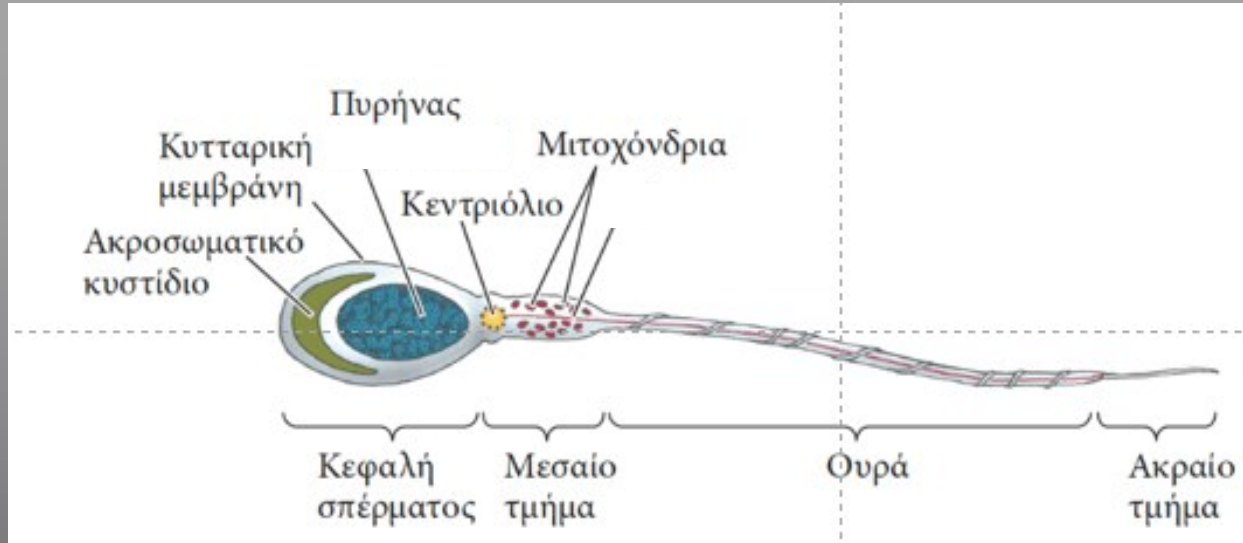
➤ Επαφή/αναγνώριση ωαρίου - σπερματοζωαρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό το στάδιο εξασφαλίζει ότι οι γαμέτες ανήκουν στο ίδιο είδος.

➤ Ρύθμιση της εισόδου του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Παρεμπόδιση της πολυσπερμίας με ενεργό τρόπο.

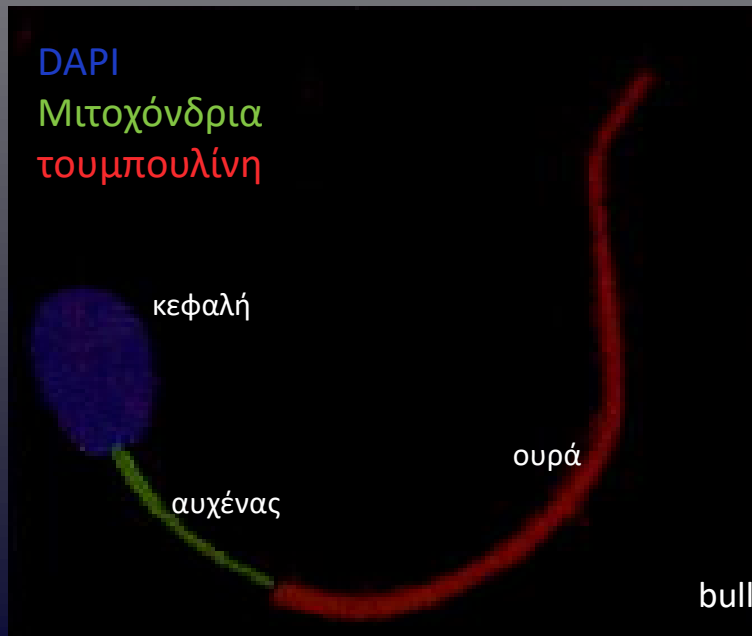
➤ Σύντηξη των προπυρήνων.

➤ Ενεργοποίηση του μεταβολισμού του ωαρίου, ώστε να αρχίσει η ανάπτυξη.

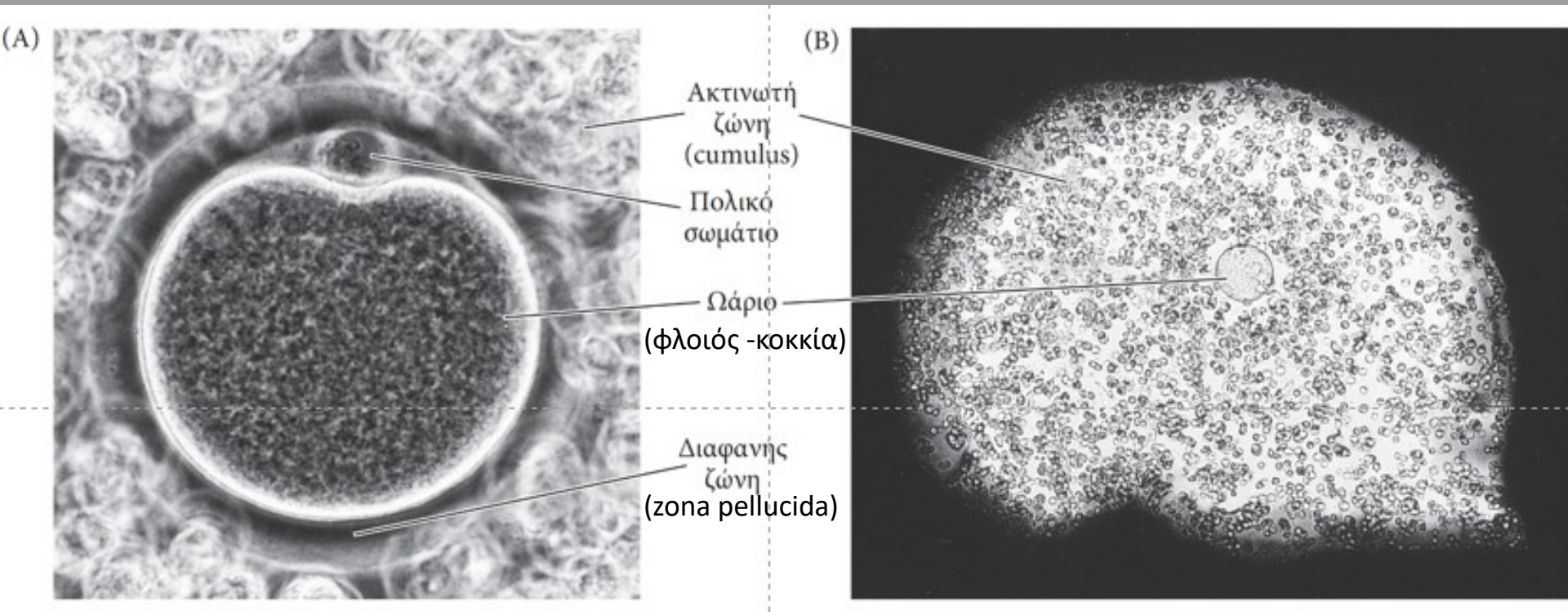
Δομή των γαμετών: α.σπερματοζωάρια



Ακρόσωμα και
πυρήνας = κεφάλι
σπερματοζωαρίου

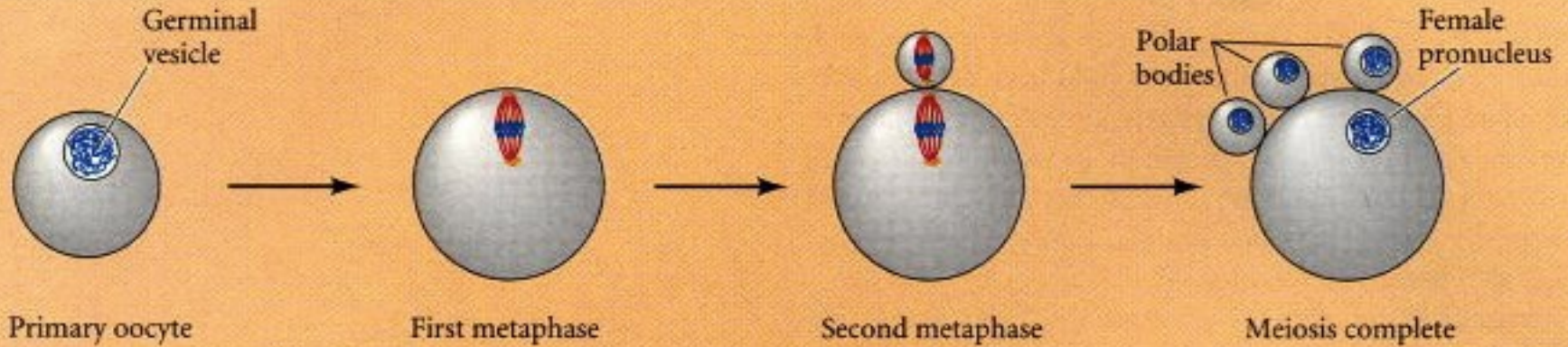


Δομή των γαμετών: β.ωάρια



- Διαφανής ή διαυγής ζώνη (zona pellucida) - κύτταρα των ωοθηλακίων και μόρια της εξωκυττάριας ουσίας.
- Ακτινωτή ζώνη ή ακτινωτός στέφανος (cumulus) - κύτταρα των ωοθηλακίων - ουσίες που θρέφουν το ωοκύτταρο με την απομάκρυνσή του από την ωοθήκη.

Δομή των γαμετών: β.ωάρια



The roundworm
Ascaris
The mesozoan *Dicyema*
The sponge *Grantia*
The polychaete worm
Myzostoma
The clam worm *Nereis*
The clam *Spisula*
The echiuroid worm
Urechis
Dogs and foxes

The nemertean worm
Cerebratulus
The polychaete worm
Chaetopterus
The mollusc
Dentalium
The core worm
Pectinaria
Many insects
Starfish

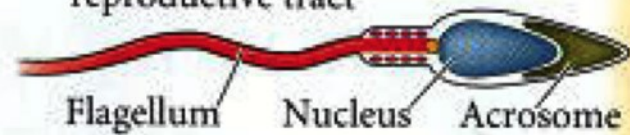
The lancelet
Branchiostoma
Amphibians
Most mammals
Fish

Cnidarians
(e. g., anemones)
Sea urchins



(B) MOUSE

(1) Sperm activated by female reproductive tract



(2) Sperm binds zona pellucida



(3) Acrosomal reaction



(4) Sperm lyses hole in zona



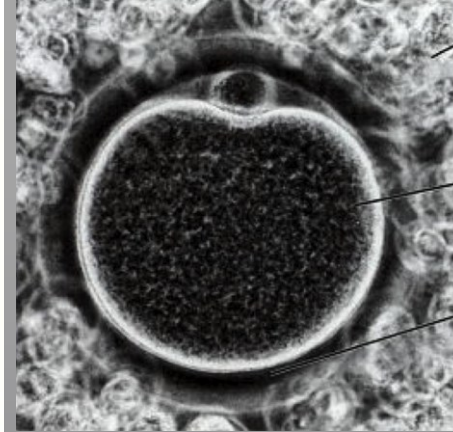
(5) Sperm and egg membranes fuse



Egg cell membrane

Cumulus layer
(extracellular coat)

Zona pellucida
(extracellular matrix)



ακτινωτός
στέφανος
(cumulus)

διαυγής ζώνη
(zona
pellucida)

Από την εκσπερμάτωση στη γονιμοποίηση.

Τα πέντε στάδια αναγώρισης του σπερματοζωαρίου απο το αυγό.

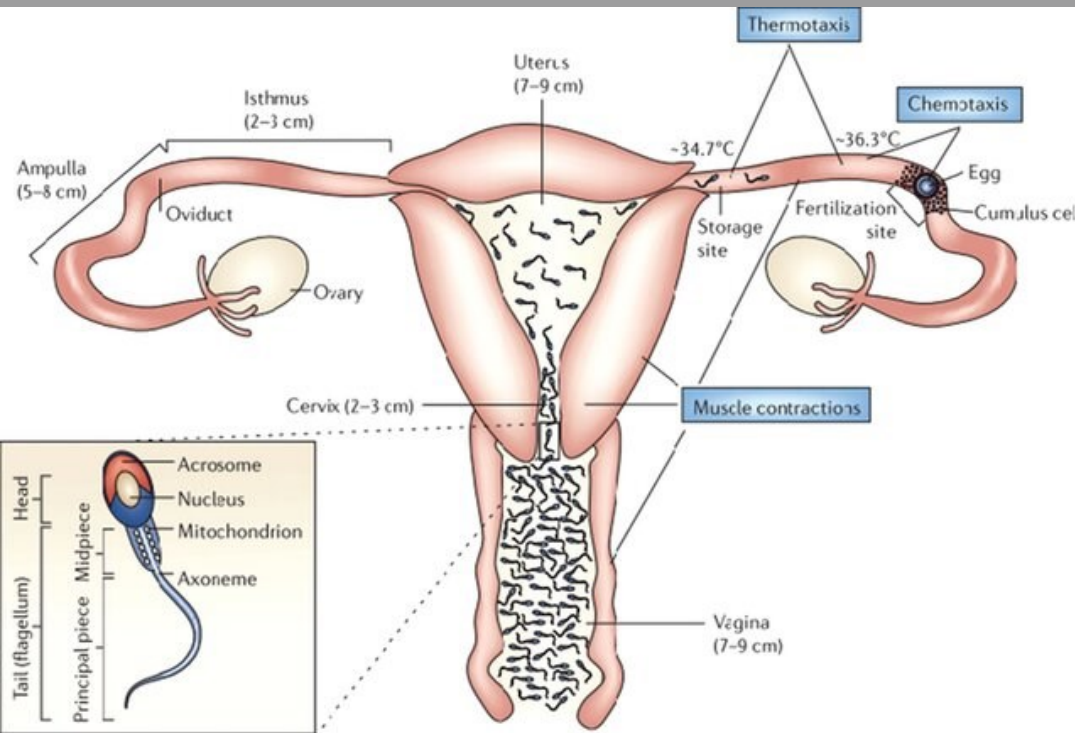
Ταξίδι στον ωαγωγό

➤ 280×10^6 σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση- 200 φτάνουν στον ωαγωγό.

➤ 30' μετά τη σύζευξη εντοπίζονται σπερματοζωάρια στον ωαγωγό - η μεταφορά εξασφαλίζεται από τη μυϊκή δραστηριότητα της μήτρας.

➤ Υπάρχει χημειοτακτισμός όπως σε άλλα είδη;

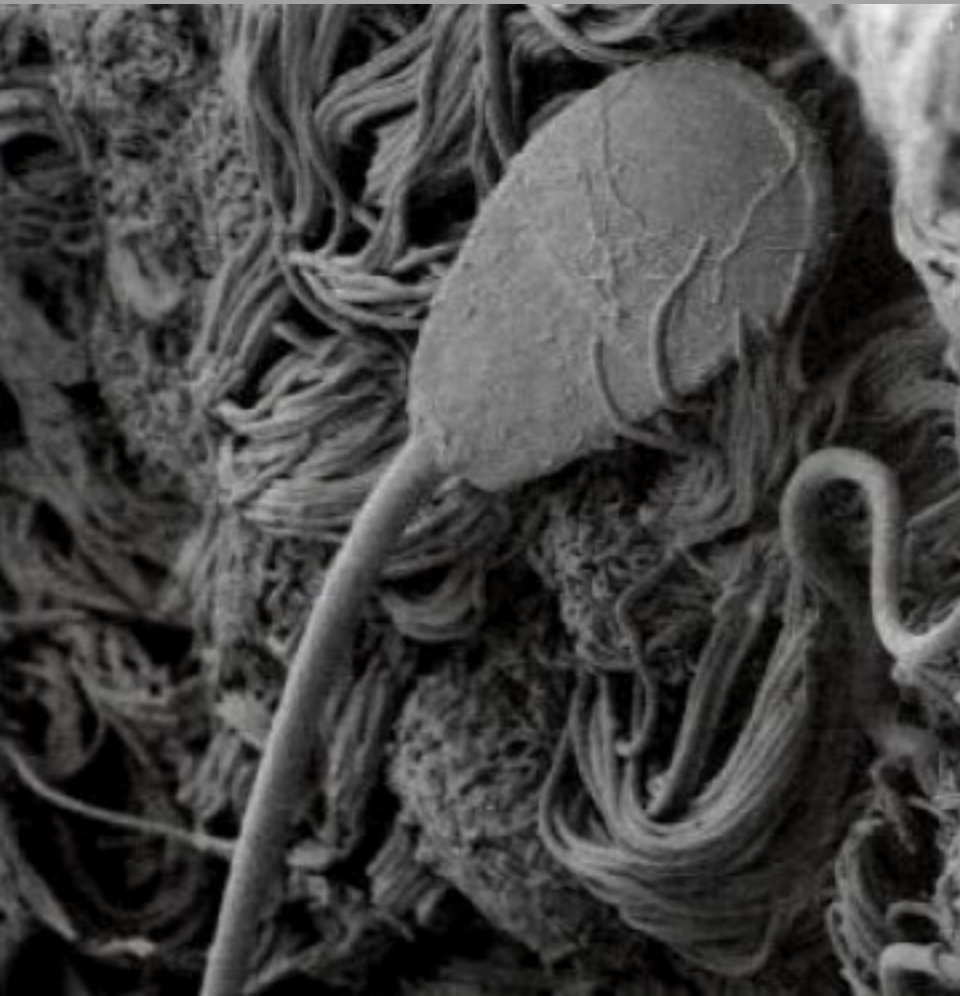
➤ Τα σπερματοζωάρια είναι ανίκανα να γονιμοποιήσουν τα ωάρια (μπλοκάρονται στον ακτινωτό στέφανο) εκτός και αν παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού (ακόμη και 6 μέρες μετά).



DOI: 10.1002/adbi.201900079

➤ Τι συμβαίνει στο σπερματοζωάριο κατά την ενεργοποίησή του;

1. Ενεργοποίηση



➤ Τα μη ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια προσδένονται ενεργά στις μεμβράνες των κυττάρων του ωαγωγού στον ισθμό.

➤ Η πρόσδεση είναι παροδική και αναιρείται από την ενεργοποίηση. Μόνο τα υπερ ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μπορούν με τις κινήσεις τους να αποκολληθούν.

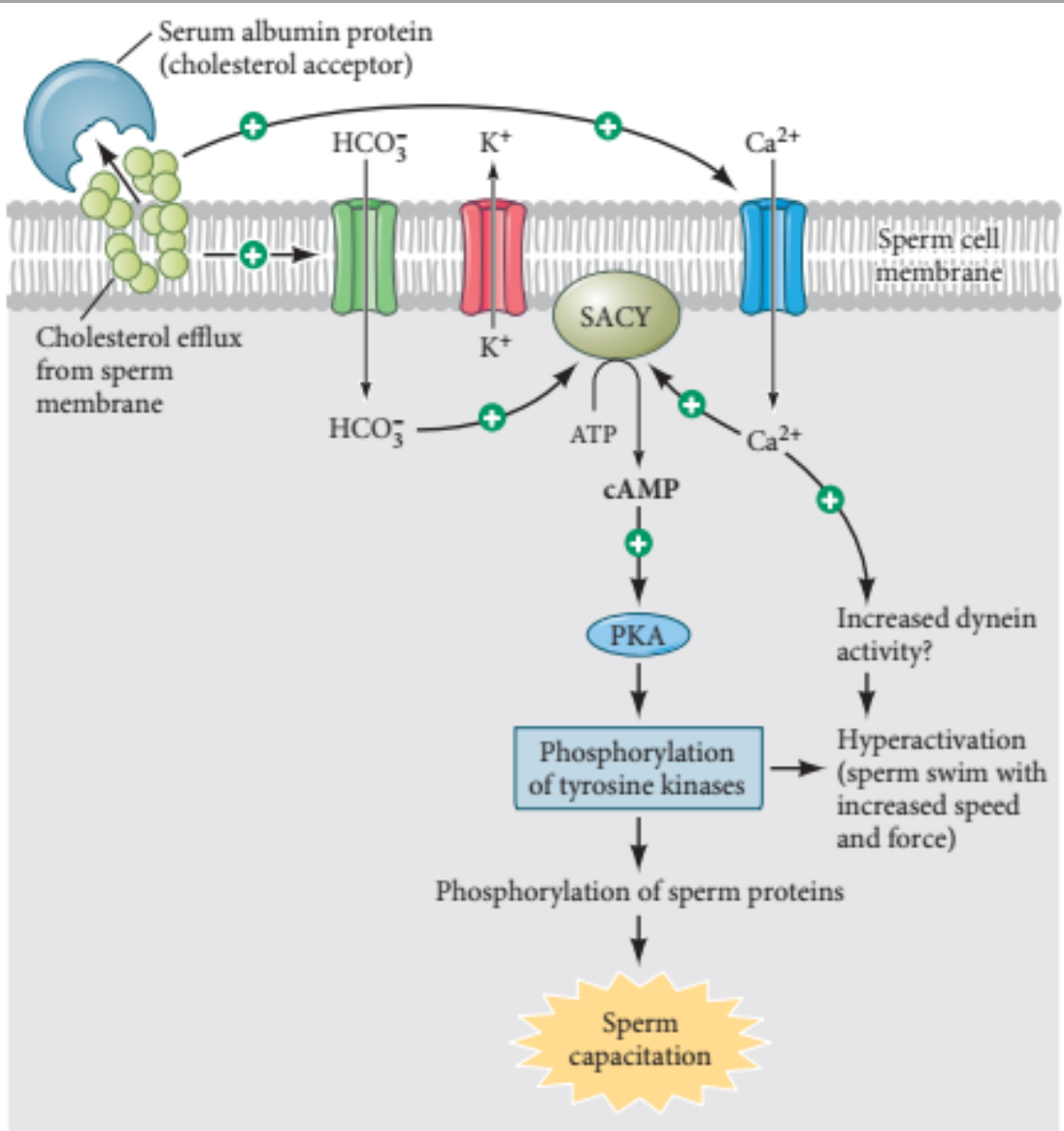
Η πρόσδεση αυτή φαίνεται ότι:

➤ Αυξάνει τη διάρκεια ζωής του σπερματοζωαρίου (αύξηση της πιθανότητας γονιμοποίησης).

➤ Συμβάλλει στο φραγμό στην πολυσπερμία (αφαίρεση ισθμού οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας πολυσπερμίας).

Σπερματοζωάριο προσδεμένο στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού.

1. Ενεργοποίηση



➤ Αλλαγες στη μεμβράνη

➤ Απομάκρυνση της χοληστερόλης από αλβουμίνες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.

➤ Αλλαγή στο δυναμικό μεμβράνης (έξοδος ιόντων καλίου - είσοδος διττανθρακικών - pH και είσοδος ιόντων ασβεστίου)

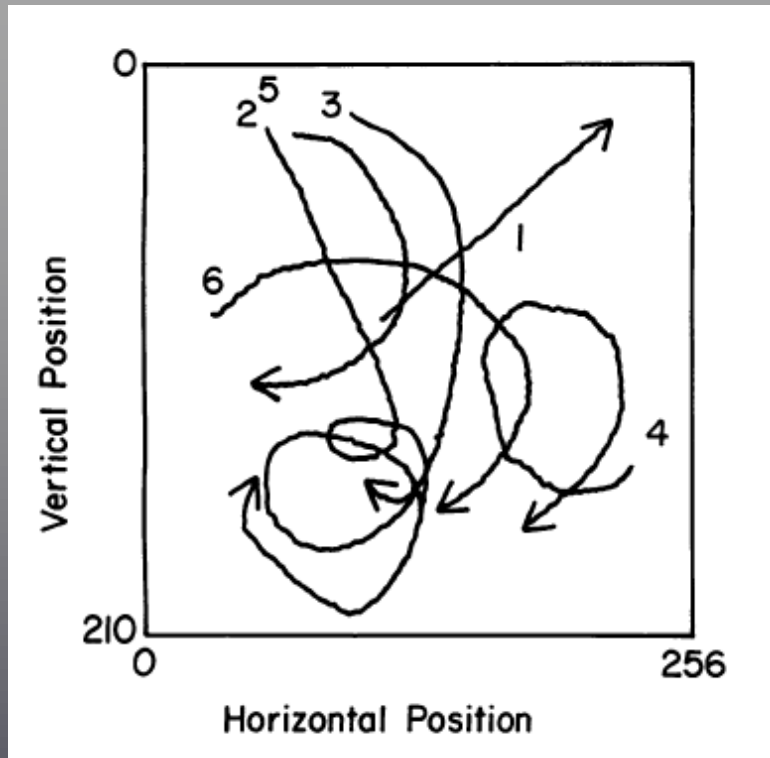
➤ Αδενυλική κυκλάση cAMP - ενεργοποίηση κινάσης PKA.

➤ Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών - μετακίνησή τους στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.

➤ Η ενεργοποίηση γίνεται *in vitro* σε απλά διαλύματα (αλβουμίνη, Ca)

Ταξίδι στον ωαγωγό:

Χημειοτακτισμός – Θερμοτακτισμός



➤Υγρό από ωοθυλάκια που έχουν απελευθερώσει ωάριο φαίνεται ότι επηρεάζει την πορεία που ακολουθούν τα σπερματοζωάρια.

➤Σε ζώα με εξωτερική γονιμοποίηση έχει αποδειχθεί ότι τα ωάρια παράγουν παράγοντες που έλκουν προς αυτά τα σπερματοζωάρια (resact-αχινός).

➤Είναι πιθανό κάτι τέτοιο να ισχύει και στα θηλαστικά.

➤Προγεστερόνη -ένα απο τα χημειοτακτικα μορια που προσελκυουν τα σπερματοζωαρια (εκκρίνεται απο τα ωοκύτταρα και τον ακτινωτό στέφανο).

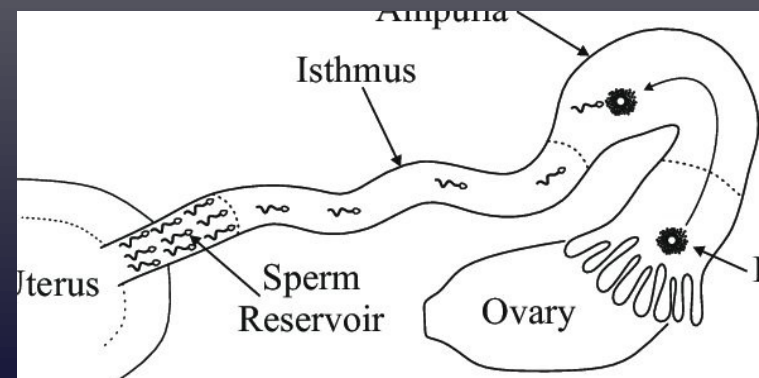
➤Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

➤Θερμοτακτισμός

➤Διαφορά θερμοκρασίας ισθμού - αυχένα 2 °C.

➤Τα σπερματοζωάρια μετακινούνται από ψυχρότερες προς θερμότερες (0.014 °C) περιοχές.

➤Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.



Σύνοψη:

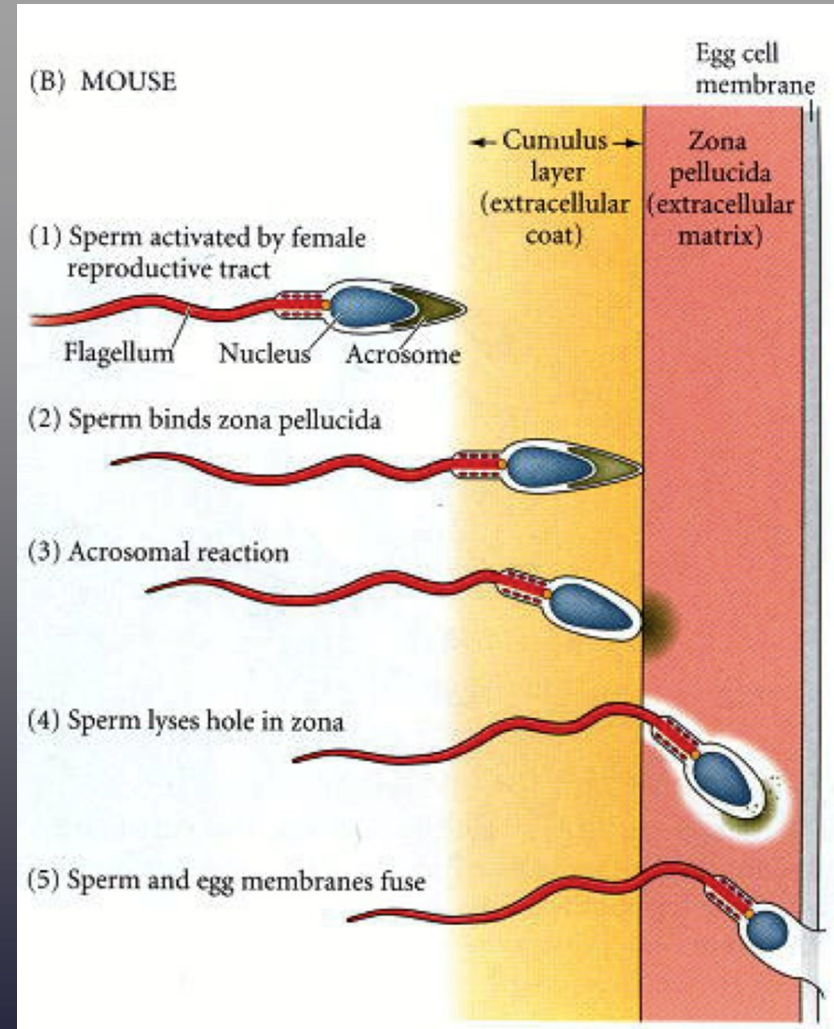
- Για να βρουν το δρόμο τους τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια στον ωαγωγό σημαντικό ρόλο παίζει ο χημειοτακτισμός, ο θερμοτακτισμός και η εκροή υγρού απο τα ωοθηλάκια κατά την απελευθέρωση του ωαρίου.
- Η ενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου πραγματοποιείται απο την επαφή του με τις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και είναι απαραίτητη για τη γονιμοποίηση.
- Κατά την ενεργοποίηση πρωτεΐνες υπεύθυνες για την αναγνώριση σπερματοζωαρίου - ωαρίου μεταφέρονται στην επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου.

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

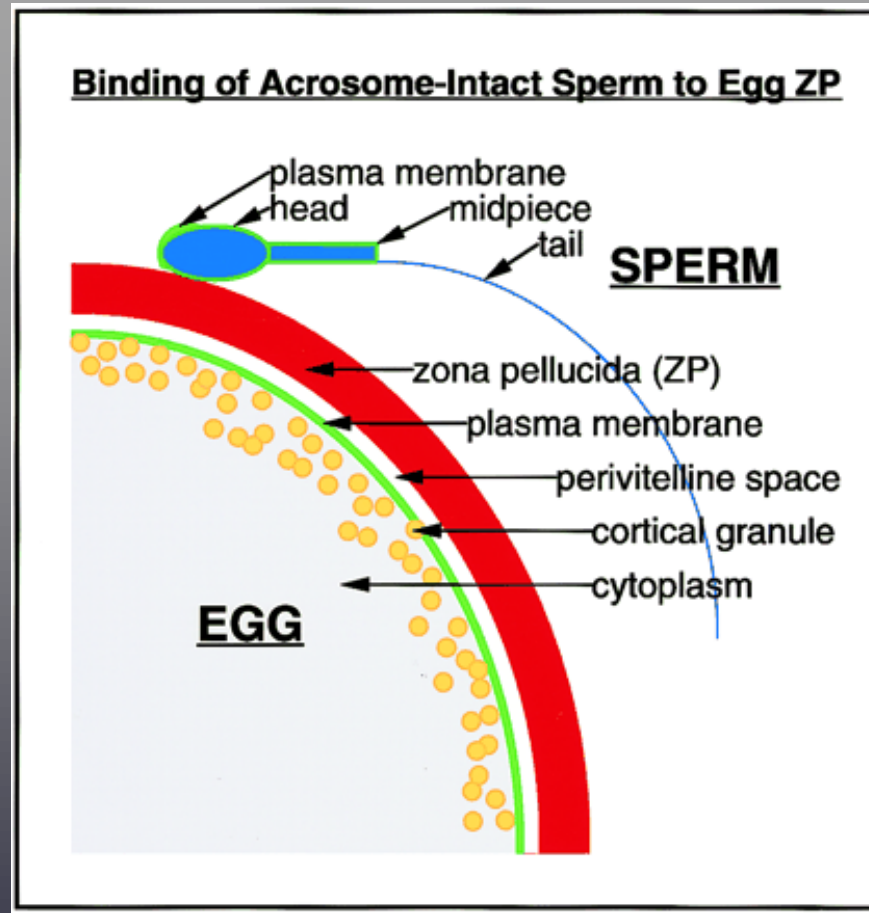
➤ Αυξημένη κινητικότητα (υπερενεργοποίηση στο πέρασμα από μήτρα σε ωαγωγό)

➤ Πέρασμα από cumulus (ακτινωτός στέφανος)

➤ Εκφραση υαλουρονιδασών (αρκετά μέλη της οικογένειας) στην κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου - δημιουργία “μονοπατιού” διαμέσου των κυττάρων του cumulus.



2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

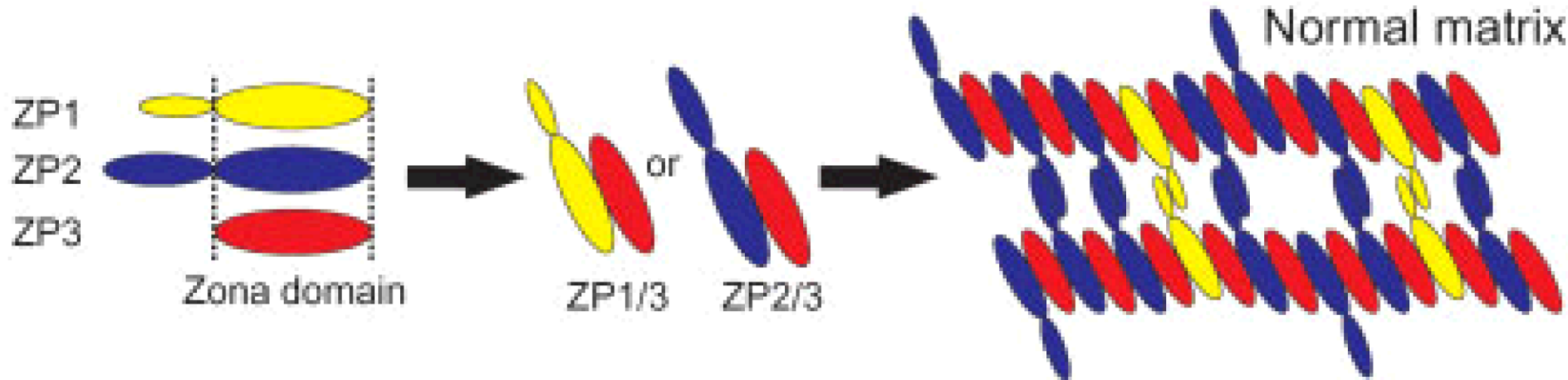


Η διαυγής ζώνη (zona pellucida) αποτελείται από από γλυκοπρωτεΐνες και ενέχεται:

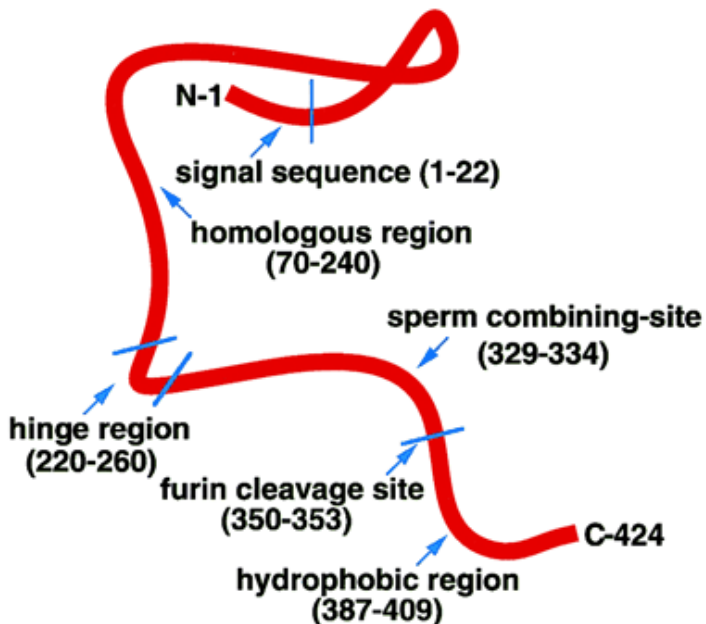
➤στην ειδική πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και

➤στην έναρξη της ακρωσωμικής αντίδρασης

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



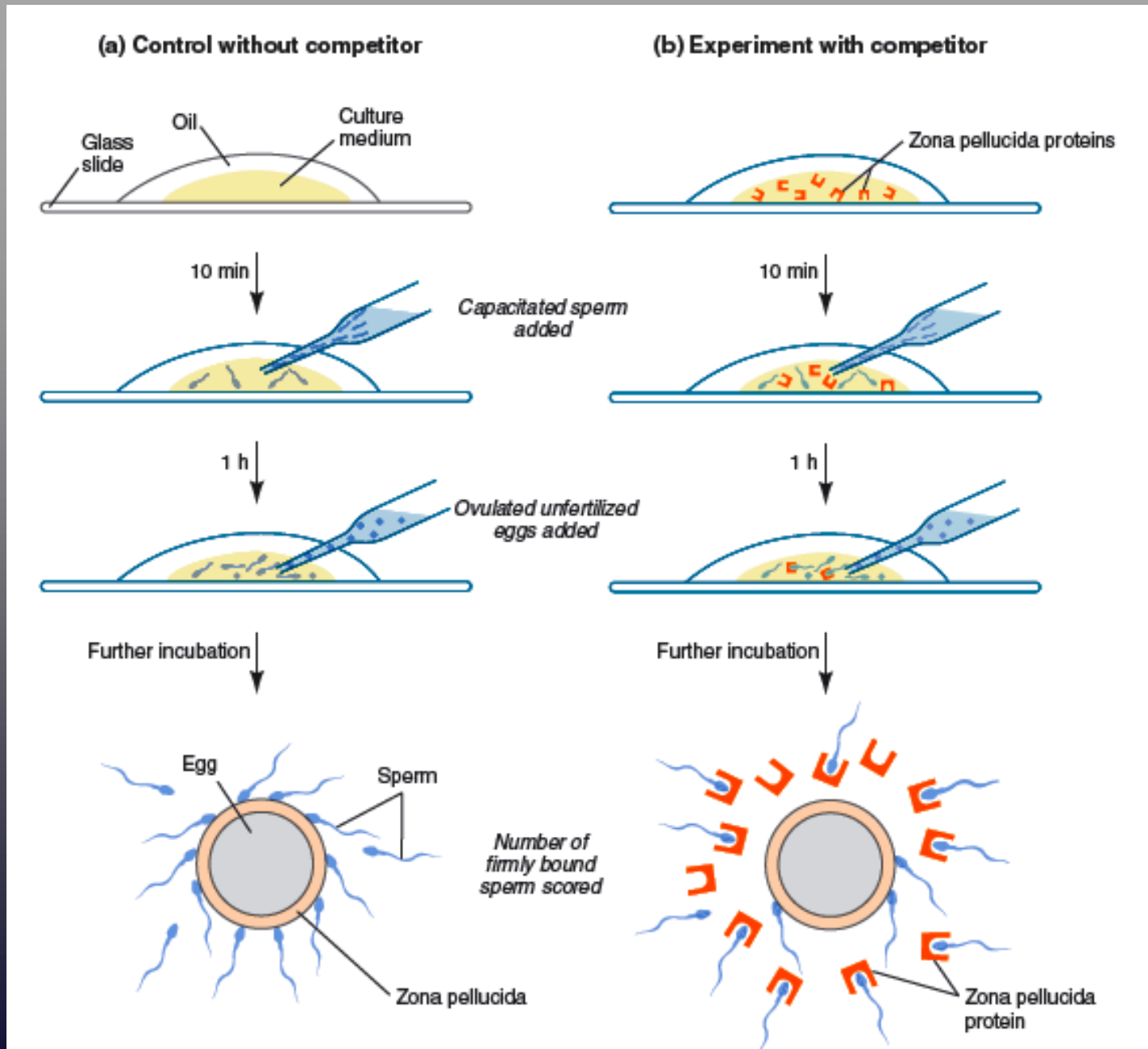
LANDMARKS OF THE mZP3 POLYPEPTIDE



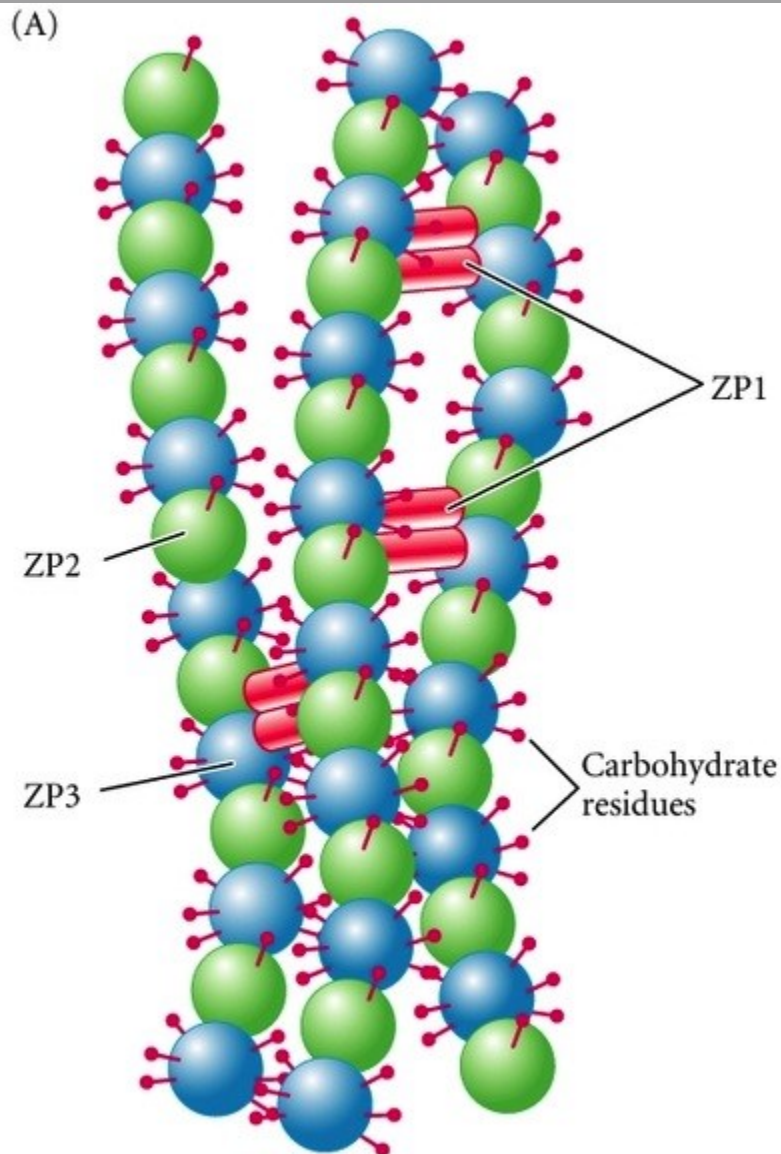
➤ Η διαυγής ζώνη αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP2 και ZP3. Κωδικοποιούνται από γονίδια που φαίνεται ότι ελέγχονται από παράγοντες bHLH.

➤ Η ZP3 είναι η πρωτεΐνη που ενέχεται στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.

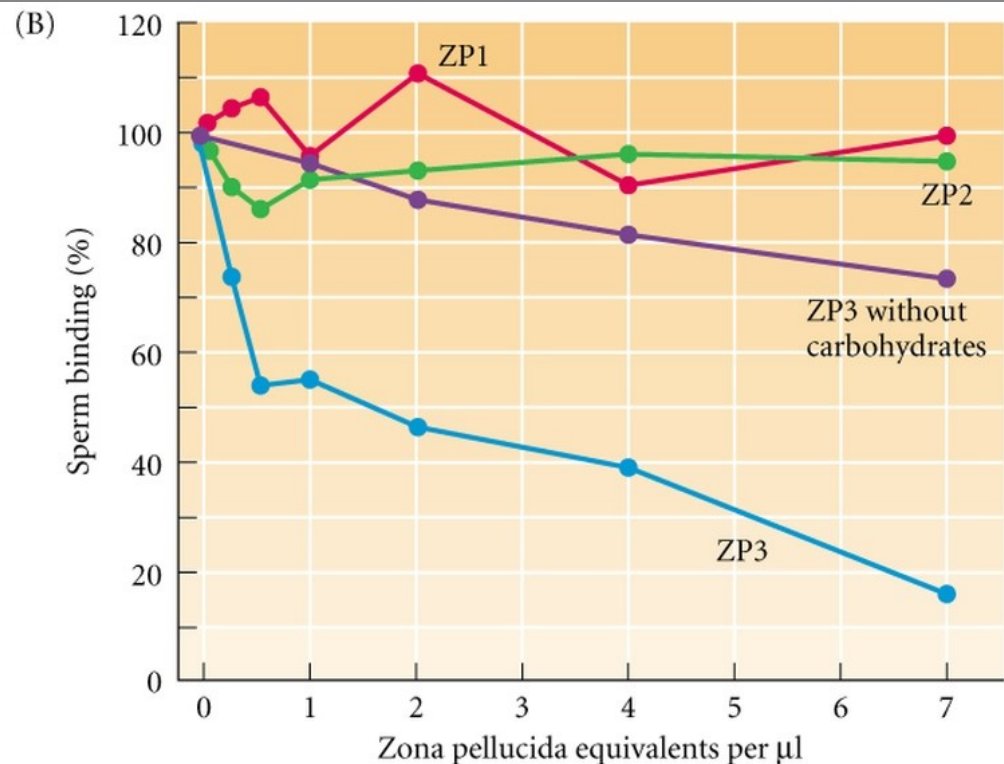
2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



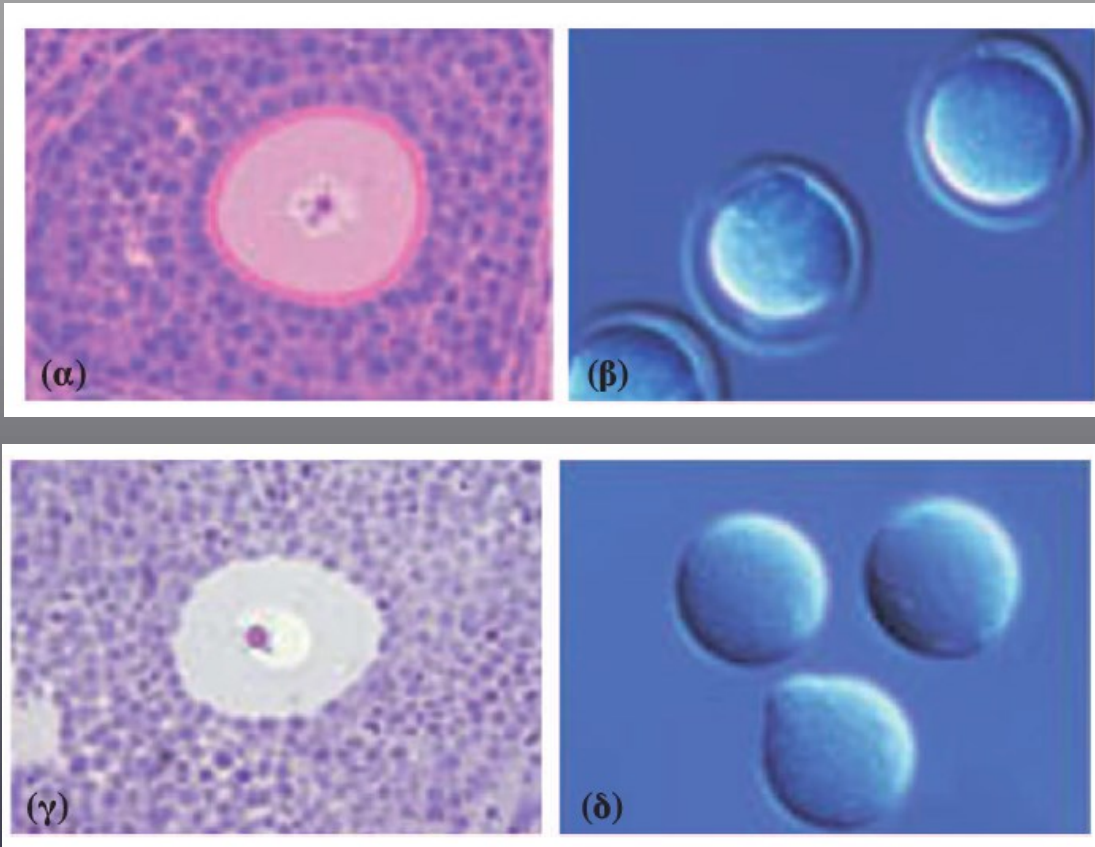
2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



➤ Προεπώση των σπερματοζωαρίων με καθαρή ZP3 εμποδίζει την πρόσδεση των σπερματοζωαρίων στα ωάρια. Τα κατάλοιπα των υδατανθράκων παίζουν και αυτά ρόλο στην αναγνώριση από το σπερματοζώαριο.



2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



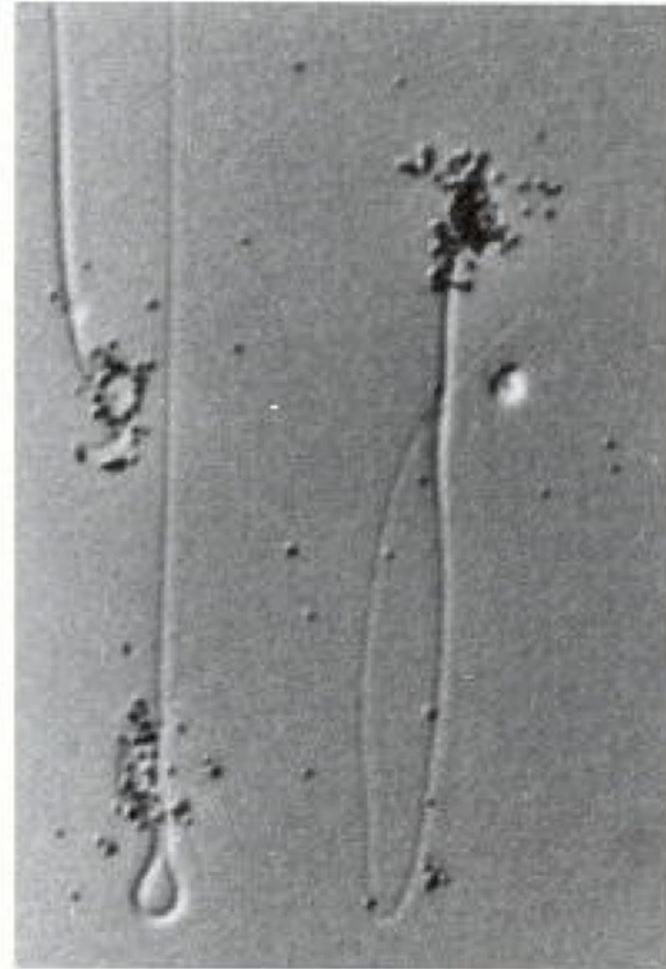
Τα ωάρια από θηλυκά άτομα στα οποία έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ZP3 στερούνται διαφανούς ζώνης: (α, β) φυσιολογικά ωάρια, (γ, δ) ωάρια από θηλυκά άτομα από τα οποία απουσιάζει η ZP3.

Από τη δημοσίευση Dean (2004) Bioessays **26**, 29-38, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο John Wiley & Sons, Ltd.

