

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

Ανάπτυξης



Μάθημα 7:

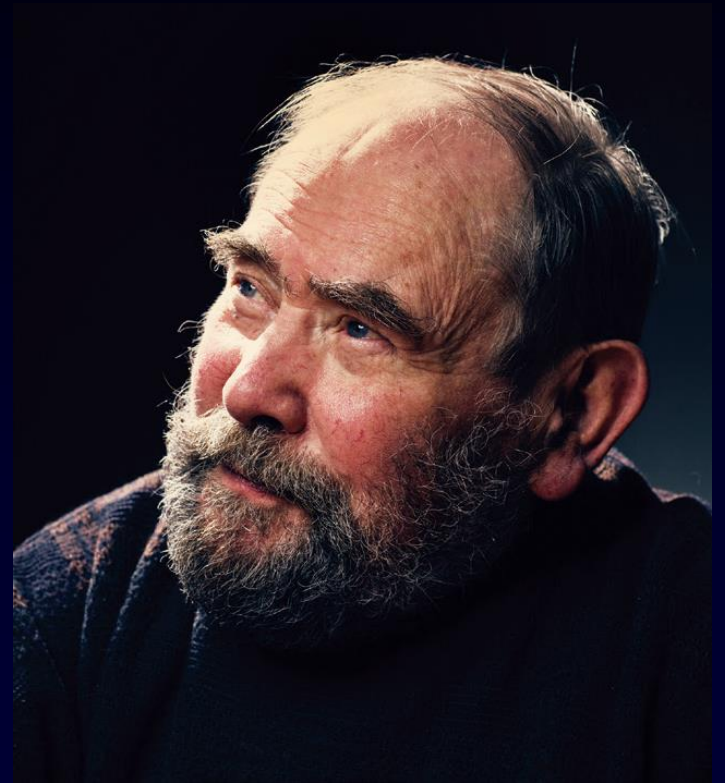
Ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans*



electrastyl@gmail.com

**«We think we have a good candidate in the form
of a small nematode worm»**

**Απόσπασμα από ερευνητική πρόταση του S.
Brenner προς το MRC, 1964**

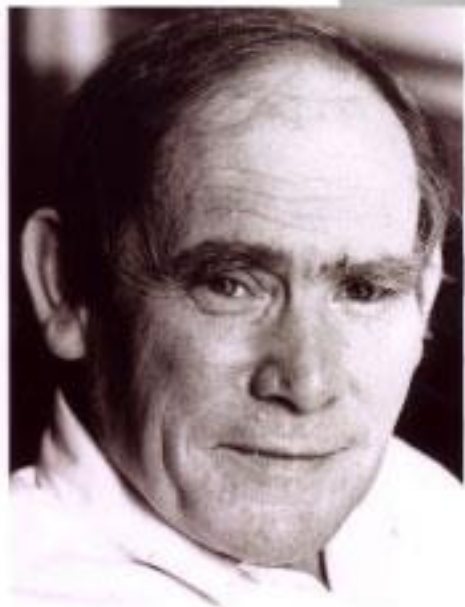
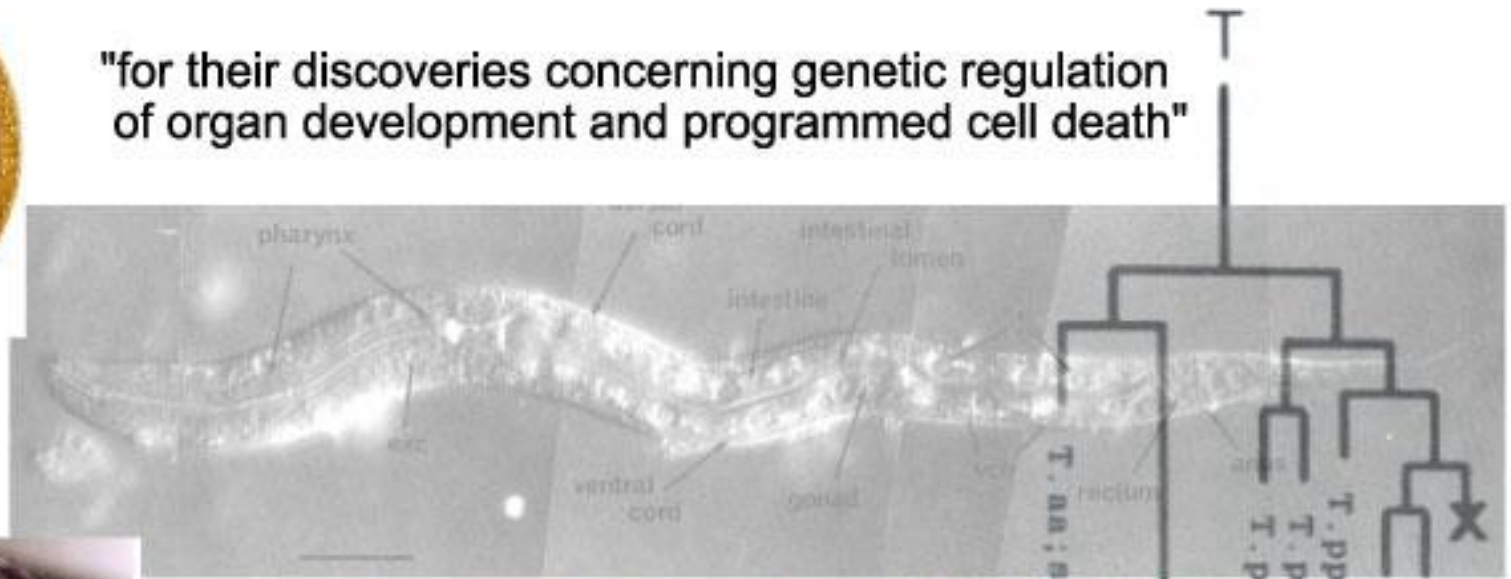


