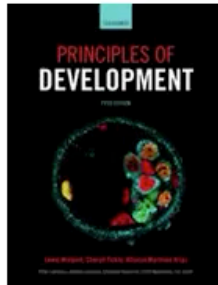


Εμβρυολογία
και
Μοριακή
Βιολογία
Ανάπτυξης



Ενότητα 8:

Ανάπτυξη των σωμιτών και των άκρων



Principles of Development

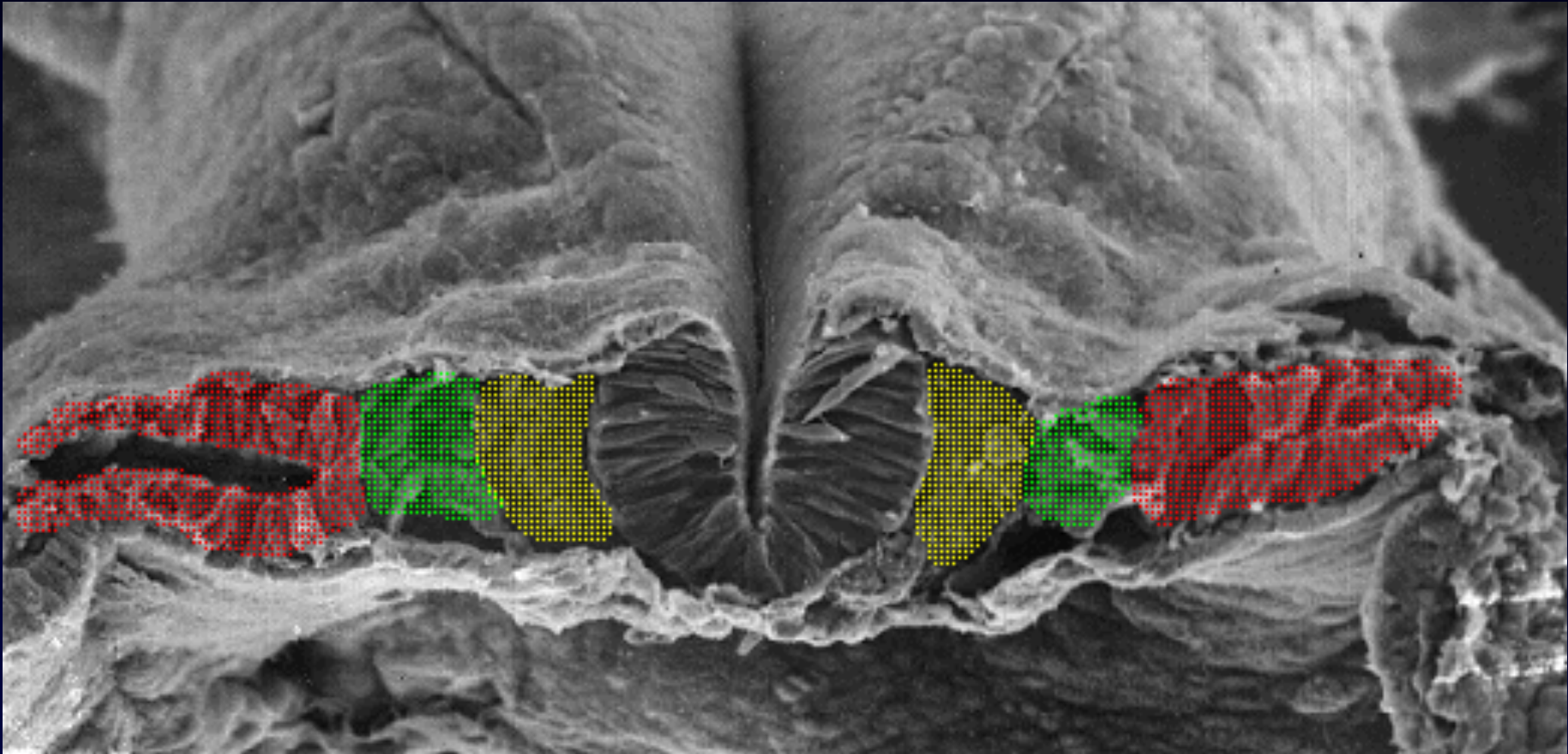
Fifth Edition

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Somitogenesis

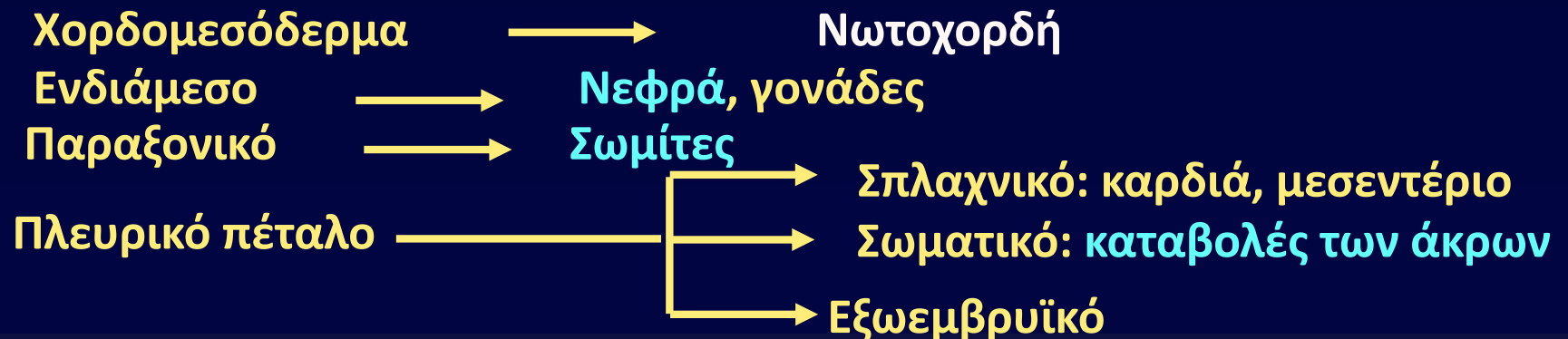
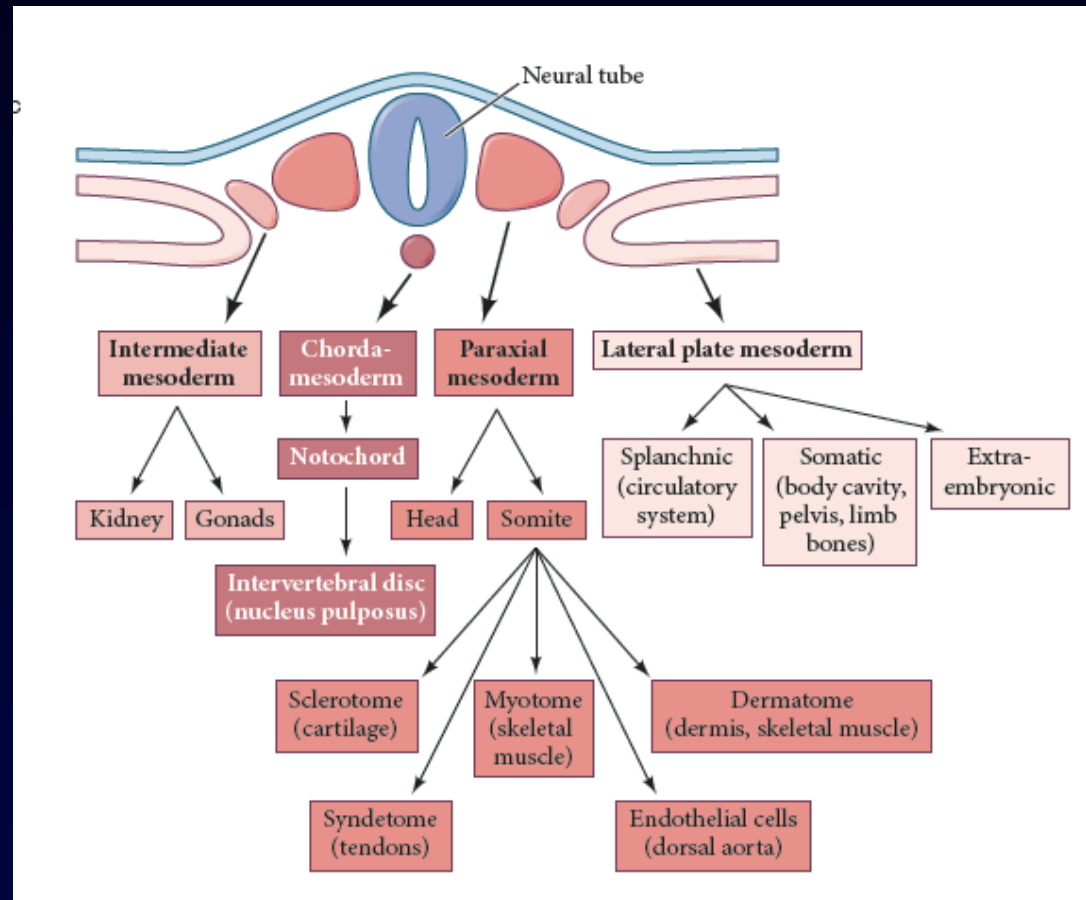
© Oxford University Press, 2015.

Το μεσόδερμα



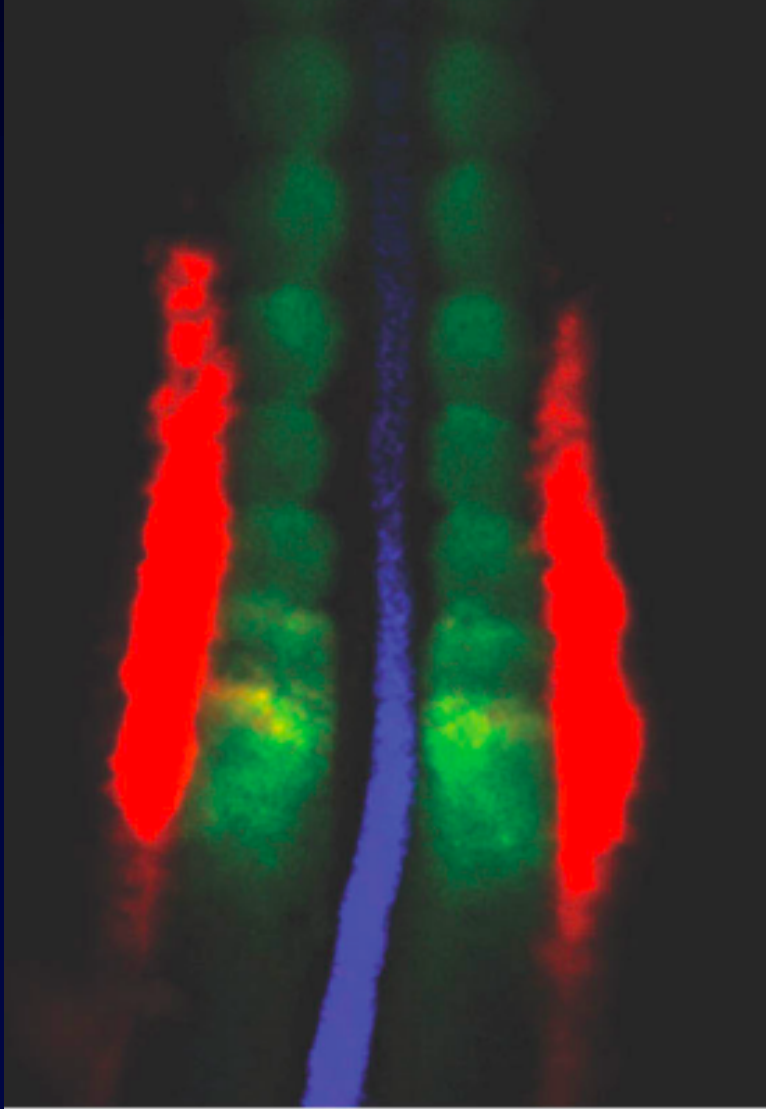
Στο φυλοτυπικό στάδιο στο μεσόδερμα μπορούμε να διακρίνουμε πέντε ομάδες κυττάρων: το χορδομεσόδερμα (αξονικό), το παραξονικό μεσόδερμα, το **διάμεσο μεσόδερμα**, το **πλάγιο πέταλο** και το μεσόδερμα της κεφαλής - (εγκάρσια τομή)

Παράγωγα του μεσοδέρματος



Εξειδίκευση του παραξονικού μεσοδέρματος

Η νωτοχορδή εκφράζει **chordin** ,
οι σωμίτες **Paraxis** και το
ενδιάμεσο **Pax2**.



Το παραξονικό μεσόδερμα βρίσκεται εκατέρωθεν της νωτοχορδής και εκτείνεται από την προχορδιαία πλάκα εμπρός προς την αρχική γραμμή σχηματίζοντας παχιές κυτταρικές στήλες.

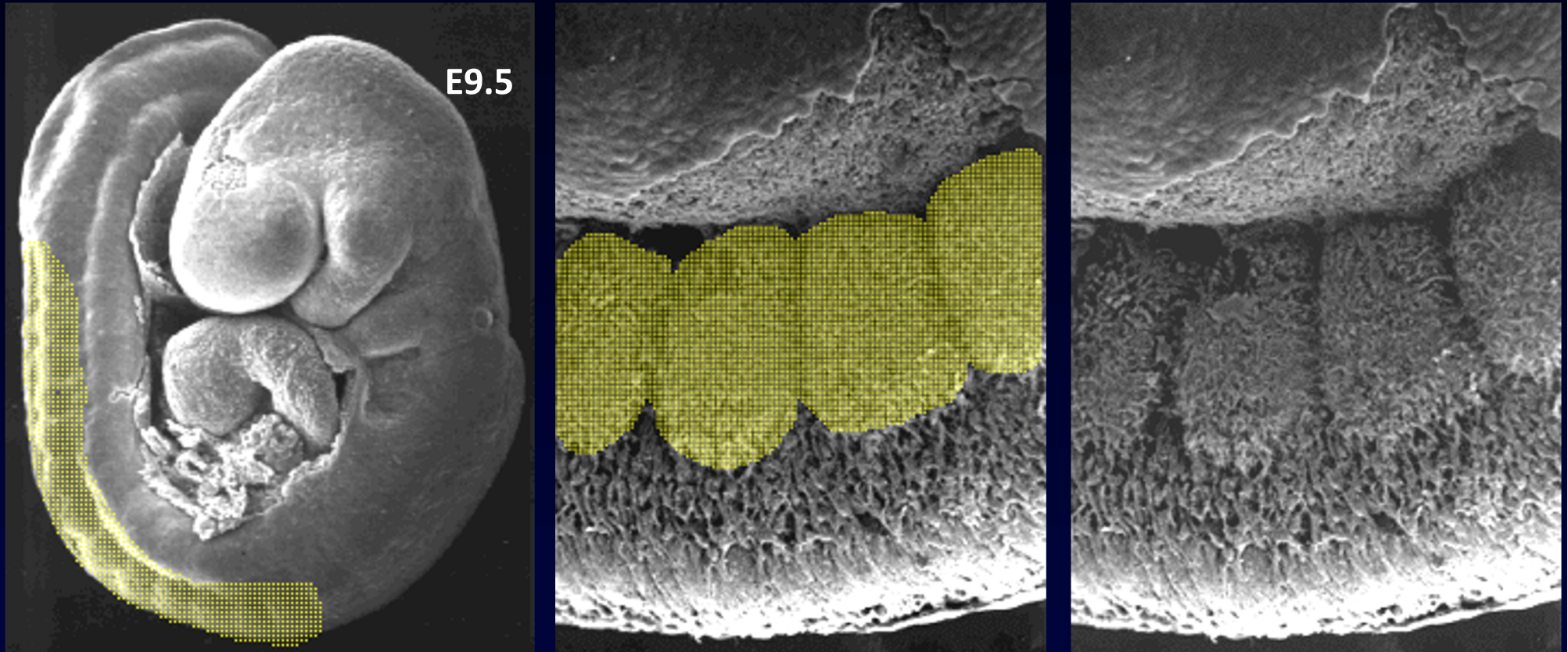
Το παραξονικό μεσόδερμα χαρακτηρίζεται από την έκφραση δύο γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες **FOXC1** και **FOXC2**.

Στα διπλά μεταλλάγματα **FOXC/ FOXC2** οι σωμίτες απουσιάζουν.

Υπερέκφραση των **FOXC1** και **FOXC2** στο έμβρυο της όρνιθας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πλάτους των σωμιτών.

Find it, move it, loose it!!

Το παραξονικό μεσόδερμα



Το παραξονικό μεσόδερμα βρίσκεται εκατέρωθεν της νωτοχορδής και εκτείνεται από την προχορδιαία πλάκα εμπρός προς την αρχική γραμμή σχηματίζοντας παχιές κυτταρικές στήλες. Τα κύτταρα στις στήλες συσπειρώνονται σχηματίζοντας τα σωμιτομερή (somitomes). Τα σωμιτομερή συμπυκνώνονται (αύξηση της έκφρασης καδερίνης N και φιμπρονεκτίνης), επιθηλιοποιούνται και σχηματίζουν μια σειρά από διακριτά τμήματα τους σωμίτες (somites). Οι πρώτοι σωμίτες εμφανίζονται αμέσως πίσω από το πρόσθιο άκρο της νωτοχορδής.

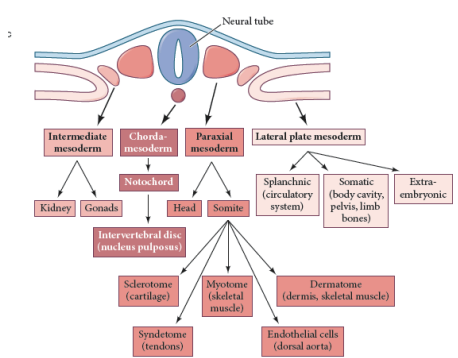
Το παραξονικό μεσόδερμα



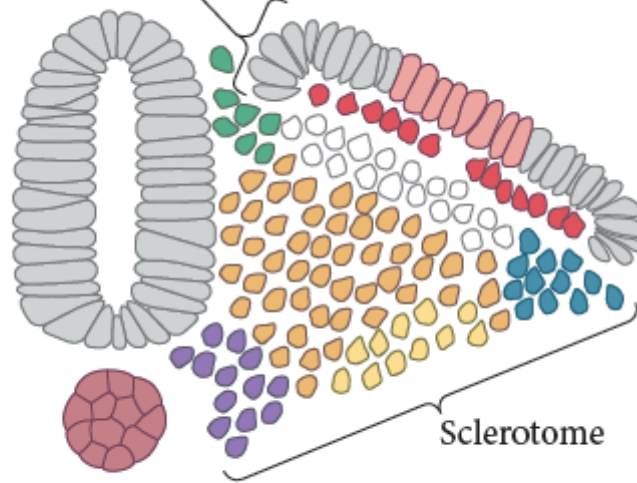
Οι σωμίτες σχηματίζονται σε ζεύγη εκατέρωθεν της νωτοχορδής. Οι σωμίτες κάθε ζεύγους σχηματίζονται ταυτόχρονα. Η ανάπτυξη των σωμιτών εξελίσσεται προοδευτικά, **κεφαλουριαία**, έτσι οι πρώτοι σωμίτες αρχίζουν να διαφοροποιούνται πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των τελευταίων.

αριθμός των σωμιτών είναι χαρακτηριστικός για το κάθε είδος, π.χ κοτόπουλο 50, ποντικός 65, άνθρωπος 44 μερικά φίδια 500 (Ο αριθμός των σωμιτών που αναπτύσσονται τελικά μπορεί να είναι μικρότερος).

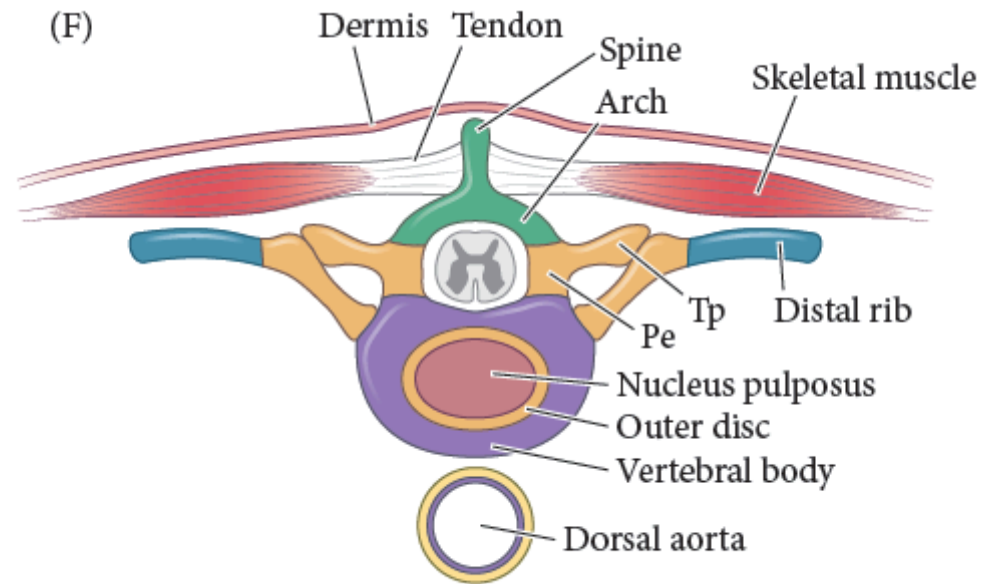
Παράγωγα των σωμιτών



(E) Dermomyotome



(F)



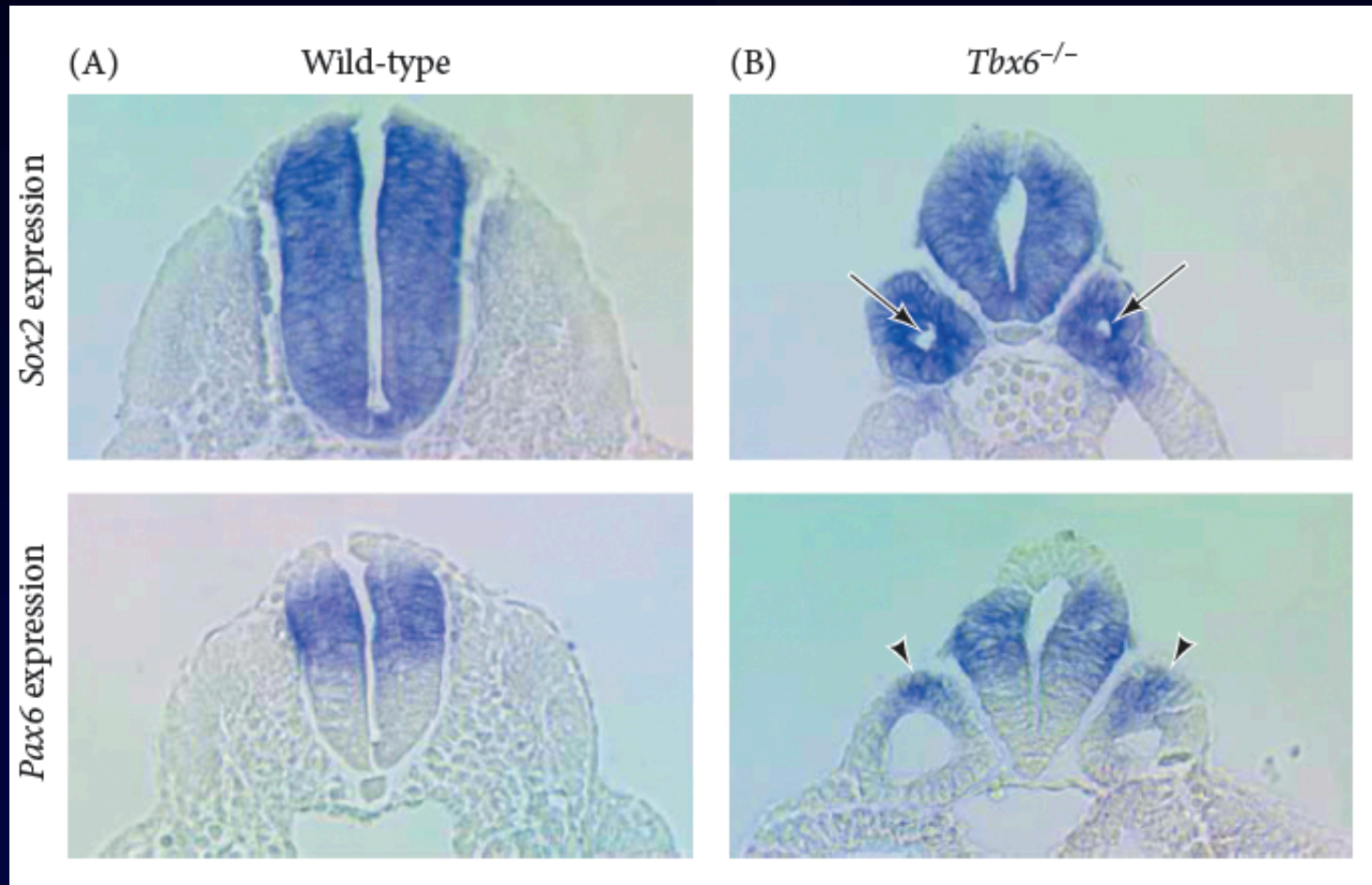
- Arthrotome: vertebral joints (Pe, Tp), proximal rib, outer disc
- Dorsomedial sclerotome: spine, arch
- Ventrolateral sclerotome: distal rib
- Ventromedial sclerotome: vertebral body
- Notochord: inner disc/nucleus pulposus

- Ventral posterior sclerotome: endothelial precursor: outer dorsal aorta
- Syndetome: tendons
- Myotome
- Dermatome: dermis

Το γονίδιο *tbx6*

+/-

+/-



Το γονίδιο *tbx6* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται στο παραξονικό μεσόδερμα. Σε ποντικούς στους οποίους έχει γίνει knock out το *tbx6* απουσιάζουν οι σωμίτες και το παραξονικό μεσόδερμα συμπεριφέρεται σαν εξώδερμα έτσι σχηματίζονται δύο επιπλέον νευρικοί σωλήνες, εκατέρωθεν του φυσιολογικού. Οι επιπλέον νευρικοί σωλήνες, δεν εκφράζουν κανένα από τα γονίδια που είναι χαρακτηριστικά για τους σωμίτες. Αντίθετα εκφράζουν κατά μήκος του κοιλιακού-ραχιαίου άξονά τους γονίδια χαρακτηριστικά για το νευρικό σωλήνα.

Από: σε εγκάρσιες τομές E9.5

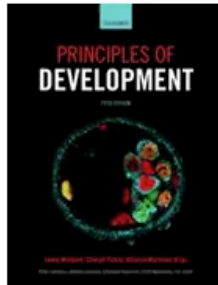
Εξειδίκευση του παραξονικού μεσοδέρματος



Ο σχηματισμός των σωμιτών συνδέεται με χαμηλή σηματοδότηση BMP

Διπλα δημιουργία επιπλέον σωμιτών μετά από εμφύτευση στο ενδιάμεσο μεσόδερμα σφαιριδίου εμποτισμένου με noggin

Καθώς το ζώο επιμηκύνεται έχω σχηματισμό σωμιτών από το μεσόδερμα



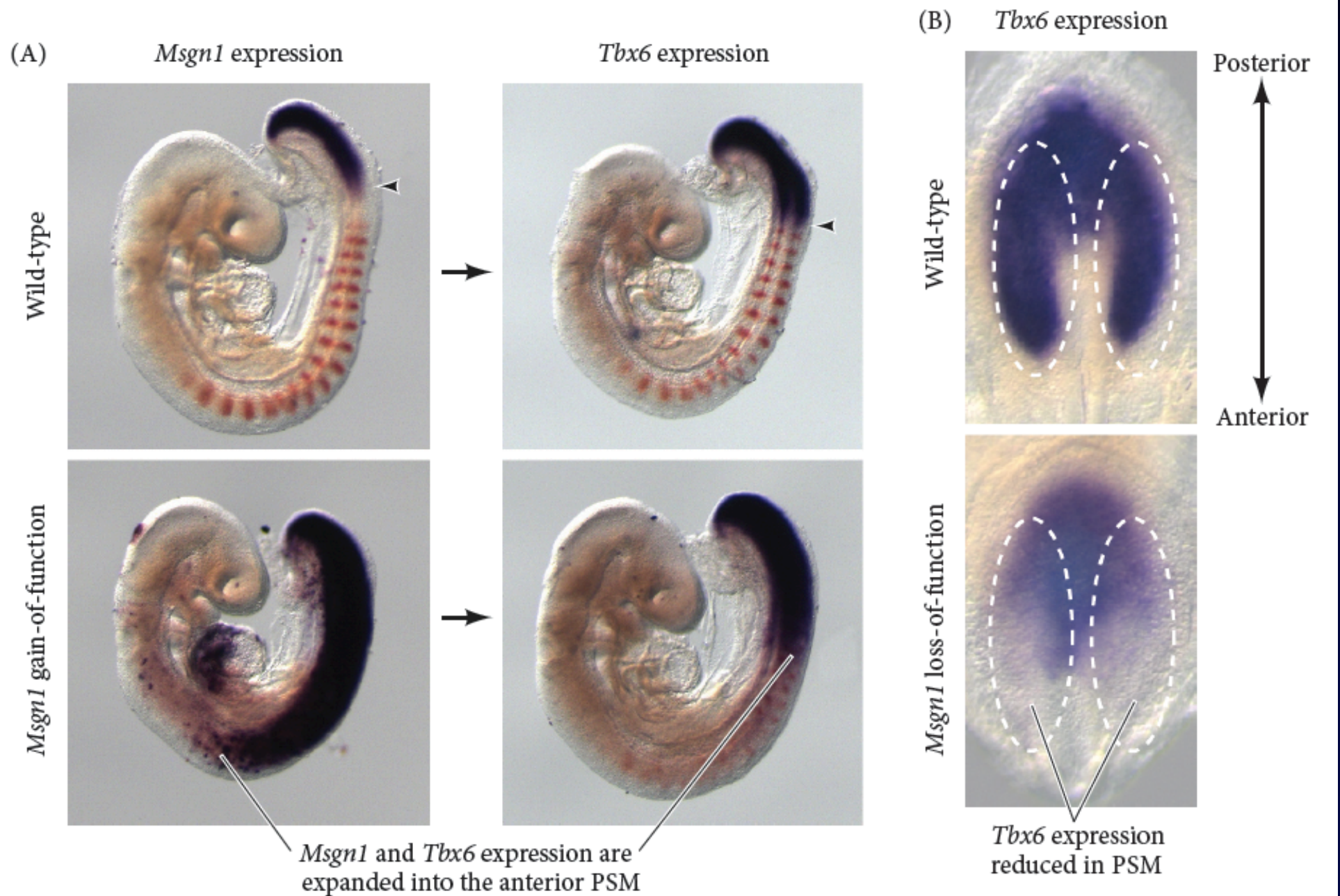
Principles of Development
Fifth Edition

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

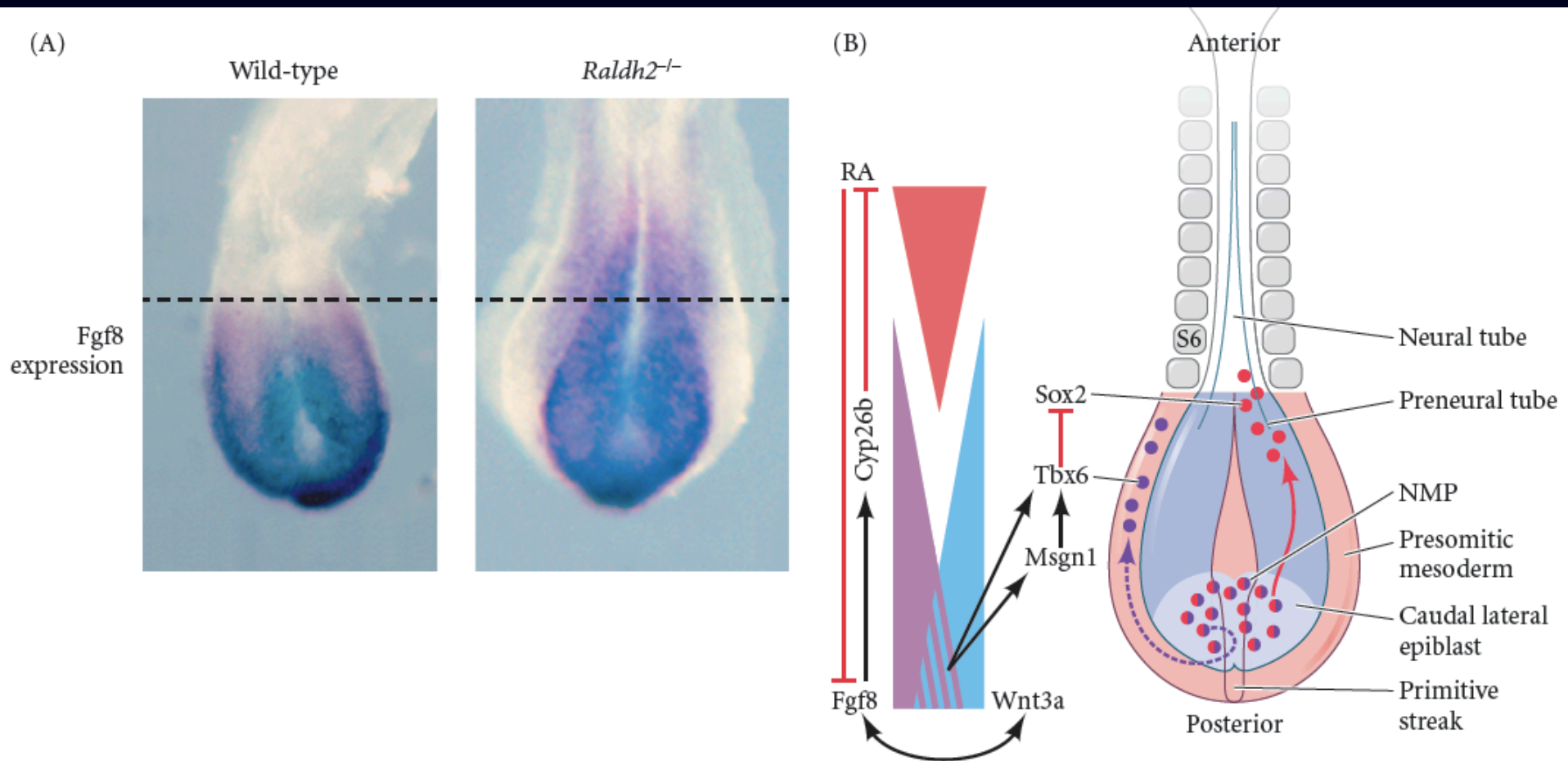
Somitogenesis

© Oxford University Press, 2015.

Το γονίδιο *mesogenin* (*Msgn1*)

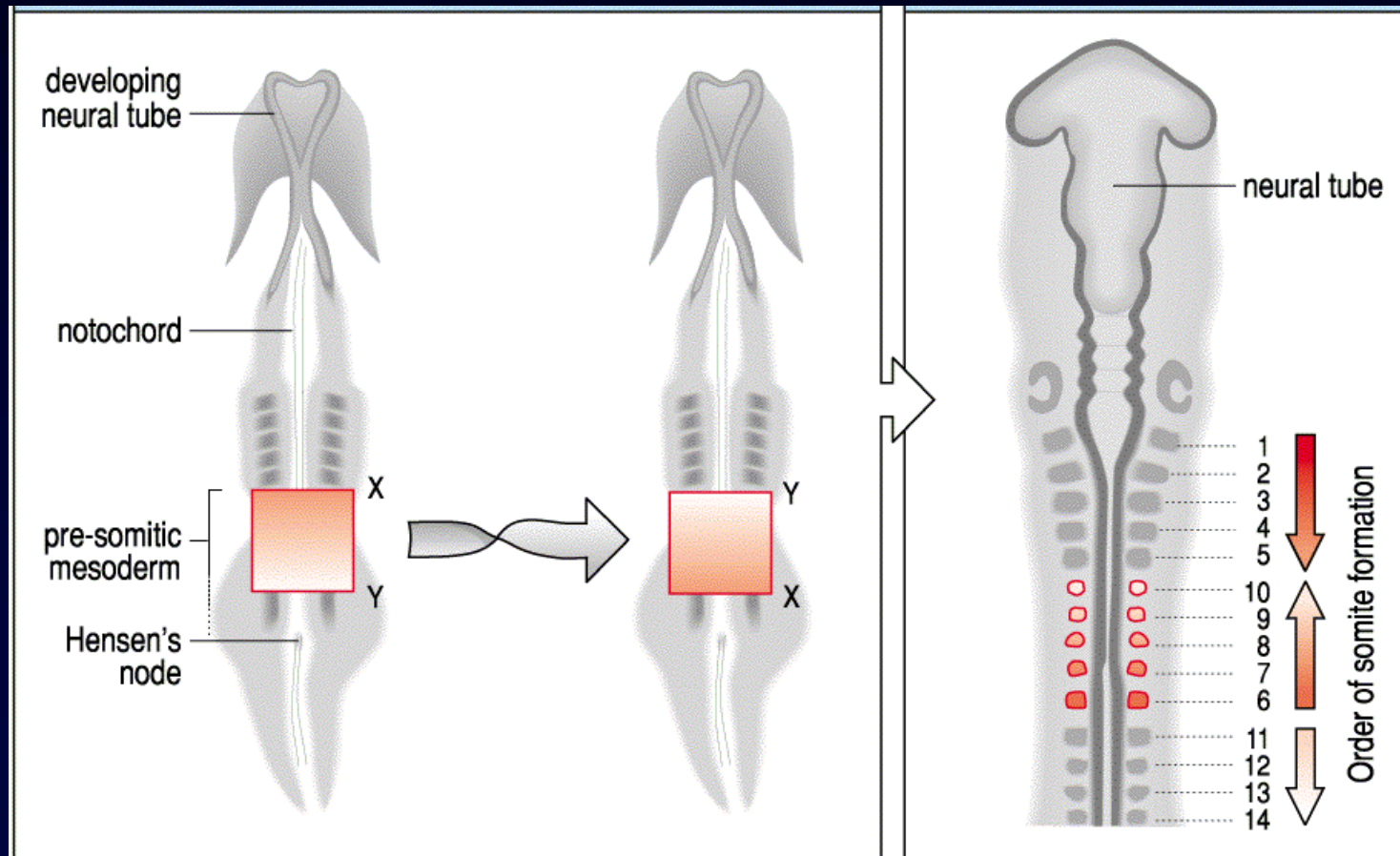


Το γονίδιο *mesogenin* (*Msgn1*)



- (A) Loss of retinoic acid synthesis in the *Raldh2* knockout mouse shows an anterior expansion of Fgf8 expression (blue past the dashed line).
- (B) Model of signaling systems regulating the NMP from the caudal progenitor zone (the caudal lateral epiblast) into the preneural tube or presomitic mesoderm. Posterior signals of FGF and Wnt antagonize anterior retinoic acid signaling. Fgf8 and Wnt3a upregulate *Msgn1* and *Tbx6* expression to promote presomitic progenitor specification and repress neural cell fate specification (*Sox2*).

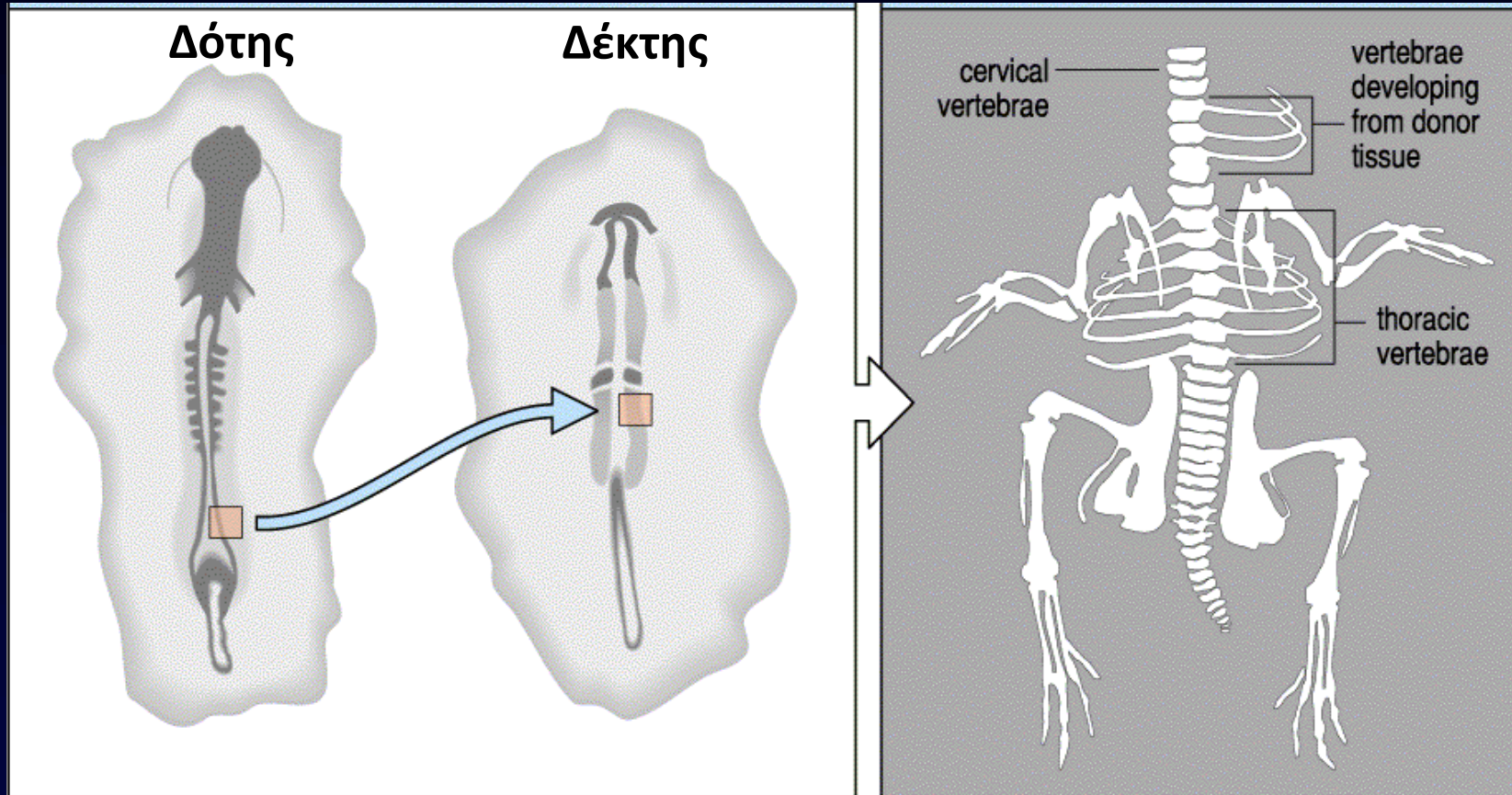
Σχηματισμός σωμιτών πολικότητα κατά μήκος του Ε/Ο άξονα



Αν μεταμοσχεύσουμε στο έμβρυο της όρνιθας προσωμικό μεσόδερμα (presomitic mesoderm) περιστρέφοντάς το κατά 180°, τότε οι σωμίτες σχηματίζονται κανονικά (χρόνος,οργάνωση) αλλά με ανεστραμμένη αλληλουχία.

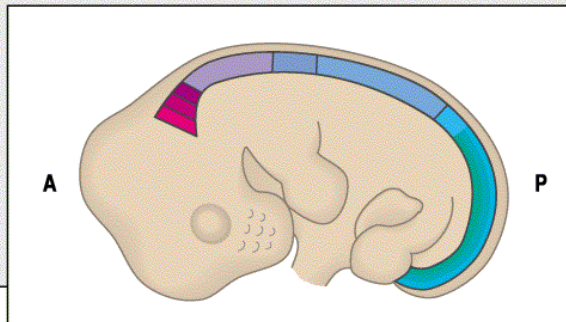
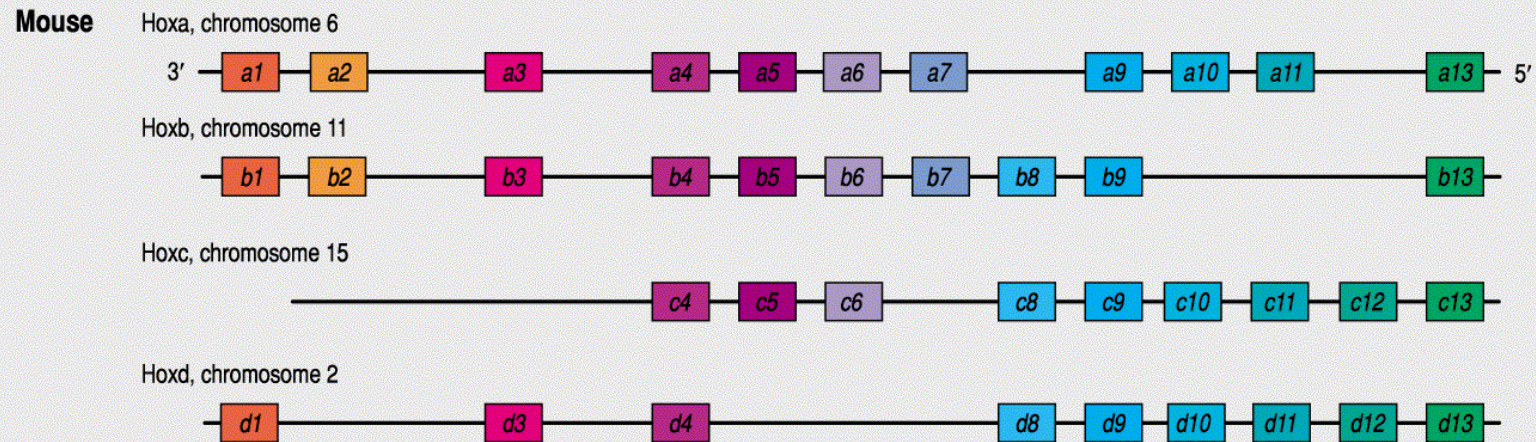
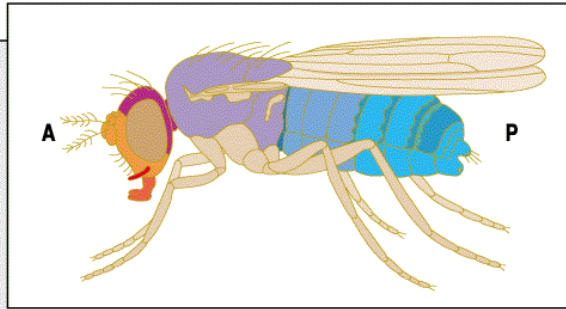
Επομένως: πριν από την εμφάνιση των σωμιτών έχει καθοριστεί το πότε θα σχηματιστούν και πώς θα σχηματιστούν.

Σχηματισμός σωμιτών – οργάνωση, ταυτότητα Ε/Ο



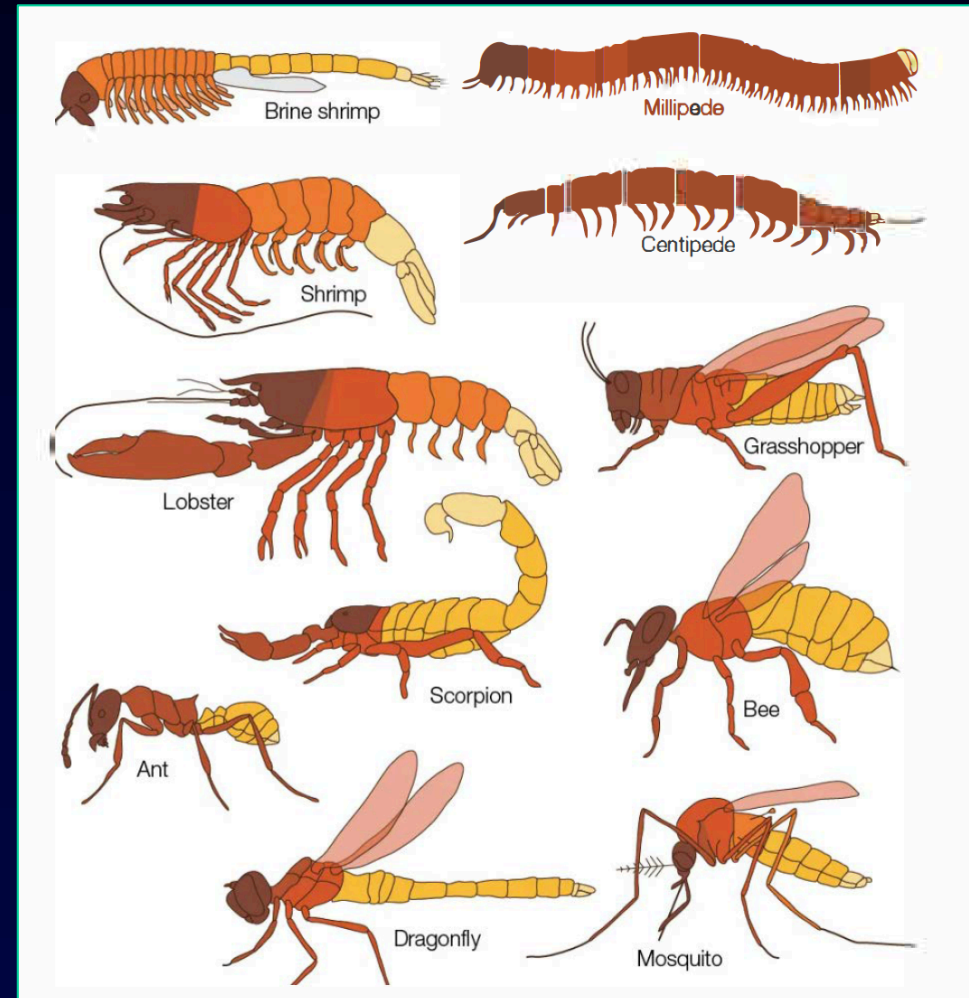
Αν μεταμοσχεύσουμε στο έμβρυο της όρνιθας προσωμικό μεσόδερμα (presomitic mesoderm) από ουραία περιοχή που θα έδινε θωρακικούς σπονδύλους (thoracic vertebrae) σε περιοχή που θα έδινε αυχενικούς σπονδύλους (cervical vertebrae - πιο μπροστά), τότε εκεί εμφανίζονται θωρακικοί σπόνδυλοι. Επομένως πριν από την εμφάνιση των σωμιτών έχει καθοριστεί η ταυτότητά τους κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Πώς καθορίζεται αυτό;

Τα γονίδια *Hox* και πάλι !!