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (σπερματοζωάριο)



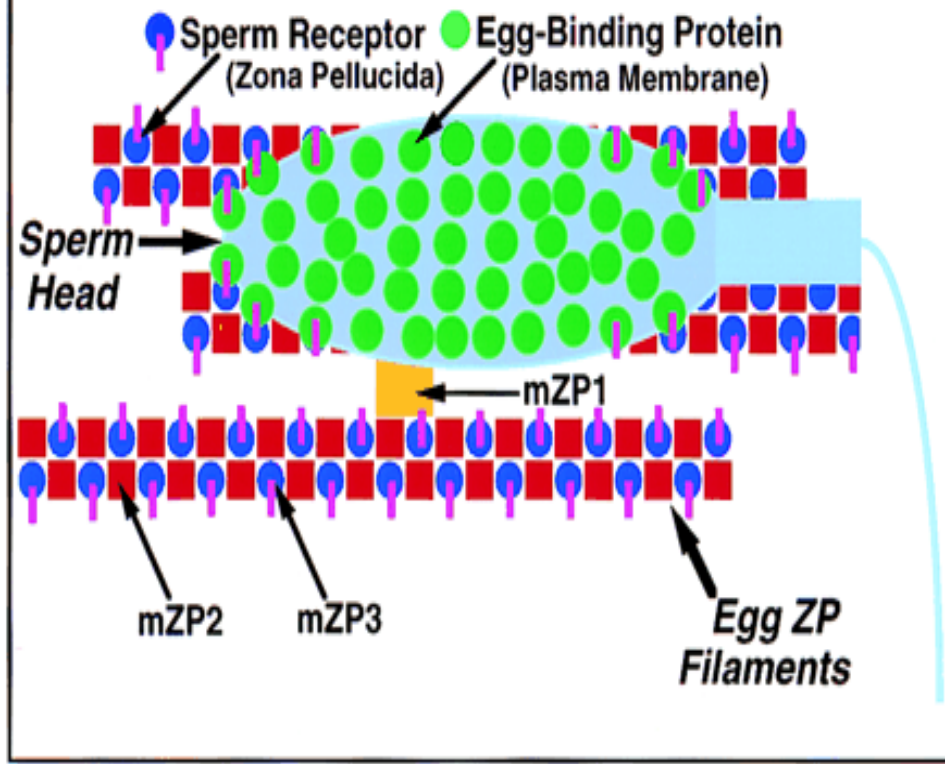
(B)



Στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου εντοπίζονται «υποδοχείς» για την ZP3

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (σπερματοζωάριο)

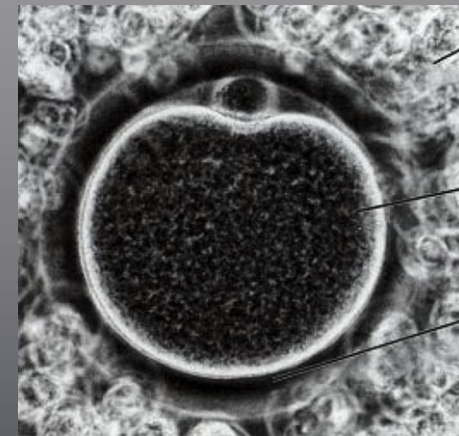
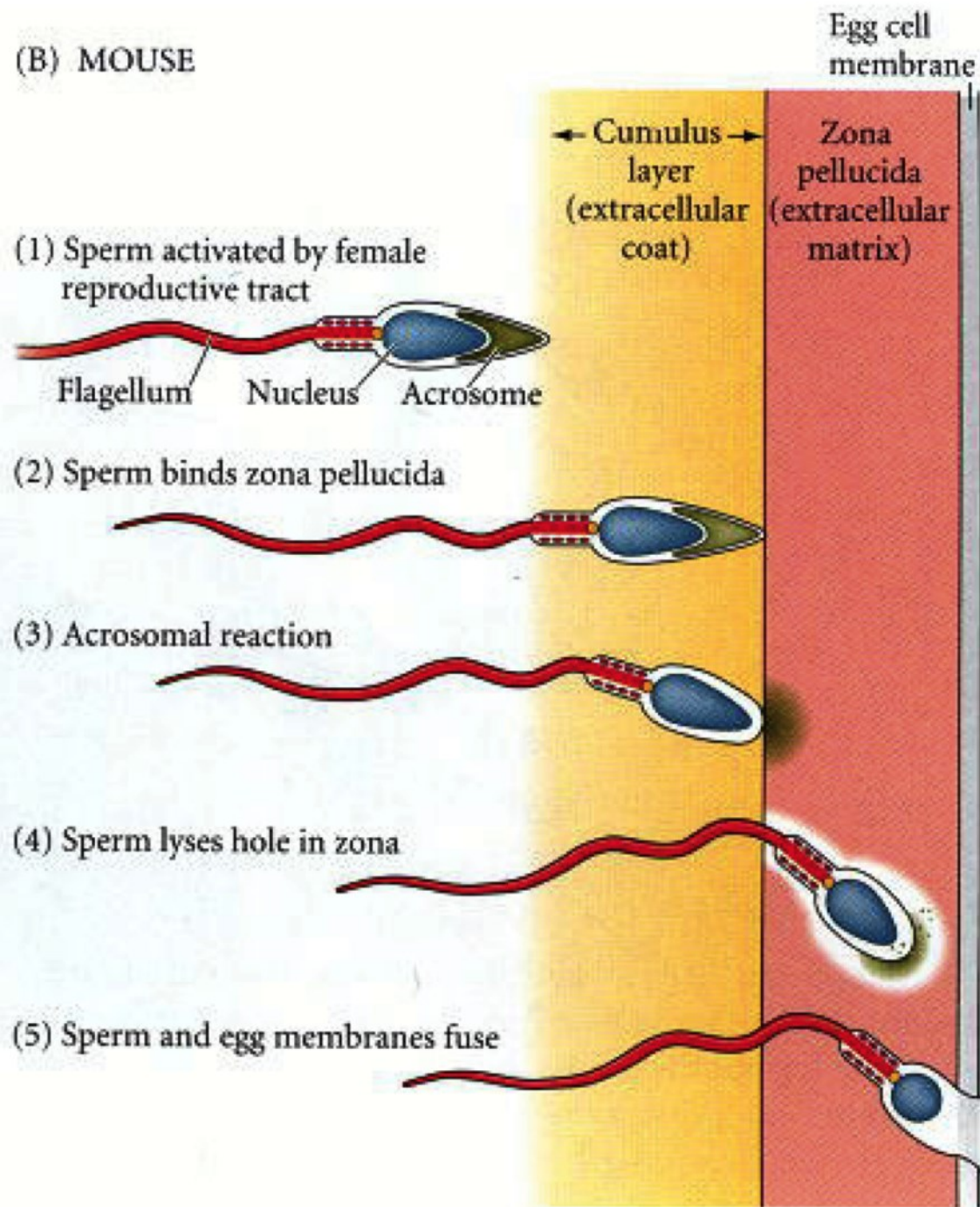
Binding of Sperm to Zona Pellucida Filaments



Η πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου που αναγνωρίζει τη ZP3 είναι μια επιφανειακή β -1,4-γαλακτοζυλο-τρανσφεράση (GalT) η οποία προσδένεται ισχυρά σε αυτή.

Η αλληλεπίδραση της ZP3 με την GalT προκαλεί την ακροσωμική αντίδραση.

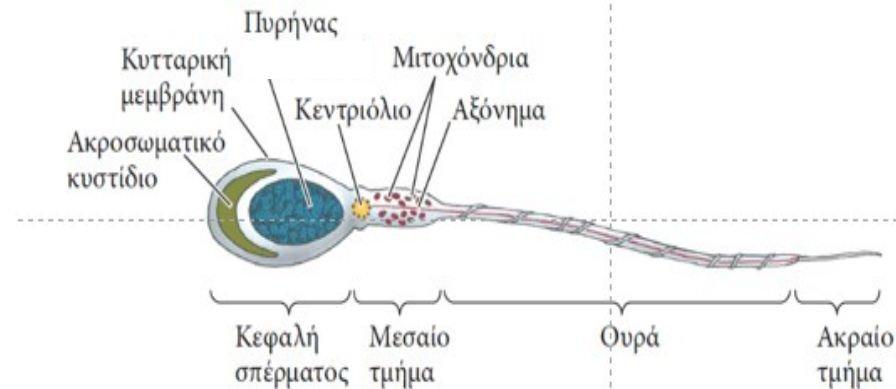
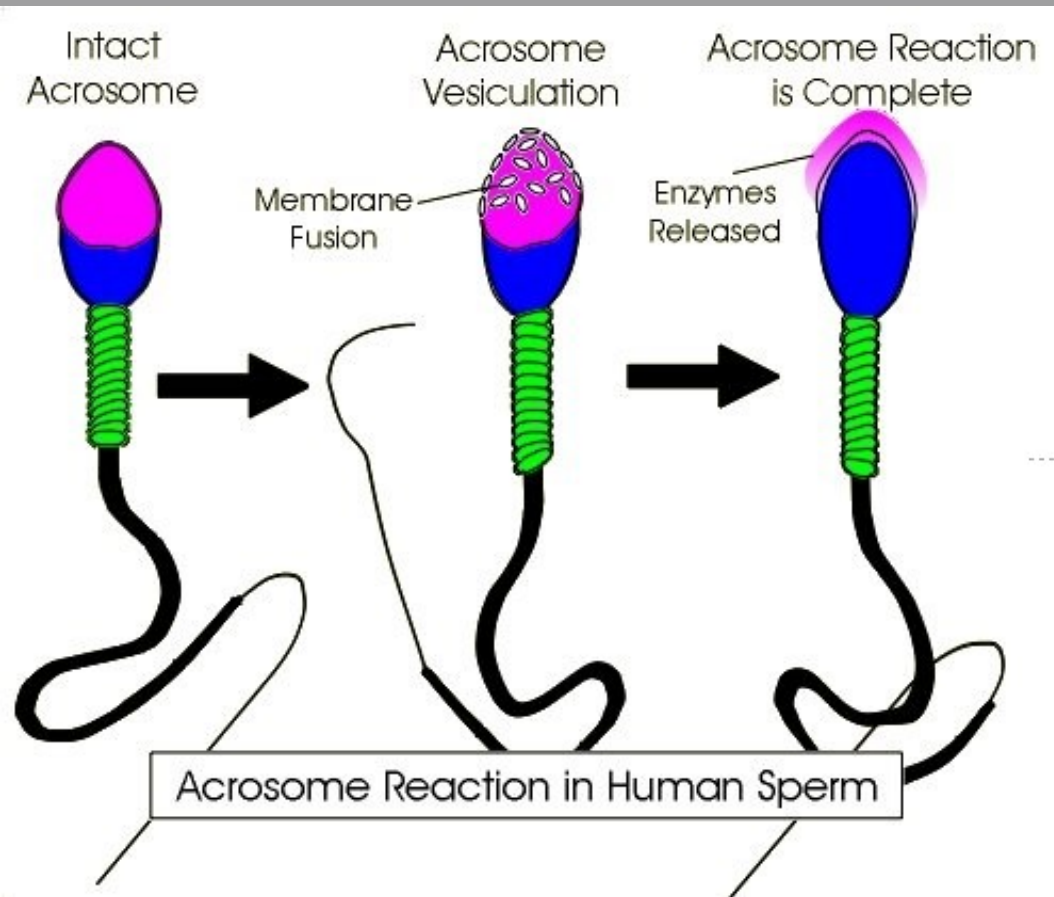
(B) MOUSE



ακτινωτός
στέφανος
(cumulus)

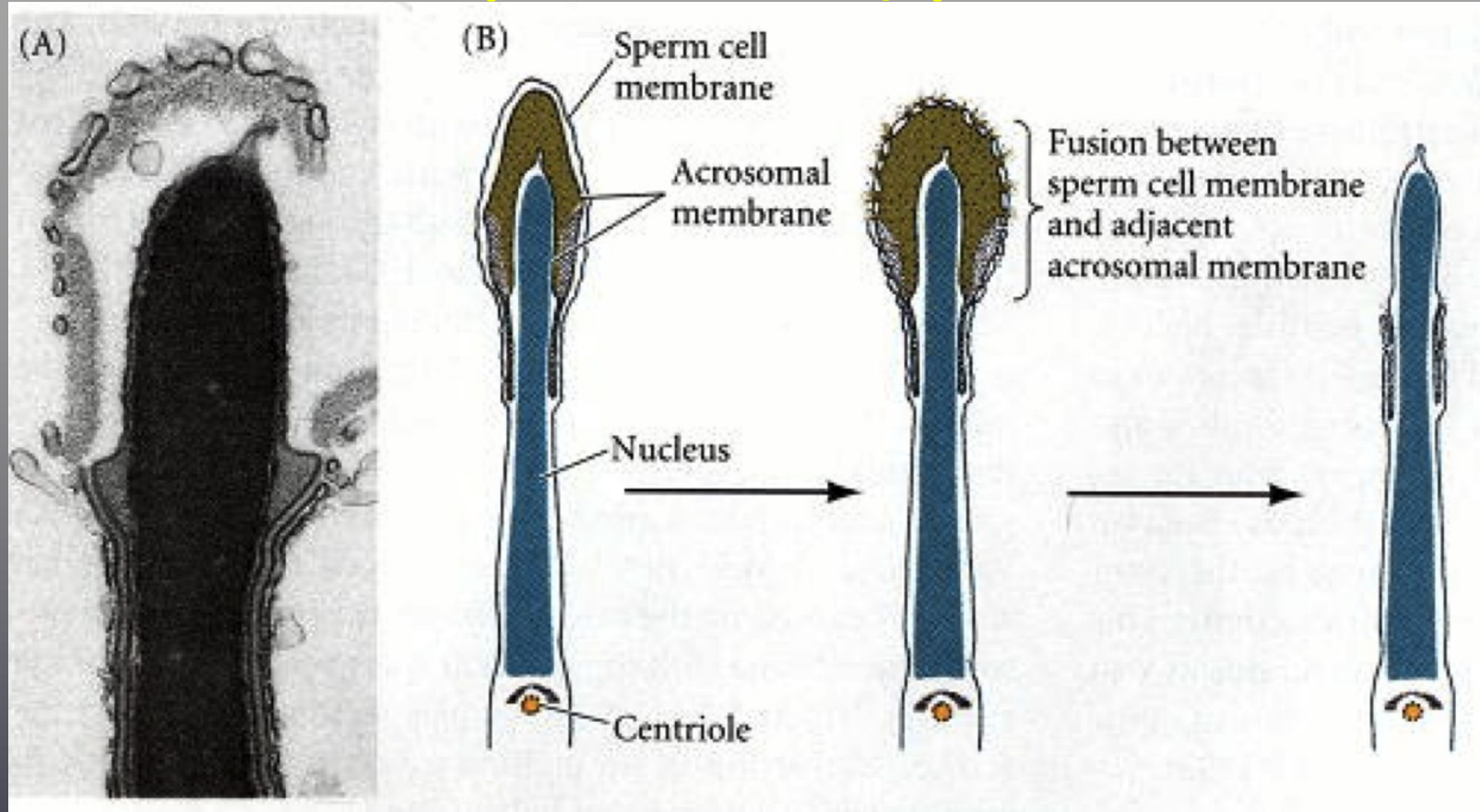
διαυγής ζώνη
(zona
pellucida)

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



- Ακολουθεί την αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου.
- Σύντηξη της μεμβράνης του ακροσώματος με αυτή του σπερματοζωαρίου.
- Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (ακροσίνη - διαφανής ζώνη)

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



➤ Επάγεται από την αλληλεπίδραση της ZP3 με υποδοχείς της στη μεμβράνη του σπερματοζωαρίου.

➤ Ένας από αυτούς β-γαλακτοσυλτρανσφεράση I - ενεργοποιεί μέσω πρωτεϊνών G έναν καταρράκτη που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα διαύλων Ca γεγονός που προκαλεί την εξωκυττάρωση των περιεχομένων του ακροσωματίου.

➤ Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεάση σερίνης ακροσίνη - υδρόλυση διαφανούς ζώνης) – μονοπάτι διέλευσης του σπερματοζωαρίου.

3. Η ακροσωμική αντίδραση: αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου

➤ Στο στάδιο αυτό η αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου διεκπεραιώνεται από τις ADAM στις οποίες προσδένεται το ωάριο.

➤ Οι ADAM είναι πρωτεΐνες του σπερματοζωαρίου (A disintegrin and Metalloprotease domain) : φερτιλίνη α, φερτιλίνη β και κυριτεστίνη.

➤ Η επώαση σε πειράματα γονιμοποίησης *in vitro* σε θρεπτικό μέσο παρουσία πεπτιδίων φερτιλίνης β : παρεμπόδιση της πρόσδεσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο.

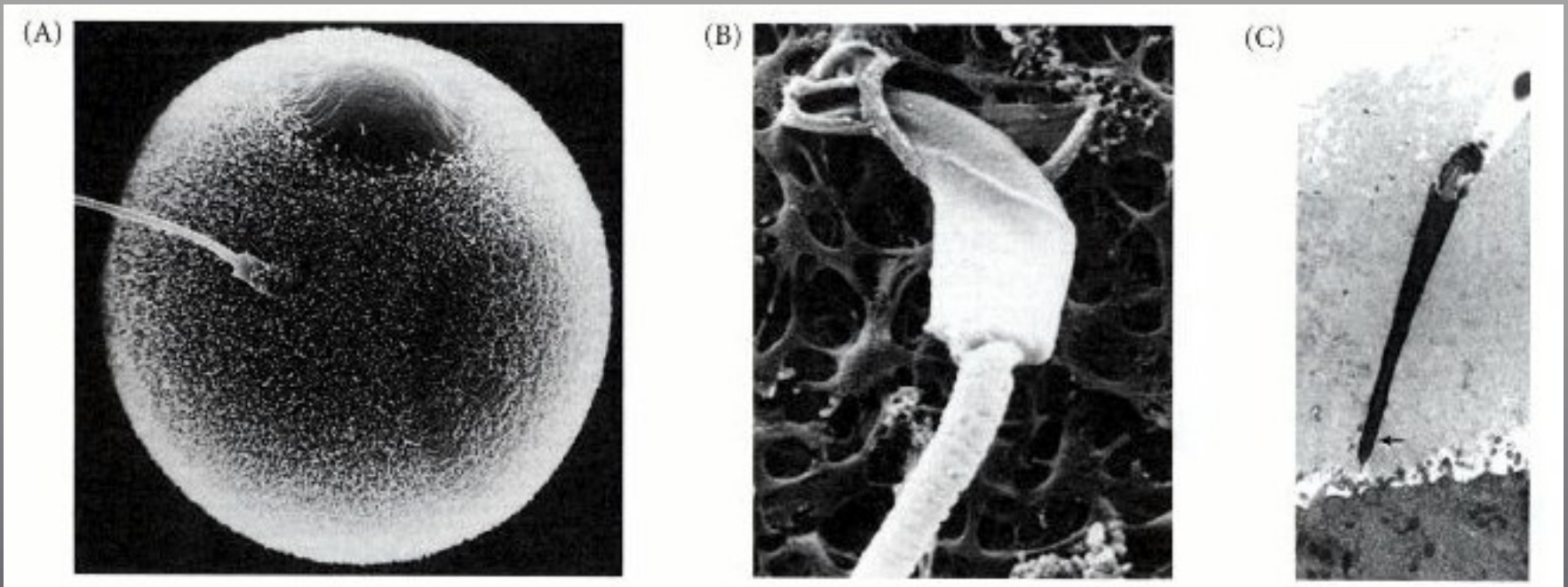
➤ Τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει η φερτιλίνη β ή η κυριτεστίνη εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα. Γιατί;

➤ Πιθανός στόχος των ADAM στην επιφάνεια του ωαρίου : η ιντεγκρίνη α6.

➤ Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της α6 παρεμποδίζουν την γονιμοποίηση *in vitro*.

➤ Ωστόσο τα knock out ιντεγκρίνης 6 έχουν φυσιολογική γονιμότητα. Γιατί;

5. Σύντηξη γαμετών



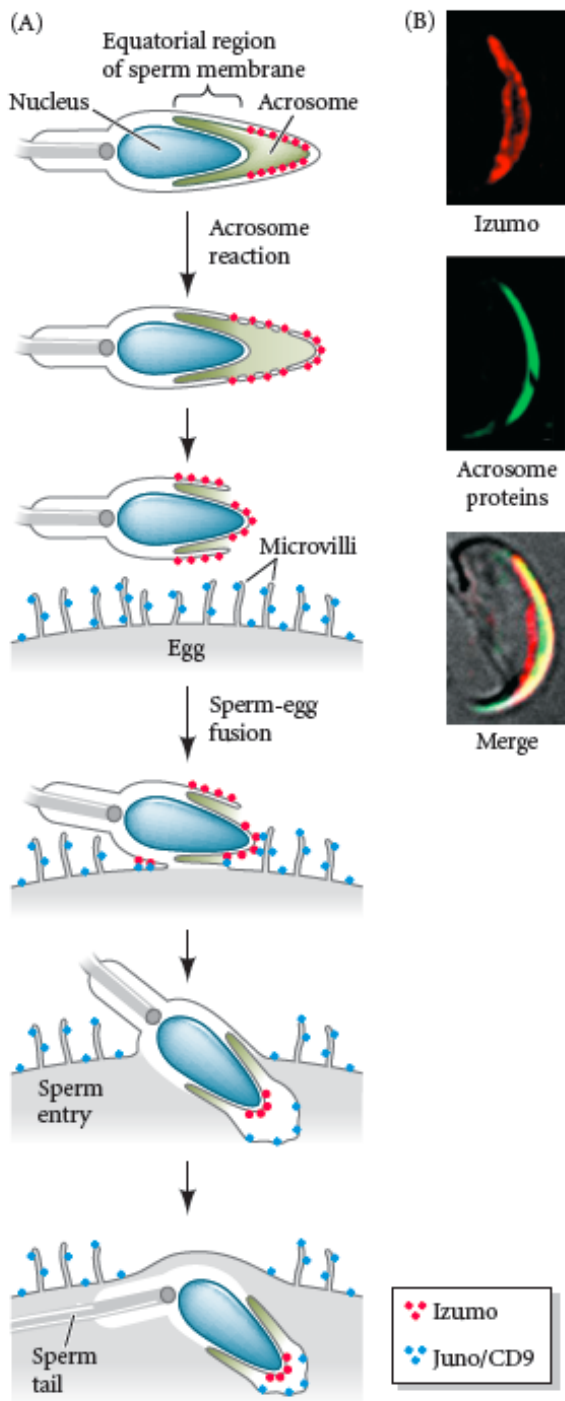
➤ Η επαφή ωαρίου-σπερματοζωαρίου γίνεται στο πλαϊό του σπερματοζωαρίου .

➤ Φαίνεται ότι ενέχεται μια πρωτεΐνη που συνδέεται με ιντεγκρίνες η CD9.

➤ Η CD9 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ωαρίου.

➤ Στο knock-out του CD9 τα θηλυκα είναι στείρα- αποτυχία στη σύντηξη.

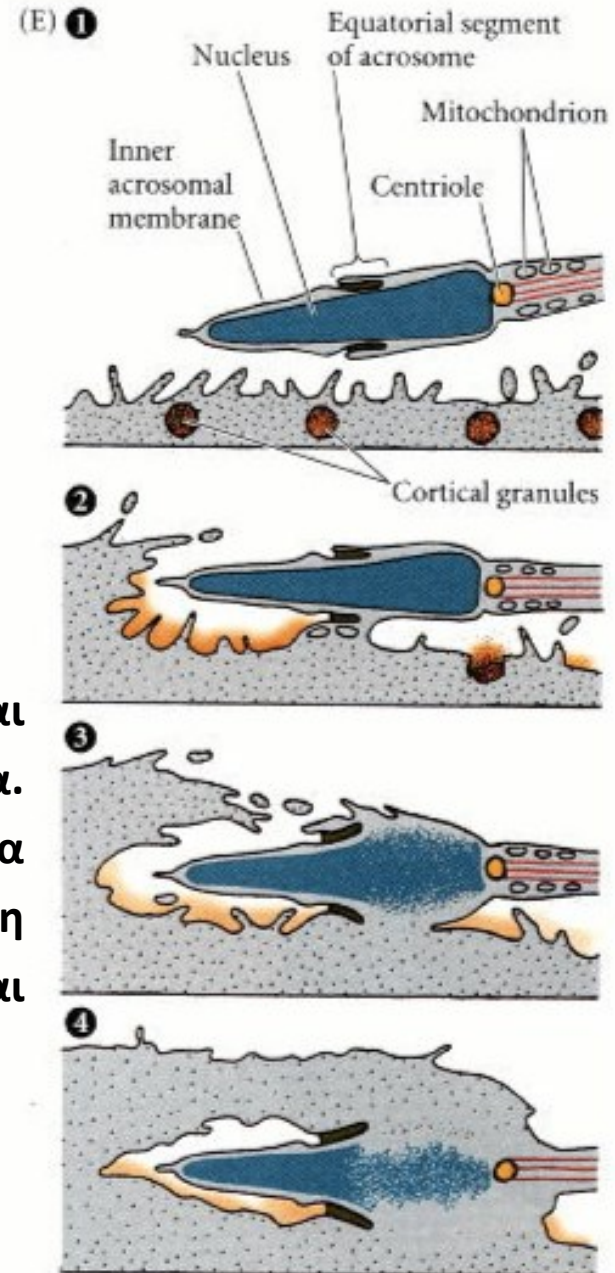
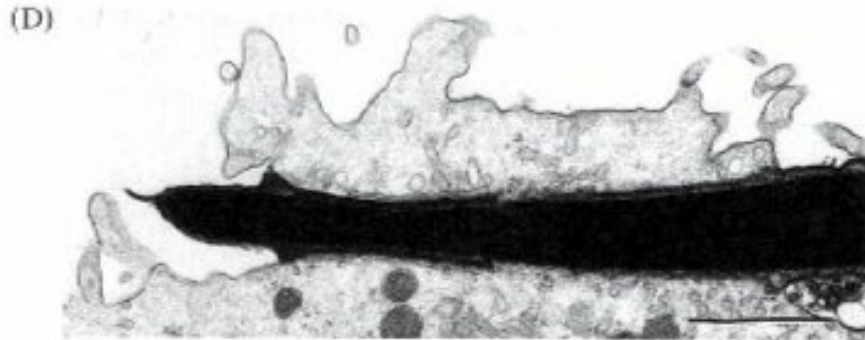
➤ Μπορεί να γίνει διάσωση με ένεση mRNA του CD9.



5. Σύντηξη γαμετών

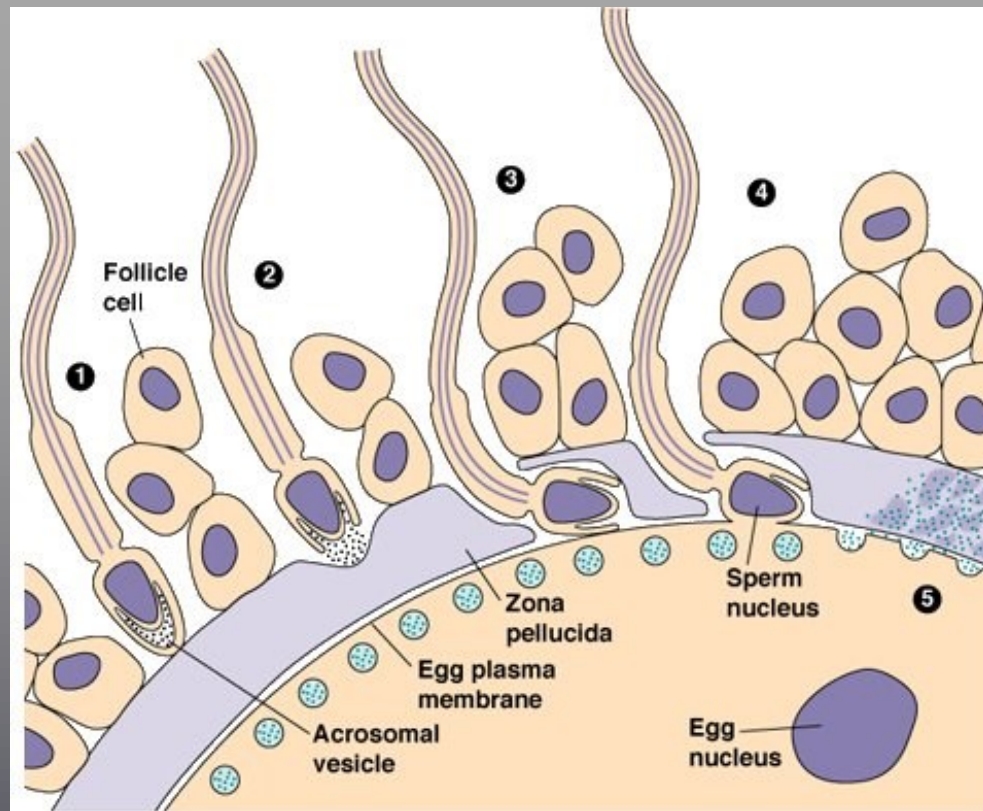
- Η κατανομή της *Izumo* μεταβάλλεται – αρχικά στο ακρόσωμα. Κατά τη σύντηξη περιορίζεται στην περιοχή επαφής των γαμετών.
- Knock out του γονιδίου *Izumo* - τα σπερματοζωάρια περνούν τη διαφανή ζώνη αλλά δεν ολοκληρώνουν τη σύντηξη.
- Η *Juno* αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου την *Izumo* (με επικράτειες ανοσοσφαιρίνης).
- Knock out του γονιδίου *Juno* ούτε πρόσδεση του σπερματοζωαρίου και ούτε σύντηξη γαμετών.
- Η *CD9* στρατολογείται στη μεμβράνη του ωοκυττάρου από την *Juno*.

Η αντίδραση του φλοιού



➤ Στο φλοιό του ωοκυττάρου εντοπίζονται κυστίδια που περιέχουν τα φλοιϊκά κοκκία. Κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου τα φλοιϊκά κυστίδια συντήκονται με τη μεμβρανή του ωοκυττάρου και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους.

Η αντίδραση του φλοιού



Τα φλοιϊκά κυστίδια περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες που τροποποιούν τη διαυγή ζώνη.

➤ N-ακετυλογλυκοσαμινιδάση αποκόπτει κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης από ZP3.

➤ Πρωτεάσες που αποικοδομούν τη ZP2.

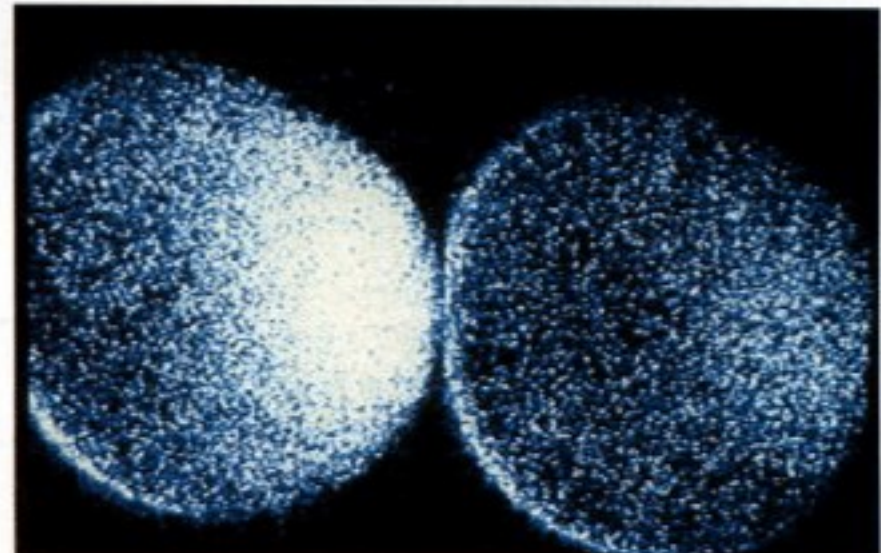
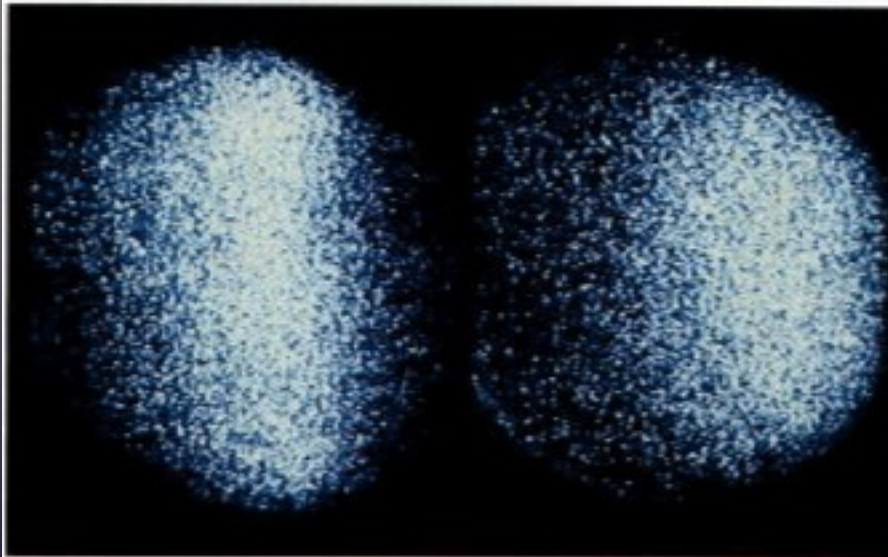
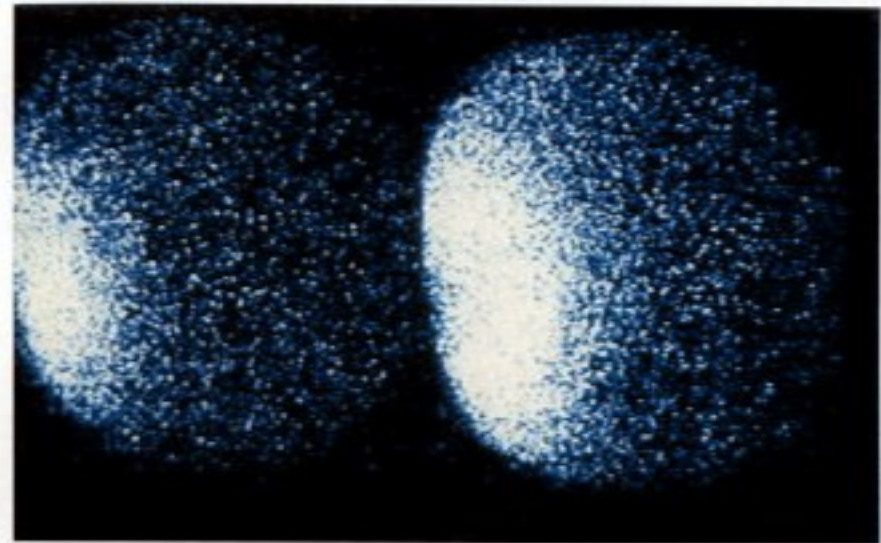
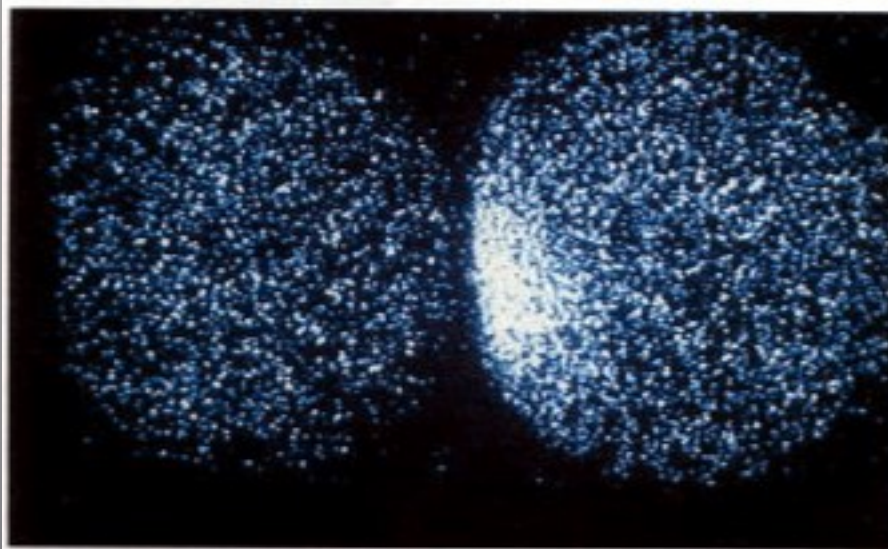
➤ Αναστολείς της ακροσίνης

➤ Φράγμα στην πολυσπερμία.

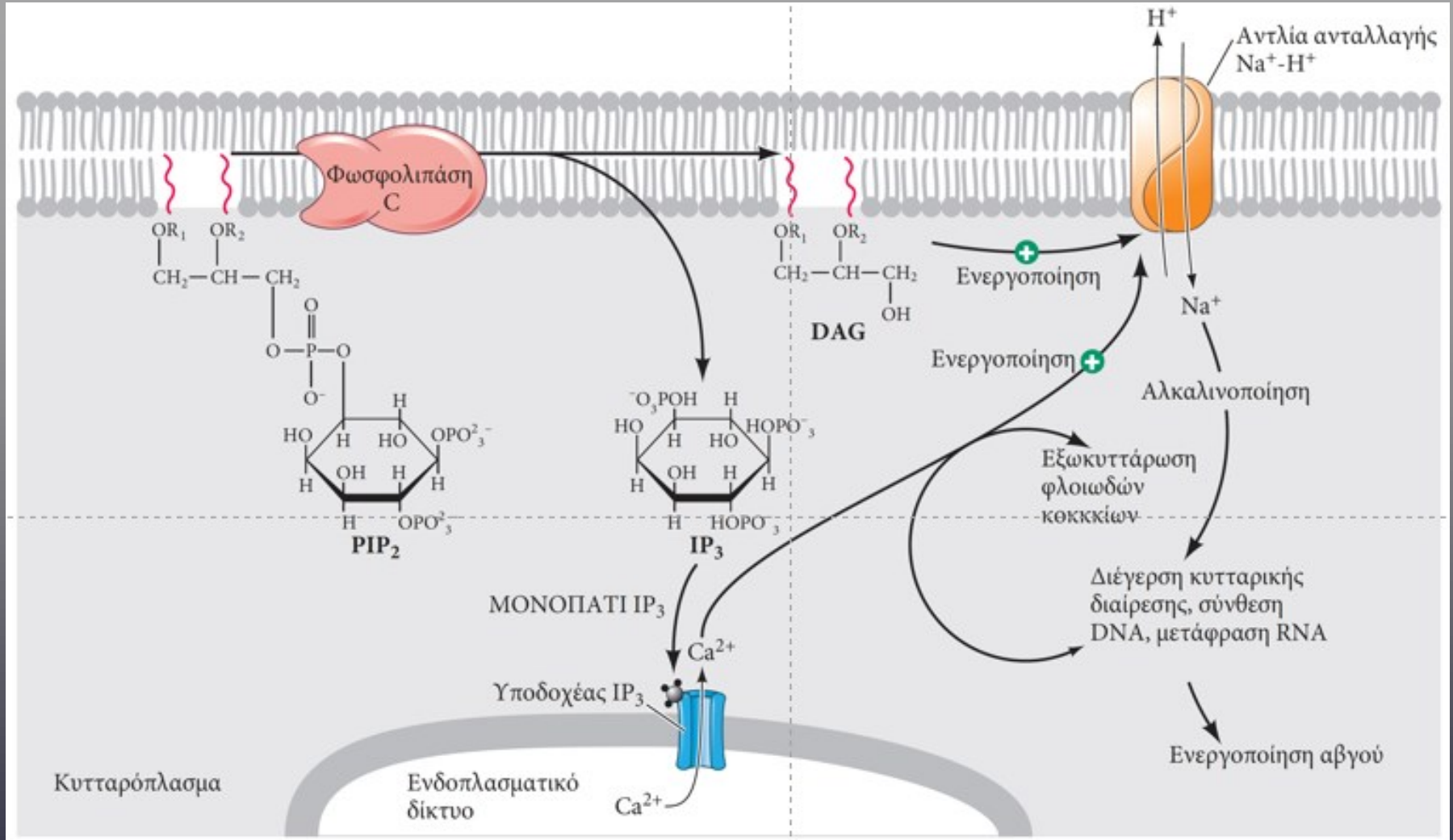
➤ Οι ίδιοι μηχανισμοί που ενέχονται στην ακροσωμική αντίδραση φαίνεται ότι εμπλέκονται και στην αντίδραση του φλοιού.

➤ Αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} - απελευθέρωσή του από ενδοπλασματικό δίκτυο.

Απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca



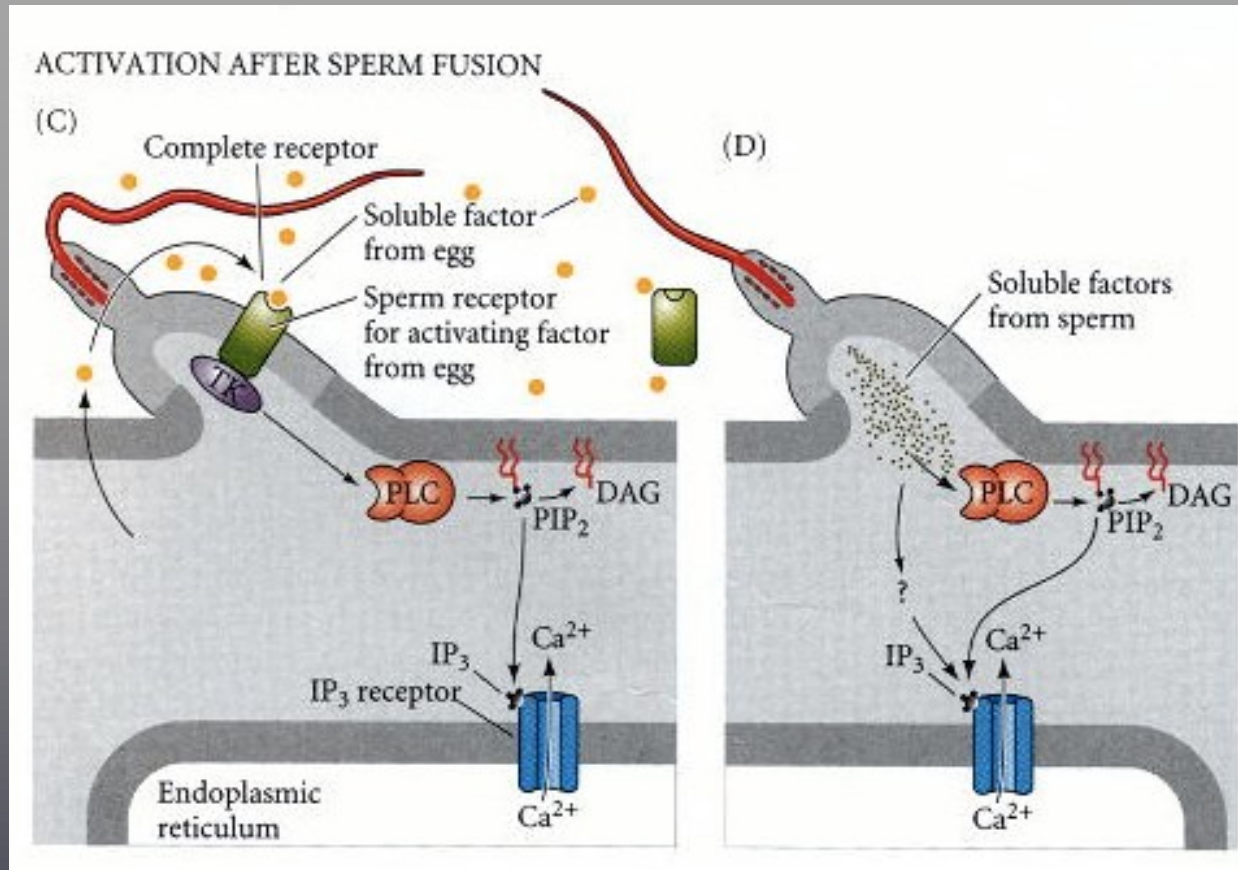
➤ Η απελευθέρωση αρχίζει από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου και στη συνέχεια επεκτείνεται. (επάνω : αχινός!!)



➤ Το IP3 ενέχεται στην απελευθέρωση του Ca- παρεμποδίζοντας τον υποδοχέα του αναστέλλεται η απελευθέρωση του Ca.

➤ Το IP3 παράγεται από το PIP2 μετά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C.

Τι ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C;



➤ Υπάρχουν αρκετές φωσφολιπάσες.

➤ Υπάρχουν πολλά πιθανά μονοπάτια ενεργοποίησής τους.

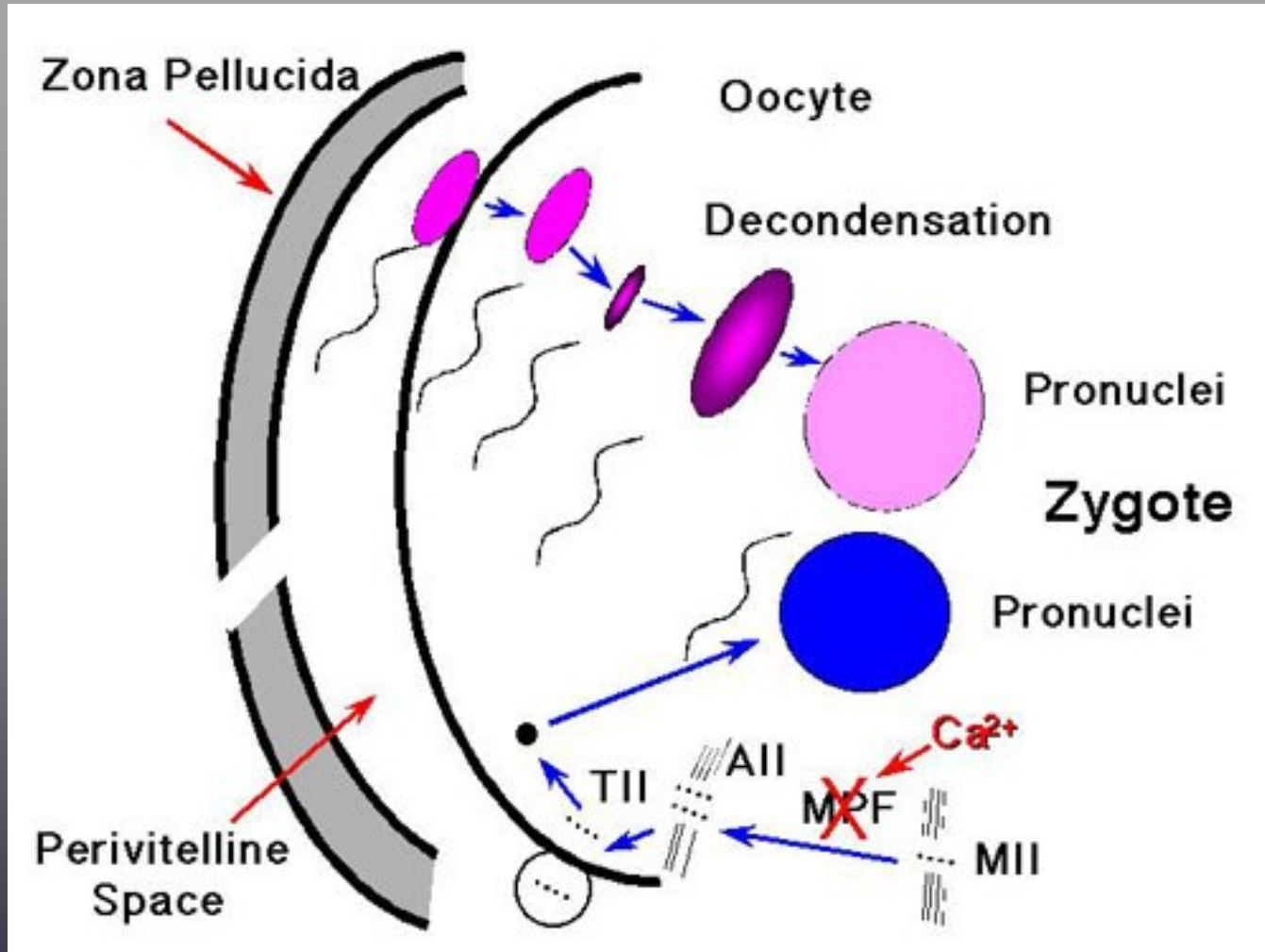
➤ Υπάρχουν διαφορές από είδος σε είδος.

➤ Στα θηλαστικά φαίνεται ότι η απελευθέρωση του Ca επιτυγχάνεται μέσω του ελαχιστου κυτταροπλάσματος που περιβάλλει τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου: δύο τρόποι

α) ενεργοποίηση γίνεται από μια πρωτεΐνη π.χ. Κινάση ή

β) ύπαρξη ειδικής φωσφολιπάσης στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου (PLCζ)?

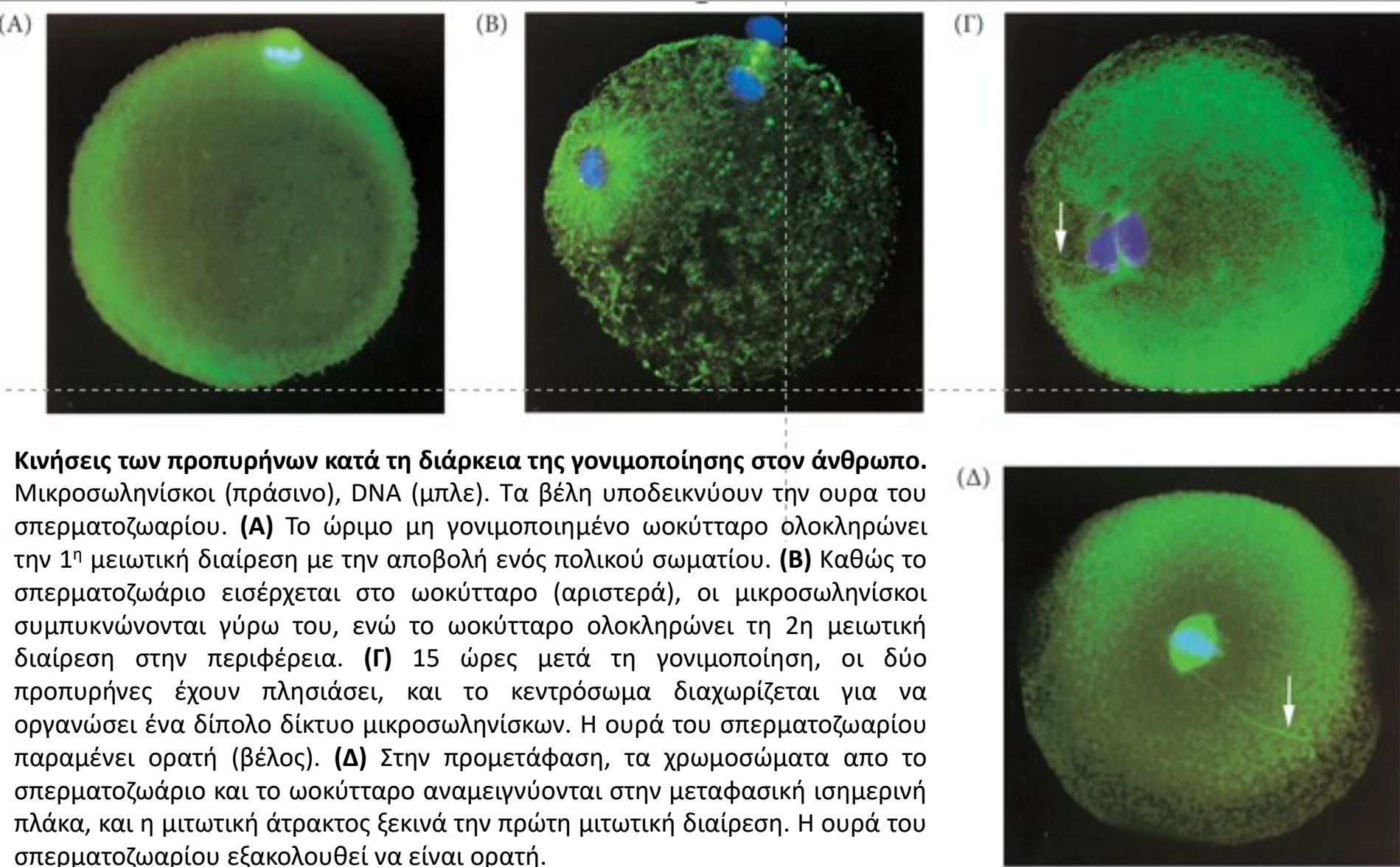
Μετανάστευση προπυρήνων



➤ Το Ca που απελευθερώνεται ευθύνεται και για την επανέναρξη της μείωσης, και την έναρξη της σύνθεσης DNA (πρωτεόλυση κυκλινών κ.λ.π)

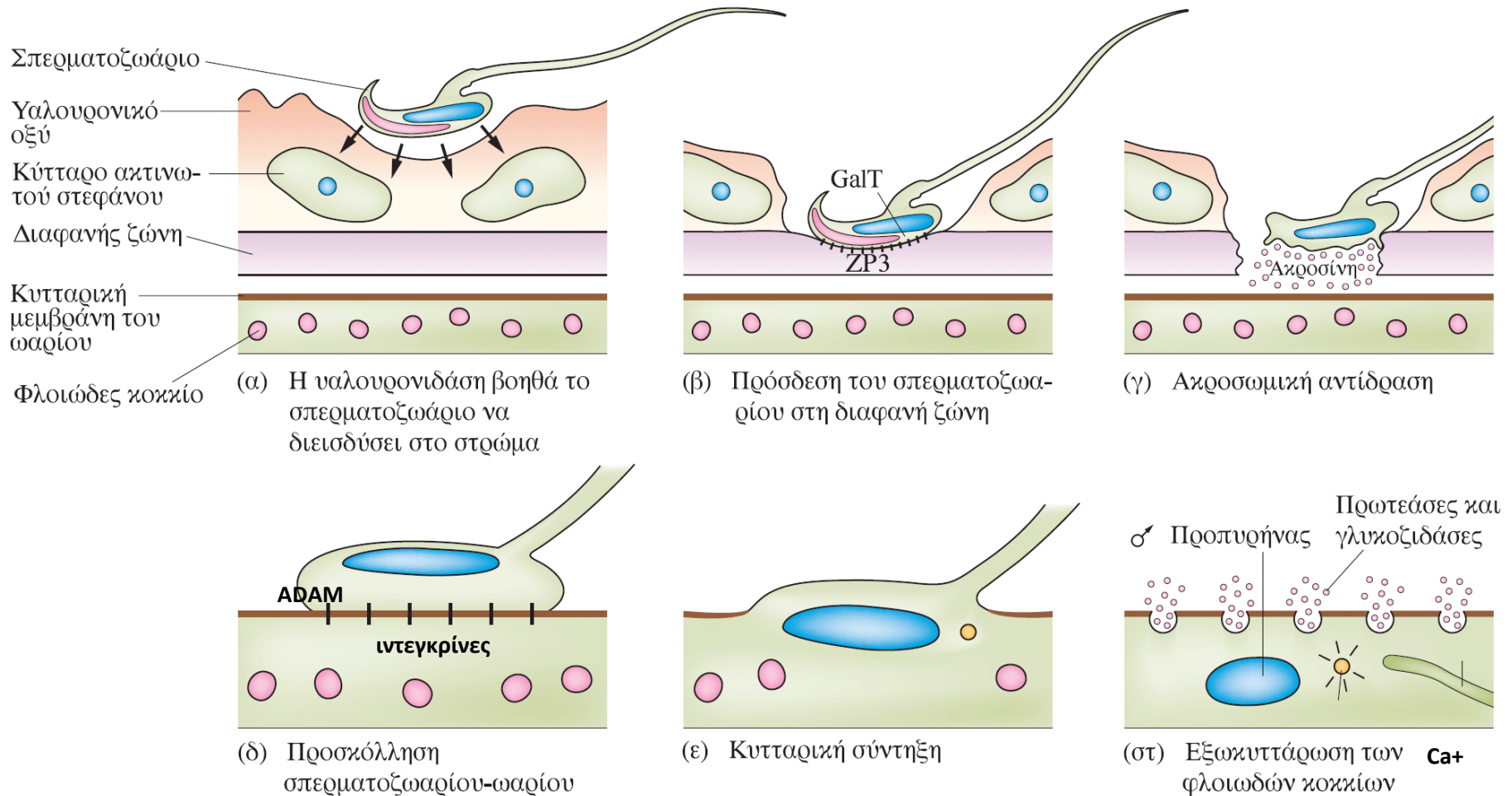
➤ Η σύνθεση DNA γίνεται ανεξάρτητα σε κάθε πυρήνα (σπερματοζωαρίο-ωοκύτταρο)
Δεν υπάρχει σύντηξη πυρήνων.