**Sydney Brenner
(1927-2019)**

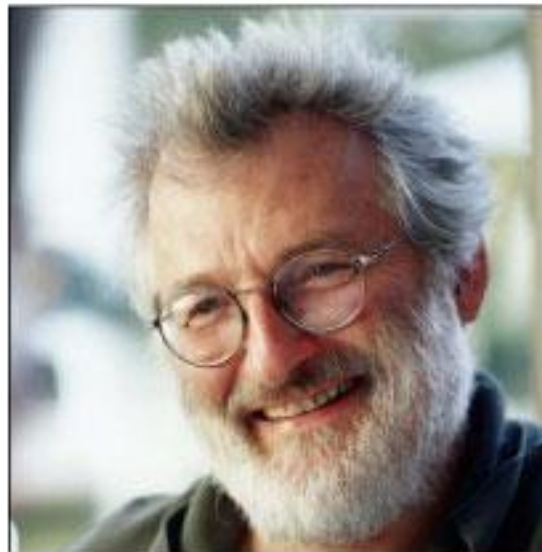
2002 Nobel Prize in Physiology or Medicine



"for their discoveries concerning genetic regulation of organ development and programmed cell death"



Sydney Brenner

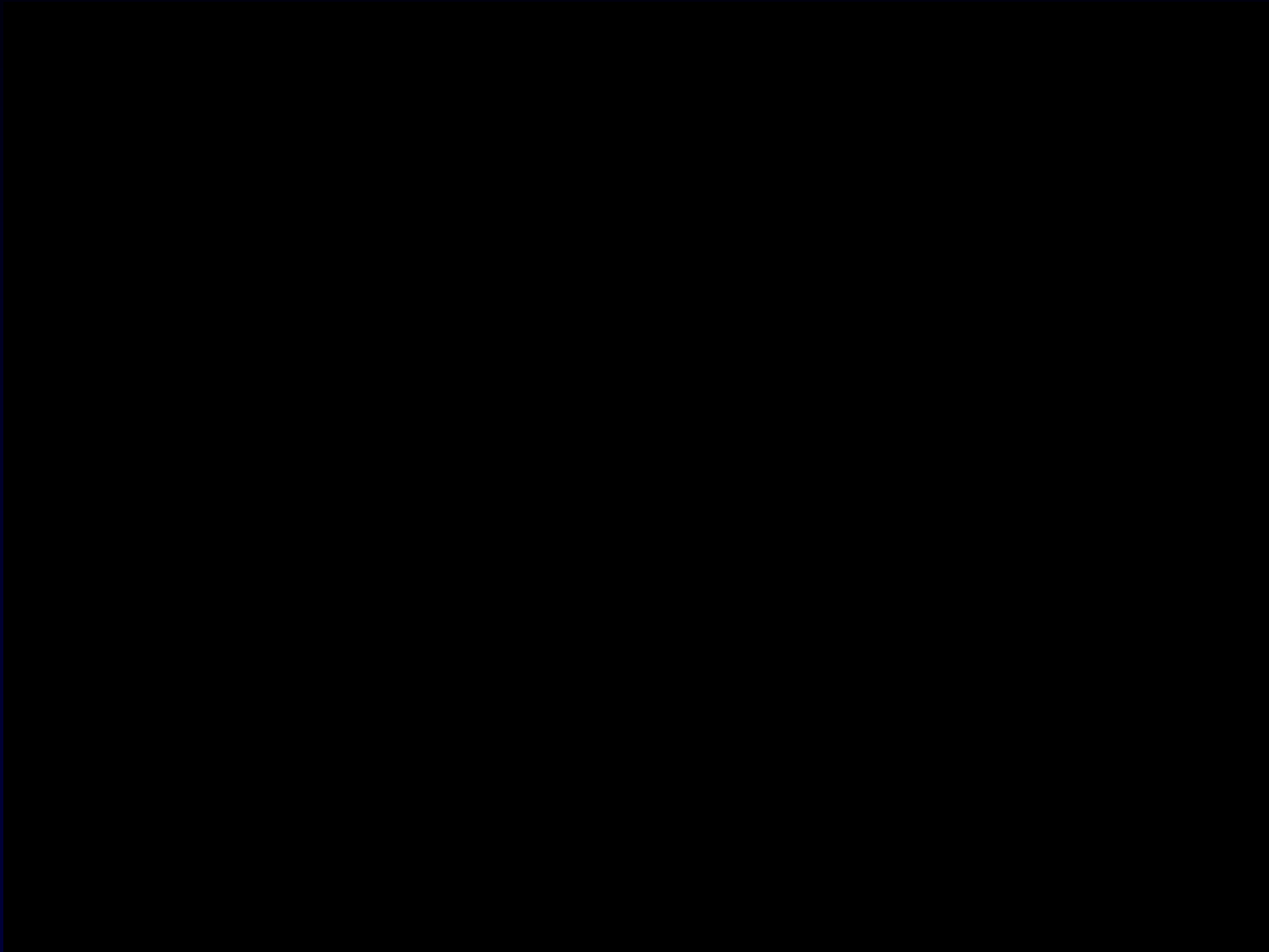


John Sulston



Bob Horvitz

T.pppap:8
T.pppaa:8

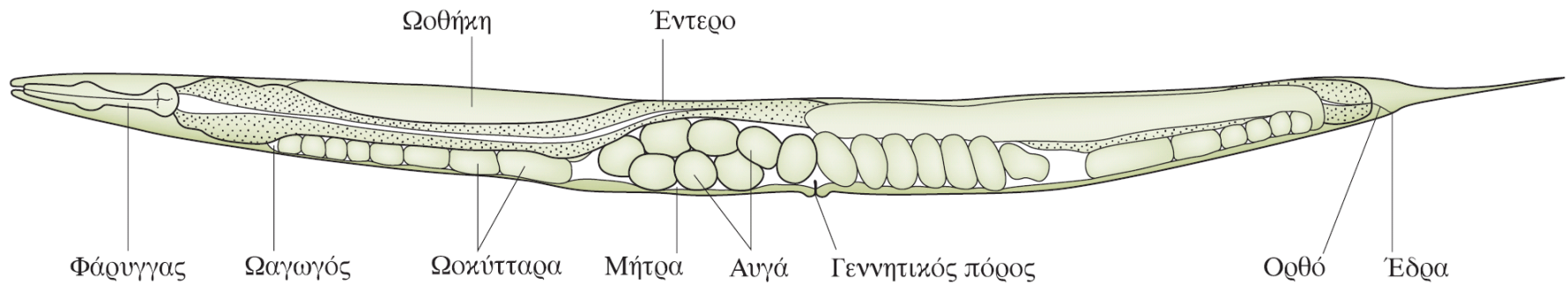


Ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans*

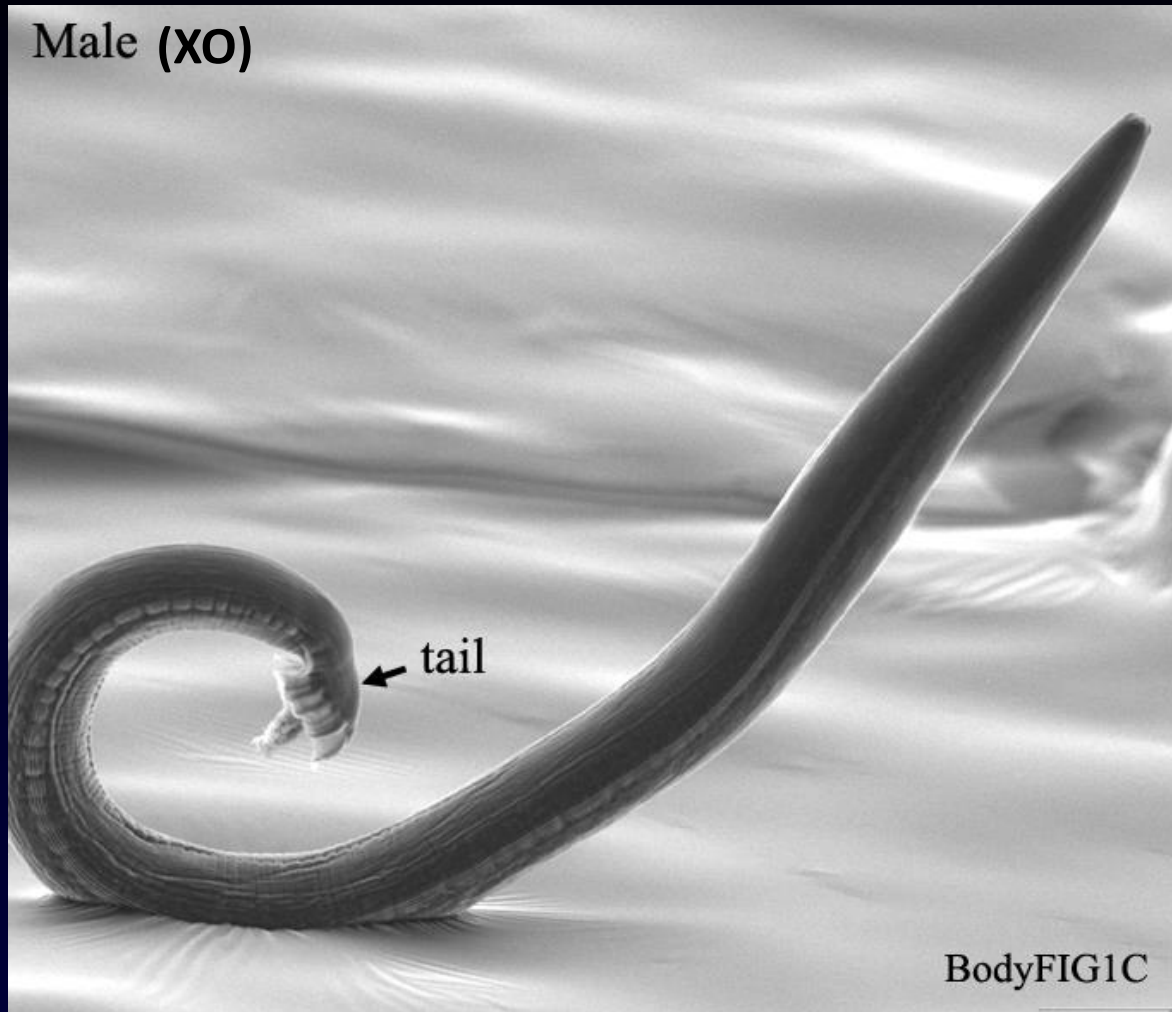


Ο *Caenorhabditis elegans*

- Νηματώδης - μήκος περίπου 1mm
- Ζει ελεύθερος στο έδαφος
- Τρέφεται με βακτήρια
- Συνήθως ερμαφρόδιτος
- Διπλοειδής, απλή οργάνωση



Ο αρσενικός *Caenorhabditis elegans*



Τα αρσενικά προκύπτουν όταν χαθεί αυθόρμητα ένα X κατά τη μείωση
Στη φύση με συχνότητα 1:700