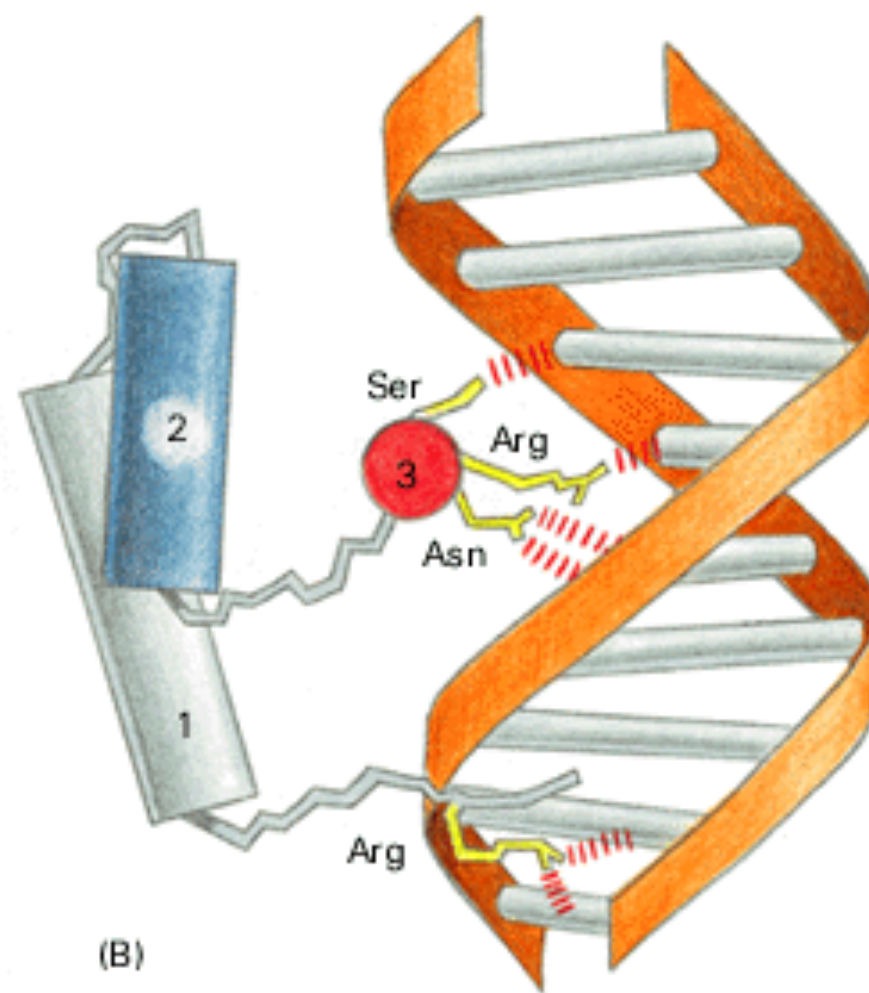
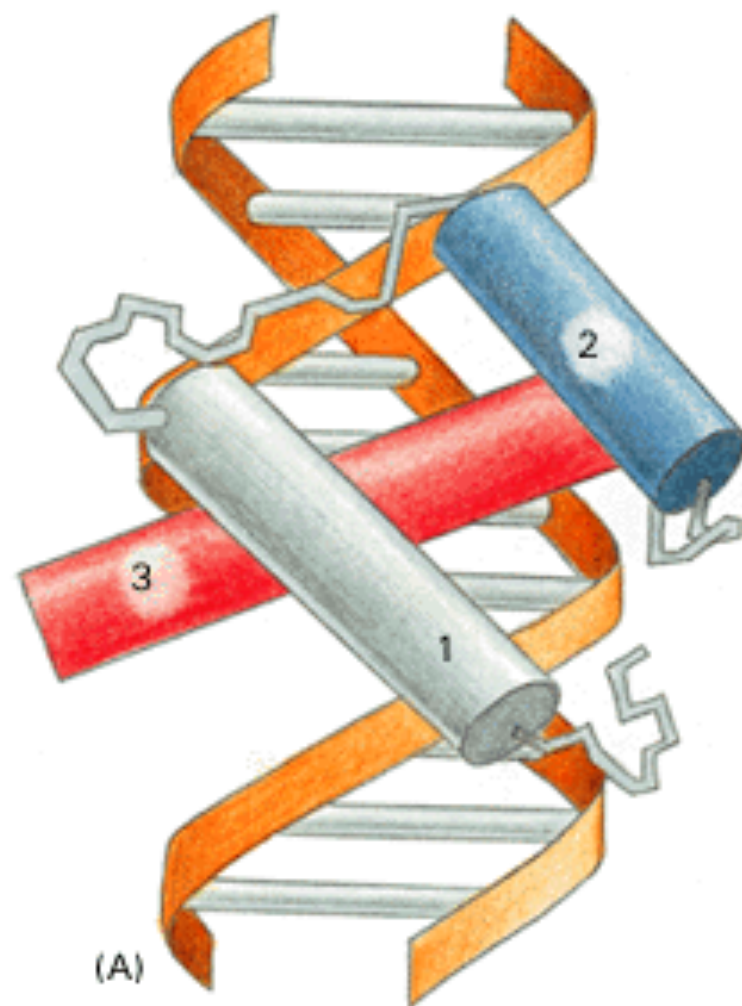


Οργάνωση του αρχιτεκτονικού σχεδίου του σώματος

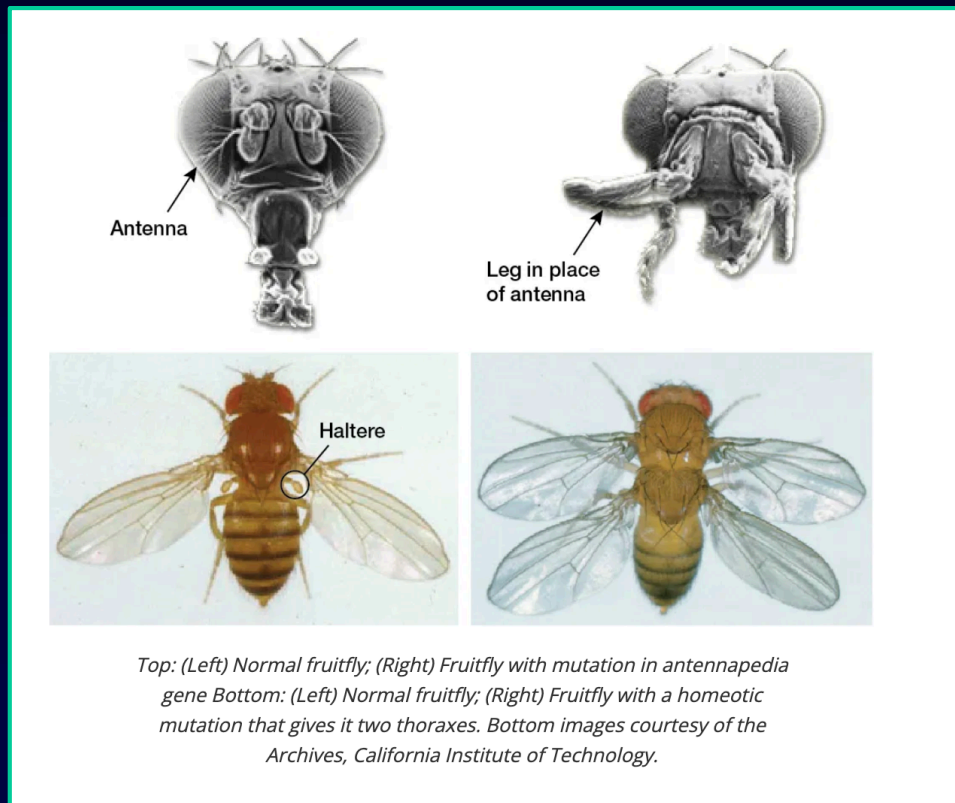
- Η οργάνωση του σώματος των ζώων εμφανίζει μεγάλη μεγάλη ποικιλία.
- Τα σώματα των ζώων και του ανθρώπου αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες (ή τμήματα)
- Υπάρχουν γενετικά προγράμματα που ενεργοποιούνται για την κατασκευή αυτών των τμημάτων που ονομάζονται μεταμερή.
- Ένα πρόγραμμα για την κατασκευή μιας δομής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλού. Έτσι η προσθήκη μερικών τμημάτων και η εκτέλεση του προγράμματος "πόδι" σε αυτά μπορεί να δημιουργήσει έναν οργανισμό με μερικά επιπλέον ζευγάρια πόδια.



Τα τα χρώματα επισημαίνουν την **ταυτότητα** τους. Κάθε χρώμα ακολουθεί ένα διαφορετικό γενετικό πρόγραμμα: για παράδειγμα, ένα πρόγραμμα για "πόδι" ή ένα πρόγραμμα για "κεραία".

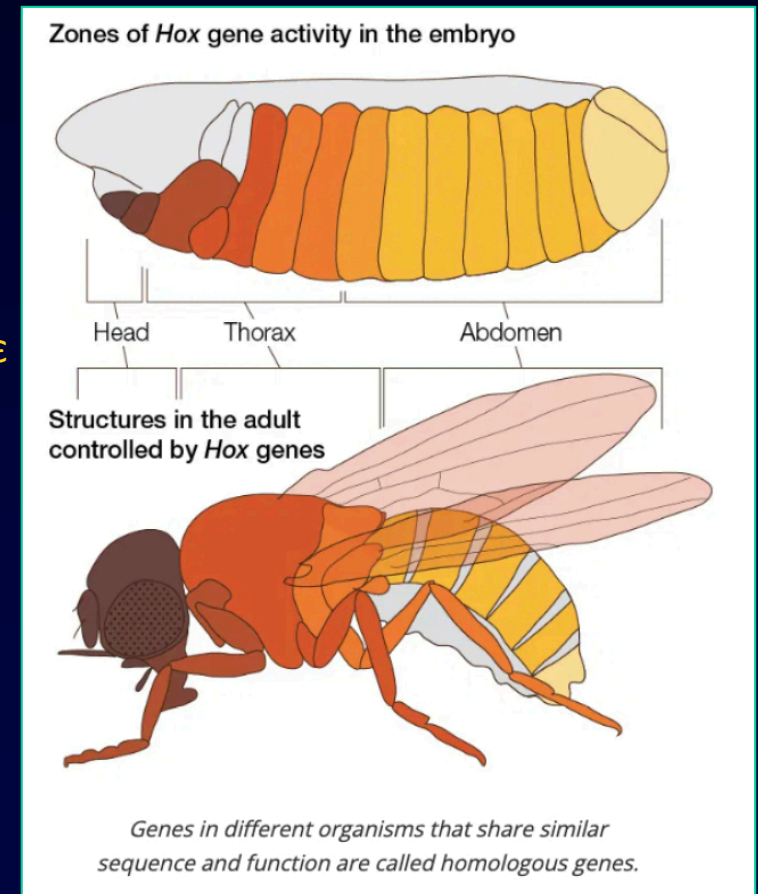


➤ Περιγράφηκαν για πρώτη φορά στη *Drosophila* - μεταλλάξεις τους προκαλούν ομοιωτικό μετασχηματισμό, ένα τμήμα του σώματος αποκτά την ταυτότητα ενός άλλου (μετασχηματίζεται) που βρίσκεται ακριβώς μπροστά ή πίσω από αυτό.

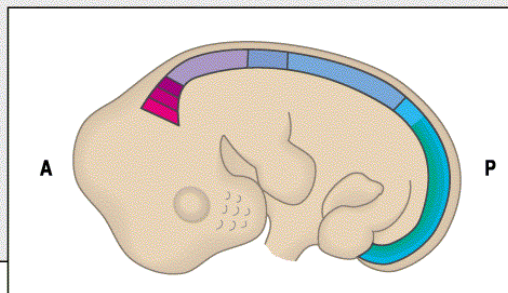
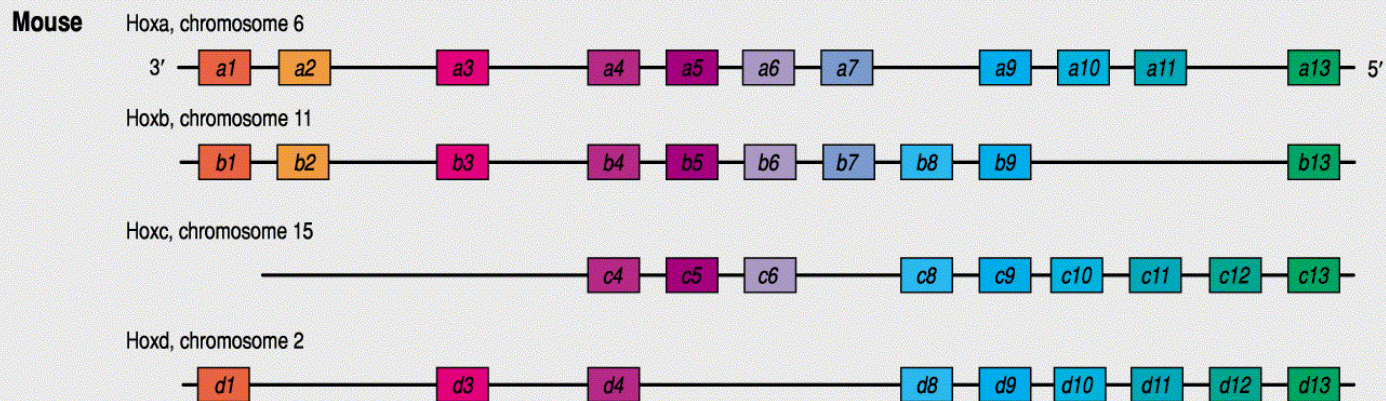
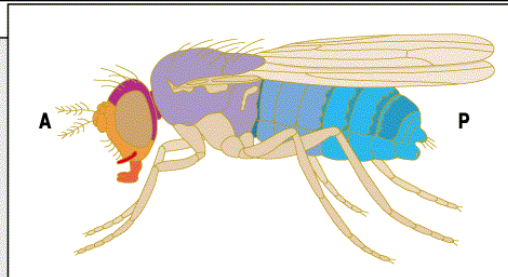


Κεραίες σε πόδια

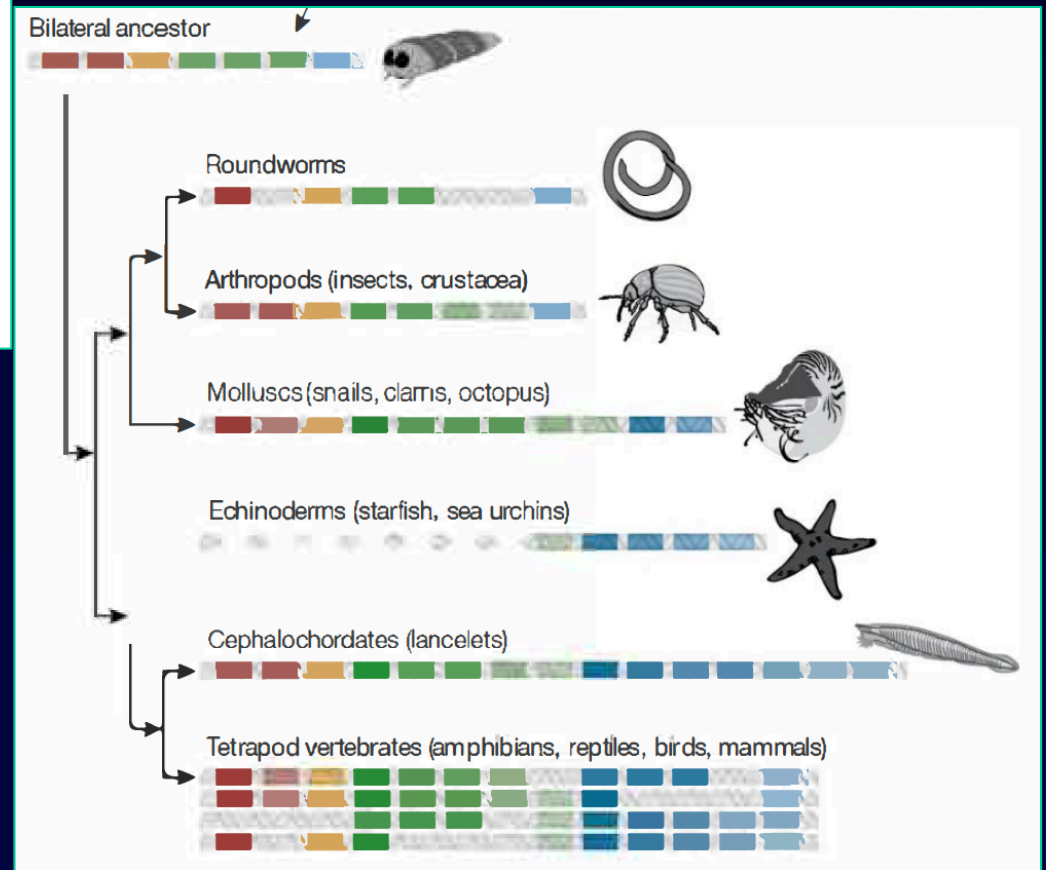
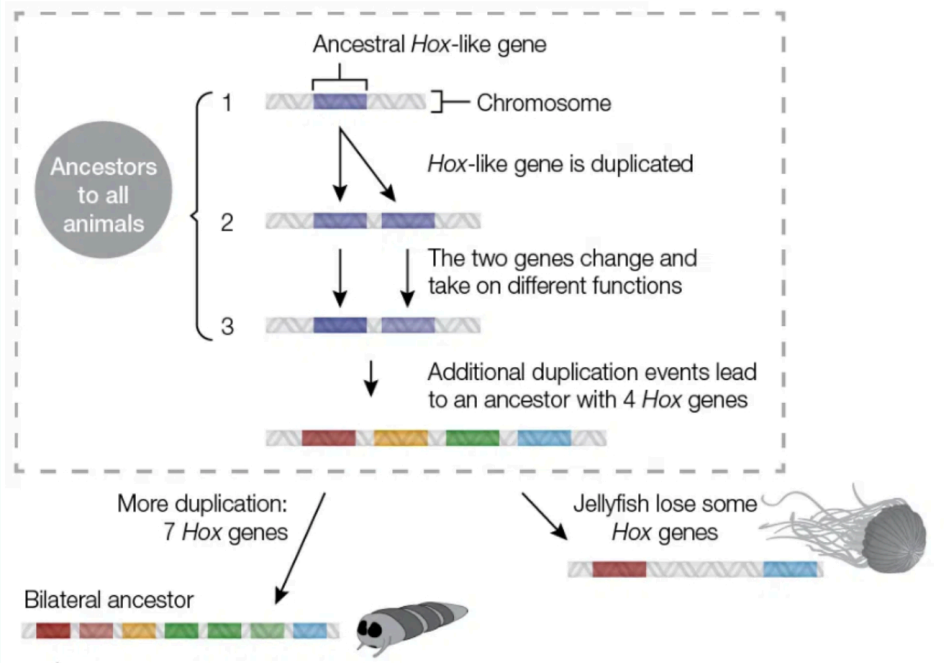
Αλτήρες σε φτερά



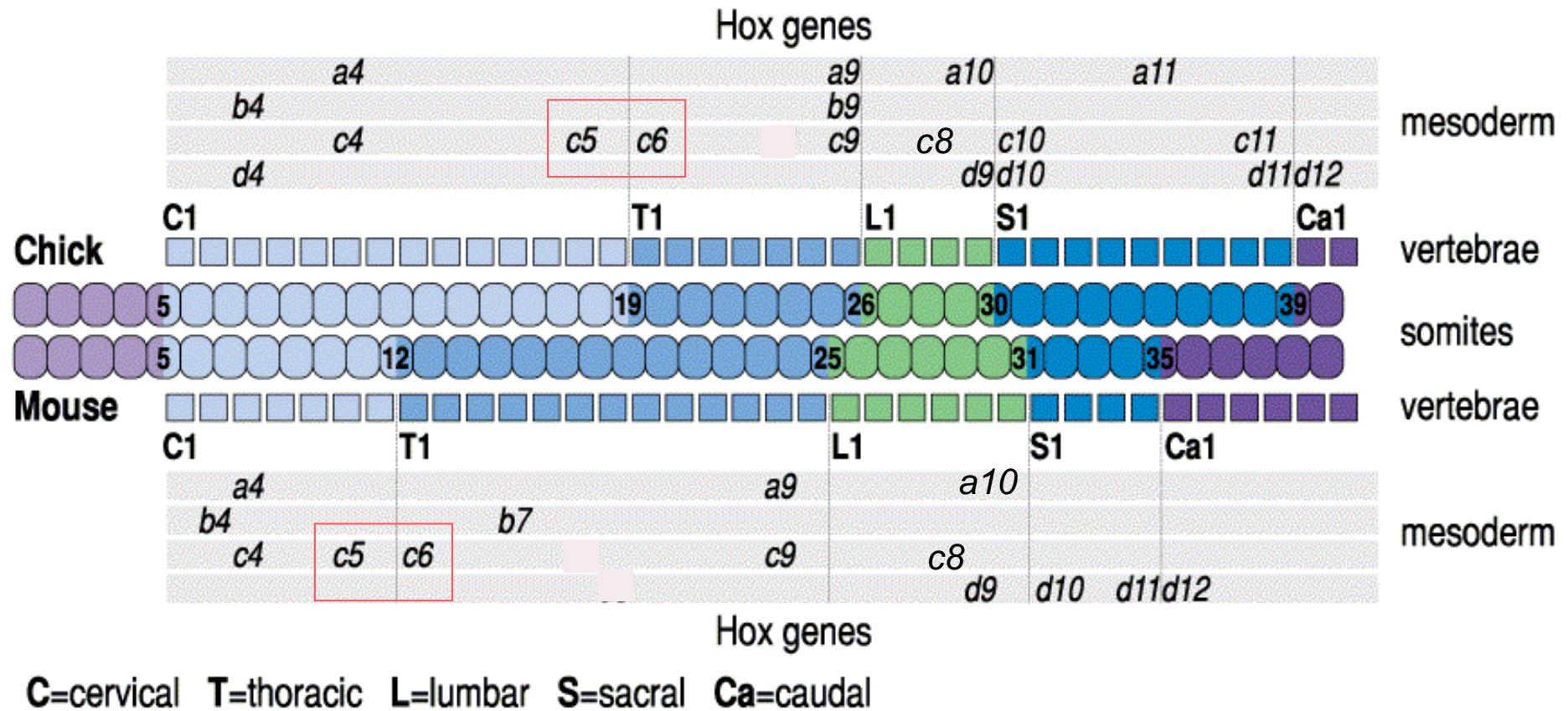
Τα γονίδια Hox Οργάνωση



Τα γονίδια *Hox*

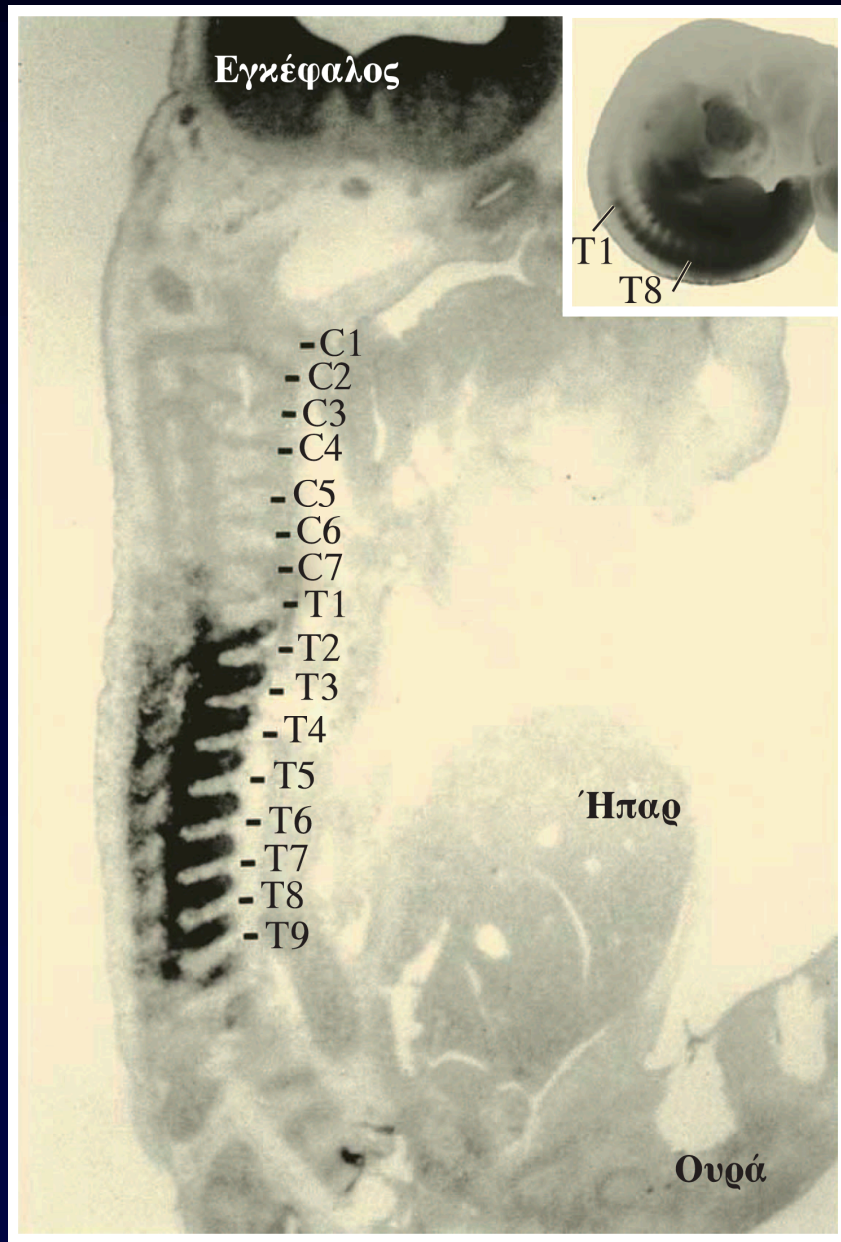


Τα γονίδια *Hox* και η ταυτότητα των σπονδύλων



Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των *Hox* στο μεσόδερμα του εμβρύου της όρνιθας και του ποντικού και η σχέση τους με την ταυτότητα των σπονδύλων. Ο αριθμός των σπονδύλων ποικίλλει στα δύο είδη (κοτόπουλο-ποντικός) όμως για να γίνει η μετάβαση από το ένα είδος σπονδύλου στο άλλο χρειάζεται να γίνει η ίδια αλλαγή στον κώδικα *Hox*. Για παράδειγμα μετάβαση από αυχενικό σε θωρακικό γίνεται στο όριο c5/c6.

Τα γονίδια *Hox*



Το πρότυπο έκφρασης του *Hoxc6* στους μελλοντικούς θωρακικούς σπονδύλους ενός εμβρύου ποντικού.

de Robertis (2008) *Cell* **132**, 185-195.

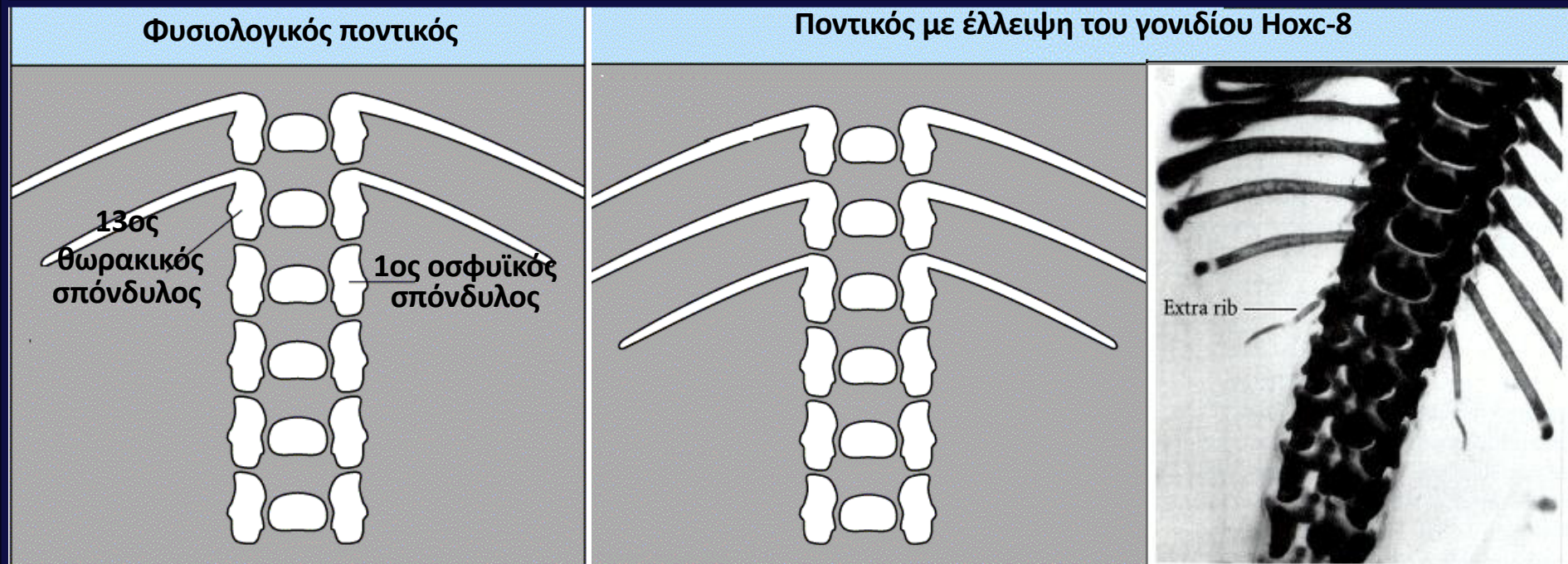
Μεταλλαγές στα γονίδια *Hox*

Μεταλλαγές που προκαλούν απώλεια της ενεργότητας των γονιδίων *Hox* οδηγούν πολλές φορές σε ομοιωτικό μετασχηματισμό (homeotic transformation).

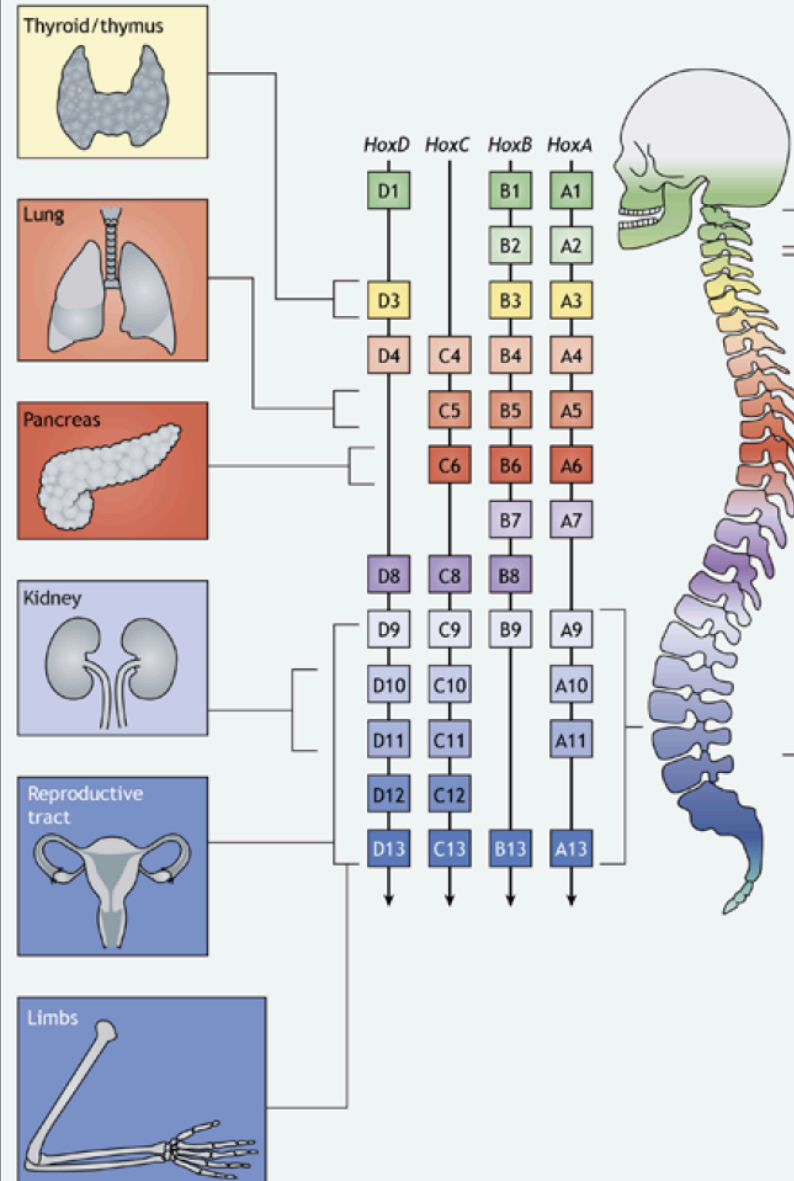
Ο φαινότυπος εμφανίζεται στο εμπρόσθιο όριο της έκφρασής του γονιδίου και όργανα ή δομές μετασχηματίζονται σε αντίστοιχα που βρίσκονται πιο μπροστά.

Για παράδειγμα έλλειψη του γονιδίου *Hoxc-8* μετετρέπει τον πρώτο οσφυϊκό σπόνδυλο σε θωρακικό, όπως συμβαίνει και με τα γονίδια *Hox* στη *Drosophila*.

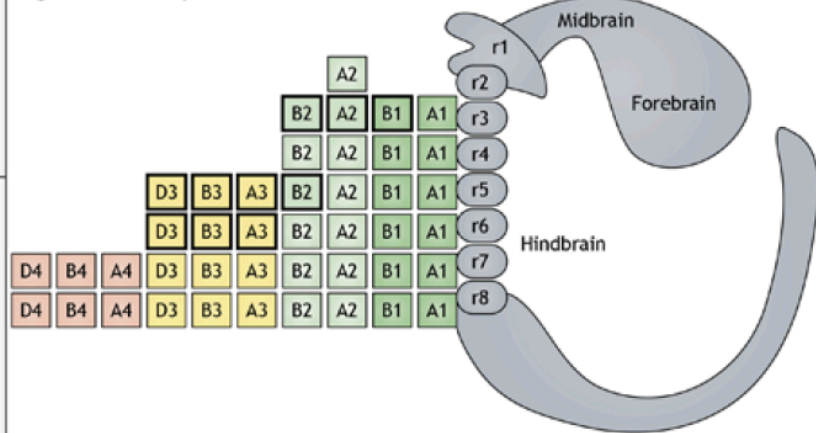
Παραομολογα με παρόπμοια πρότυπα = λειτουργικός πλεονασμός



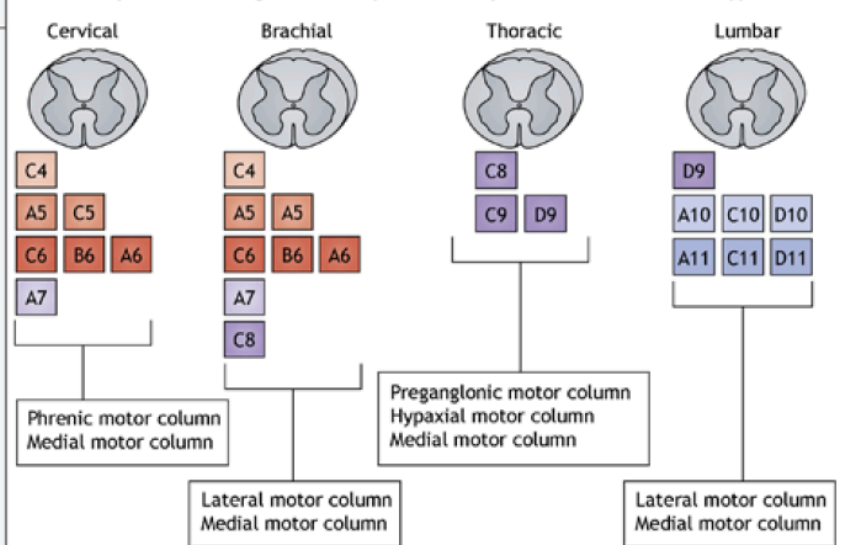
Hox paralogs pattern many organs along the anterior-posterior axis. Posterior Hox paralogs (9-13) also pattern the limbs along the proximal-distal axis. Hox expression remains regionally restricted in many tissues and organs through postnatal and adult life.



Hox paralogous groups 1-4 are expressed in the hindbrain rhombomeres and regulate the development of hindbrain cranial and motor neurons. Bold black outline indicates higher levels of expression in those rhombomeres.



Colinear expression of Hox genes in the spinal cord helps to define motor neuron types.



Σχηματισμός σωμιτών – οργάνωση, ταυτότητα Ε/Ο

Δότης

Λέκτρος

(B)

Wild-type



Misexpression of
Hoxa10



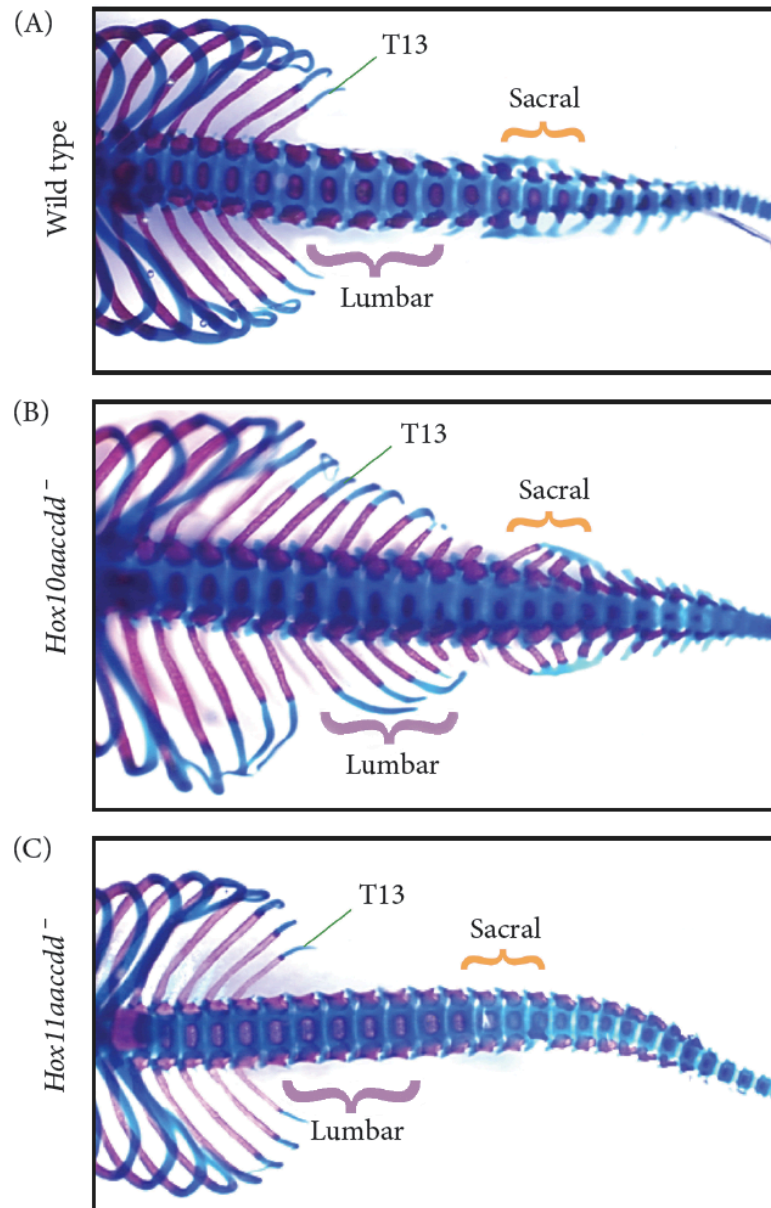
(C) Misexpression of
Hoxb6



Αλλαγή στον κώδικα Hox στον ποντικό με εκτοπική έκφραση.

Α: σκελετός φυσιολογικού ποντικού Β: Σκελετός ποντικού μετά από εκτοπική έκφραση του *Hoxa10* σε ολόκληρο το παραξονικό μεσόδερμα. C: Σκελετός ποντικού μετά από εκτοπική έκφραση του *Hoxb6* σε ολόκληρο το παραξονικό μεσόδερμα

Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*



Μεταλλαγές που προκαλούν απώλεια της ενεργότητας όλων των παραομόλογων γονιδίων *Hox* οδηγούν σε ομοιωτικό μετασχηματισμό (homeotic transformation).

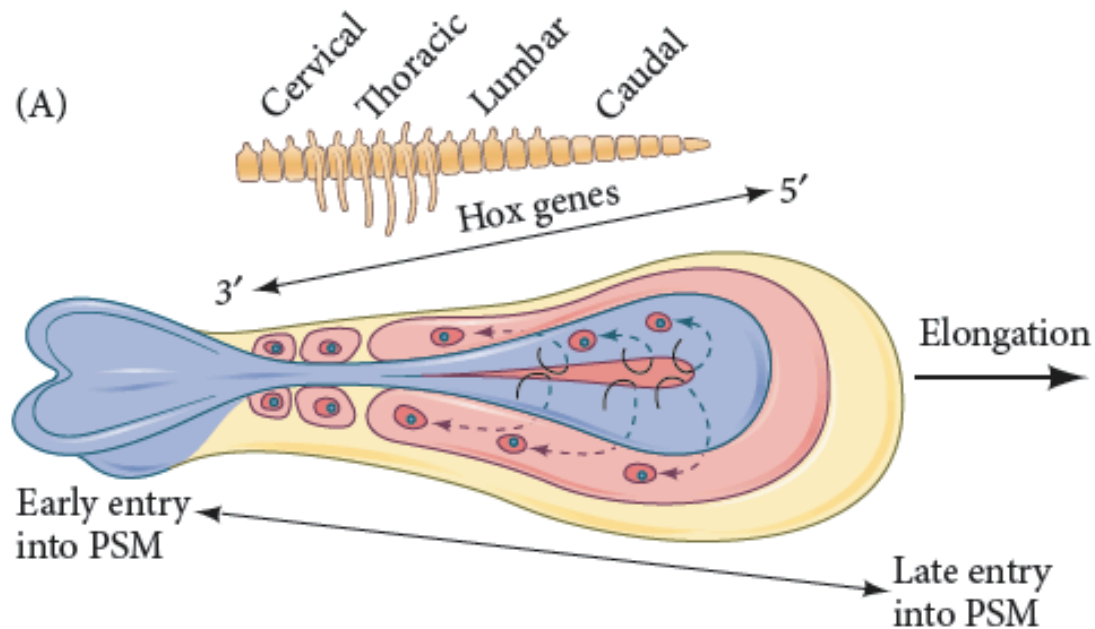
Δίπλα Σκελετός εμβρύων E18.5 μετά από κατάλληλη χρώση

A: Εμβryo άγριου τύπου

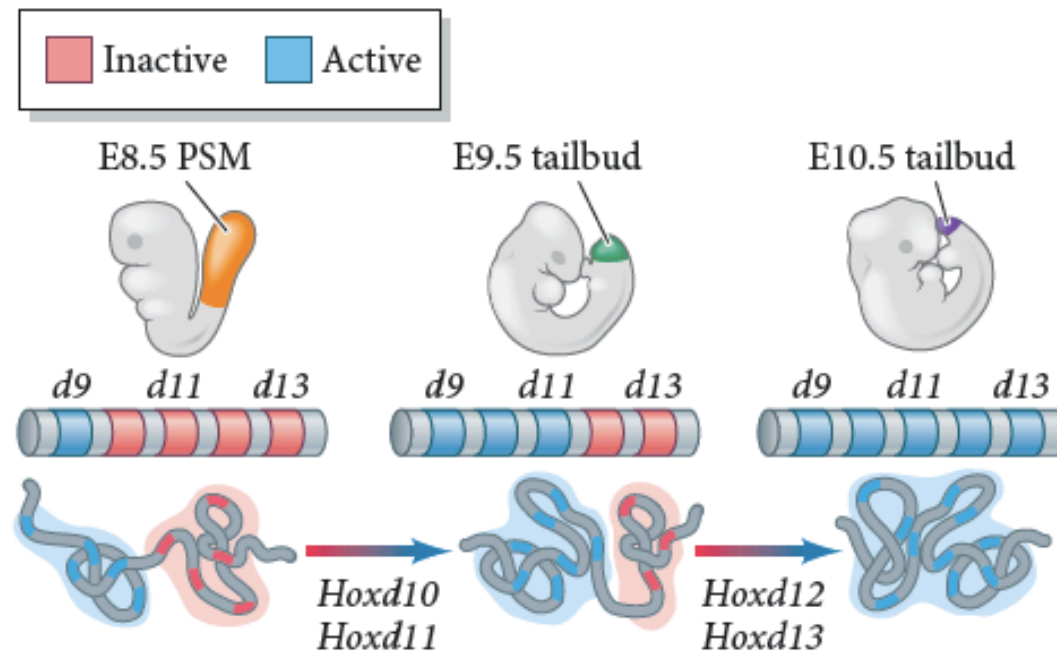
B: Εμβryo *Hox10aacdd*

C: Εμβryo *Hox11aacdd*

(Wellik & Capecchi 2003)

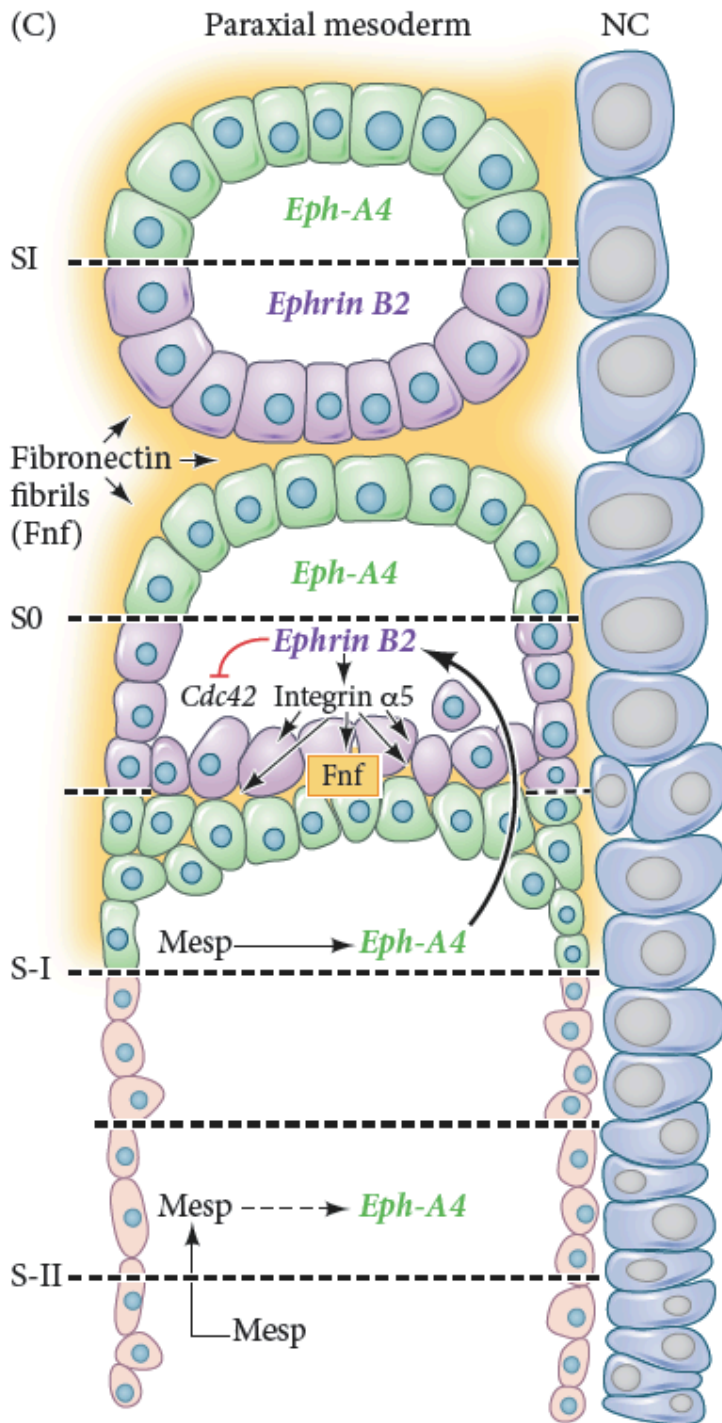


(B) Transition to chromatin states



Ρύθμιση της έκφρασης των *Hox*

Το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Hox* στο προσωμικό μεσόδερμα καθορίζεται από αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης που την καθιστούν ενεργή.



Πώς σχηματίζεται ένας σωμίτης από το παραξονικό μεσόδερμα?

Με μεσεγχυματεπιθηλιακή μετάπτωση

➤ Επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα *Mesp* (mesodermal posterior) – μόλις ο σωμίτης σχηματιστεί η έκφραση τη *Mesp* περιορίζεται στο εμπρόσθιο ημισυ του.