Μετανάστευση προπυρήνων



(Από Simerly et al. 1995, με την ευγενική παραχώρηση του G. Schatten.)

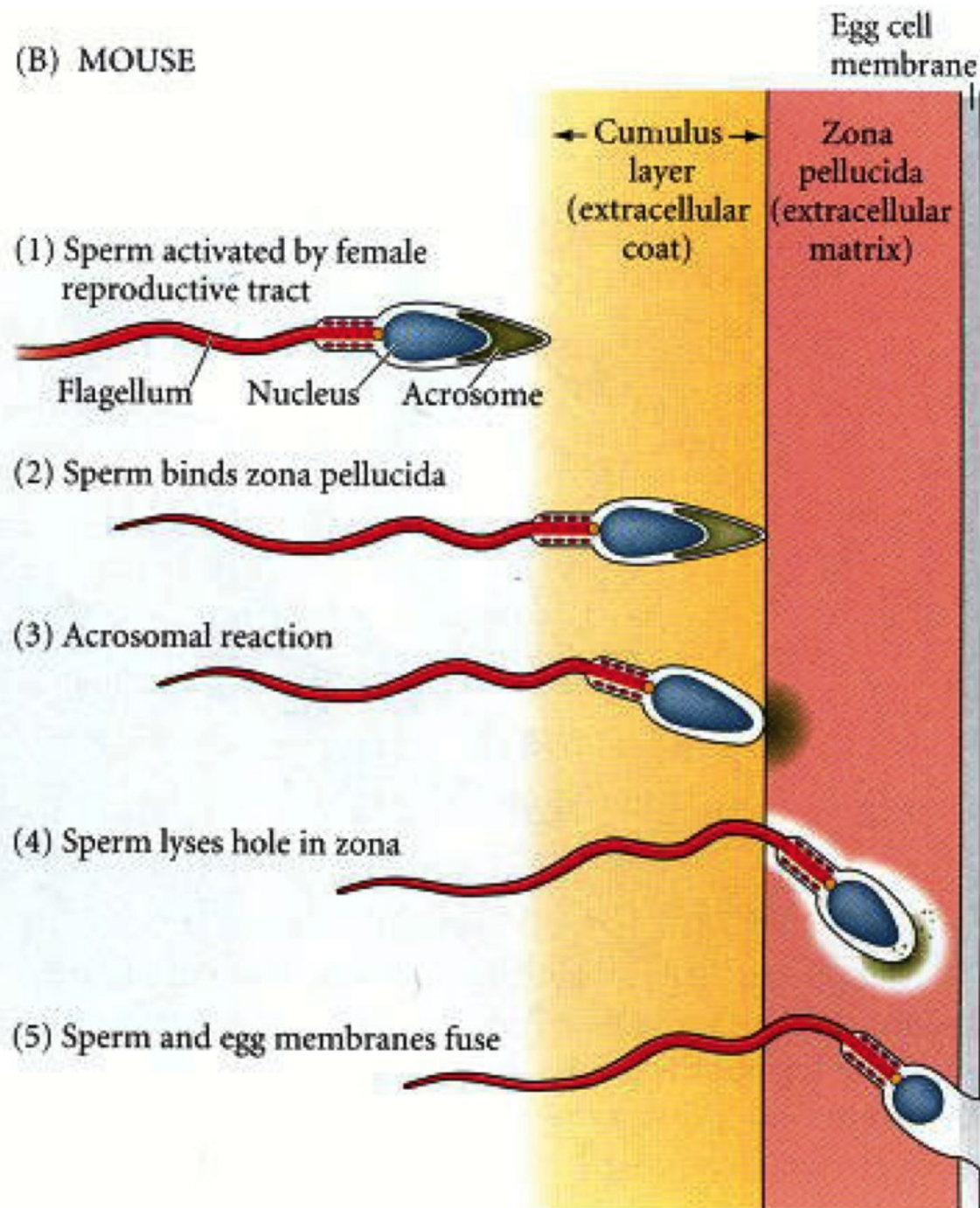
Η γονιμοποίηση στα θηλαστικά



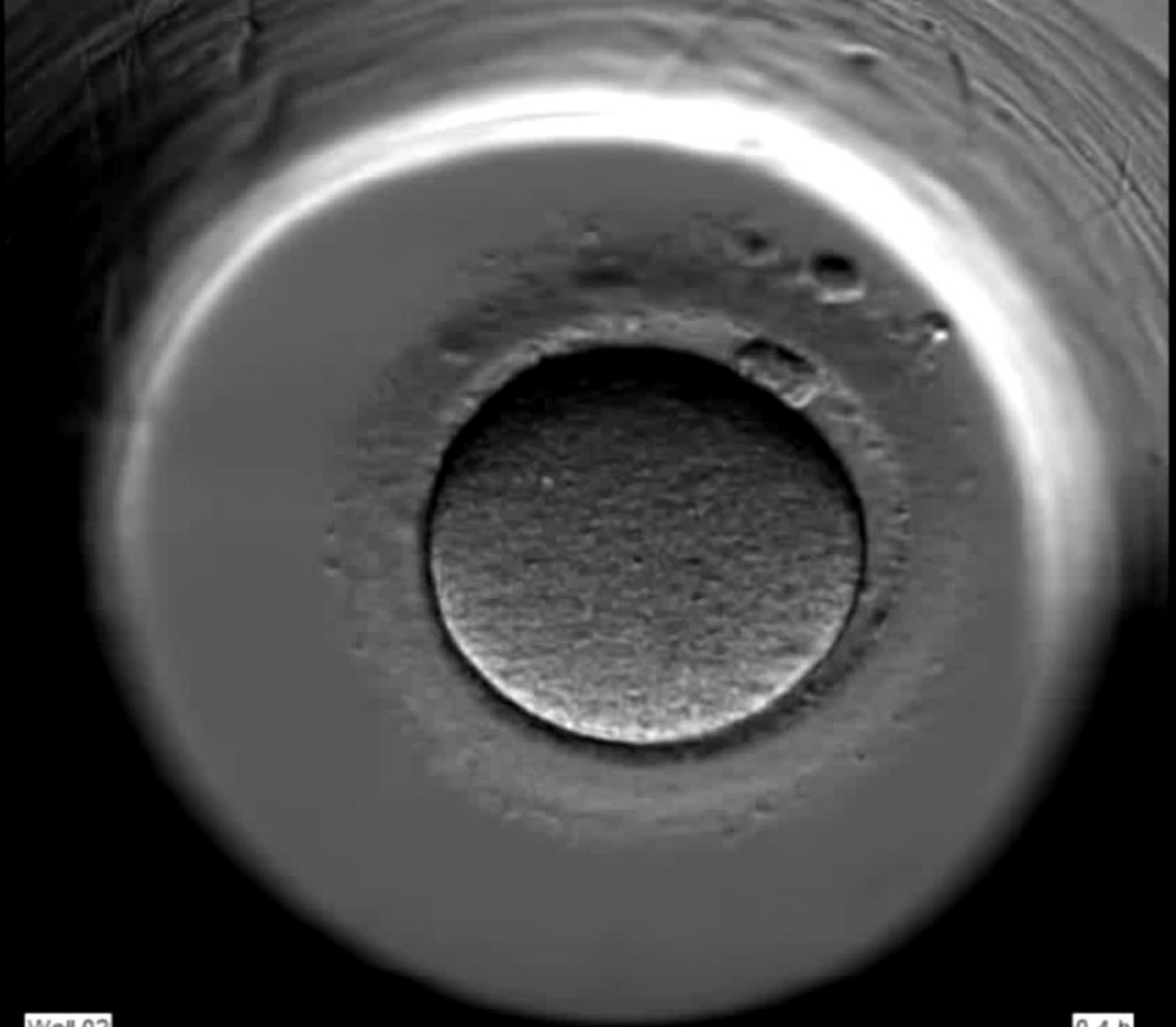
Τα κύρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη γονιμοποίηση στον ποντικό.

Σύνοψη

(B) MOUSE



- Απομάκρυνση της χοληστερόλης, αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης, μετακίνηση πρωτεϊνών στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.
- Έκφραση υαλουρονιδασών – πέρασμα απο ακτινωτό στέφανο.
- Αναγνώριση του σπερματοζωαρίου απο την ZP3 της διάφανης ζώνης.
- Ακροσωμική αντιδραση-απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων – διέλευση απο τη διάφανη ζώνη και αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου.
- Απελευθέρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου – φράγμα στην πολυσπερμία και ολοκλήρωση της μείωσης απο το ωοκύτταρο.
- Μετανάστευση προπυρήνων.

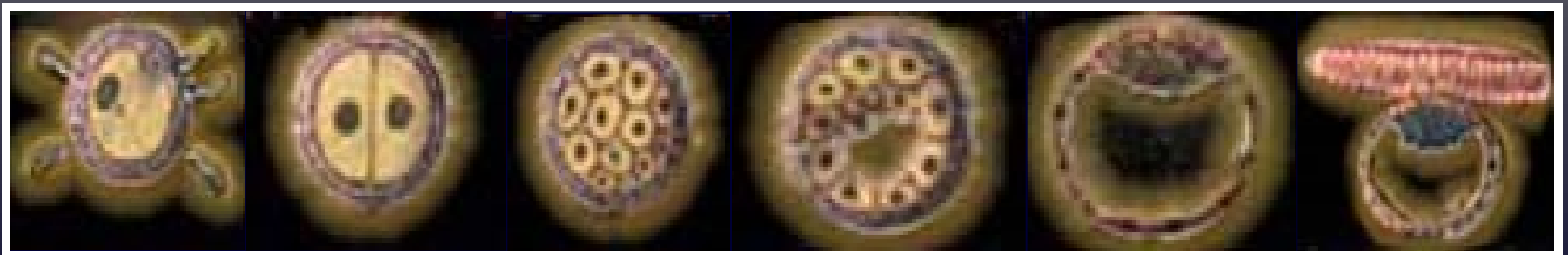


Well 02

0.4 h

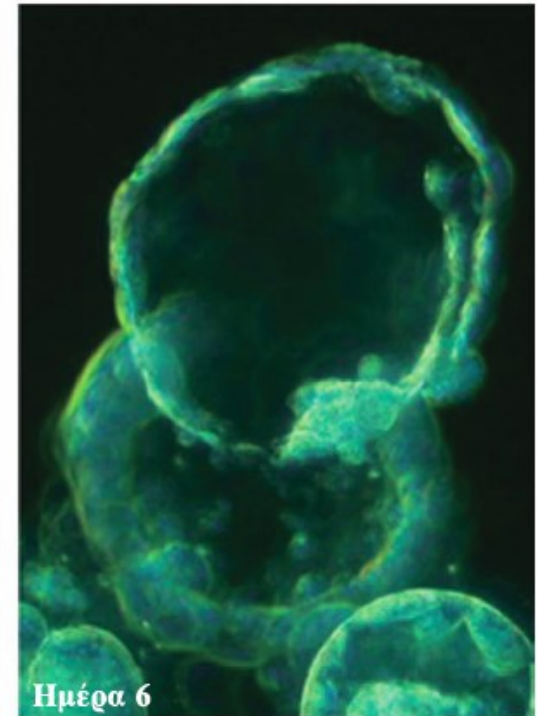
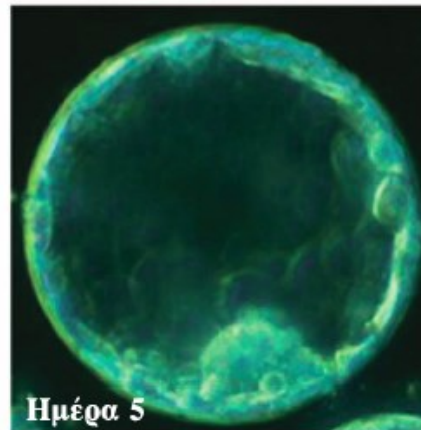
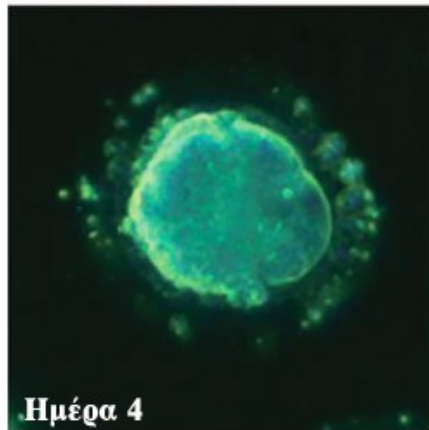
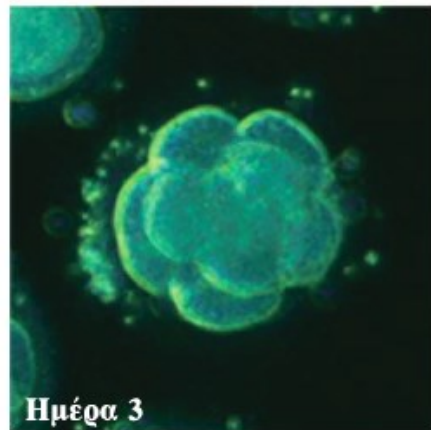
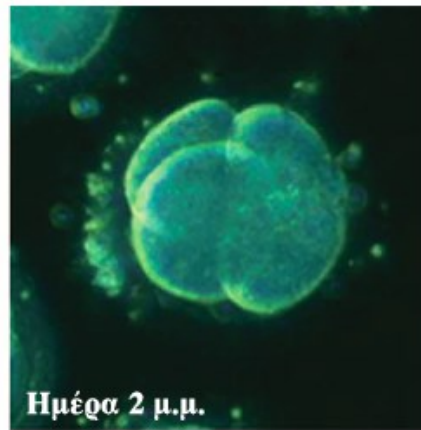
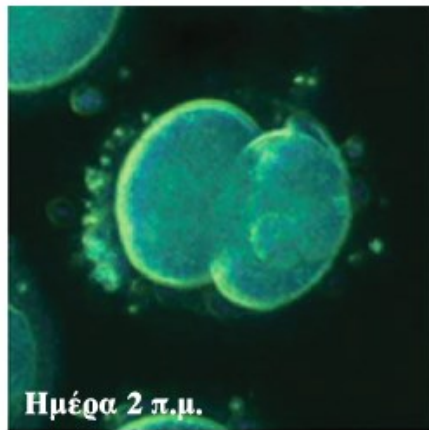
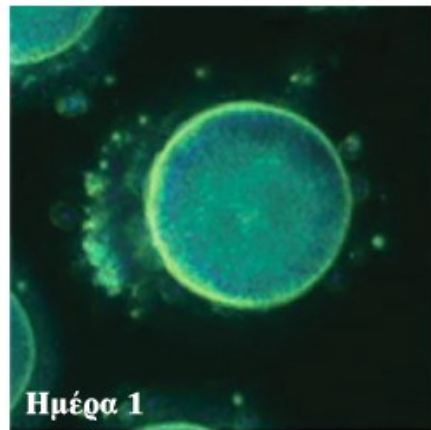
Τι είναι η αυλάκωση;

- Μια σειρά κυτταρικών διαιρέσεων έτσι το ζυγωτό μετατρέπεται σε μια πολυκύτταρη βλαστοκύστη. Τα κύτταρα κατά την αυλάκωση ονομάζονται βλαστομερίδια.
- Στις μιτωτικές αυτές διαιρέσεις δεν υπάρχουν οι φάσεις G1 και G2, αλλά εναλλαγή των M και S.
- Κατά την αυλάκωση δεν αυξάνεται το μέγεθος έτσι η βλαστοκύστη και το γονιμοποιημένο ωάριο έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος (100μm).



Αυλάκωση σε ένα ανθρώπινο έμβρυο

Τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπου

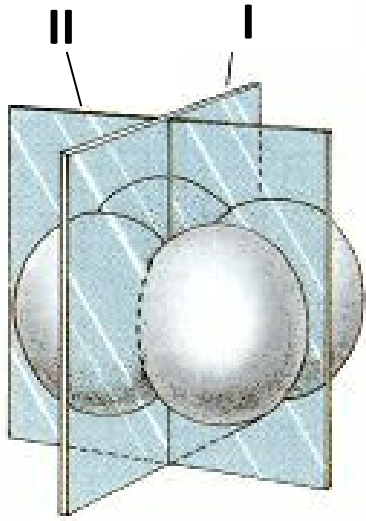


Γονιμοποιημένο ωάριο, στάδιο δύο κυττάρων, στάδιο τεσσάρων κυττάρων, στάδιο οκτώ κυττάρων, συμπαγές μορίδιο, βλαστοκύστη, εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη. Ευγενική παραχώρηση του Dr K. Loewke, Stanford University.

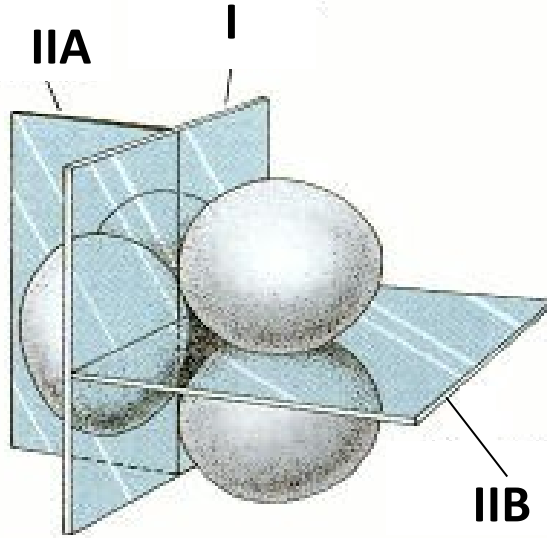
Χαρακτηριστικά της αυλάκωσης στα θηλαστικά

- Ο ρυθμός διαίρεσης είναι εξαιρετικά αργός (12-24h).
- Τα βλαστομερίδια αυλακώνονται ασύγχρονα. Έμβρυα θηλαστικών πολύ συχνά αποτελούνται από περιττό αριθμό κυττάρων.
- Το γονιδίωμα ενεργοποιείται στα αρχικά στάδια της αυλάκωσης (π.χ. στο ποντίκι στο στάδιο των 2 κυττάρων).
- Περιστροφική αυλάκωση (rotational cleavage), ο τρόπος αυτός είναι ασυνήθιστος.
- Εμφανίζεται στο στάδιο των 8 κυττάρων το φαινόμενο της πύκνωσης (compaction).

Περιστροφική αυλάκωση



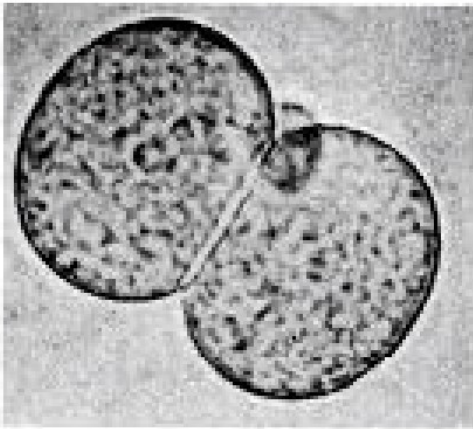
Α: Εχινόδερμα,
Αμφίβια



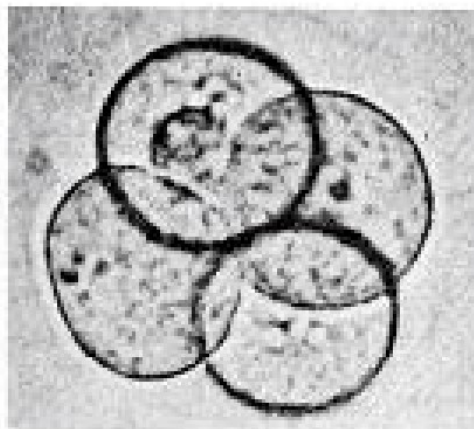
Β: Θηλαστικά

Πρώτο αυλακωτικό επίπεδο (I)
μεσημβρινό.

Δεύτερο αυλακωτικό επίπεδο
μεσημβρινό (IIA)
ισημερινό (IIB)
(90° περιστροφή)



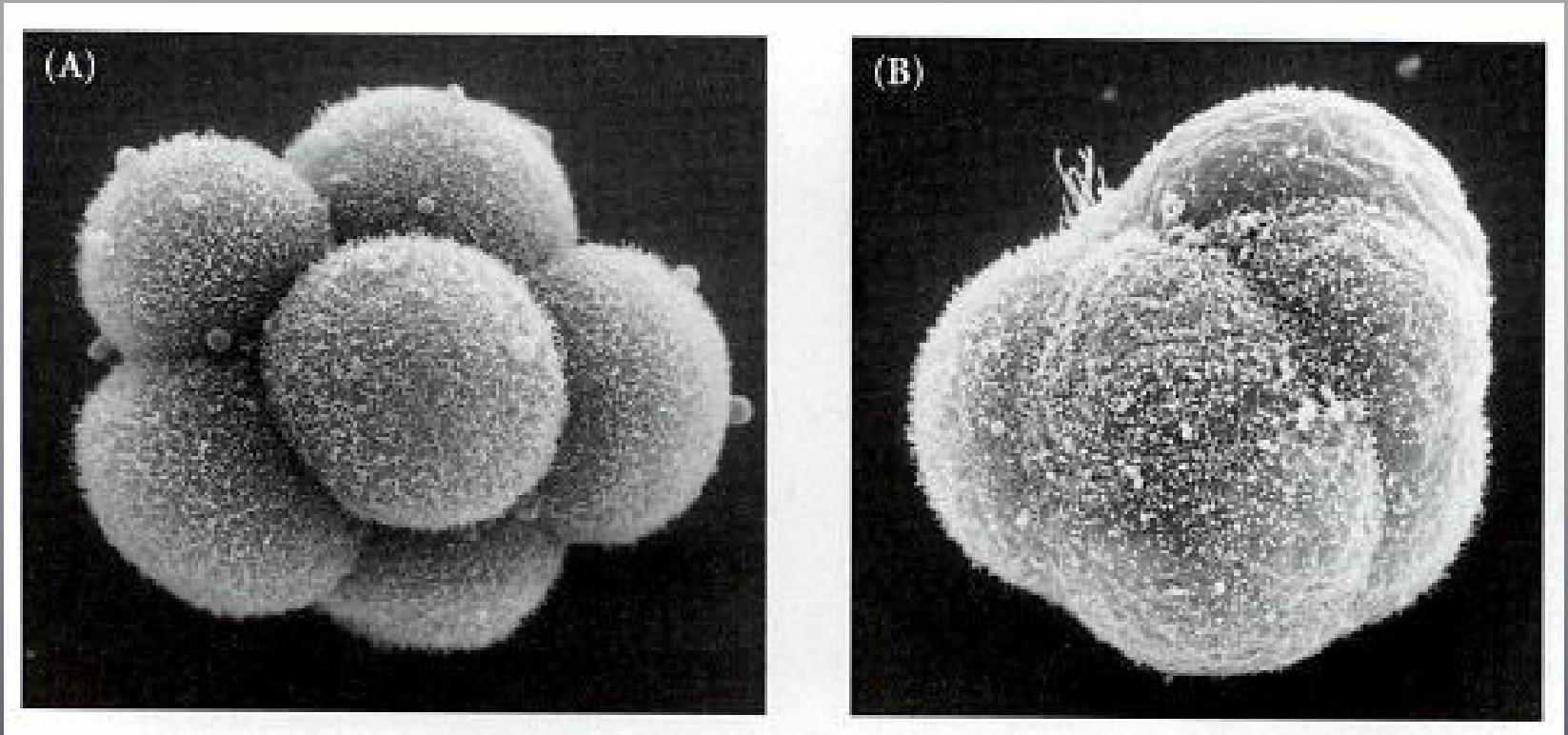
Στάδιο 2 κυτ.



Στάδιο 4 κυτ.

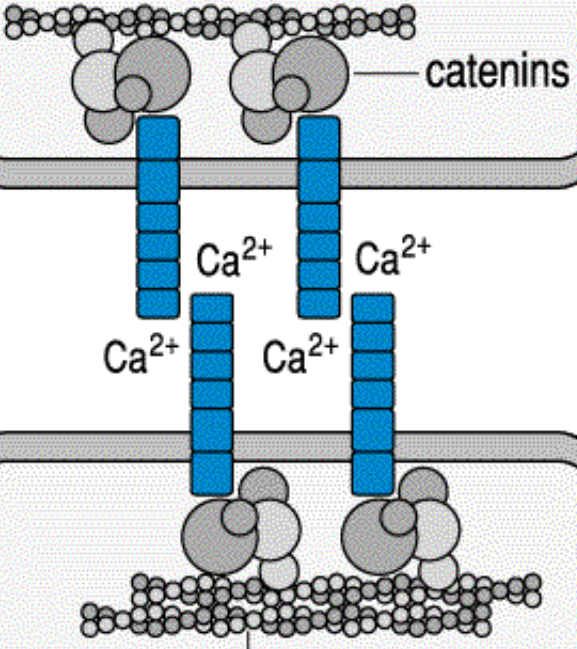
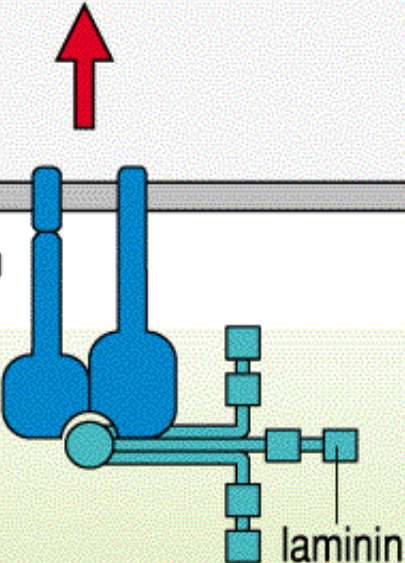
Οι δύο πρώτες διαιρέσεις σε ένα
έμβρυο ποντικού.

Σύμπτυξη



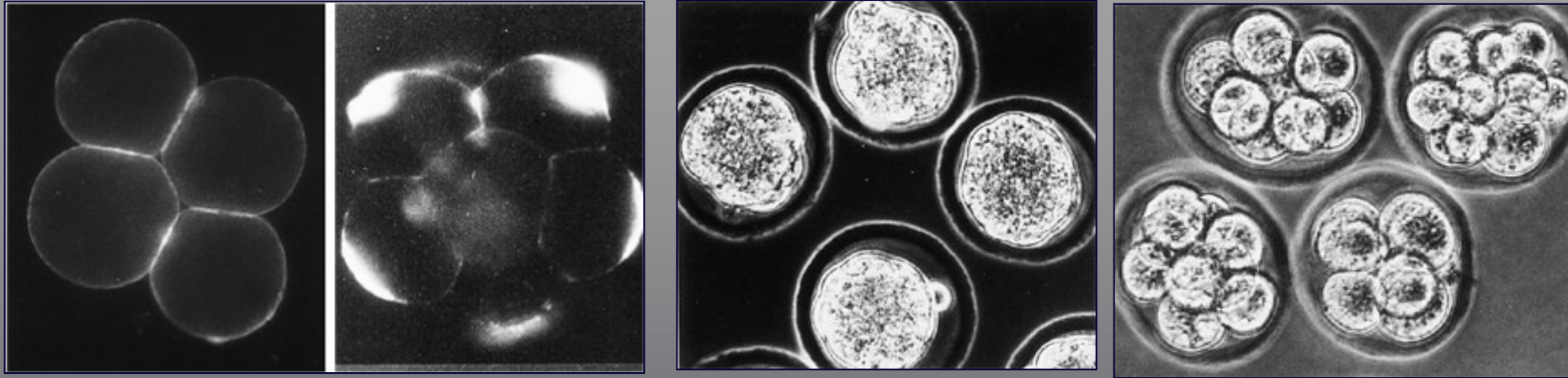
Μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων τα κύτταρα βρίσκονται σε ασθενή σύνδεση - φτιάχνοντας ένα χαλαρό συσσωμάτωμα (A). Μετά από την τρίτη κυτταρική διαίρεση όμως, τα κύτταρα σχηματίζουν μια συμπαγή δομή αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής τους (B). Μετά την σύμπτυξη τα κύτταρα φέρουν στην εξωτερική επιφάνεια μικρολάχνες ενώ η εσωτερική τους επιφάνεια είναι λεία.

Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)

Cell-cell adhesion		Cell-matrix adhesion
Calcium-dependent adhesion	Calcium-independent adhesion	
Cadherin  catenins Ca^{2+} Ca^{2+} actin bundles	Immunoglobulin superfamily  Immunoglobulin superfamily e.g. N-CAM	 Integrin laminin extracellular matrix

Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπτυξη;

➤ Μεταβολές στον εντοπισμό μορίων στην κυτταρική μεμβράνη- πόλωση (polarization)



1: Πόλωση μεμβρανικών συστατικών σε βλαστομερίδια ποντικού (Α) Ομοιογενής κατανομή- σήμανση με φθορίζουσα κονκαβαλίνη Α, στο στάδιο των 4 κυτ. (Β) Ετερογενής πολωμένη κατανομή στο στάδιο των 8 κυτ.

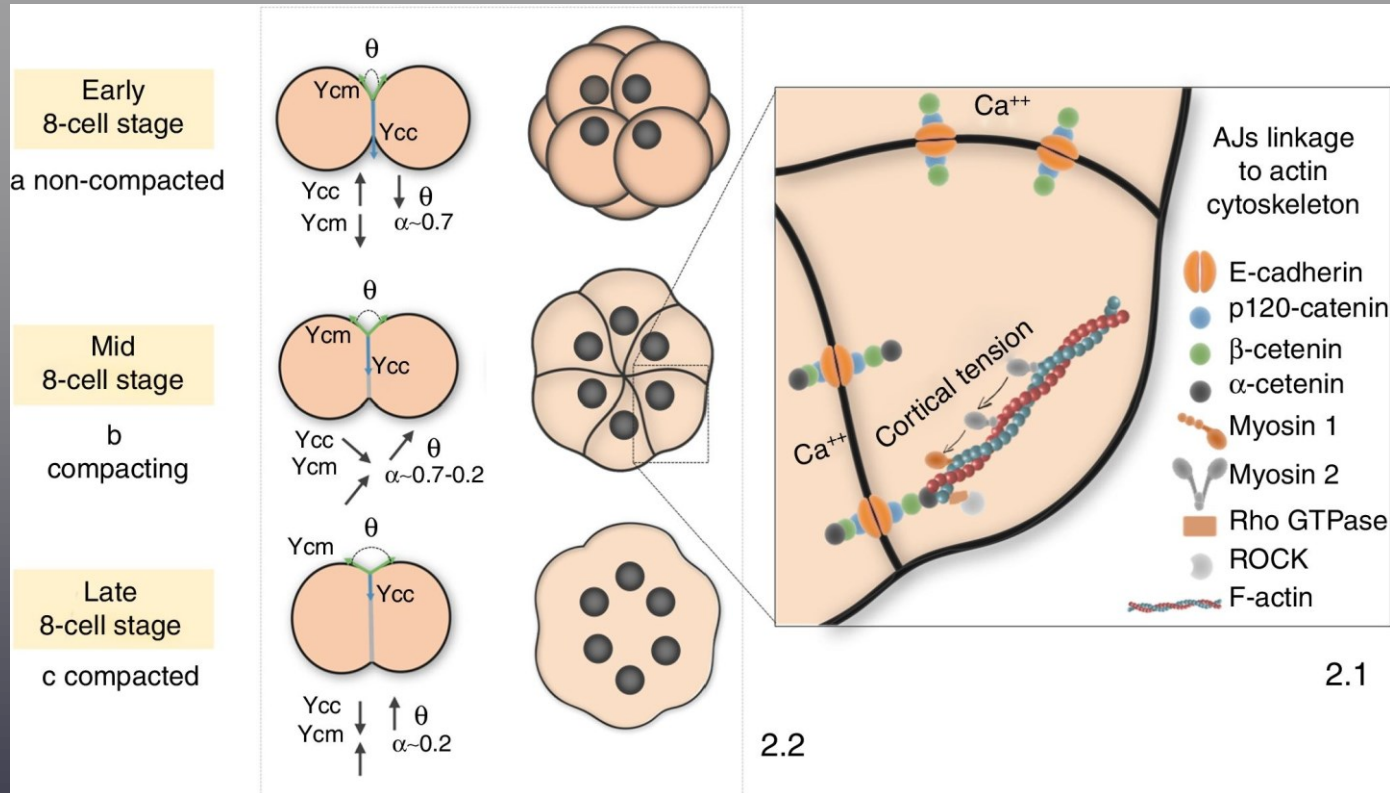
2: Αναστολή της πύκνωσης με τη χρήση αντιορού έναντι της καδερίνης Ε. (Α) Φυσιολογική πύκνωση απουσία αντιορού. (Β) Πολλαπλασιασμός των κυττάρων χωρίς όμως πύκνωση παρουσία αντισωμάτων έναντι της καντερίνης Ε.

➤ Μεταβολές στον κυτταροσκελετό π.χ. σχηματισμός μικρολαχνών

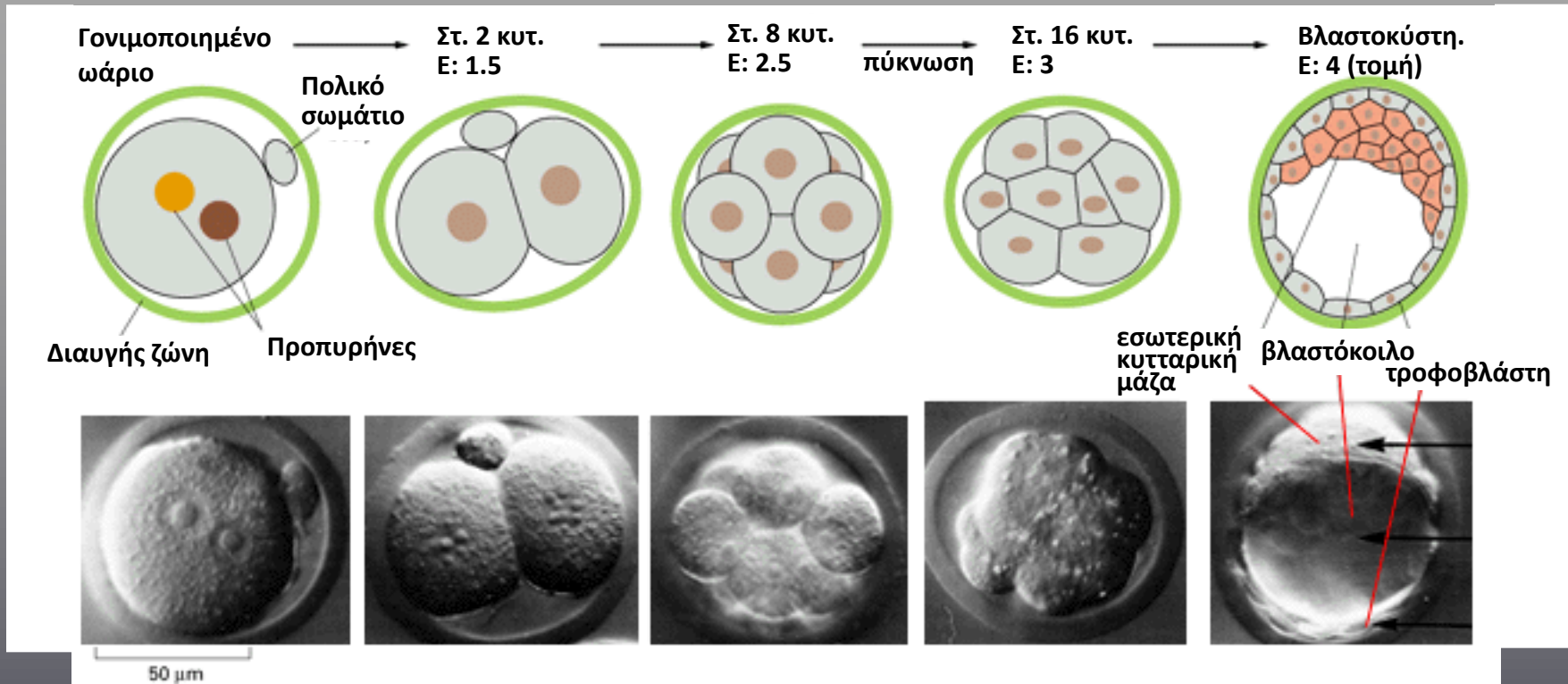
➤ Μόρια κυτταρικής συνάφειας π.χ. καδερίνη Ε.

➤ Ενεργοποίηση του μονοπατιού της φωφαιδυλοϊνοσιτόλης. Ουσίες που ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C προκαλούν πρόωρη πύκνωση σε έμβρυα που βρίσκονται στο στάδιο των 4 κυττάρων.

Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπληξη;



Σχηματισμός μοριδίου και βλαστοκύστης



➤ **Μορίδιο (morula)**- 16 κύτταρα (αποτελείται από 1-2 εσωτερικά που περιβάλλονται από τα υπόλοιπα).

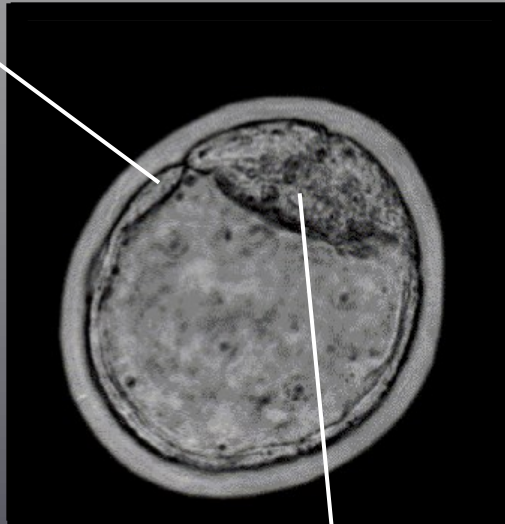
➤ **Βλαστοκύστη (blastocyst)** 32 κύτταρα σε δύο ομάδες : την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass) και την τροφοβλάστη (tropho-blast) που την περιβάλλει, και αντλεί υγρό έτσι ώστε να σχηματιστεί μια κοιλότητα (βλαστόκοιλο-blastocoel) στο εσωτερικό. Η αυλάκωση ολοκληρώνεται με μια ακόμη διαίρεση και ακολουθεί η εμφύτευση της βλαστοκύστης στη μήτρα.

Ο διαχωρισμός των δύο κυτταρικών πληθυσμών της βλαστοκύστης αποτελεί σημαντικό διαφοροποιητικό γεγονός στην ανάπτυξη των θηλαστικών.

1. Τροφοβλάστη



χόριο :



α. Θρέψη

β. Παραγωγή ορμονών

γ. Παραγωγή ουσιών που αναστέλλουν την απόρριψη του εμβρύου από τη μητέρα.

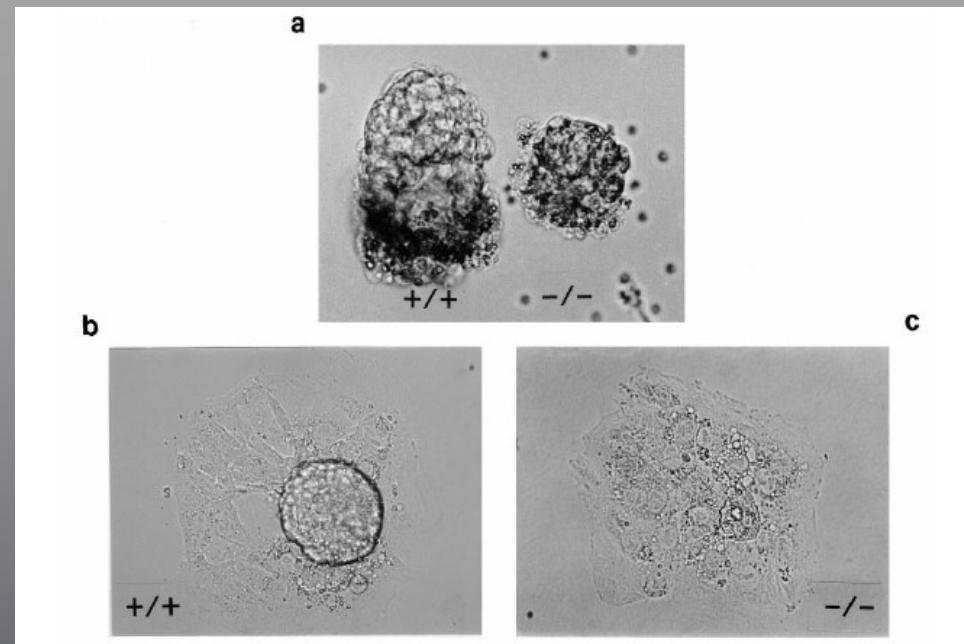
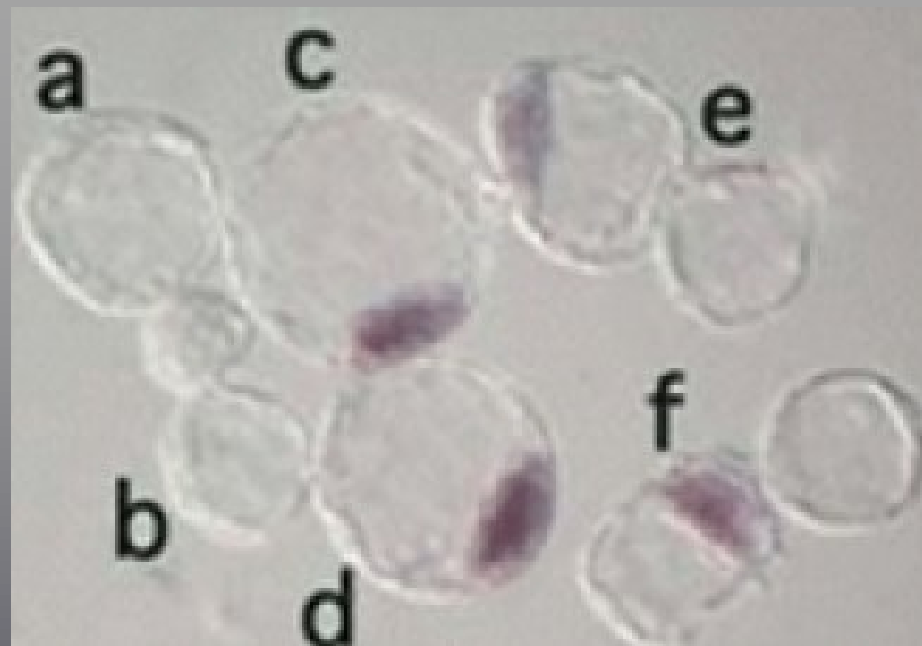
2. Εσωτερική κυτταρική μάζα



έμβρυο (τελικά το ζώο)
εξωεμβρυϊκές δομές

Από το στάδιο των 64 κυττάρων και μετά, οι δύο στιβάδες ΔΕΝ συνεισφέρουν πια κανένα κύτταρο η μια στην άλλη.

Oct-4



➤ Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 εκφράζεται στην ΕΚΜ και στη γεννητική ακρολοφία.

➤ Είναι γνωστοί κάποιοι στόχοι του, καθώς και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτόν.

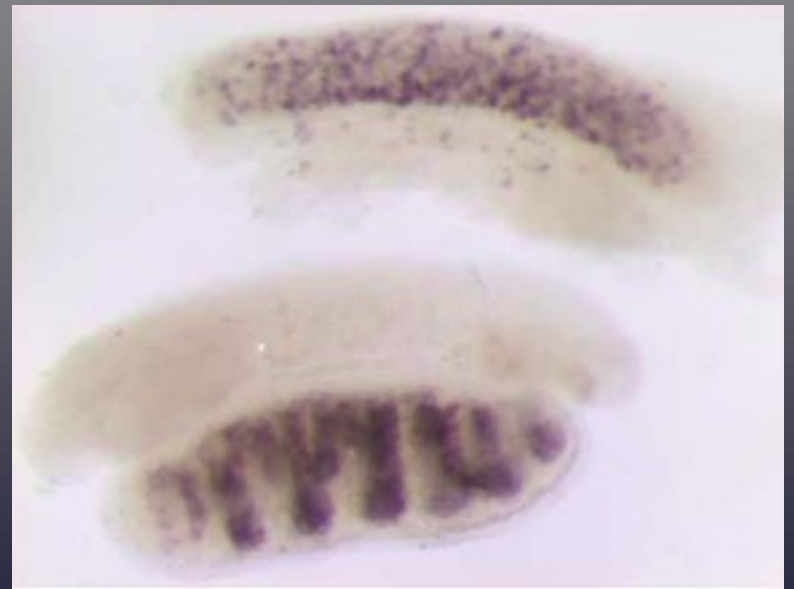
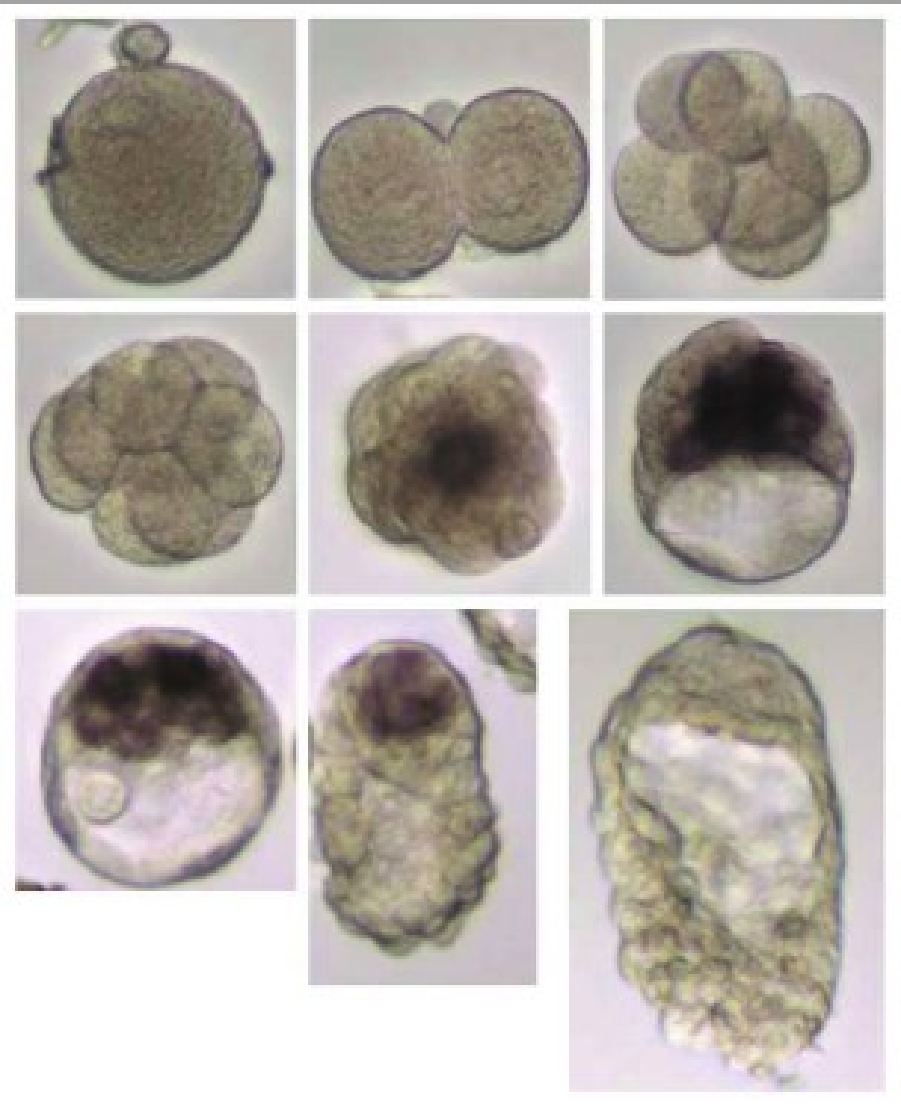
➤ Εμβρυα από τα οποία απουσιάζει η Oct-4 πεθαίνουν Ε 5.

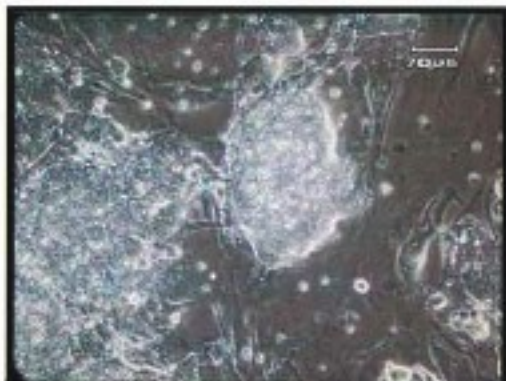
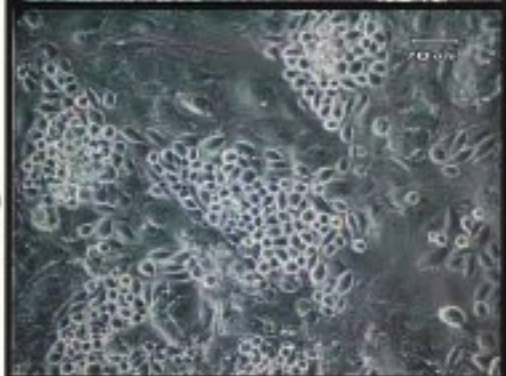
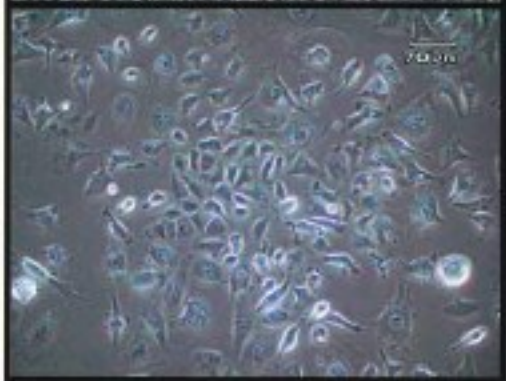
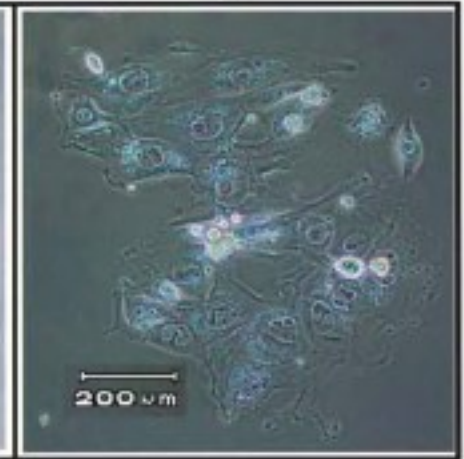
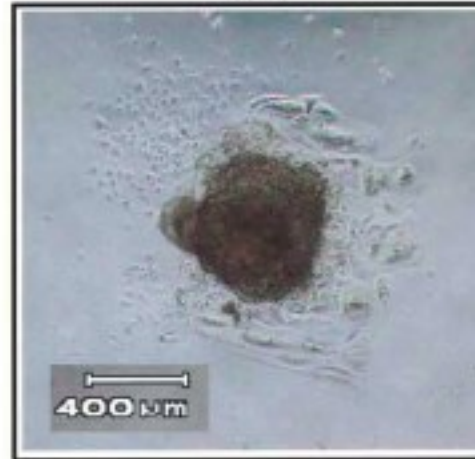
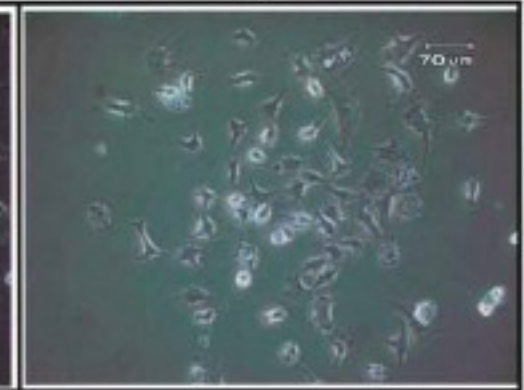
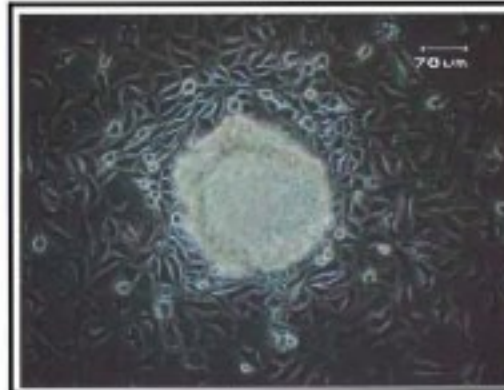
➤ Αλλαγές στα επίπεδα του Oct-4 έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των κυττάρων της ΕΚΜ.