O Caenorhabditis elegans

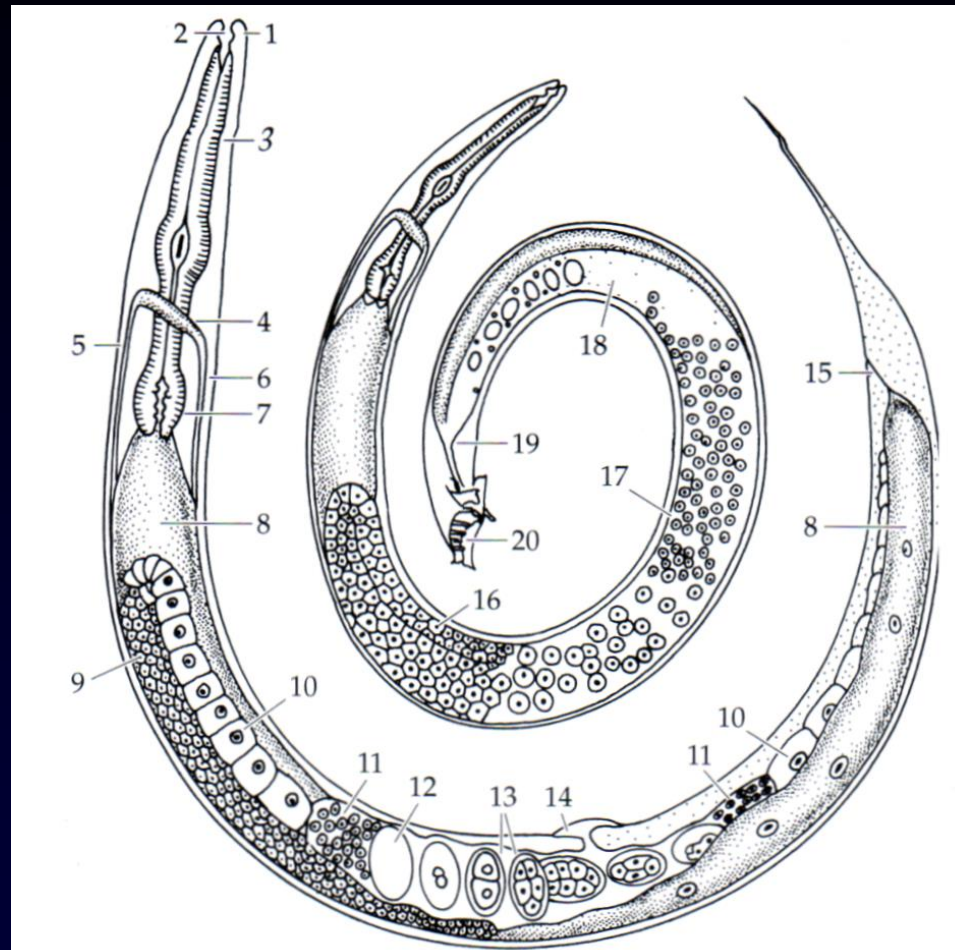
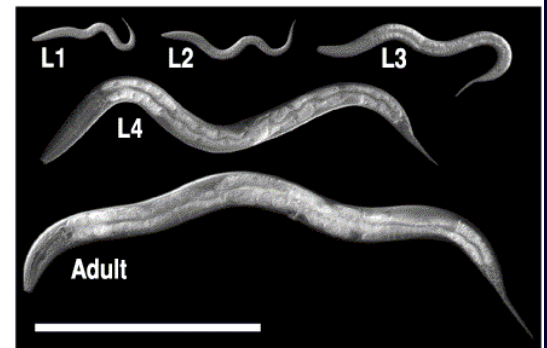