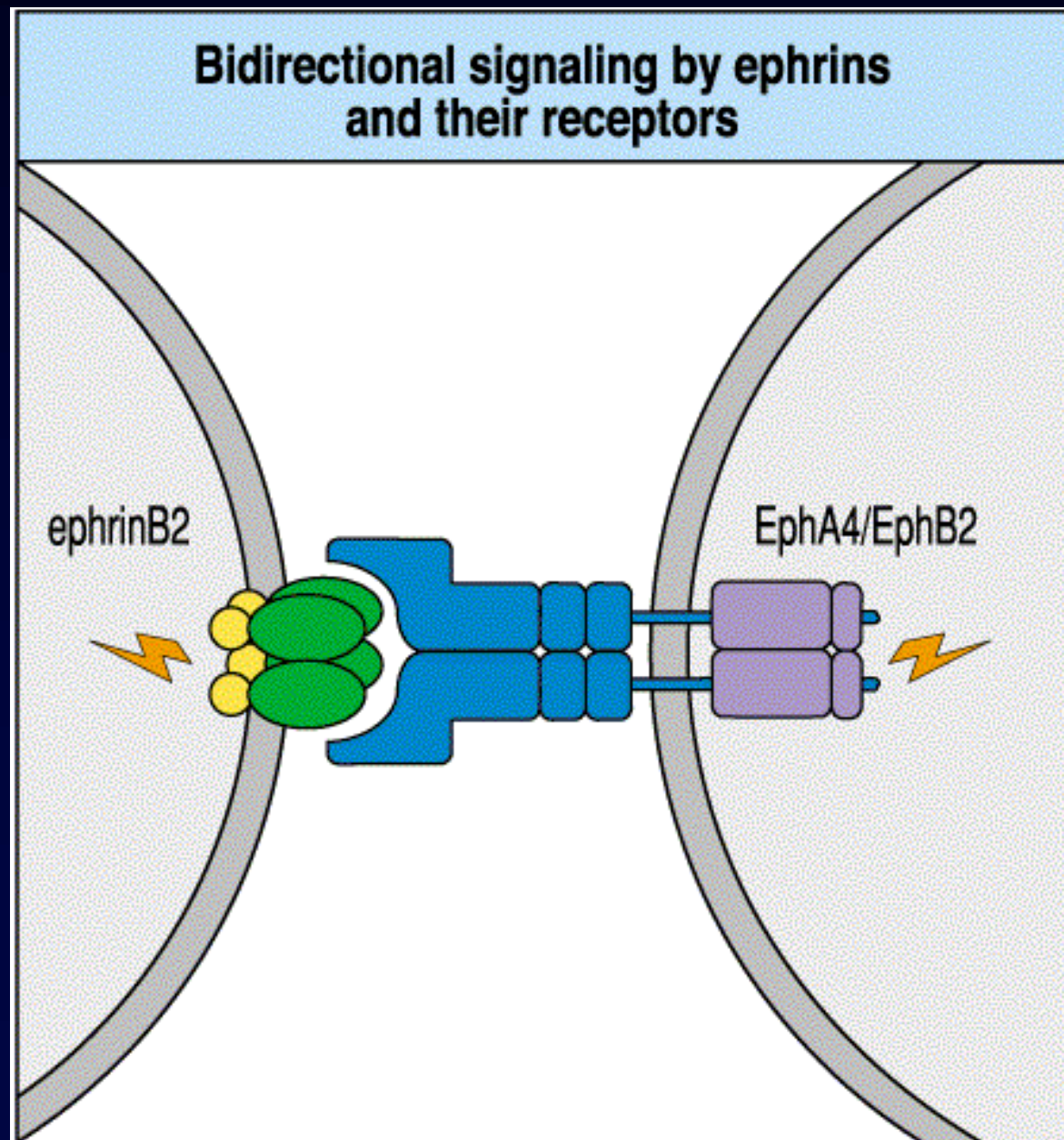
➤ Επαγωγή των *Eph* (σηματοδότηση μέσω εφρινών)

➤ Αλλαγές στον κυτταροσκελετό (GTPases Rho) με μείωση των επιπέδων της *Cdc42* στα όρια του σωμίτη που υπάρχει ενεργή *Ephrin* = όρια του σωμίτη

➤ Αλλαγές στη GTPase Rho Rac1 ενέχονται στην επιθηλιοποίηση

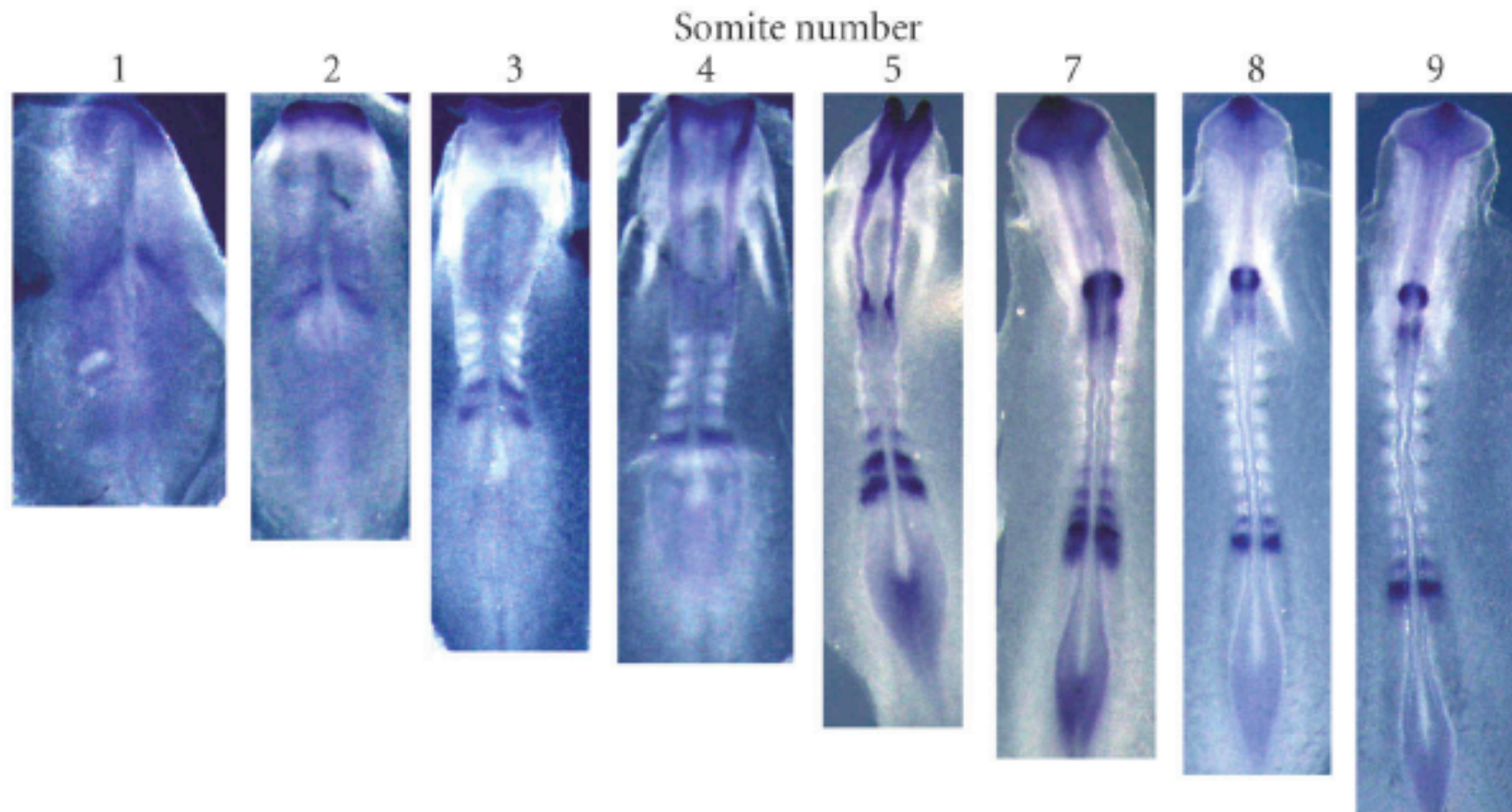
➤ Ενίσχυση της ενεργότητας της ιντεγκρίνης $\alpha 5$ και αύξηση της εξωκυτταριας φιμπρονεκτίνης που περιβάλλει το νεοσχηματιζόμενο σωμίτη

Οι εφρίνες και οι υποδοχείς Eph

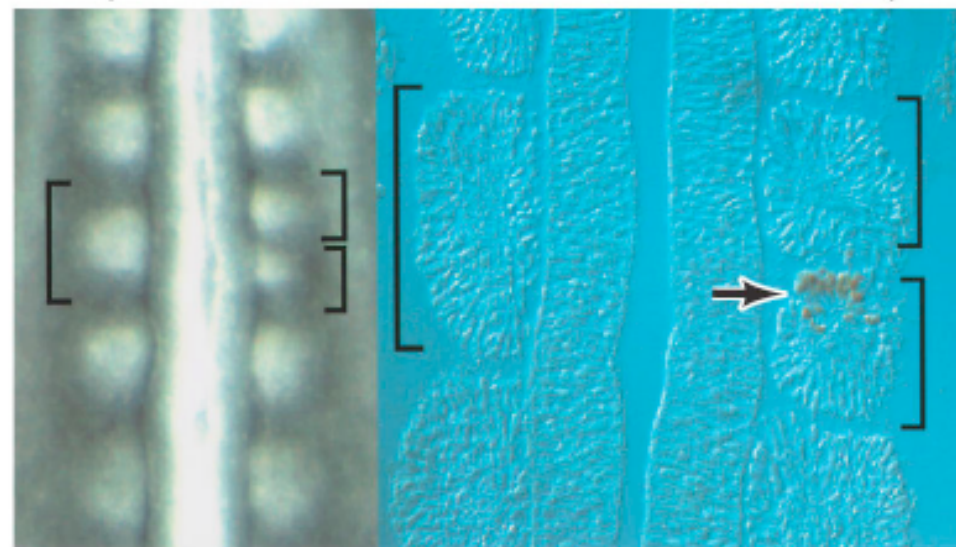
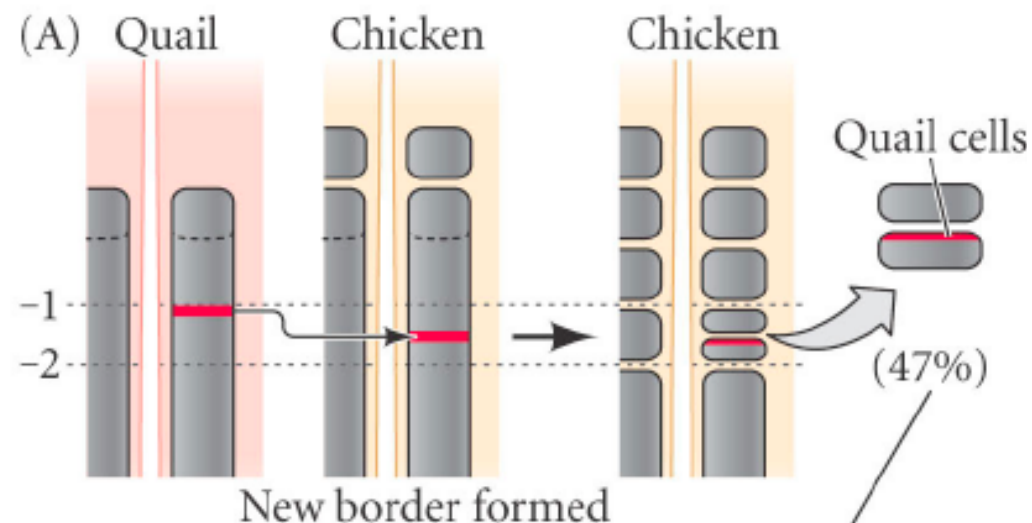
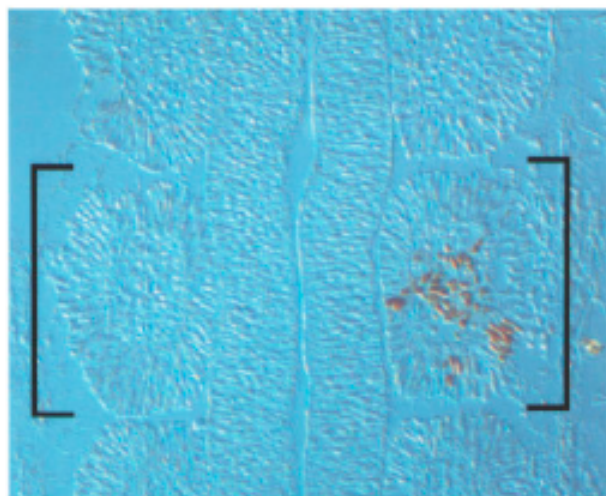
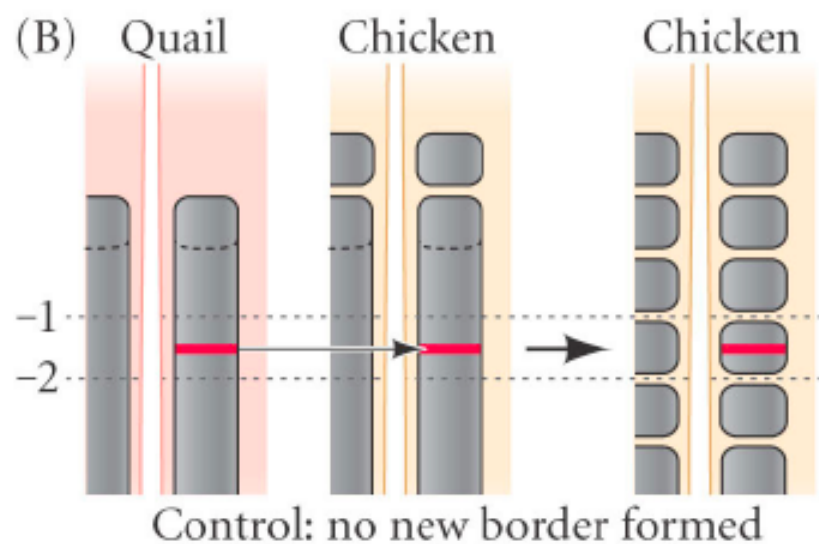


Ο ρόλος των εφρινών

(B)



Σχηματισμός σωμάτων- εφρίνες (ορνιθα-ορτύκι)



Το γονίδιο που κωδικοποιεί την EphA4 είναι στόχος του Notch (όπως και το hairy, αλλά και άλλα γονίδια π.χ Wnts) και με τη σειρά του δρα στην ephrin

Πού και πότε σχηματίζεται ένας σωμίτης



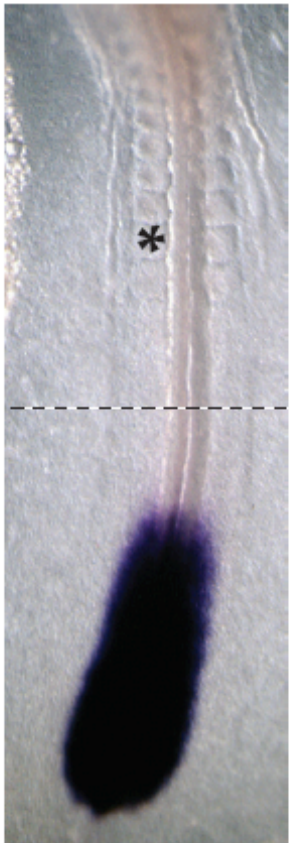
Οι σωμίτες σχηματίζονται σε ζεύγη εκατέρωθεν της νωτοχορδής. Οι σωμίτες κάθε ζεύγους σχηματίζονται ταυτόχρονα.

Η ανάπτυξη των σωμιτών εξελίσσεται προοδευτικά, **κεφαλουριαία**, έτσι οι πρώτοι σωμίτες αρχίζουν να διαφοροποιούνται πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των τελευταίων.

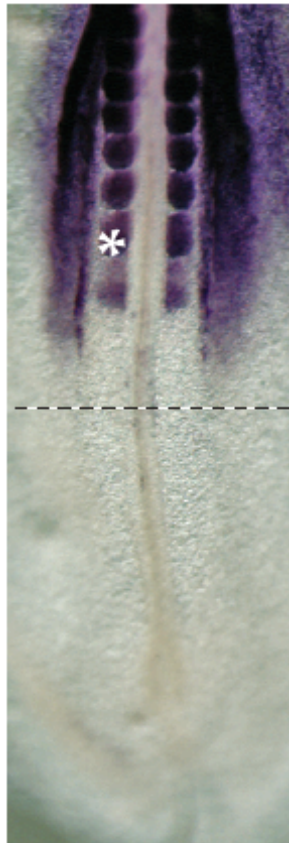
Το μοντέλο του ταλαντωτή (ρολογιού)

Πού και πότε σχηματίζεται ένας σωμίτης

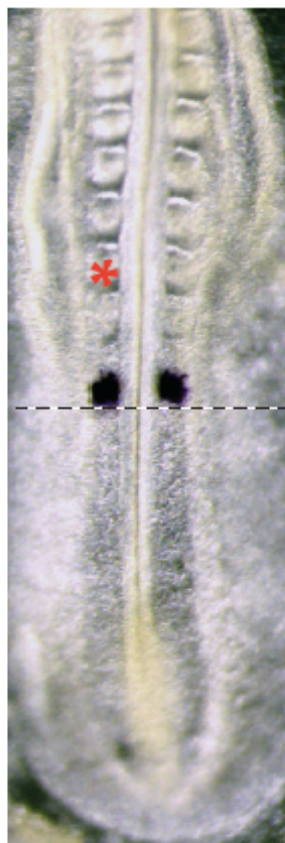
(A) Fgf8



(B) Raldh2



(C) Mesp

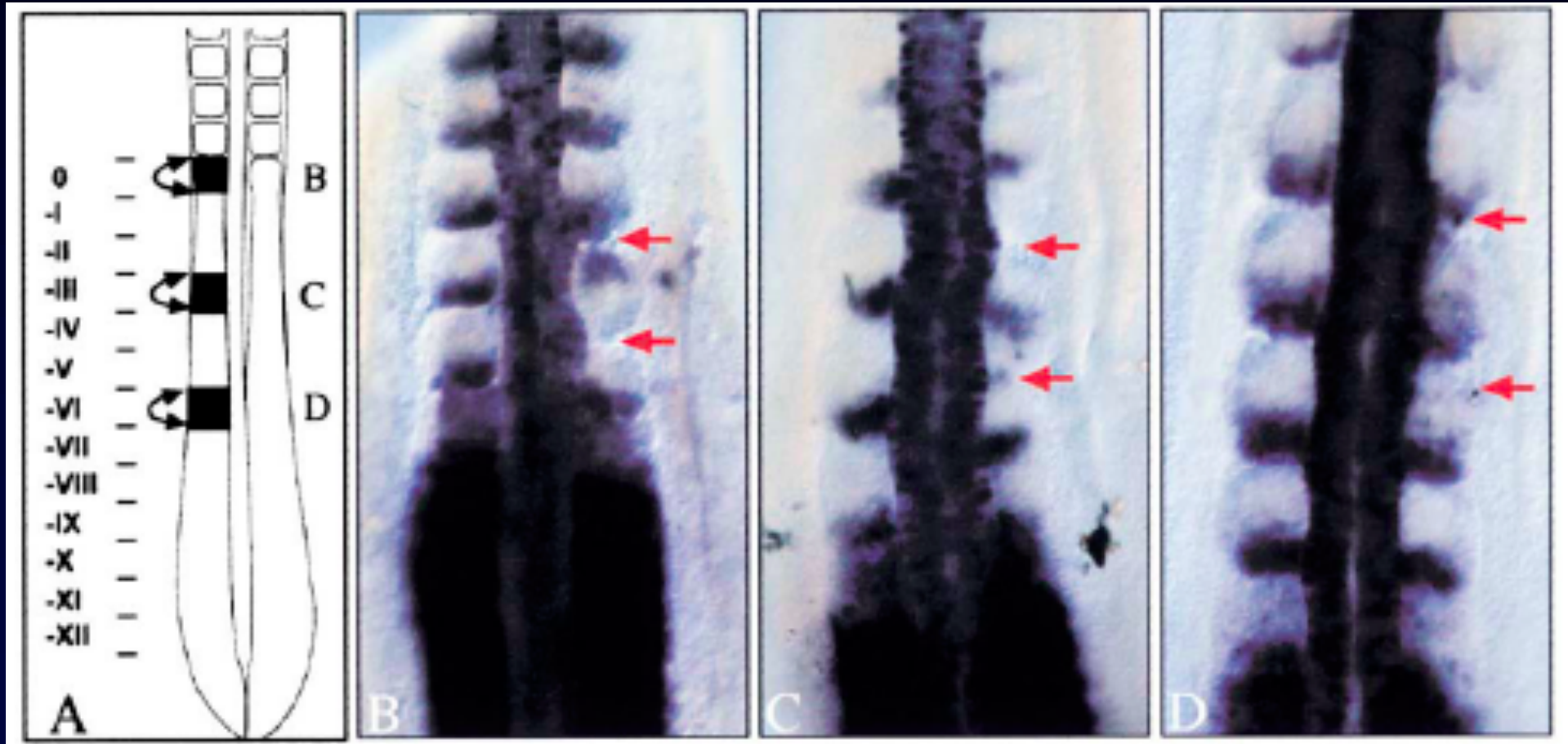


1. Κύτταρα στο μέτωπο καθορισμού = περιοχή με χαμηλά επίπεδα σηματοδότησης ρετινοϊκού και FGF στο προσωμιτικό μεσόδερμα
2. Κύτταρα που μπορούν να αποκριθούν στον ταλαντωτή

Ενεργοποίηση του Mesp/Erh

Το μοντέλο της συνδυαστικής δράσης του μετώπου καθορισμού με τον ταλαντωτή (ρολοϊ)

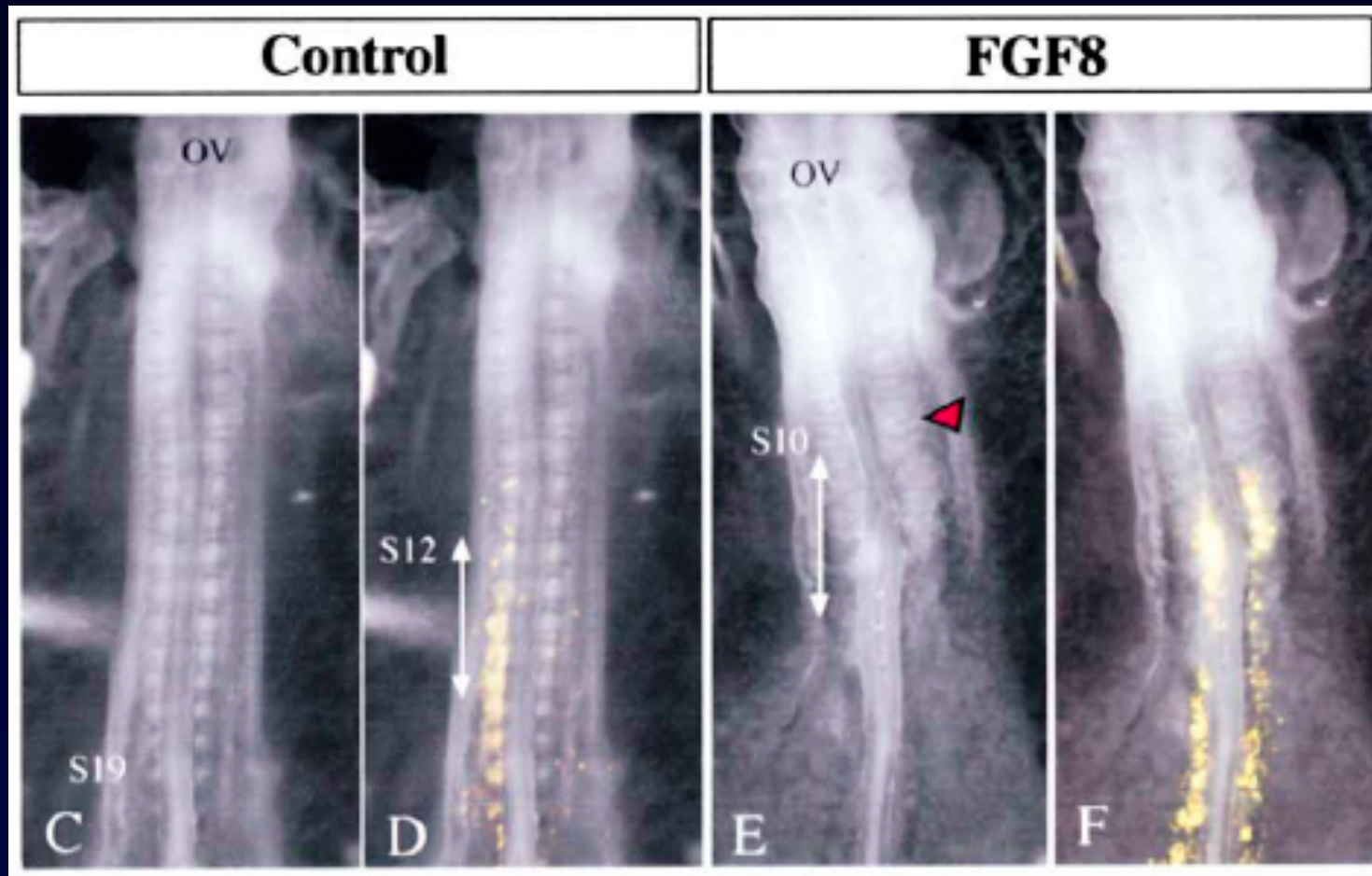
Ο ρόλος του FGF8



Results of inversions of PSM fragments of one somite in length from the level of S0 to S XII as illustrated in (A). Formation of morphological somitic boundaries and anteroposte-rrior patterning of the somitic compartments in the inverted tissue were evaluated after in situ hybridization with delta-3.

Στο S-VI εντοπίζεται το μέτωπο προκαθορισμού του ορίου (determination front)

Ο ρόλος του FGF8

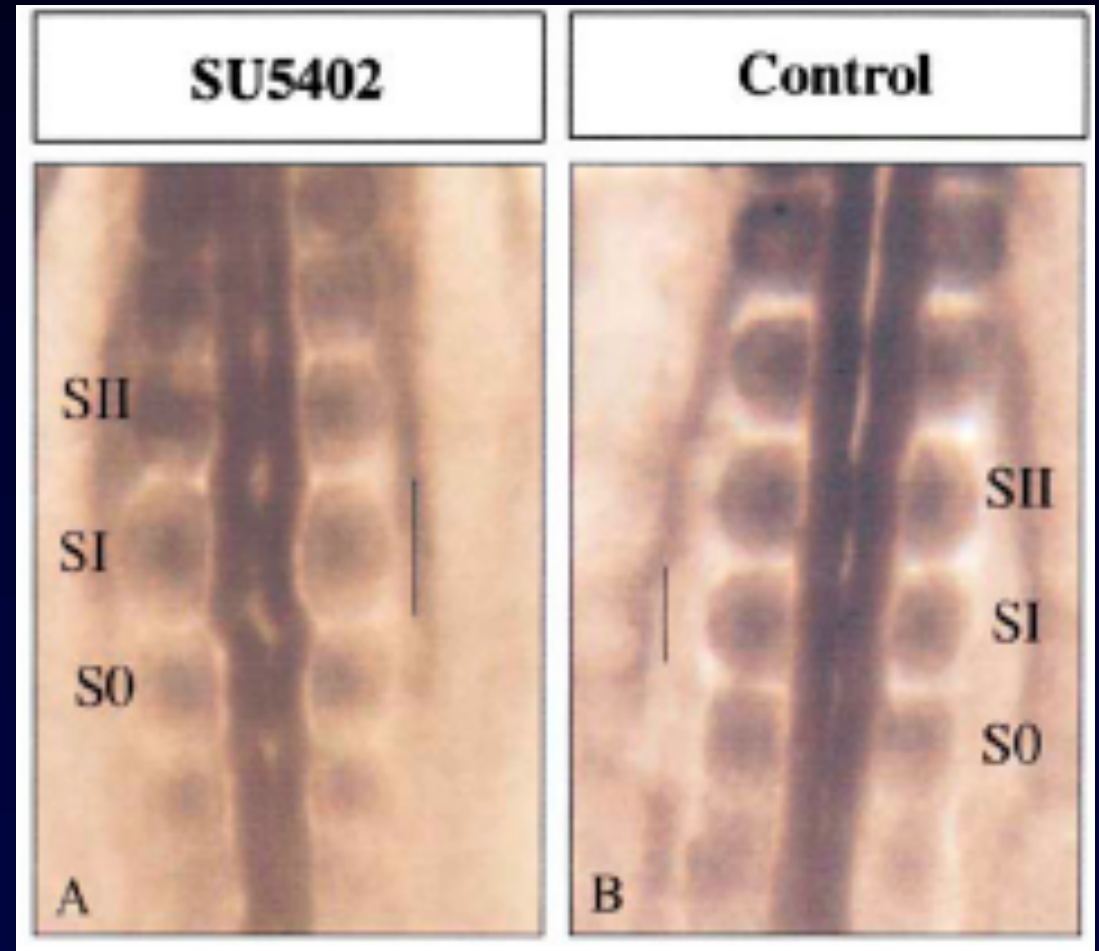
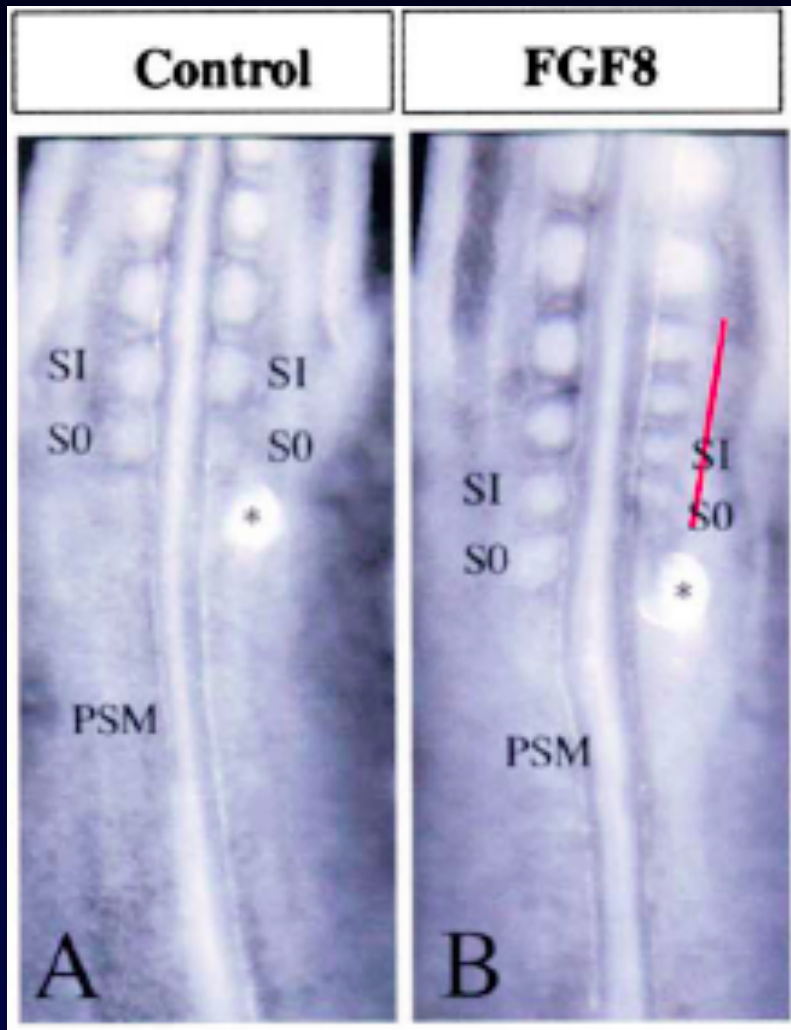


Υπερέκφραση του FGF8 στο PSM έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της σωματογένεσης = ο FGF διατηρεί τα κύτταρα μη διαφοροποιημένα.

C: control, D: μετά από ηλεκτροδιάτρηση με πλασμίδιο που εκφράζει GFP

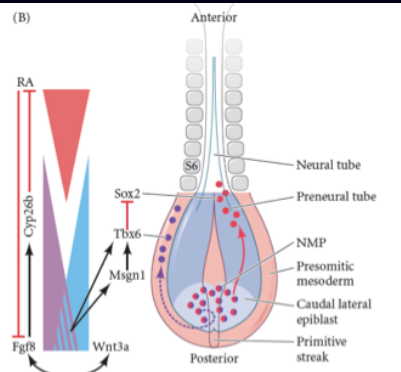
E,F: μετά από ηλεκτροδιάτρηση με πλασμίδιο που εκφράζει FGF8 και GFP Η επώαση των E και F είναι ίδια με αυτή του D. Μέχρι τον S10 οι σωμίτες είναι φυσιολογικά σχηματισμένοι.

Ο ρόλος του FGF8

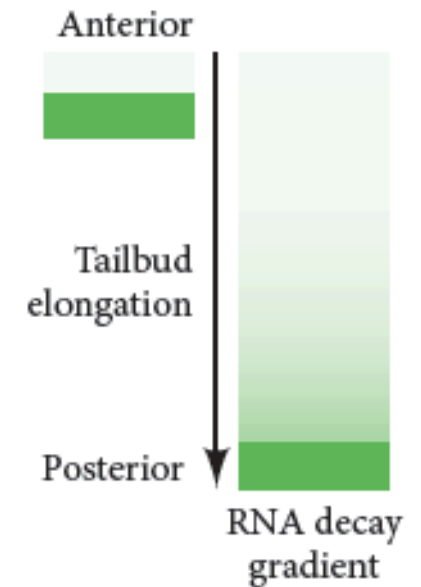
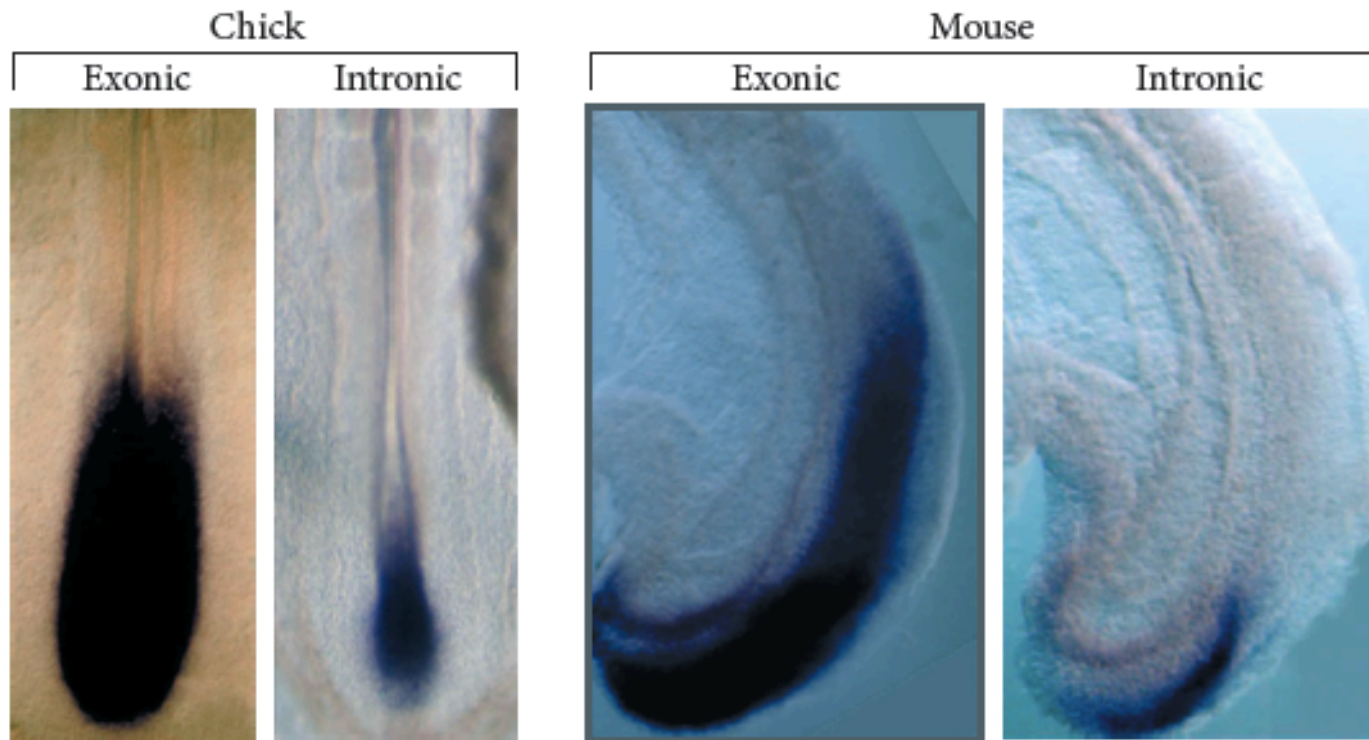


Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του FGF8 έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων σωμιτών.

Αντίθετα η χρήση αναστολέα του μονοπατιού FGF (ένεση SU5402) έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό σωμιτών μεγαλύτερου μεγέθους.



Η κλίση του FGF8



Υβριδοποίηση in situ με ιχνηθέτη εξωνίου ή ιντρονίου.

Η μεταγραφή του FGF8 διατηρείται σταθερή μόνο στην εκτεινόμενη καταβολή της ουράς – στα κύτταρα του προσωμιτικού μεσοδέρματος πραγματοποιείται αποικοδόμηση του RNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλίσης

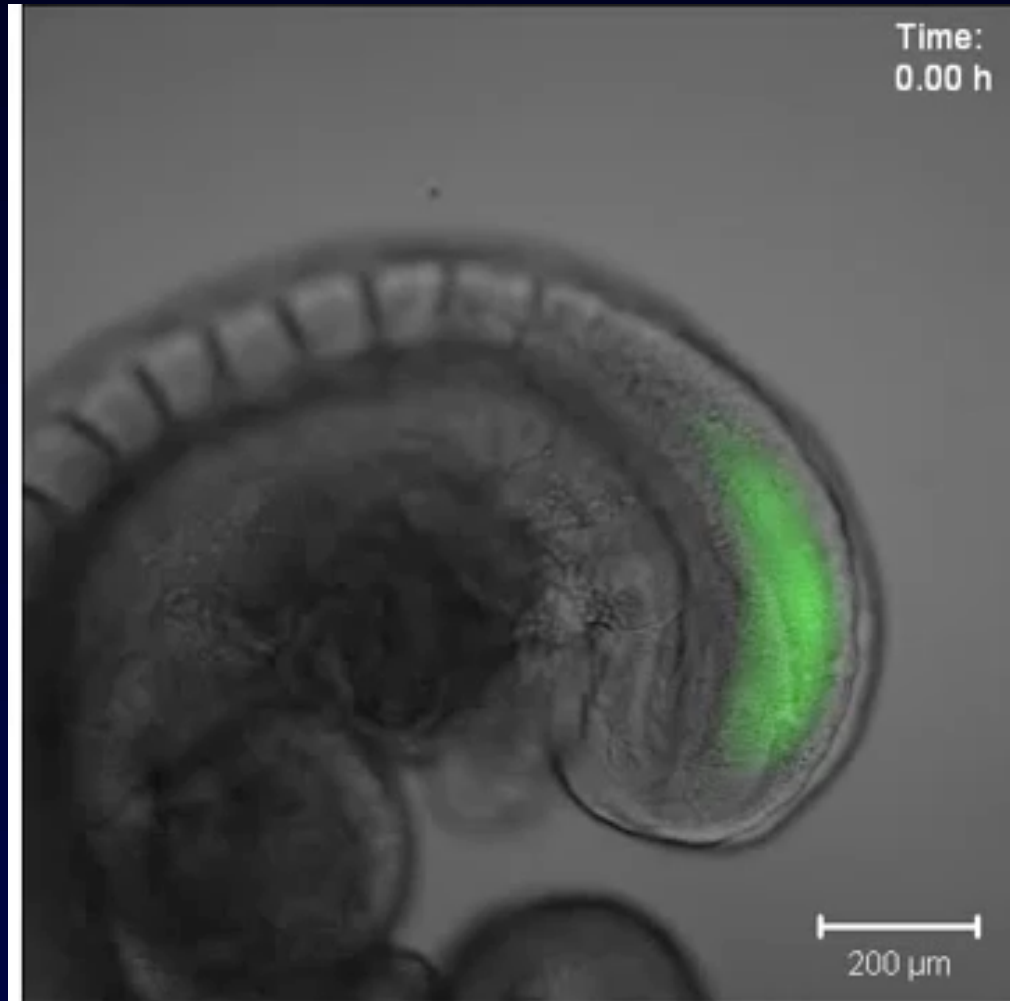
Οι σωμίτες εμφανίζονται περιοδικά



Τα ζεύγη των σωμιτών εμφανίζονται περιοδικά. Στο κοτόπουλο σχηματίζεται περίπου 1 ζεύγος κάθε 90 λεπτά, στον άνθρωπο σχηματίζεται περίπου 1 ζεύγος κάθε 8 ώρες.

Ο αριθμός των σωμιτών είναι χαρακτηριστικός για το κάθε είδος, π.χ κοτόπουλο 50, ποντικός 65, άνθρωπος 44 μερικά φίδια 500.

Οι σωμίτες εμφανίζονται περιοδικά

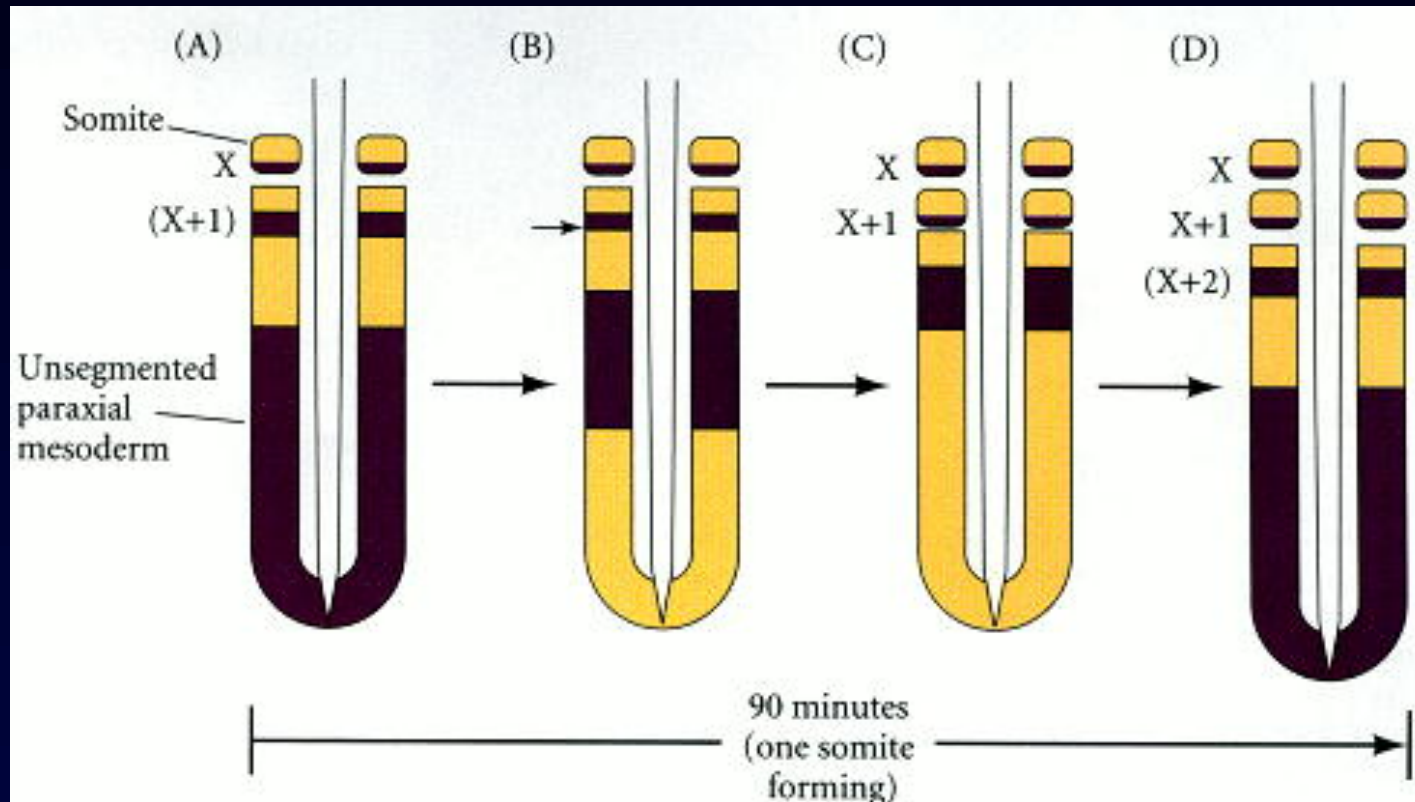


Τα ζεύγη των σωμιτών εμφανίζονται περιοδικά. Στο κοτόπουλο σχηματίζεται περίπου 1 ζεύγος κάθε 90 λεπτά, στον άνθρωπο σχηματίζεται περίπου 1 ζεύγος κάθε 8 ώρες.

Ο αριθμός των σωμιτών είναι χαρακτηριστικός για το κάθε είδος, π.χ κοτόπουλο 50, ποντικός 65, άνθρωπος 44 μερικά φίδια 500.

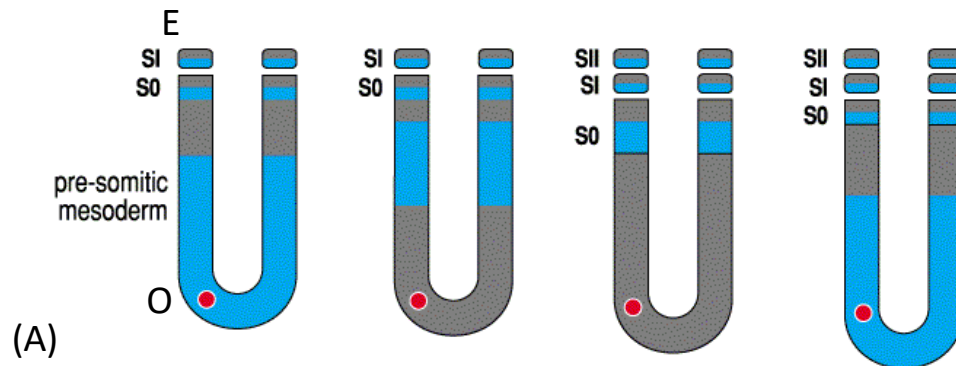
The periodic, anteriorly traveling waves of cyclic gene expression can be seen in the presomitic mesoderm (PSM) of a transgenic mouse embryo. The transgene expresses a destabilized YFP from the cyclic promoter of the Lunatic Fringe gene, an oscillating component of the mouse segmentation clock. See Aulehla et al., 2008. Nat Cell Biol. 10(2):186-93 for more details.

c-hairy 1

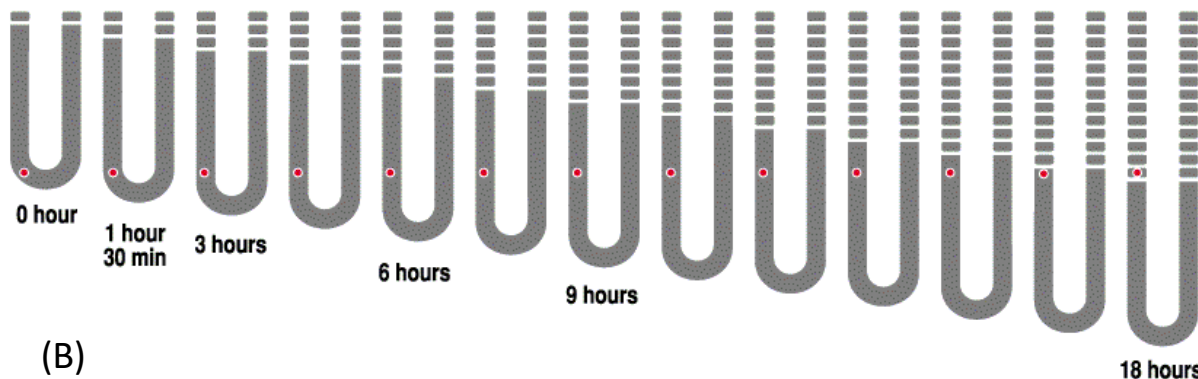


Η έκφραση του γονιδίου *c-hairy 1* κατά το σχηματισμό ενός σωμίτη. (A) Απεικόνιση του οπίσθιου τμήματος ενός εμβρύου κοτόπουλου που έχει X αριθμό σωμιτών. Το hairy εκφράζεται στο οπίσθιο τμήμα του τελευταίου σωμίτη, στο οπίσθιο τμήμα του προσωμιτικού μεσοδέρματος και στο μελλοντικό οπίσθιο τμήμα του επόμενου (X+1) σωμίτη (hairy: καφέ χρώμα). (B) Σχηματισμός της αύλακας που θα χωρίσει τον X+1, μετατόπιση της έκφρασης του hairy. (C) Ο σωμίτης X+1 σχηματίζεται, η έκφραση του hairy μετατοπίζεται ακόμα πιο μπροστά και περιορίζεται. (D) Ολοκληρώνεται ο X+1 και το hairy μετατοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του προσωμιτικού μεσοδέρματος. Το εμπρόσθιο όριο της έκφρασης του hairy στο C είναι τώρα το μελλοντικό οπίσθιο τμήμα του X+2.

c-hairy 1



Έκφραση του hairy κατά το σχηματισμό ενός σωμίτη. (A) Ένα κύτταρο (κόκκινο) που βρίσκεται στο προσωμικό μεσόδερμα εκφράζει περιοδικά το hairy.

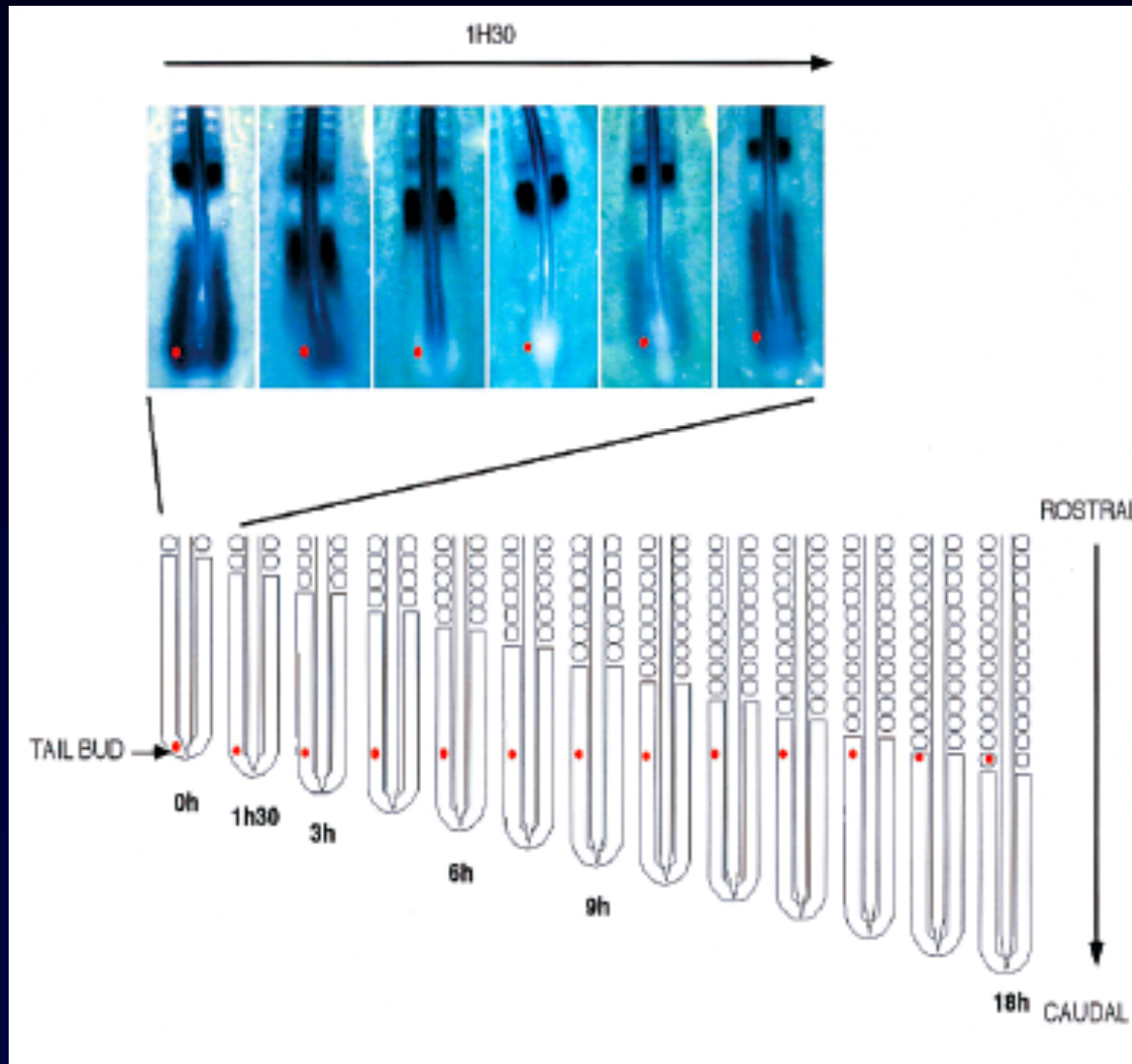


(B) Το κύτταρο της (A) και η θέση του μέχρι να ενσωματωθεί σε ένα σωμίτη. Κύτταρα τα οποία ενσωματώνονται στους εμπρόσθιους σωμίτες έχουν εκφράσει λιγότερους κύκλους hairy. Καθορισμός της ταυτότητάς του κάθε σωμίτη;

Η έκφραση του hairy είναι εγγενής-απομονωμένα τμήματα προσωμικού μεσοδέρματος που καλλιεργούνται in vitro διατηρούν την περιοδική έκφραση του hairy.

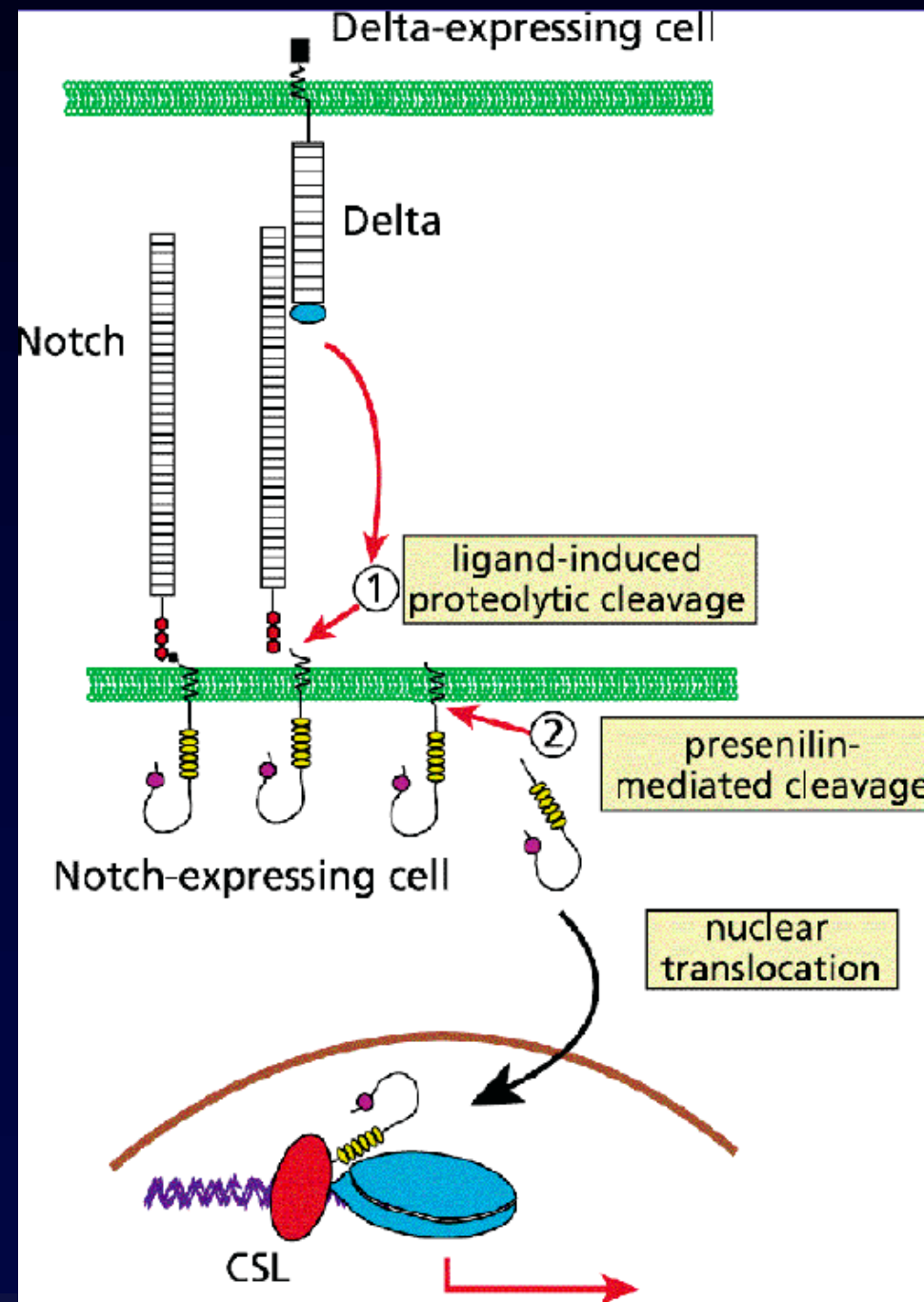
Το γονίδιο hairy κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα.
Πώς γίνεται η ενεργοποίησή του? Ποιοι είναι οι στόχοι του??