Nanog

➤ Μεταγραφικός παράγοντας που φέρει ομοιοεπικράτεια.

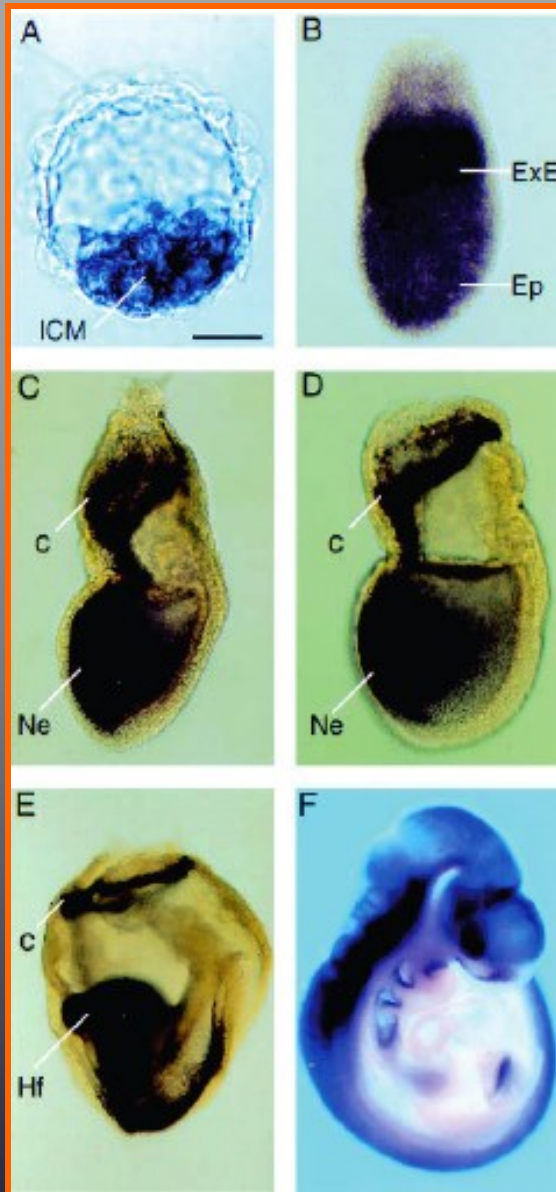
➤ Η έκφραση της nanog περιορίζεται σε ΕΚΜ και εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα (embryonic germ cells).



A**WT****KO****(STO+)****KO****(STO-)****nanog****C****+/+****-/-****blastocysts****D****+/+****-/-****ICM**

➤ Knock-out : Βλαστοκύστες ή ICM αποδιοργανώνονται - τα έμβρυα πεθαίνουν E 4- E 5. Τα κύτταρα της EKM διαφοροποιούνται πρόωρα - πρωτογενές ενδόδεμα.

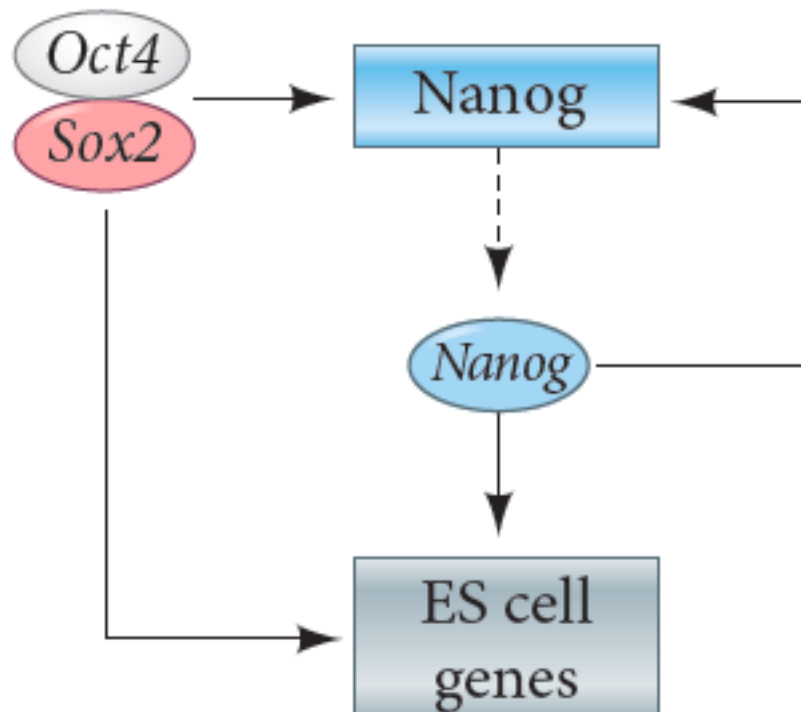
Sox-2



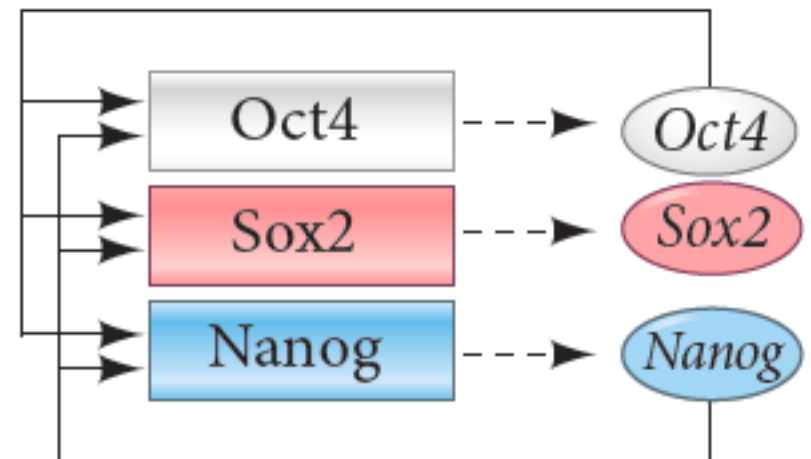
- Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας SRY (φέρει HMG box)
- Εκφράζεται στην ΕΚΜ (όχι αποκλειστικά)
- Εκφράζεται και στο ΝΣ
- Αλληλεπιδρά με τον Oct4.
- Στα ΚΟ τα έμβρυα πεθαίνουν κατά την E6.5
- Επειδή εκφράζεται και στα ωκύτταρα πιθανόν το μητρικό προϊόν επιτρέπει την επιβίωση ως την E 6.5.
- Παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας.

Παράγοντες πολυδυναμίας

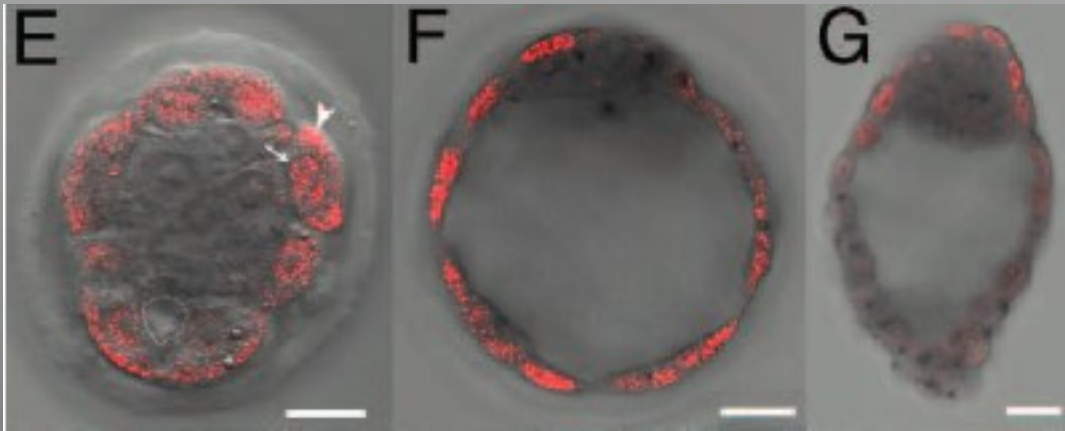
(A)



(B)



Το γονίδιο Cdx2



➤ Ομόλογο του caudal

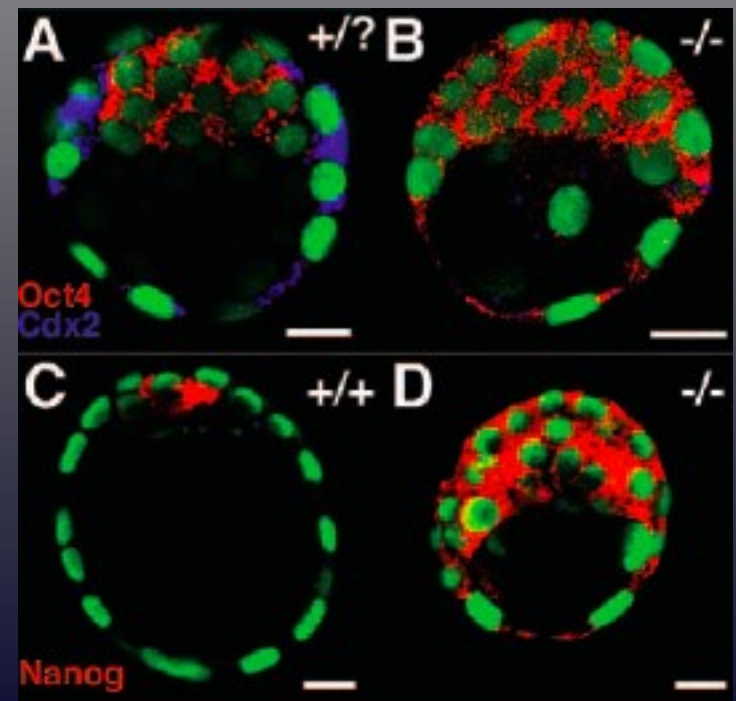
➤ Φέρει ομοιοεπικράτεια

➤ Εκφράζεται στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος (ΤΕ)

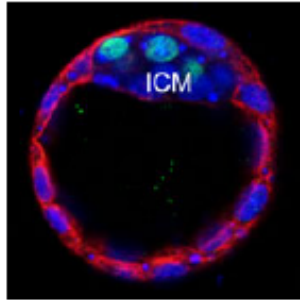
➤ Καταστέλλει την έκφραση των Oct4 και nanog στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος.

➤ Ο Oct4 καταστέλλει την έκφραση του cdx2 στην ΕΚΜ.

➤ Οι Oct4 και cdx2 ρυθμίζουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα eomesodermin που ενέχεται στη διαφοροποίηση του ΤΕ.



Το γονίδιο Cdx2



Mice develop without maternal Cdx2

Maternal genes, which are transcribed in the female germline during oogenesis, play variable roles in embryonic patterning. In frog embryos, for example, differentially localised maternal factors regulate early cell

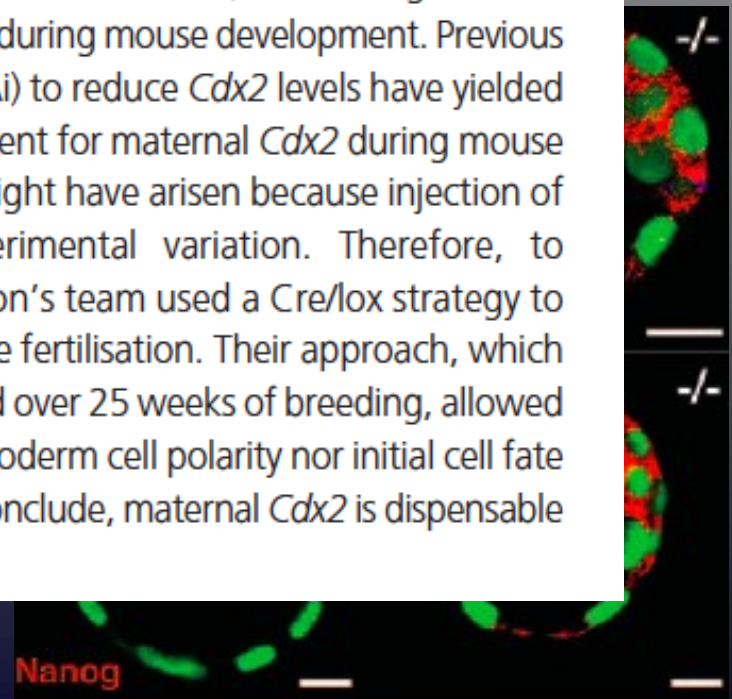
fate decisions. By contrast, the contribution of maternal factors to mammalian embryo patterning remains controversial. On p. 3969, Amy Ralston and co-workers re-examine the requirement for maternal *Cdx2* (the orthologue of the *Drosophila* maternal-effect gene *caudal*) during mouse development. Previous studies that used RNA interference (RNAi) to reduce *Cdx2* levels have yielded contradictory results about the requirement for maternal *Cdx2* during mouse development. This lack of agreement might have arisen because injection of RNAi constructs can introduce experimental variation. Therefore, to unambiguously resolve this issue, Ralston's team used a Cre/lox strategy to genetically ablate *Cdx2* in oocytes before fertilisation. Their approach, which involved three generations of crosses and over 25 weeks of breeding, allowed them to determine that neither trophectoderm cell polarity nor initial cell fate depends on maternal *Cdx2*. Thus, they conclude, maternal *Cdx2* is dispensable for mouse development.

➤ Καταστέλλει την έκφραση του Oct4 στα κύτταρα του τροφωτικού ενδοδερμίου (TE).

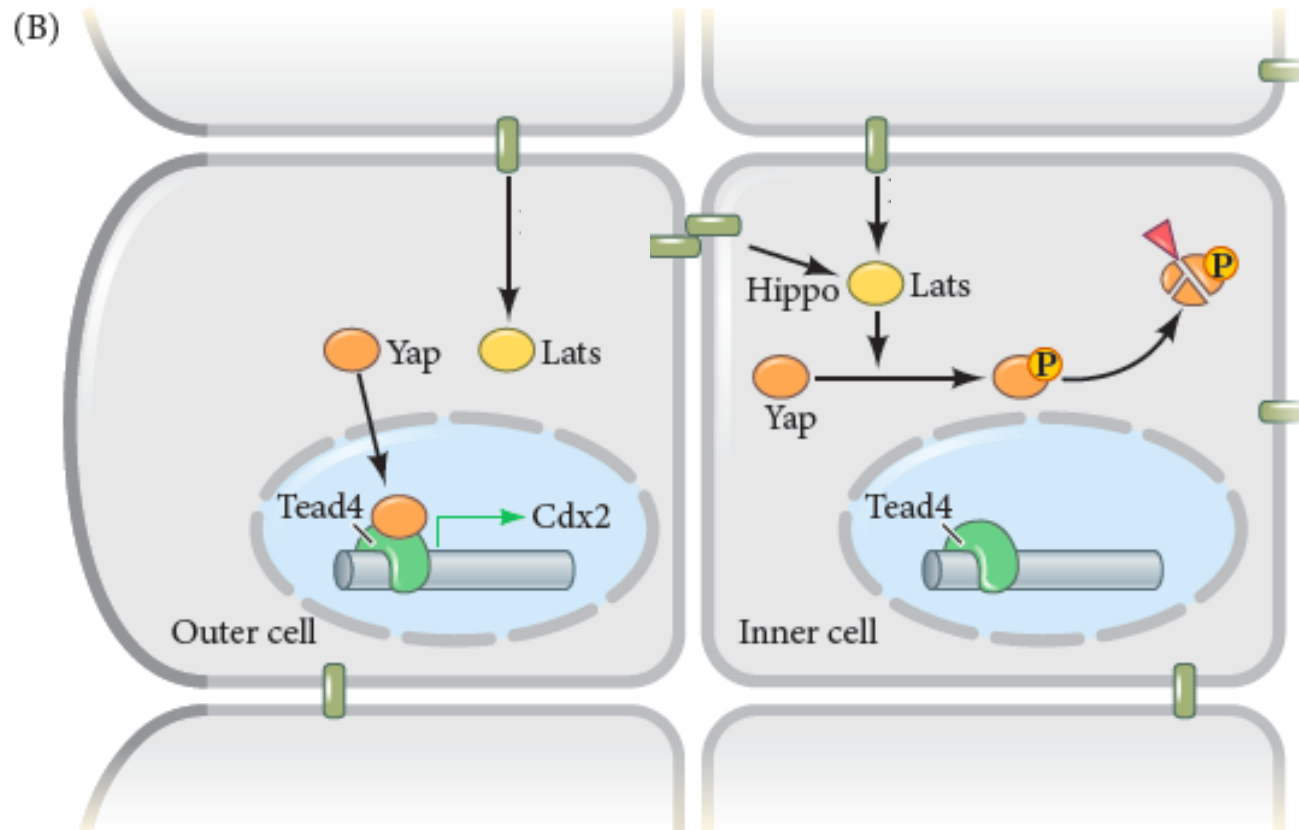
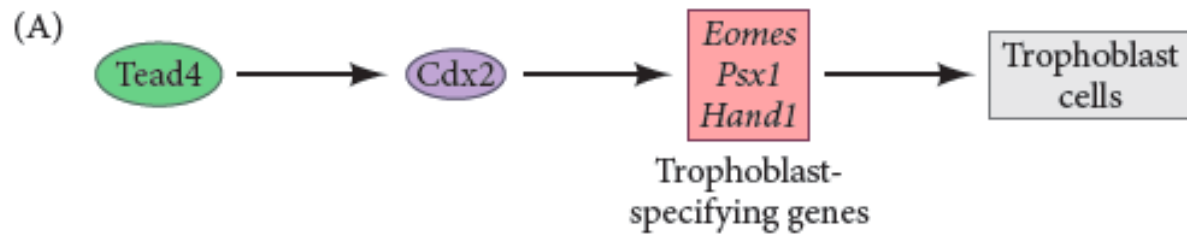
➤ Ο Oct4 καταστέλλει την έκφραση του Cdx2 στο EKM.

➤ Οι Oct4 και *cdx2* αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργούν στη διαφοροποίηση του TE.

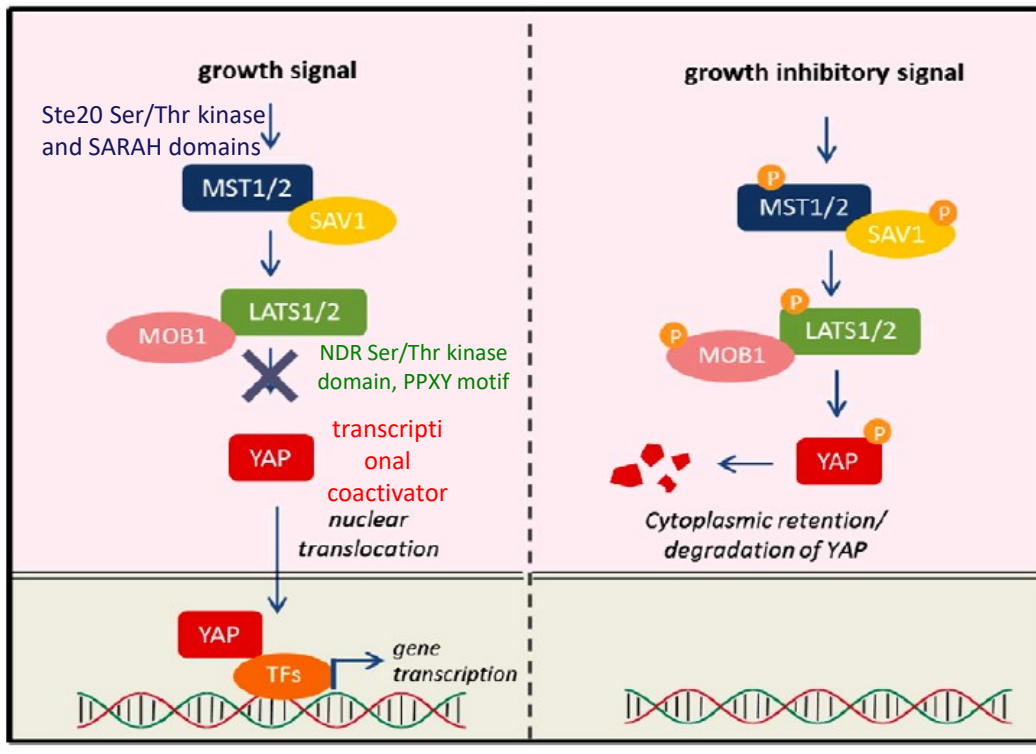
δα του



Τι επάγει το Cdx2;

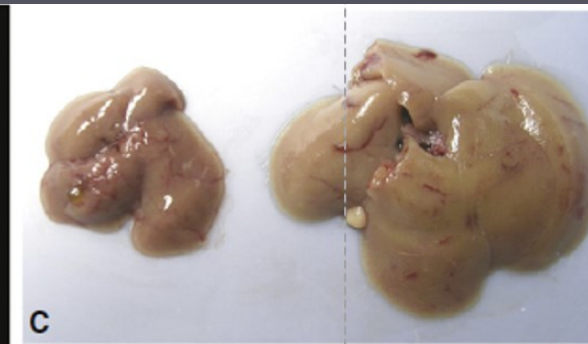
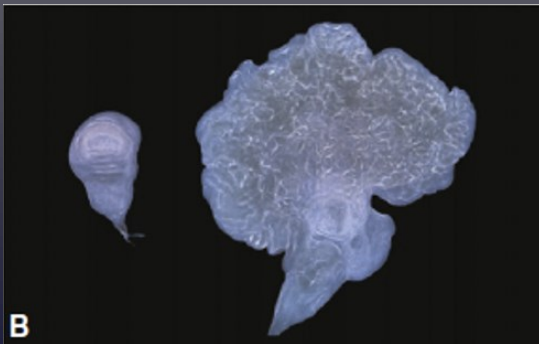


Το μονοπάτι Hippo (θηλαστικά)



- Το μονοπάτι Hippo χαρακτηρίστηκε αρχικά από το ρόλο του στην αύξηση.
- Συντηρημένο μεταξύ των ειδών από το *Drosophila melanogaster* μέχρι τον άνθρωπο

Υπερέκφραση YAP

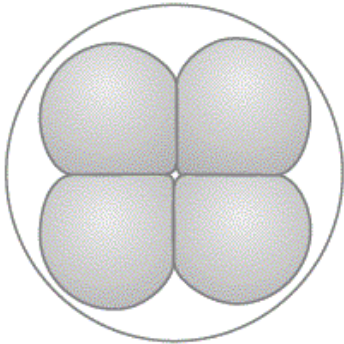


- Αριστερα – *D. melanogaster* δίσκος ενήλικου
- Δεξιά- ποντικός ήπαρ

Τι καθορίζει αν ένα κύτταρο θα ανήκει στην τροφοβλάστη ή την εσωτερική κυτταρική μάζα;

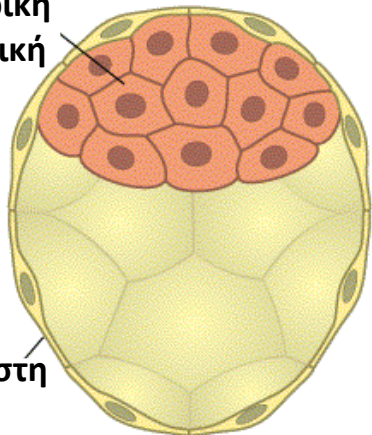
Φυσιολογικό έμβryo

Έμβryo 4 κυτ.

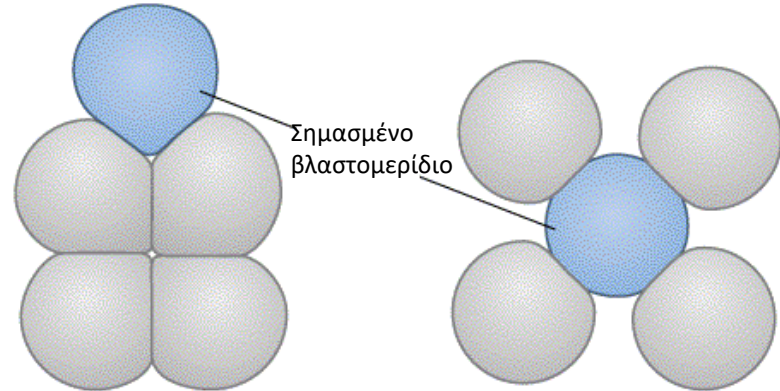


Εσωτερική
Κυτταρική
μάζα.

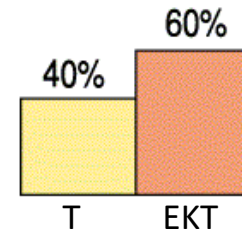
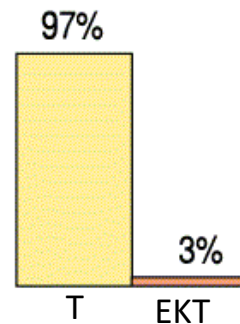
Τροφοβλάστη



Έμβρυα στα οποία μεταμοσχεύεται ένα βλαστομερίδιο.

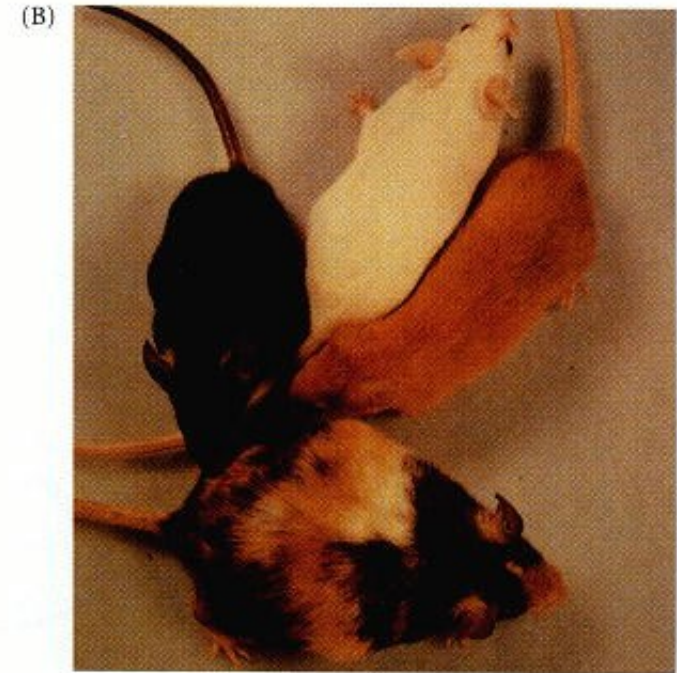
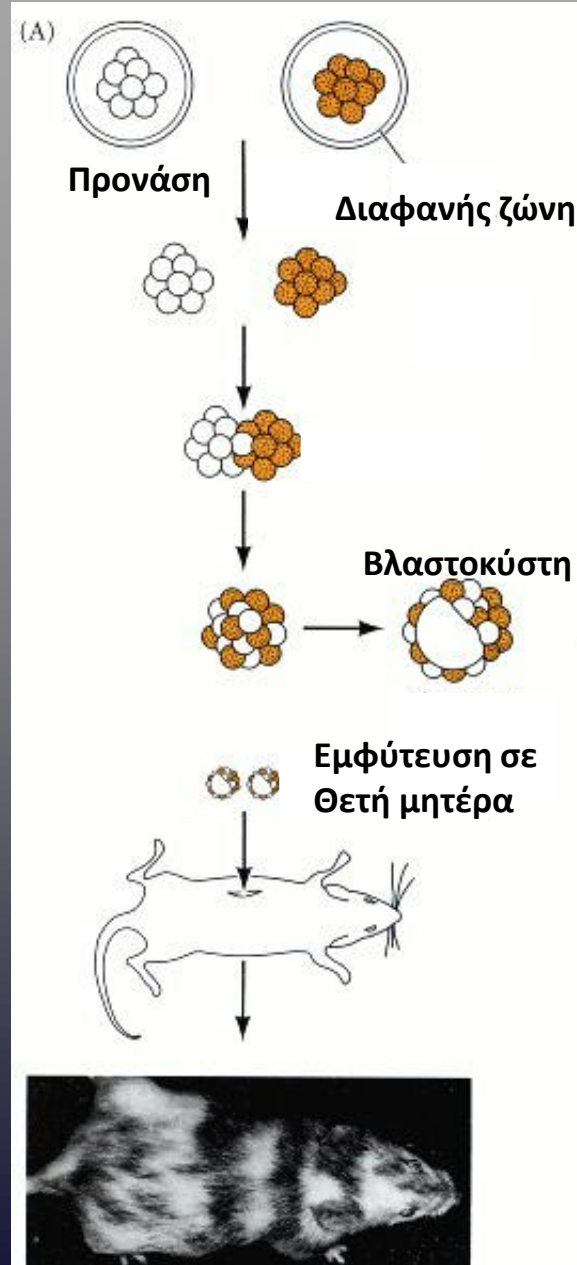


Η τύχη (fate) των σημεισμένων κυττάρων



Η θέση του στο έμβryo μετά τη σύμπτυξη.

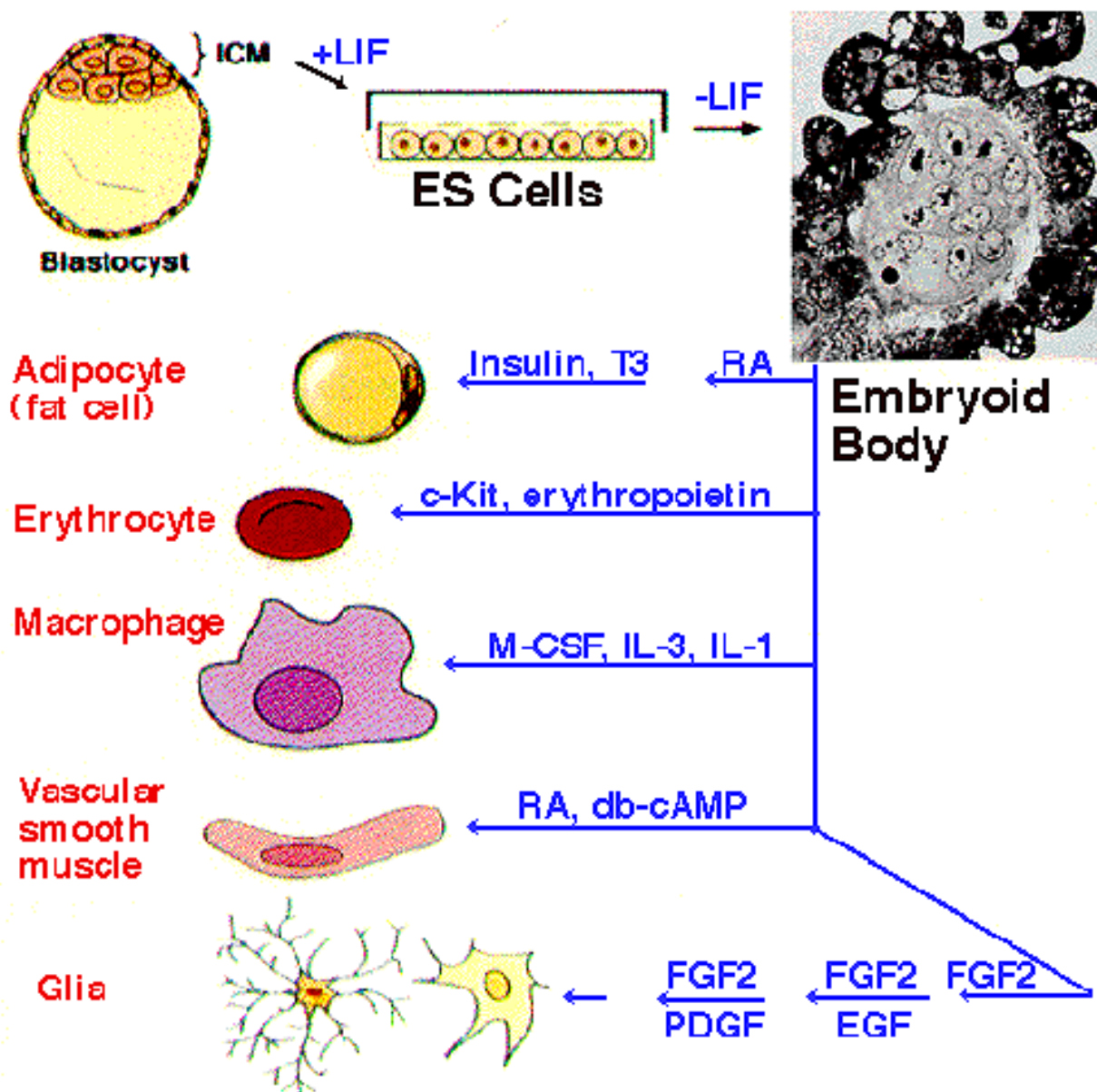
Πόσα κύτταρα σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα;



Ένα χιμαιρικό ποντίκι που έχει προέλθει από σύντηξη τριών εμβρύων με διαφορετικό χρώμα τριχώματος. Φαίνονται και οι απόγονοί του απόδειξη ότι κύτταρα και από τα τρία έμβρυα έδωσαν κύτταρα της γαμετικής σειράς.

Πειράματα με χιμαιρικά έμβρυα έδειξαν ότι η εσωτερική κυτταρική μάζα προκύπτει από τους απογόνους τριών από τα οκτώ κύτταρα του εμβρύου.

Διαφοροποίηση των ES *in vitro*

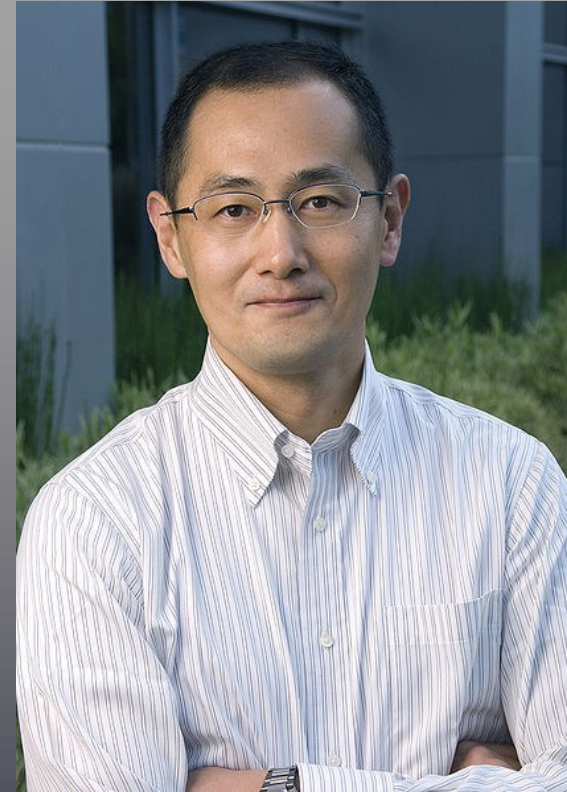


2012 Nobel Prize in Medicine



J. Gurdon

Department of Zoology, University of Cambridge



S. Yamanaka

Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco

"revolutionized our understanding of how cells and organisms develop"

Τα βλαστοκύτταρα στη θεραπεία ασθενειών

The Washington Post

FDA OKs 1st Embryonic Stem Cell Trial

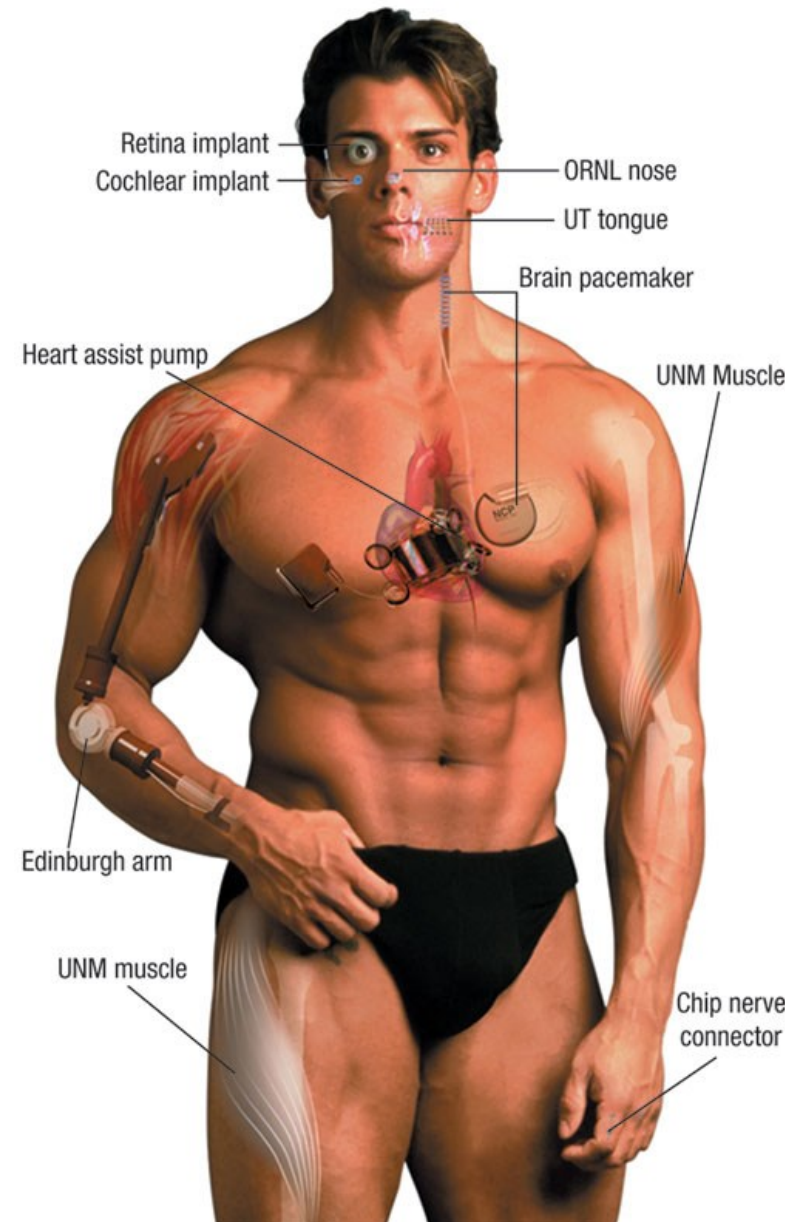
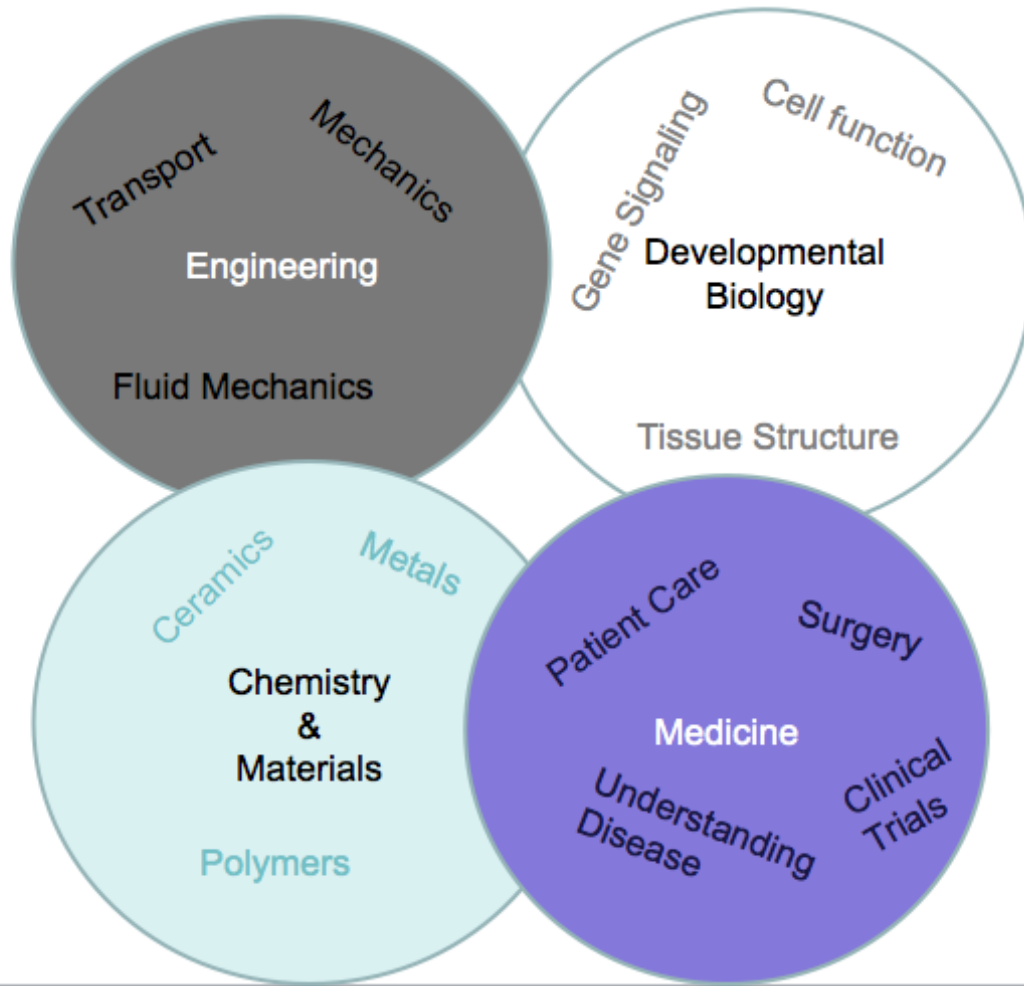
By Steven Reinberg

HealthDay Reporter

Friday, January 23, 2009; 12:00 AM

FRIDAY, Jan. 23 (HealthDay News) -- The first human trial using embryonic stem cells as a medical treatment has been approved by the U.S. Food and Drug Administration.

Αναγέννηση: Μηχανική Ιστών



**Περισσότερα για τα βλαστοκύτταρα και την
αναγέννηση στο μάθημα
«Βιολογία βλαστοκυττάρων και
αναγέννησης» !**

Box 2. A history of ART

1785. Conception by artificial insemination in dogs by Lazzaro Spallanzani (University of Pavia, Italy) (Spallanzani, 1785).

1900s. Artificial insemination techniques for use in horses, cattle and sheep developed by Ilya Ivanov (State Veterinary Institute, Russia).

1940s. Techniques to freeze and store animal spermatozoa developed by Chris Polge (University of Cambridge, UK).

1934. IVF of rabbit oocytes followed by transfer into the fallopian tubes by George Pincus and Ernst Enzmann (Harvard University, USA).

1954. First characterization of human pre-implantation embryos (at the 2-cell and later stages) by Arthur Hertig and John Rock (Free Hospital for Women in Brookline, USA).

1957. Development of superovulation in mice using gonadotrophins by Robert Edwards and Ruth Fowler (University of Cambridge, UK).

1959. In vitro fertilized rabbit oocytes capable of proceeding to live birth were demonstrated by Min Chueh Chang (Worcester Foundation, USA).

1969. Early stages of IVF of human eggs by Robert Edwards and colleagues (University of Cambridge, UK).

1970. Successful culture of human cleavage stage embryos by Robert Edwards and colleagues (University of Cambridge, UK).

1972. Cryopreservation techniques for the long-term storage of pre-implantation mammalian embryos by David Whittingham (Oak Ridge National Laboratory, USA).

1978. Birth of the first child conceived via IVF reported by Robert Edwards and Patrick Steptoe (Oldham General Hospital and Bourn Hall Clinic).

1992. Development and successful use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to assist with infertility by Gianpiero Palermo, Paul Devroey and Andre Van Steirteghem (Vrije Universiteit Brussel, Belgium).

1998. Development of serum-free culture methods for human blastocysts in vitro by David Gardner and colleagues (University of Oxford, UK).

Assisted Reproduction Techniques

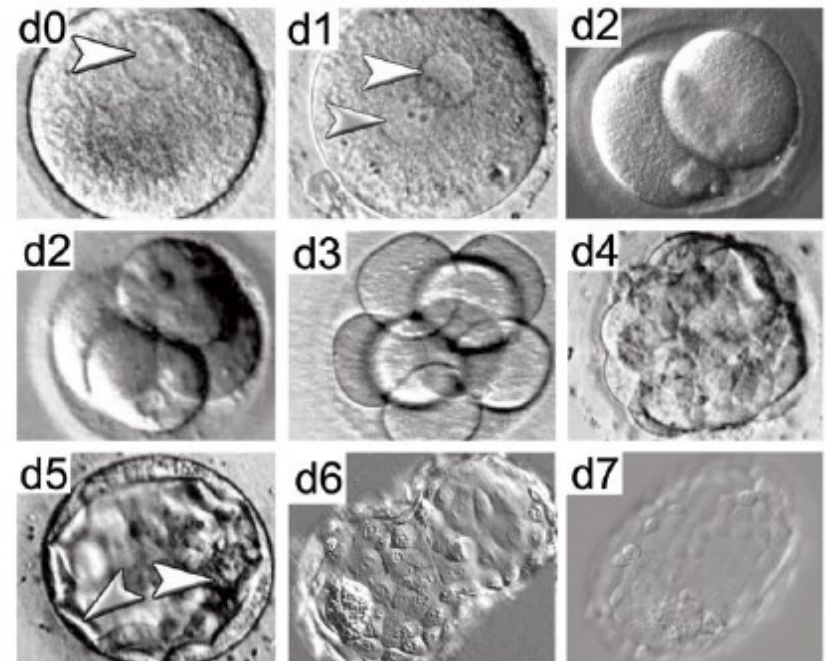
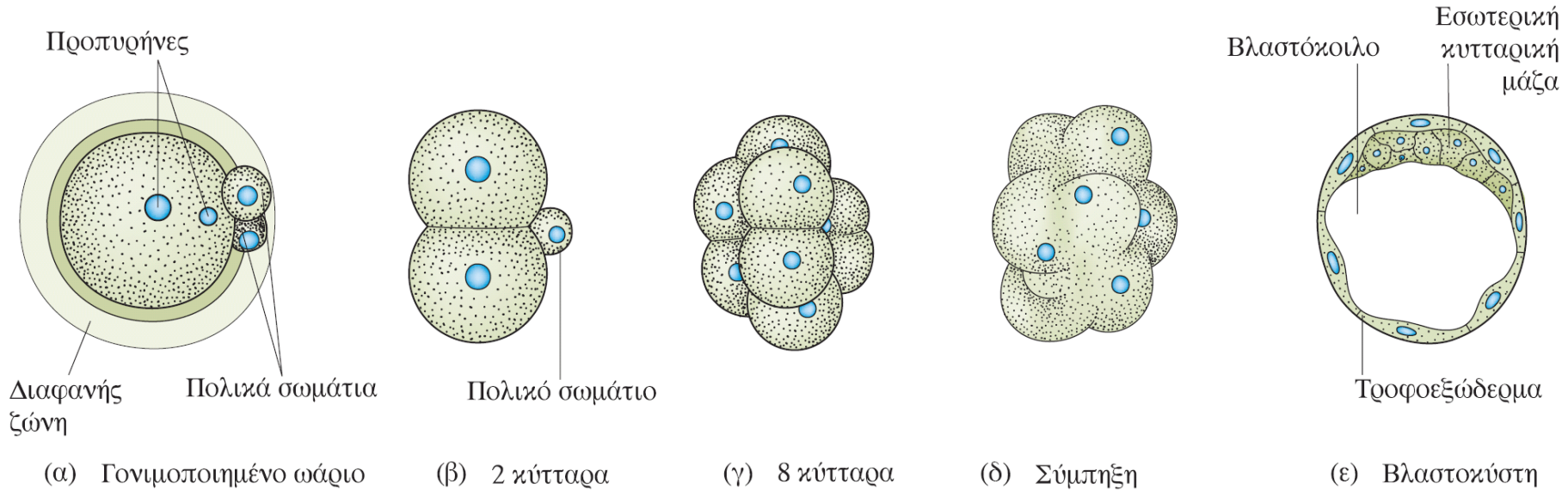


Fig. 1. Stages of human pre-implantation embryo development. Phase-contrast images of human embryo development from day (d) 0 to day 7. Following fertilization, embryos undergo a series of mitotic cell divisions. Arrowheads in d0 and d1 indicate pronuclei. On or around day 4, the embryo compacts, resulting in the formation of a morula that consists of cells (or blastomeres) in a compact cluster contained within the zona pellucida (the glycoprotein layer that surrounds the embryo). The blastocyst, which forms on day 5, is a fluid-filled structure composed of an inner cell mass (white arrowhead) and trophectoderm (gray arrowhead). On day 6, the blastocyst 'hatches' from the zona pellucida and it is ready to implant into the uterine wall on day 7.

Πρώιμη ανάπτυξη



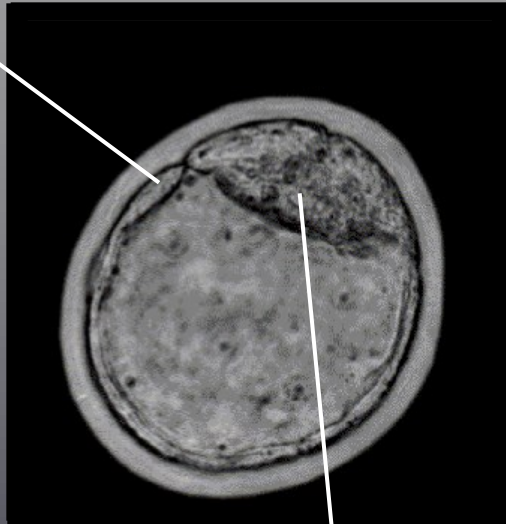
Προεμφυτευτική ανάπτυξη. Στα στάδια (β) έως (ε) έχει παραλειφθεί η διαφανής ζώνη.



Δανάη
G. Klimt
1907

Ο διαχωρισμός των δύο κυτταρικών πληθυσμών της βλαστοκύστης αποτελεί σημαντικό διαφοροποιητικό γεγονός στην ανάπτυξη των θηλαστικών.

Τροφοβλάστη → χόριο :

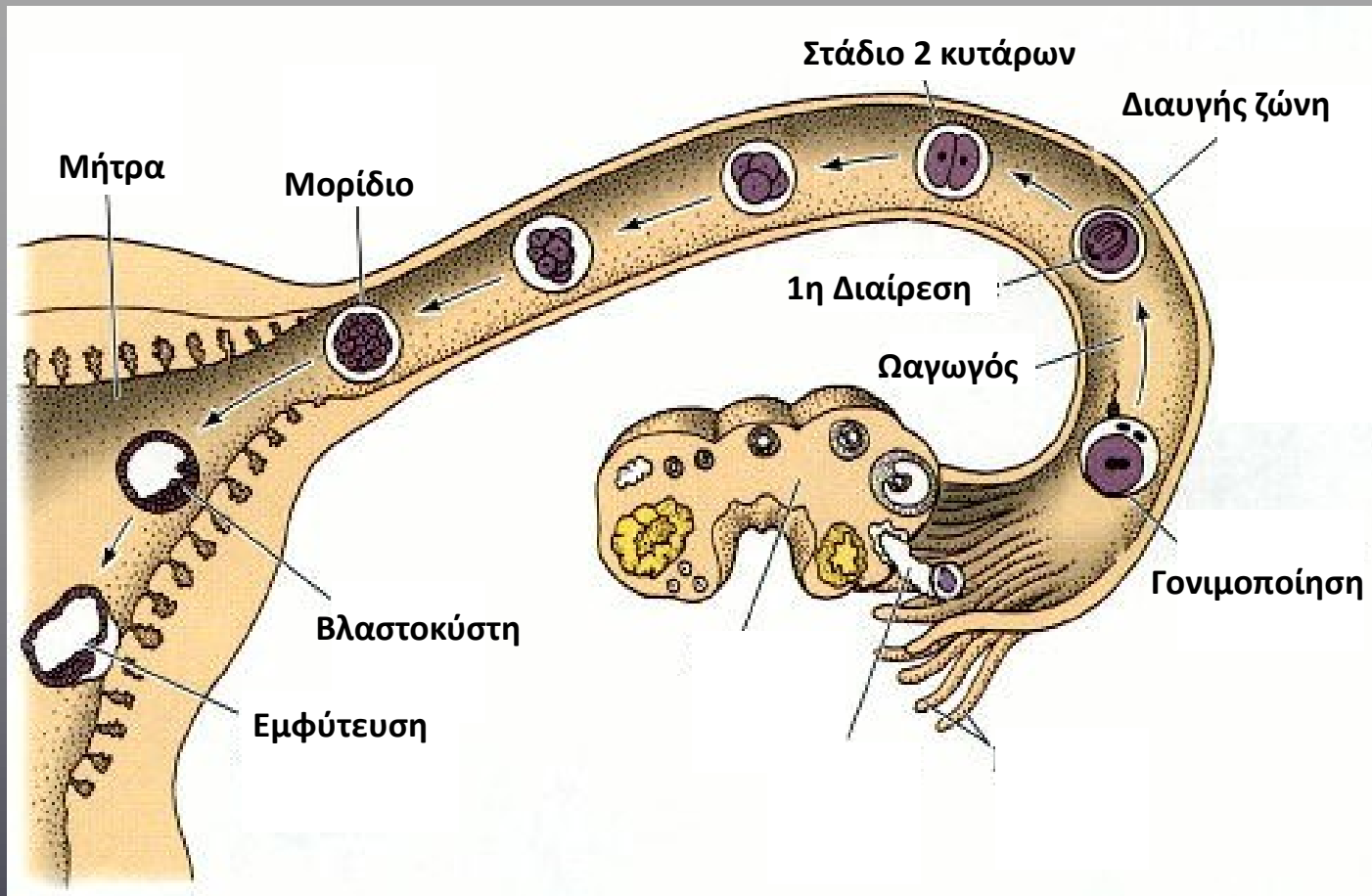


- α. Θρέψη
- β. Παραγωγή ορμονών
- γ. Παραγωγή ουσιών που αναστέλλουν την απόρριψη του εμβρύου από τη μητέρα.