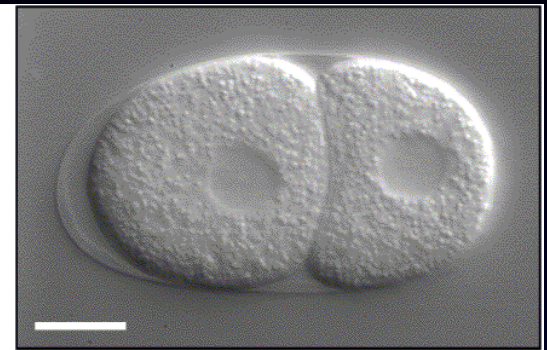
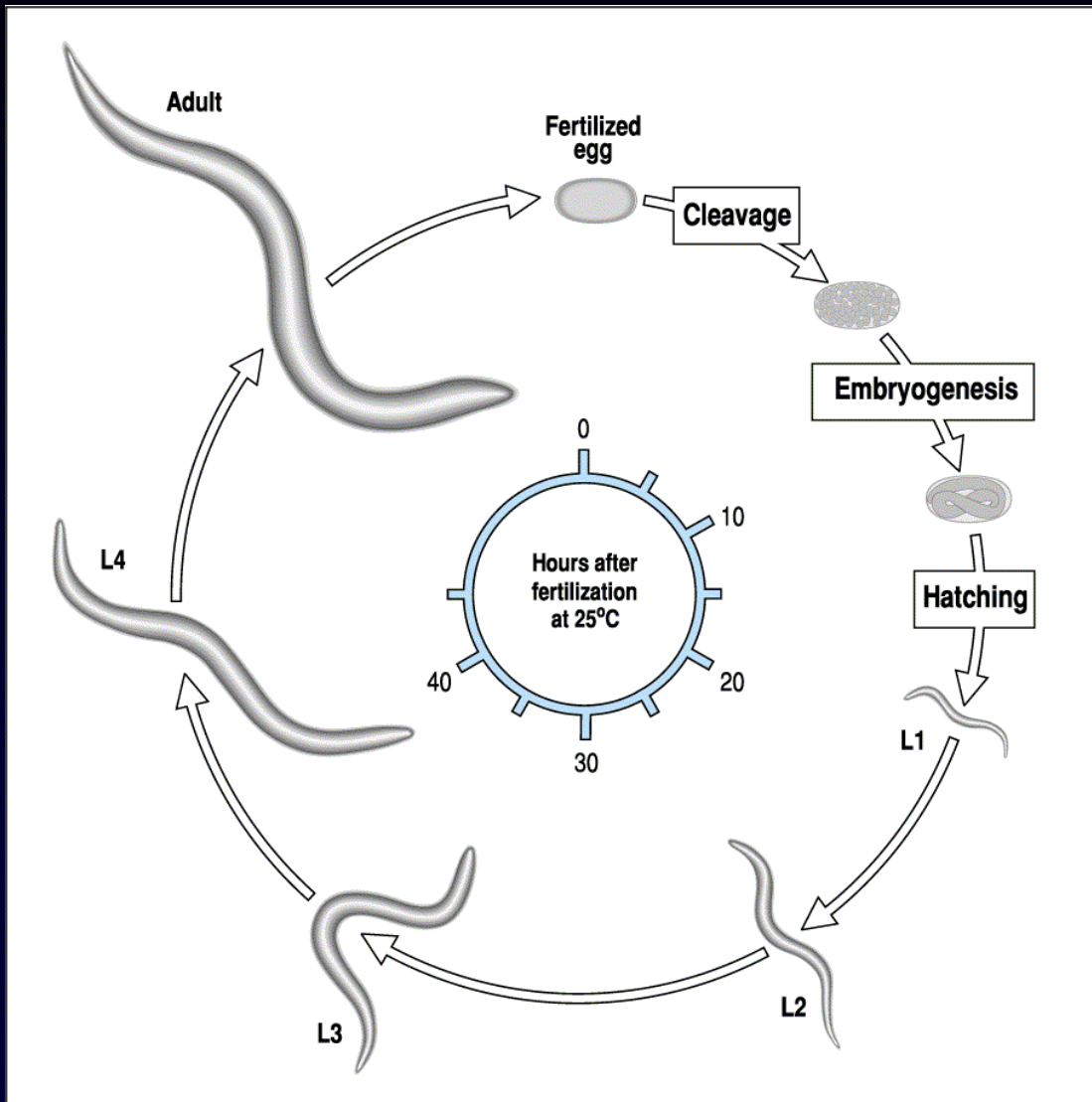