Το μονοπάτι Notch



Τα Notch, Delta και το lunatic fringe (κωδικοποιεί μια γλυκοζυλοτρανσφεράση που προσθέτει κατάλοιπα σακχάρων στη Notch) ταλαντώνονται επίσης - στο μελλοντικά οπίσθιο τμήμα του σωμίτη, ενεργοποιείται το μονοπάτι Notch (zebrafish- delta C).

Το μονοπάτι Notch



Το μονοπάτι Notch

(A) Mouse

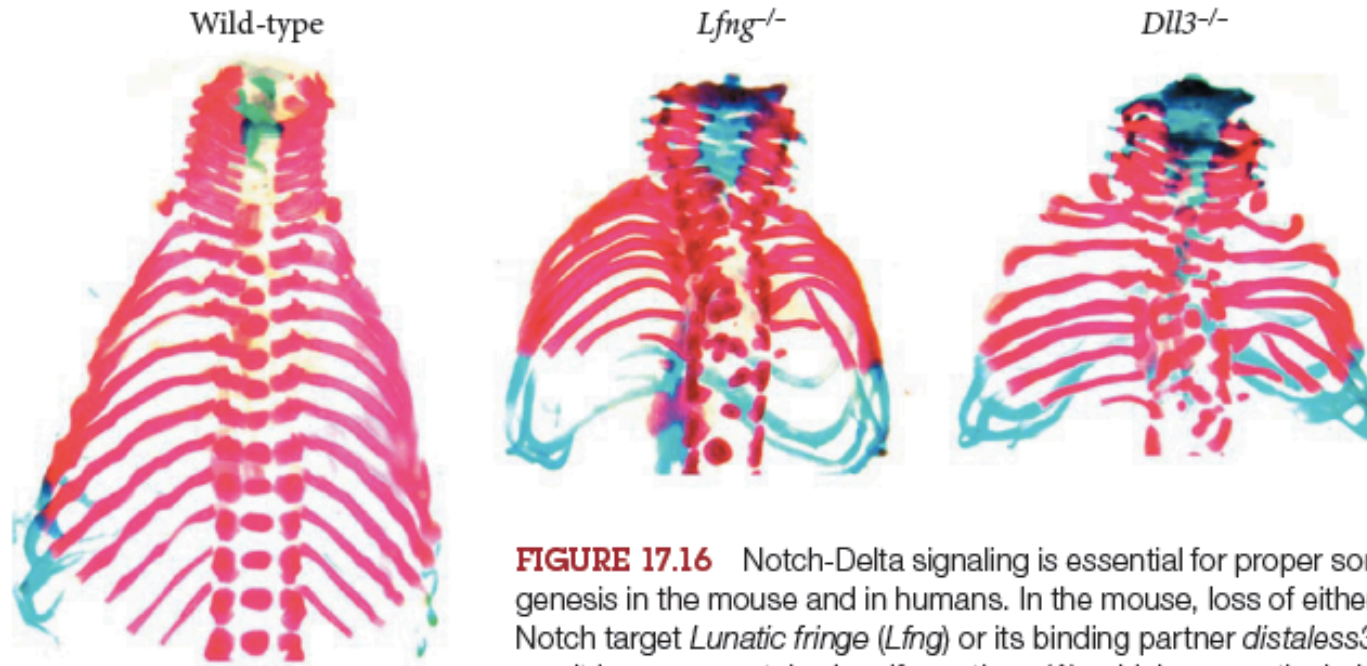


FIGURE 17.16 Notch-Delta signaling is essential for proper somitogenesis in the mouse and in humans. In the mouse, loss of either the Notch target *Lunatic fringe* (*Lfng*) or its binding partner *distaless3* (*Dll3*) result in severe vertebral malformations (A), which are particularly similar to the phenotype caused by known mutations in the human *Lunatic fringe* (B). (A from Fisher et al. 2012; B from Sparrow et al. 2006.)

Ποντικοί από τους οποίους απουσιάζει το notch ή το lunatic fringe εμφανίζουν προβλήματα στο μεταμερισμό αν και η διαφοροποίηση των σωμιτών είναι OK.

Υπερέκφραση του *notch* στο ψάρι ζέβρα επίσης διαταράσσει το πρότυπο μεταμερισμού.

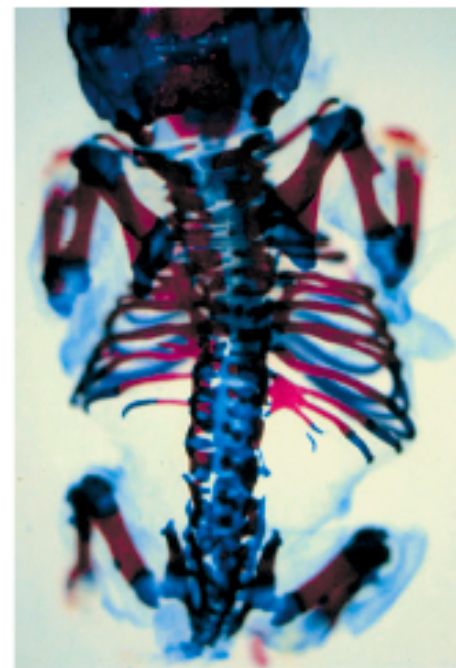
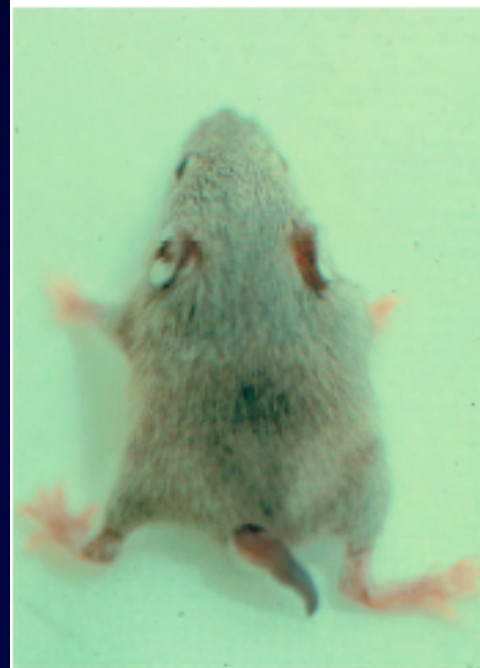
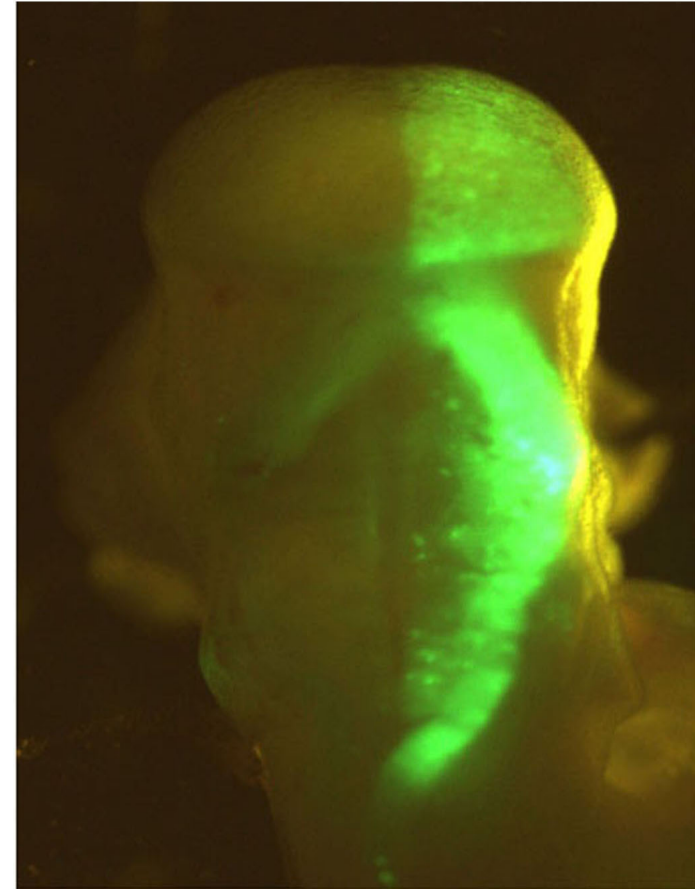
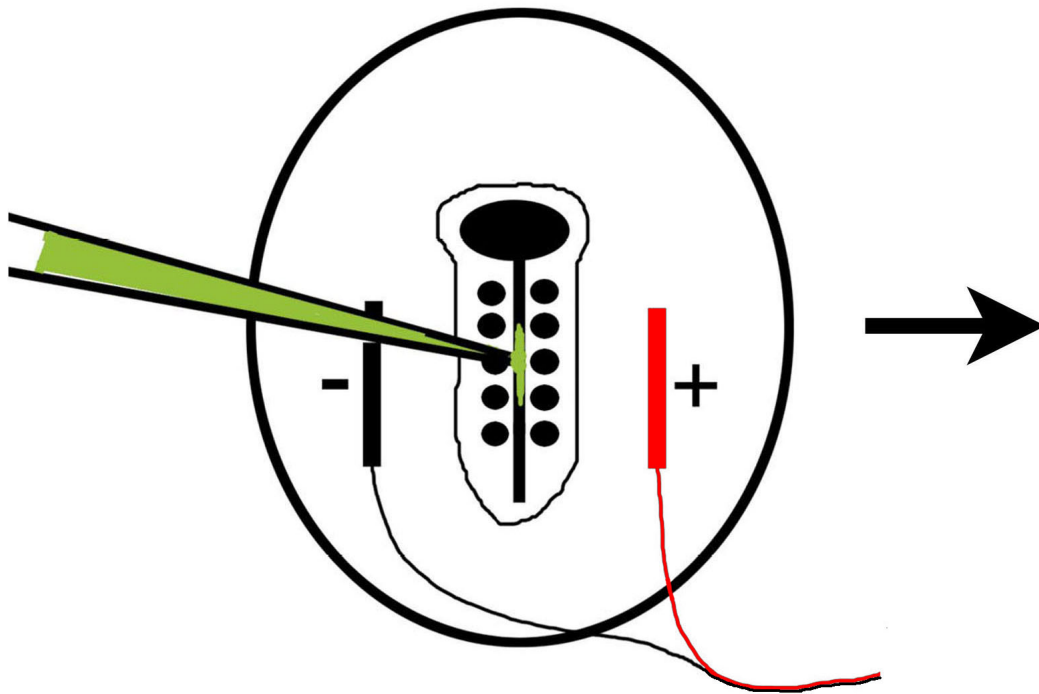


Fig. 4. Vertebral malformations and trunk shortening in *Delta-like 3* mutations. In both human spondylocostal dysostosis and mouse *Dtl3^{pu}* (pudgy), extensive vertebral malformations can be seen in radiograph (human) and neonatal Alizarin red/Alcian blue skeletal preparation (mouse). These segmentation defects result in truncal dwarfism and kypho-scoliotic deviations of the vertebral column. Reproduced with permission from the Nature Publishing Group, Bulman et al., Nat Genet 2000; 24: 438–441 (32).

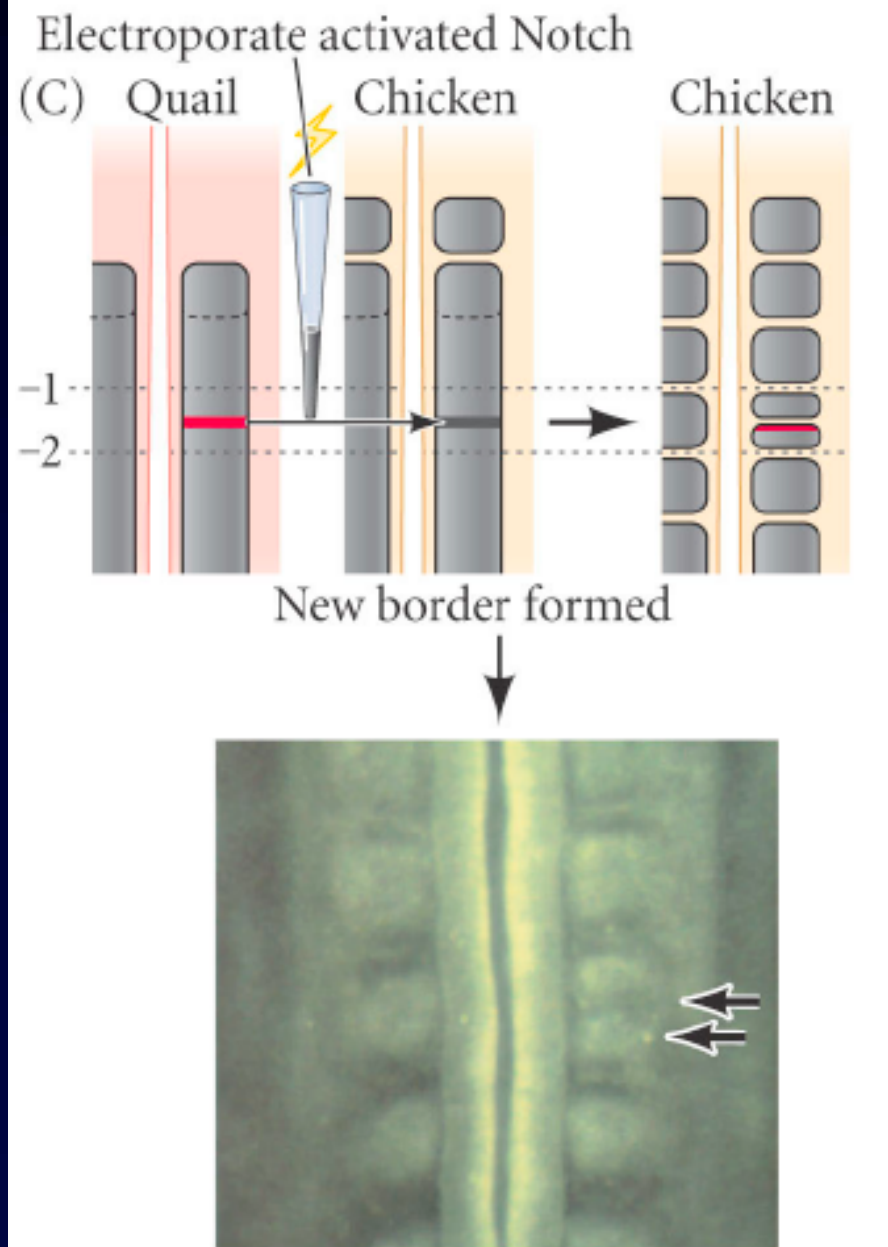
Το μονοπάτι Notch

Ηλεκτροδιάτρηση in ovo σαν μέσο
γονιδιακής μεταφοράς in vivo

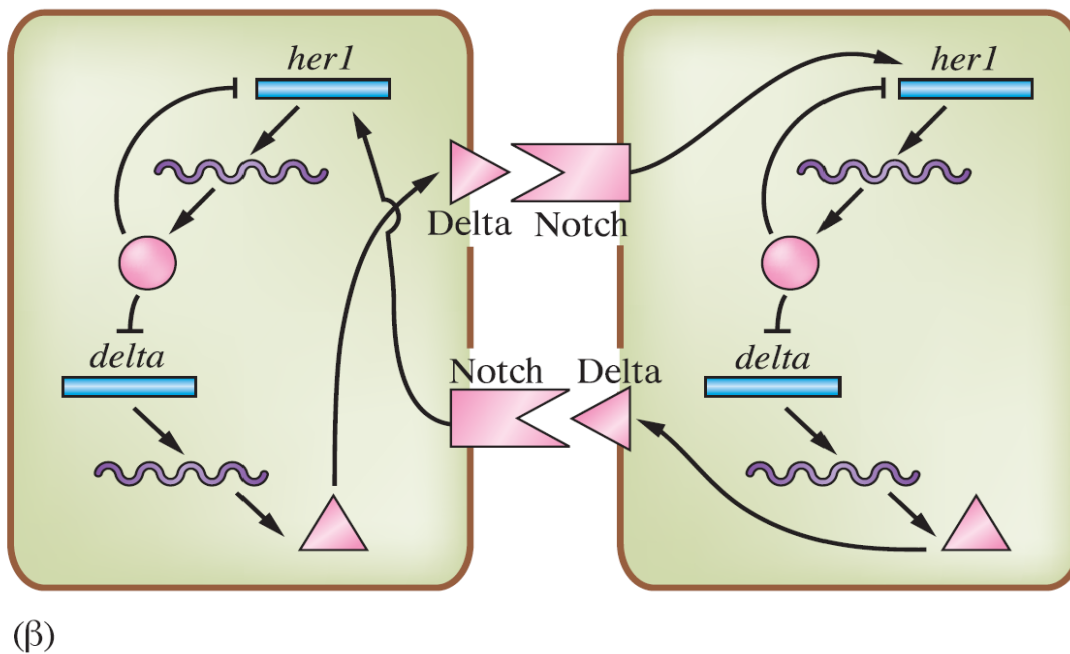
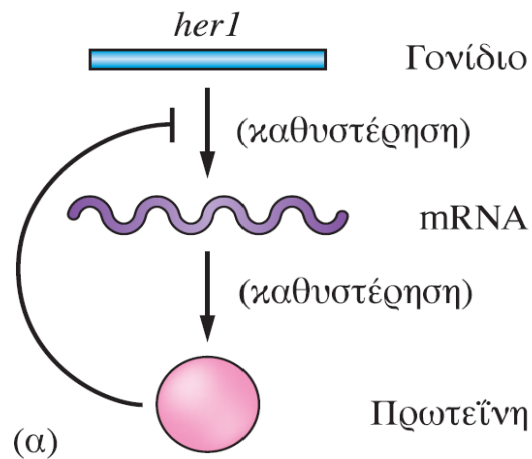


Εκφραση της GFP 36 ώρες
μετά την ηλεκτροδιάτρηση

Το μονοπάτι Notch



Περιοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού

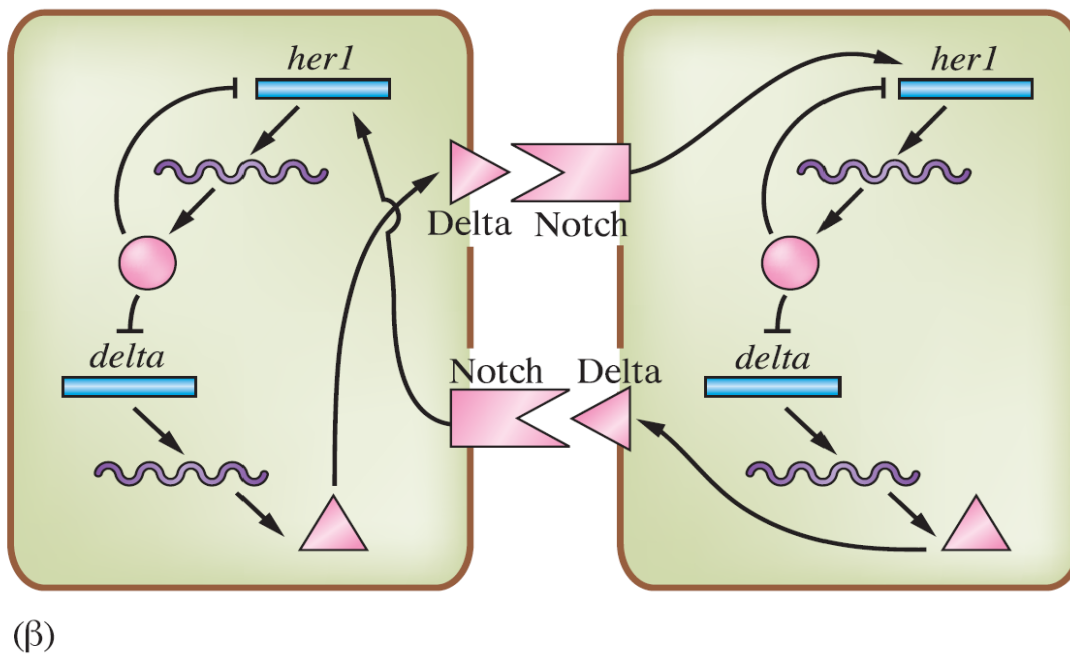
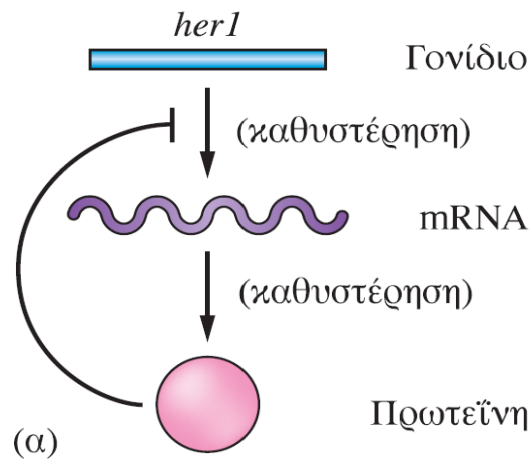


Hes τα ομόλογα του hairy στον ποντικό

Her τα ομόλογα του hairy στο ψάρι ζέβρα.

Αυτορρύθμιση των παραγόντων hairy.

Αντισημαίνοντα ολιγονουκλεο-τίδια έναντι του hairy σταματούν τον ταλαντωτή



Η *her* καταστέλλει τη *delta* ενώ η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch αυξάνει τη μεταγραφή του *her*.

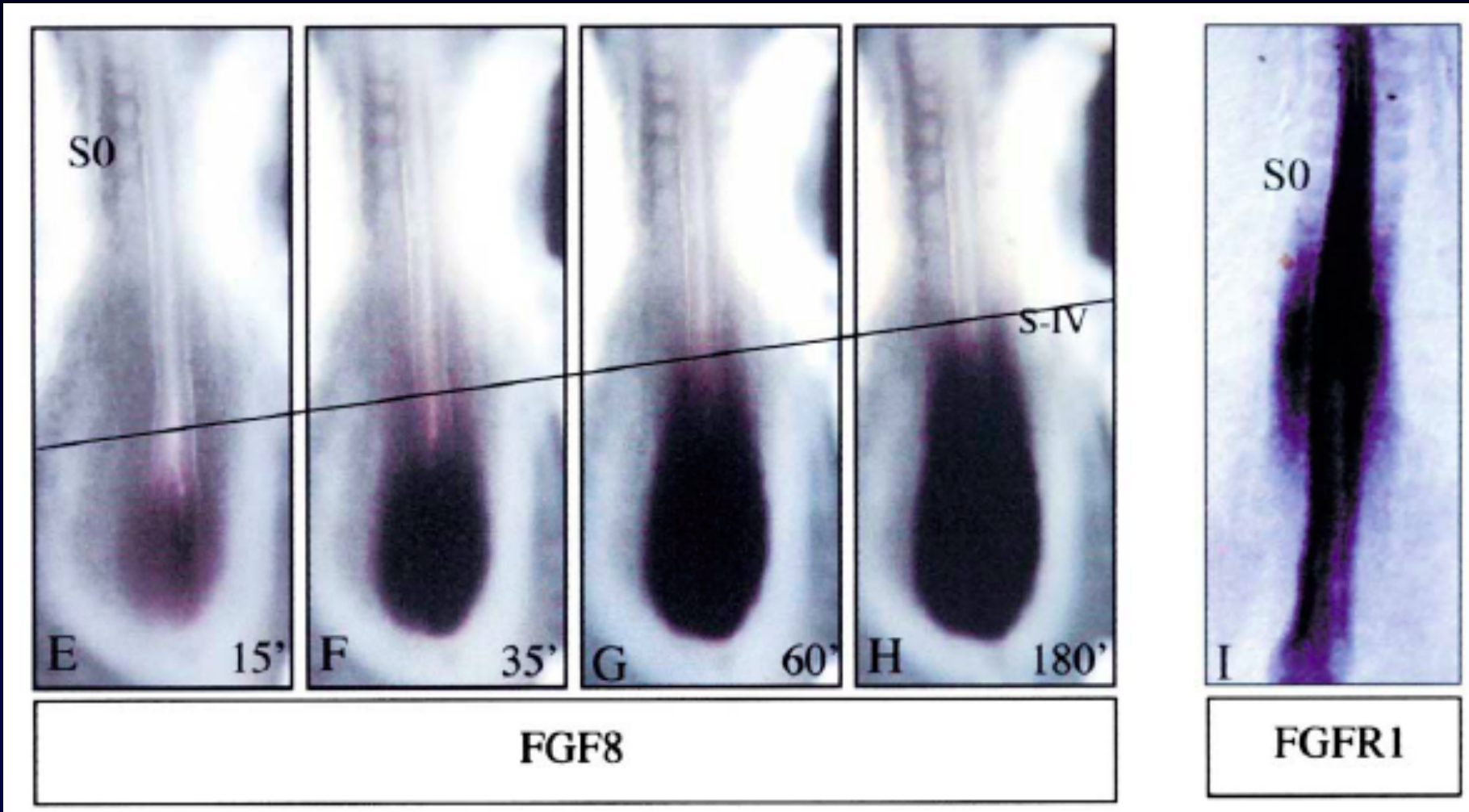
Διαφορές από οργανισμό σε οργανισμό

Καταστολή της Delta στον ποντικό περιορίζει τις ταλαντώσεις.

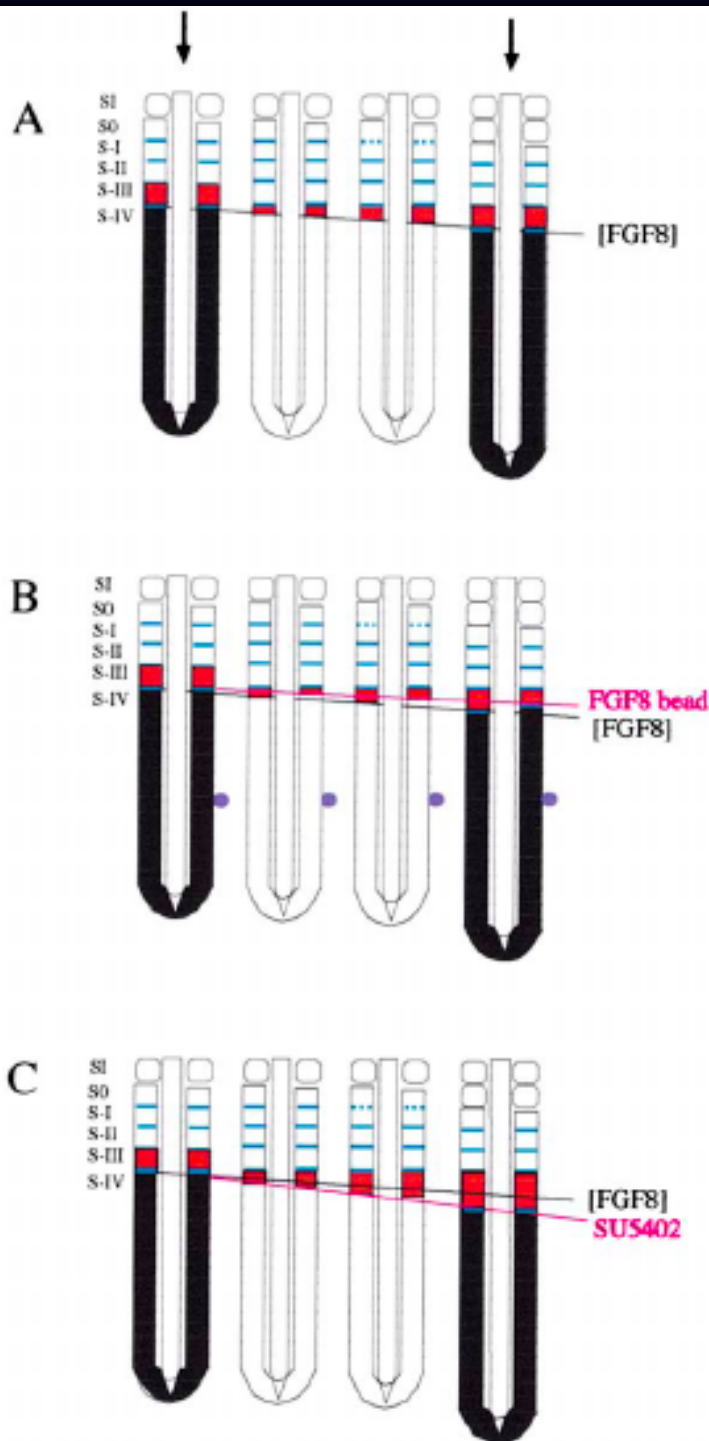
αλλά

στο ψάρι ζέβρα οι ταλαντώσεις συνεχίζονται ωστόσο χάνεται ο συγχρονισμός τους

Ο ρόλος του FGF8 – επιλογή ορίων του σωμίτη...



(E), 35 (F), 60 (G), and 180 min (H) of **staining reaction** to demonstrate the graded expression of this mRNA in the caudal PSM. (I) In situ hybridization with the FGFR1 probe of a 14-somite stage embryo.



Τα όρια των σωμιτών καθορίζονται από τον ταλαντωτή σε συνεργασία με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης του FGF8.

Το μονοπάτι FGF8 καταστέλλει την έκφραση του Delta (zebrafish) και διατηρεί το αξονικό μεσόδερμα αναστέλλει μεταμερισμό

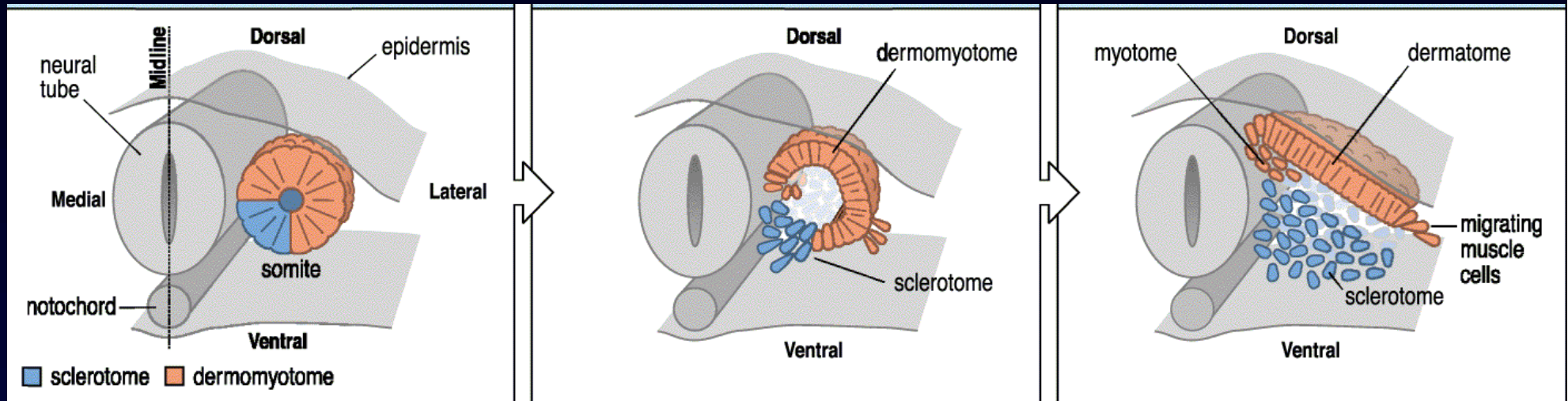
Τα όρια σχηματίζονται στο σημείο στο οποίο τα επίπεδα του FGF8 πέφτουν χαμηλότερα από κάποιο κατώφλι και ενεργοποιείται η σηματοδότηση Notch (=βρίσκονται σε επαφή δύο πληθυσμοί κυττάρων που βρίσκονται σε διαφορετική φάση του ταλαντωτή).

Η περιοδικότητα οφείλεται στον ταλαντωτή

Το μέγεθος των σωμιτών καθορίζεται από το ρυθμό υποχώρησης της έκφρασης του FGF8.

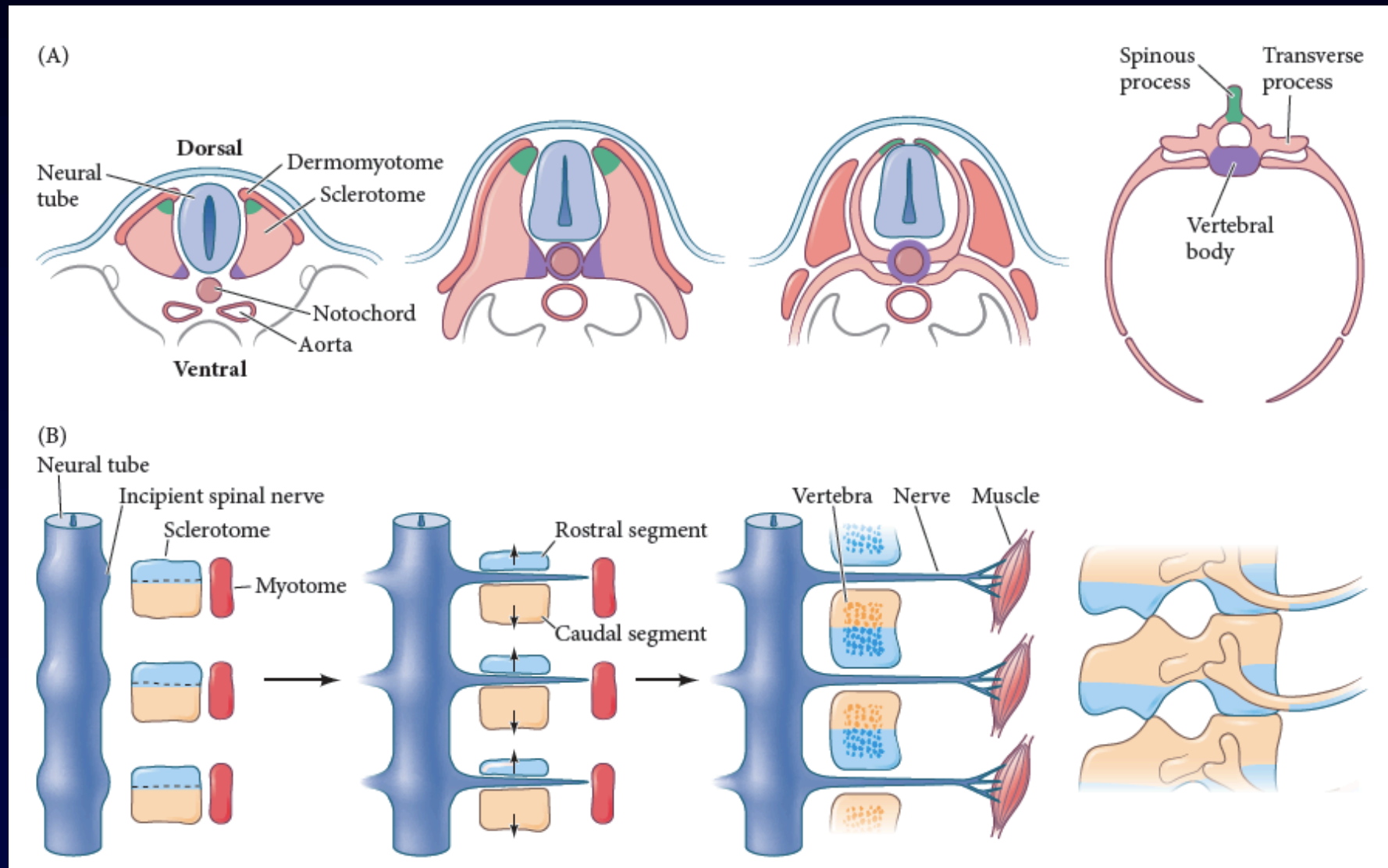
Ωστόσο εμπλέκονται (τουλάχιστον στον ποντικό) και το μονοπάτι Wnt (διαβάθμιση οπίσθιο-εμπρόσθιο) και το ρετινοϊκό

Το πεπρωμένο των σωμιτικών κυττάρων



Οι σωμίτες διαφοροποιούνται σε τρία μέρη. Το κοιλιακό έσω τμήμα χάνει το περίγραμμά του, τα κύτταρα αλλάζουν μορφολογία και μεταναστεύουν προς το νευρικό σωλήνα και τη νωτοχορδή όπου σχηματίζουν ένα χαλαρό ιστό που ονομάζεται **σκληροτόμιο** (sclerotome). (**πλευρές, τένοντες, σπόνδυλοι**). Απο το ραχιαίο τμήμα του σκληροτομίου (=συνδετόμιο), σχηματίζονται οι **τένοντες**. Κάθε σπόνδυλος αναπτύσσεται από το οπίσθιο ήμισυ ενός σωμίτη + το εμπρόσθιο ήμισυ του επόμενου.

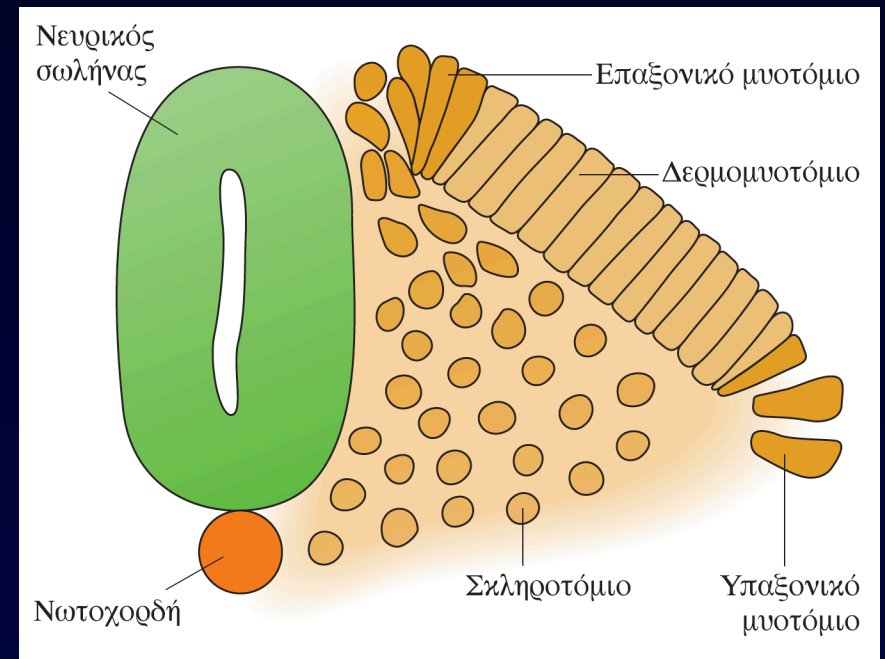
Το πεπρωμένο των σωμιτικών κυττάρων



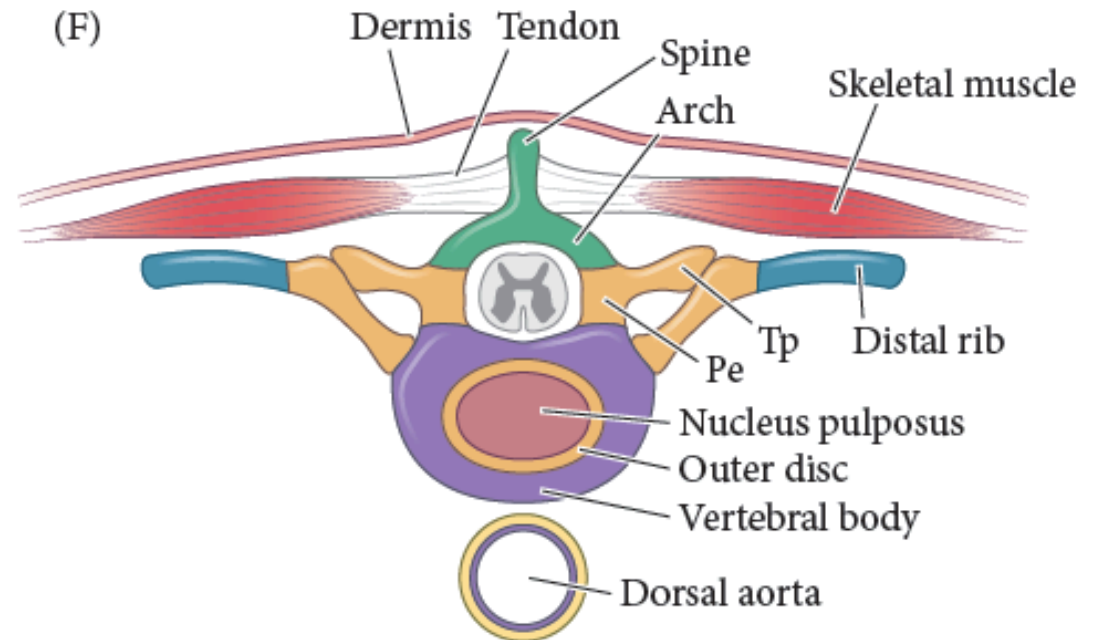
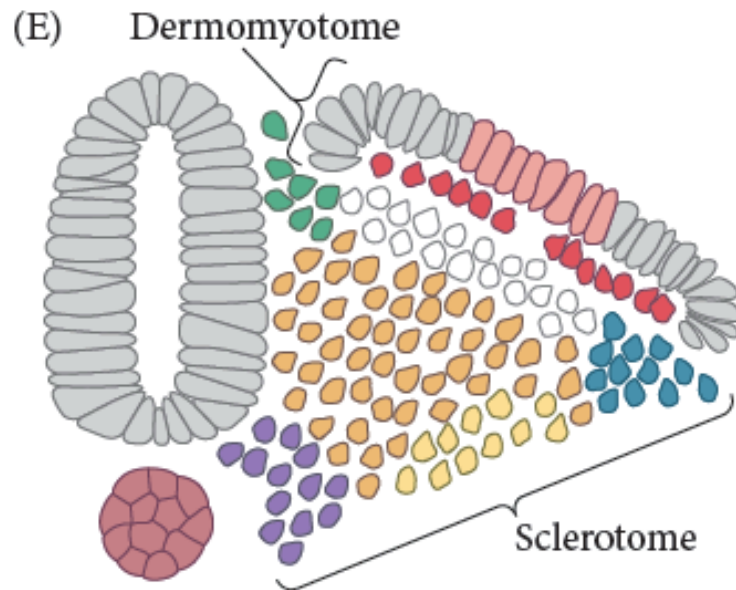
Οι σπόνδυλοι βρίσκονται σε σχέση με τους σωμίτες εκτός φάσης κατά μισό μεταμερές
= ανασχηματισμός του μεταμερισμού

Το πεπρωμένο των σωμιτικών κυττάρων

Το τμήμα που παραμένει μετά το σχηματισμό των σκληροτομίων είναι το **δερμομυοτόμιο** (dermomyototome). Κοντά στη μέση γραμμή εντοπίζεται το **επαξονικό μυοτόμιο** (από αυτό προκύπτουν οι μεταμερικοί μύες του κύριου άξονα του σώματος) και στο πλευρικό τμήμα το **υπαξονικό μυοτόμιο**, (από αυτό σχηματίζονται οι μύες του κοιλιακού σωματικού τοιχώματος, τα άκρα και το διάφραγμα). Από τα κύτταρα του δερματομίου που διασπείρονται κάτω από το εξώδερμα προκύπτει το **χόριο του δέρματος**.



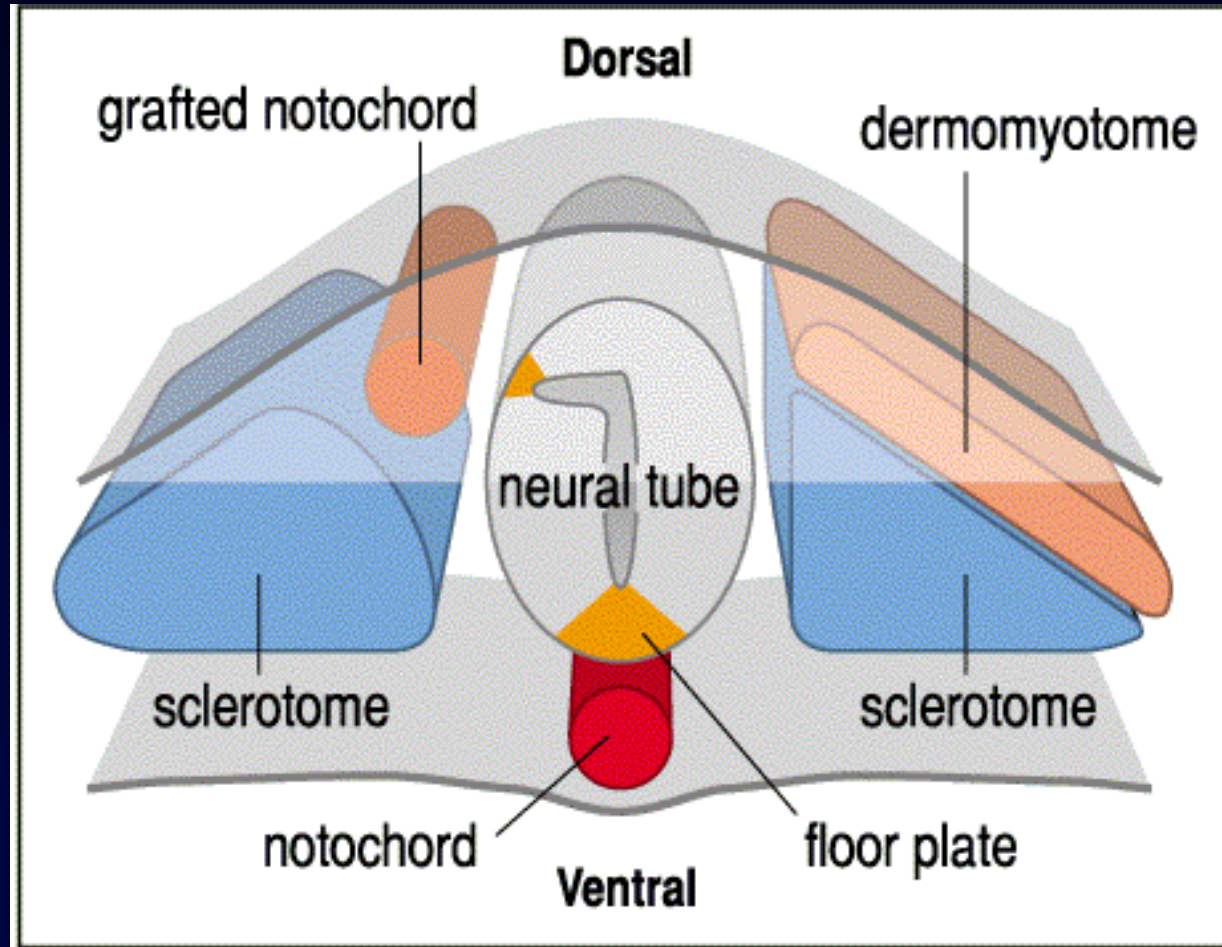
Το πεπρωμένο των σωμιτικών κυττάρων



- Arthrotome: vertebral joints (Pe, Tp), proximal rib, outer disc
- Dorsomedial sclerotome: spine, arch
- Ventrolateral sclerotome: distal rib
- Ventromedial sclerotome: vertebral body
- Notochord: inner disc/nucleus pulposus

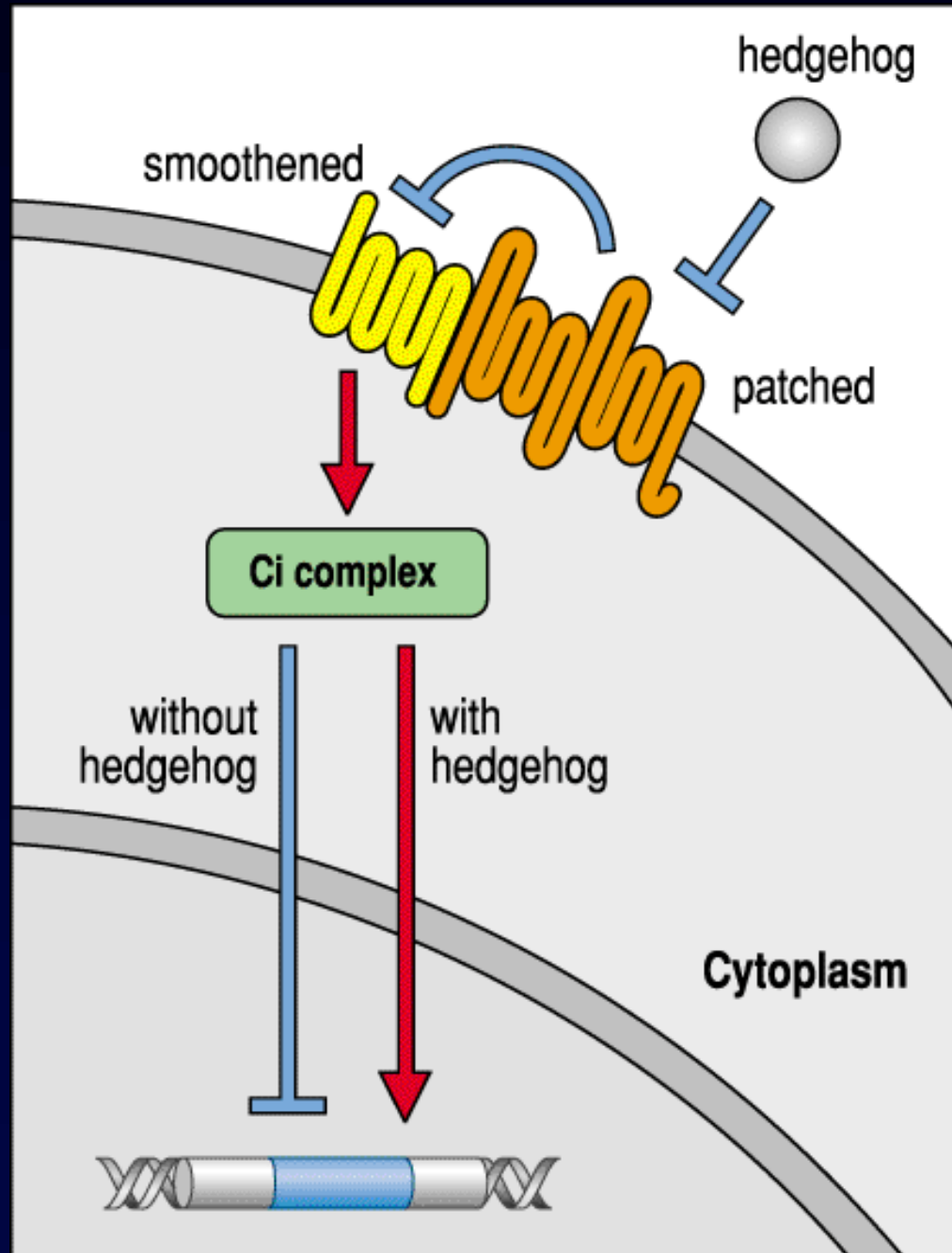
- Ventral posterior sclerotome: endothelial precursor: outer dorsal aorta
- Syndetome: tendons
- Myotome
- Dermatome: dermis

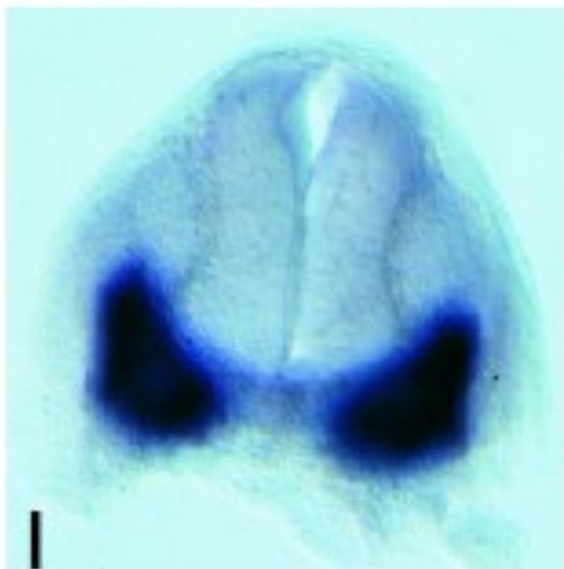
Καθορισμός του σκληροτομίου: ο ρόλος της νωτοχορδής και του *sonic hedgehog*



Μεταμόσχευση δεύτερης νωτοχορδής στο προσωμικό μεσόδερμα έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή όλων των σωματικών κυττάρων σε πρόδρομα κύτταρα χόνδρου. Το ίδιο συμβαίνει και σε μεταμόσχευση εδαφιαίου πετάλου ή κυττάρων COS που παράγουν *sonic hedgehog* = καθορισμός κοιλιακού τμήματος του σωμίτη. (BMP; για ραχιαίο;)

Το μονοπάτι hedgehog





Καθορισμός του σκληροτομίου: ο ρόλος της νωτοχορδής και του *sonic hedgehog*

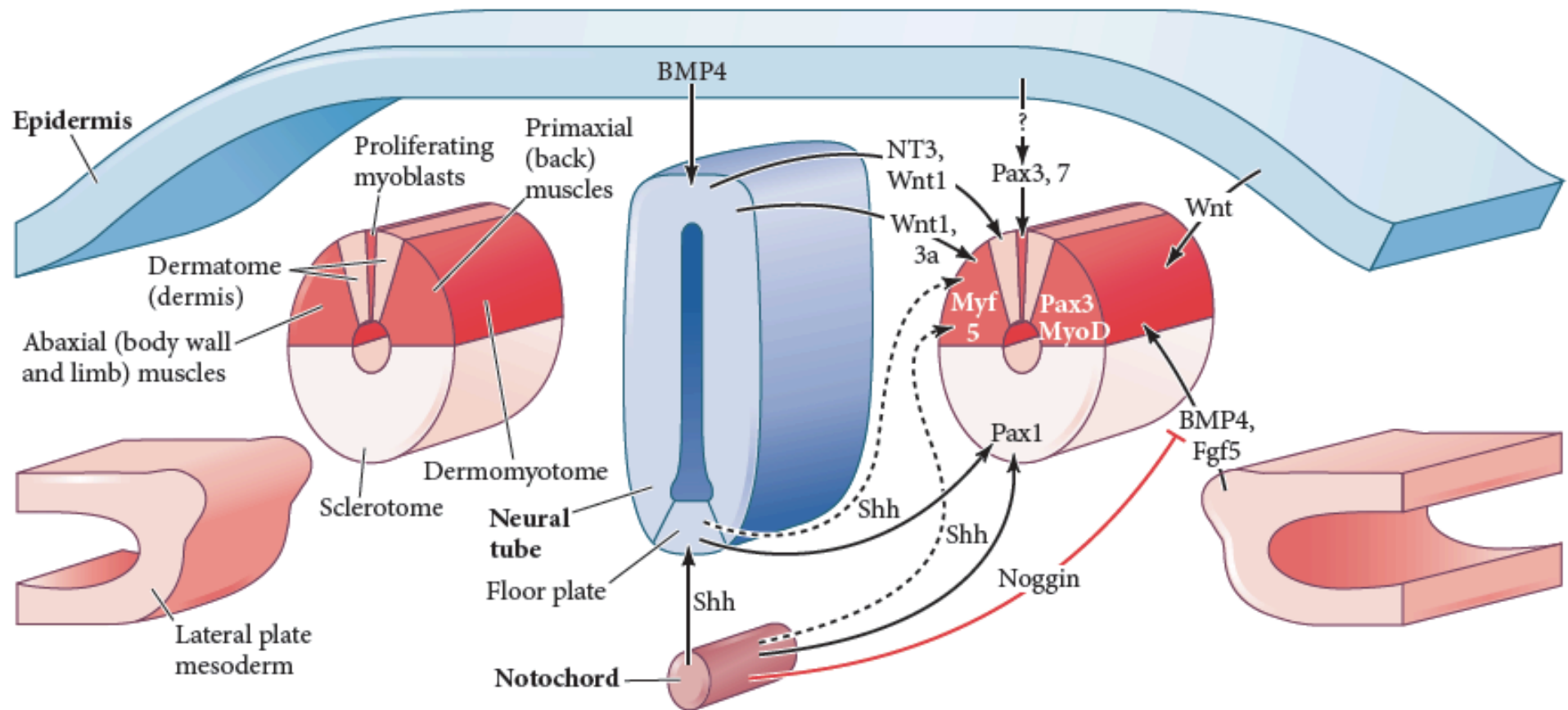
Απομάκρυνση της νωτοχορδής και του νευρικού σωλήνα έχει σαν αποτέλεσμα την απόπτωση των περισσότερων σωματικών κυττάρων (μόνο οι μύες των άκρων αναπτύσσονται) .

Έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η SHH στερούνται των παραγώγων του σκληροτομίου.

Στόχοι του μονοπατιού hedgehog είναι τα γονίδια *rax1* και *sox9* - εκφράζονται στο σκληροτόμιο.

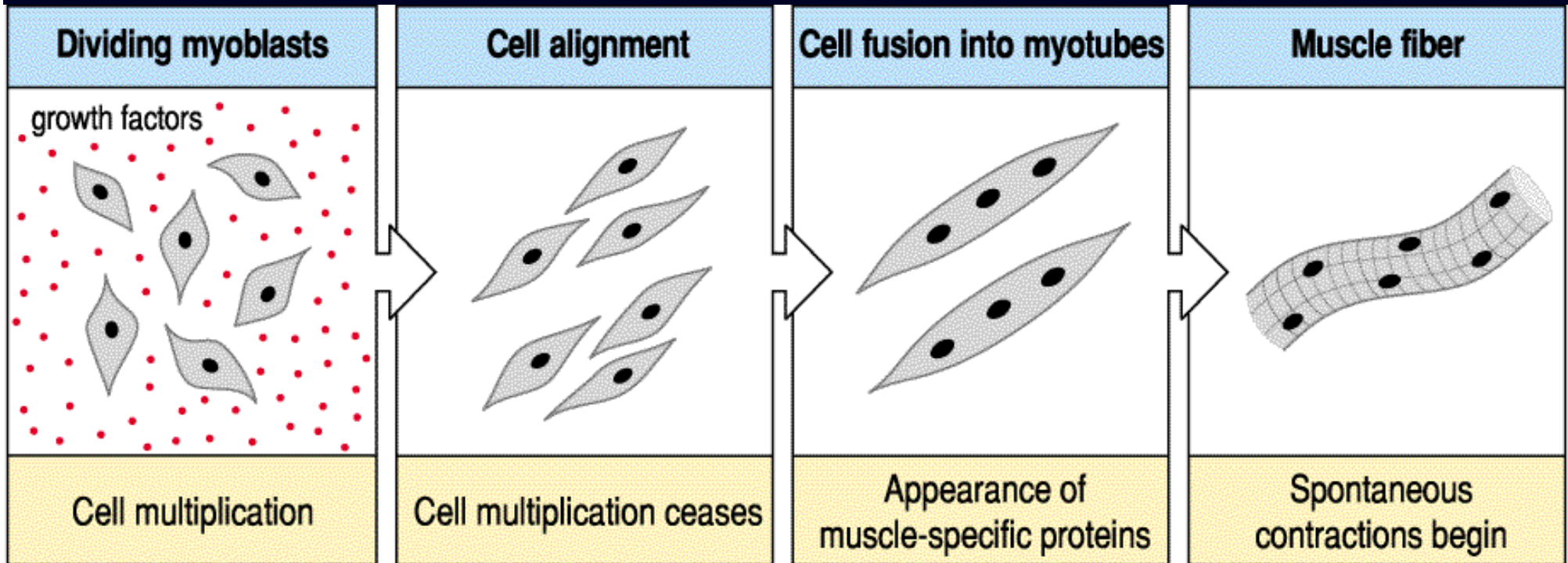
Επίσης στόχοι είναι και οι μυογενείς καταστολείς *Id*.

Σηματοδότηση και καθορισμός του πεπρωμένου των κυττάρων του σωμίτη



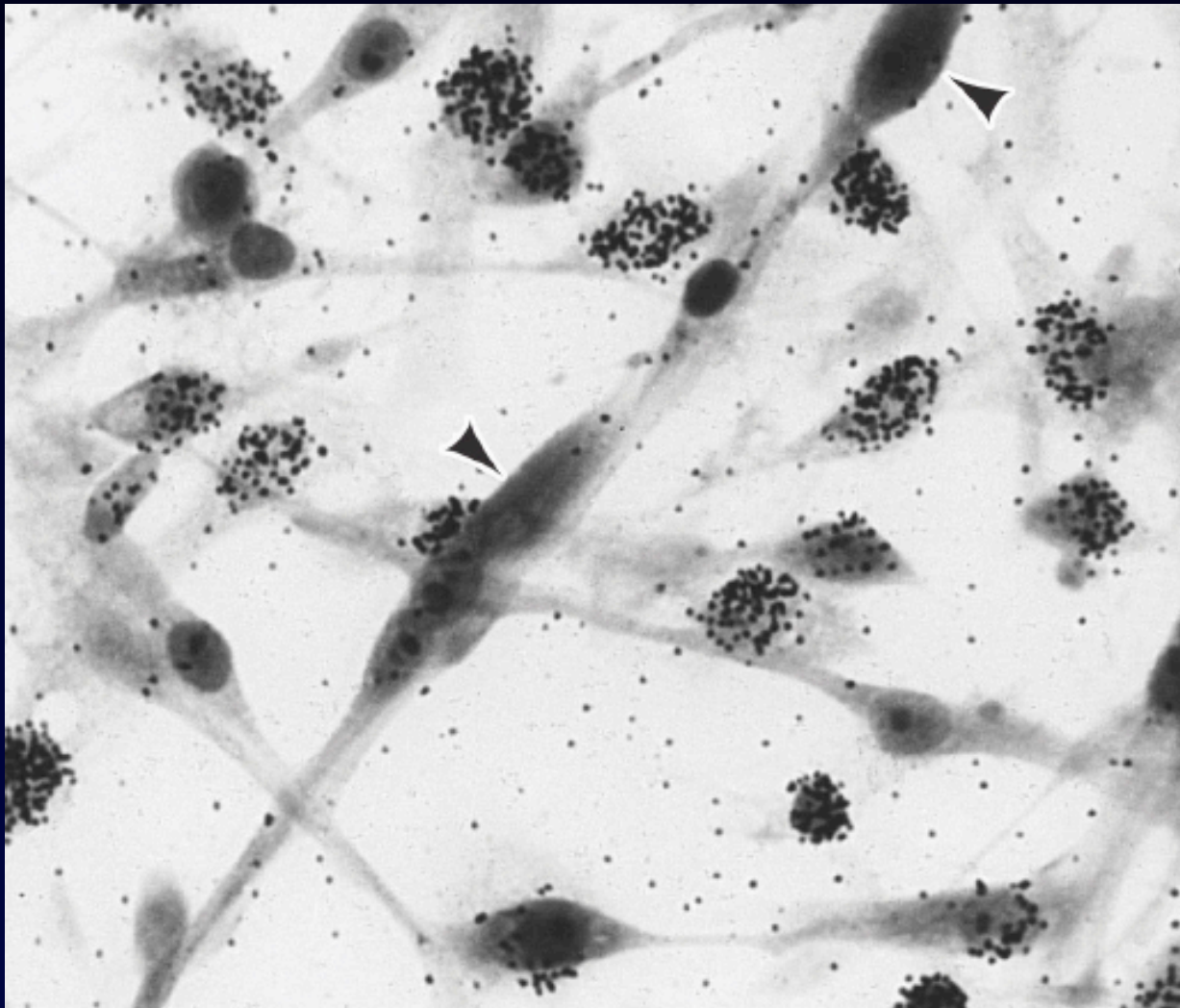
Μυογένεση

Η μυογένεση έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να μελετηθεί *in vitro* γιατί μυοβλάστες από έμβρυα (ποντικού ή κοτόπουλου) μπορούν να καλλιεργηθούν αφού απλωθούν πολύ αραιά (clonal cultures) έτσι ώστε να είναι δυνατόν να μελετηθούν οι απόγονοι ενός μόνο κυττάρου.



Οι δεσμευμένοι μυοβλάστες διαιρούνται όσο υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο παράγοντες ανάπτυξης (π.χ. FGFs, SHH Έκφραση *Msx1*). Με την απομάκρυνση των παραγόντων αυτών τα κύτταρα σταματούν τον πολλαπλασιασμό, το σχήμα τους γίνεται διπολικό και αρχίζουν να εκφράζουν μόρια κυτταρικής συνάφειας (π.χ. Φιμπρονεκτίνη, CAMs, καδερίνες) καθώς και πρωτεΐνες χαρακτηριστικές του μυϊκού ιστού (π.χ ακτίνη, τροπομυοσίνη). Παράλληλα συντήκονται (μεταλλοπρωτεάσες μελτρίνες και τετρασπανίνες) φτιάχνοντας τα μυϊκά σωληνάρια (myotubes). Μετά από 20 ώρες είναι ορατός ο γραμμικός μυς.

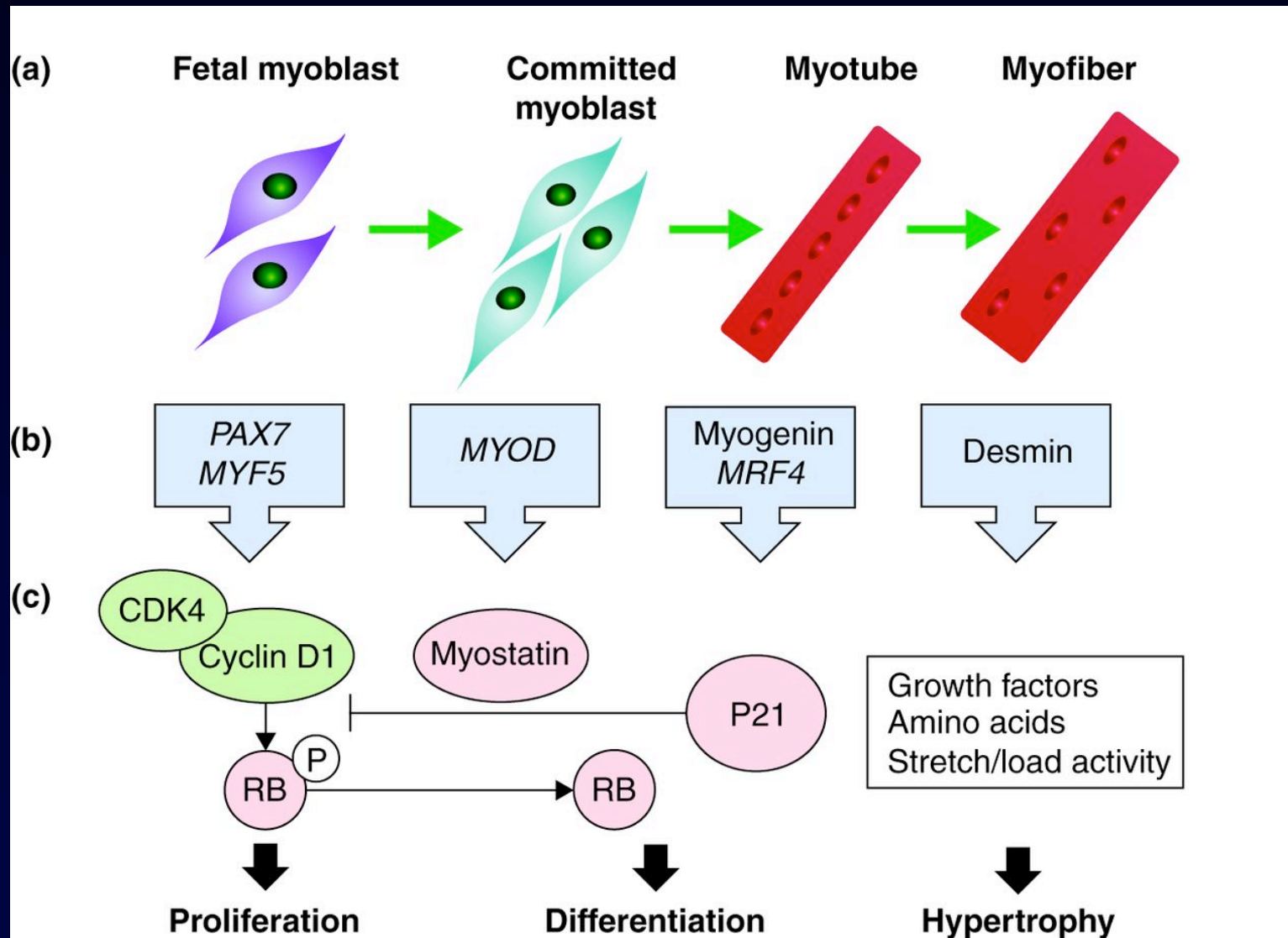
Μυογένεση



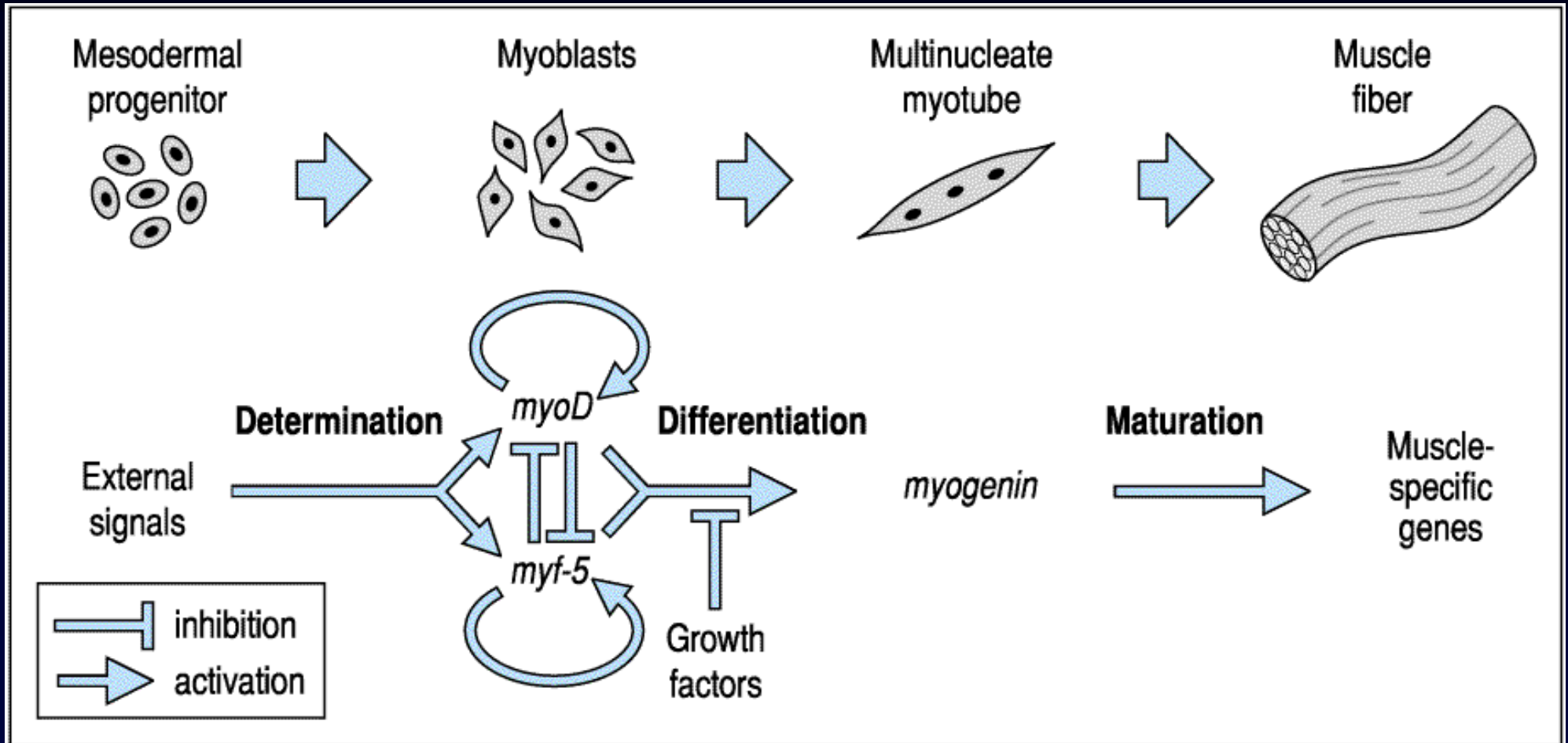
Σύνθεση DNA σε μυοβλάστες σε καλλιέργεια *in vitro* μετά από επώαση με φωσφολιπάση C που δεν επιτρέπει στους ευθυγραμμισμένους μυοβλάστες να προχωρήσουν στη σύντηξη των μεμβρανών τους.

Μόνο τα διαιρούμενα κύτταρα συνθέτουν DNA

Μυογένεση

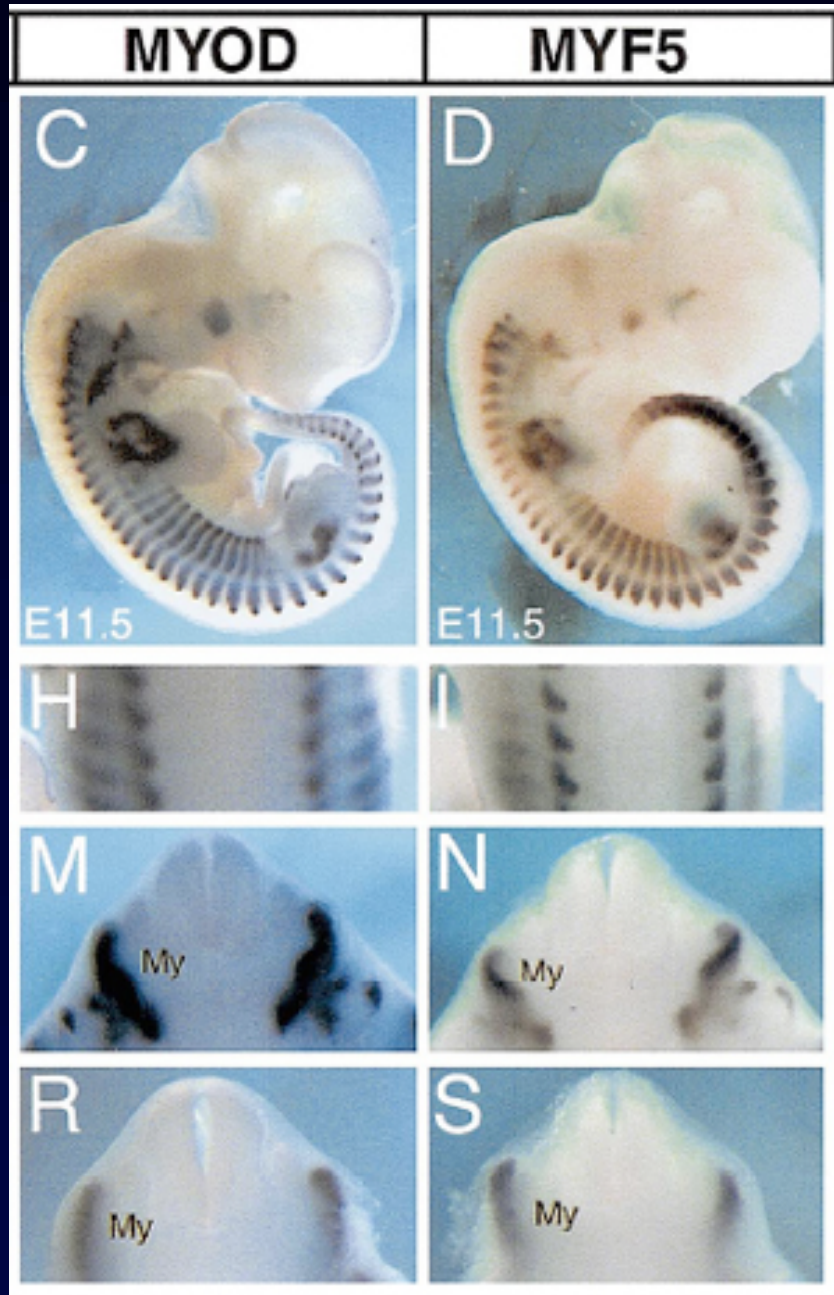


Μυογένεση



Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας του myoD (bHLH) ελέγχουν τη μυογένεση (**είναι ικανοί να επάγουν μυϊκή διαφοροποίηση σε κύτταρα όπως ινοβλάστες**). Το myf-5 και το myoD εκφράζονται στους μυοβλάστες (ανάλογα με το είδος) και επάγουν τη myogenin.

Μυογένεση



Το *myf-5* εκφράζεται στο **επαξονικό μυοτόμιο** και το *myoD* στο **υπαξονικό**.

Ποντικοί που φέρουν μεταλλαγές που αδρανοποιούν το *myoD* δεν έχουν φαινότυπο, όμως τα επίπεδα του *myf-5* είναι αυξημένα.

Ποντικοί που φέρουν μεταλλαγές που αδρανοποιούν το *myf-5* δεν έχουν προβλήματα στους γραμμωτούς μύες.

Διπλά μεταλλαγμένοι ποντικοί (για *myoD* και *myf-5*) δεν έχουν μυοβλάστες ούτε γραμμωτούς μύες.

Ποντικοί που φέρουν μεταλλαγές που αδρανοποιούν το γονίδιο ***myogenin*** έχουν φυσιολογικούς μυοβλάστες αλλά στερούνται γραμμωτών μυών.

Μυογένεση (MyoD, Myf-5, Mrf-4)

HLH : αλληλουχία 40-50 αα, δύο αμφιπαθείς έλικες και ένας βρόχος.

Ομο- ή έτεροδιμερή

bHLH : μια βασική περιοχή μήκους 15 αα δίπλα στην HLH

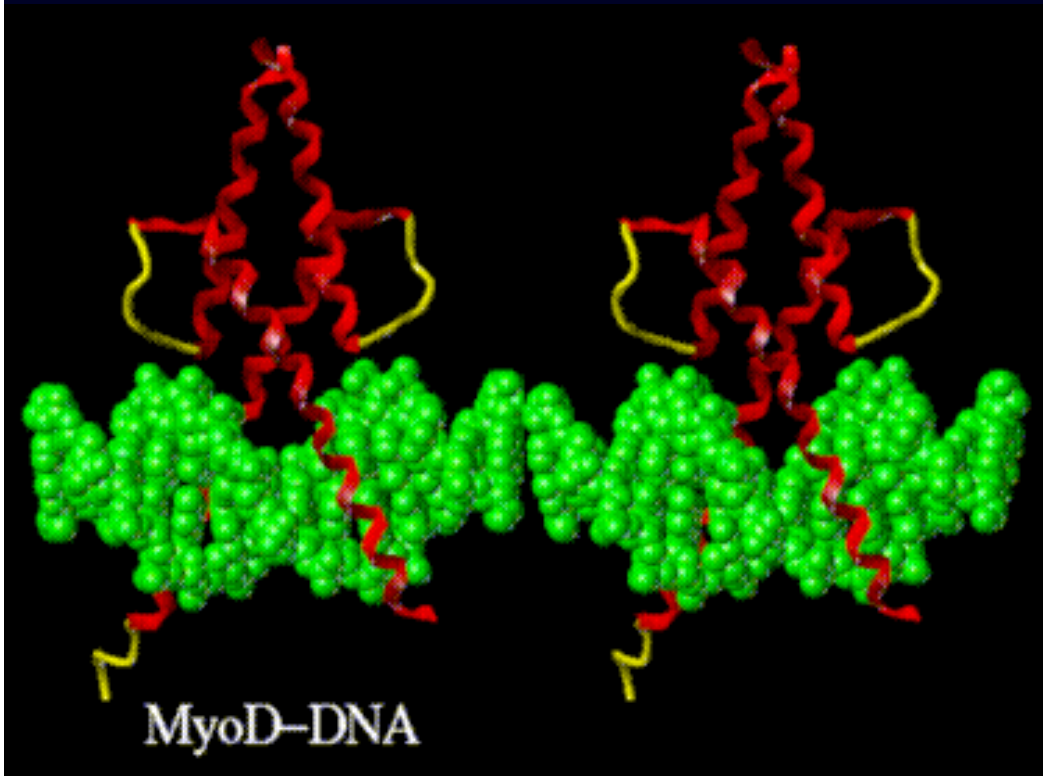
Υπάρχουν δύο κατηγορίες: ιστοειδικές ή μη ιστοειδικές.

Συνήθως δρουν ως ετεροδιμερή με εταίρο που είναι πανταχού παρών.

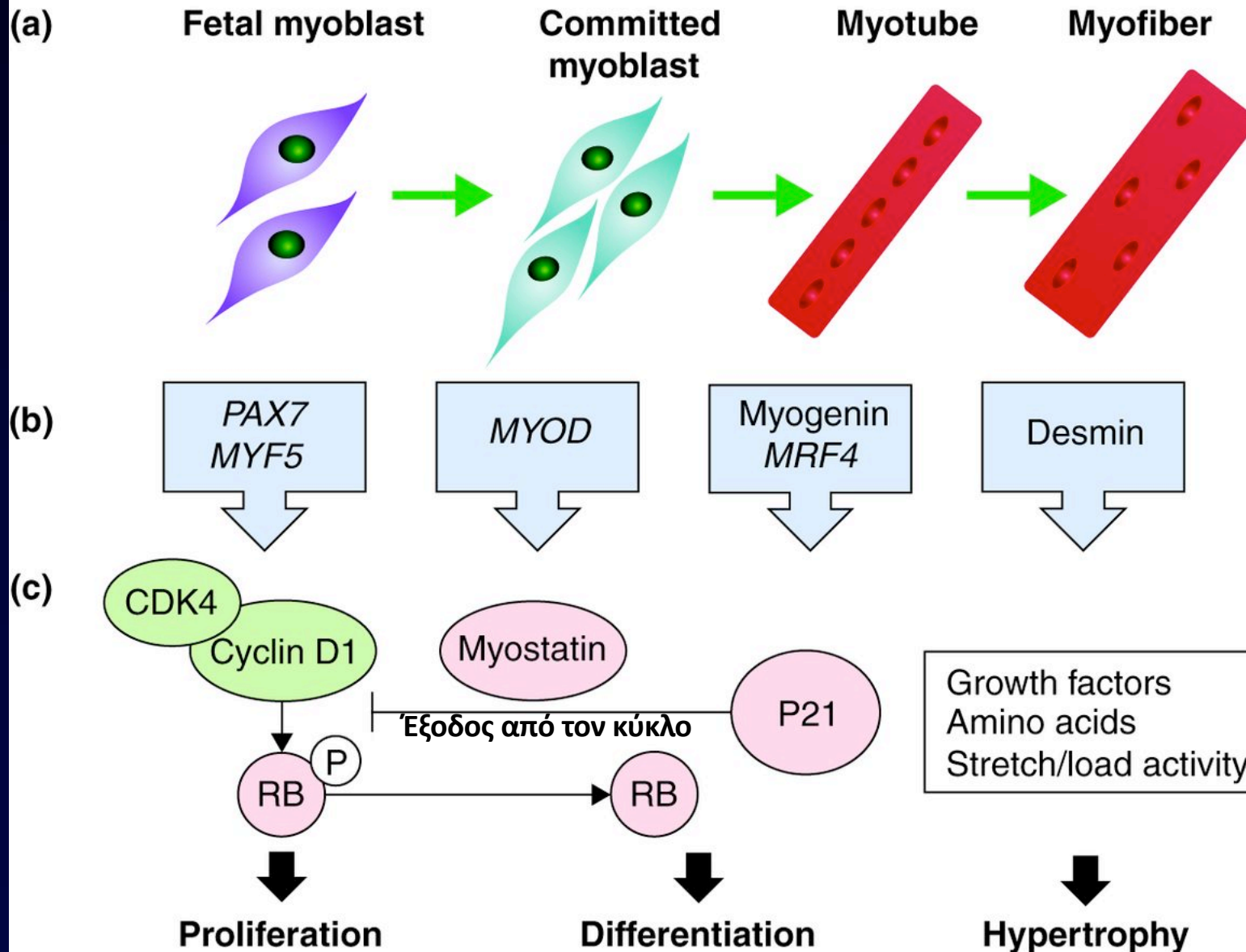
Διαφορετικά ετεροδιμερή διαφορετική δραστηριότητα.

Υπάρχουν μέλη τα οποία όταν σχηματίζουν διμερή αυτά είναι αδρανή (Id) .

Κατά τη μυογένεση το ενεργό διμερές είναι το myoD/E47 ή myoD/E12



Μυογένεση



Μυογένεση

ion Associated
rophy in a Child

E. Stolz, Ph.D.,
n, M.D.,
Ph.D.

Targeting myostatin/activin A protects against skeletal muscle and bone loss during spaceflight

Se-Jin Lee^{a,b,1}, Adam Lehar^a, Jessica U. Meir^c, Christina Koch^c, Andrew Morgan^c, Lara E. Warren^d, Renata Rydzik^e, Daniel W. Youngstrom^e, Harshpreet Chandok^a, Joshy George^a, Joseph Gogain^f, Michael Michaud^a, Thomas A. Stoklasek^a, Yewei Liu^a, and Emily L. Germain-Lee^{g,h}

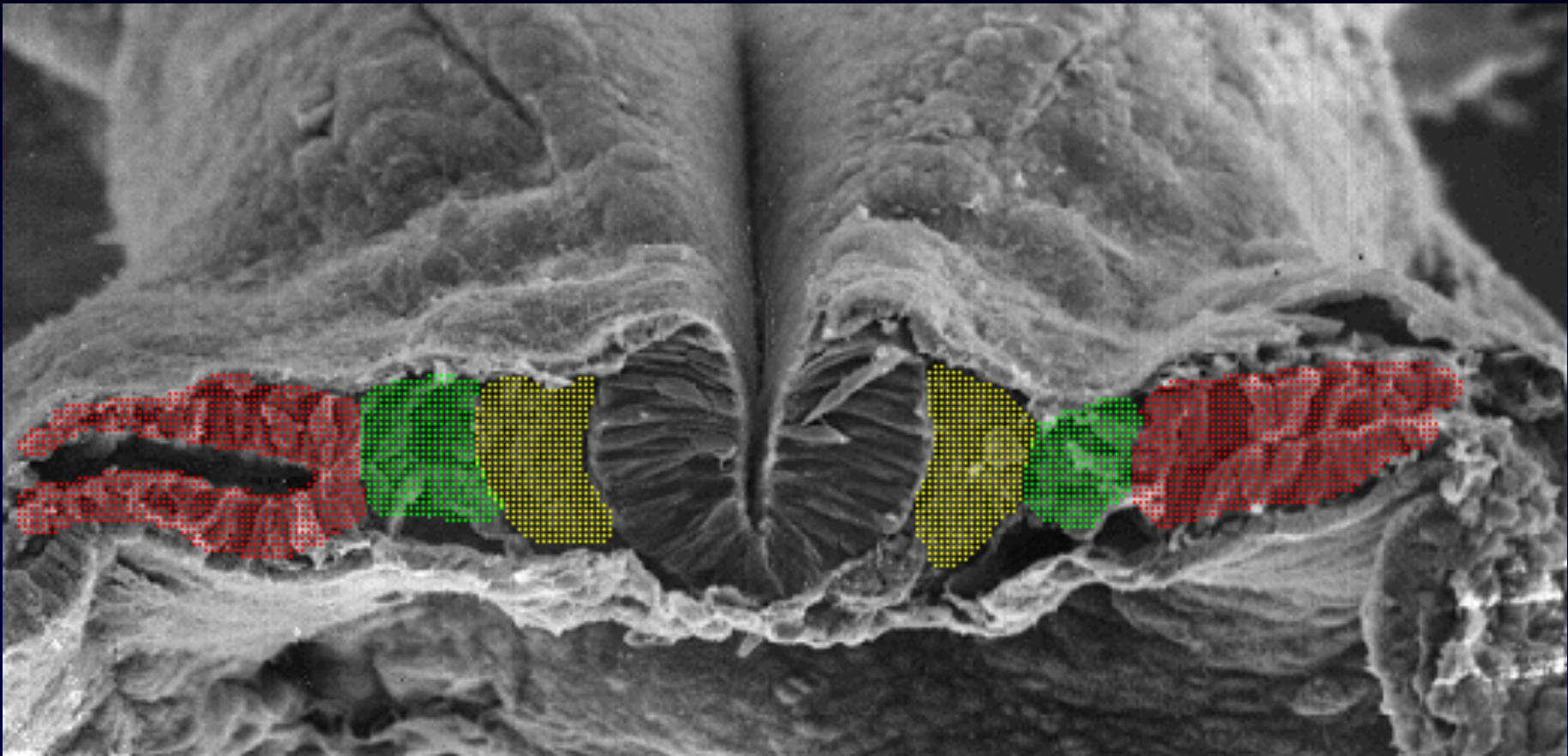
^aThe Jackson Laboratory for Genomic Medicine, Farmington, CT 06032; ^bDepartment of Genetics and Genome Sciences, University of Connecticut School of Medicine, Farmington, CT 06030; ^cThe National Aeronautics and Space Administration, NASA Johnson Space Center, Houston, TX 77058; ^dCenter for the Advancement of Science in Space, Houston, TX 77058; ^eDepartment of Orthopaedic Surgery, University of Connecticut School of Medicine, Farmington, CT 06030; ^fSomaLogic, Inc., Boulder, CO 80301; ^gDepartment of Pediatrics, University of Connecticut School of Medicine, Farmington, CT 06030; and ^hConnecticut Children's Center for Rare Bone Disorders, Farmington, CT 06032

Contributed by Se-Jin Lee, August 4, 2020 (sent for review July 14, 2020; reviewed by Shalender Bhasin and Paul Gregorevic)

Thoma-

condition is not advantageous, heterozygotes have more muscle power and are significantly overrepresented among the top racers (see Mosher et al. 2007).

Το μεσόδερμα



Στο στάδιο της νευριδίωσης στο μεσόδερμα μπορούμε να διακρίνουμε πέντε ομάδες κυττάρων: το χορδομεσόδερμα (αξονικό), το παραξονικό μεσόδερμα, το **διάμεσο μεσόδερμα**, το **πλάγιο πέταλο** και το μεσόδερμα της κεφαλής . (εγκάρσια τομή- E8.5 ποντικού)

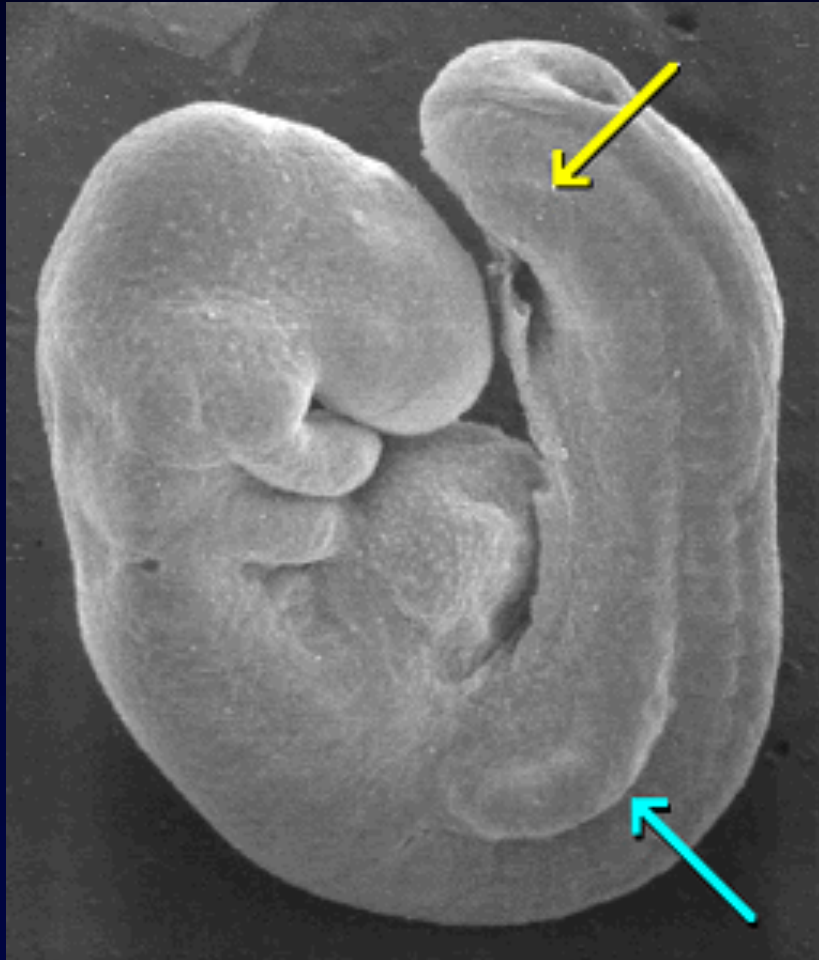
Η καταβολή των άκρων αποτελείται από μεσόδερμα (μυοτόμιο + πλευρικό πέταλο μετανάστευση & πολλαπλασιασμός) που καλύπτεται από εξώδερμα.

Τα άκρα



ΙΝΔΙΑ: ΜΩΡΟ ΓΕΝΝΗΘΗΚΕ ΜΕ 26 ΔΑΧΤΥΛΑ ΚΑΙ ΟΙ ΓΟΝΕΙΣ ΠΙΣΤΕΥΟΥΝ ΠΩΣ ΕΙΝΑΙ ΕΝΣΑΡΚΩΣΗ ΘΕΟΤΗΤΑΣ

Τα άκρα



Στην E9.5 εμφανίζονται αρχικά οι καταβολές των άνω άκρων και στη συνέχεια οι καταβολές των κάτω άκρων.

Όπως και στην περίπτωση των σωμιτών η ανάπτυξη εξελίσσεται **κεφαλουριαία**. Οι καταβολές των άνω άκρων βρίσκονται γύρω από το **καρδιακό όγκωμα** (4ος αυχ.-1ος θωρ.).

Οι καταβολές των κάτω άκρων βρίσκονται στο ύψος των οσφυϊκών και ανώτερων ιερών σπονδύλων.

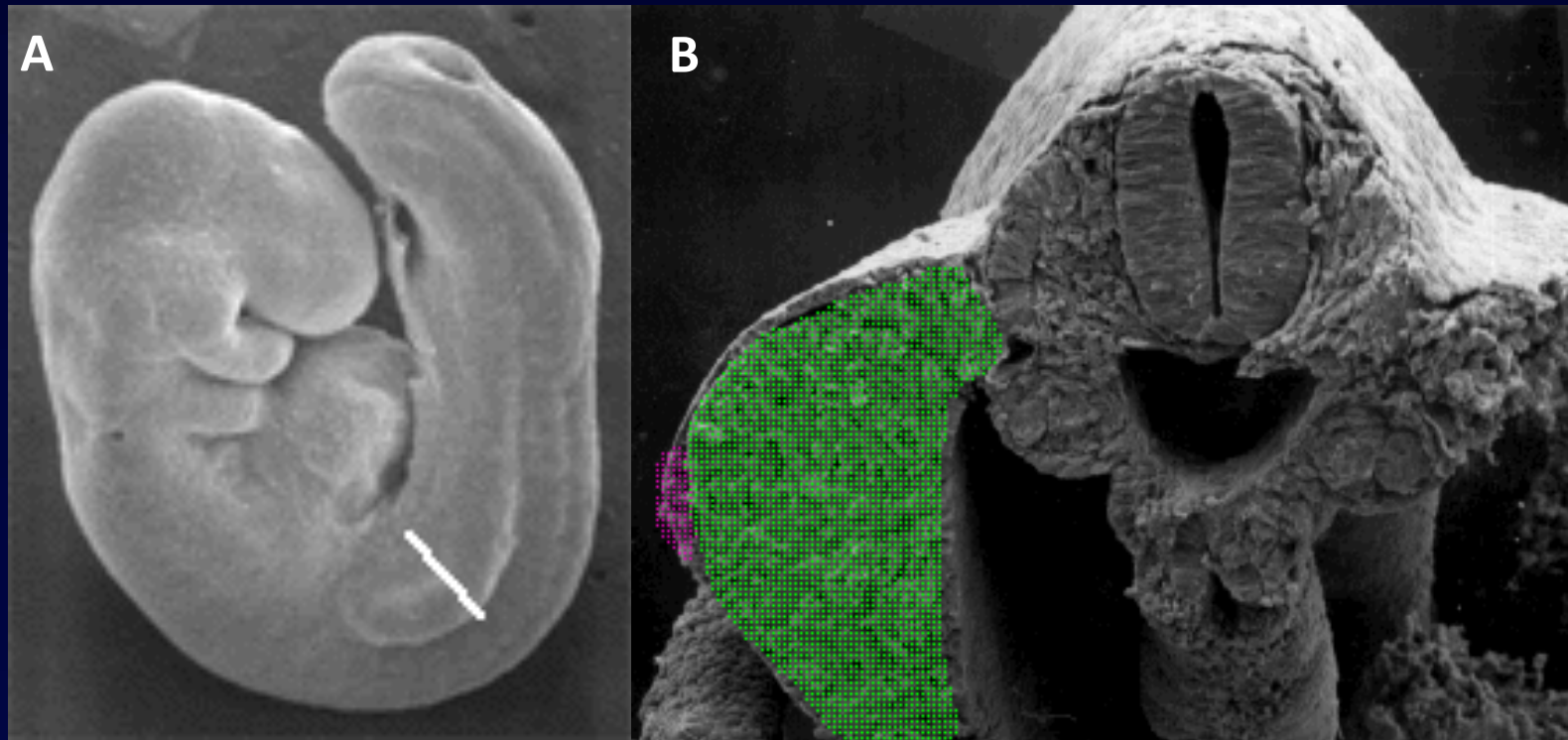
Τα άκρα

Οι καταβολές των άκρων (limb buds) αποτελούνται από **μεσοδερματικά** κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από **εξώδερμα**.

Το μεσόδερμα (μυοτόμιο + πλευρικό πέταλο) μετανάστευση & πολλαπλασιασμός κυττάρων

Μυοτόμιο- μύες των άκρων

Πλευρικό πέταλο- σκελετικά στοιχεία



A: Έμβρυο E9.5-φαίνεται το επίπεδο στο οποίο γίνεται η τομή στο B.

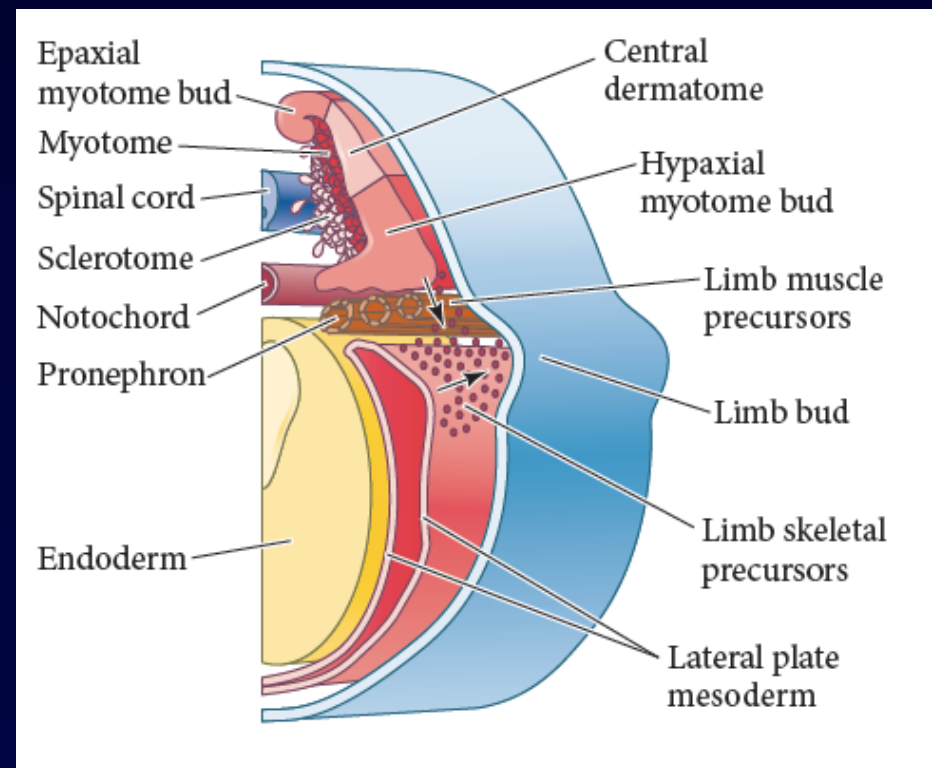
Τα άκρα

Οι καταβολές των άκρων (limb buds) αποτελούνται από **μεσοδερματικά** κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από **εξώδερμα**.