Εσωτερική κυτταρική μάζα → έμβρυο (τελικά το ζώο)
εξωεμβρυϊκές δομές

Από το στάδιο των 64 κυττάρων και μετά, οι δύο στιβάδες ΔΕΝ συνεισφέρουν πια κανένα κύτταρο η μια στην άλλη.

Γονιμοποίηση - Αυλάκωση

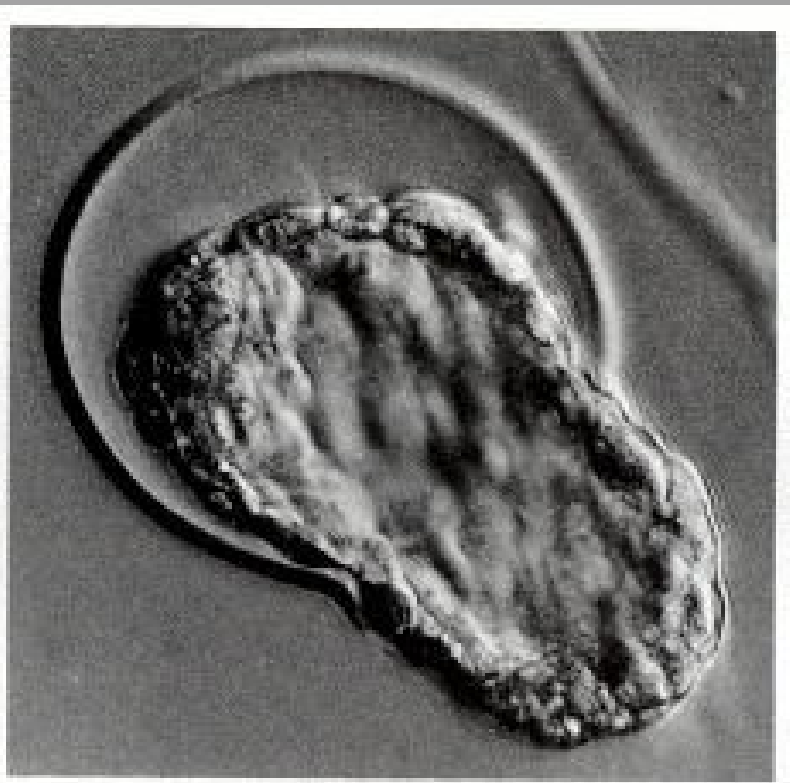


Το ωάριο απελευθερώνεται από την ωοθήκη στον ωαγωγό (σάλπιγγα). Η γονιμοποίηση γίνεται στον ωαγωγό, κοντά στη ωοθήκη. Ολοκληρώνεται η μείωση και η αυλάκωση αρχίζει περίπου 24 ώρες μετά, καθώς το έμβρυο ωθείται από τις βλεφαρίδες του ωαγωγού προς τη μήτρα .

Recording of Pre-Implantation Mous



Έξοδος από τη διαφανή ζώνη



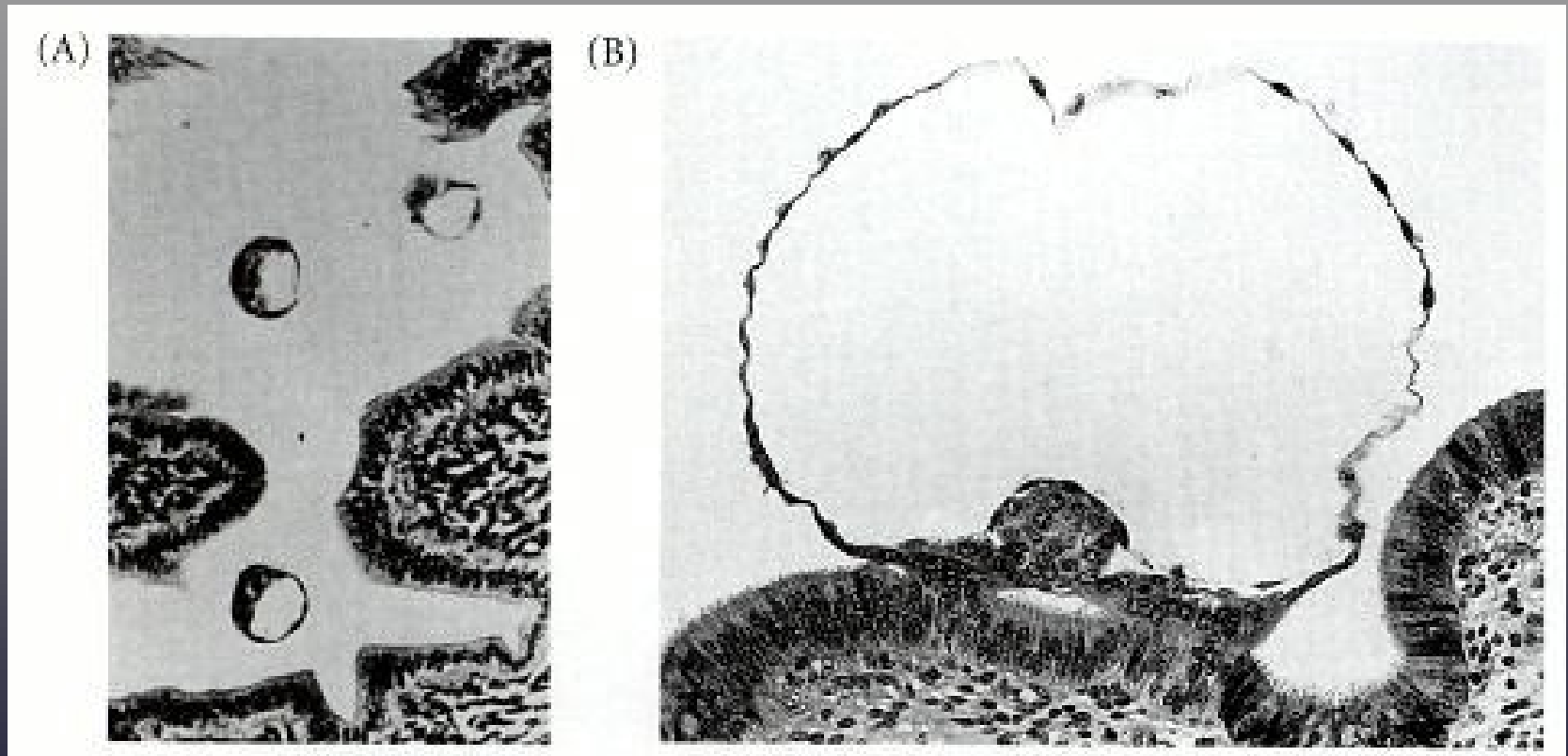
➤ Η διαφανής ζώνη είναι αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες και μουκοπολυσακχαρίτες και περιβάλλει το ωάριο. Παίζει σημαντικό ρόλο:

α. Στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.
β. Προστατεύει από την πολυσπερμία.
γ. Εμποδίζει την προσκόλληση του εμβρύου στα τοιχώματα του ωαγωγού.

➤ Καθώς το έμβρυο φθάνει στη μήτρα, η διαφανής ζώνη αποβάλλεται κατά τη διαδικασία της εκκόλαψης (hatching). Η βλαστοκύστη περνά μέσα από μια τρύπα που ανοίγεται στη διαφανή ζώνη από την στρυψίνη, ένα ένζυμο που παράγουν τα κύτταρα της τροφοβλάστης.

Εμφύτευση

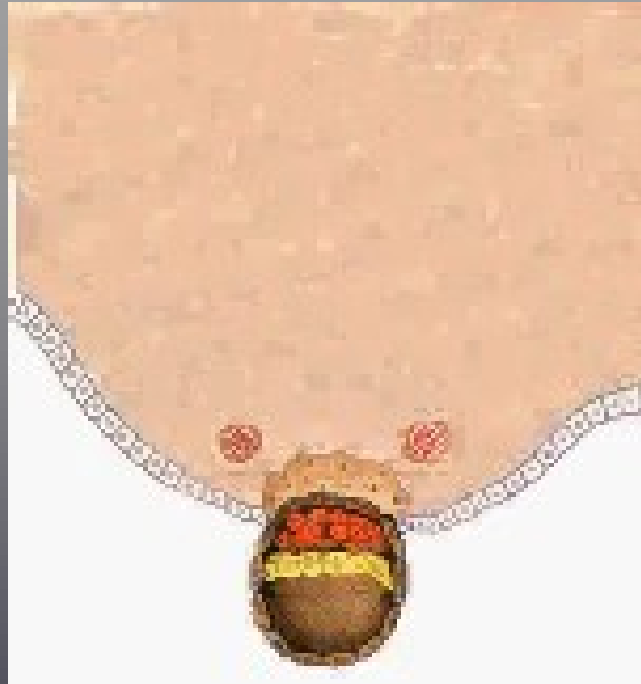
➤ Μετά την εκκόλαψη από τη διαφανή ζώνη η βλαστοκύστη προσκολλάται στο ενδομήτριο. Ακολουθεί η εμφύτευση στα τοιχώματα της μήτρας, μια διαδικασία αλληπίδρασης ανάμεσα σε δυο οργανισμούς τη μητέρα και το έμβρυο.



(A) Βλαστοκύστεις ποντικού που εισέρχονται στη μήτρα.

(B) Εμφύτευση βλαστοκύστης πιθήκου rhesus.

Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;



Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)

Cell-cell adhesion

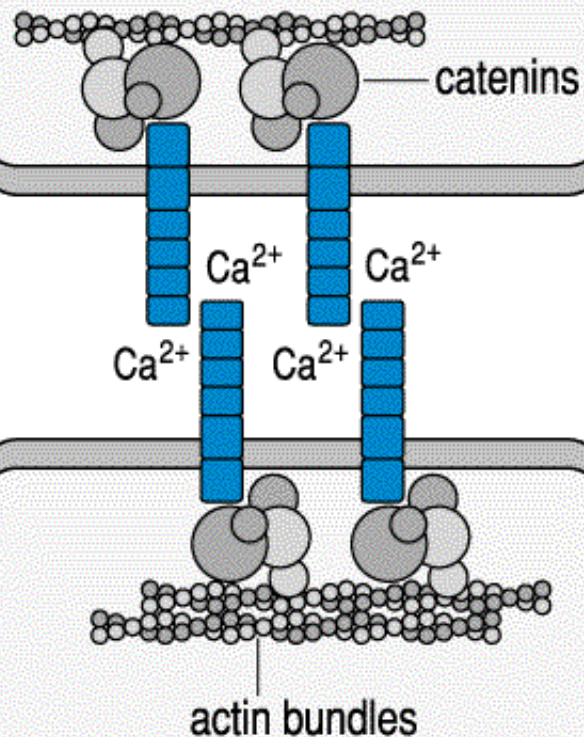
Cell-matrix adhesion

Calcium-dependent adhesion

Calcium-independent adhesion

Cadherin

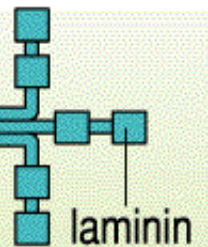
Immunoglobulin superfamily



Immunoglobulin superfamily
e.g. N-CAM



Integrin



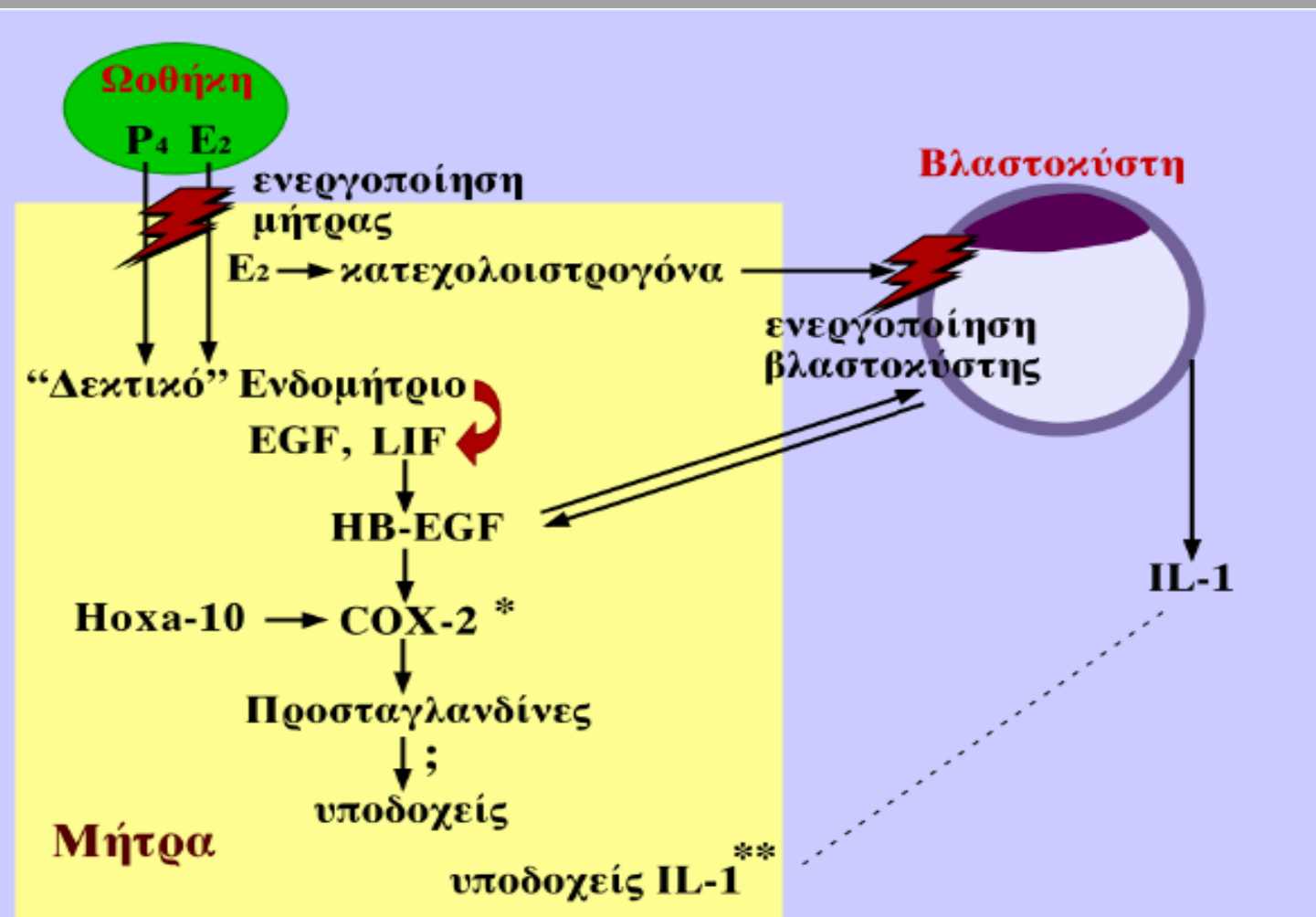
extracellular matrix

laminin

Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

A.

Ο ρόλος της προγεστερόνης και των οιστρογόνων , κυκλοζυγενάση



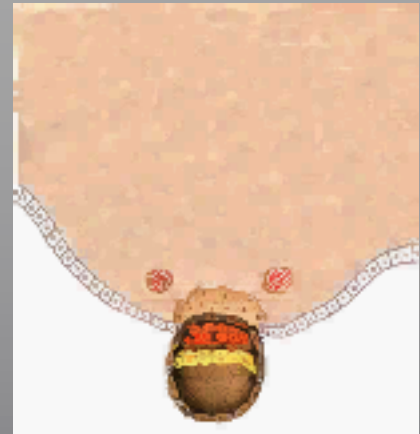
*Σε θηλυκά ποντίκια που δε συνθέτουν λειτουργικό ένζυμο ΔΕΝ γίνεται εμφύτευση.

**Απουσία υποδοχέων IL-1 το έμβryo ΔΕΝ προσκολλάται στη μήτρα.

Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

B. Μόρια κυτταρικής συνάφειας

➤ Αρκετά συστήματα κυτταρικής συνάφειας (adhesion systems) εμπλέκονται στην προσκόλληση του τροφοβλάστη στη μήτρα (πχ λαμινίνη, κολλαγόνο από τη μήτρα και ιντεγκρίνες από τη βλαστοκύστη).

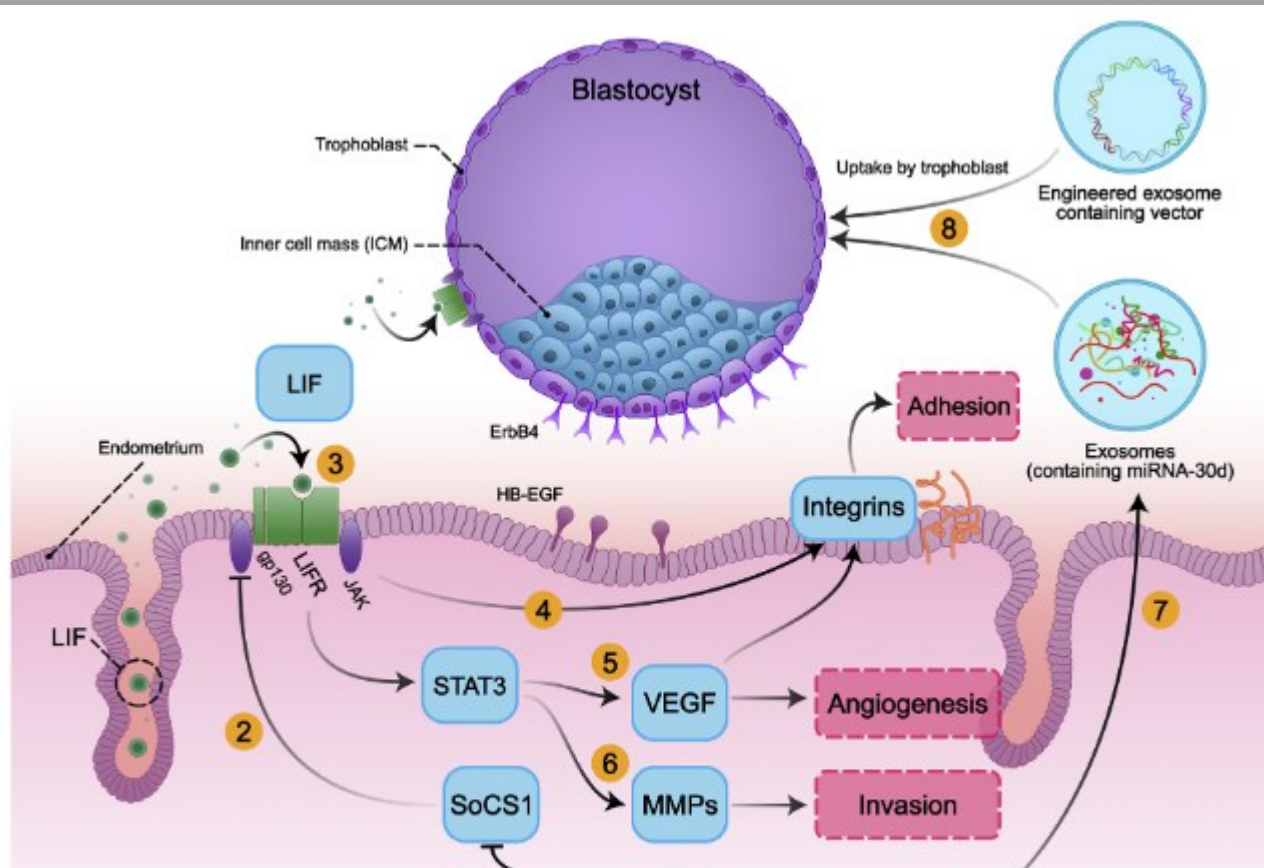


➤ Προσκόλληση με τη βοήθεια ιντεγκρινών και καδερινών. Ο HB-EGF που παράγεται από το ενδομήτριο προσδένεται στους υποδοχείς και σε πρωτεϊνογλυκάνες που υπάρχουν στη βλαστοκύστη. Έτσι επιτυγχάνεται η αρχική πρόσδεση.

➤ Επαφή μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεϊνογλυκάνες - υποδοχείς τους.

➤ Η βλαστοκύστη αρχίζει να εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας. Αυτό επιτυγχάνεται: α) Με την παραγωγή πρωτεασών από την τροφοβλάστη. β) Με την έκφραση διαφορετικών ιντεγκρινών. γ) Με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τροφοβλάστη και δ) Με την αγγειογένεση που ξεκινά στο σημείο που γίνεται η εμφύτευση.

Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;



Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

EMBRYOGLUE®

Implantation promoting medium for
increased take-home baby rate



Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues

4 May 2016

Marta N. Shahbazi^{1,5}, Agnieszka Jedrusik^{1,5}, Sanna Vuoristo^{1,5}, Gaelle Recher^{1,6}, Anna Hupalowska¹, Virginia Bolton², Norah M. E. Fogarty³, Alison Campbell⁴, Liani G. Devito², Dusko Ilic², Yakoub Khalaf², Kathy K. Niakan³, Simon Fishel⁴ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,7}

Self-organization of the *in vitro* attached human embryo

Alessia Deglincerti^{1*}, Gist F. Croft^{1*}, Lauren N. Pietila¹, Magdalena Zernicka-Goetz², Eric D. Siggia³ & Ali H. Brivanlou¹

Human embryos grown in lab for longest time ever

Embryos cultured for up to 13 days after fertilization open a window into early development.

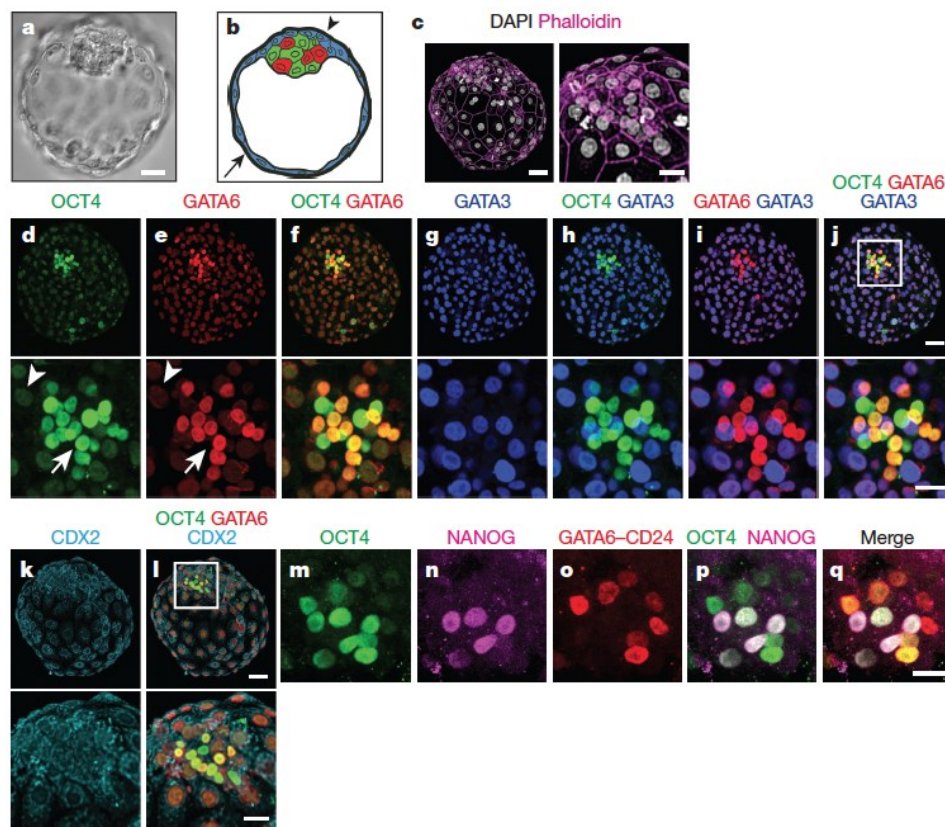
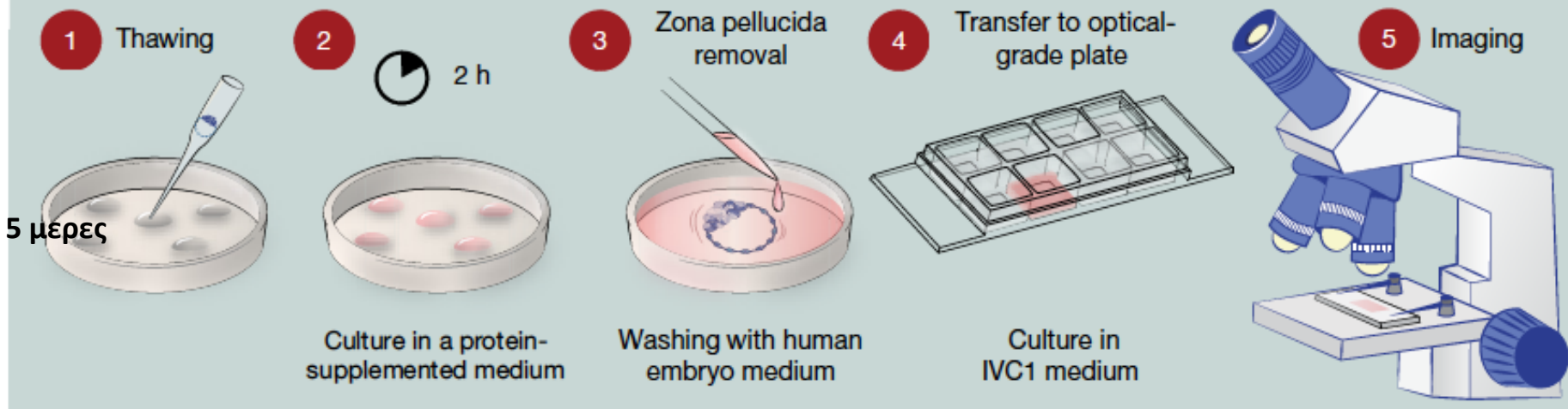


Figure 1 | D.p.f. 6 human blastocyst embryos display human-specific transcriptional profiles. a, DIC image of a d.p.f. 6 human blastocyst; scale bar, 100 μm . b, Cartoon of a d.p.f. 6 embryo with salt-and-pepper distribution of OCT4 (green) and OCT4/GATA6 (red) ICM cells, and GATA3 (blue); mural (arrow) and polar (arrowhead) TE cells. c–q, Immunostaining of d.p.f. 6 blastocysts. c, Three-dimensional rendering of the front half of a d.p.f. 6 blastocyst (left) and ICM-zoom (right). DAPI (white) and phalloidin (magenta, actin, virtual channel). d–j, Three-dimensional rendering of a d.p.f. 6 blastocyst (top) and ICM-zoom (bottom, box in j) stained for OCT4 (green), GATA6 (red, virtual channel), GATA3 (blue) ($n = 3-8$); arrows indicate high marker levels in ICM, arrowhead low levels in TE. k–l, Whole embryo (top) and ICM-zoom (bottom, box in l) of the d.p.f. 6 blastocyst from c; OCT4 (green), GATA6 (red, virtual channel), CDX2 (cyan) ($n = 5$). m–q, ICM-zoom of d.p.f. 6; OCT4 (green), NANOG (magenta), GATA6 and CD24 (red, $n = 3$). Scale bar, 100 μm for whole embryos, 20 μm for ICM-zooms.

Τι είναι η γαστριδίωση;

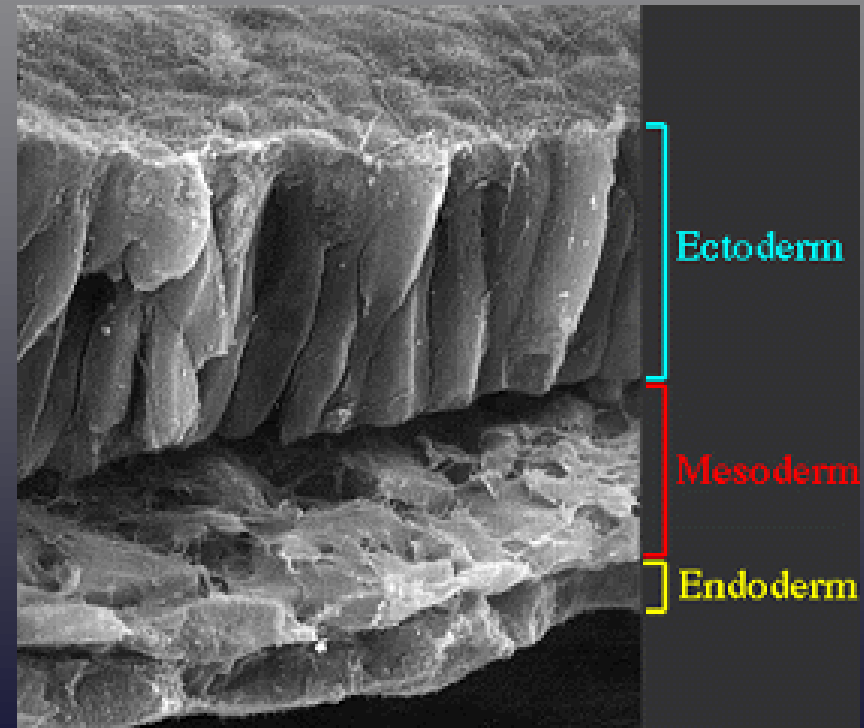
➤ Η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται τα τρία βλαστικά δέρματα (**εξώδερμα**, **μεσόδερμα** και **ενδόδερμα**).

➤ Η διαδικασία με την οποία οργανώνεται το βασικό πλάνο του σώματος.

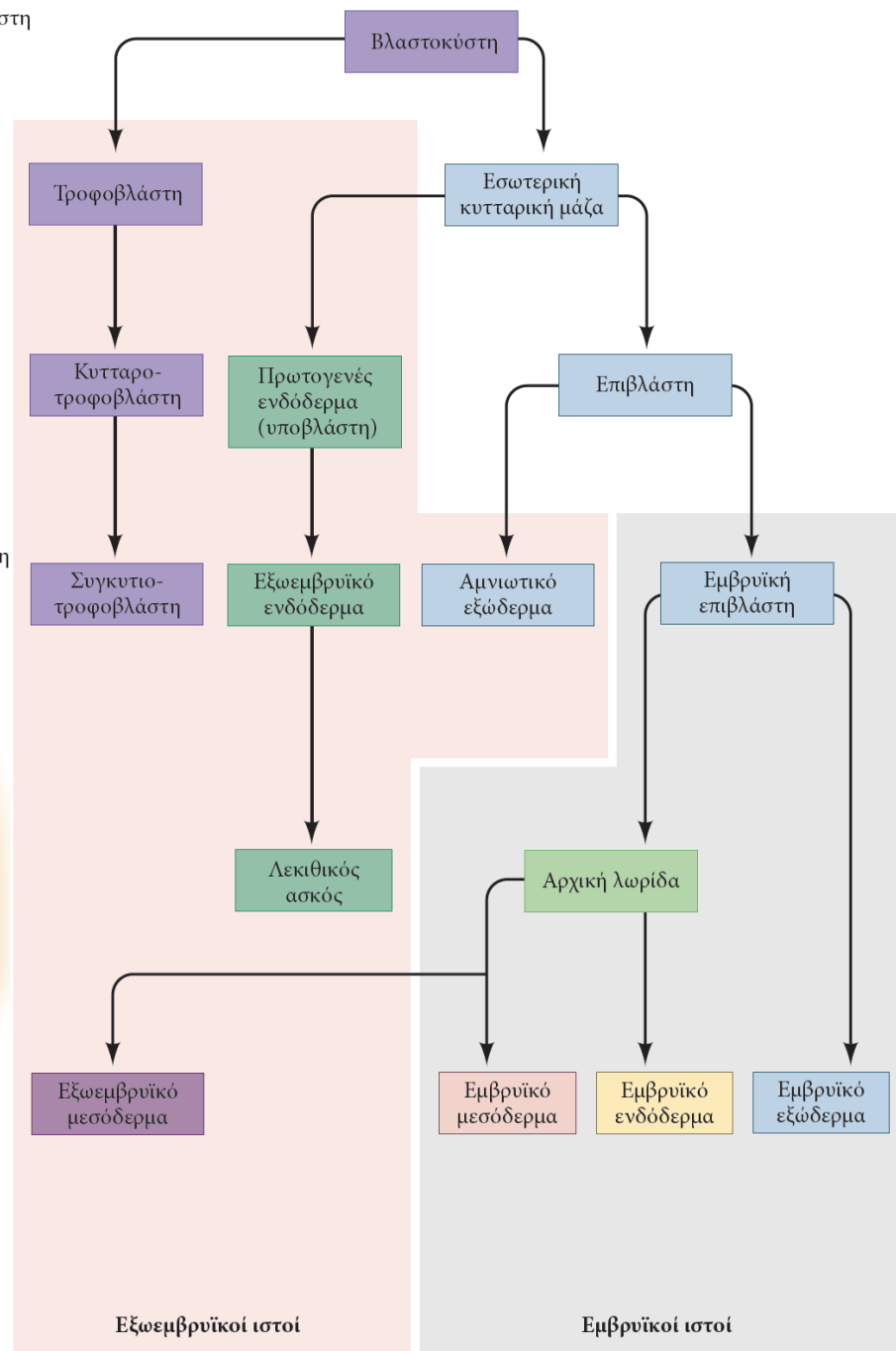
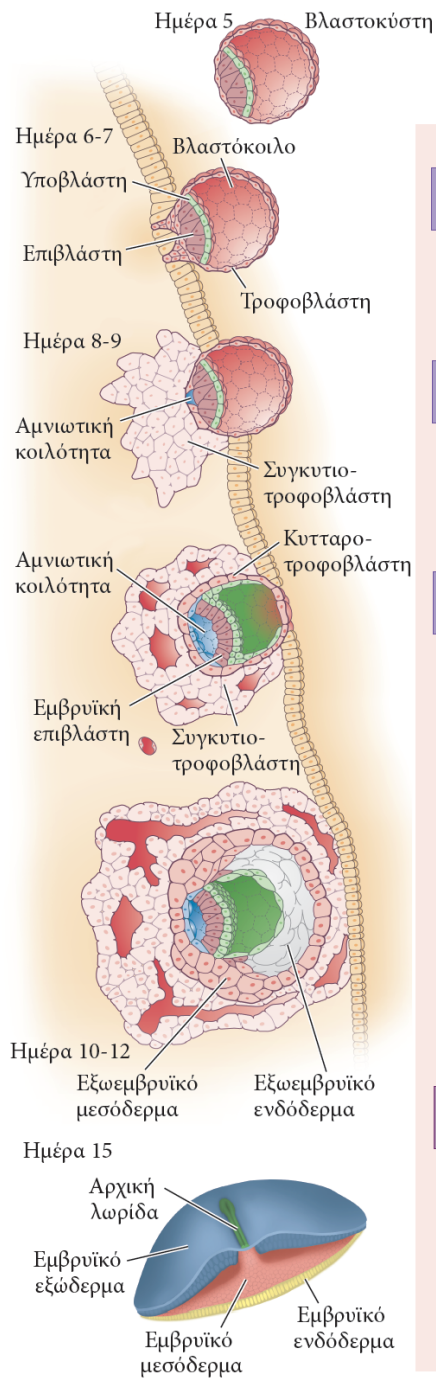
➤ Η γαστριδίωση χαρακτηρίζεται από μια σειρά προκαθορισμένων κυτταρικών ανακατατάξεων (μεταναστεύσεις).

➤ Η γαστριδίωση των θηλαστικών μοιάζει αρκετά με αυτή των πτηνών.

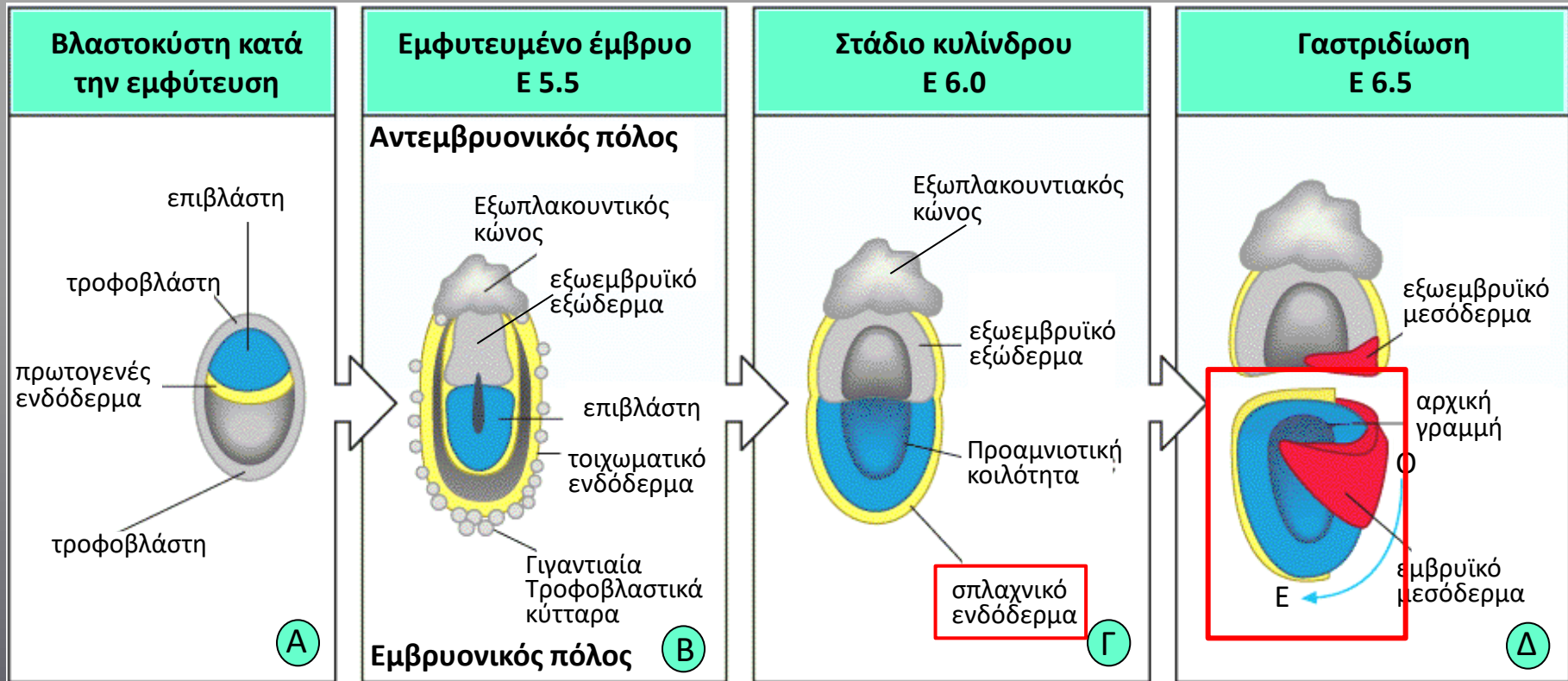
“It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life”. Lewis Wolpert



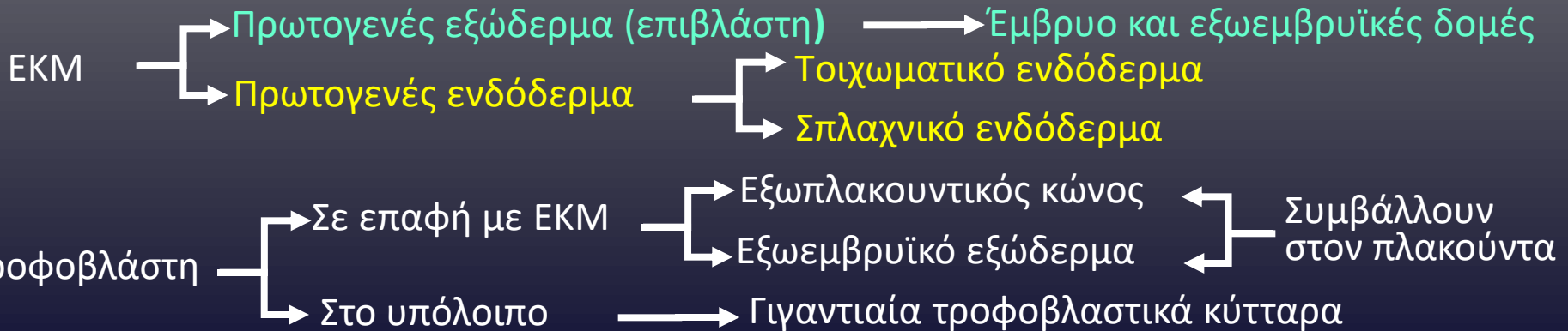




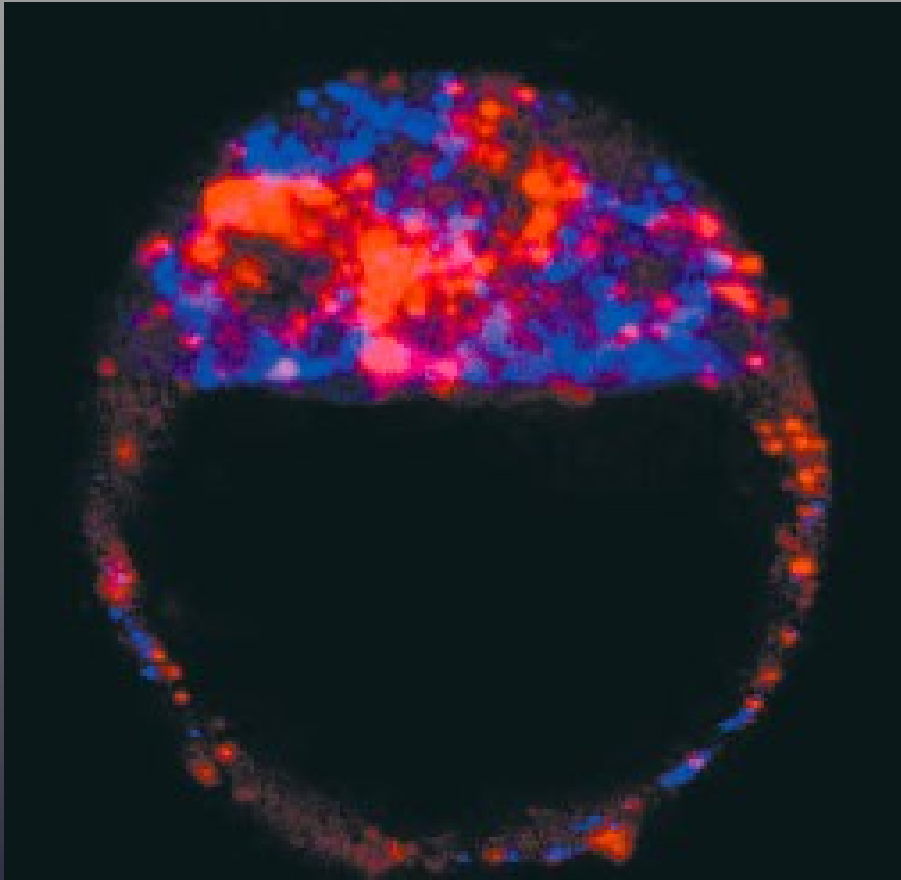
Γαστριδίωση I



Στα Γ και Δ δεν απεικονίζεται το τοιχωματικό ενδόδερμα ούτε τα γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα



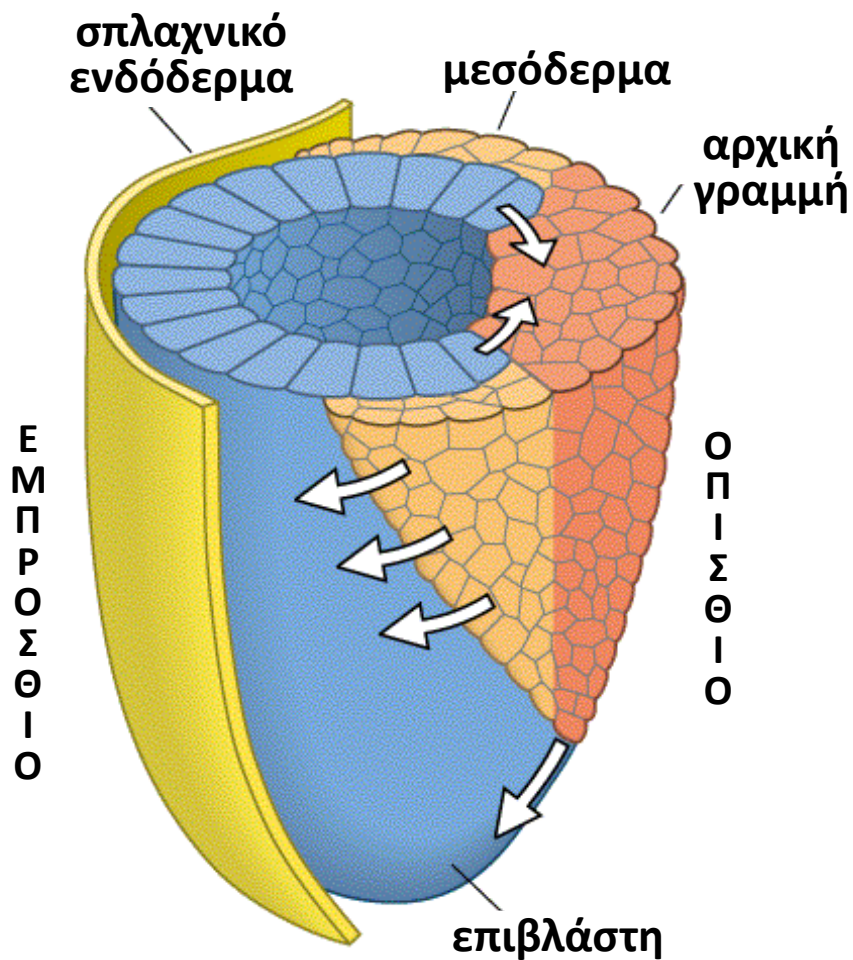
Πρώιμη ανάπτυξη



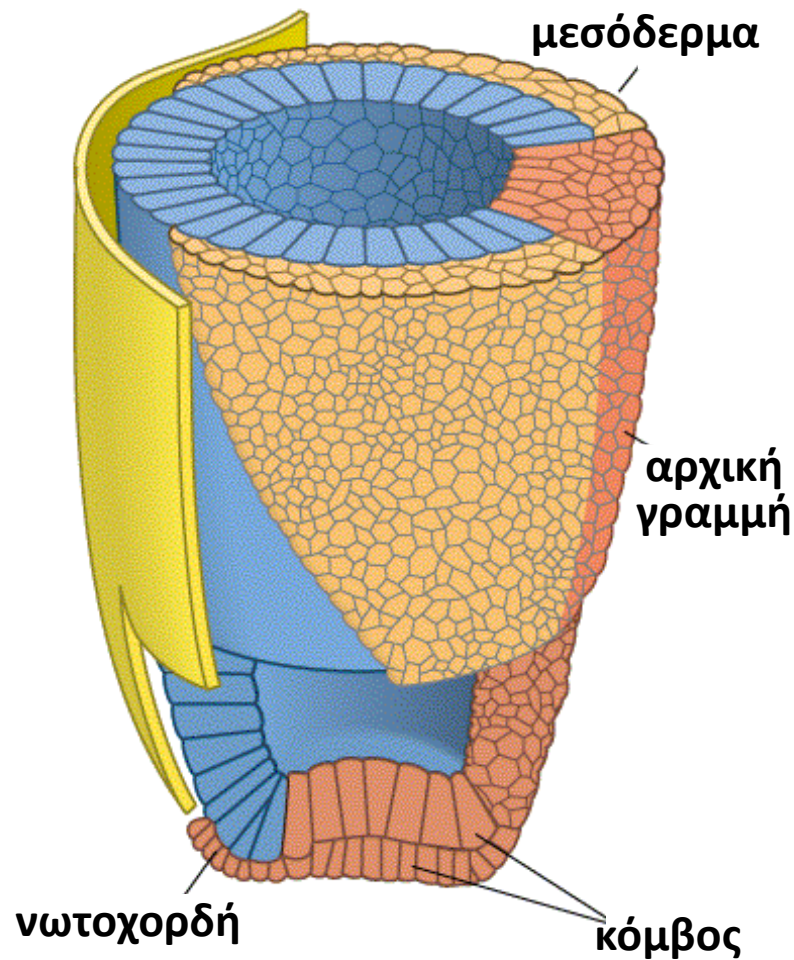
- Τυχαία ενεργοποίηση του Nanog (μπλε) και του GATA6 (κόκκινο) στην εσωτερική κυτταρική μάζα την E 3.5.
- Χρονική συνιστώσα?
- Σηματοδότηση FGF (υψηλότερη = πρωτογενές ενδόδερμα)
- **Nanog = επιβλάστη**
- **GATA6 = πρωτογενές ενδόδερμα**
- Στην E 4.5 οι δυο πληθυσμοί θα διαχωριστούν και το σπλαχνικό ενδόδερμα θα διευθετηθεί στην επιφάνεια του βλαστούκοιλου.
- Η επιβλάστη δεν θα έχει πλέον επαφή με το βλαστούκοιλο.

Γαστριδίωση II

Ε 6.5 : Σχηματισμός αρχικής γραμμής



Ε 7.5 : Πρώιμη κεφαλική καταβολή



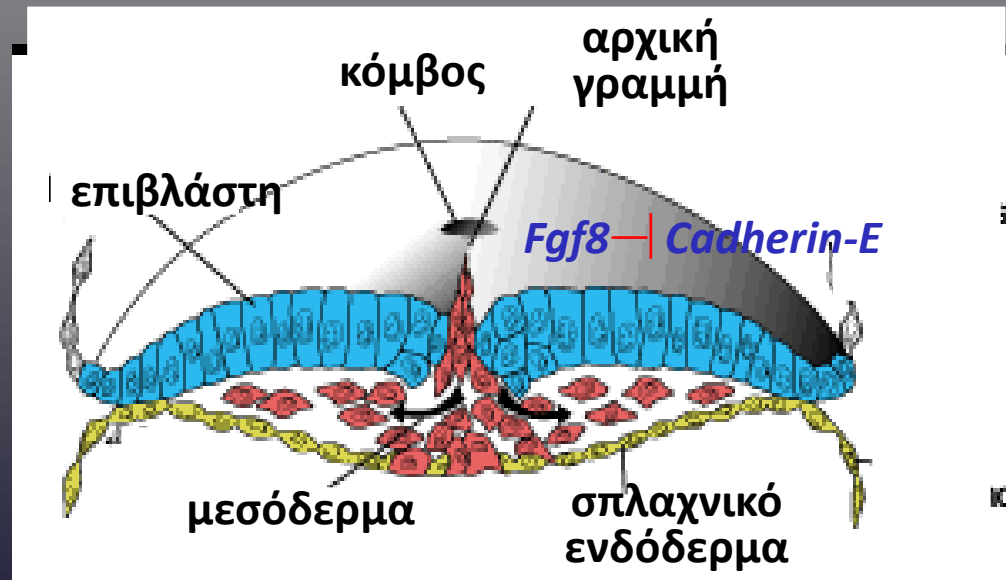
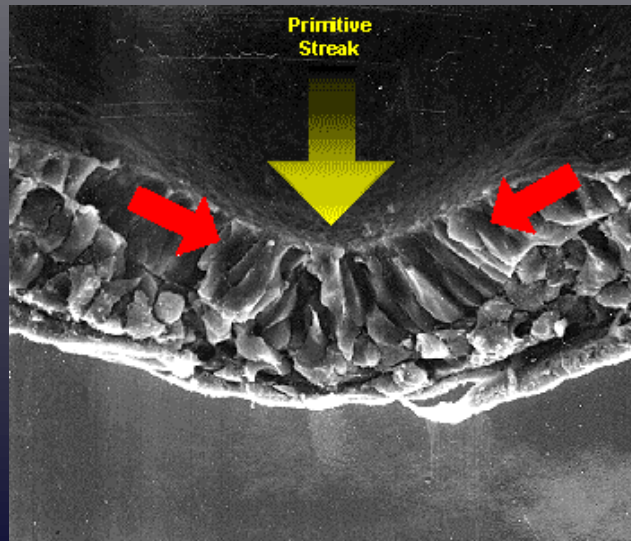
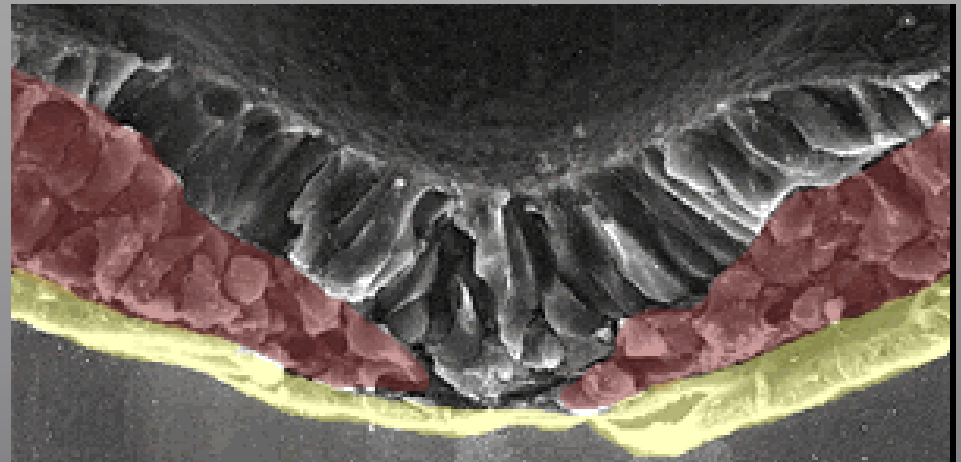
Γαστριδίωση III : Σχηματισμός αρχικής γραμμής

➤ Η αρχική γραμμή (primitive streak) προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό και τη συγκέντρωση κυττάρων της επιβλάστης στο οπίσθιο τμήμα του εμβρύου.