Figure 8.1 General anatomy of a nematode. Larger animal outside, female; smaller animal inside, male. 1, one of six lips; 2, mouth; 3, pharynx; 4, nerve ring; 5, dorsal nerve cord; 6, ventral nerve cord; 7, posterior pharynx bulb; 8, intestine; 9, oogonia; 10, oocytes; 11, sperm; 12, freshly fertilized egg; 13, early cleavage stages; 14, vulva; 15, anus; 16, spermatogonia; 17, sperm; 18, vas deferens; 19, cloaca; 20, copulatory bursa. (After Meglitsch and Schram 1991.)

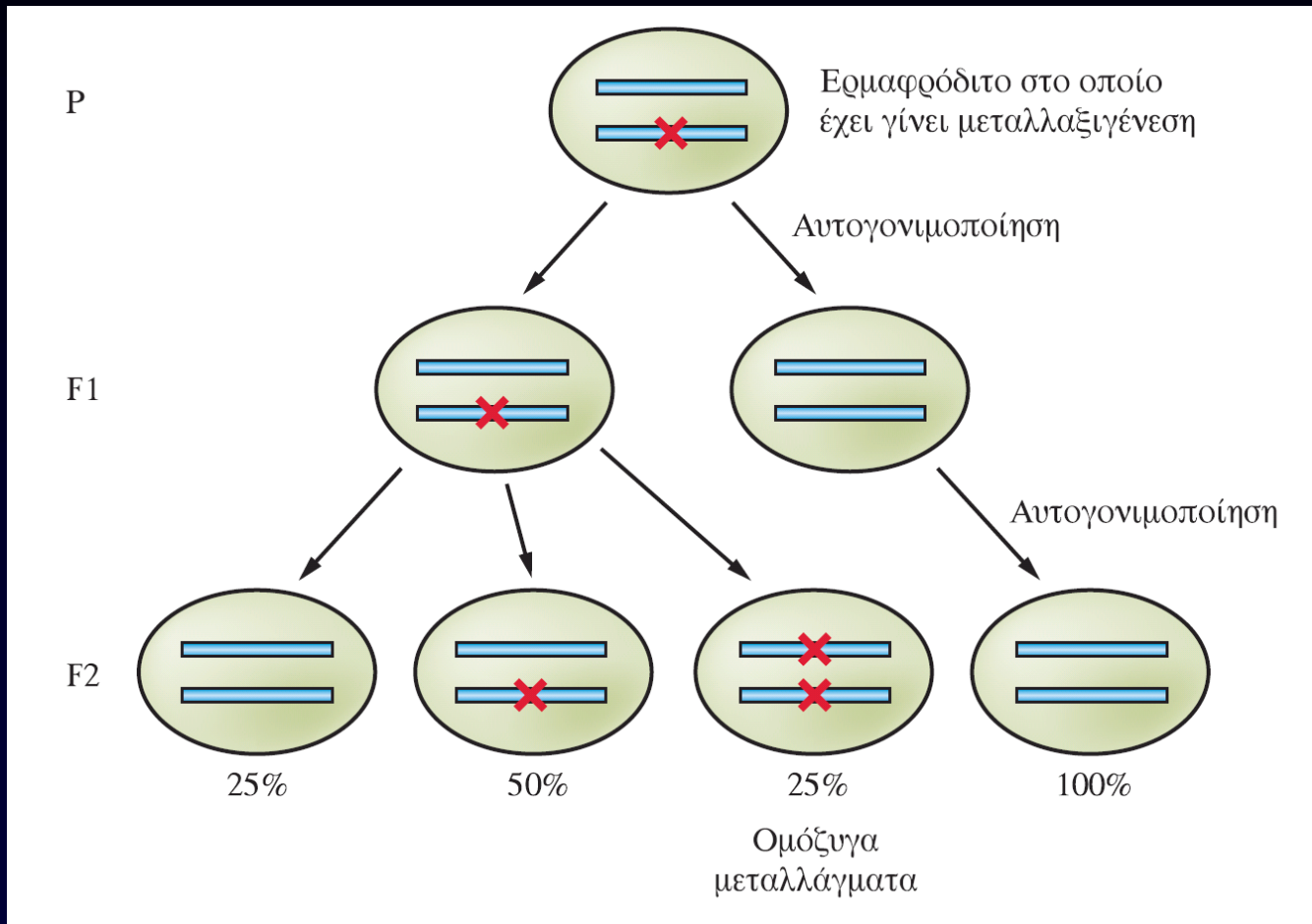
Κύκλος ζωής του *Caenorhabditis elegans*