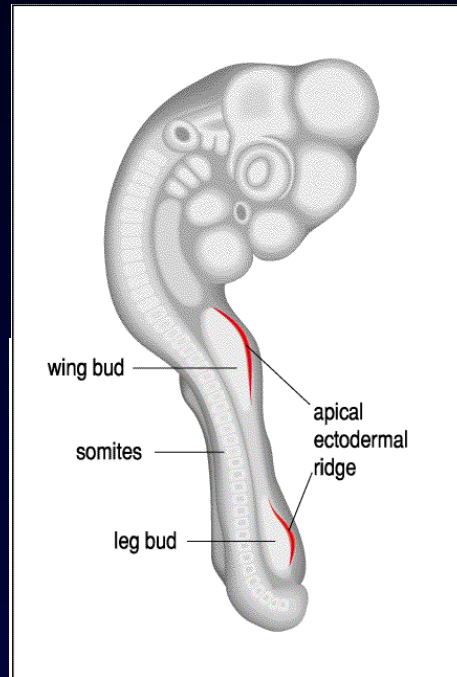
Το μεσόδερμα (μυοτόμιο + πλευρικό πέταλο) μετανάστευση & πολλαπλασιασμός κυττάρων

Μυοτόμιο- μύες των άκρων

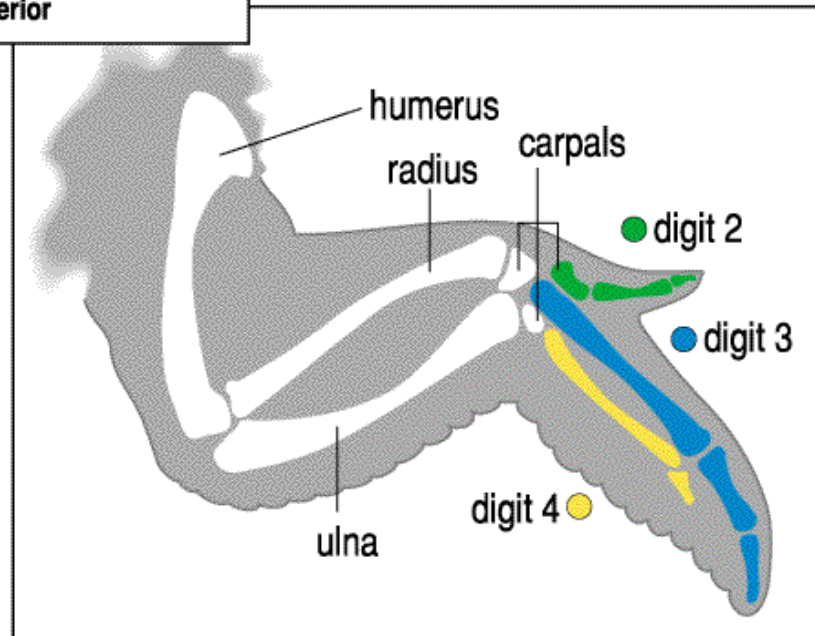
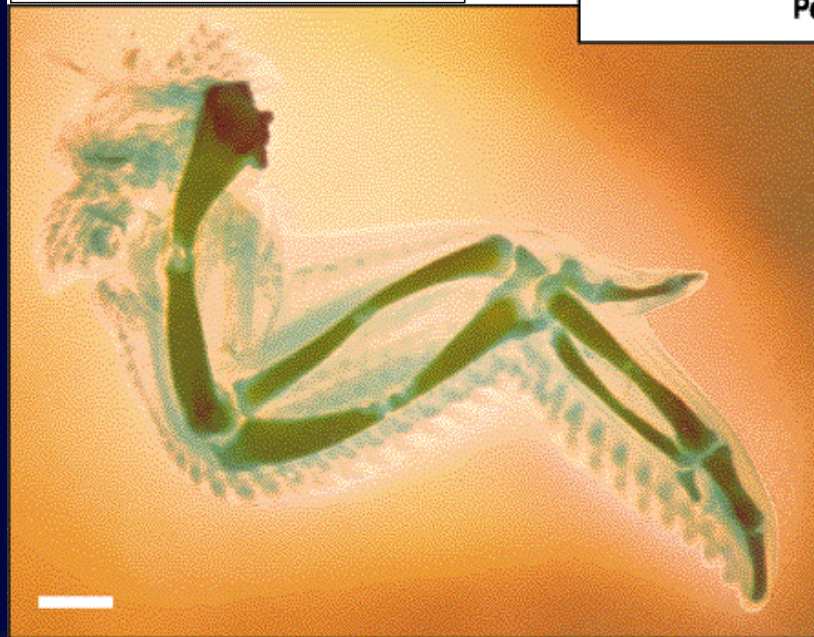
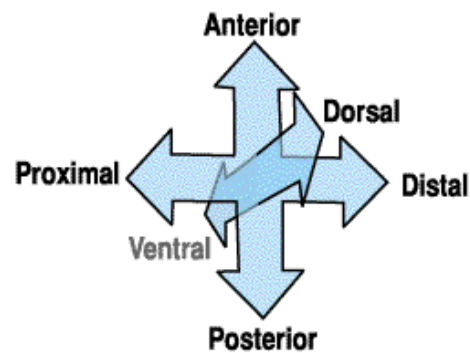
Πλευρικό πέταλο- σκελετικά στοιχεία



Τα άκρα στο έμβρυο της όρνιθας



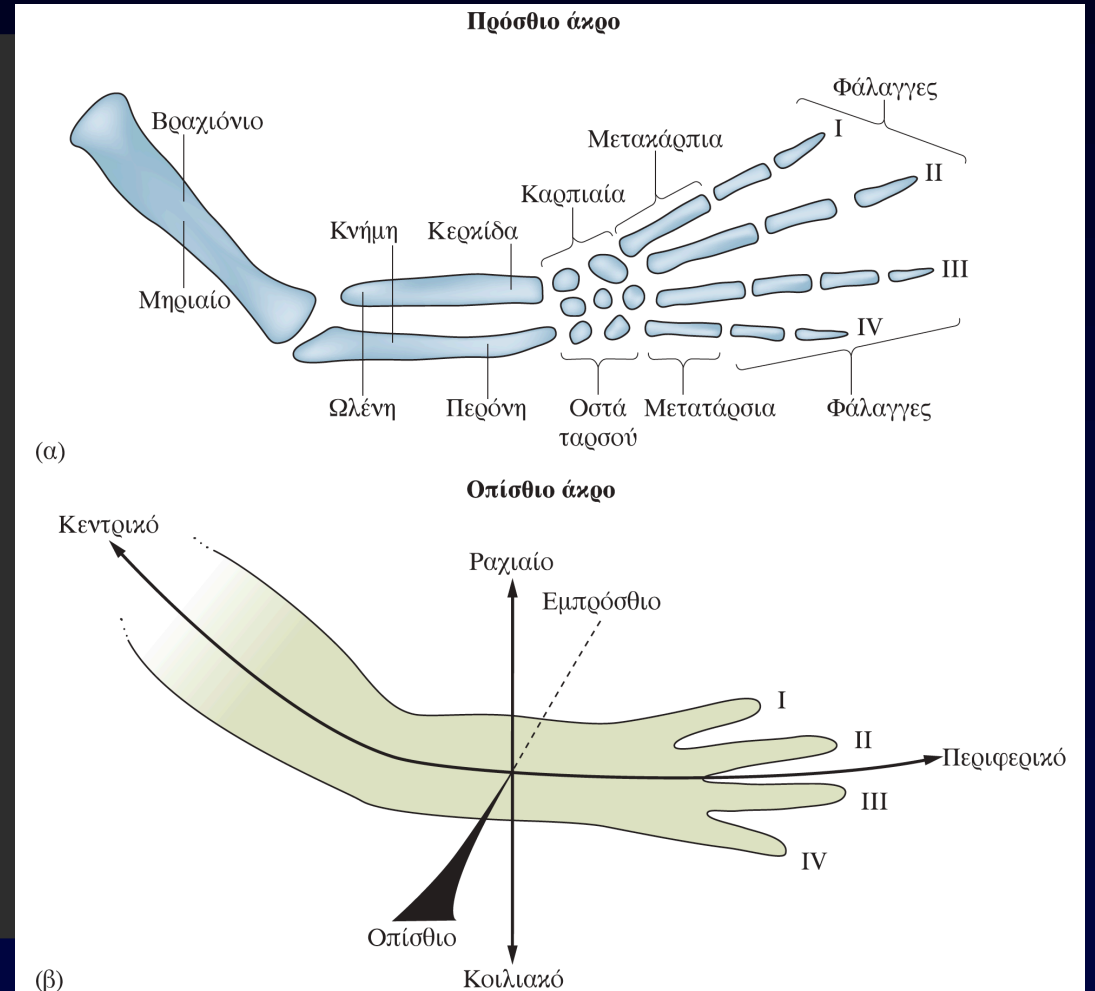
Στα άκρα διακρίνουμε τρεις άξονες: τον εμπροσθοπίσθιο (anteroposterior), το ραχιαίο-κοιλιακό (dorsoventral) και τον κεντρικό-περιφερικό (proximo-distal).



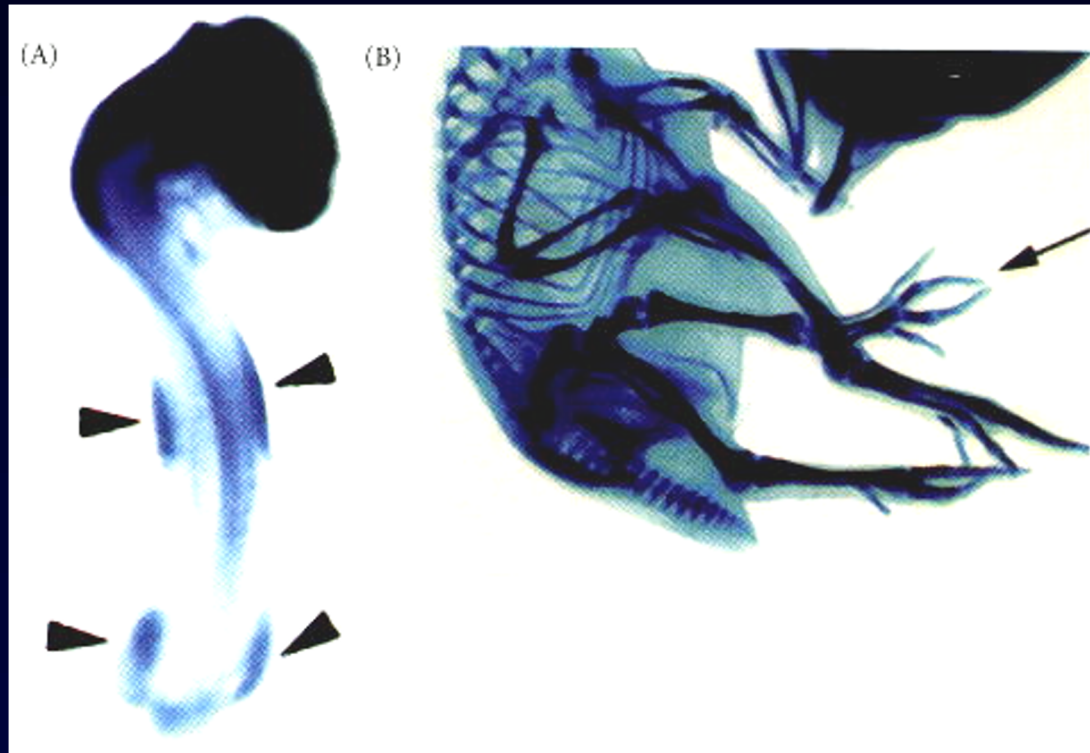
Τα άκρα και οι τρεις άξονες



Κοιλιακή άποψη αναπτυσσόμενου ανω άκρου



Πού αναπτύσσονται οι καταβολές των άκρων; Ο ρόλος του FGF10



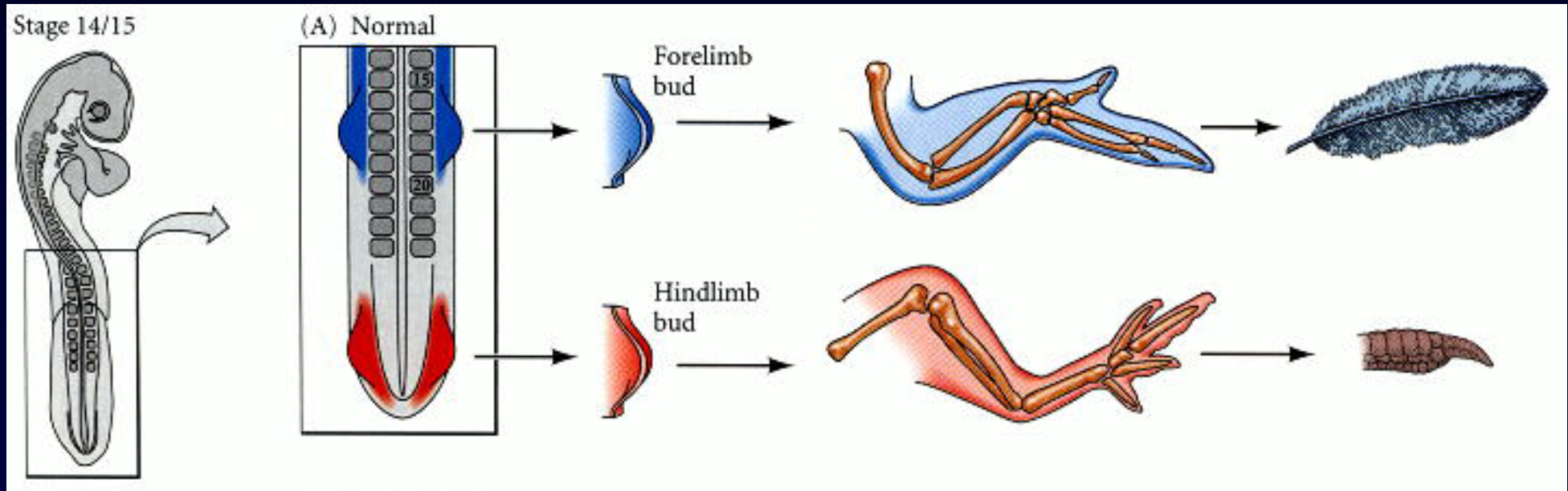
Η ανάπτυξη των άκρων αρχίζει όταν μεσεγχυματικά κύτταρα από από τα πλευρικά πέταλα και τους σωμίτες αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται, οπότε δημιουργείται μια προεκβολή που ονομάζεται **καταβολή του άκρου**

(A). Αν εμφυτεύσουμε σφαιρίδια ή κύτταρα που παράγουν FGF10 εκτοπικά τότε αναπτύσσεται στο σημείο της εμφύτευσης ένα παραπάνω άκρο (B). Ο FGF10 ίσως επάγεται από τα γονίδια *Hox* -υπάρχει κώδικας *Hox* και για τα πλευρικά πέταλα.

Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει knock out το γονίδιο του υποδοχέα του FGF δεν έχουν καταβολές άκρων.

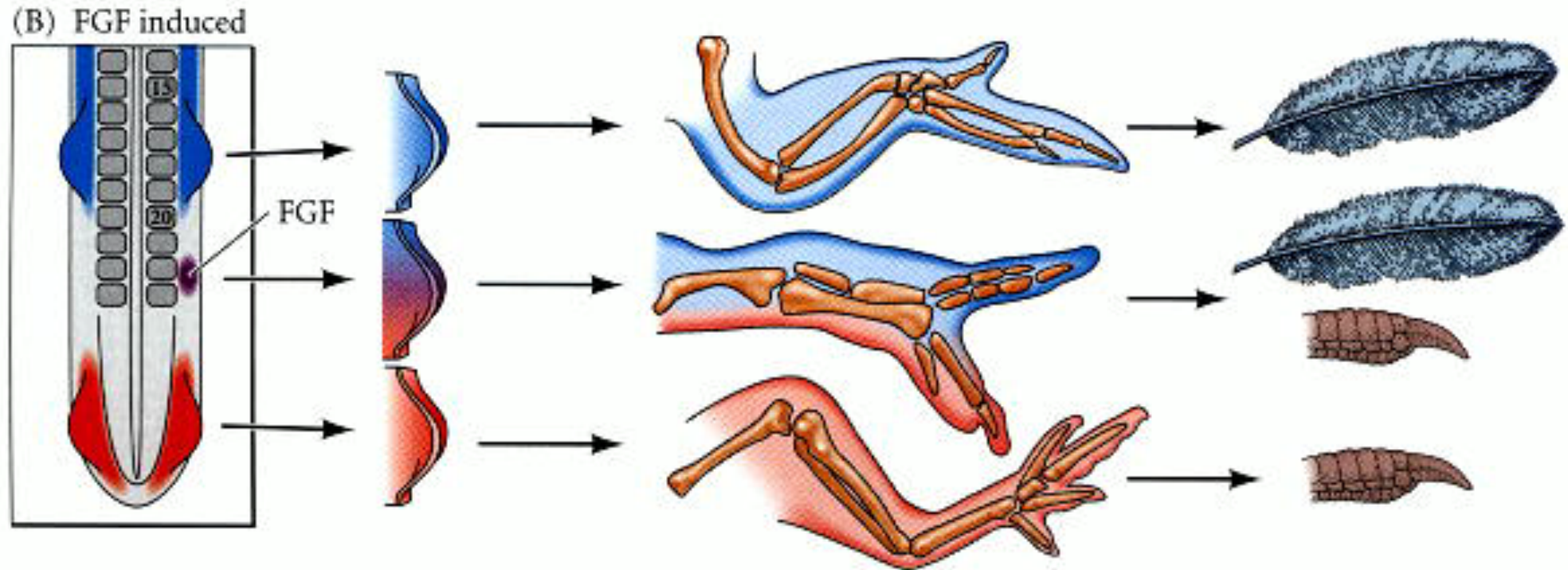
Εμπρόσθιο ή οπίσθιο άκρο; Ο ρόλος των *Tbx4/5*

Τα γονίδια *Tbx4* και *Tbx5* κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες .



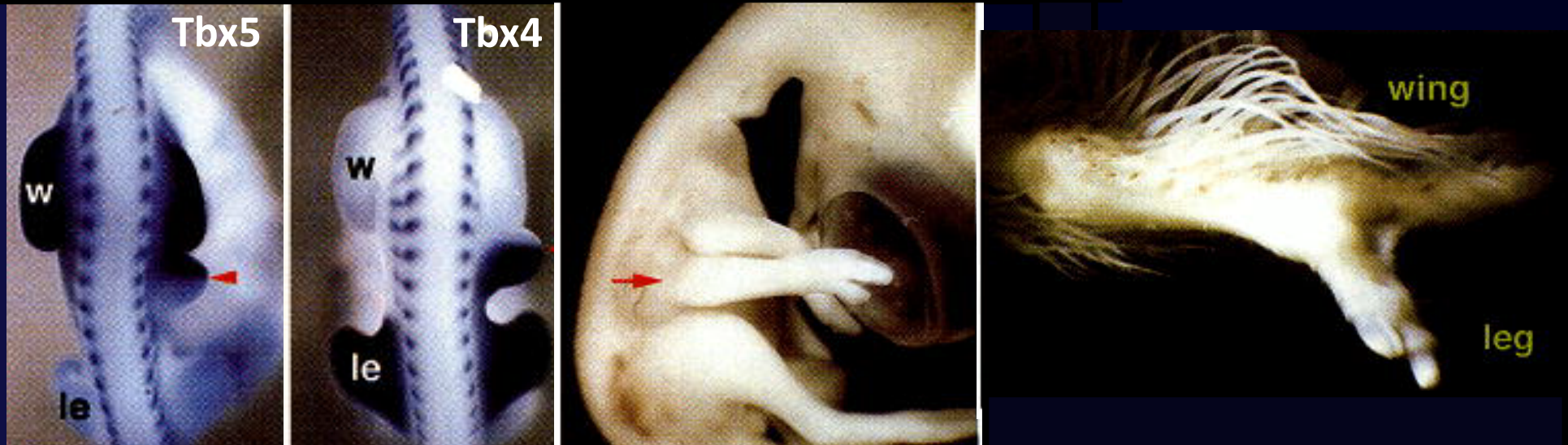
Εξειδίκευση του άκρου ανάλογα με την έκφραση των γονιδίων *Tbx4* και *Tbx5*. Κατά την ανάπτυξη του κοτόπουλου γονίδιο *Tbx5* εκφράζεται στα πλάγια πέταλα (στο επίπεδο των πρόσθιων άκρων) και στις καταβολές των πρόσθιων άκρων ενώ το γονίδιο *Tbx4* εκφράζεται στα πλάγια πέταλα (στο επίπεδο του οπίσθιων άκρων) και στις καταβολές των κάτω άκρων. Στο κοτόπουλο τα άνω άκρα θα δώσουν τις πτέρυγες και τα κάτω άκρα τα πόδια.

Εμπρόσθιο ή οπίσθιο άκρο; Ο ρόλος των Tbx4/5



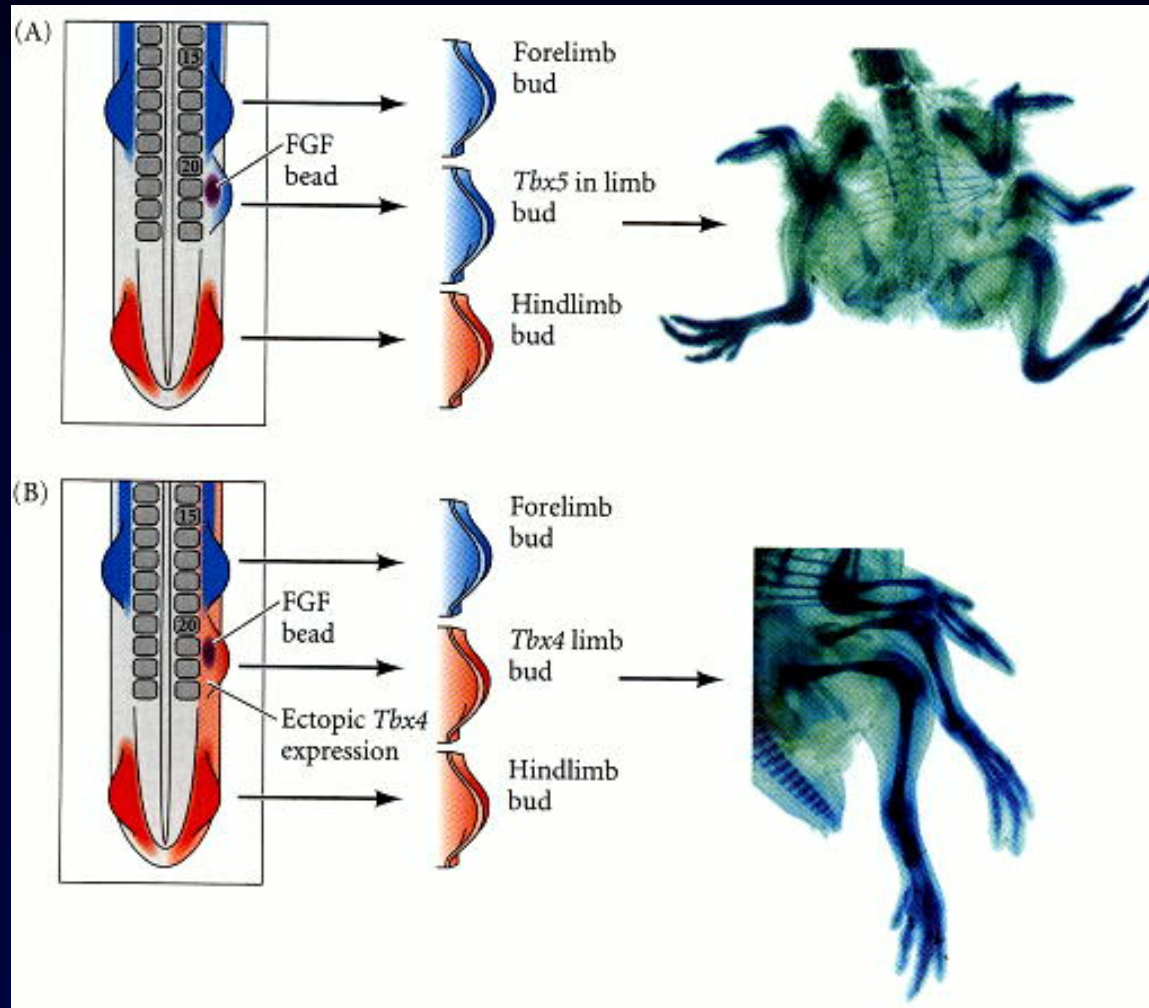
Όταν εμφυτεύουμε σφαιρίδια που περιέχουν FGF10 σε περιοχή κοντά στο πρόσθιο άκρο, τότε το επιπλέον άκρο είναι πρόσθιο. Το αντίθετο συμβαίνει αν εμφυτεύσουμε beads που περιέχουν FGF10 κοντά στο οπίσθιο άκρο. Τέλος, αν εμφυτεύσουμε beads που περιέχουν FGF10 ανάμεσα στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο τότε στην επιπλέον καταβολή που αναπτύσσεται εκφράζεται τόσο το Tbx5 (στο εμπρόσθιο τμήμα) όσο και το Tbx4 (στο οπίσθιο τμήμα). Το άκρο που αναπτύσσεται τελικά έχει χαρακτηριστικά τόσο των άνω (φτερά) όσο και των κάτω άκρων (πόδια).

Εμπρόσθιο ή οπίσθιο άκρο; Ο ρόλος των Tbx4/5



Όταν εμφυτεύουμε σφαιρίδια που περιέχουν FGF10 σε περιοχή ανάμεσα στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο τότε στην επιπλέον καταβολή που αναπτύσσεται εκφράζεται τόσο το Tbx5 (στο εμπρόσθιο τμήμα) όσο και το Tbx4 (στο οπίσθιο τμήμα). Το άκρο που αναπτύσσεται τελικά έχει χαρακτηριστικά τόσο των άνω (φτερά) όσο και των κάτω άκρων (πόδια).

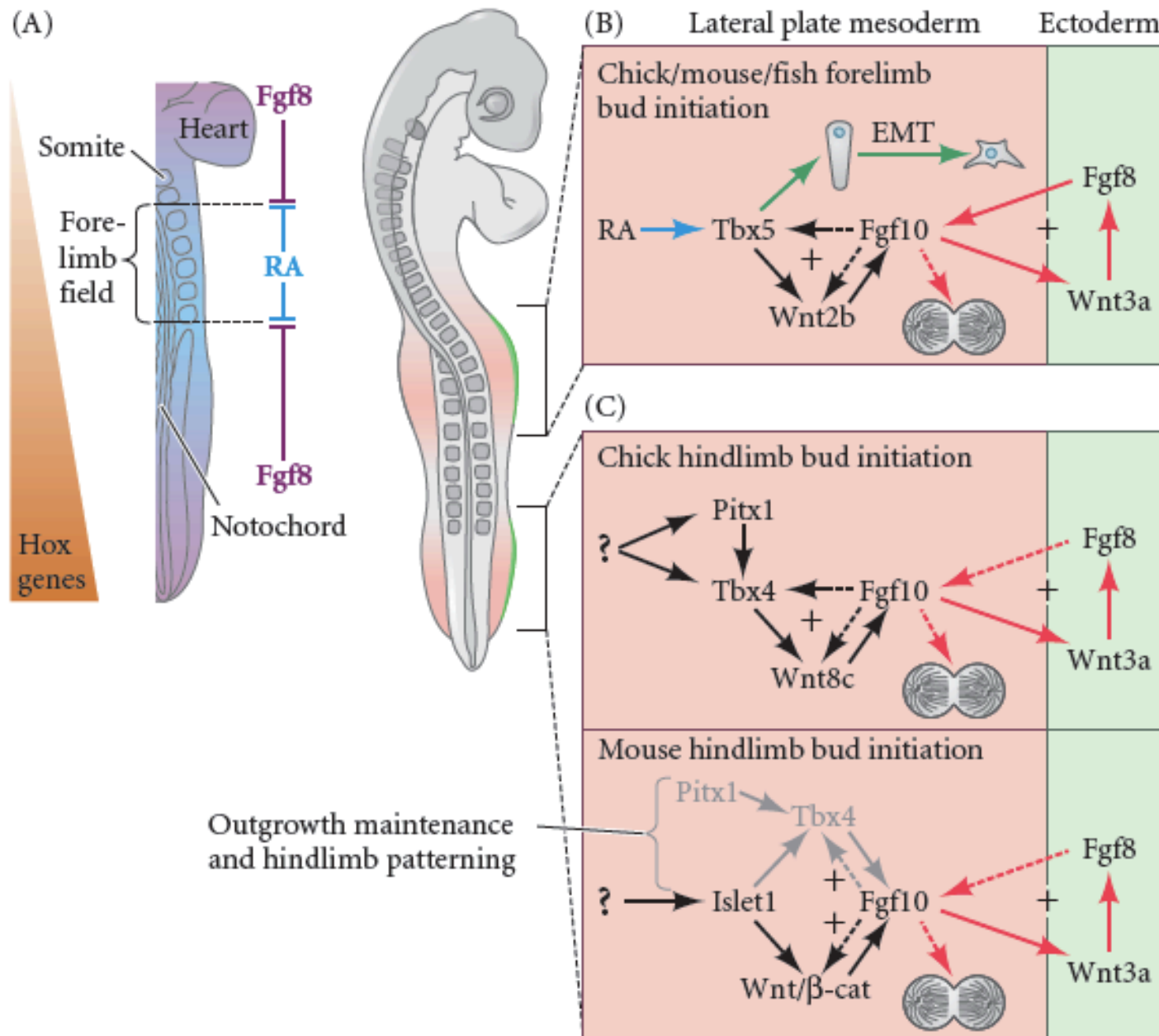
Εμπρόσθιο ή οπίσθιο άκρο; Ο ρόλος των Tbx4/5



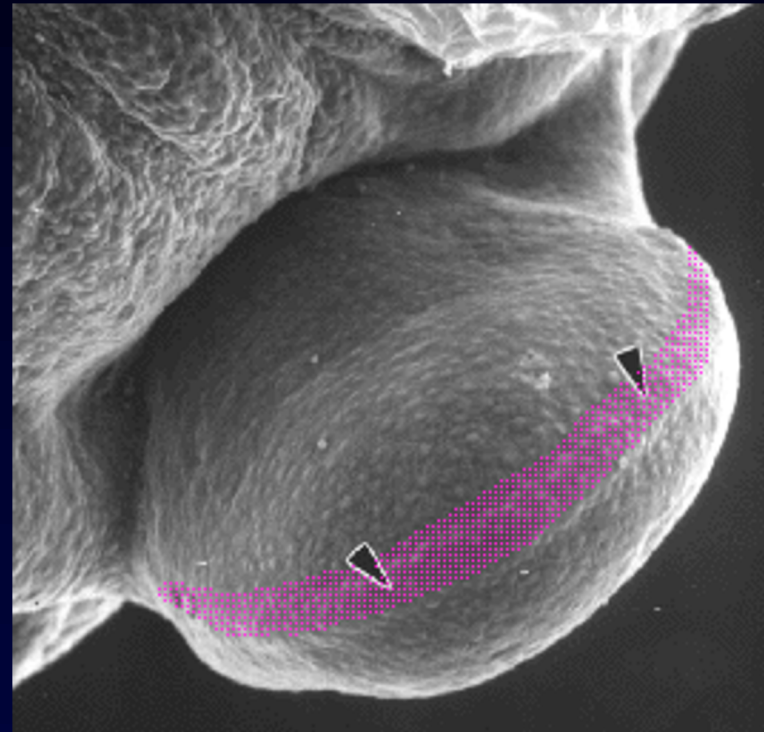
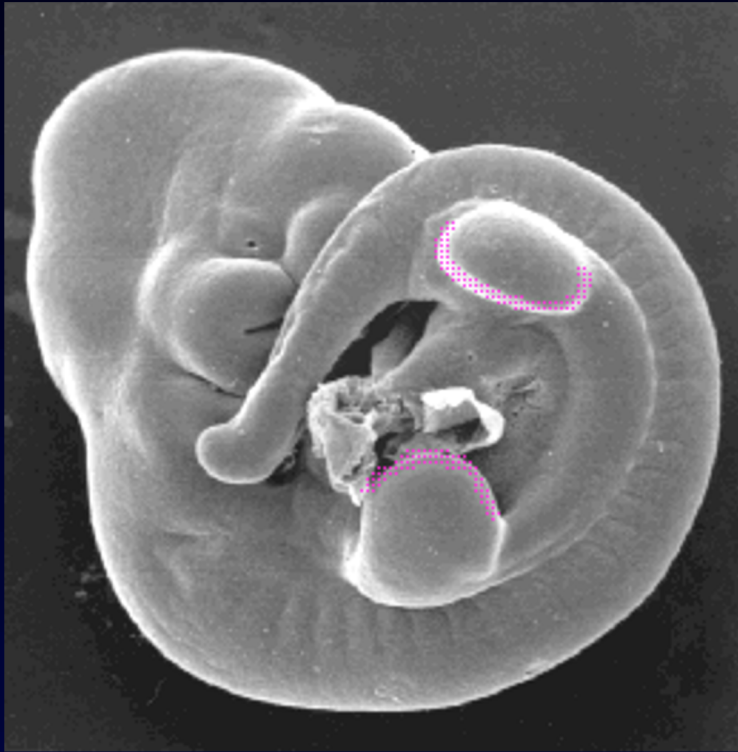
Επανεξειδίκευση του άνω ά-κρου μετά από εκτοπική έκ-φραση του *Tbx4*. Εμφύτευση σφαιριδίων εμποτισμένων με FGF10 κοντά στο άνω άκρο έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός επιπλέον εκτοπικού άνω άκρου (A). Αν παράλληλα με την εμφύτευση η καταβολή μολυνθεί με ανασυνδυασμένο ιό που εκφράζει *Tbx4*, τότε το επιπλέον εκτοπικό άκρο, είναι συχνά, οπίσθιο (B).

Άνθρωποι ετερόζυγοι για μεταλλάγές του *TBX5* παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη των άνω άκρων και στην καρδιά. Τα οπίσθια άκρα είναι φυσιολογικά.

Τι επάγει ο FGF10?



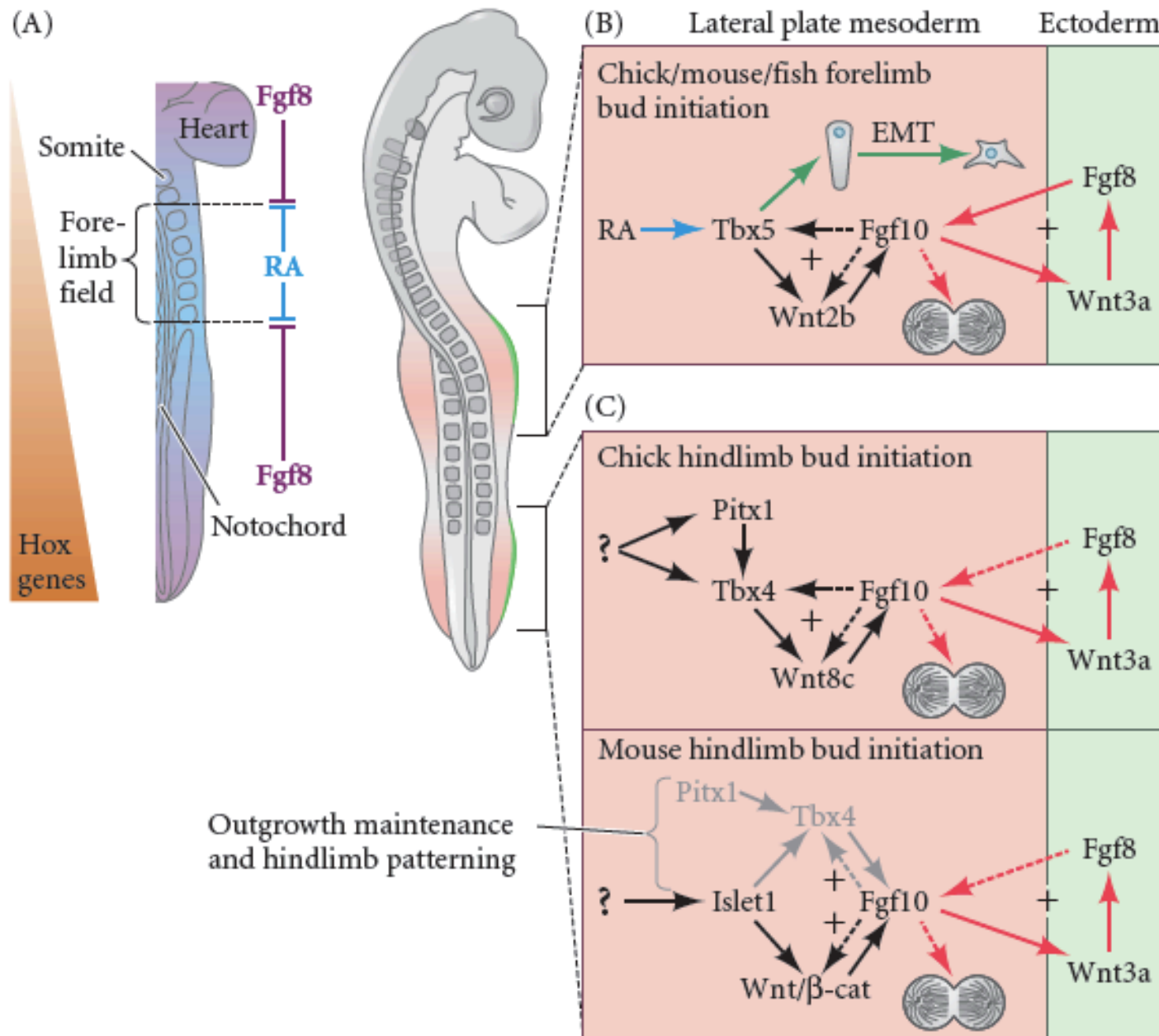
Επαγωγή της κορυφαίας εξωδερμικής ακρολοφίας



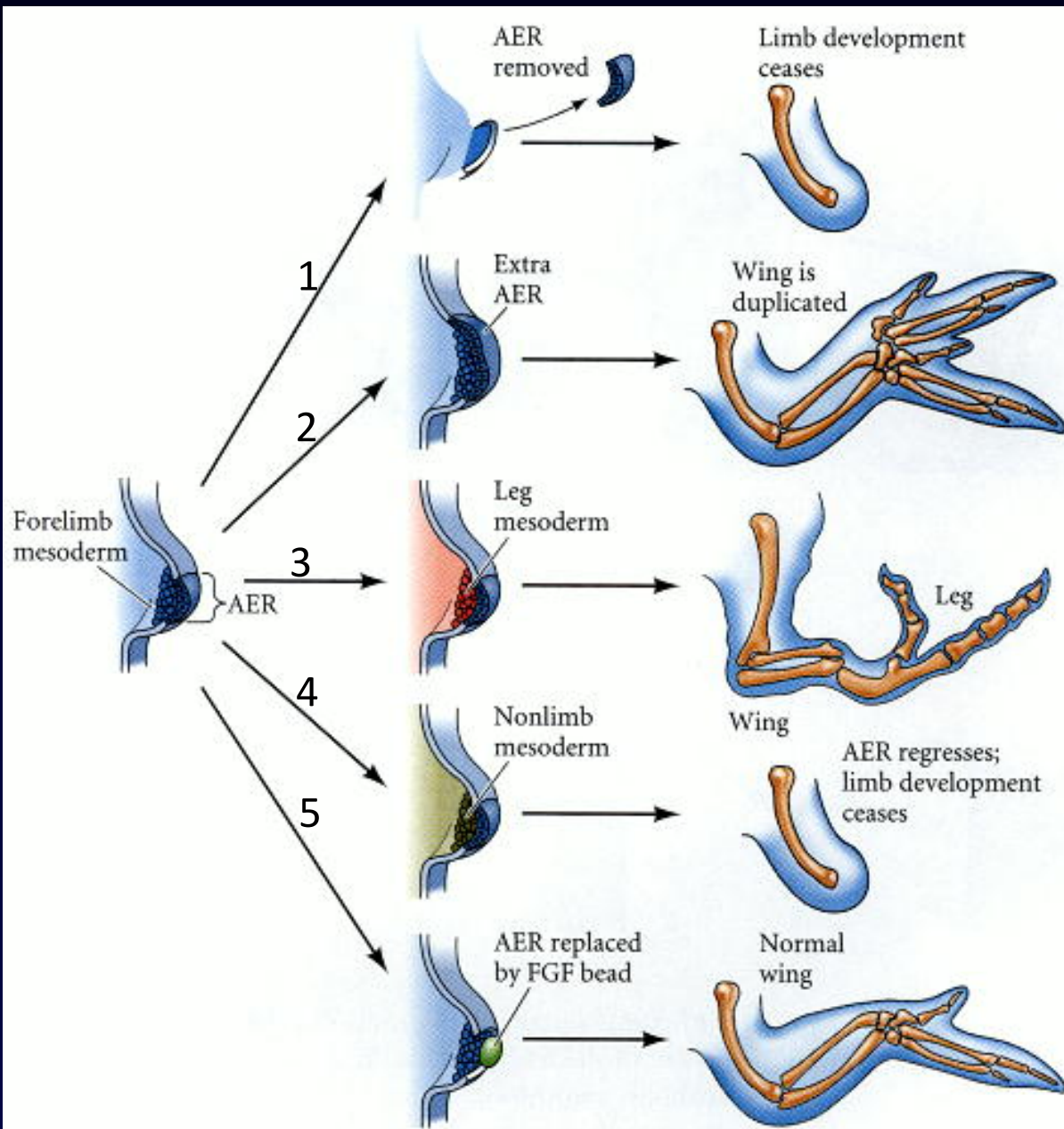
Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που εποικίζουν την καταβολή των επάγουν το εξώδερμα να σχηματίσει μια πάχυνση στην κορυφή της καταβολής. Η πάχυνση αυτή ονομάζεται κορυφαία εξωδερμική ακρολοφία και παίζει σημαντικό ρόλο:

- Διατηρεί τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε κατάσταση πολλαπλασιασμού.
- Διατηρεί την έκφραση μορίων υπεύθυνων για την οργάνωση του εμπροσθοπίσθιου άξονα και
- Αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στον καθορισμό του εμπροσθοπίσθιου και του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα (συντονισμός).
- Οργανώνει τον κεντρικό-περιφερειακό άξονα.

Τι επάγει ο FGF10?

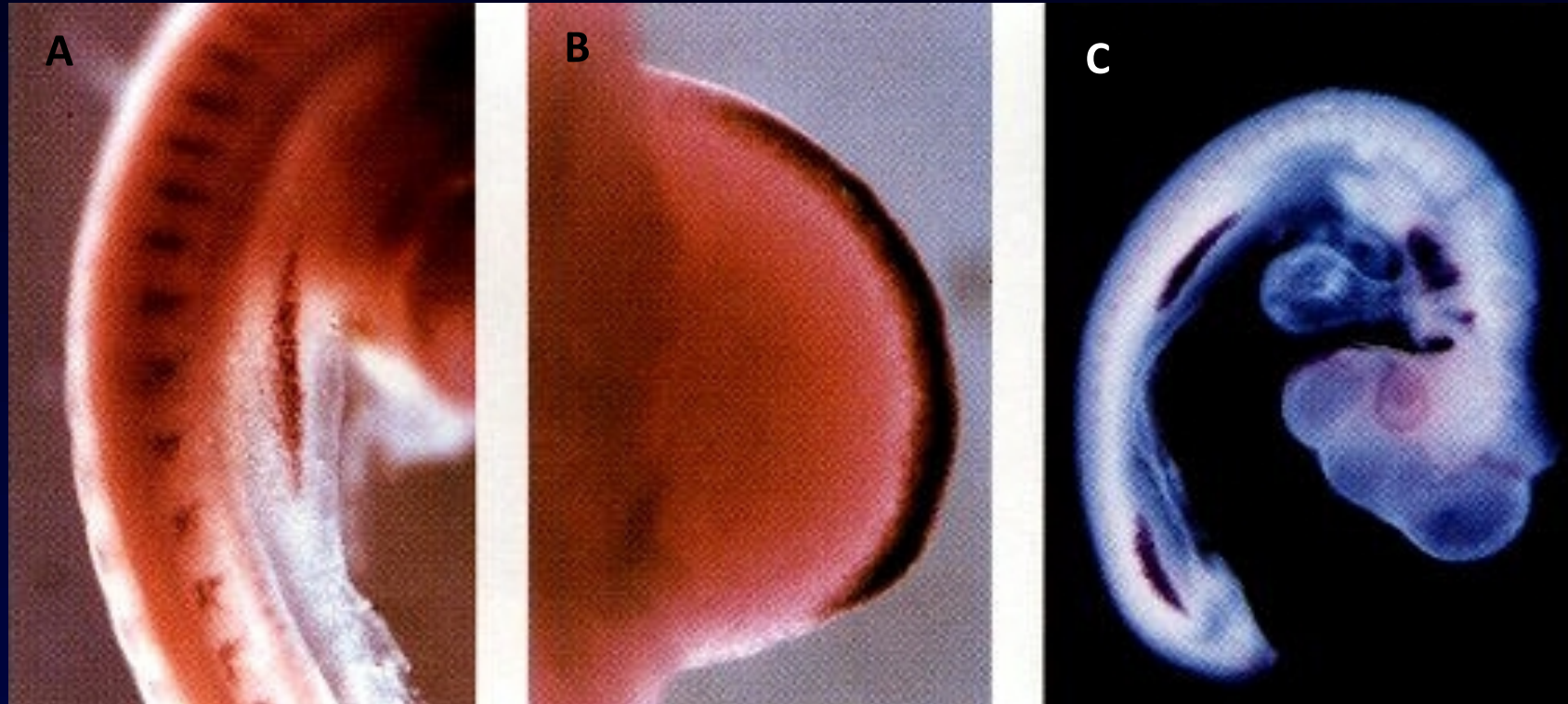


Η κορυφαία εξωδερμική ακρολοφία



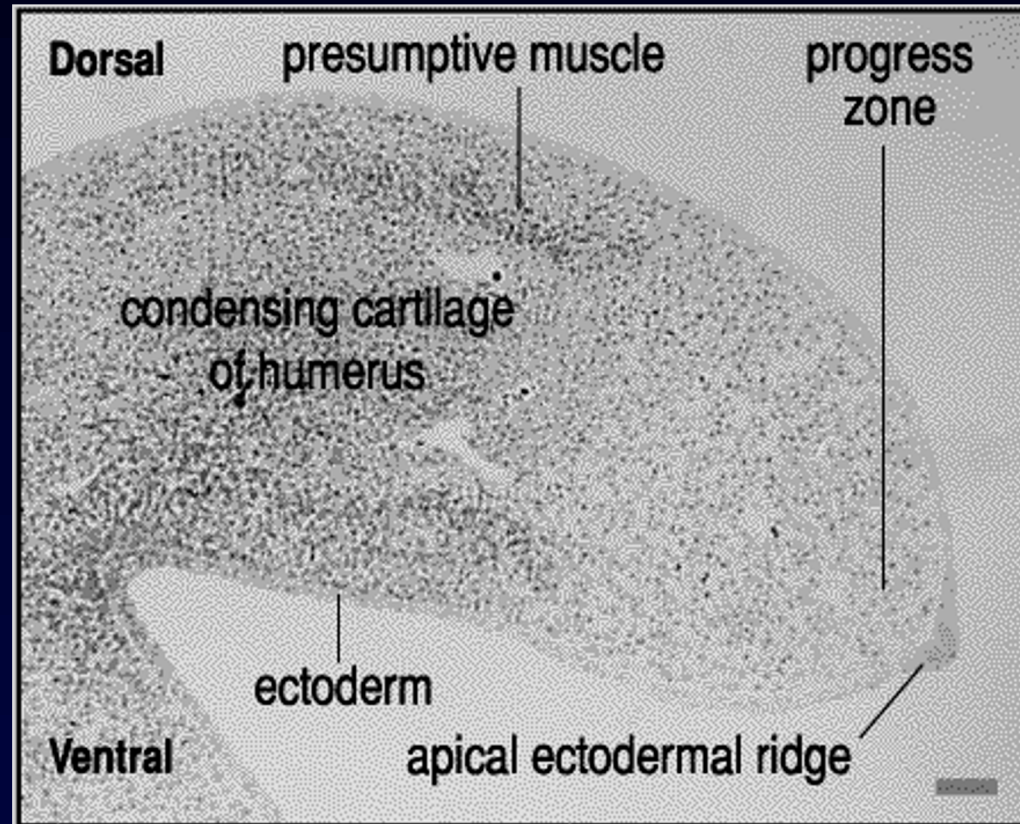
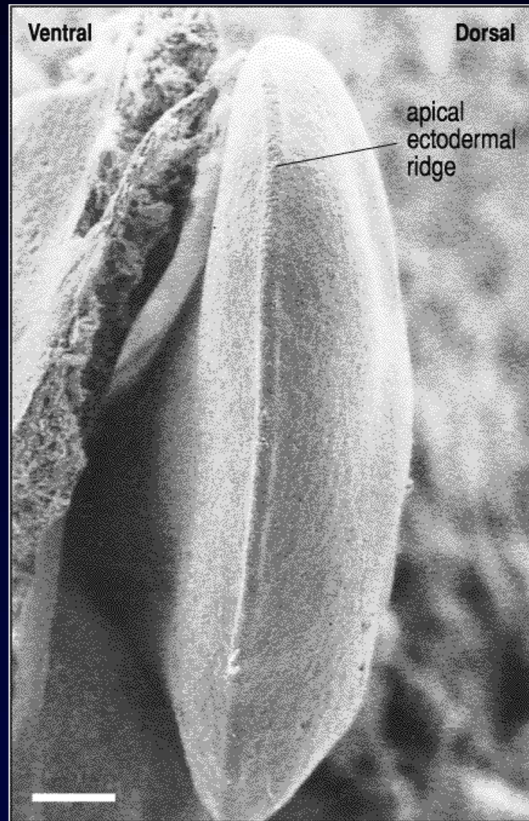
1. Απουσία της AER δεν αναπτύσσεται το άκρο.
2. Μεταμόσχευση δεύτερης AER έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό δομών.
3. Η ταυτότητα του άκρου εξαρτάται από το μεσόδερμα.
4. Μόνο το μεσόδερμα των καταβολών των άκρων μπορεί να αλληλεπιδράσει με την AER.
5. Ο FGF8 και ο FGF4 μπορεί να υποκαταστήσει την AER.

Εκφραση του FGF8 στην AER



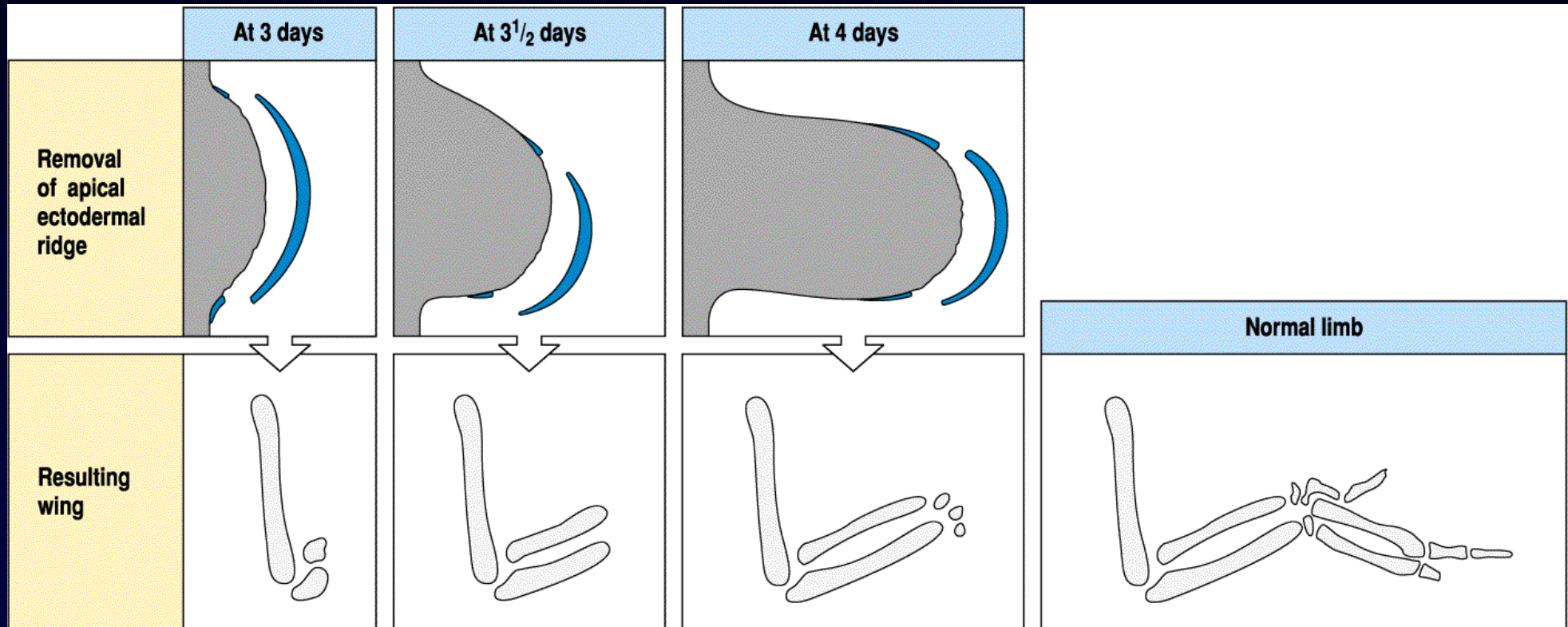
Υβριδοποίηση *in situ*. (A) Έκφραση του FGF8 στο εξώδερμα καθώς η καταβολή του άκρου αρχίζει να σχηματίζεται. (B) Έκφραση του FGF8 στην AER. (C) Το πρότυπο έκφρασης του FGF8 σε ένα έμβρυο κοτόπουλου 3 ημ.