➤ Τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια αποκολλώνται από το εξώδερμα και γλιστρούν κάτω από αυτό.

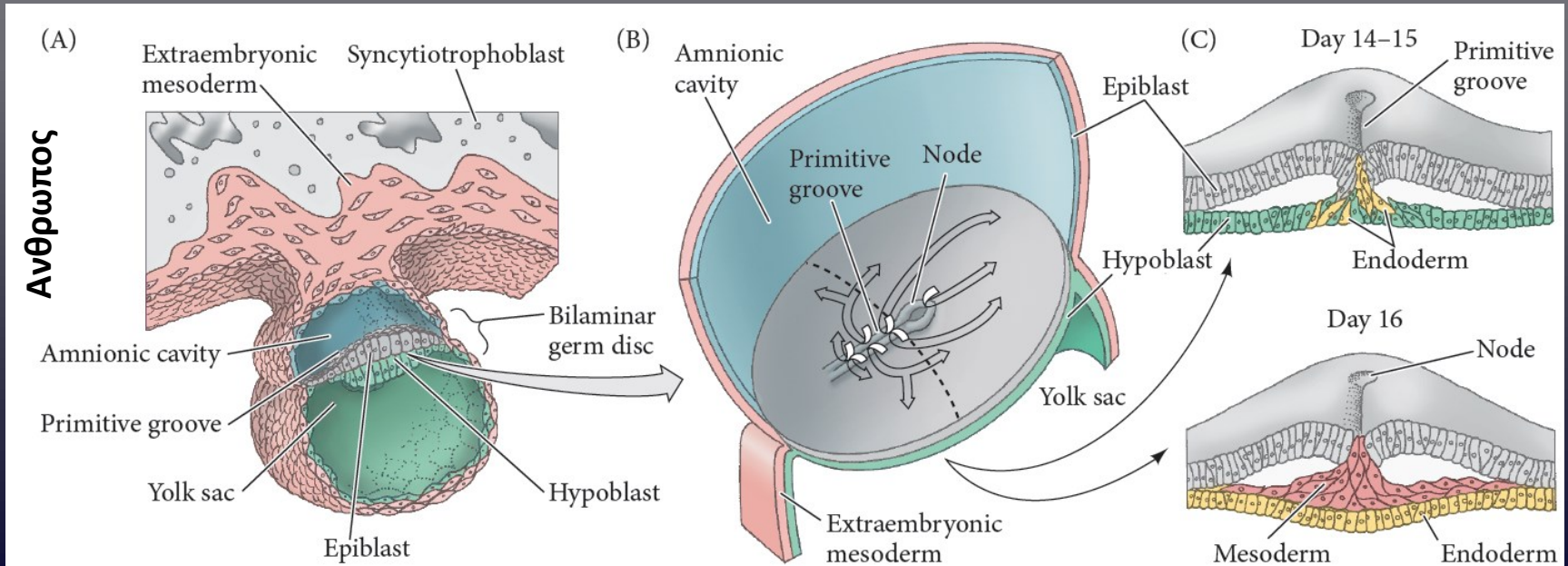
➤ Το κεφαλικό άκρο είναι ο κόμβος (node).

➤ Η αρχική γραμμή χαρακτηρίζει το οπίσθιο τμήμα του εμβρύου.



Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων

- Το μεσόδερμα και το ενδόδερμα προέρχονται από την επιβλάστη.
- Κύτταρα της επιβλάστης υφίστανται επιθηλιομεσεγγυματική μετάπτωση (απώλεια καδερίνης E) και ως μεμονωμένα κύτταρα διέρχονται από την αρχική γραμμή
- Η νωτοχορδή αναπτύσσεται από τον κόμβο- κύτταρα από την οροφή του πρωτογενενούς πεπτικού σωλήνα συγκλίνουν στη μέση γραμμή προς το ραχιαίο τμήμα του εμβρύου
- Ακολουθεί το μεσόδερμα (αρχική γραμμή).
- Μονοπάτι Fgf8 – απουσία Fgf8 το μεσόδερμα και το ενδόδερμα δεν σχηματίζονται, δεν γίνεται η μετάπτωση και δεν ενεργοποιείται μια σειρά γονιδίων που χρειάζονται για τη μετανάστευση και την εξειδίκευση των κυττάρων.
- Τα κύτταρα του μελλοντικού εξωδέρματος εντοπίζονται μπροστα από το ακραία εμπροσθιο τμήμα της αρχικής γραμμής.
- Στον ποντικό στο στάδιο αυτό ένα κύτταρο μπορεί ακόμα να δώσει απογόνους που ανήκουν σε παραπάνω του ενός βλαστικά δερματα!!
- Δεν έχουν ακόμα ξεχωρίσει οι τρεις κυτταρικές γενεαλογίες.

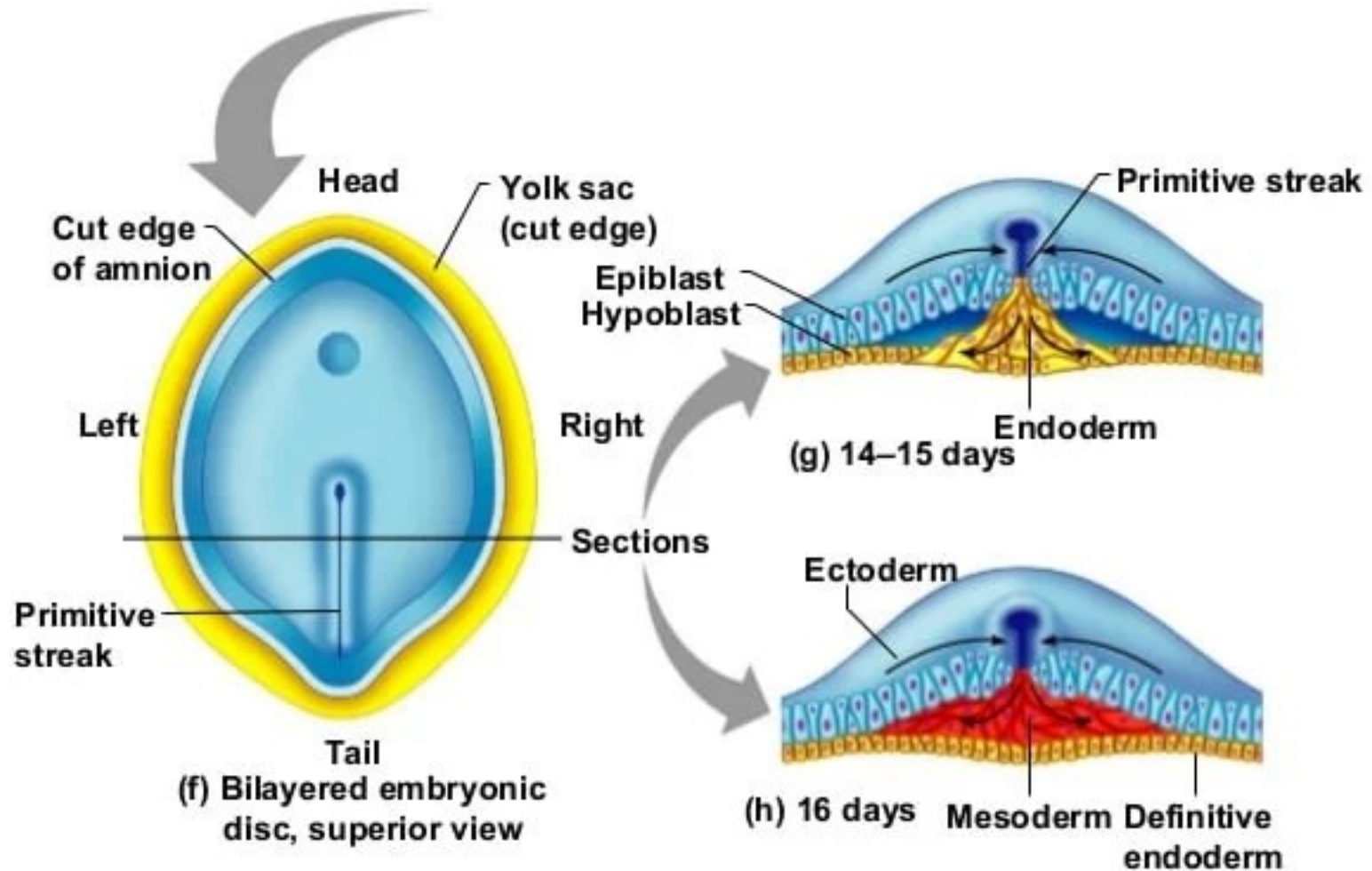


Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων

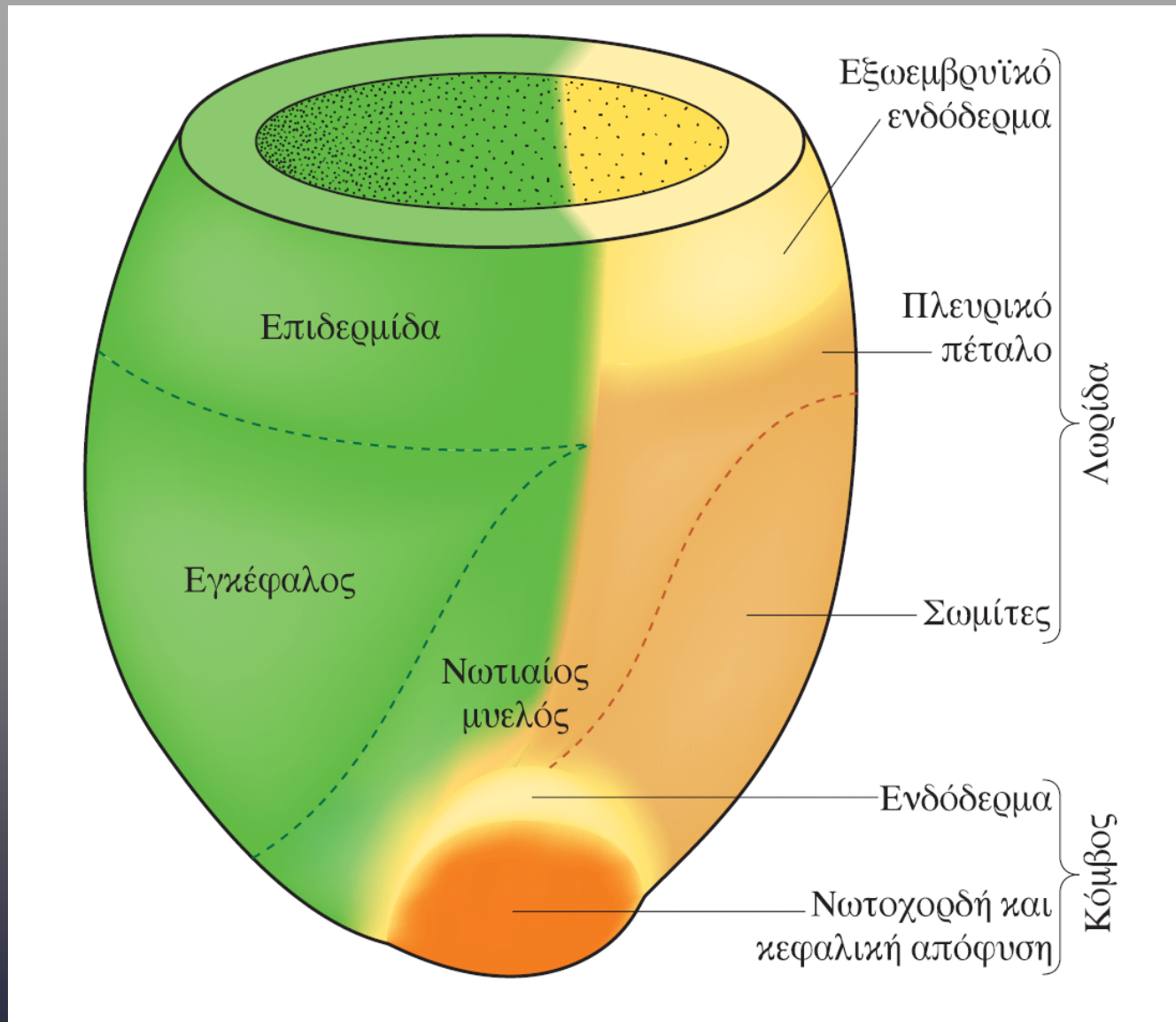
➤ Το μεσόδερμα και το ενδόδερμα προέρχονται από την επιβλάστη.

➤ Κύτταρα
➤ Η νευρική
➤ συσκευή
➤ Ακροφύα
➤ Μορφογένεση
➤ και διαφοροποίηση
➤ κυττάρων
➤ Τα αγγεία
➤ αρχίζονται
➤ Στο τέλος
➤ του πρώτου
➤ Δεκαημέριου

Formation of the three primary germ layers



ως
ήνα
ωση
των
της
κνω
e
n

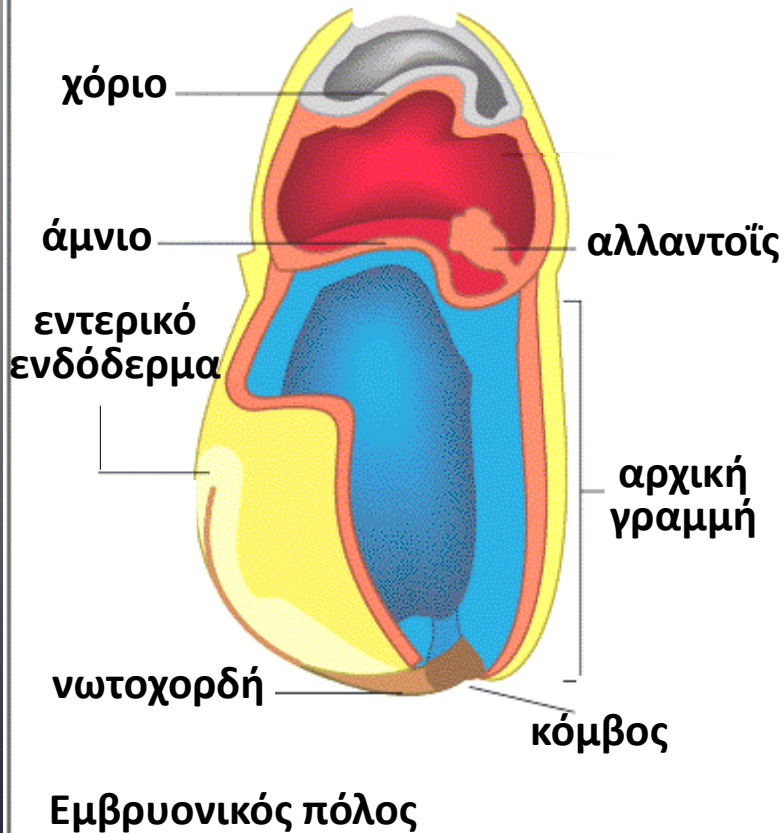


Χάρτης πεπρωμένου του σταδίου της όψιμης αρχικής λωρίδας. Στην πραγματικότητα τα όρια είναι πιο ασαφή λόγω της ανάμειξης μεταξύ των κυττάρων.

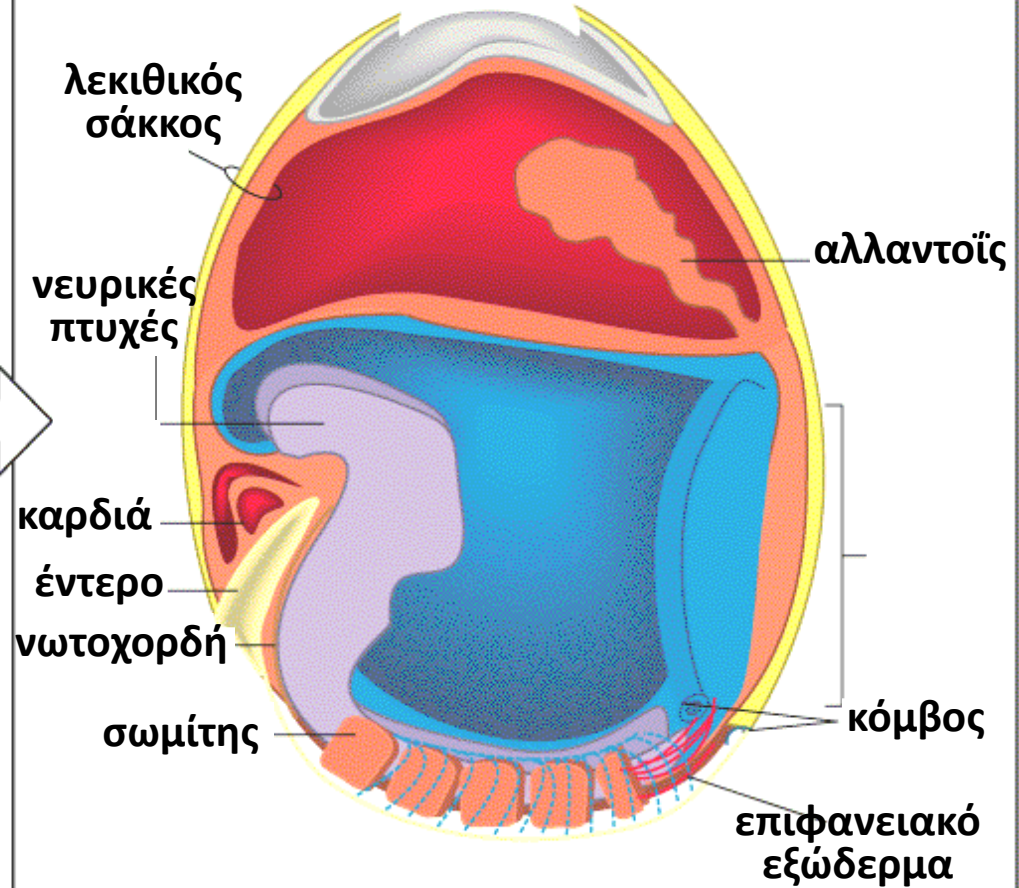
Γαστριδίωση - Έναρξη Νευριδίωσης

Ε 7.5 : Αρχική γραμμή σε πλήρη ανάπτυξη

Αντεμβρυονικός πόλος



Ε 8.5 : Σχηματισμός νευρικών πτυχών



Τέλος γαστριδίωσης- Στροφή

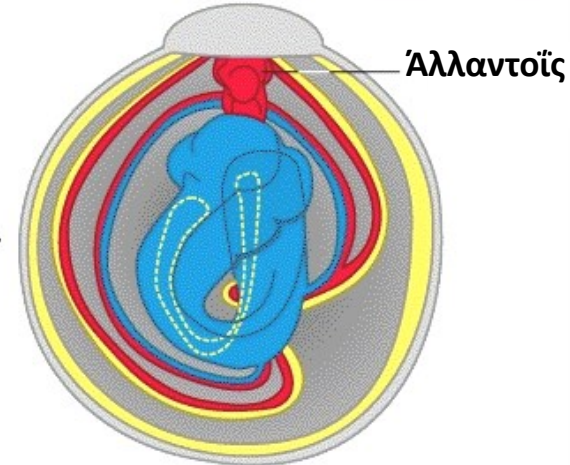
Ε 8.5 : Σχηματισμός
νευρικών πτυχών



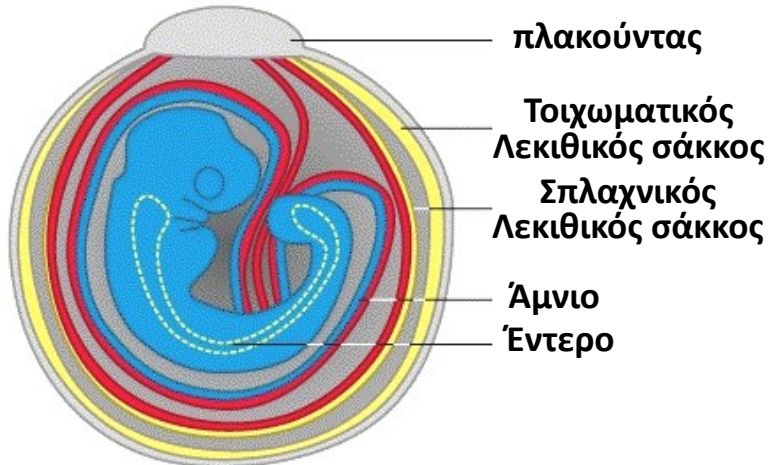
3-4 ώρες μετά



Ε 9.0



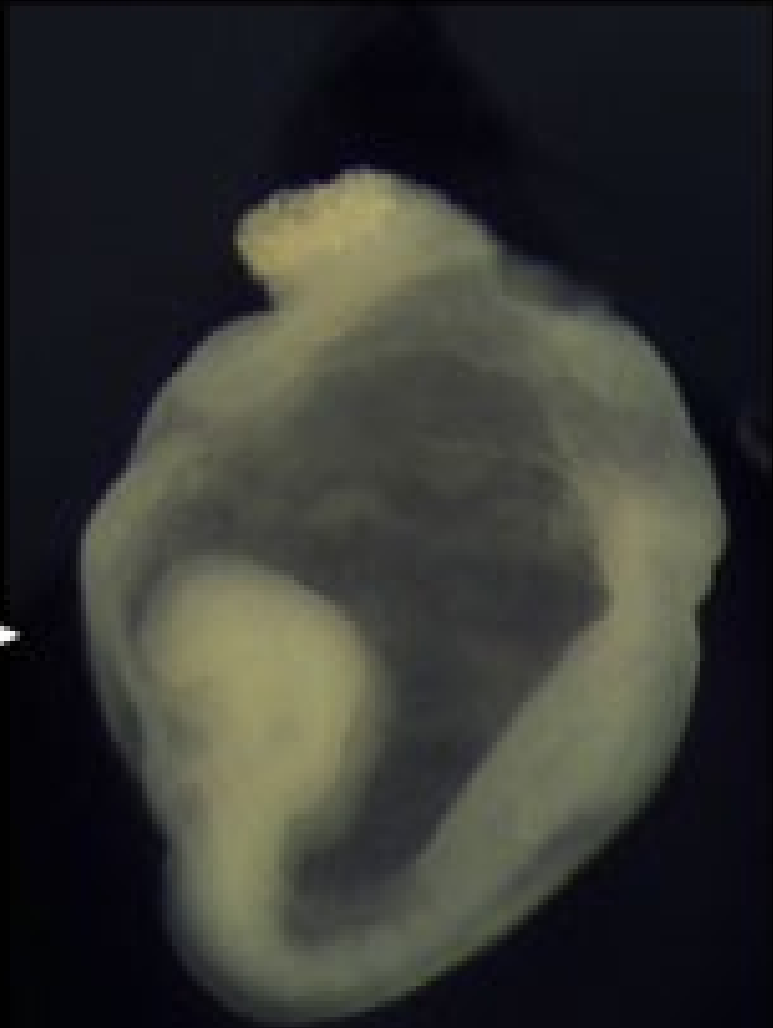
Ε 9.5 : Τέλος γαστριδίωσης



Ανάμεσα στην Ε8.5 και την Ε9.5 το έμβρυο στρέφεται και τελικά περικλείεται στον αμνιακό σάκκο (άμνιο) που περιέχει το αμνιακό υγρό που προφυλάσσει το έμβρυο από τους κραδασμούς. Ο σπλαχνικός λεκιθικός σάκκος βοηθά στη θρέψη και η αλλαντοΐς συνδέει το έμβρυο με τον πλακούντα.



e7.5



e8.5

Γαστριδίωση: Οι όροι

Γαστριδύση: Gastrulation

Πρωτογενές ενδόδερμα: Primitive endoderm

Τοιχωματικό ενδόδερμα: Parietal endoderm

Γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα: Trophoblast giant cells

Εξωεμβρυϊκό εξώδερμα: Extra-embryonic mesoderm

Προαμνιακή κοιλότητα: Proamniotic cavity

Σπλαχνικό ενδόδερμα: Visceral endoderm

Επιβλάστη: Eriblast

Εμπρόσθιο: Anterior

Οπίσθιο: Posterior

Αρχική γραμμή: Primitive streak

Κόμβος: Node

Νωτοχορδή: Notochord

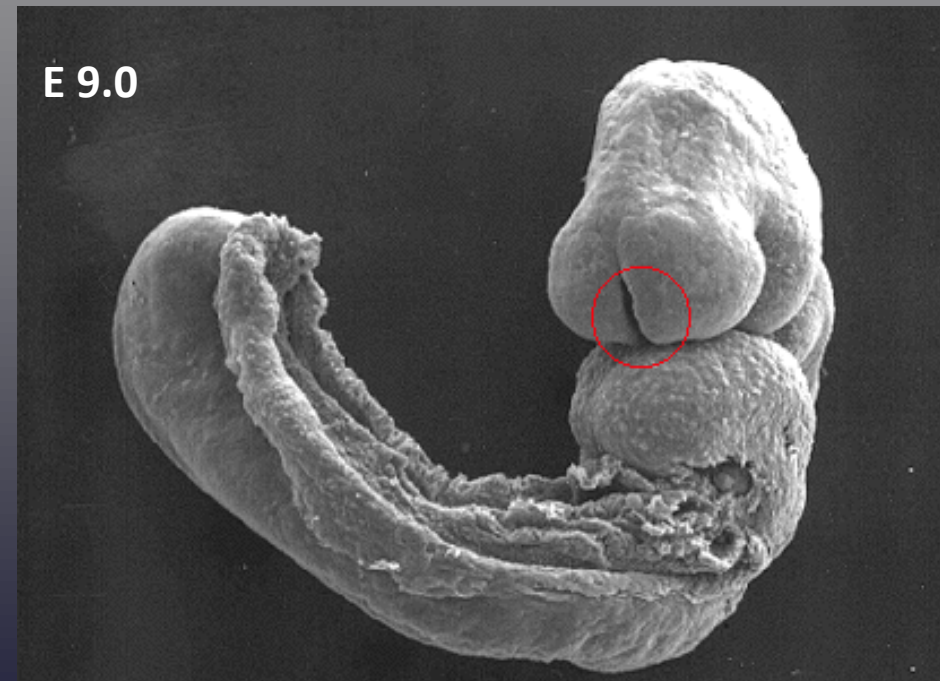
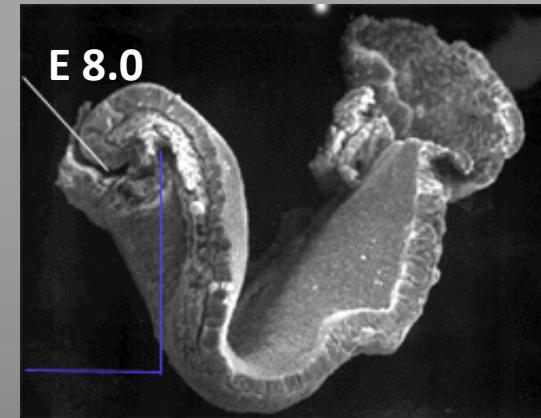
Αλλαντοΐς: Allantois

Νευρικές πτυχές: Neural folds

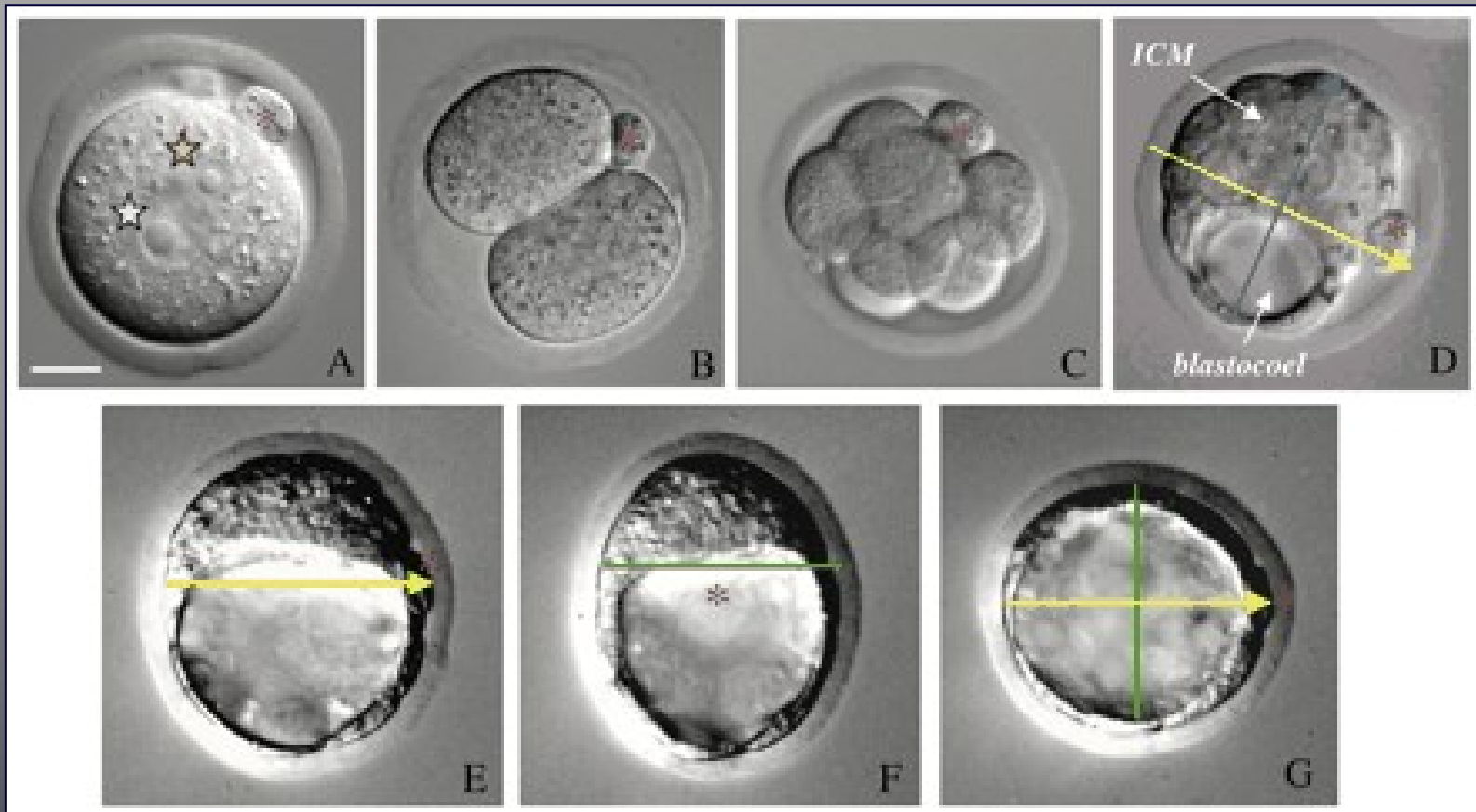
Σωμίτης: Somite

Επιφανειακό εξώδερμα: surface ectoderm

Εξωπλακουντικός κώνος: ectoplacental cone

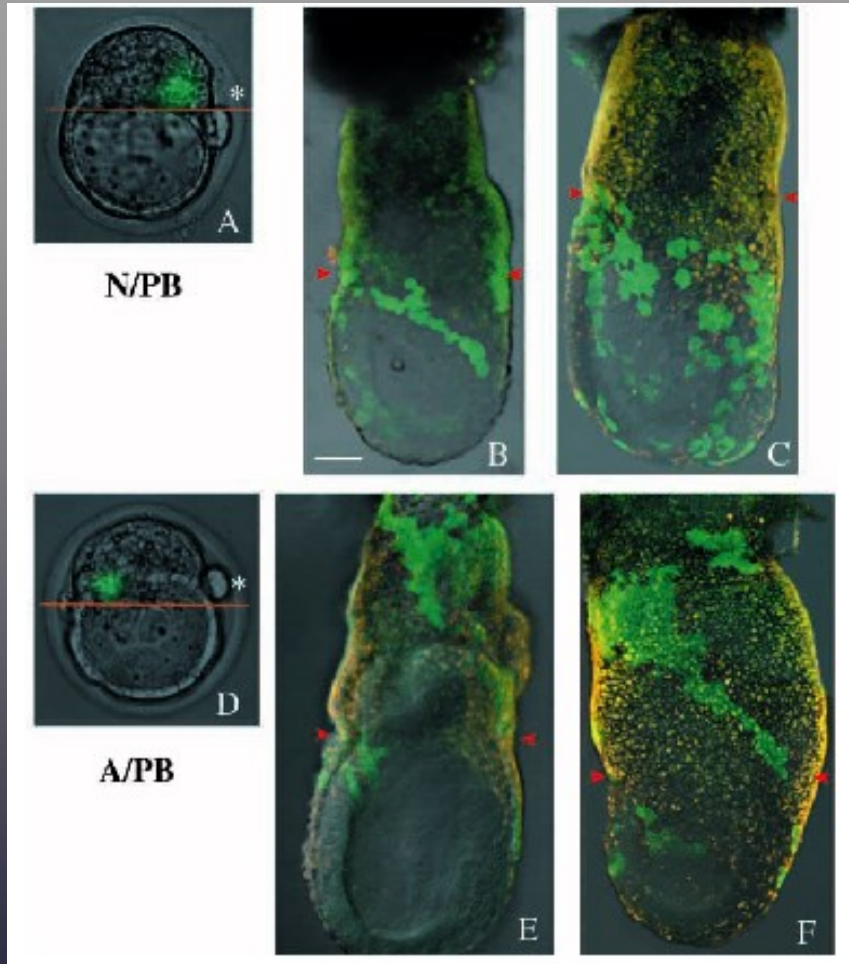


Καθορισμός αξόνων: Ασυμμετρία στη βλαστοκύστη



(A) Γονιμοποιημένο ωάριο. Διακρίνονται ο αρσενικός (λευκό αστέρι) και ο θηλυκός (ροζ αστέρι) προπυρήνας καθώς και το πολικό σωματίο (κόκκινος αστερίσκος) (B) Στάδιο δύο κυττάρων. (C) Στάδιο 8 κυττάρων (D) Πρώιμη βλαστοκύστη. Διακρίνονται ο άξονας ζωικού-φυτικού πόλου (κίτρινος) και ο άξονας εμβρυονικού-αντεμβρυονικού πόλου (γαλάζιος). (E-G) Βλαστοκύστη από τρεις διαφορετικές απόψεις. (E) Από το πλαϊό, φαίνεται ο αμφοτερόπλευρος άξονας συμμετρίας κατά μήκος της ΕΚΜ (ICM) (F) Από το ζωικό πόλο (G) Από τον εμβρυϊκό πόλο, φαίνονται τόσο ο μακρύς όσο και ο βραχύς άξονας συμμετρίας της ΕΚΤ. (Zernicka-Goetz, Development 129: 815-829 [2002])

Καθορισμός αξόνων: Υπάρχει σχέση ανάμεσα στην ασυμμετρία στη βλαστοκύστη και την πολικότητα που παρατηρούμε στο έμβρυο μετά την εμφύτευση;



(A) Σήμανση κυττάρων (πρωτογενές ενδόδερμα) που βρίσκονται κοντά στο πολικό σωματίο με MmGFPmRNA (N/PB)

(B) Σήμανση κυττάρων (πρωτογενές ενδόδερμα) που βρίσκονται μακριά στο πολικό σωματίο με MmGFPmRNA (A/PB)

Οι αστερίσκοι δείχνουν τα πολικά σωματίδια.

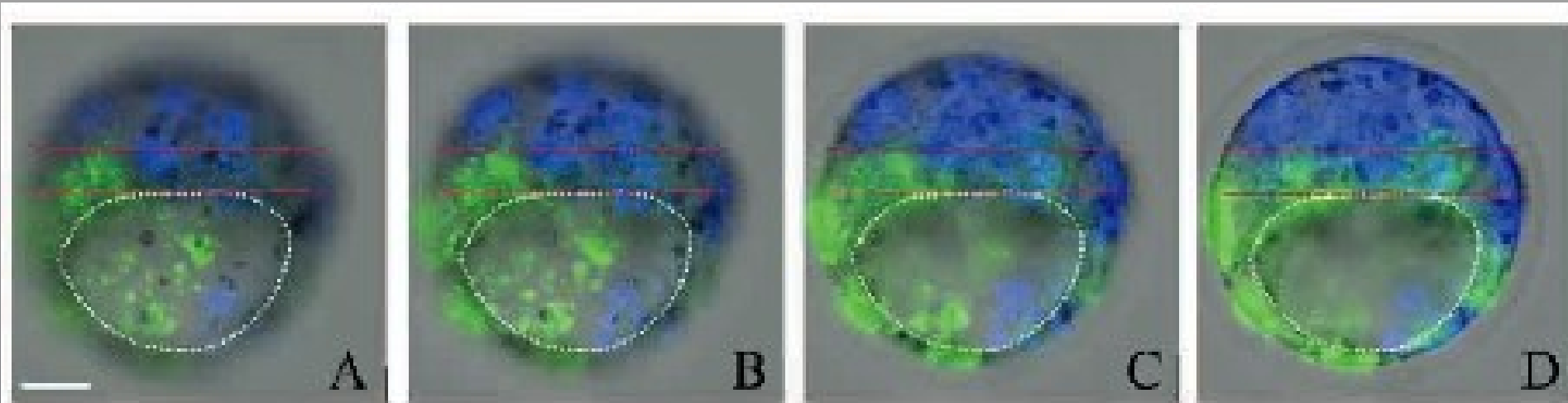
(B),(C),(E) και (F) Έμβρυα E 6.5 ή στα οποία μελετάται η κατανομή των απογόνων (σπλαχνικό ενδόδερμα) των κυττάρων που παρουσι-άζονται στο (A) και (D). Τα βέλη δείχνουν τα όρια ανάμεσα στην εμβρυονική και αντεμβρυονική περιοχή.

Το εμπρόσθιο τμήμα του εμβρύου είναι σε κάθε περίπτωση στα αριστερά.

Weber et al., Development, 126: 5591-5598 (1999).

Οι απόγονοι των σημασμένων κυττάρων κατανέμονται ασύμμετρα κατά μήκος του εμβρυονικού- αντεμβρυονικού άξονα.

Καθορισμός αξόνων: Πώς δημιουργείται η ασυμμετρία στη βλαστοκύστη;



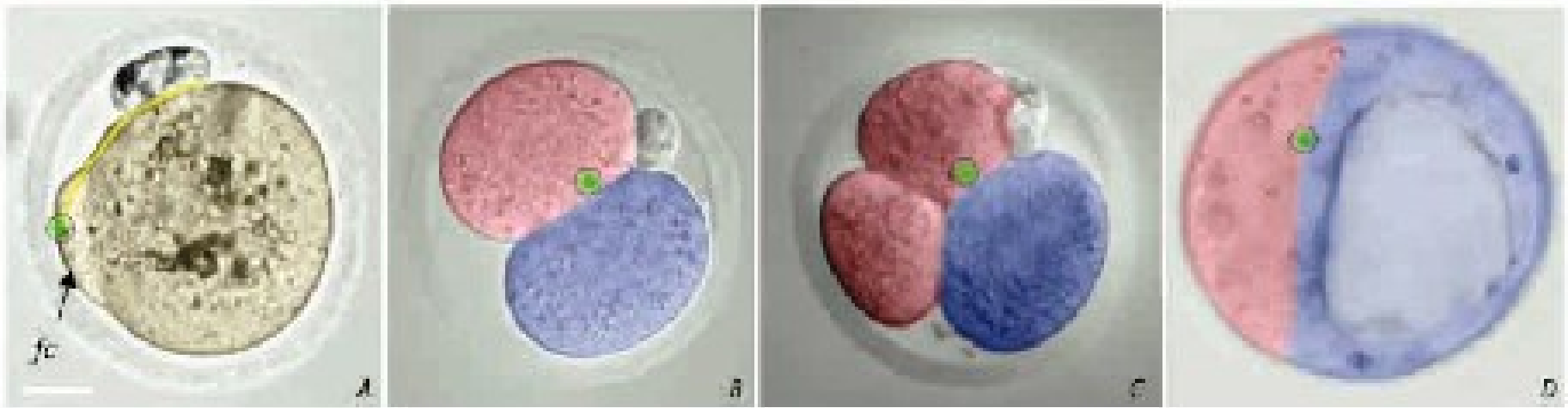
➤ Σήμανση των βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο κυττάρων, με δύο διαφορετικές χρωστικές.

➤ Ανάπτυξη εμβρύων σε βλαστοκύστεις.

➤ Εσωτερική Κυτταρική Μάζα προέρχεται κυρίως από το ένα βλαστομερίδιο και η τροφοβλάστη από το άλλο.

(Η περιοχή της επικάλυψης σημειώνεται με κόκκινη γραμμή. A-D τομές σε συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο). (Piotrowska et al. Development, 128:3739-3748 [2001])

Καθορισμός αξόνων



➤ Η εσωτερική κυτταρική μάζα συνήθως προέρχεται από το πρώτο βλαστομερίδιο που διαιρείται στο στάδιο των δύο κυττάρων. Το πρώτο αυλακωτικό επίπεδο φαίνεται ότι ορίζεται από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου (sperm entry point- σημειωμένο με πράσινο) και το δεύτερο πολικό σωματίο. Το βλαστομερίδιο που διαιρείται πρώτο, είναι αυτό που περιέχει και το ελάχιστο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου. Επίσης φαίνεται ότι το πρώτο αυλακωτικό επίπεδο σχετίζεται με το όριο (boundary) ανάμεσα στην εμβρυονική και αντεμβρυονική περιοχή.

➤ Πιο νωρίς = Επιβλάστη, πιο αργά = υποβλάστη

Piotrowska et al. (2001, Gentz 2010) Development, 128:3739-3748

Πώς συνδυάζονται τα δεδομένα αυτά με το ρυθμιστικό μοντέλο ανάπτυξης των θηλαστικών;

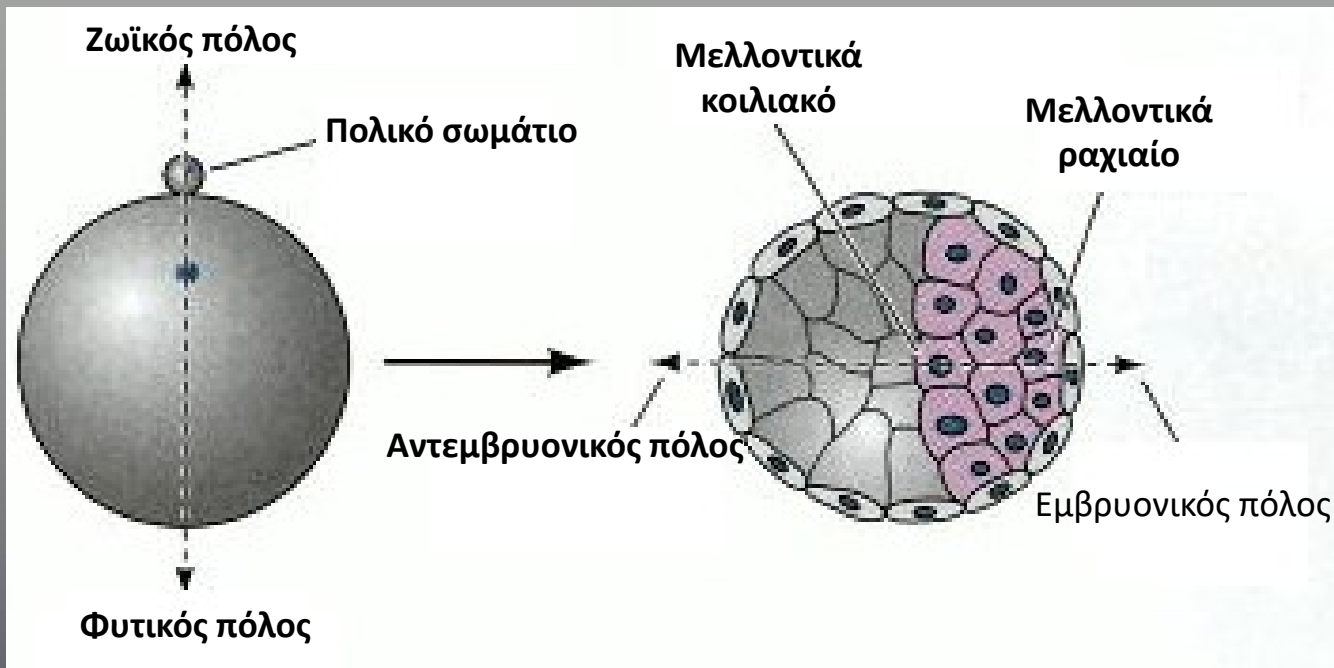
➤ Επανακαθορισμός όταν χωρίζονται τα βλαστομερίδια;

➤ Ο ένας πόλος (ζωϊκός/φυτικός) μπορεί να επανακαθορίσει τον άλλο απουσία του;

➤ Υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον που επανακαθορίζουν την πολικότητα;

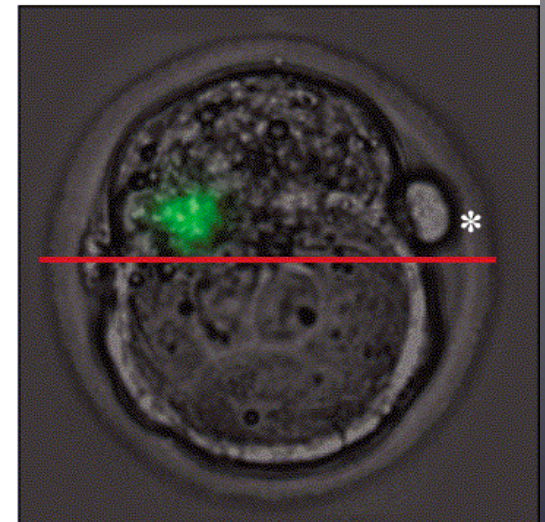
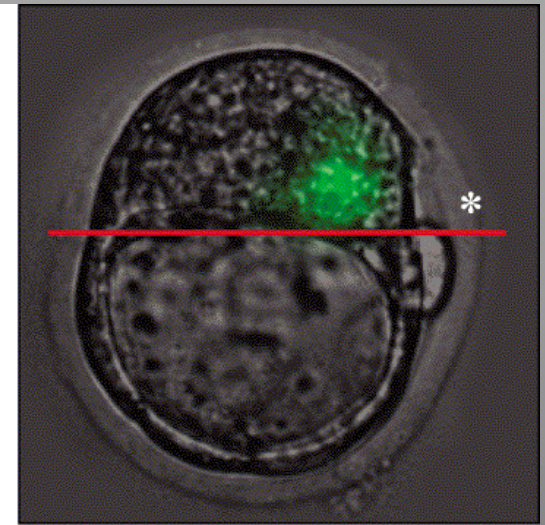
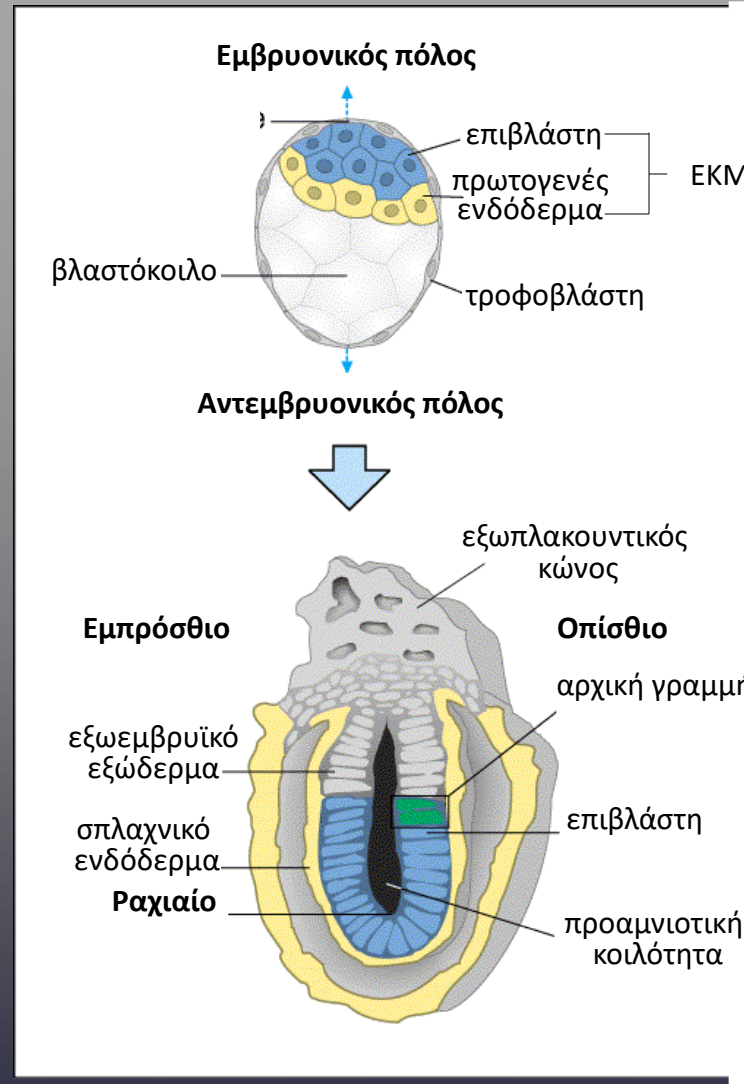


Ο ραχιαίος - κοιλιακός άξονας



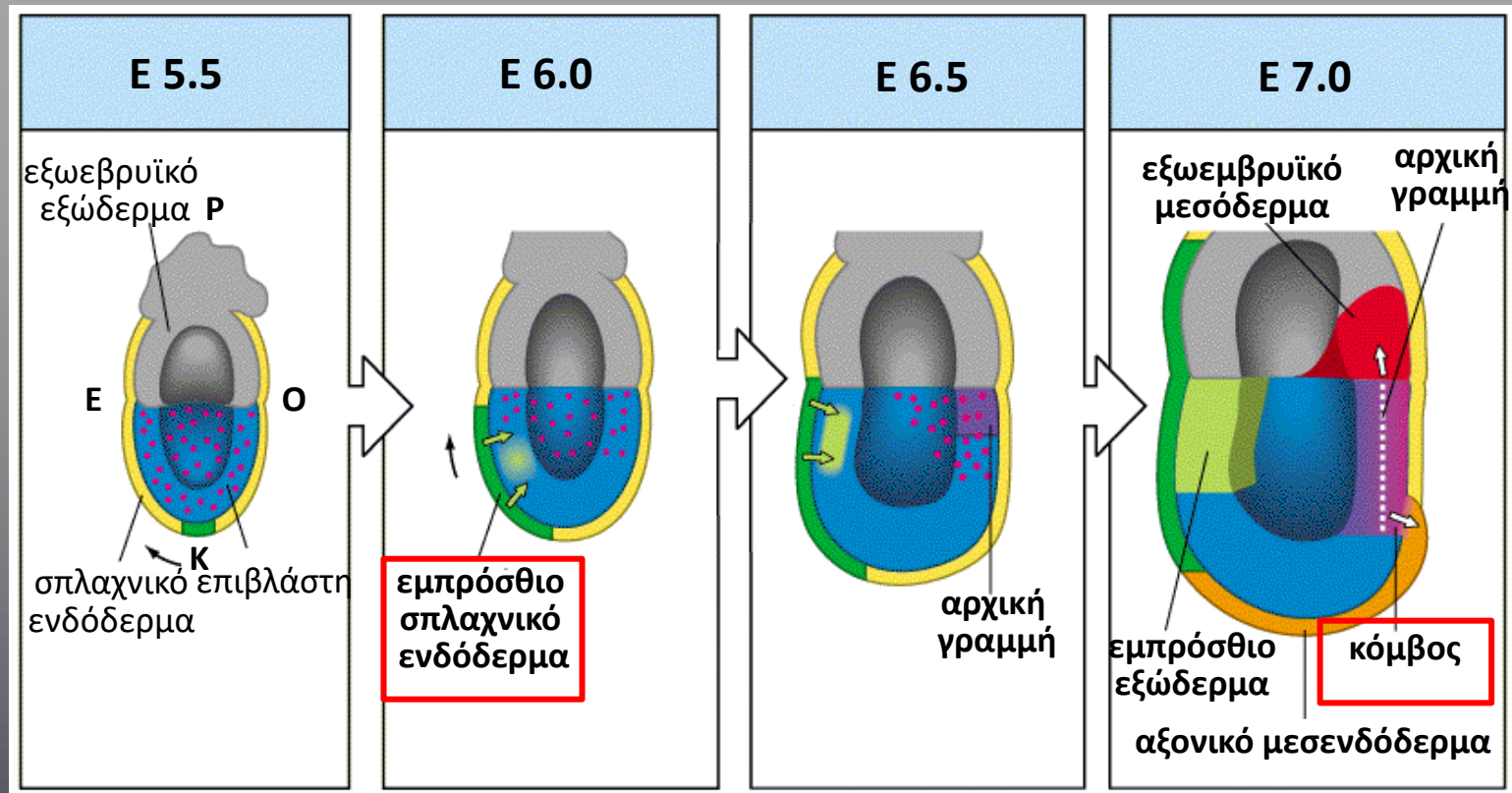
➤ Στη βλαστοκύστη η ΕΚΜ καθορίζει τον εμβρυονικό-αντεμβρυονικό άξονα, που γεωμετρικά σχετίζεται με τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα. Ο άξονας αυτός είναι κάθετος στον άξονα ζωϊκού- φυτικού πόλου.