Τα πλεονεκτήματα του *C. elegans*

- Σύντομη εμβρυογένεση (15 ώρες στους 20°C)
- Γενιά - 3 ημέρες
- Λίγοι κυτταρικοί τύποι
- Πολύ λίγα κύτταρα (959 το ώριμο άτομο, 558 η λάρβα)
- Όλο το γονιδίωμα γνωστό (πρώτο που χαρτογραφήθηκε-1998)
- Ομόλογα γονίδια με σπονδυλωτά και ασπόνδυλα
- Ερμαφρόδιτος - αυτογονιμοποίηση αλλά και διασταυρώσεις με αρσενικά άτομα - προσφέρεται για γενετική ανάλυση.

Πορεία μεταλλαξογένεσης στον *C. elegans*



Διαχωρισμός ομόζυγων ατόμων μετά από πείραμα μεταλλαξιγένεσης και δύο γενιές αυτογονιμοποίησης.

Τα πλεονεκτήματα του *C. elegans*

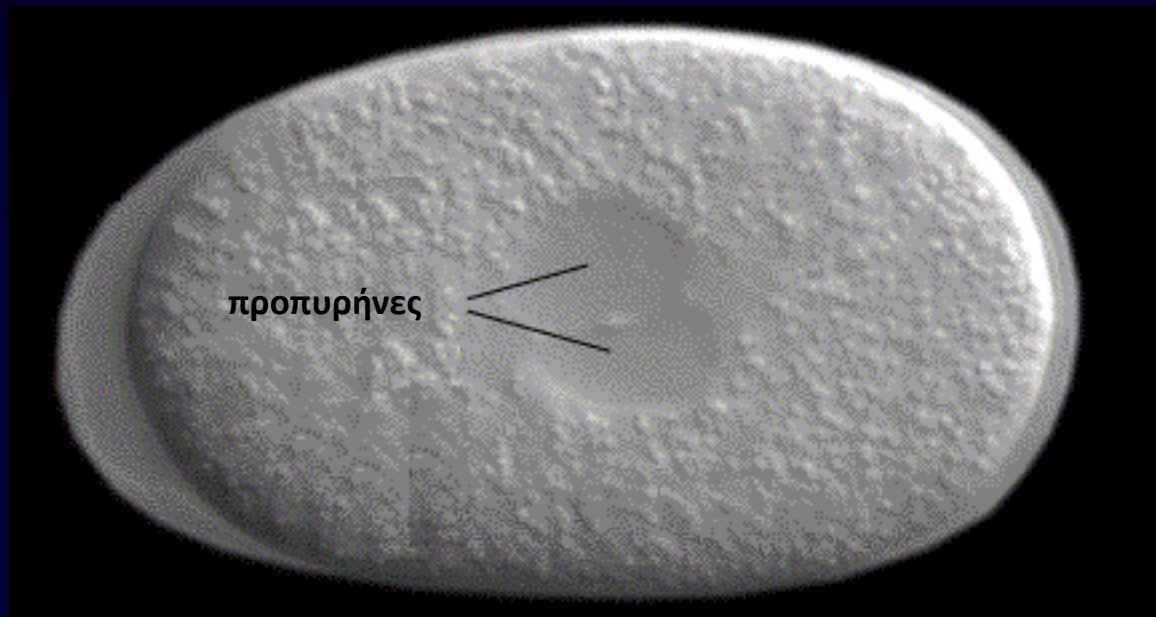
- Σύντομη εμβρυογένεση (15 ώρες- 20°C)
- Λίγοι κυτταρικοί τύποι.
- Γενιά - 3 ημέρες
- Πολύ λίγα κύτταρα (959 το ώριμο άτομο, 558 η λάρβα)
- Όλο το γονιδίωμα γνωστό (πρώτο που χαρτογραφήθηκε-1998)
- Ερμαφρόδιτος - αυτογονιμοποίηση αλλά και διασταυρώσεις με αρσενικά άτομα - προσφέρεται για γενετική.
- Ομόλογα γονίδια με σπονδυλωτά και ασπόνδυλα
- Η κυτταρική γενεαλογία γνωστή (διαφανής) (DIC-Nomarski).
- Η κυτταρική γενεαλογία επαναλαμβάνεται σχεδόν απaráλλακτη από το ένα άτομο στο άλλο.
- Στο εργαστήριο αναπτύσσεται σε τρυβλία Petri, τρέφεται με βακτήρια και οι προνύμφες πρώιμων σταδίων είναι δυνατόν να διατηρηθούν κατεψυγμένες.