Η ζώνη προόδου



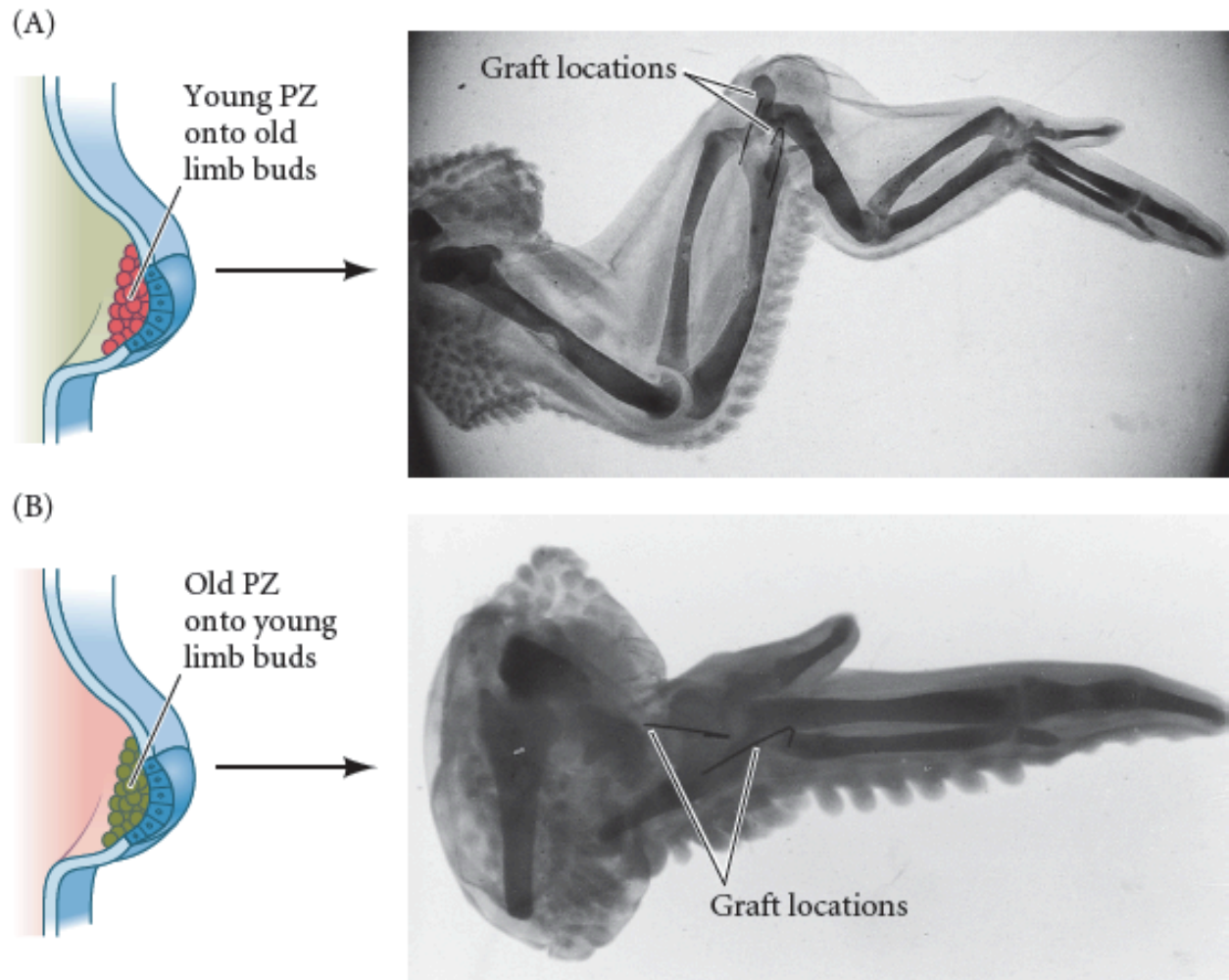
Οι καταβολές των άκρων αυξάνονται επειδή τα μεσοδερμικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται. Κάτω από την AER σχηματίζεται η ζώνη προόδου (progress zone). Τα κύτταρα στη ζώνη αυτή πολλαπλασιάζονται ανταποκρινόμενα σε σήματα από την AER (FGFs). Τα κύτταρα εγκαταλείποντας τη ζώνη προόδου διαφοροποιούνται. Τα κύτταρα της AER αποπίπτουν μετά την εγκαθίδρυση του άξονα ΚΠ

Η ζώνη προόδου και η AER



Όσο νωρίτερα απομακρύνεται η AER τόσο λιγότερες περιφερειακές δομές προκύπτουν. Φαίνεται ότι τα πρώτα κύτταρα που εγκαταλείπουν τη ζώνη προόδου φτιάχνουν δομές χαρακτηριστικές για το κεντρικό τμήμα (βραχιόνιο) ενώ αυτά που εγκαταλείπουν τη ζώνη αργότερα φτιάχνουν δομές χαρακτηριστικές της περιφέρειας (φάλαγγες).

Οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα

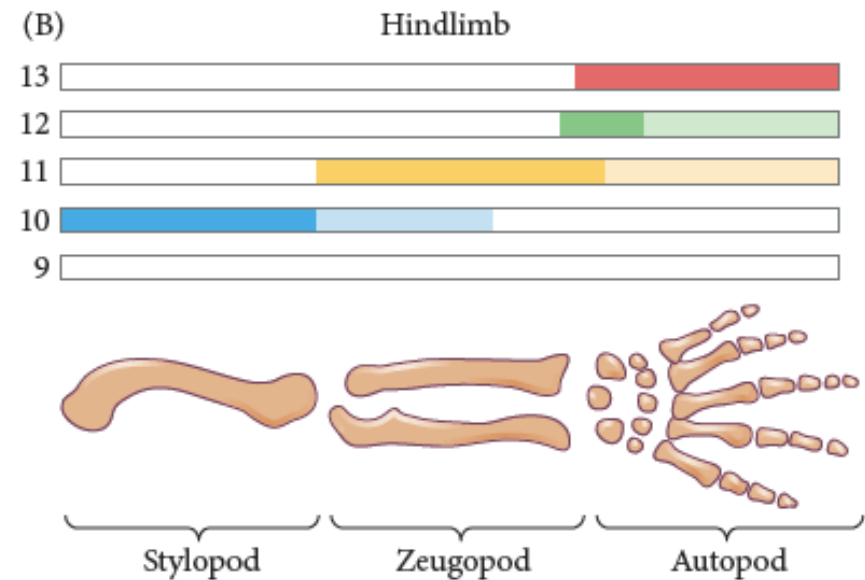
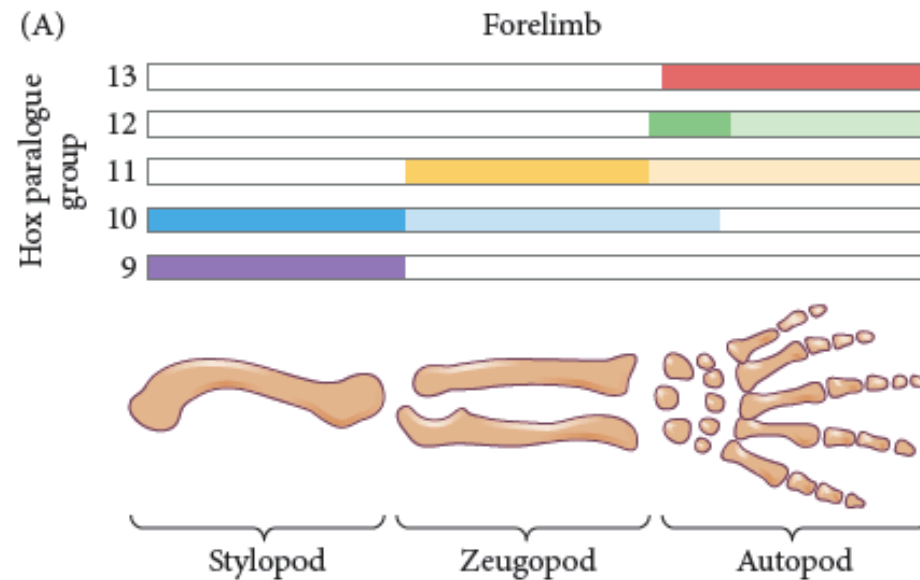


(A) μεταμόσχευση της ζώνης προόδου από νεαρό έμβρυο σε μεγαλύτερο έχει σαν αποτέλεσμα το διπλασιασμό του βραχιόνιου και της κερκίδας και ωλένης.

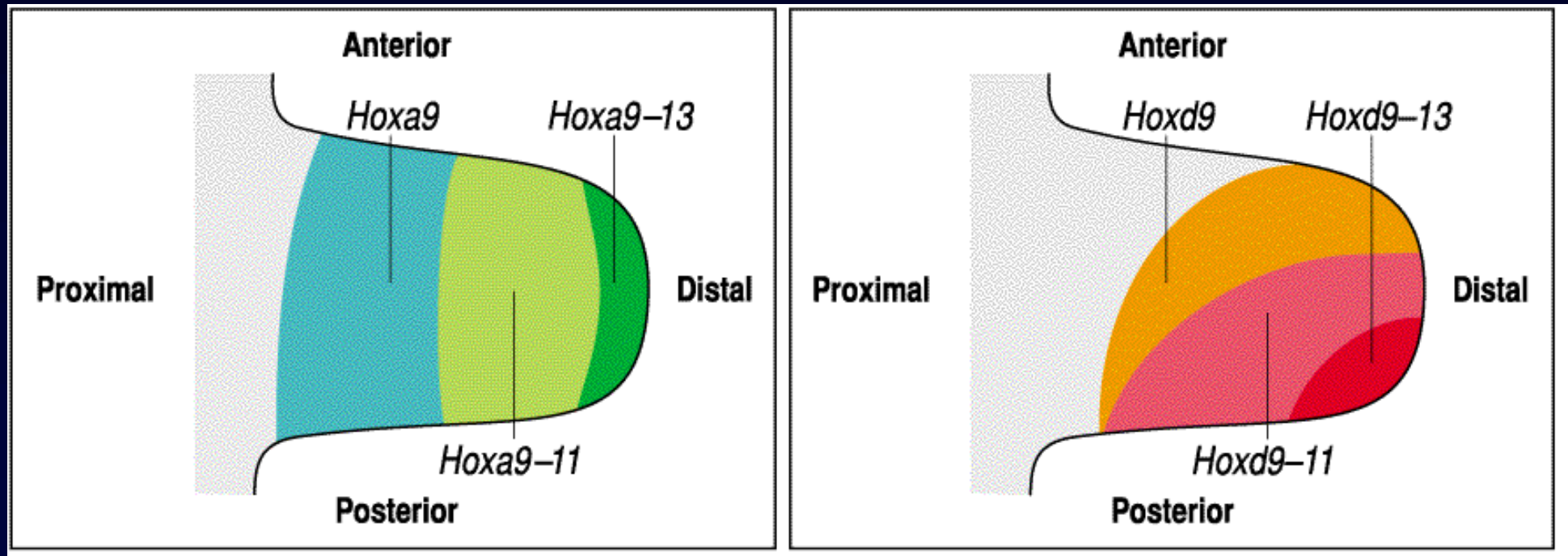
(B) μεταμόσχευση της ζώνης προόδου από μεγαλύτερο έμβρυο σε νεαρότερο έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό φαλάγγων απουσία κερκίδας-ωλένης.

Οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα

Τα γονίδια Hox

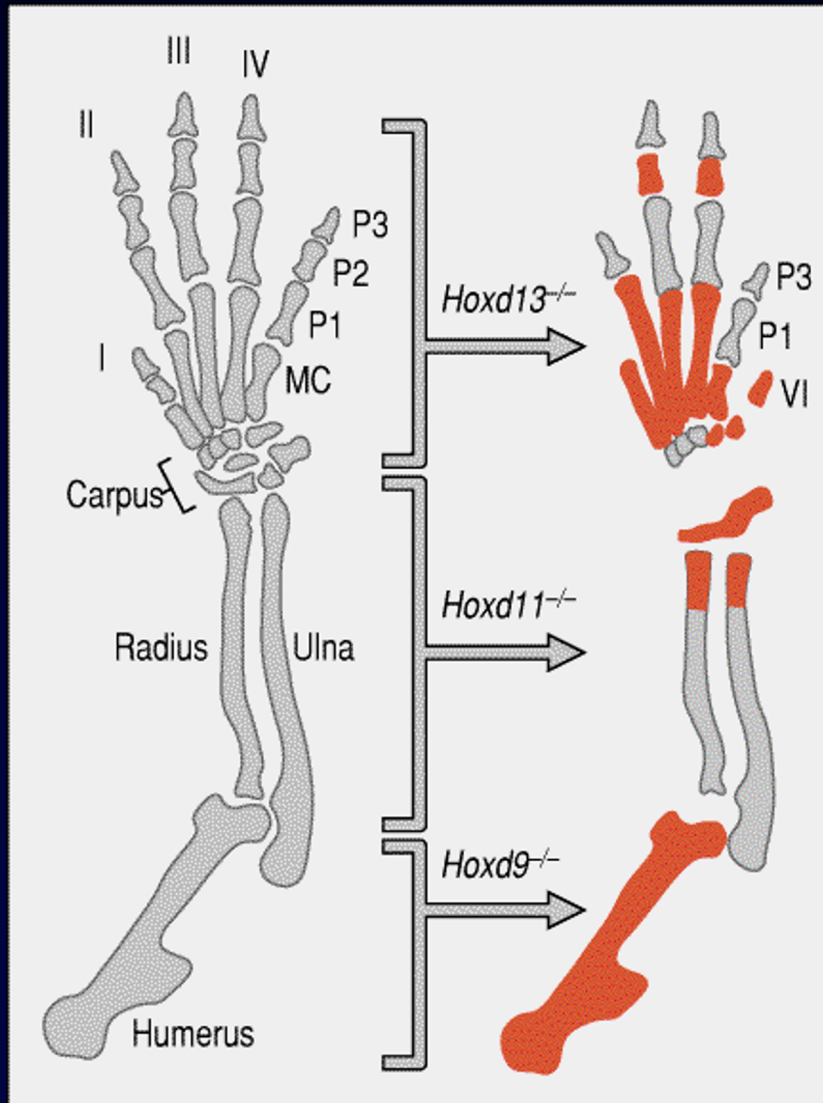


Ο ρόλος των γονιδίων *Hox* στην οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα



Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των *Hoxa9-13* και *Hoxd9-13* στην αναπτυσσόμενη καταβολή πτέρυγας στο έμβρυο της όρνιθας.

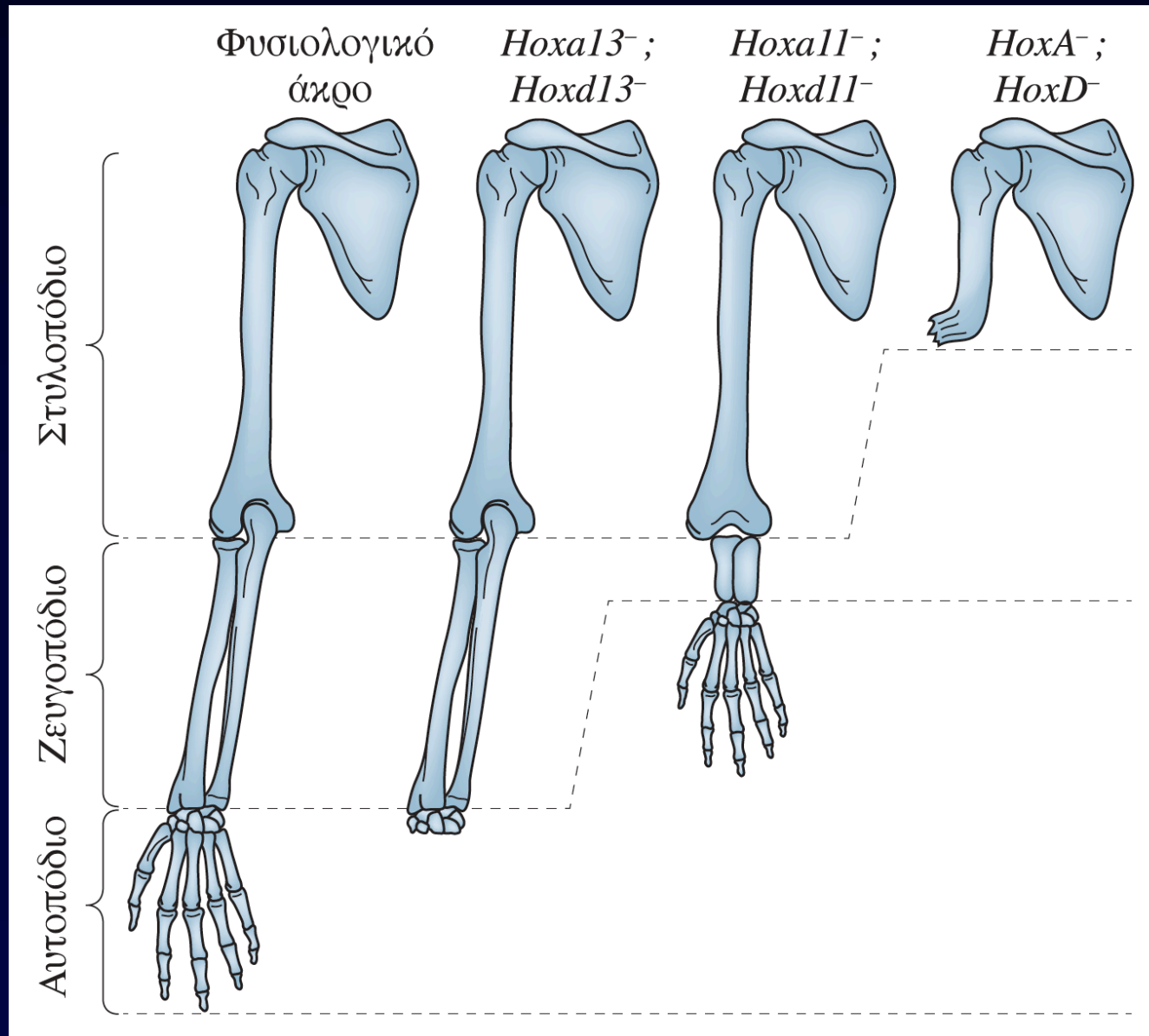
Ο ρόλος των γονιδίων *Hox* στην οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα: μεταλλάξεις



Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των άκρων ποντικών στους οποίους έχουν γίνει knock-out τα γονίδια *Hoxd13*, *Hoxd11* ή *Hoxd9*.

Απουσία κάποιου από τα *Hox* δεν οδηγεί σε ομοιωτικό μετασχηματισμό αλλά σε αλλαγές του μεγέθους ή του σχήματος κάποιου/ κάποιων οστού/οστών (κόκκινο χρώμα στο σχήμα)

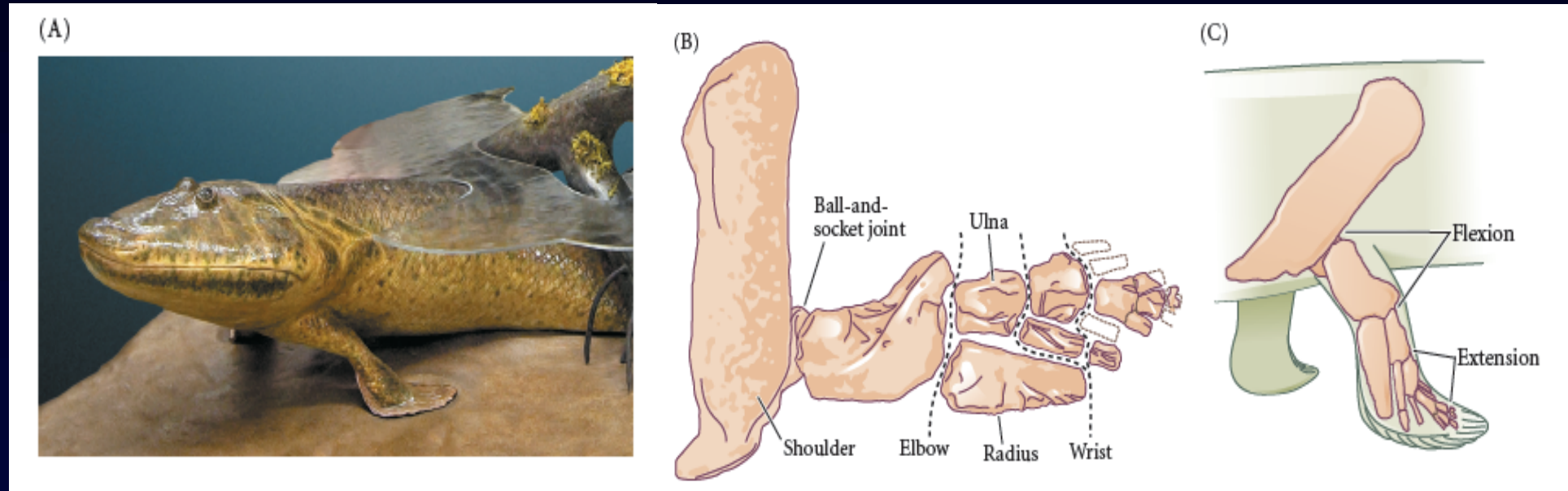
Ο ρόλος των γονιδίων *Hox* στην οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα: μεταλλάξεις



Στην περίπτωση που παρουσιάζεται απουσιάζουν και τα δύο συμπλέγματα.

Οργάνωση του κεντρικού-περιφερικού άξονα

Τα γονίδια Hox

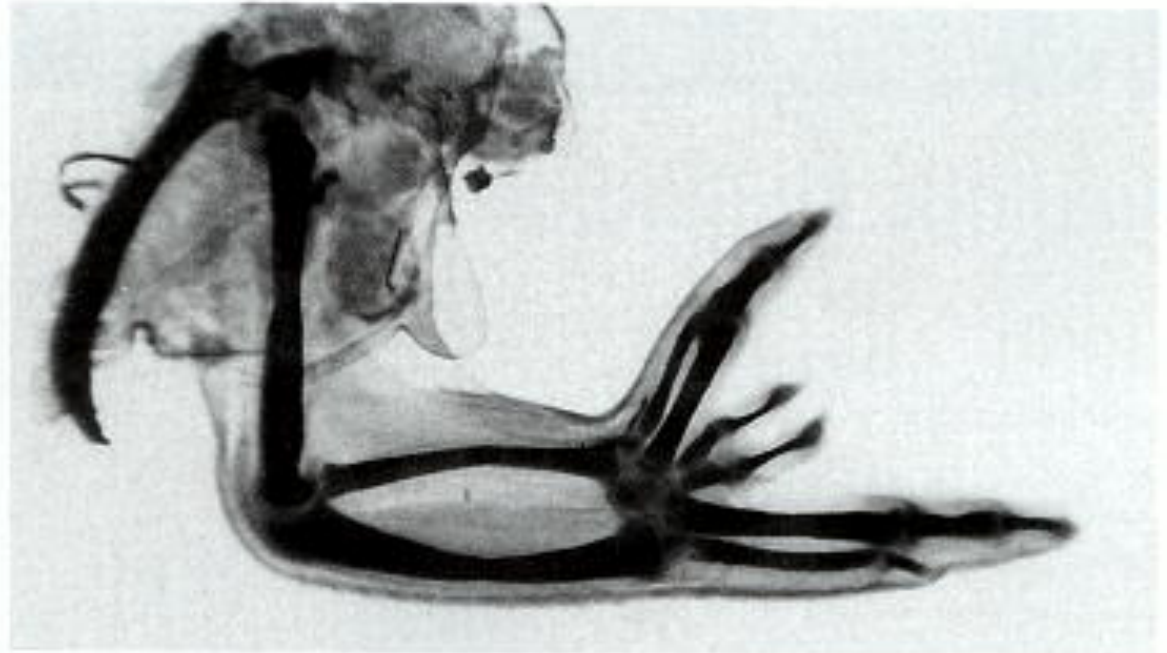
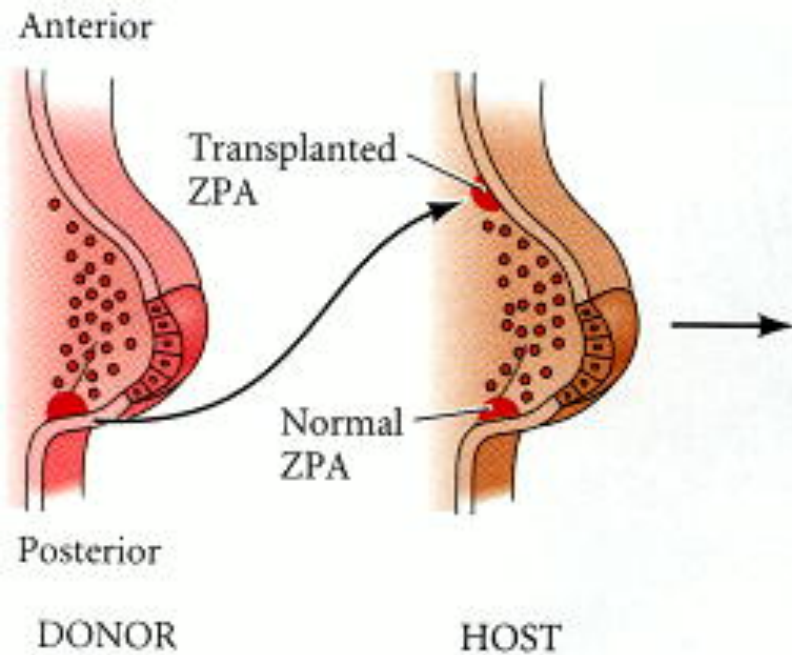


A. Αναπαράσταση (από τα απολιθώματα) του *Tiktaalik roseae* που ζούσε πριν 375 m χρόνια σε αβαθή ύδατα. Είχε πτερύγια, λέπια και βράγχια αλλά και ρουθούνια κάτι που υποδεικνύει ότι μπορούσε να αναπνεύσει και αέρα.

B. Από τα απολιθώματα η δομή του άκρου του *Tiktaalik* αποκαλύπτει την ύπαρξη δομών που μοιάζουμε με φάλαγγες, καρπό, αγκώνα και ώμο. Η δομή του άκρου υποδεικνύει ότι αυτό το ζώο μάλλον μπορούσε να περπατήσει στο ρηχό βυθό ή και στη στεριά για λίγο. Μια πρωτόγονη άρθρωση του αγκώνα και του καρπού επέτρεπε το λύγισμα

C. Η αντίσταση στην επαφή με ένα υπόστρωμα επέτρεπε την κάμψη στις κεντρικές αρθρώσεις (ώμος και αγκώνας) και την επέκταση στις περιφεριακές (καρπό και φάλαγγες).

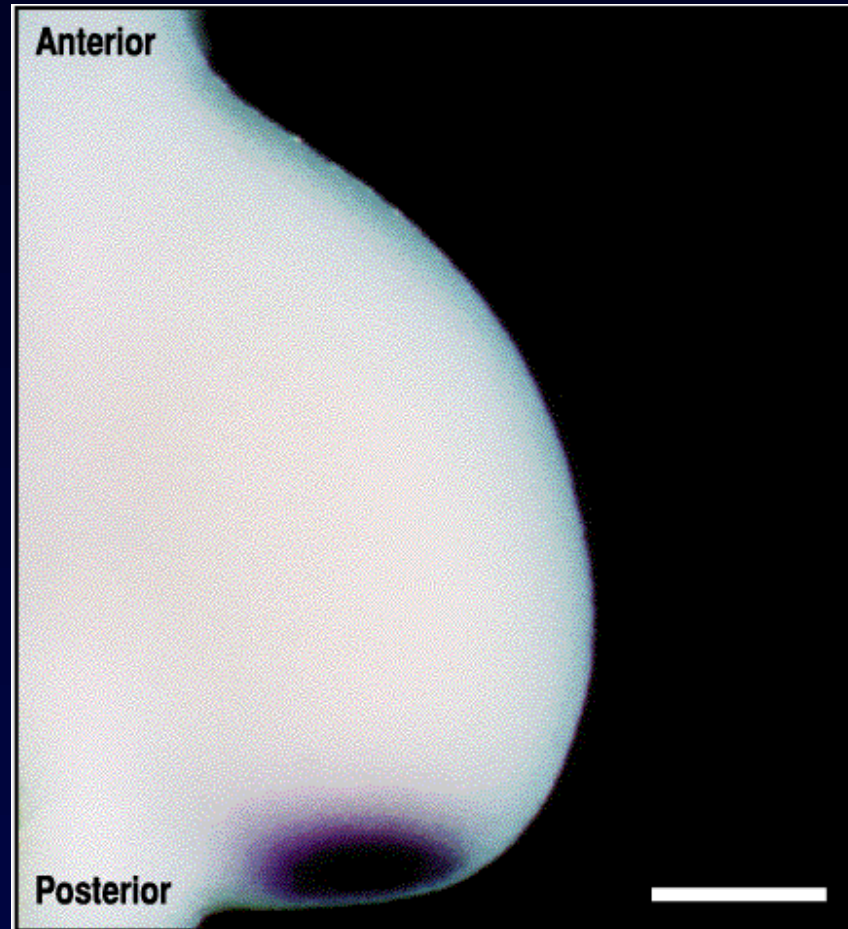
Οργάνωση του εμπροσθοπίσθιου άξονα των άκρων



Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας του άκρου καθορίζεται από μια μικρή ομάδα μεσοδερμικών κυττάρων (ζώνη πολωτικής ενεργότητας-zone of polarizing activity ZPA) που βρίσκονται στο οπίσθιο όριο ανάμεσα στην αναπτυσσόμενη καταβολή και τον κορμό.

Μεταμόσχευση της ZPA στο εμπρόσθιο τμήμα ενός αναπτυσσόμενου άκρου οδηγεί σε διπλασιασμό των οπίσθιων δομών.

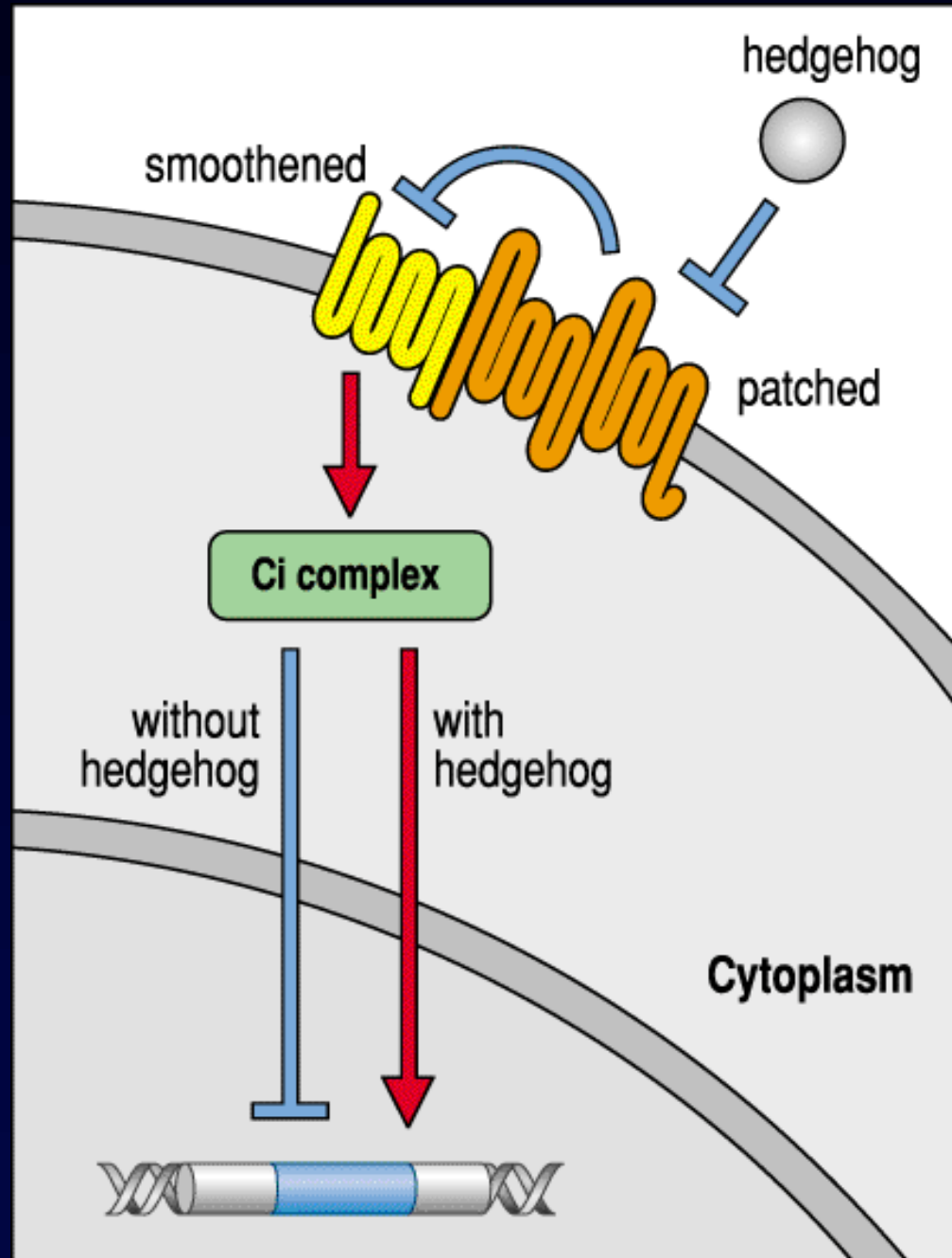
Οργάνωση του εμπροσθοπίσθιου άξονα των άκρων



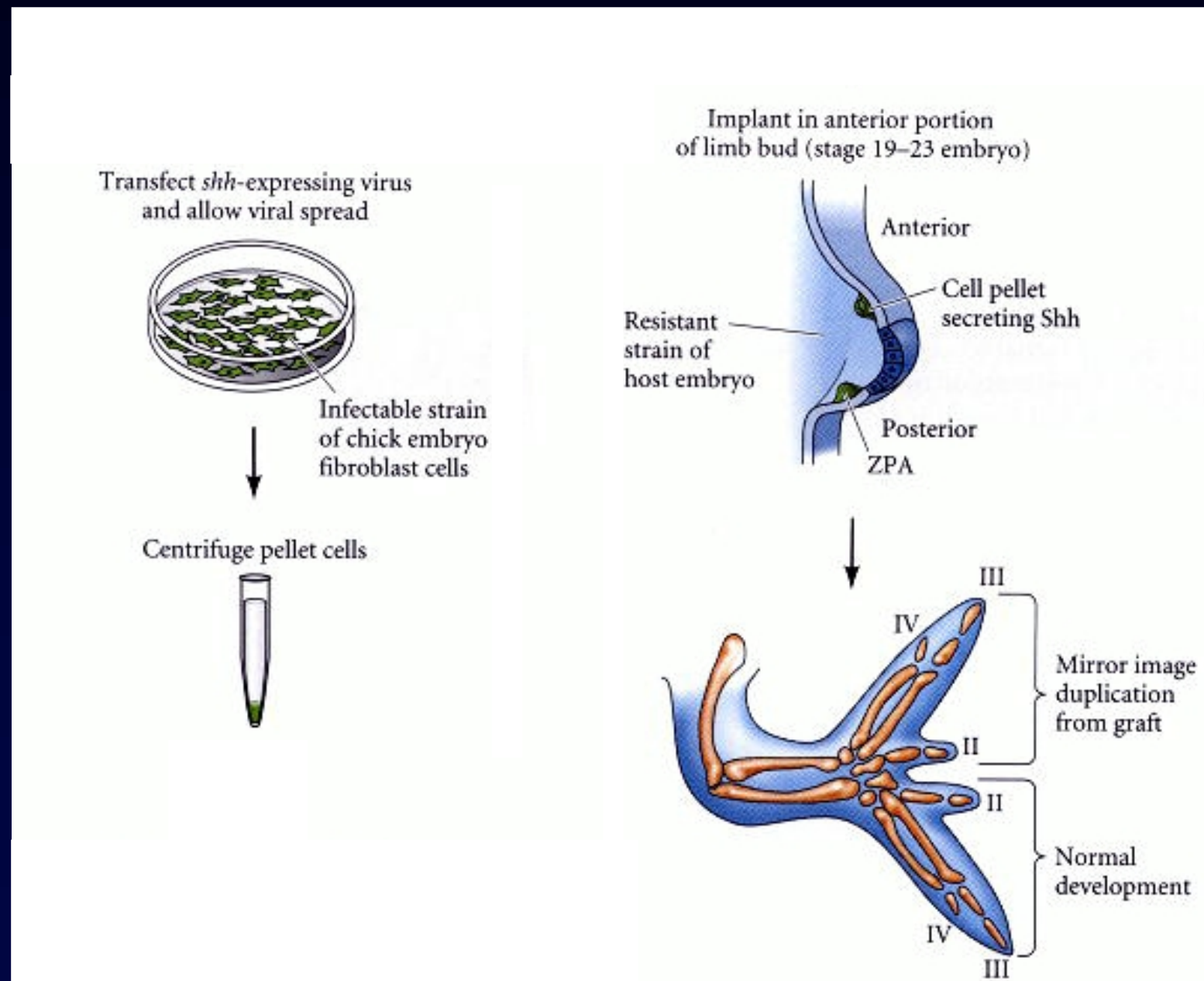
Το γονίδιο *sonic hedgehog* εκφράζεται στη ΖΡΑ.

Δίπλα: Υβριδοποίηση *in situ* - ανίχνευση του *sonic hedgehog*.

Το μονοπάτι hedgehog



To sonic hedgehog μπορεί να υποκαταστήσει τη ZPA

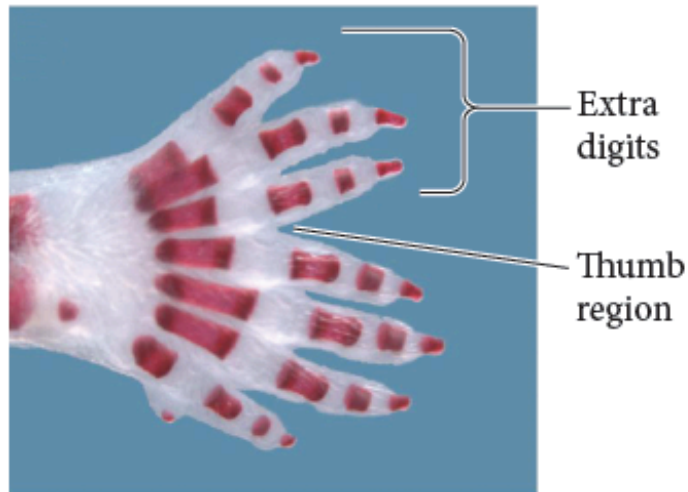


Το sonic hedgehog και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

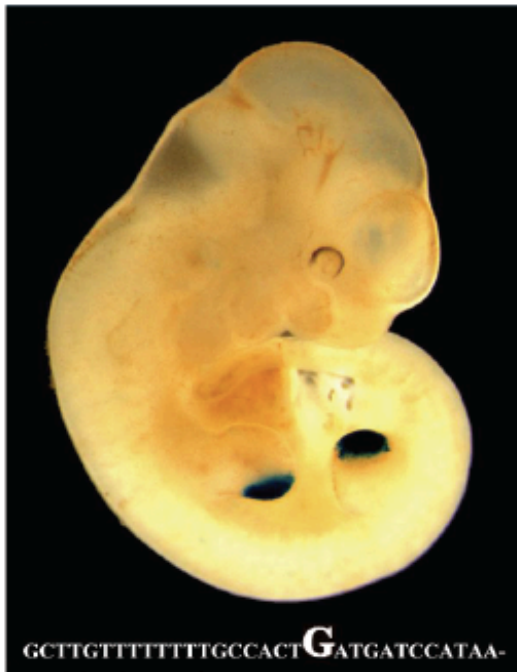
(A) Thumb region



Hx (hemimelic extra-toes)



(C) Wild-type



Αλληλουχία enhancer *shh* wt

(D) *hx* mutant



Αλληλουχία enhancer *shh* Hx

Ο ενισχυτής αυτός εντοπίζεται στο -10^6

Αδυναμία πρόσδεσης του καταστολέα – επαγωγή μεταγραφής του *shh* στο εμπρόσθιο τμήμα της καταβολής.

Το sonic hedgehog και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



Μεταλλαγές στον ίδιο enhancer *SHH*



Μεταλλαγές στον ίδιο enhancer του *Shh*
(απόγονος της γάτας του Ernest Hemingway, Key West, Florida)

Το sonic hedgehog και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

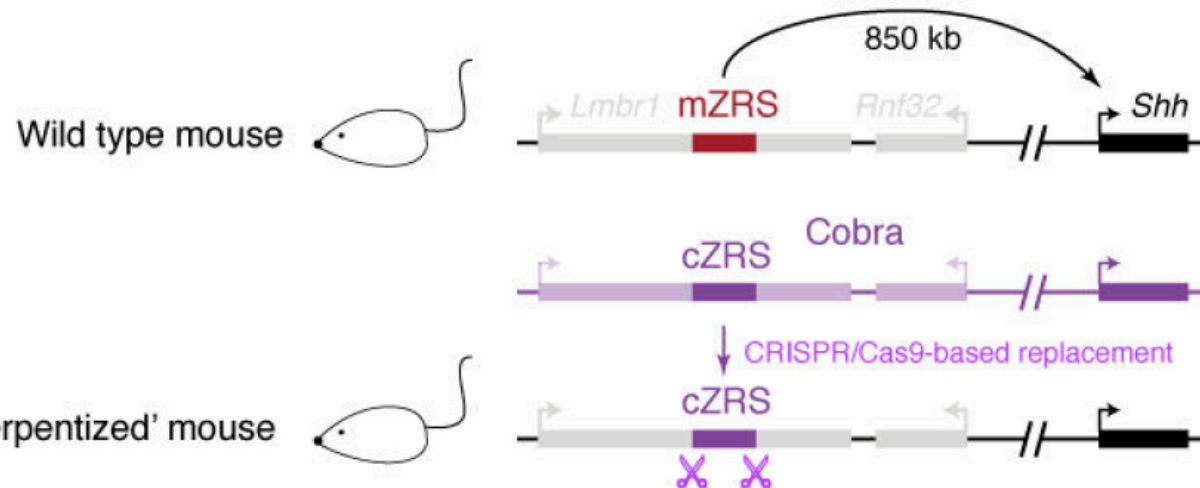
A

17 bp snake-specific deletion

	***** * * * *
human	ATAATAAAAGCAAAAAGTAC-AAAA-TTTTAGGTAACCTTCCTTCTTAATTAATTGGACTGACCAG
mouse	ATAATAAAAGTAAATGCAC-AAAA-TCTGAGGTCACTTCCTCTCTTAATTAGTTGCACTGACCAG
cow	ATAATAAAAGCAGAAAGGAC-AAAA-TCTGAGGTAACTTCCTTTCTTAATTAATTAGACTGGCCAG
dolphin	ATAATAAAAGCAAAAAGTAC-AAAA-TCTGAGGTGACTTCCTTTCTTAATTAATTAGACTGGCCAG
horse	ATAATAAAAGCAAAAAGTAC-AAAA-TTTGAGGTAACCTTCCTTCTTAATTAATTAGACTGACCAG
megabat	ATAATAAAAGCAAAAAGTAC-AAAA-TTTGCGGTAACCTTCCTTCTTAATTAATTAGACTGACCAG
sloth	ATAATAAAAGCAAAAAGTAC-AAAA-TTTGAGGTAACCTTCCTTTCTTAATTAATTAGACTGACCAG
platypus	ATAATAAAAGCAAAATAGTACAAAA-TTTGAGGTAACCTTCCTCGCTTAATTAATTAGGTAGACCAG
chicken	ATAATAAAAGCAAAATAGTACAAAA-TTTGAGGTAACCTTCCTTGCTTAATTAATTAGGTAGACCAG
lizard	ATAATAAAAGCAAAATGGTAGAAAA-TTCTGAGGTAACCTTCCTTGCTTAATTAATTAGGTAGGCCAG
boa	ATAATAAAAGCAAAATGGTAGCAAAA-----ATTTTAATTAATTAGGTAGGCCAG
python	ATAATAAAAGCAAAATGGTAGCGAAA-----TTTTTAATTAATTAGGTAGGCCAG
viper	ATAATAAAAGGAAATAGTAGCAATT-----TCCTTAATTAAT-----TAGGCCAG
rattlesnake	ATAATAAAAGCAAAATGGTAGCAATT-----TCCTTAATTAAT-----TAGGCCAG
cobra	-----
cornsnake	-----
coelacanth	ATAATAAAATAATCGGTACAAAA-TTTGAGGTAACCTTCCTTGCTTAATTAATTAGATAGACCAG
e. shark	ATTAATAAAGAGAGCAGTATGAAA--TTGCAGTGATTTCCTTGACTAATTAATTAGATCCACCAG

Το ποντικόφιδο!!!

A



B

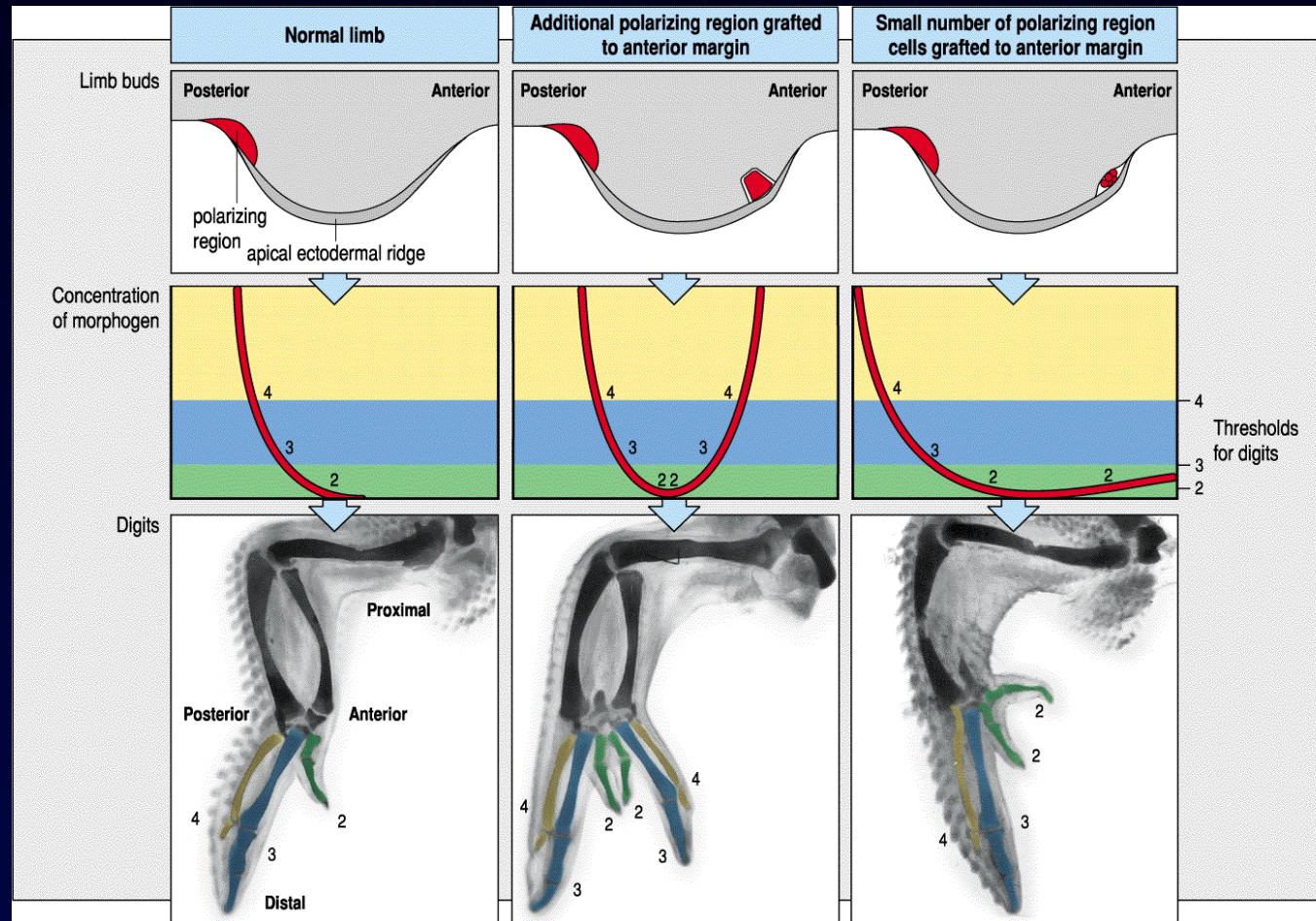
Wild type



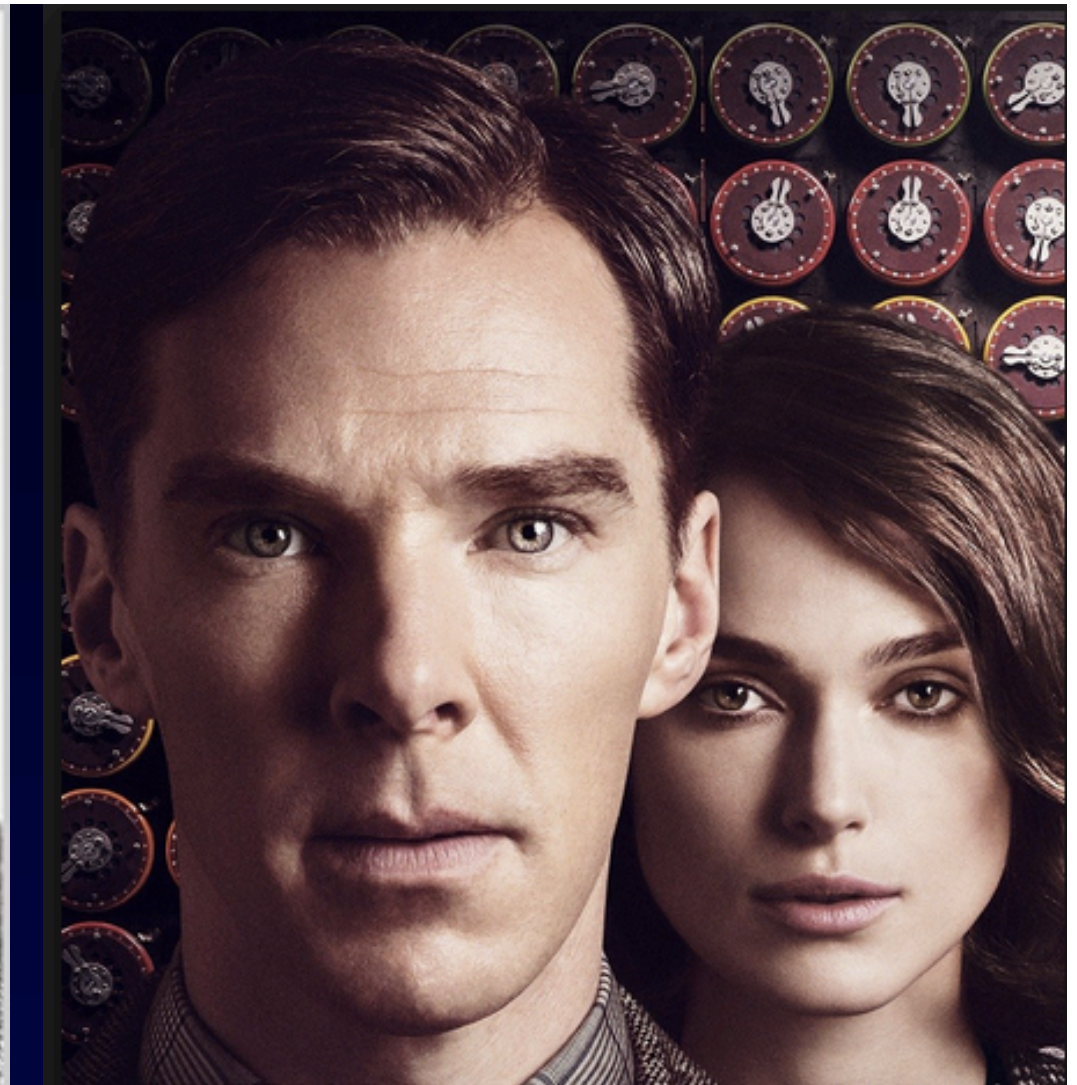
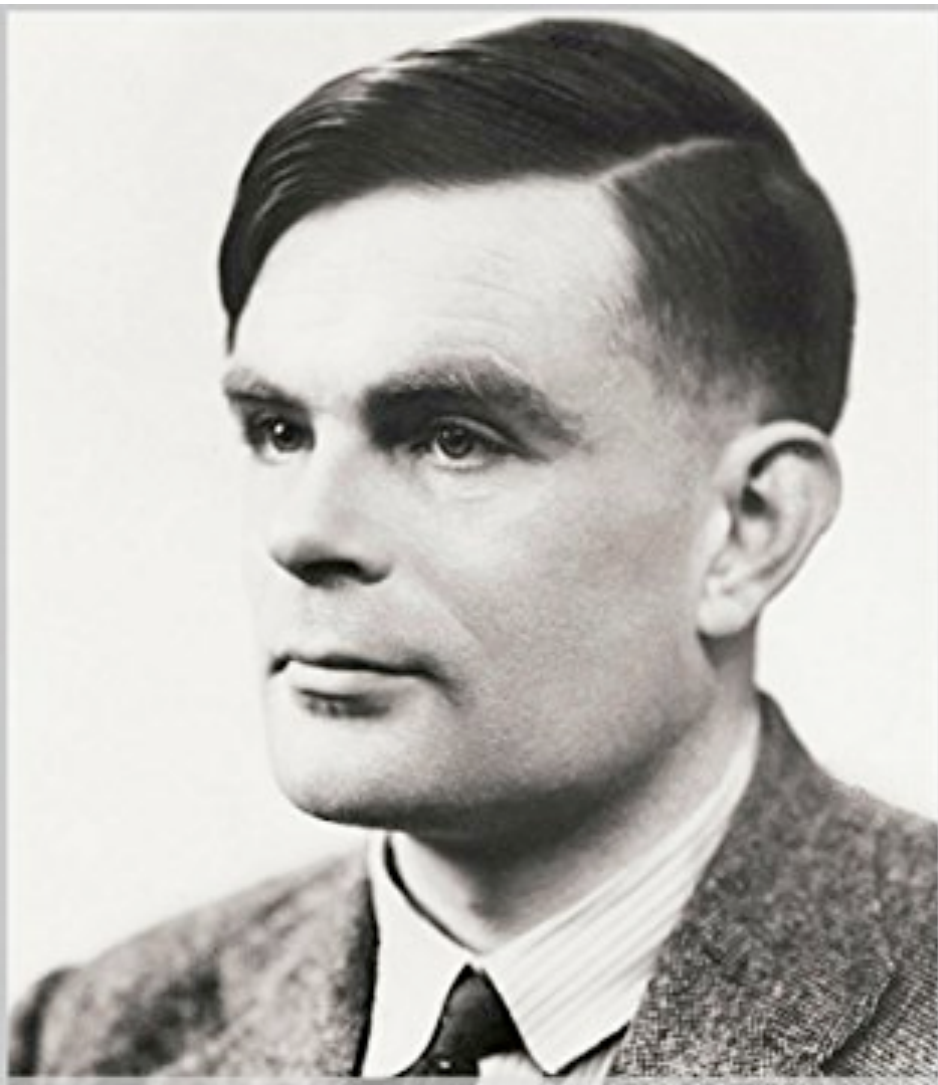
'Serpentized'



Πώς δρα το sonic hedgehog ;



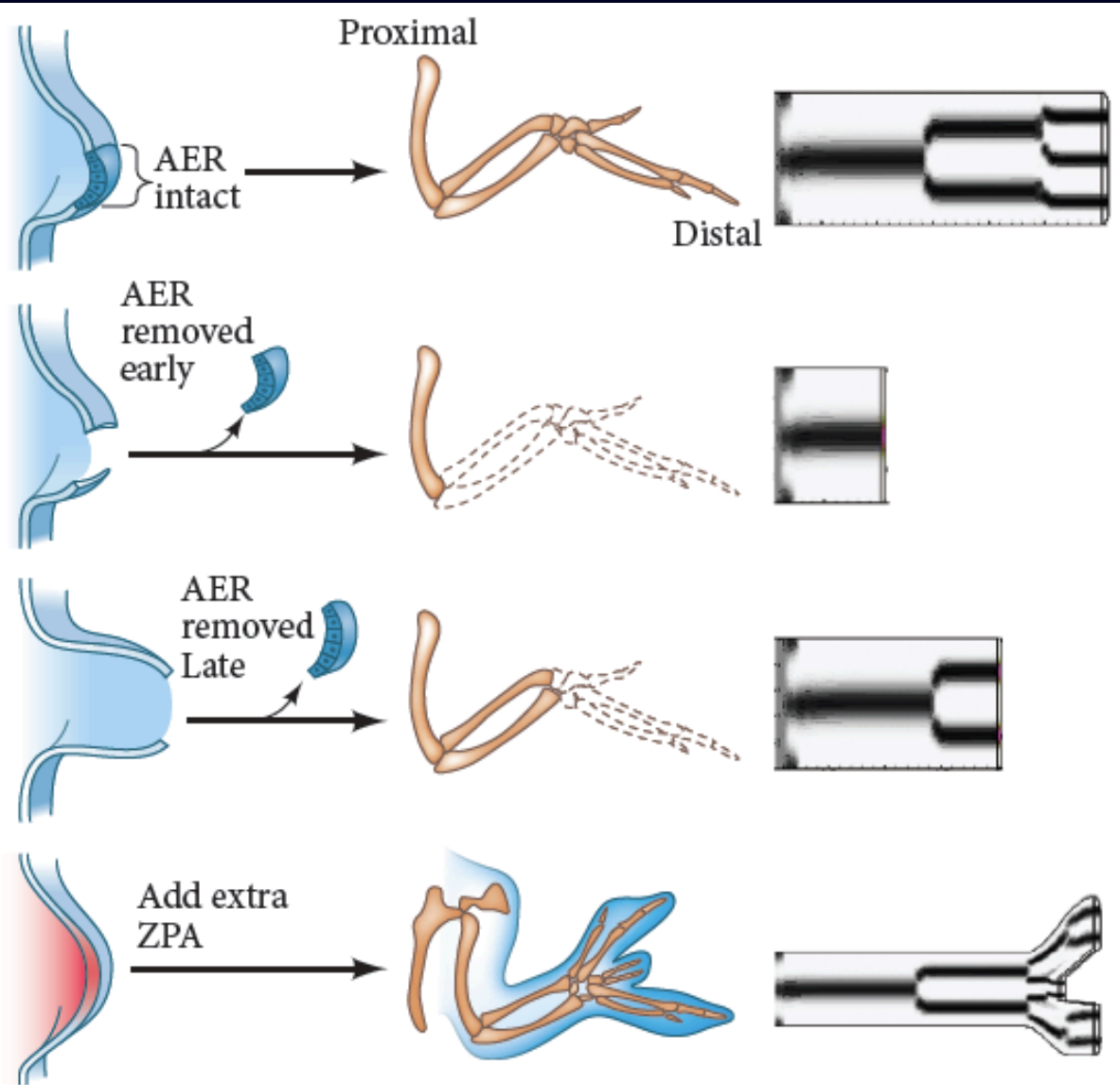
Είναι η κλίση του sonic hedgehog υπεύθυνη για την οργάνωση του εμπροσθοπίσθιου άξονα; (κατ'αντιστοιχία με το κοιλιακό-ραχιαίο άξονα στο νευρικό σωλήνα)
 Το shh ενεργοποιεί BMP και η κλίση αυτών οργανώνει τον εμπροσθοπίσθιο άξονα- η υπόθεση αυτή ενισχύεται από πειράματα που δείχνουν ότι το shh δεν διαχέεται μακριά από τη ZPA.