Καθορισμός αξόνων



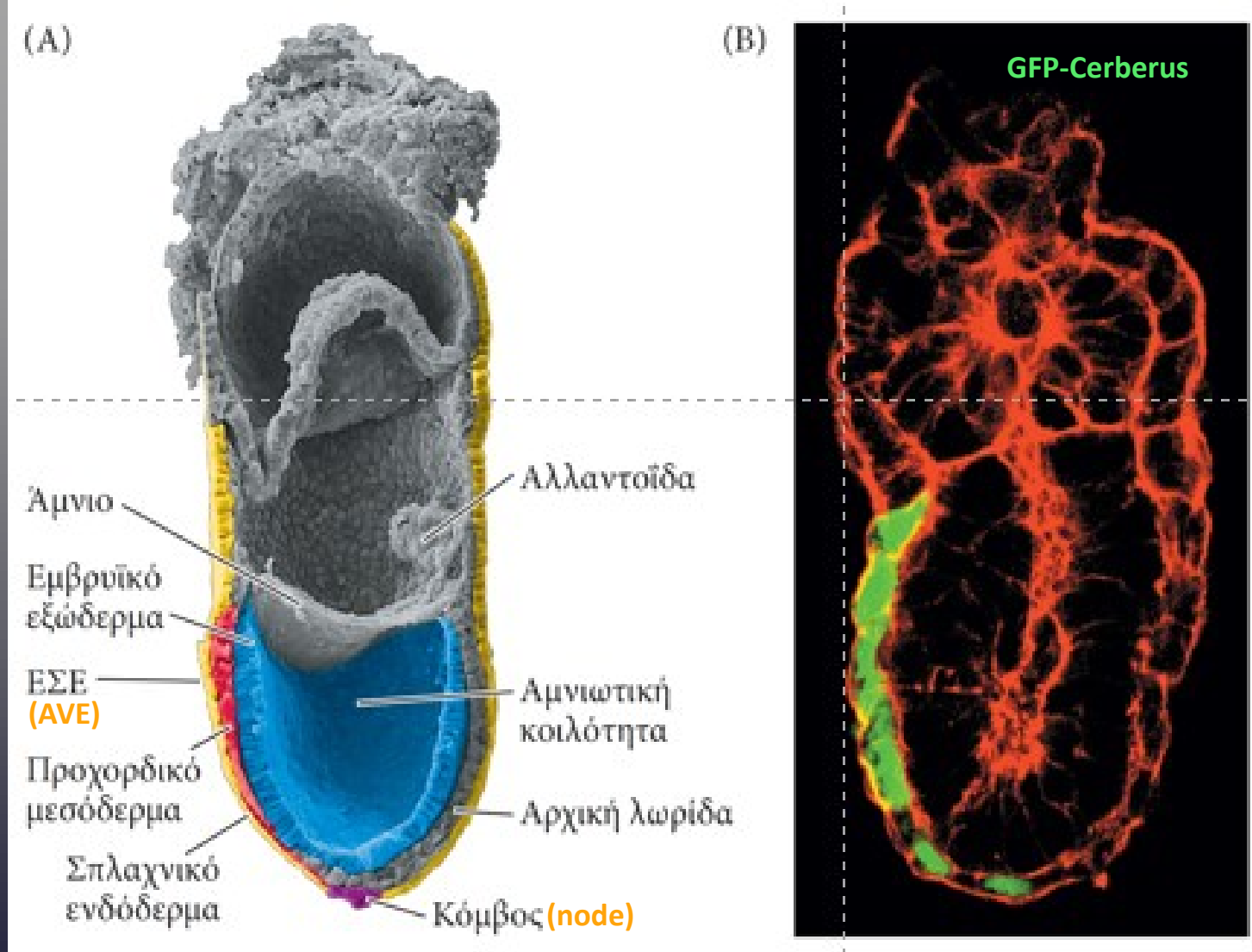
➤ Στη βλαστοκύστη η ΕΚΜ καθορίζει τον εμβρυονικό-αντεμβρυονικό άξονα, που γεωμετρικά σχετίζεται με τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα. Ο άξονας αυτός είναι κάθετος στον άξονα ζωϊκού- φυτικού πόλου.

Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



➤ Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο «κέντρα ελέγχου» : ο κόμβος (node) και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (anterior visceral endoderm). Ο κόμβος είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό του κορμού και συνεργάζεται με το AVE για το σχηματισμό του εμπρόσθιου τμήματος. Οι δύο αυτές περιοχές εκφράζουν ομόλογα γονιδίων τα οποία εκφράζονται στον οργανωτή (organizer) του *Xenopus* και του εμβρύου της όρνιθας.

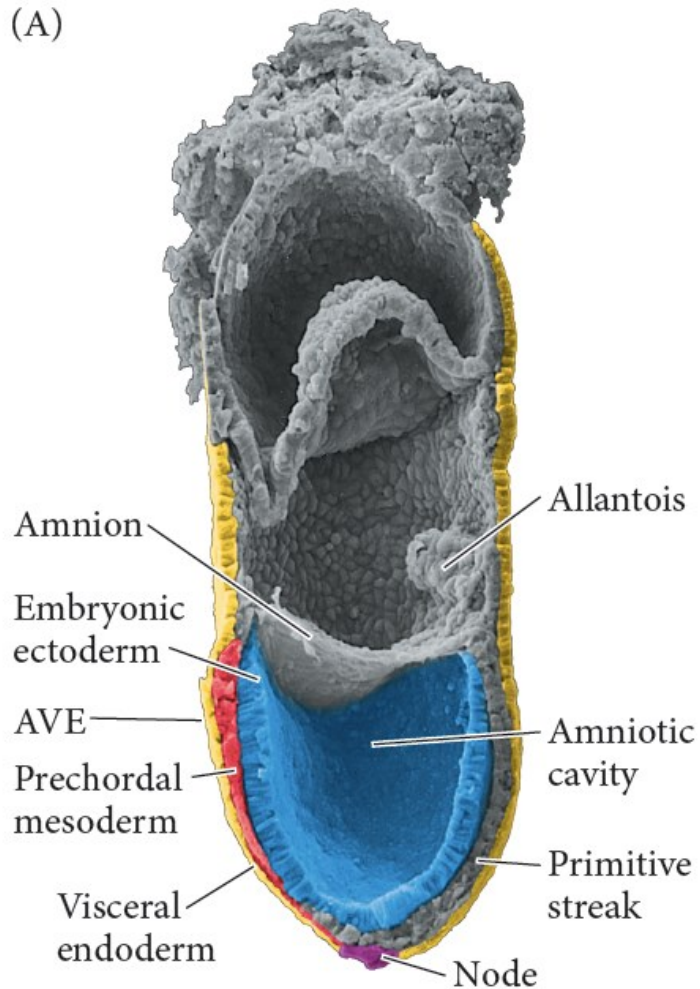
Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο κέντρα ελέγχου: ο κόμβος (node) και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (ΕΣΕ ή AVE- Anterior Visceral Endoderm).

Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

(A)



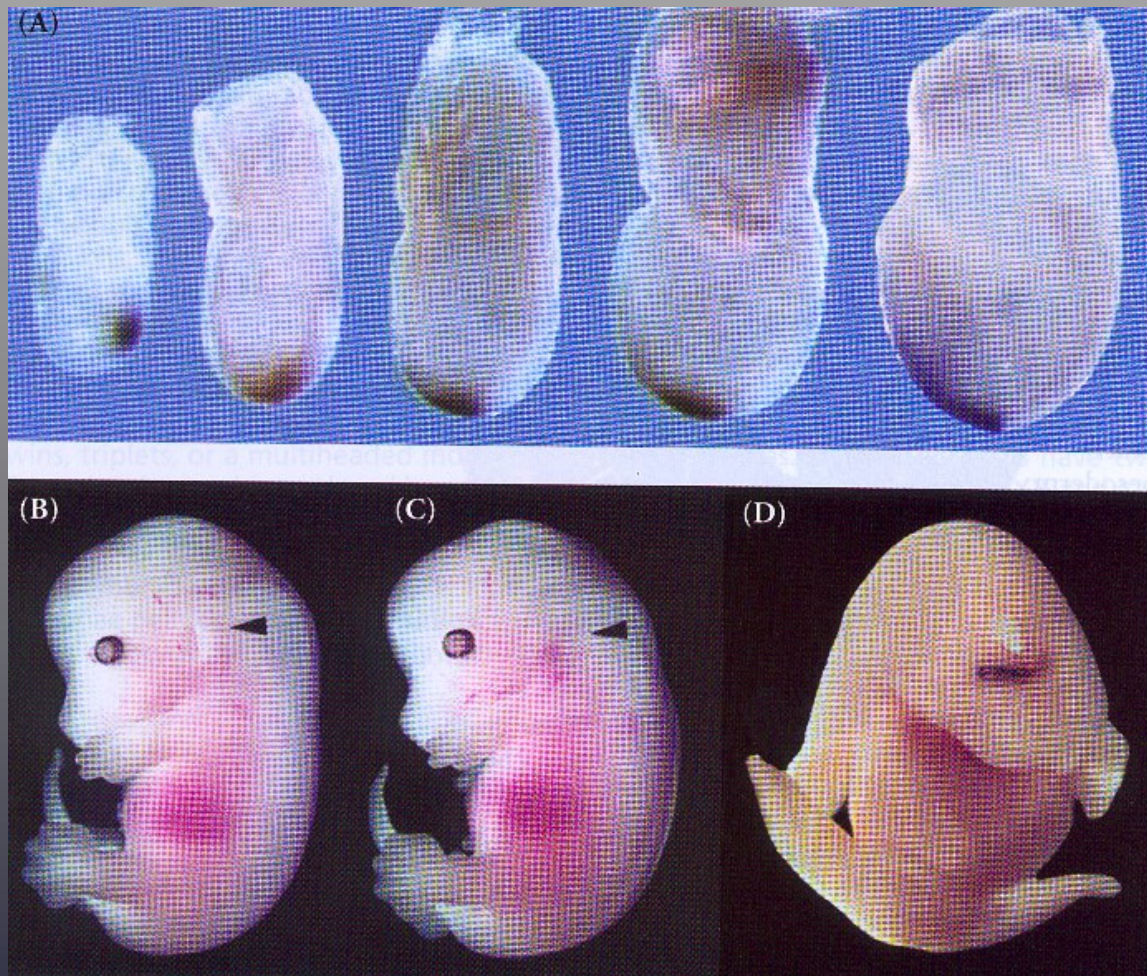
- BMP4 από το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα επάγει τα κύτταρα της επιβλάστης να παράγουν Wnt3a και Nodal.
- Το AVE (Εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα) παρεμποδίζει τη σηματοδότηση καθώς παράγει Cerberus, Lefty-1, Dickkopf. Θυμηθείτε τι γίνεται στα αμφίβια!!!!
- Ο κόμβος (εμπρόσθιο τμήμα τη αρχικής γραμμής) παράγει Chordin, η νωτοχορδή Noggin.
- Ο Wnt3a ενεργοποιεί το *Brachyury* στο μελλοντικά οπίσθιο τμήμα (αρχική γραμμή).

Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και ο κόμβος

Knock out noggin και chordin (Εικ. Α).

Έμβρυα ομόζυγα για μεταλλάξεις που αδρανοποιούν την chordin (Εικ. C) ή noggin έχουν ήπιο φαινότυπο, όμως διπλές μεταλλάξεις (Εικ. D) έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια εμπρόσθιων δομών (προσεγκέφαλος, πρόσωπο, μύτη).

Τι επάγει τον κόμβο και το AVE;



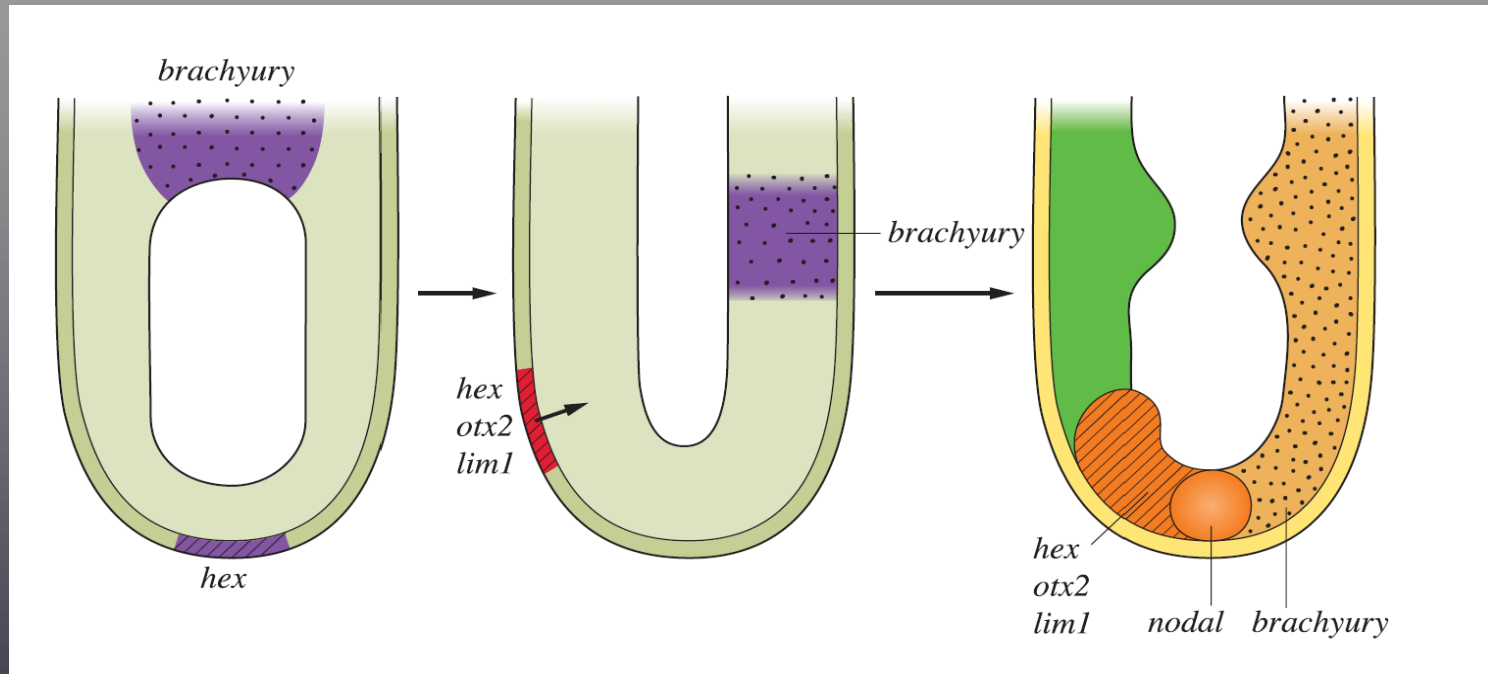
Bachiller et al. Nature, 403: 658-661

Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

ko nodal : αδυναμία σχηματισμού προτύπου

ko activin receptor I/II : απουσία Ε/Ο προτύπου

Ko smad2 : απουσία Ε/Ο προτύπου



➤ Έκφραση hex (dickkopf, lefty, cerberus like) στο σπλαχνικό ενδόδερμα (περιφέρεια).

➤ Έκφραση του brachyury στο κεντρικό τμήμα της επιβλάστης.

➤ Η έκφραση των μορίων αυτών επάγεται από BMP4 που εκφράζεται από τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς

Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα

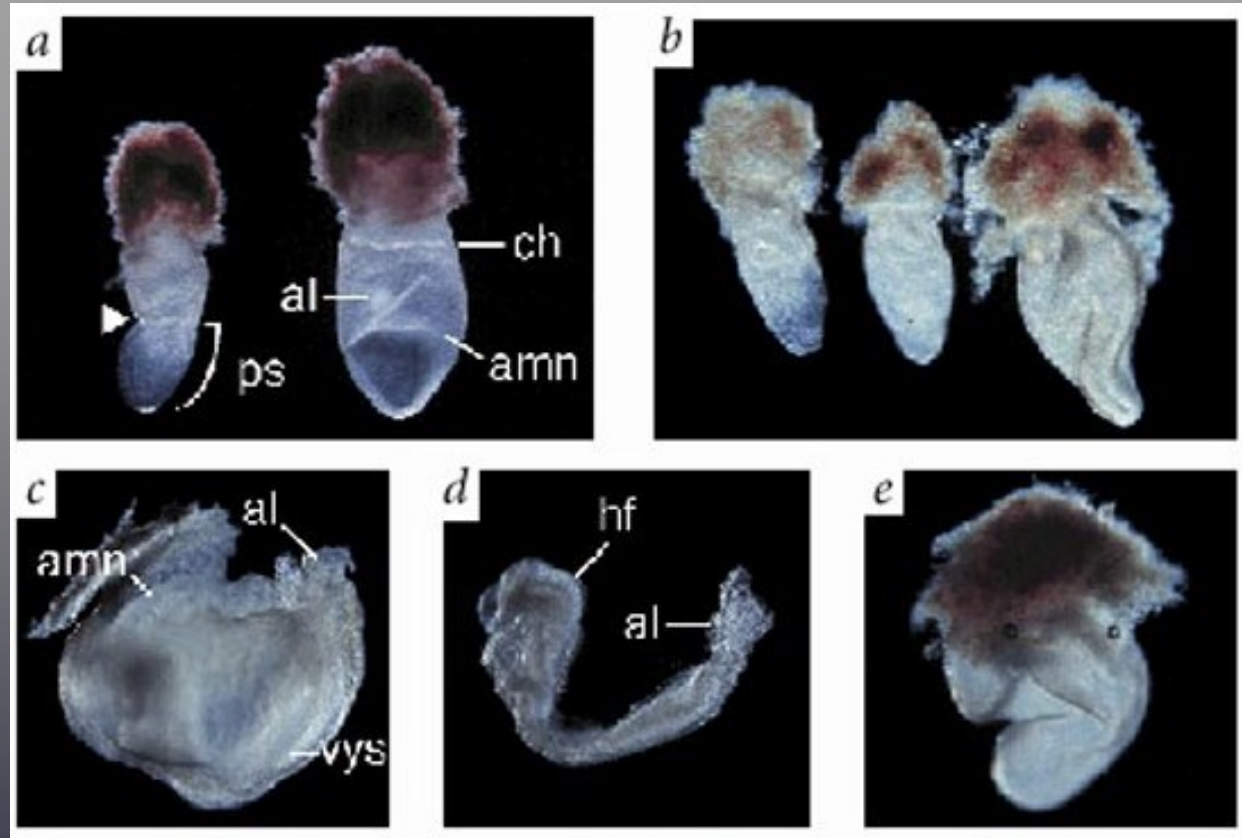
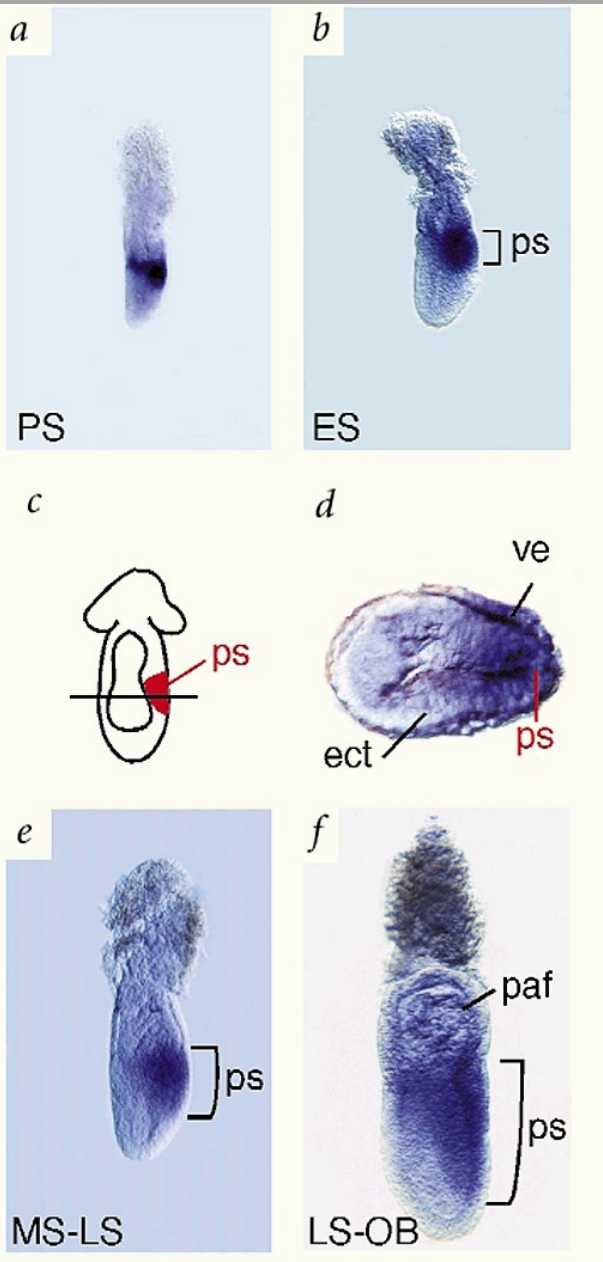
➤ Το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα σχηματίζεται στο εμπρόσθιο πάντα άκρο πριν από τον κόμβο, και η αρχική γραμμή δημιουργείται ακριβώς απέναντί του.

➤ Το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα εκφράζει μια σειρά γονιδίων που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό της κεφαλής (*Lim-1*, *Otx-2*, *Hesx-1*, *Cerberus*). Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά οδηγούν σε ανωμαλίες στο σχηματισμό της κεφαλής ή του εγκεφάλου.



Ο φαινότυπος των ποντικών στα οποία έχει γίνει knock out το γονίδιο *Lim-1*.
(Swalot , W. and R. Behringer. *Nature*, 374: 425-430)

Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



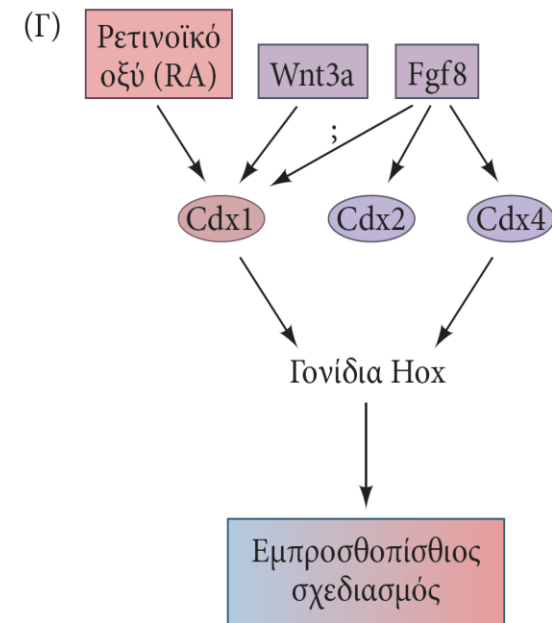
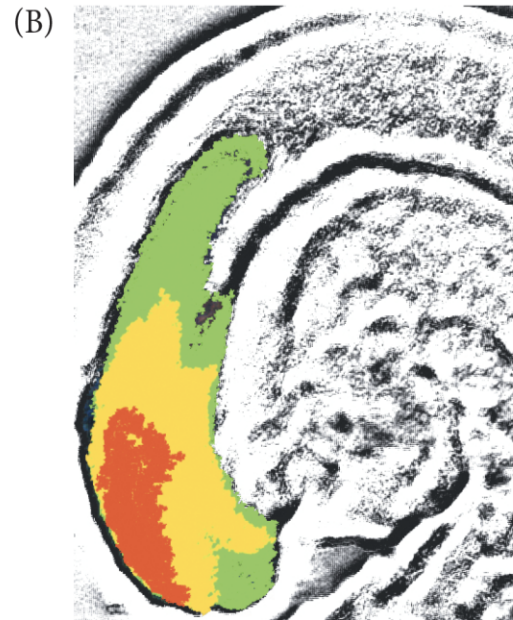
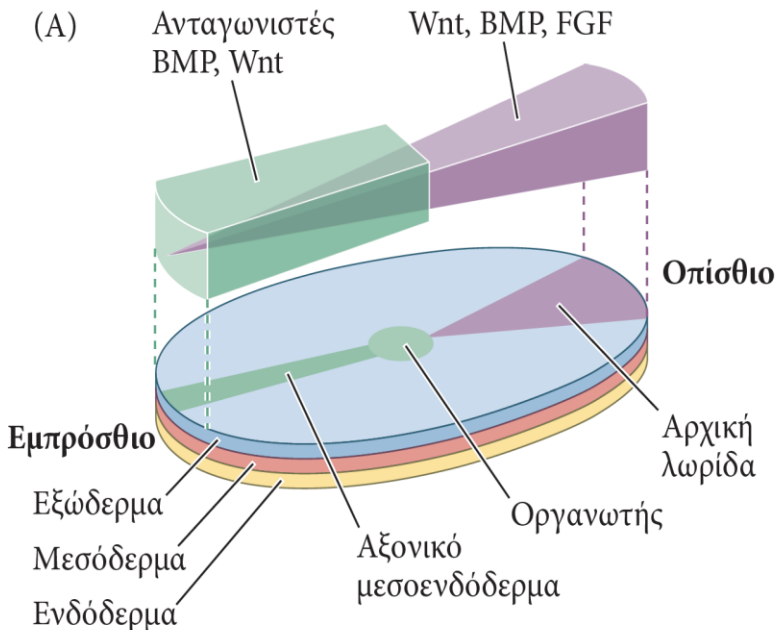
↗ wnt3 ko

↗ Η έκφραση του wnt3

Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

➤ Cdx-Hox

- Διαβαθμίσεις συγκέντρωσης των BMP Wnt, και FGF σε ένα έμβρυο ποντικού (flat mount).
- Στην όψιμη γαστριδίωση η αρχική γραμμή είναι Wnt και BMP ενώ ο κόμβος και το AVE, παράγουν ανταγωνιστές των μονοπατιών.
- Ο Fgf8 εκφράζεται με υψηλότερα επίπεδα στο οπίσθιο τμήμα (B) in situ με διαφορετικούς χρόνους έκθεσης).
- Η νωτοχορδή παράγει ρετινοϊκό οξύ.
- Ενεργοποίηση οικογένειας Cdx που ενεργοποιεί τα Hox.



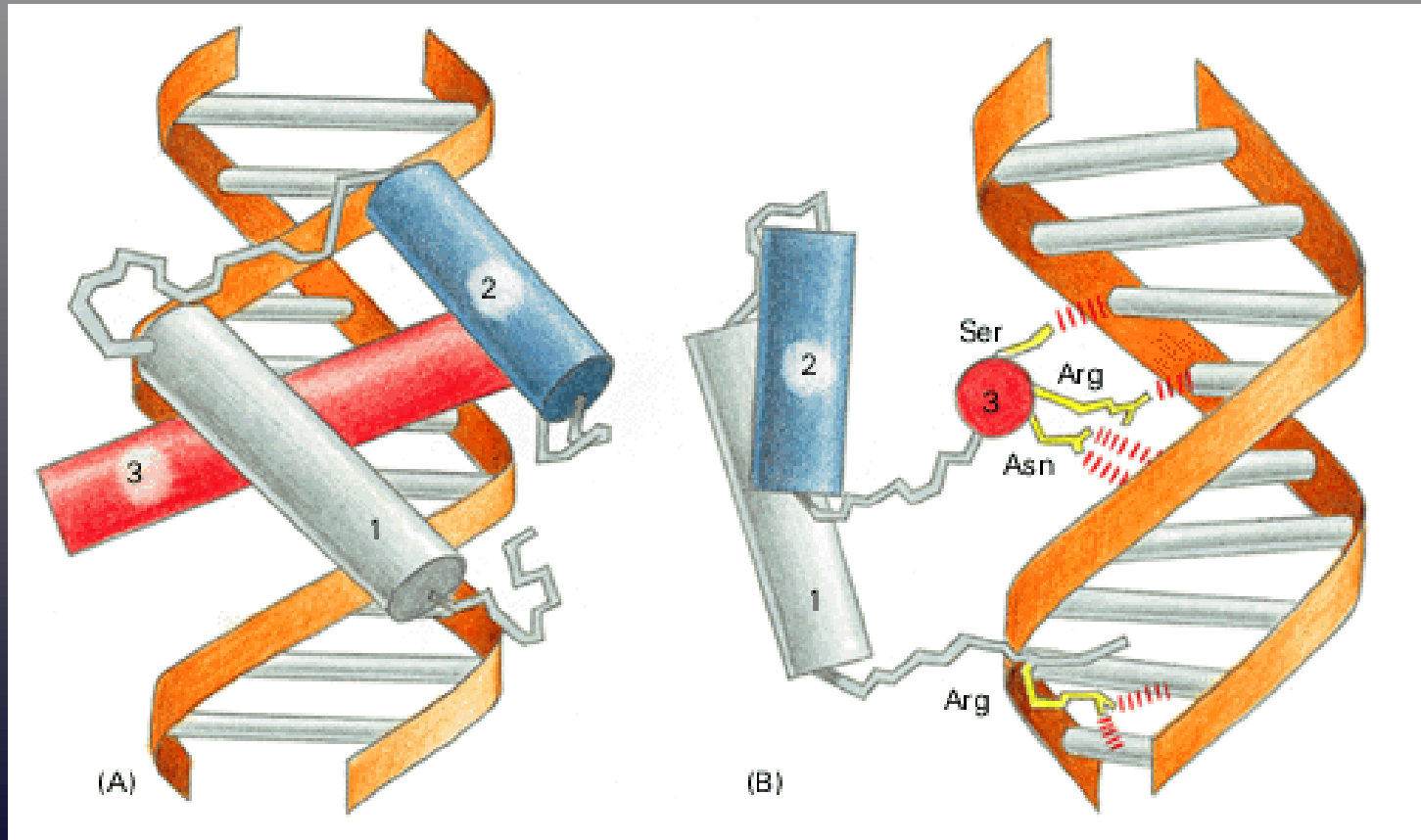
Καθορισμός αξόνων : ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και τα γονίδια *Hox*

Nature works constantly with the same materials. She is ingenious to vary only the forms. As if in fact she were restricted to the same primitive ideas, one sees her tend always to cause the same elements to reappear, in the same number, in the same circumstances, and with the same connections. (Geoffrey Saint-Hilaire, 1807)

Evo-Devo: εξέλιξη και ανάπτυξη

Τα γονίδια *Hox*

- Μεταγραφικοί παράγοντες που περιέχουν την ομοιοεπικράτεια, μια περιοχή μήκους 60aa με την χαρακτηριστική δομή έλικα-στροφή-έλικα.
- Περιγράφηκαν για πρώτη φορά στη *Drosophila* - μεταλλάγές τους προκαλούν ομοιώτικο μετασχηματισμό.
- Είναι οργανωμένα σε συμπλέγματα και έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς οργανισμούς.

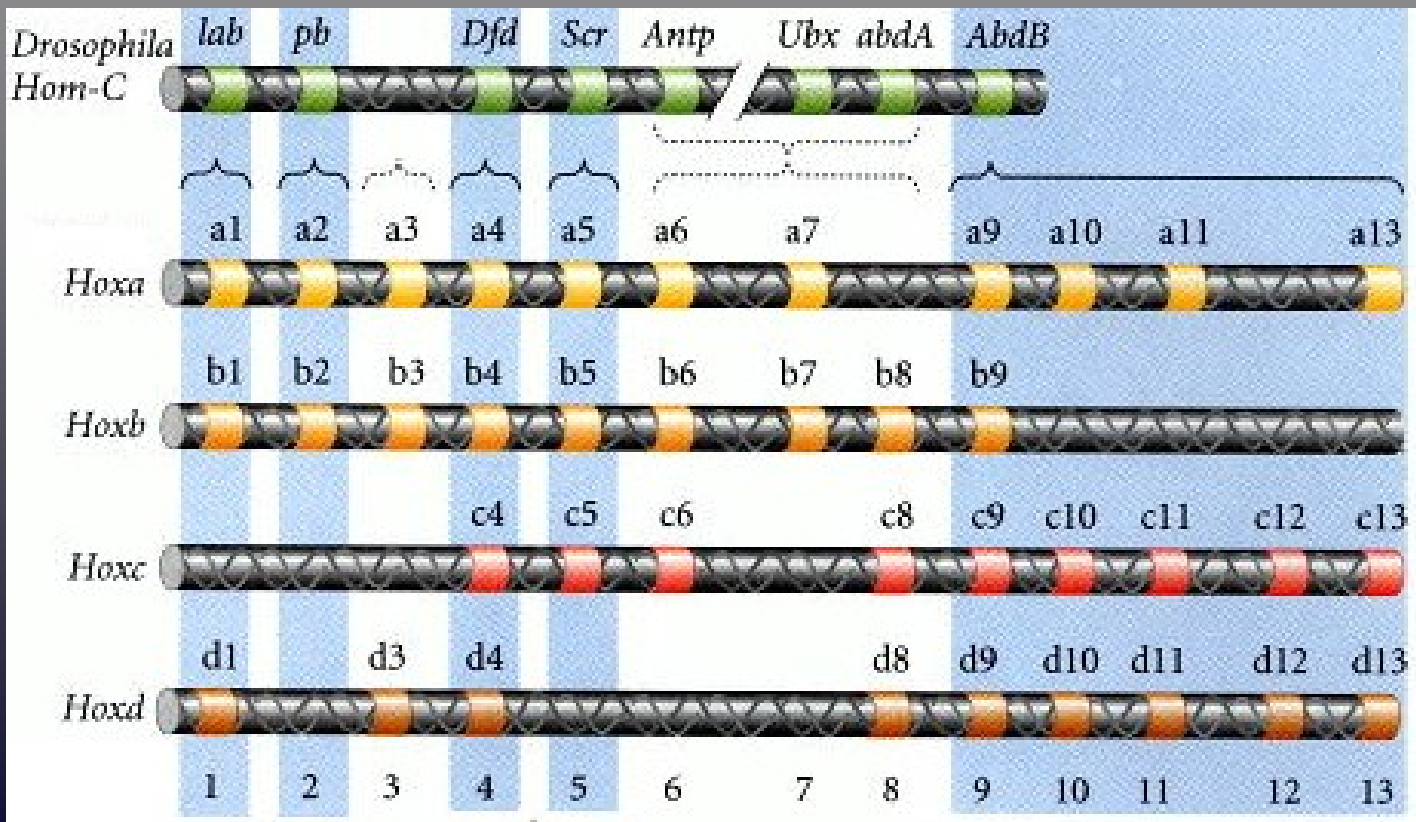


Τα γονίδια *Hox*

➤ Τα γονίδια *Hox* των σπονδυλοζώων είναι ομόλογα με αυτά του συμπλέγματος *Antennapedia* της *Drosophila*.

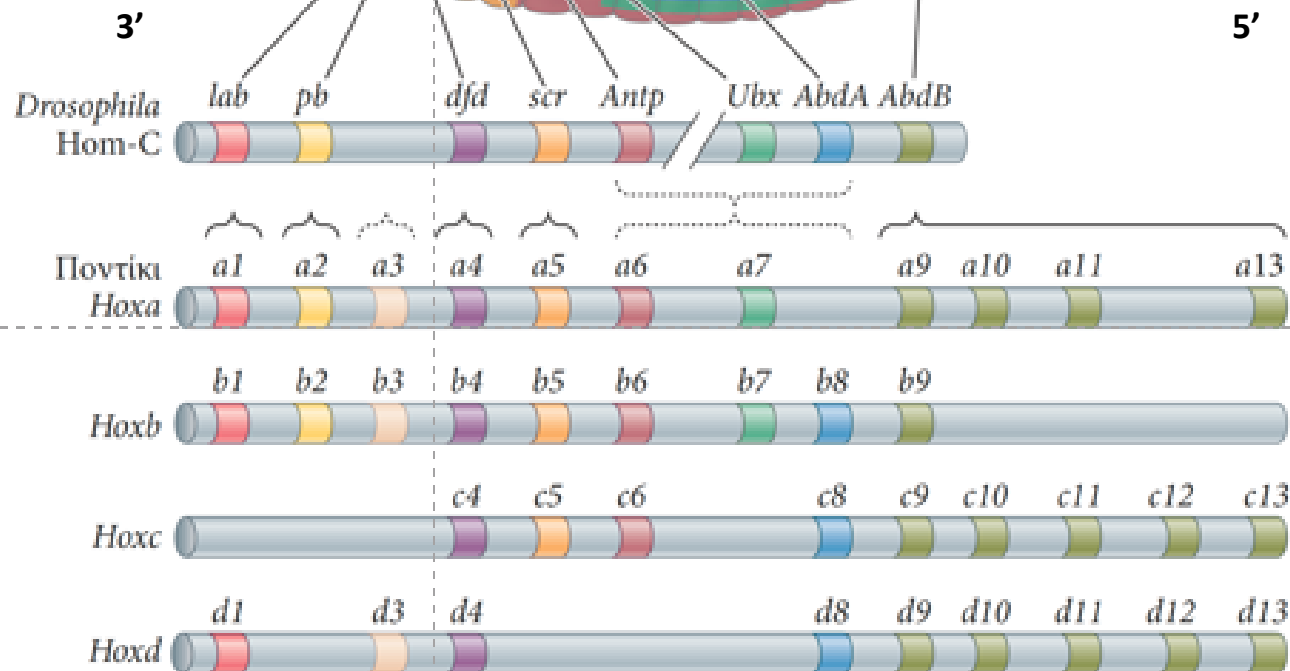
➤ Στον ποντικό (και στον άνθρωπο) υπάρχουν τέσσερα μη συνδεδεμένα συμπλέγματα που ονομάζονται *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* και *Hoxd* και εδράζονται στα χρωμοσώματα 6, 11, 15 και 2 αντίστοιχα.

➤ Τα συμπλέγματα αυτά έχουν προκύψει από διαδοχικούς διπλασιασμούς ενός αρχέγονου συμπλέγματος (απλά χορδωτά [αμφίοξος] έχουν ένα μόνο σύμπλεγμα *Hox*).

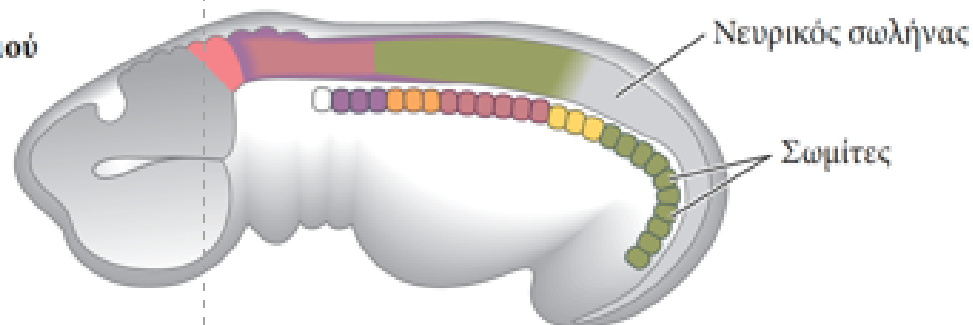


Τα γονίδια *Hox*

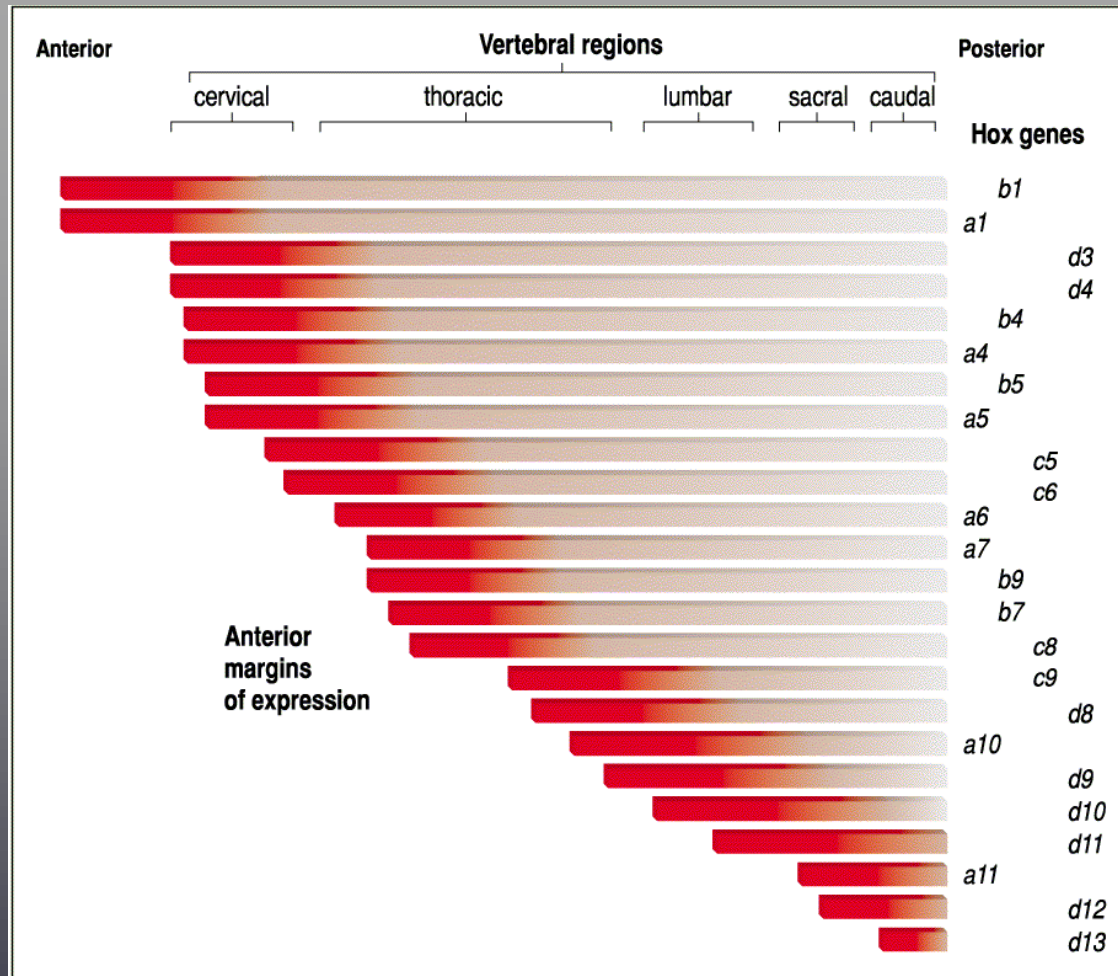
Έμβryo *Drosophila*
(10 ωρών)



Έμβryo ποντικού
(12 ημερών)



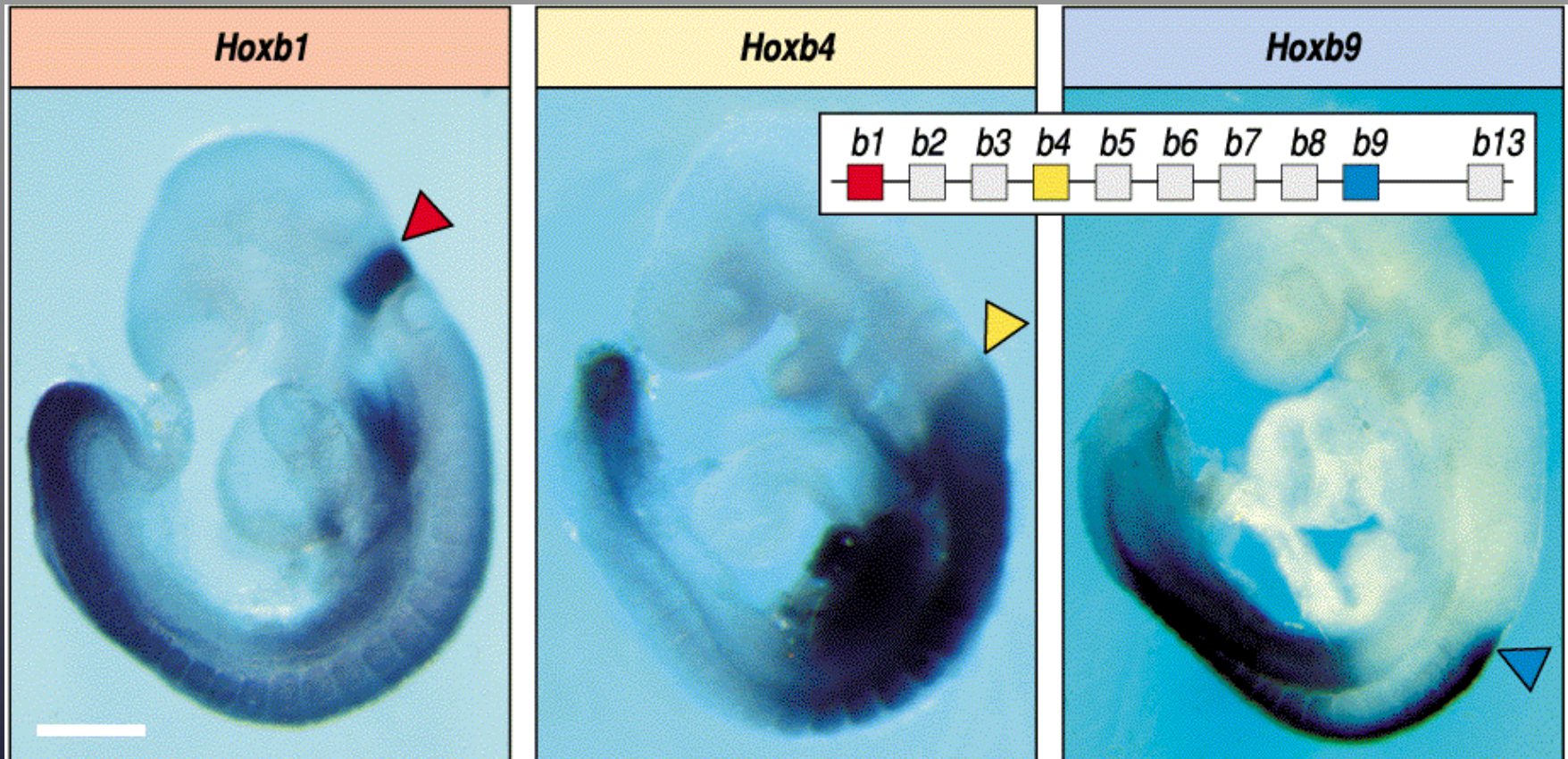
Τα γονίδια *Hox* και τα πρότυπα έκφρασής τους



➤ Τα γονίδια *Hox* εκφράζονται με καθορισμένη χωροχρονική σειρά κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Αυτά που εδράζονται στο 3' του συμπλέγματος εκφράζονται πιο μπροστά και πιο νωρίς κατά την ανάπτυξη. Τα μέλη μιας υποομάδας παραομολόγων (π.χ. *Hoxa1*, *Hoxb1*) έχουν πολύ παρόμοιο πρότυπο έκφρασης.

Τα γονίδια *Hox*

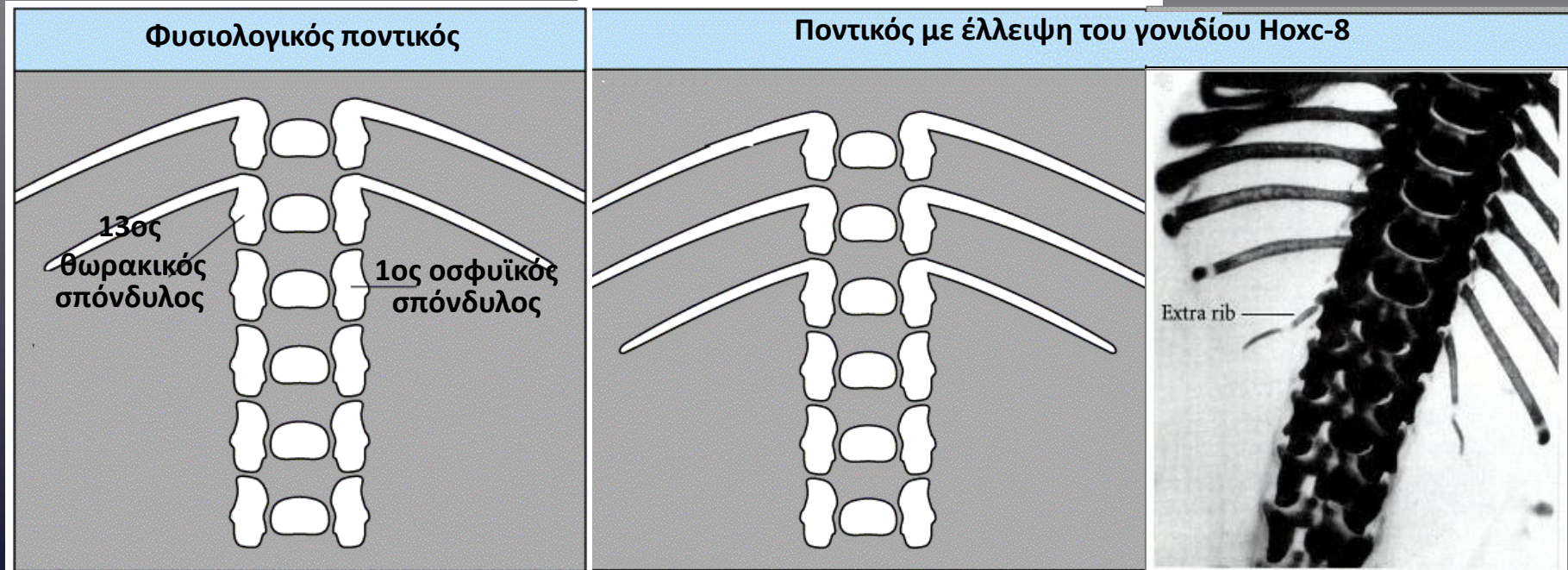
➤ Η έκφραση των γονιδίων *Hox* στα θηλαστικά ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τη *Drosophila*. Έτσι τα ομόλογα των των *labial*, *proboscipedia* και *deformed* εκφράζονται στο εμπρόσθιο τμήμα ενώ τα ομόλογα του *Abdominal-B* στο οπίσθιο.



Έκφραση των *Hoxb1*, *Hoxb4* και *Hoxb9* σε έμβρυο ποντικού.

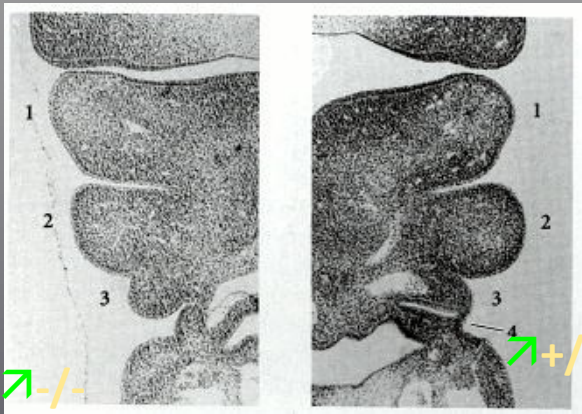
Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

➤ Μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της ενεργότητας των γονιδίων *Hox* οδηγούν πολλές φορές σε ομοιωτικό μετασχηματισμό. Οι μεταλλάξεις αυτές ονομάζονται ομοιωτικές. Ο φαινότυπος εμφανίζεται στο εμπρόσθιο όριο της έκφρασής του γονιδίου και όργανα ή δομές μετασχηματίζονται σε αντίστοιχα όργανα ή δομές που χαρακτηρίζουν τμήματα του σώματος που βρίσκονται πιο μπροστά. Για παράδειγμα έλλειψη του γονιδίου *Hoxc-8* μετετρέπει τον πρώτο οσφυϊκό σπόνδυλο σε θωρακικό, όπως συμβαίνει και με τα γονίδια του *Antp* στη *Drosophila*.



Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

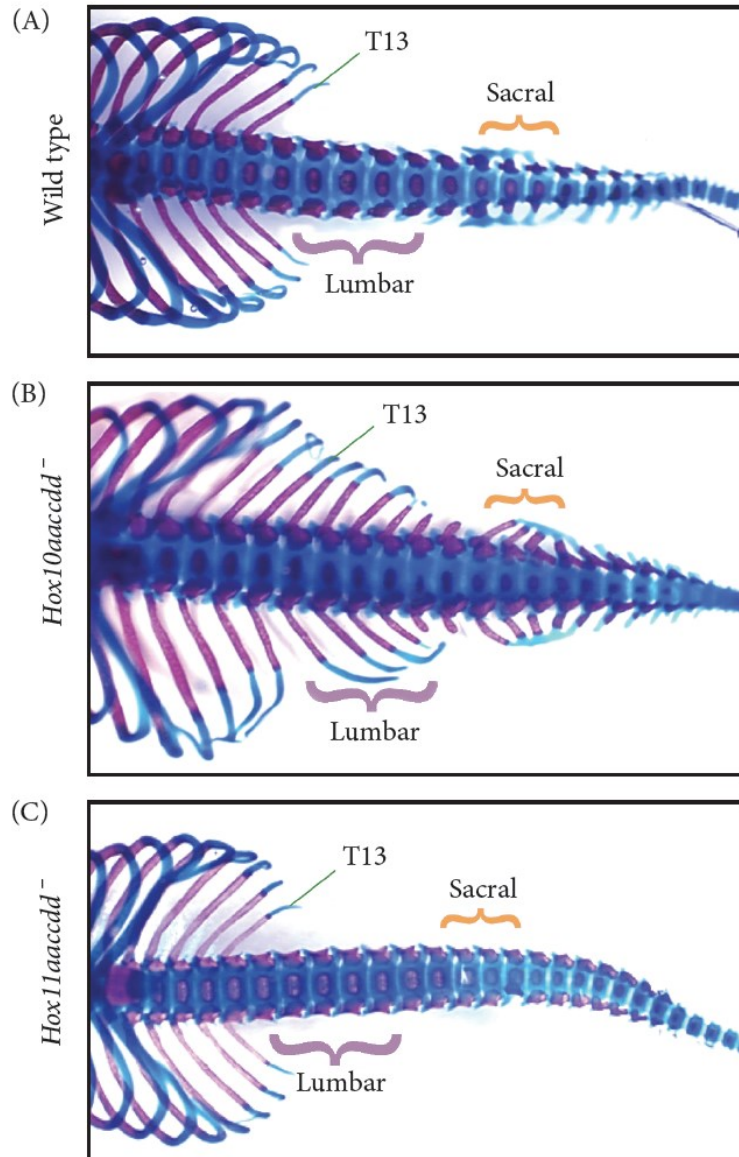
➤ Διαφορετικά γονίδια *Hox* είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό δομών και οργάνων κατά μήκος του Ε-Ο άξονα.



➤ Σε ποντικούς στους οποίους έχει γίνει knock out το *Hoxa2* υπάρχουν προβλήματα σε πολλές δομές που σχηματίζονται από τη νευρική ακρολοφία π.χ. δεν υπάρχει ο θύμος και ο παραθυρεοειδής.

➤ Τα μέλη μιας παραομόλογης ομάδας μπορούν να υποκαθιστούν το ένα το άλλο, έτσι στα απλά knock out τα προβλήματα εντοπίζονται στα όργανα/δομές εκείνες στις οποίες μόνο ένα από τα μέλη μιας παραομόλογης ομάδας εκφράζονται.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*



Axial skeletons of mice in gene knockout experiments. Each photograph is of an 18.5 day embryo, looking upward at the ventral region from the middle of the thorax toward the tail. (A) Wild-type mouse. (B) Complete knockout of *Hox10* paralogues (*Hox10^{aaccdd}*) converts lumbar vertebrae (after the thirteenth thoracic vertebrae) into ribbed thoracic vertebrae. (C) Complete knockout of *Hox11* paralogues (*Hox11^{aaccdd}*) transforms the sacral vertebrae into copies of lumbar vertebrae. (Wellik and Capecchi 2003)

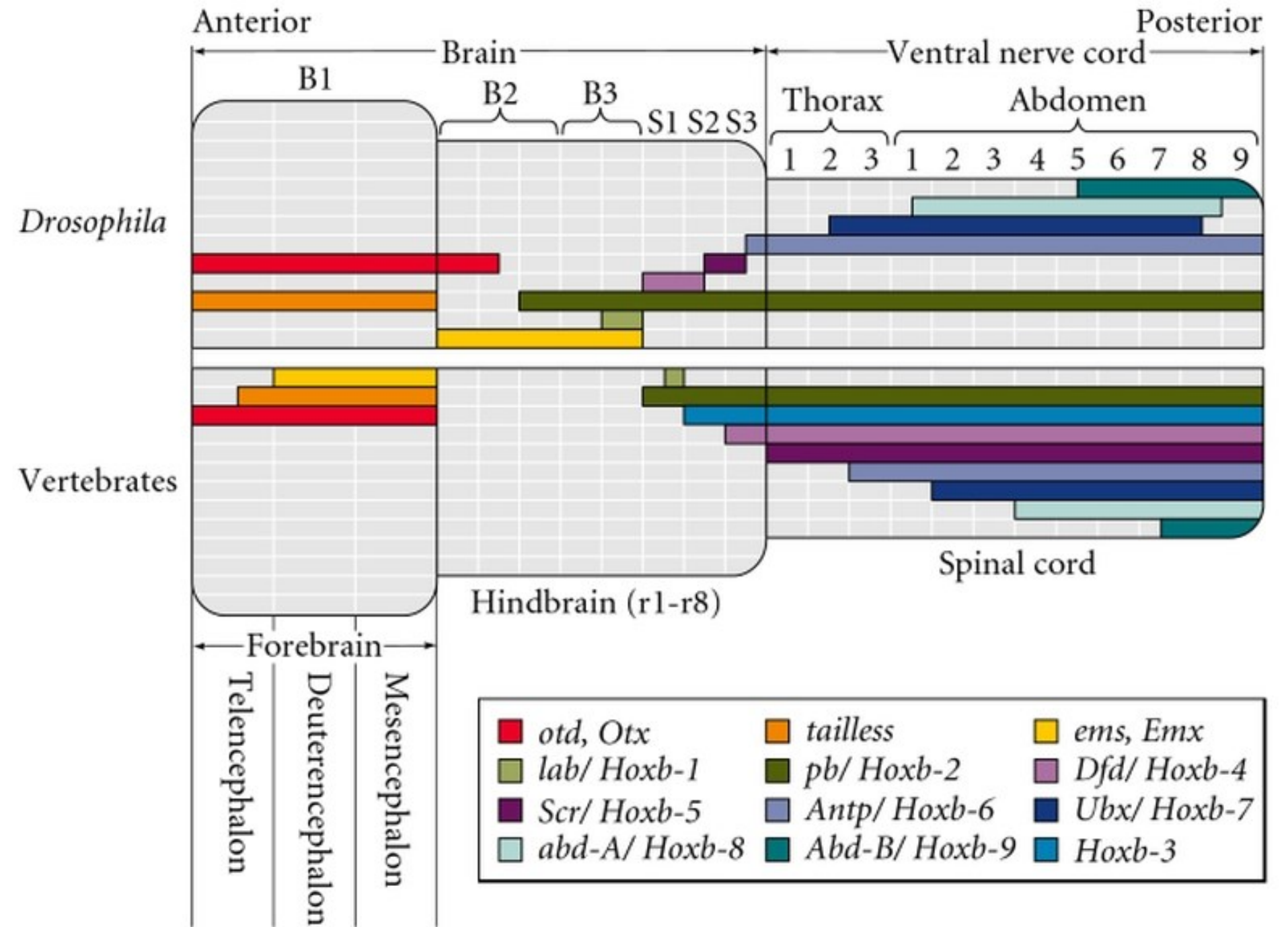
Τι θα συμβεί αν επέμβουμε στην έκφραση των *Hox*;

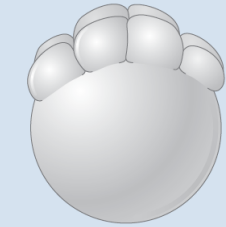
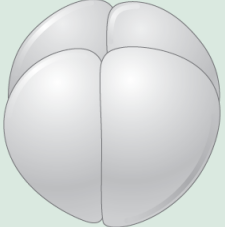
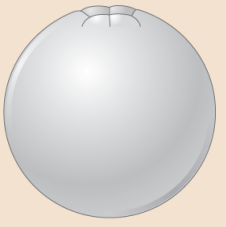
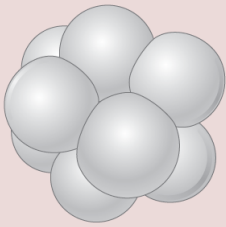
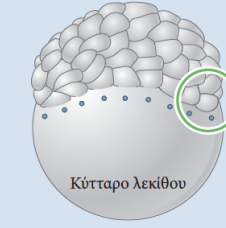
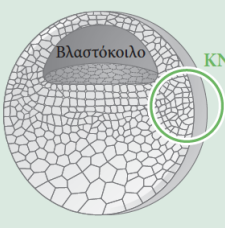
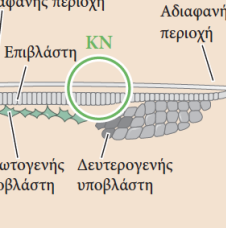
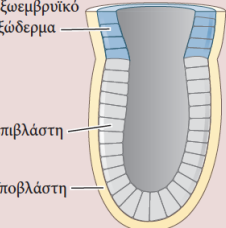
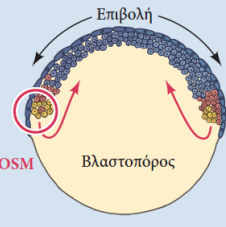
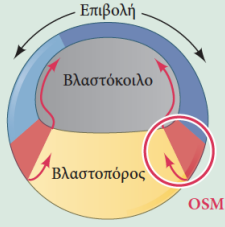
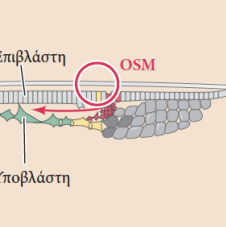
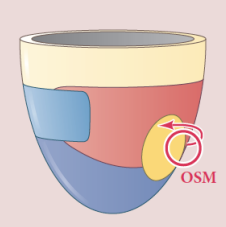
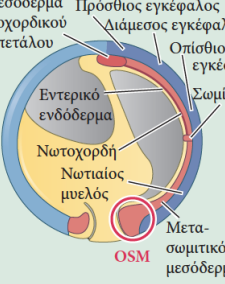
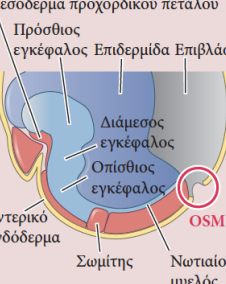
Οι υποκινητές πολλών γονιδίων *Hox* περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία και ανταποκρίνονται στο ρετινοϊκό οξύ (RA)*.



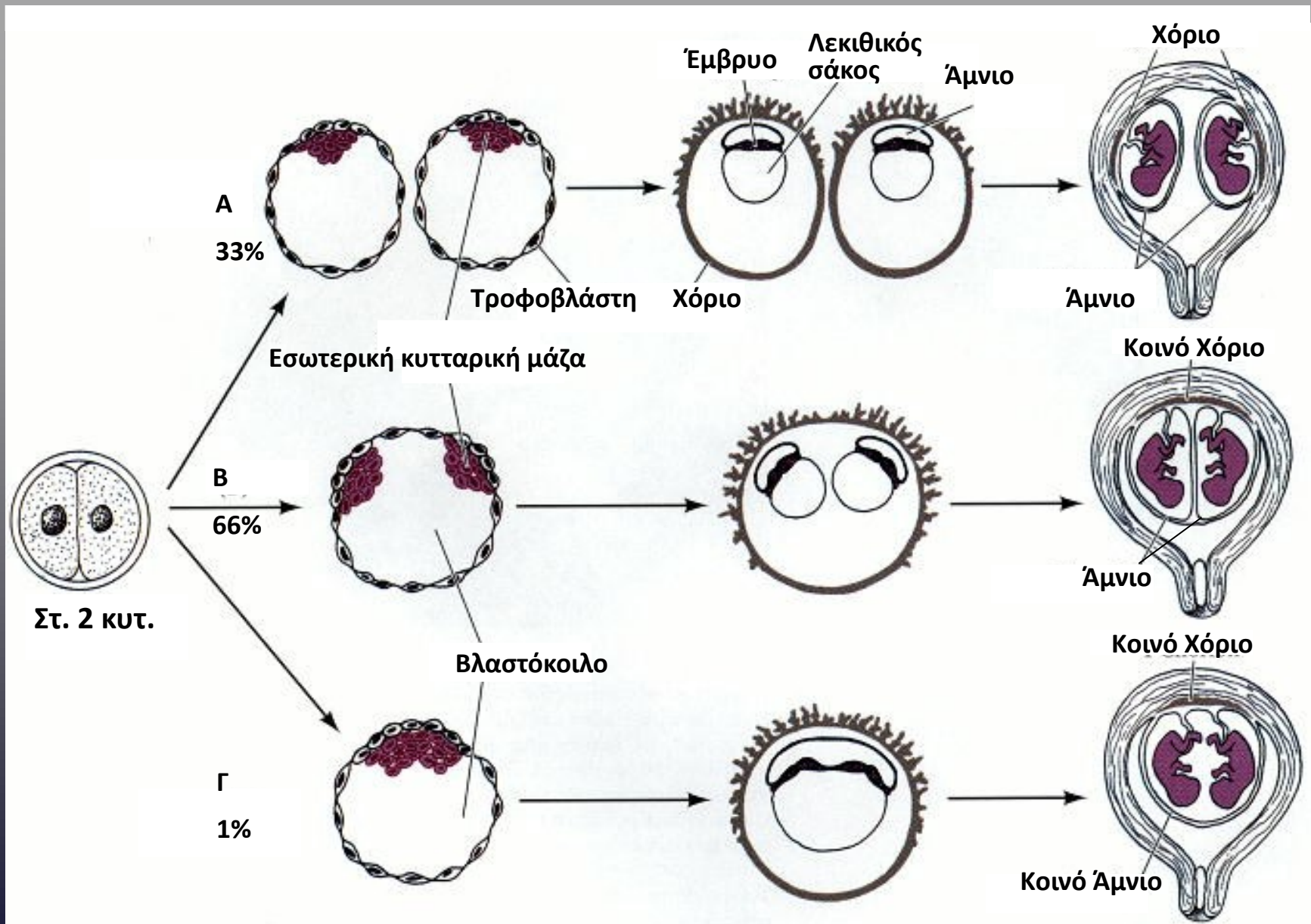
*Στο έμβρυο το RA παράγεται από τον κόμβο.

Προσθήκη RA *in utero* σε μεγάλες δόσεις οδηγεί στην έκφραση κάποιων γονιδίων *Hox* σε κυτταρικούς πληθυσμούς που φυσιολογικά δεν θα τα εξέφραζαν, και τελικά οδηγεί σε ανωμαλίες στο σχηματισμό του σκελετού. Σε ορισμένες περιπτώσεις απουσιάζει ένα τμήμα της σπονδυλικής στήλης βλ. (E).

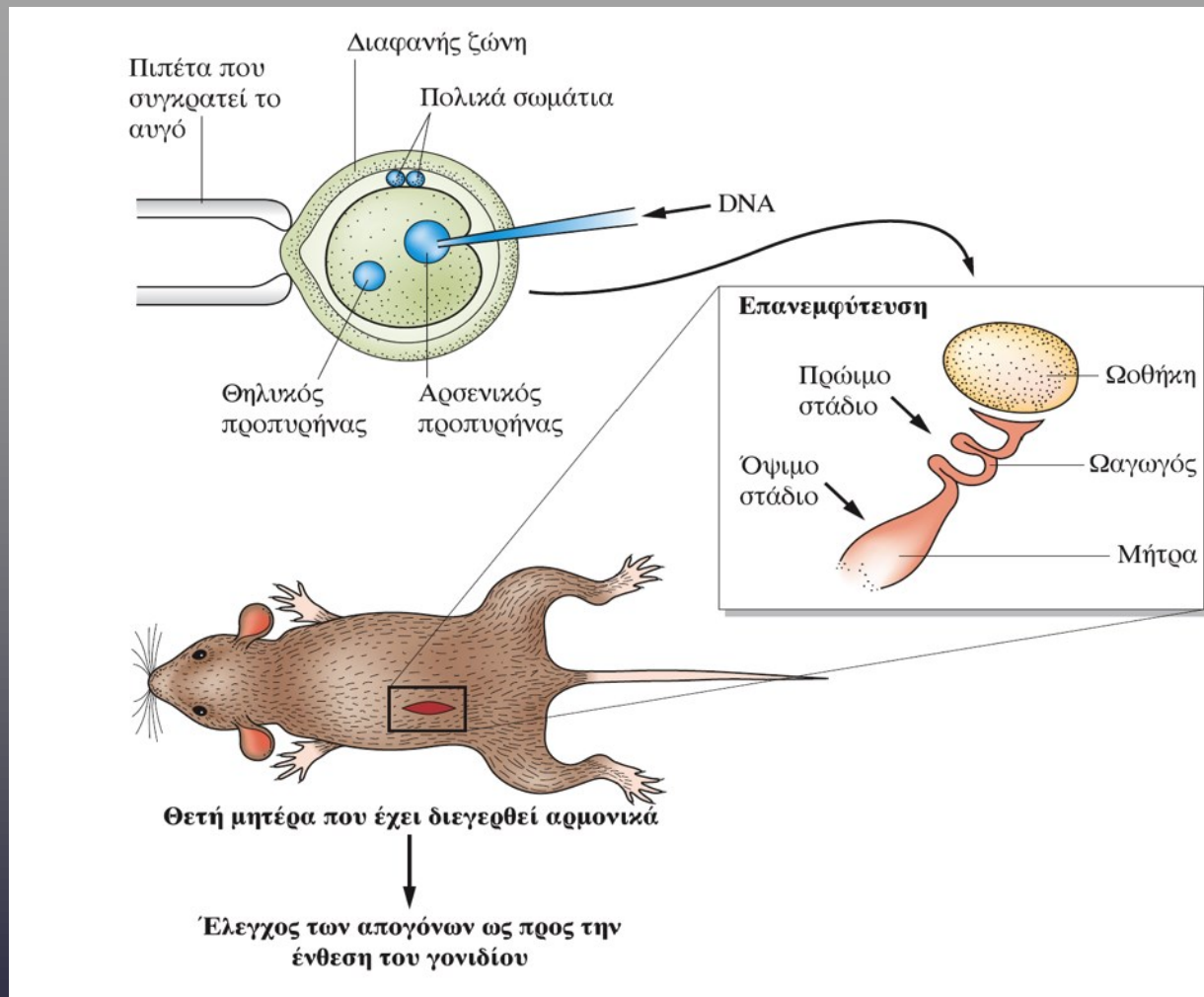


ΣΤΑΔΙΟ	Ψάρι-ζέβρα <i>Danio rerio</i>	Βάτραχος <i>Xenopus laevis</i>	Όρνιθα <i>Gallus gallus</i>	Ποντίκι <i>Mus musculus</i>
Πρώμη αυλάκωση				
Όψιμη αυλάκωση				
Πρώιμο γαστρίδιο				
Όψιμο γαστρίδιο				
Φαρυγγίδιο				

Σχηματισμός μονοζυγωτικών διδύμων (άνθρωπος)

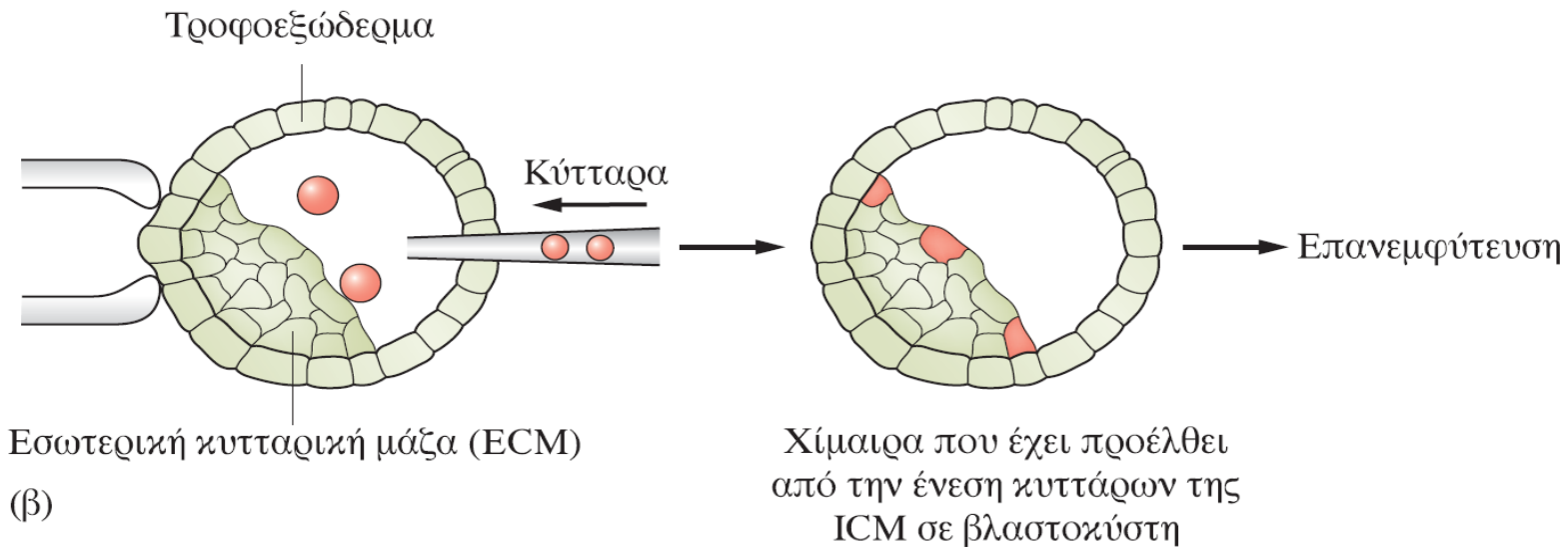
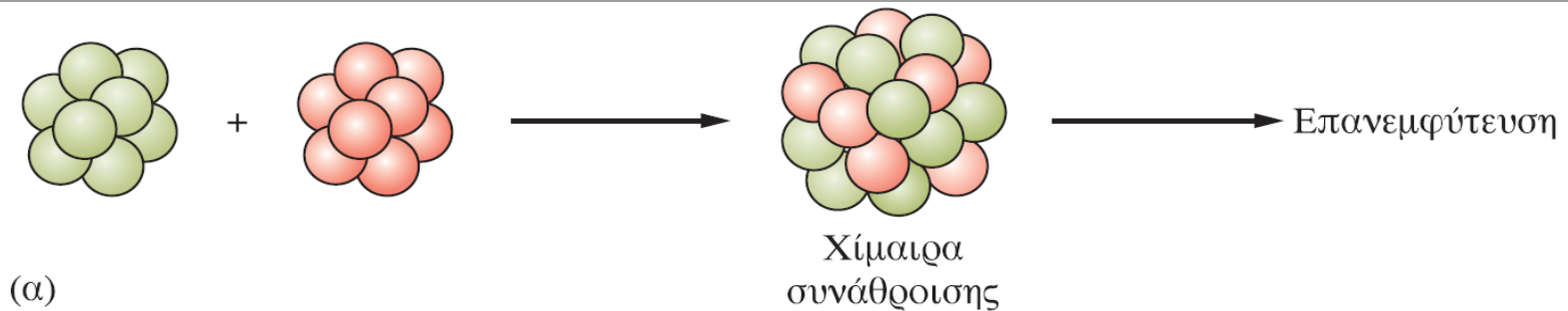


Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



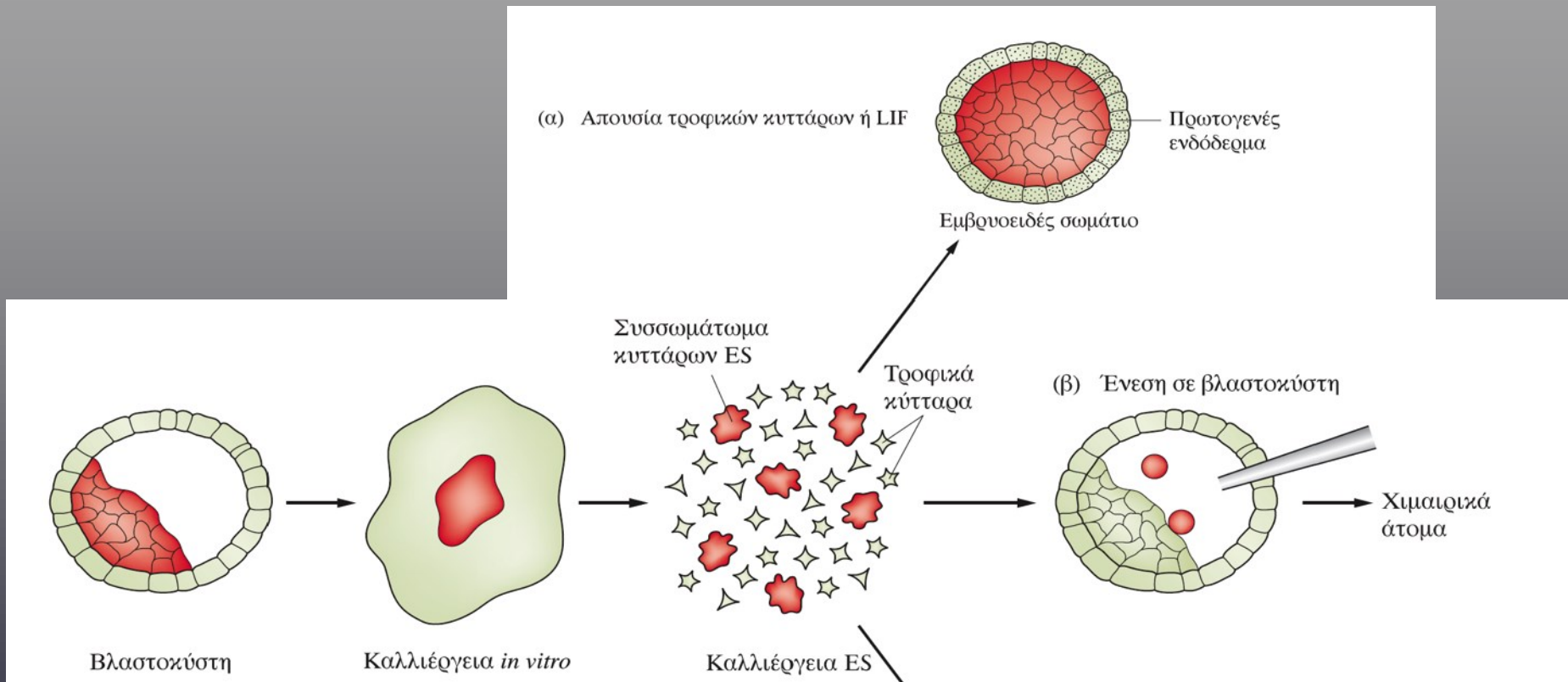
Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών ποντικών με ένεση DNA στον προπυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



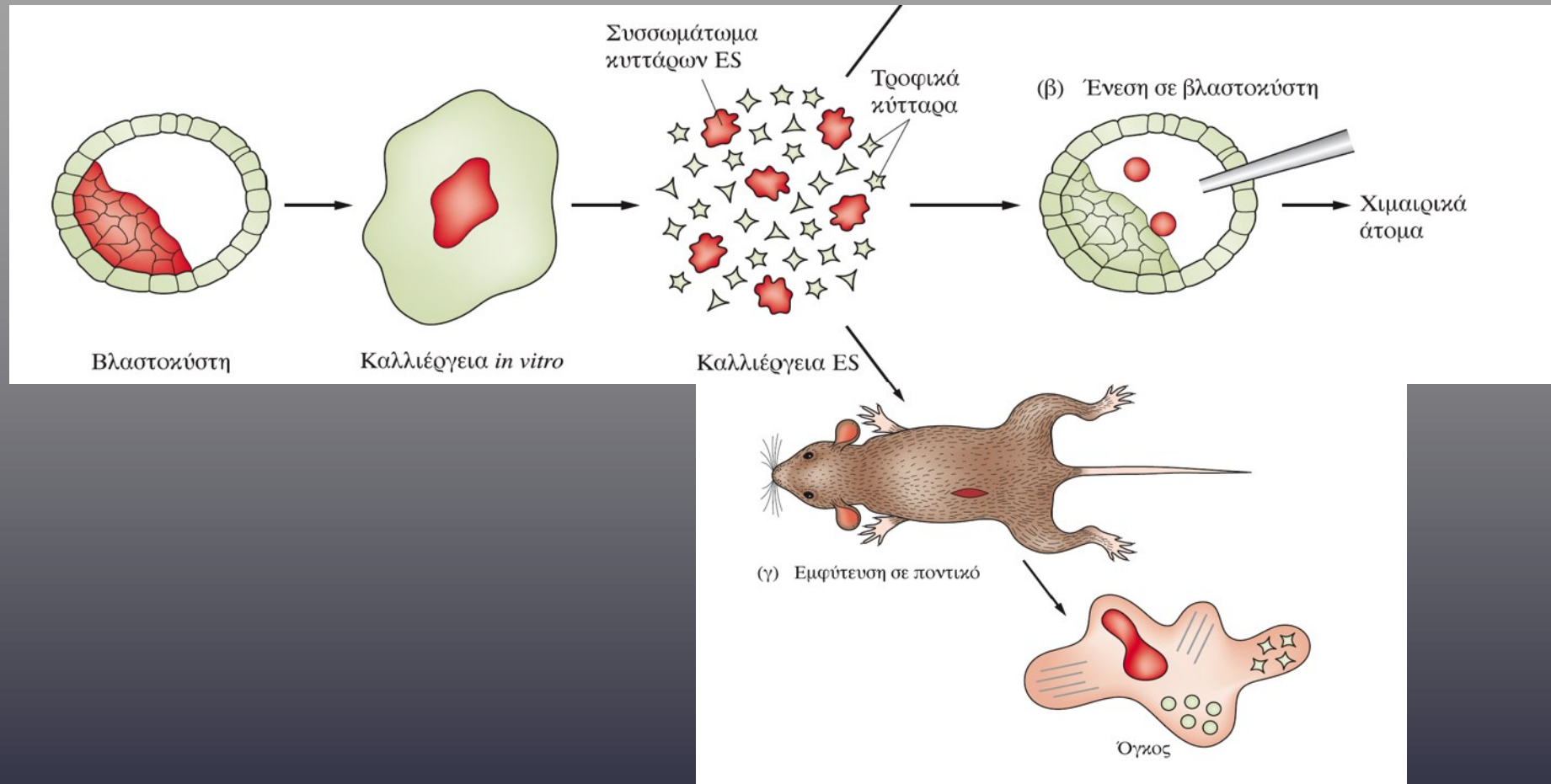
Δημιουργία χιμαιρικών ατόμων: (α) με συνάθροιση, (β) με ένεση κυττάρων στη βλαστοκύστη.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



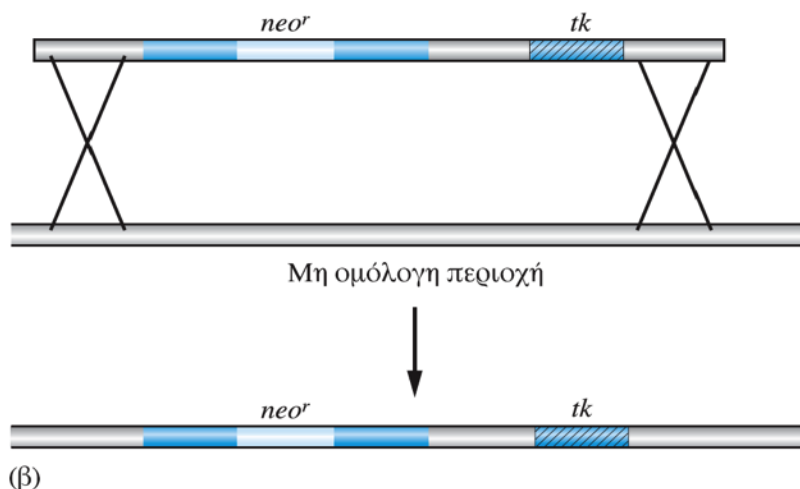
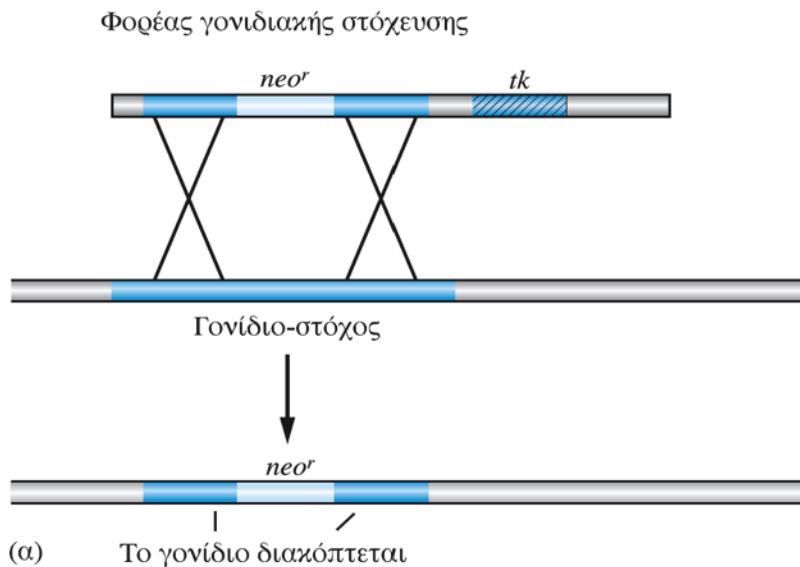
Κύτταρα ES. (α) Η αφαίρεση των τροφικών κυττάρων προκαλεί διαφοροποίηση *in vitro* των κυττάρων ES σε εμβρυοειδή σωματίδια.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



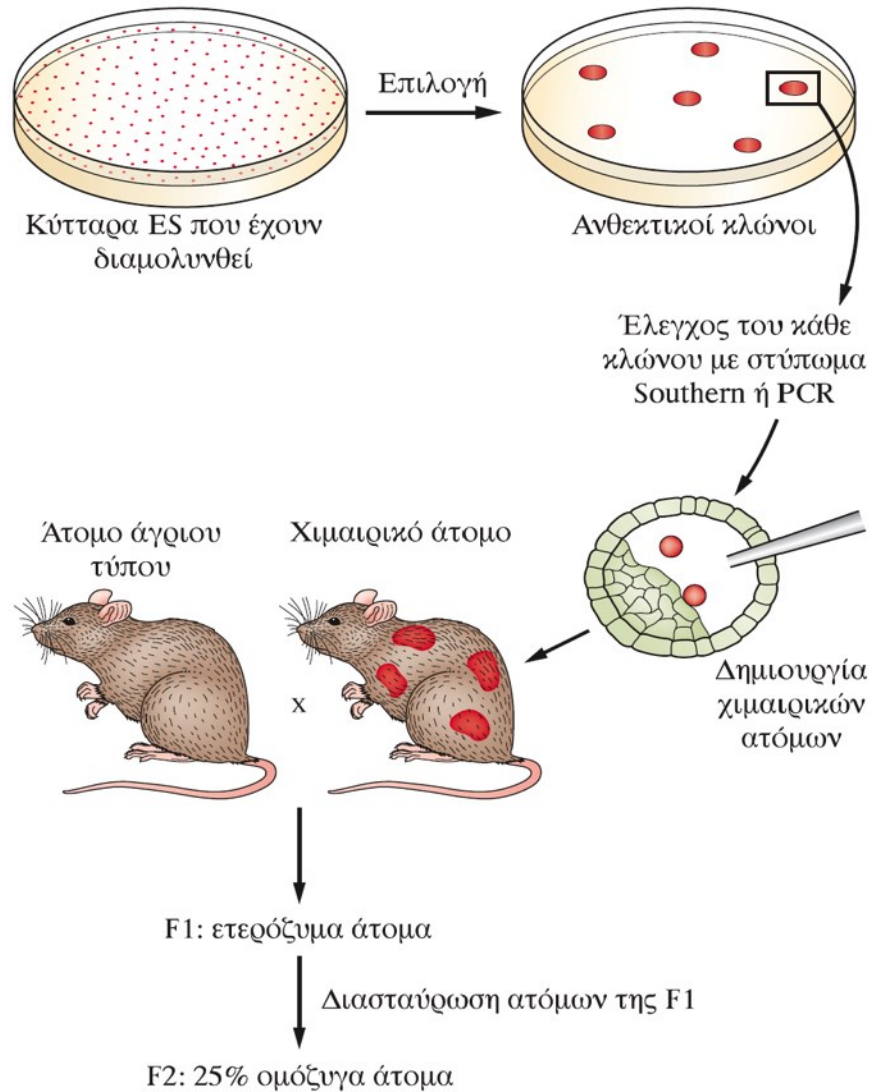
Κύτταρα ES. (β) Όταν κύτταρα ES ενίενται σε βλαστοκύστεις, τότε είναι δυνατόν να αναπτυχθούν χιμαιρικά άτομα. (γ) Όταν κύτταρα ES εμφυτεύονται κάτω από τη νεφρική κάψα, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί τερατοκαρκίνωμα.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



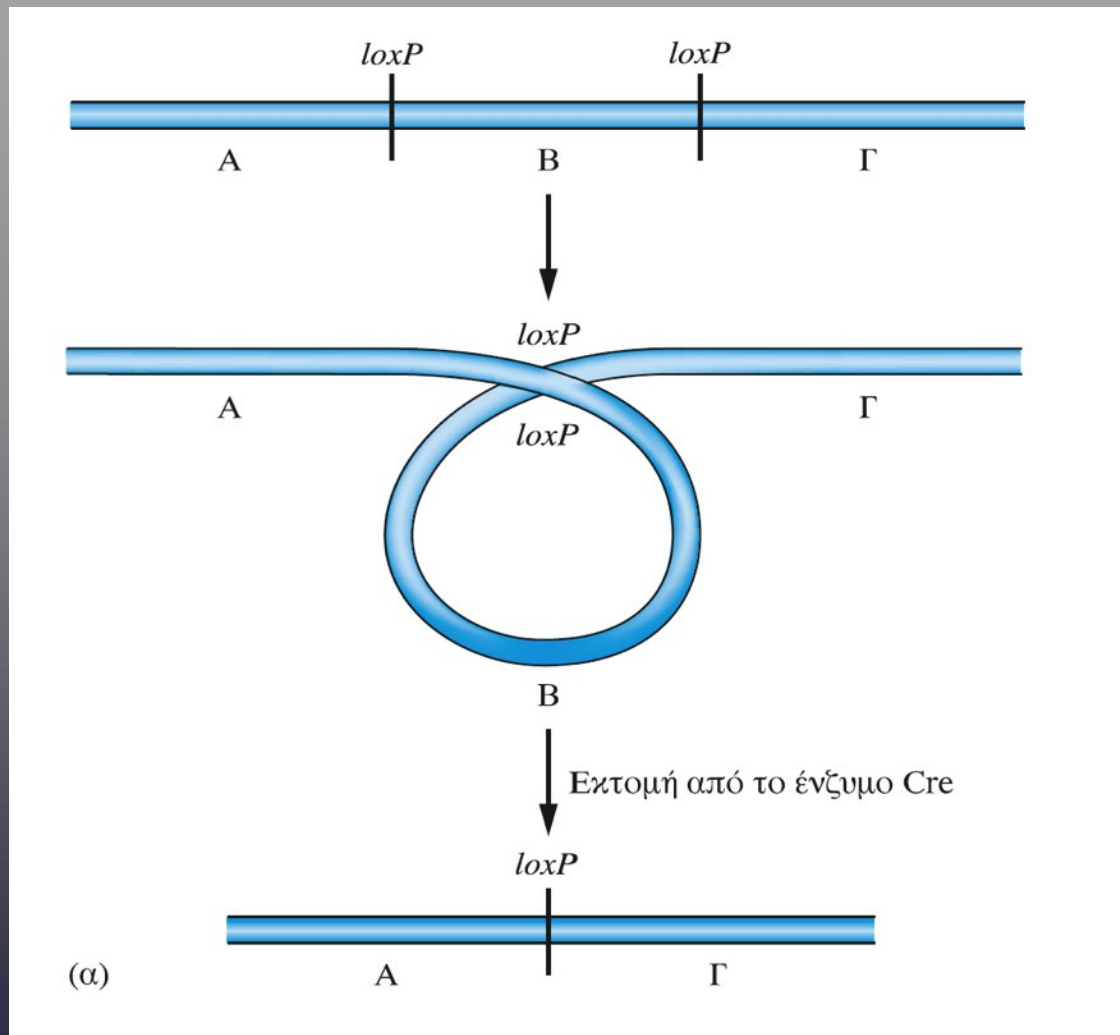
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων. (α) Ο ομόλογος ανασυνδυασμός διαταράσσει το γονίδιο-δέκτη και προκαλεί ένθεση του *neo^r* αλλά όχι του *tk*. (β) Η απλή ένθεση έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή του *neo^r* και του *tk* στο γονιδίωμα.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



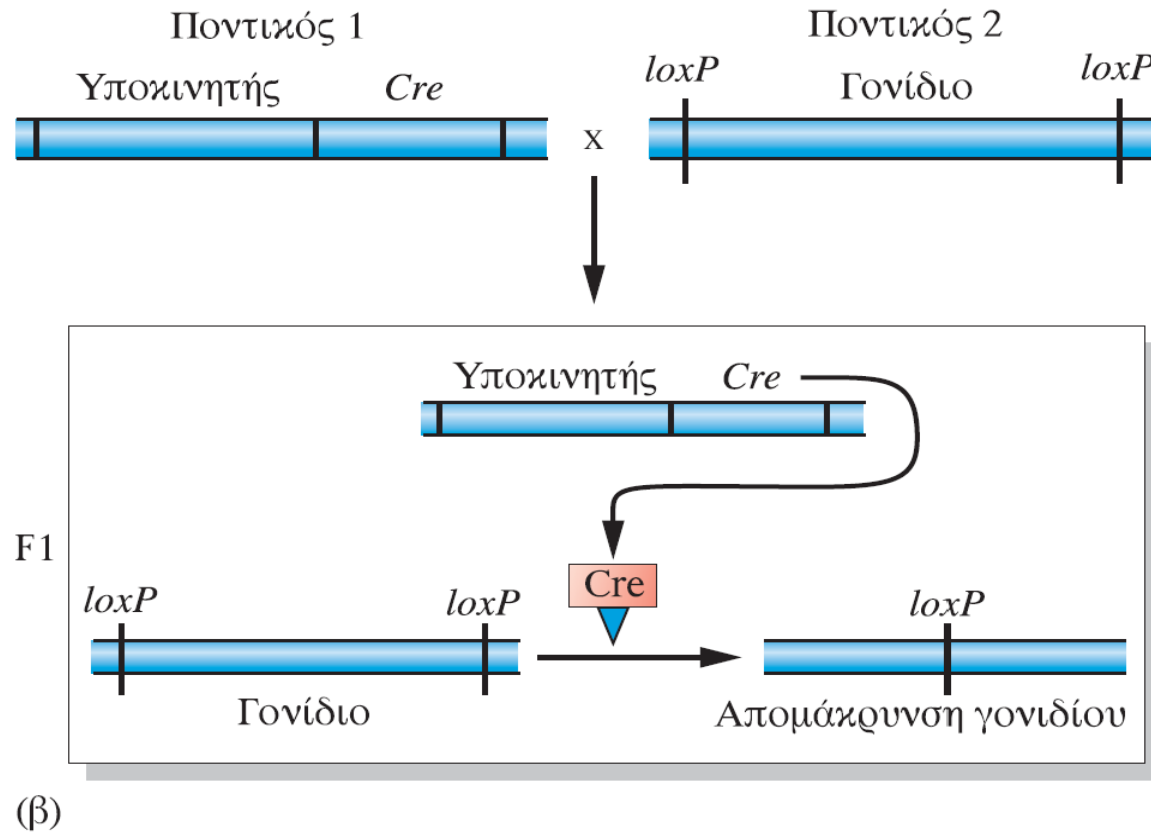
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε κύτταρα ES.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



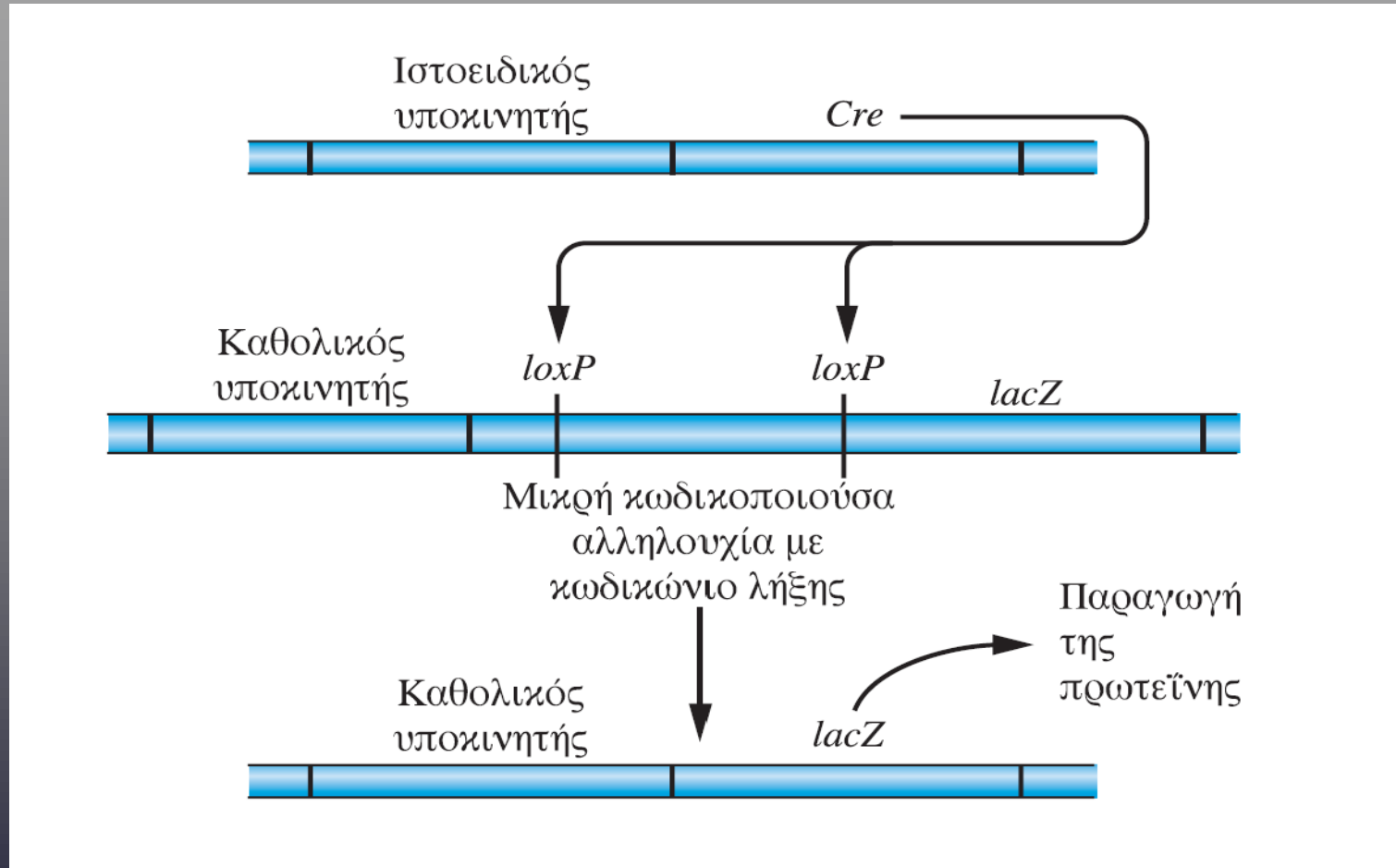
Σύστημα *cre-lox*. (α) Το ένζυμο ανασυνδυασμού Cre αποκόπτει το DNA που εντοπίζεται ανάμεσα σε δύο θέσεις *loxP*.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



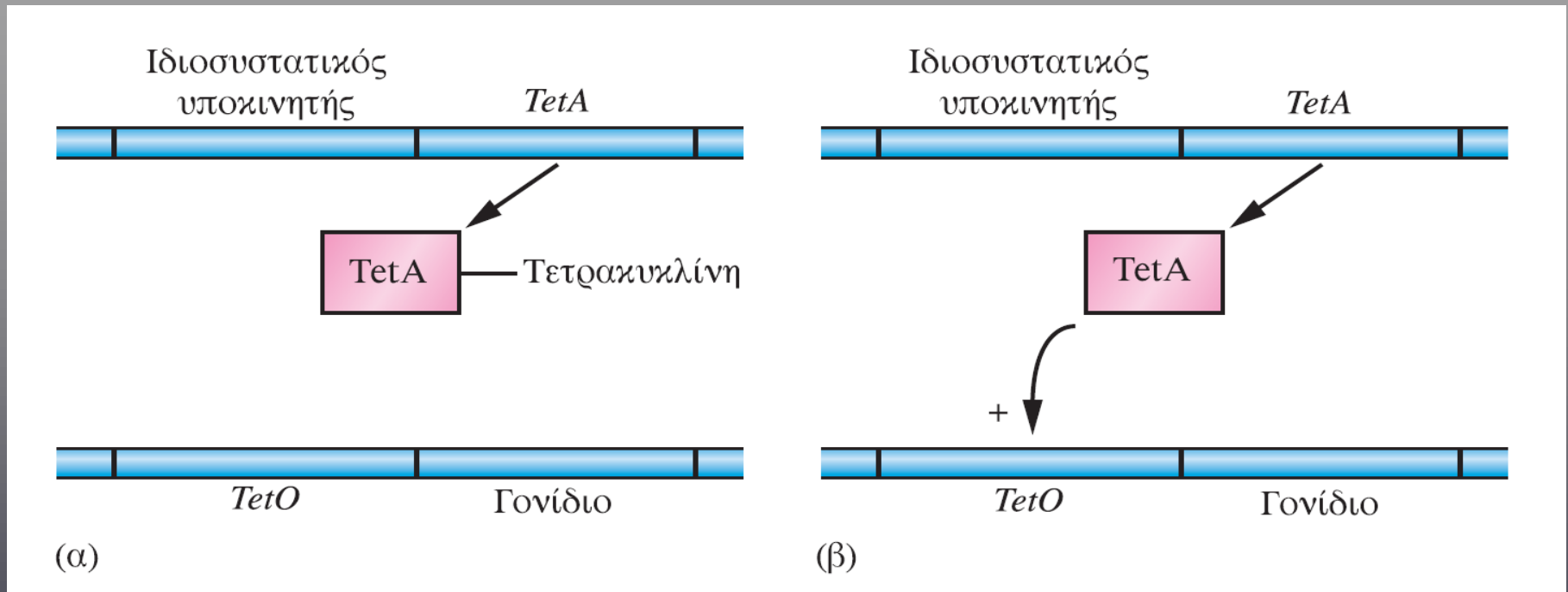
Σύστημα *cre-lox*. (β) Όταν διασταυρώνονται τα στελέχη 1 και 2, το *cre* μεταγράφεται από τον ιστοειδικό υποκινητή που το εντοπίζεται αναοδικά από αυτό με αποτέλεσμα την εκτομή του γονιδίου που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις θέσεις *loxP*.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



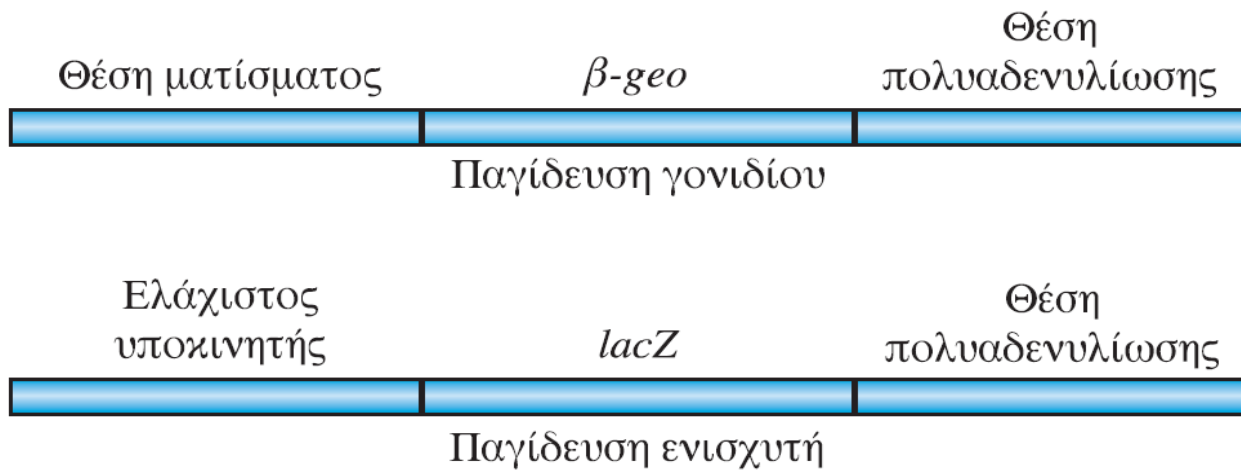
Το σύστημα *cre-lox* είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τη μόνιμη σήμανση ενός κυτταρικού πληθυσμού στον οποίο ένας ιστοειδικός υποκινητής είναι παροδικά ενεργός.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



Σύστημα tet-off. Παρουσία τετρακυκλίνης το γονίδιο-στόχος είναι ανενεργό. Όταν απομακρυνθεί η τετρακυκλίνη, το γονίδιο-στόχος ενεργοποιείται.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



Παγίδευση γονιδίου και παγίδευση ενισχυτή.