Alan Turing

Reaction-diffusion (Turing) mechanism of pattern generation

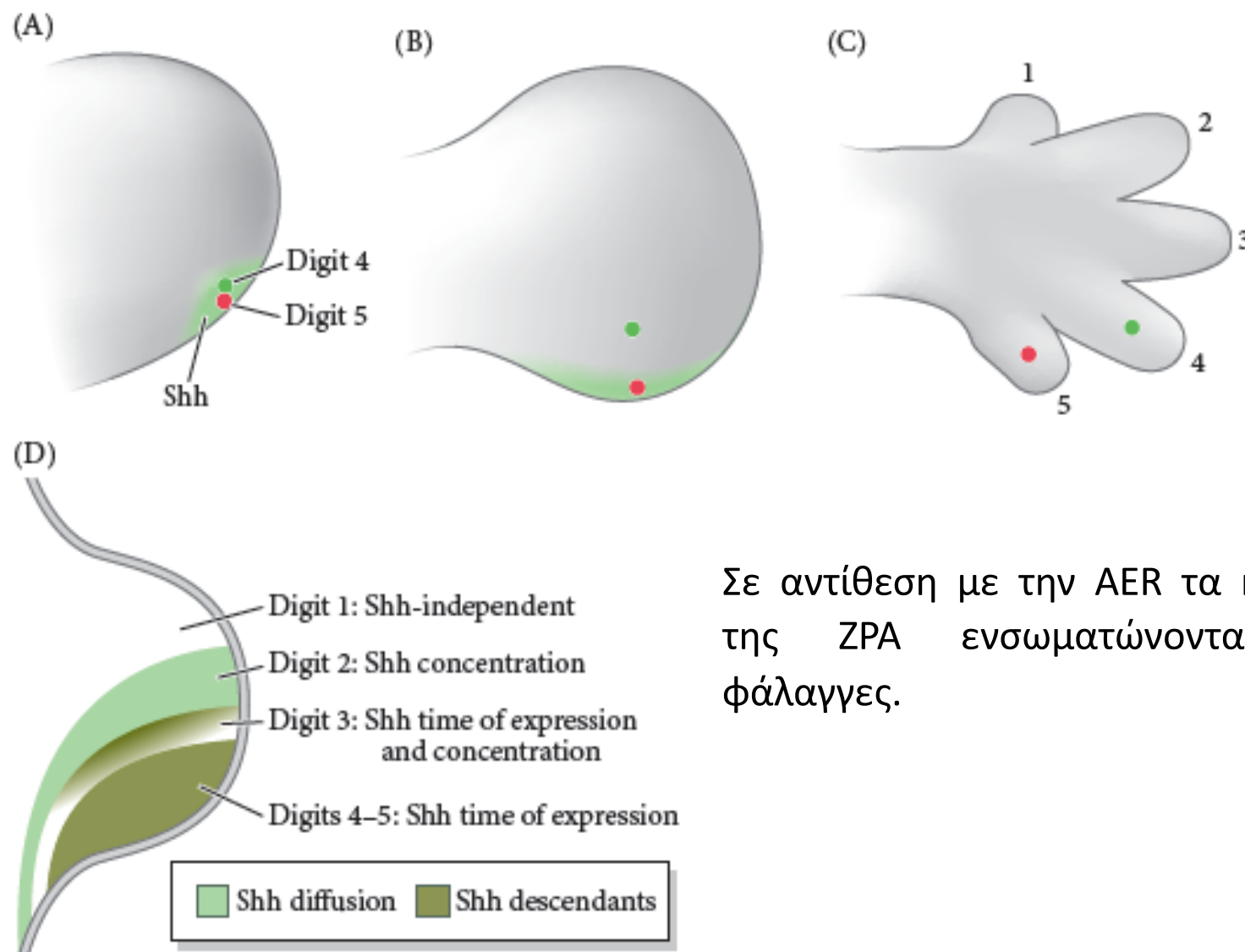
Μοντέλο Turing στο άκρο



Μοντελοποίηση λαμβάνοντας υπόψη τη γεωμετρία της καταβολής και τους ρυθμούς σύνθεσης, αποικοδόμησης και διαχυσης των ενεργοποιητών και των αναστολέων.

Πρόβλεψη των αποτελεσμάτων απομάκρυνσης, προσθήκης της AER

Σχηματισμός των καταβολών των άκρων



Σε αντίθεση με την AER τα κύτταρα της ZPA ενσωματώνονται στις φάλαγγες.

Σχηματισμός των καταβολών των άκρων

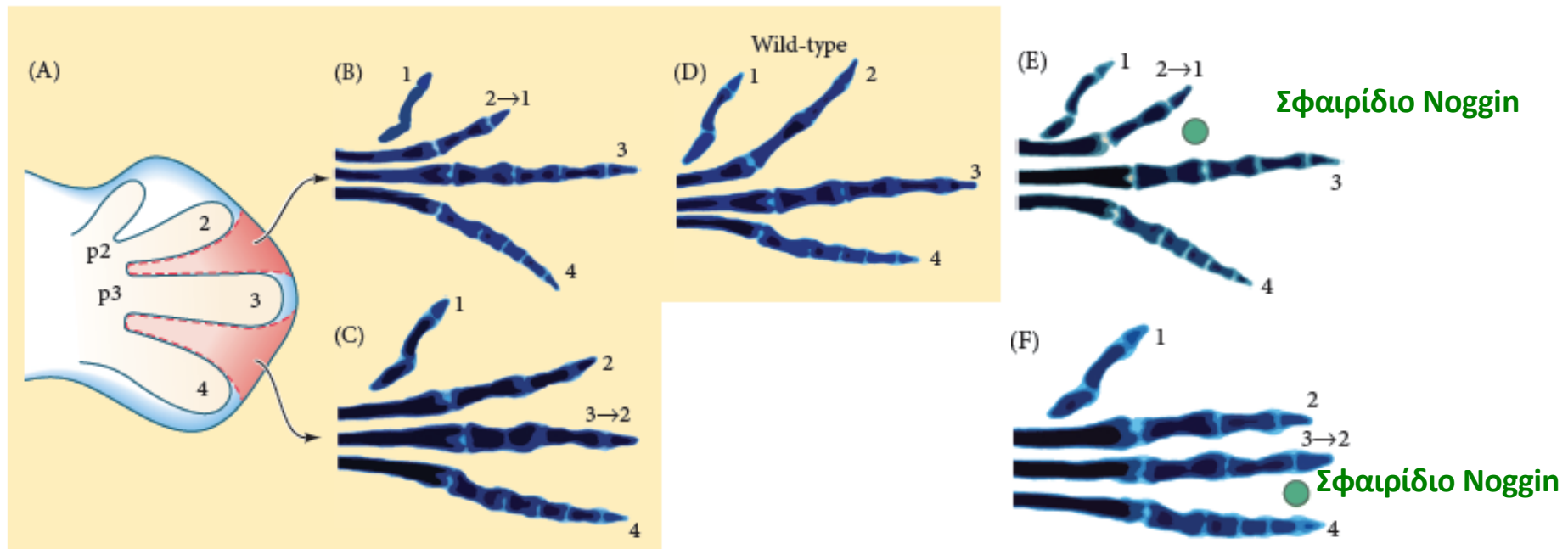
Κατά συνθήκη νοκ-άουτ του *Shh* στα οποία η έκφραση του μπορεί να σταματήσει σε συγκεκριμένα στάδια υποδεικνύουν δύο φάσεις δράσης:

A) Δράση μορφογόνου – αρχικά μέσω συγκέντρωσης αλλά μετά και μέσω της διάρκειας της έκθεσης (και μέσω και του BMP). Διαβάθμιση ενεργοποίησης του Gli3. Ταυτότητα των φαλάγγων!!

B) Δράση μιτογόνου που συνεπάγεται πολλαπλασιασμό του μεσεγχύματος της καταβολής.

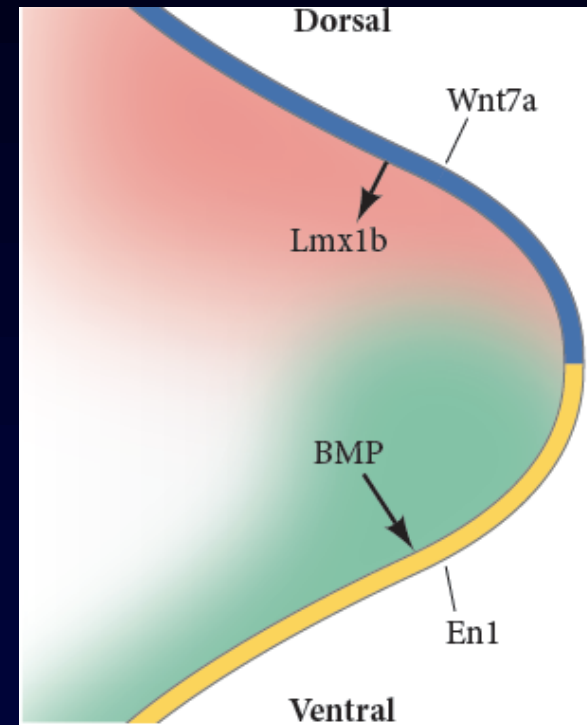
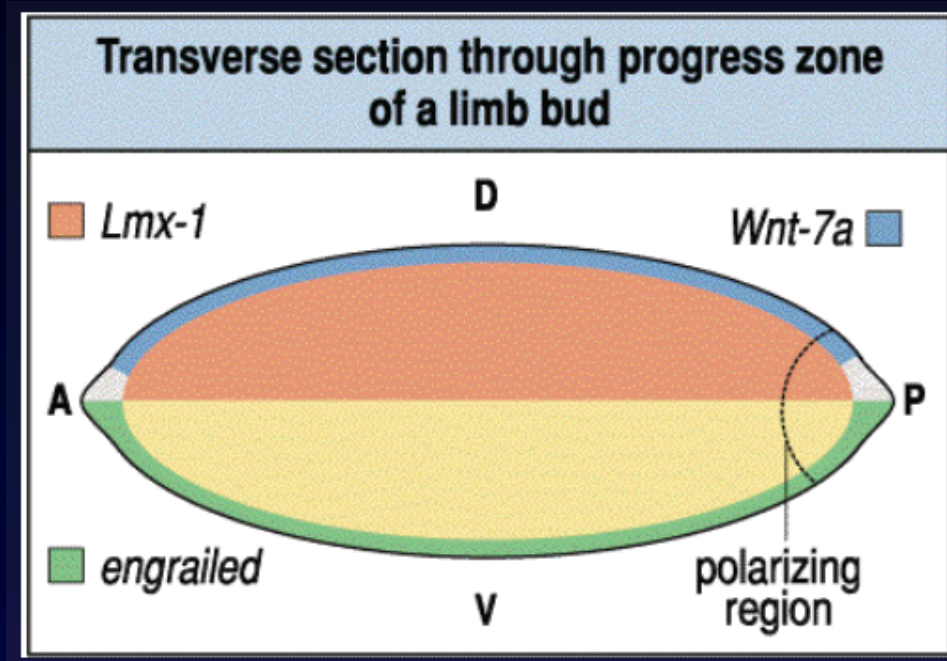
Ρύθμιση και έναρξη διαφοροποίησης του χόνδρινου προτύπου.

Ρόλος των μεσοφαλλαγγικών περιοχών στην ταυτότητα των φαλάγγων.



Πολλαπλά επίπεδα δράσης του μονοπατιού BMP

Οργάνωση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα των άκρων



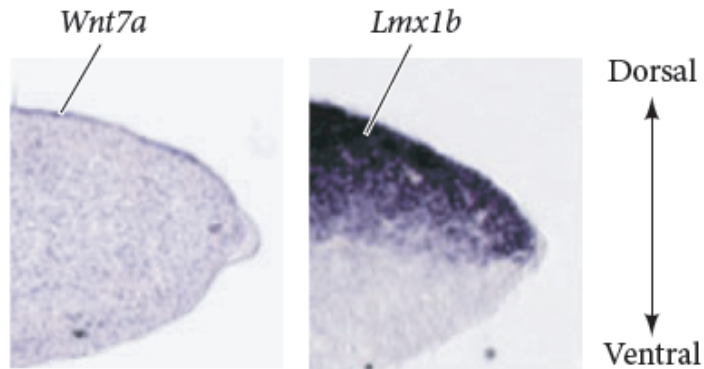
Ο ραχιαίος-κοιλιακός άξονας οργανώνεται από σήματα που προέρχονται από το εξώδερμα. Ένα από τα σήματα αυτά είναι το *Wnt7a*. Το *Wnt7a* εκφράζεται στη ραχιαία περιοχή του εξωδέρματος και επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Lmx-1*.

Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει knock-out το *Wnt7a* ή το *Lmx-1* σχηματίζουν κοιλιακές δομές στο ραχιαίο τμήμα των άκρων τους. (Σύνδρομο nail-patella στον άνθρωπο)

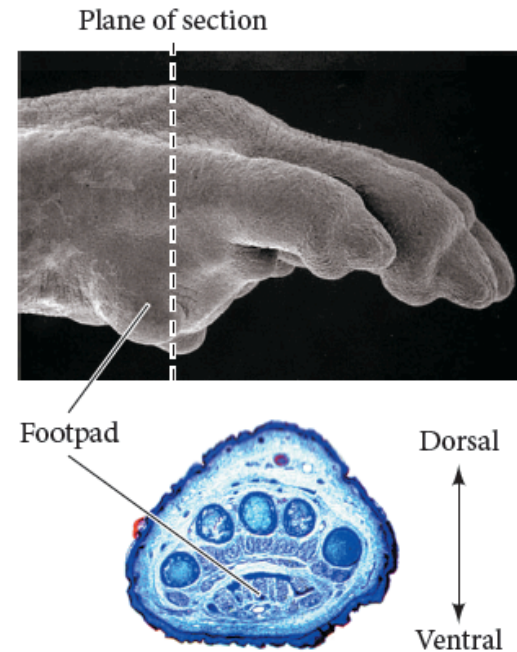
Εκτοπική έκφραση του *Lmx-1* στο κοιλιακό τμήμα της καταβολής έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ραχιαίων δομών αντί κοιλιακών.

Οργάνωση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα των άκρων

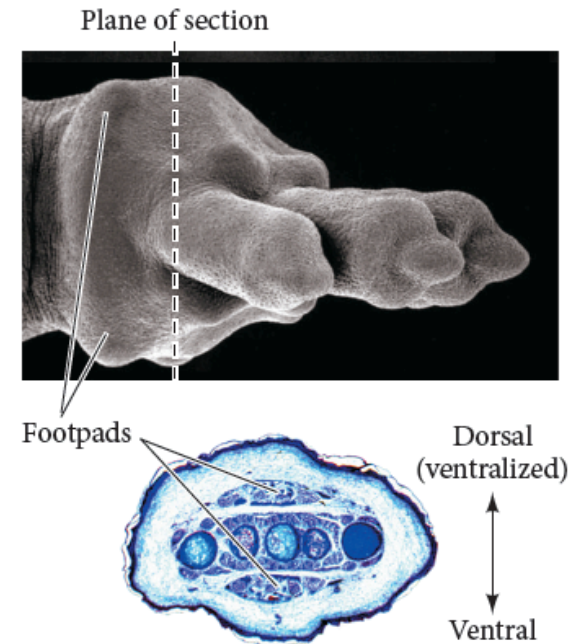
(A) Gene expression



(B) Wild-type



(C) *Lmx1b* mutant

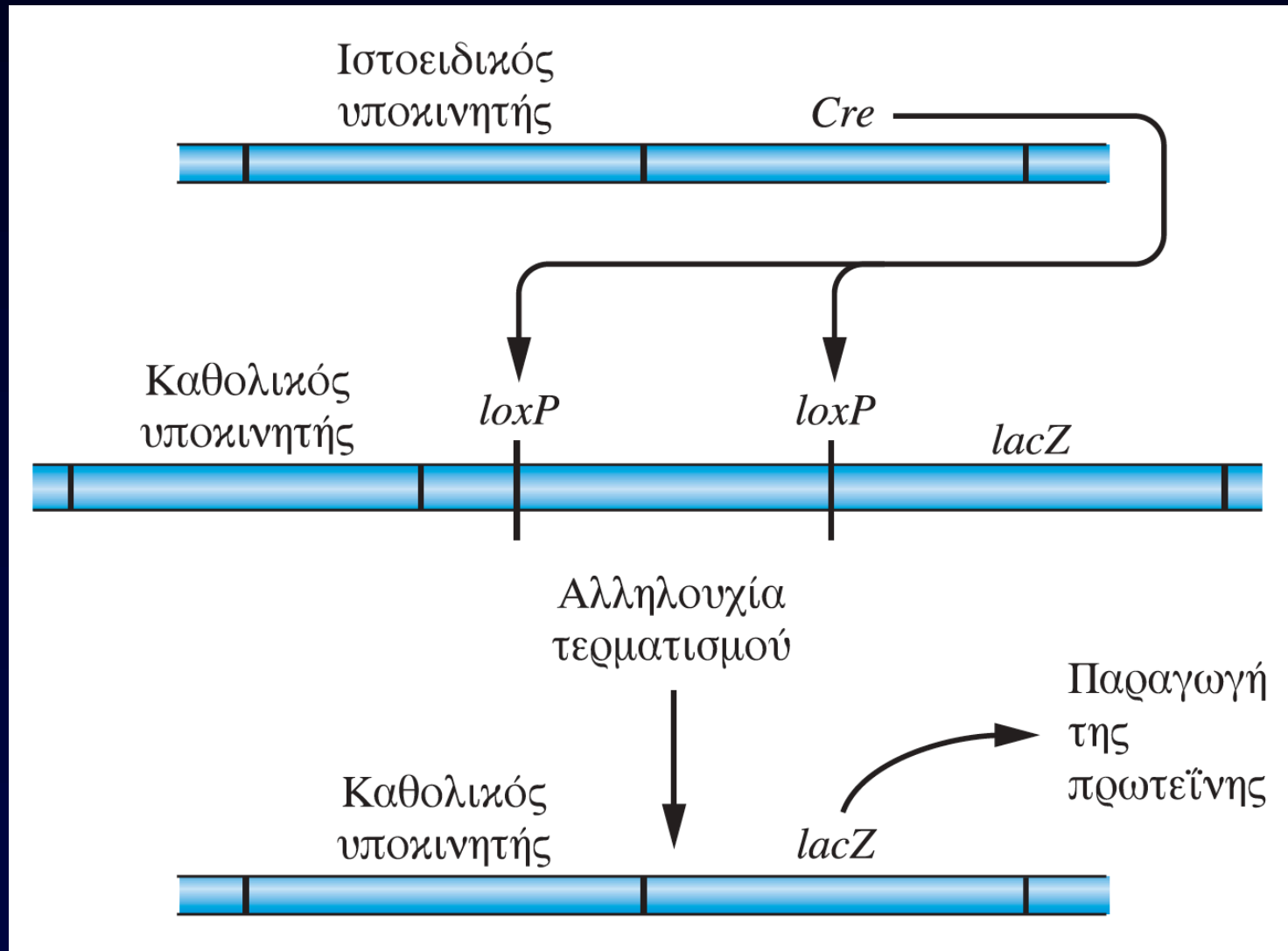


Ο ραχιαίος-κοιλιακός άξονας οργανώνεται από σήματα που προέρχονται από το εξώδερμα. Ένα από τα σήματα αυτά είναι το *Wnt7a*. Το *Wnt7a* εκφράζεται στη ραχιαία περιοχή του εξωδέρματος και επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Lmx-1*.

Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει knock-out το *Wnt7a* ή το *Lmx-1* σχηματίζουν κοιλιακές δομές στο ραχιαίο τμήμα των άκρων τους. (Σύνδρομο nail-patella στον άνθρωπο)

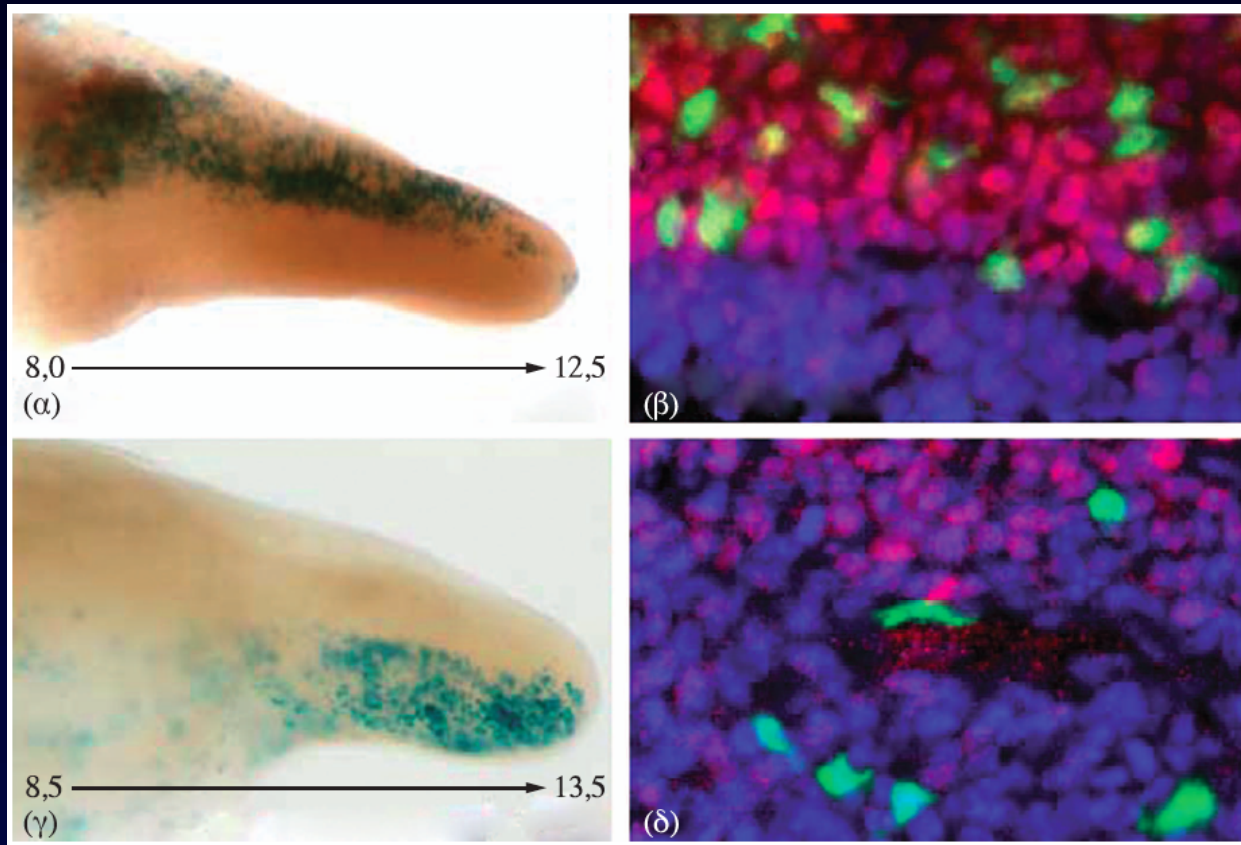
Εκτοπική έκφραση του *Lmx-1* στο κοιλιακό τμήμα της καταβολής έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ραχιαίων δομών αντί κοιλιακών.

Οργάνωση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα των άκρων



Η ενεργοποίηση του υποκινητή που καθοδηγεί την έκφραση του *Cre* έχει ως αποτέλεσμα τη μόνιμη σήμανση των κυττάρων.

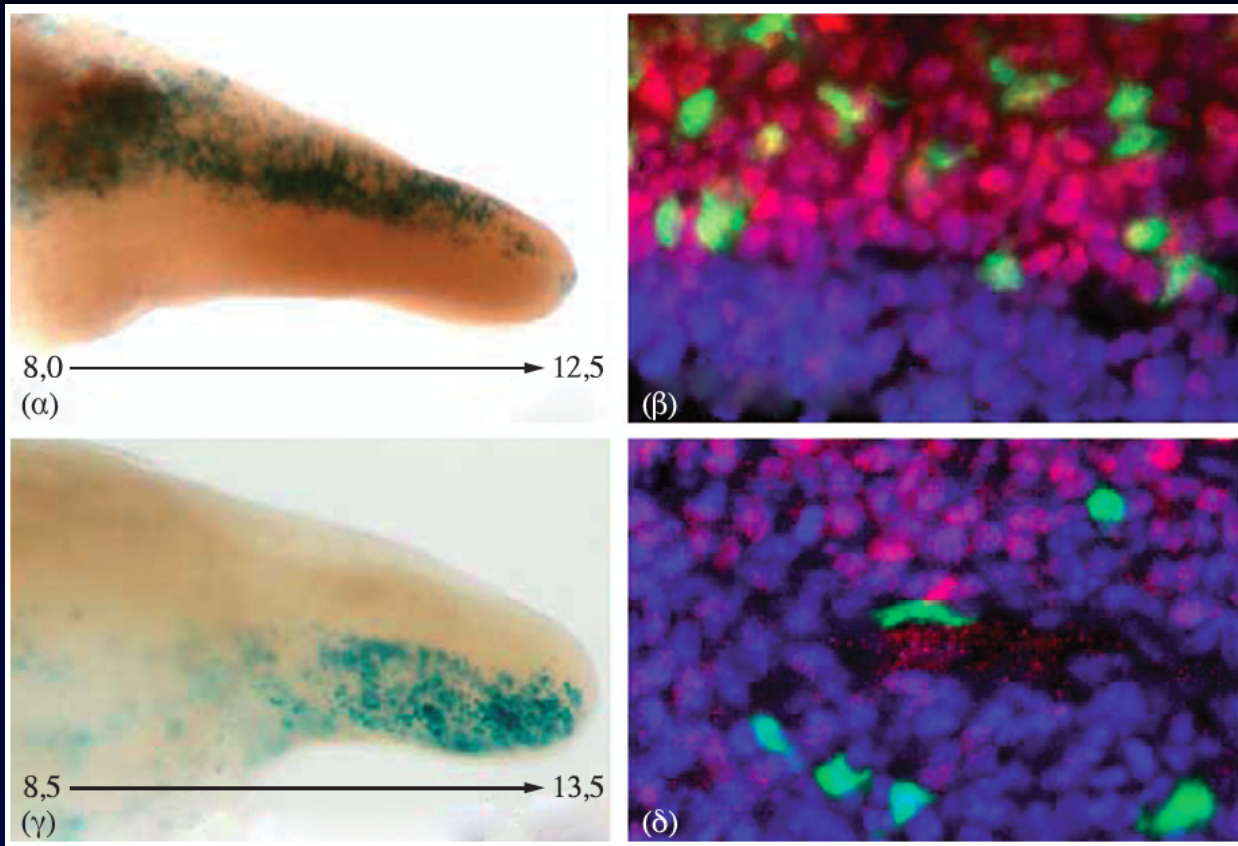
Οργάνωση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα των άκρων



Η επαγωγή των κλώνων έχει γίνει σε πρώιμα στάδια (E8,0 ή E8,5) με χαμηλή δόση 4-hydroxy-tamoxifen σε ποντικούς Pol2-CreER x R26R.

Στα (α) και (γ) έχει γίνει χρώση με το υπόστρωμα της β-γαλακτοζιδάσης XGal κατά την E12,5. Από τη δημοσίευση Arques *et al.* (2007) *Development* **134**, 3713-3722,

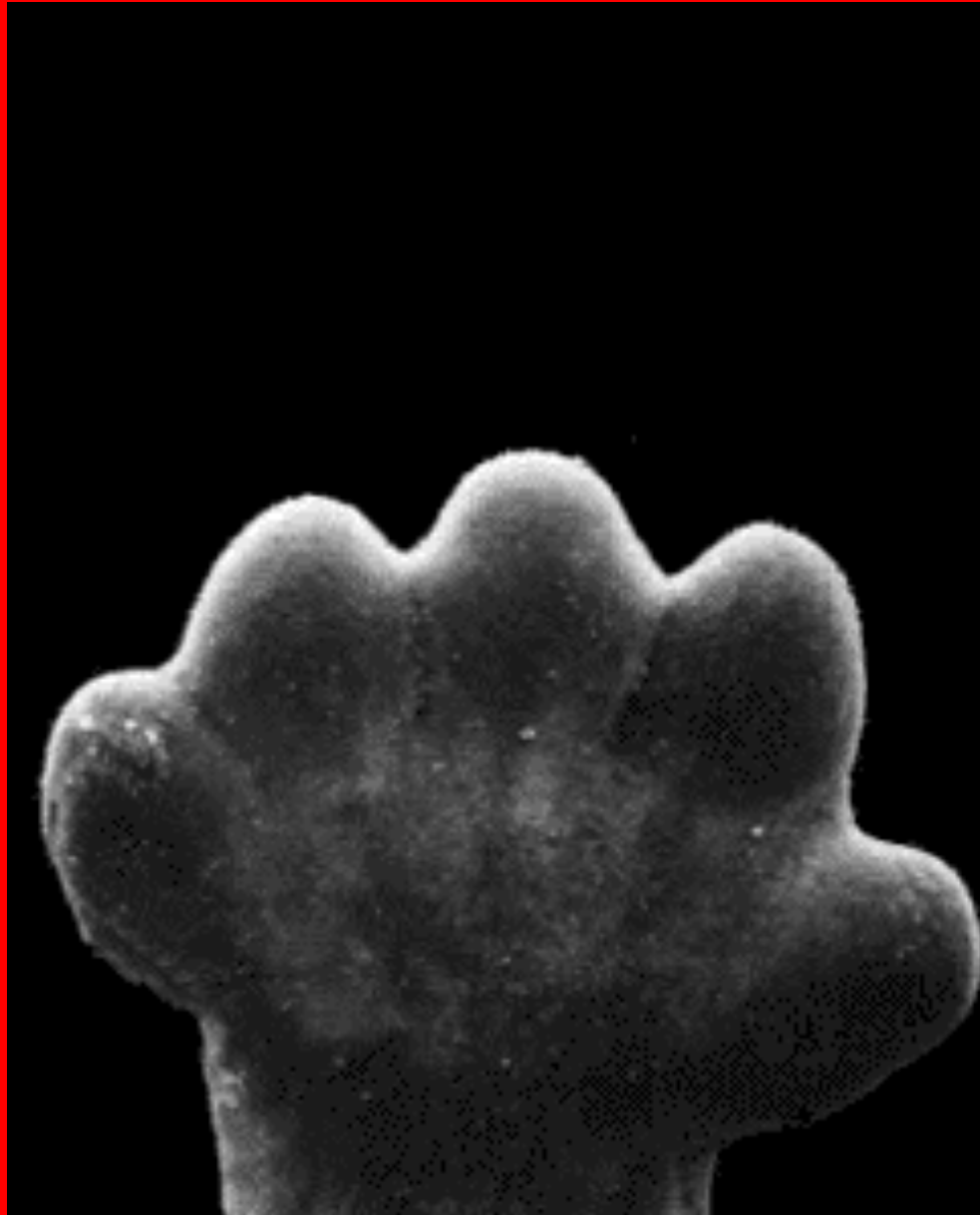
Οργάνωση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα των άκρων



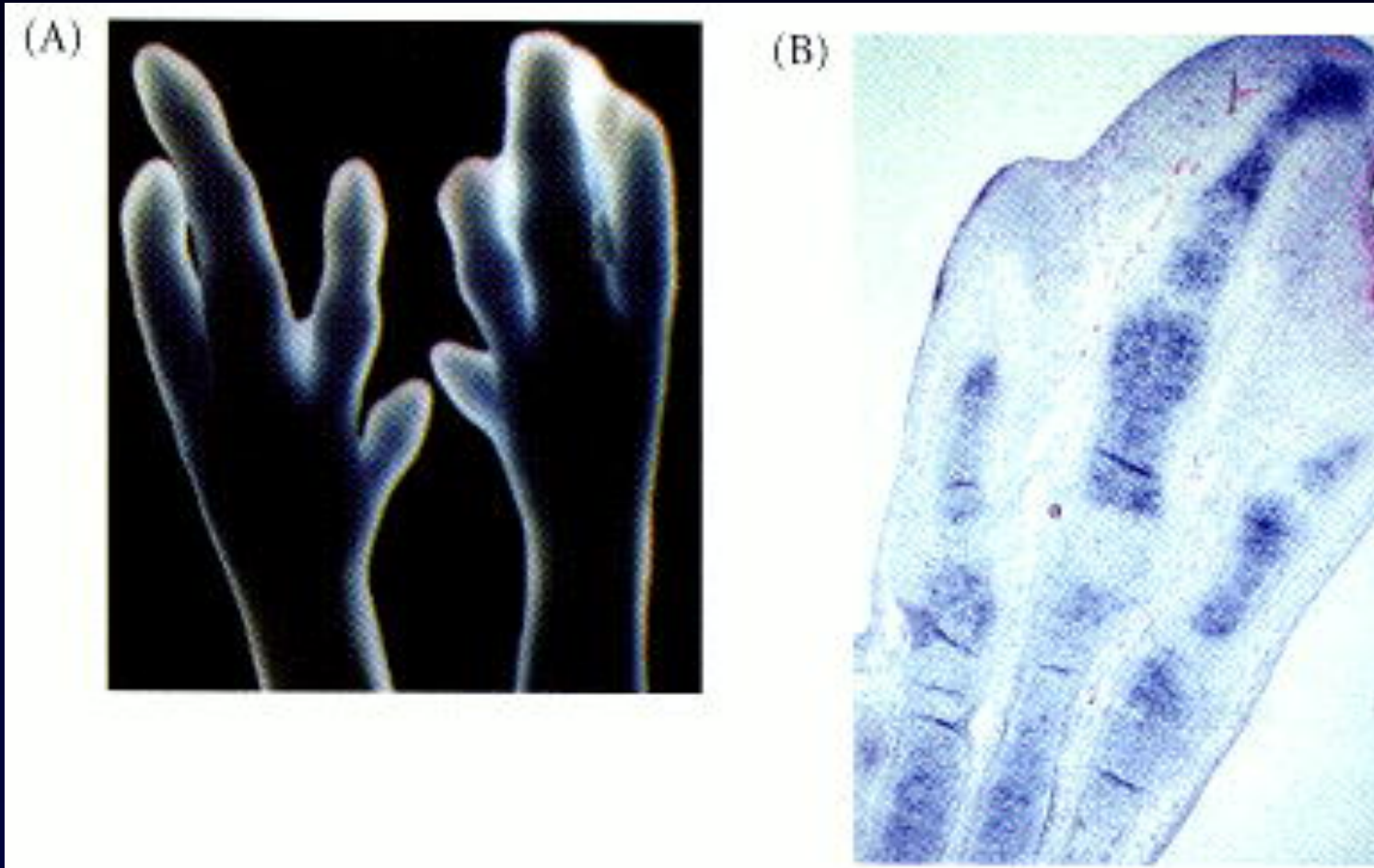
Η επαγωγή των κλώνων έχει γίνει σε πρώιμα στάδια (E8,0 ή E8,5) με χαμηλή δόση 4-hydroxy-tamoxifen σε ποντικούς Pol2-CreER x R26R.

Στα (β) και (δ) παρουσιάζονται τομές σε μεγάλη μεγέθυνση – οι κλώνοι είναι ση-μασμένοι με GFP και ταυτοποιούνται με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (πρά-σινο). Τα κύτταρα που εκφράζουν τον LMX1B φαίνονται κόκκινα, καθώς έχει γίνει ανοσοχρώση με αντίσωμα που αναγνωρίζει τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα. Οι πυρήνες φαίνονται με χρώμα μπλε. Από τη δημοσίευση Arques *et al.* (2007) *Development* **134**, 3713

Σχηματισμός δακτύλων



Σχηματισμός δακτύλων



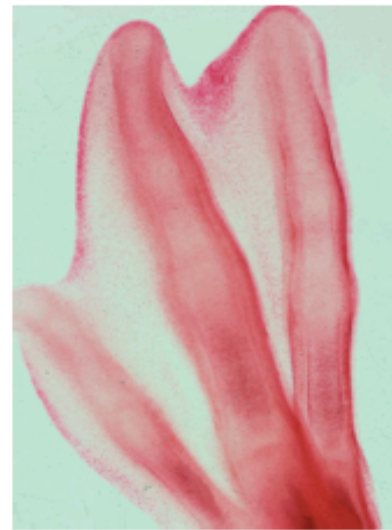
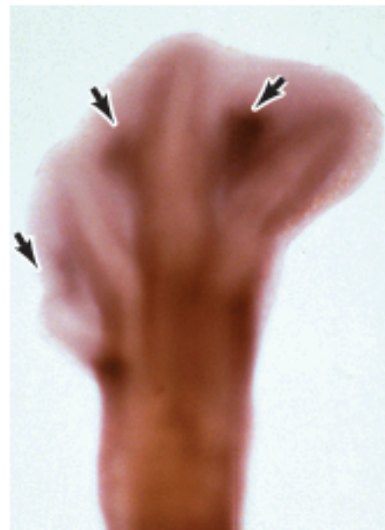
Στις περιοχές μεταξύ των μελλοντικών δακτύλων εκφράζονται BMP2, BMP4 και BMP7 ενώ στο χόνδρο των δακτύλων εκφράζεται η *poggin* (B). (A) Στο έμβρυο αυτό το δεξί άκρο έχει μολυνθεί με ιό ο οποίος εκφράζει έναν dominant negative υποδοχέα των BMP- έτσι εμποδίζεται η μετάδοση σήματος και εμποδίζεται η απόπτωση. Το αριστερό άκρο είναι μάρτυρας.

Σχηματισμός δακτύλων

Chick
hindlimb



Duck
hindlimb



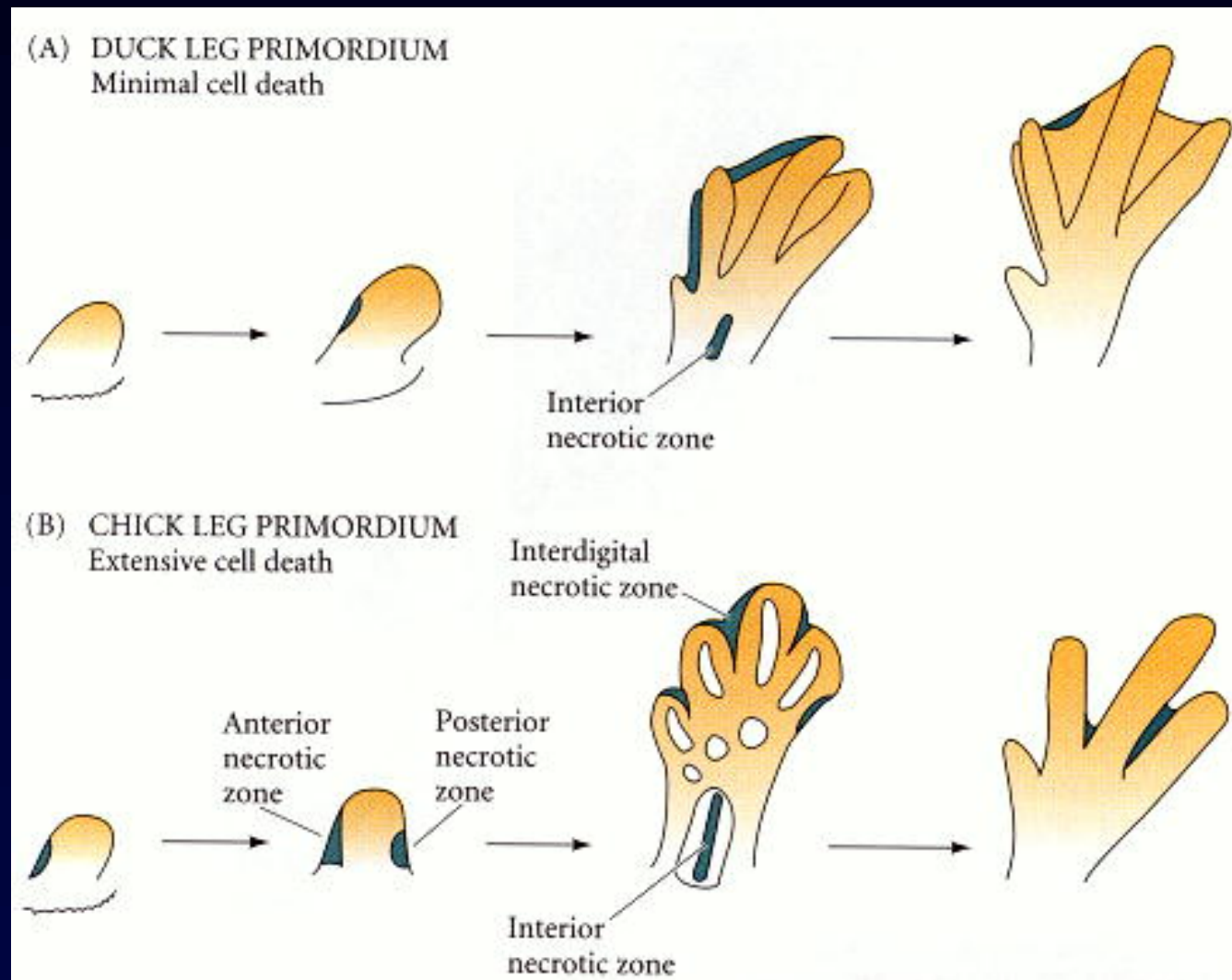
BMP

Gremlin

Apoptosis

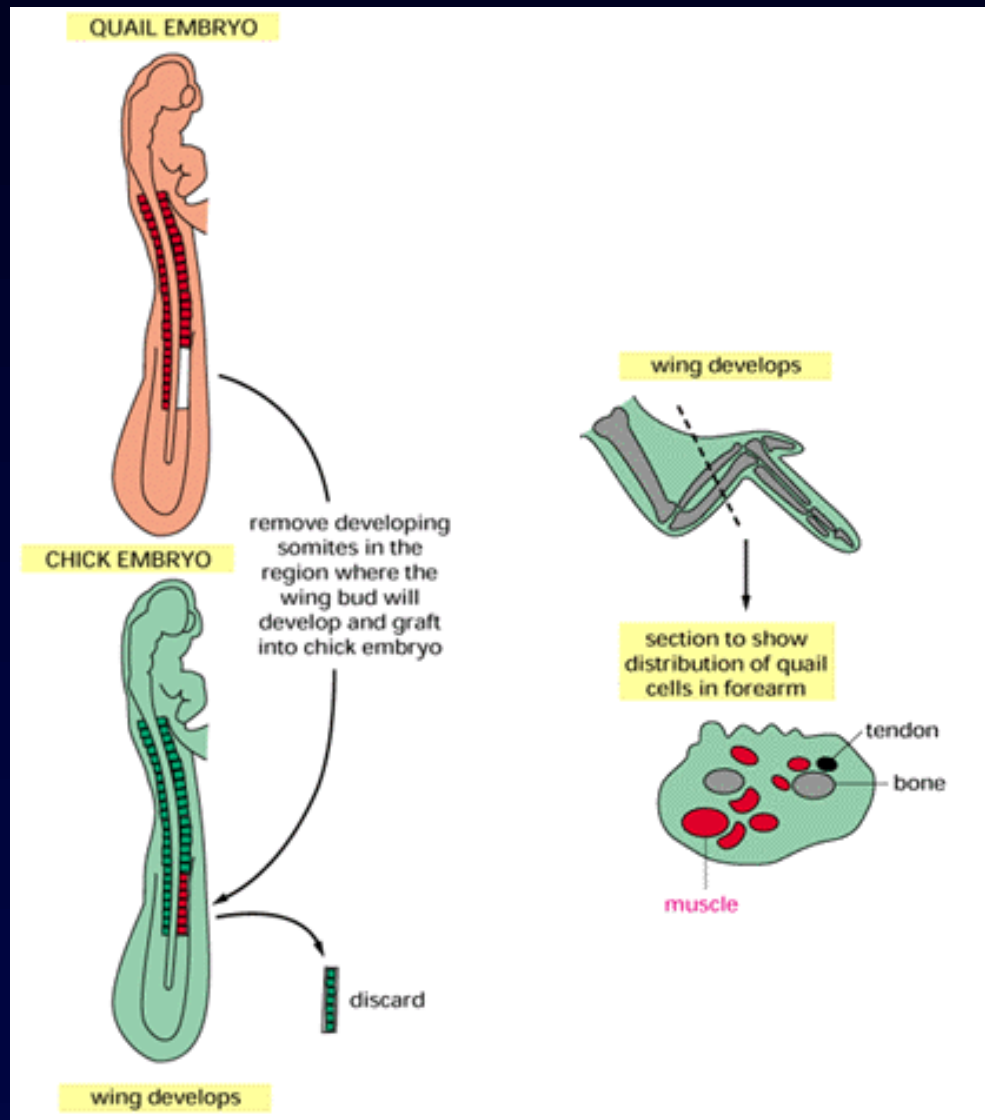
Newborn

Σχηματισμός δακτύλων



Για να σχηματιστούν τα δάκτυλα αλλά και να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των οστών και των αρθρώσεων μεσοδερμικά κυτταρα γίνονται αποπτωτικά. Αν κύτταρα που πρόκειται να πεθάνουν, μεταμοσχευθούν από έμβρυο κότας σε αντίστοιχη θέση σε έμβρυο πάπιας τότε δεν πεθαίνουν.

Οι μύες των άκρων



Οι μύες των άκρων προέρχονται από κύτταρα που μεταναστεύουν από τους σωμίτες. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν όταν εισέρχονται στην καταβολή *Hoxa11*, και αργότερα αυτά που εγκαθίστανται στο οπίσθιο τμήμα, *Hoxa13*.

Ωστόσο έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης από τα μεσεγχυματικά κύτταρα της καταβολής τα περιβάλλουν.

Η μετανάστευση επιτυγχάνεται μέσω του HGF που δρα χημειοτακτικά

ΚΟ του HGF ή του υποδοχέα του απουσία μυών