Τα μειονεκτήματα του *C. elegans*

- Μικρό μέγεθος αυγών.
- Πολύ σκληρό κέλυφος.

επομένως

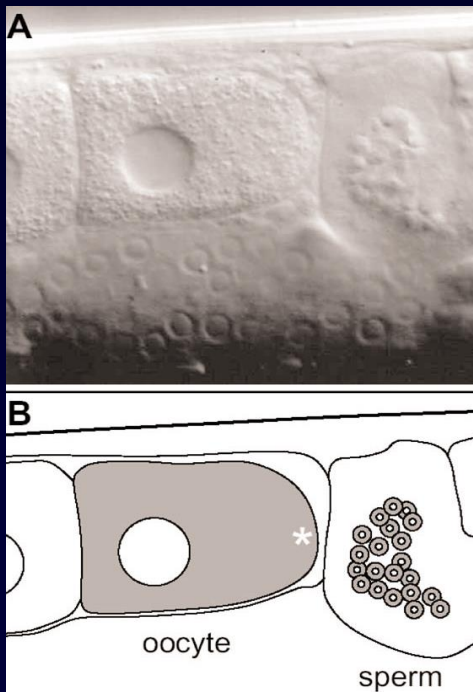
- Μικροχειρουργικά πειράματα δύσκολα.



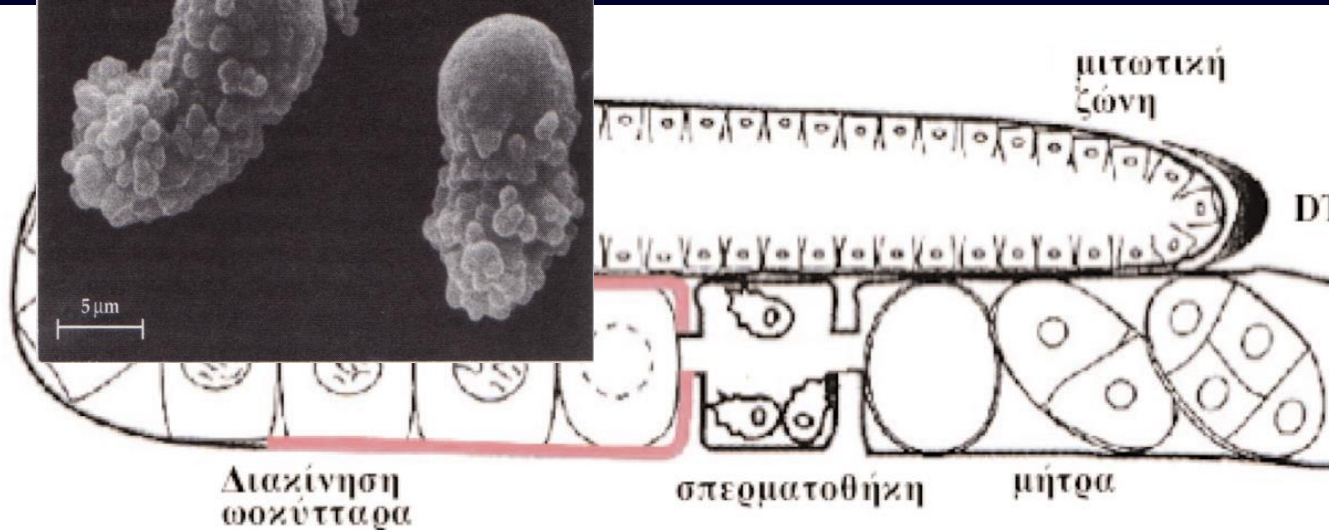
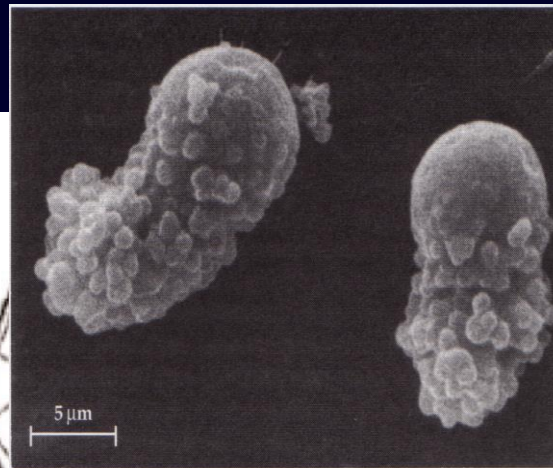
Η ανάπτυξη του *C. elegans*

Η γονιμοποίηση στον *C. elegans*

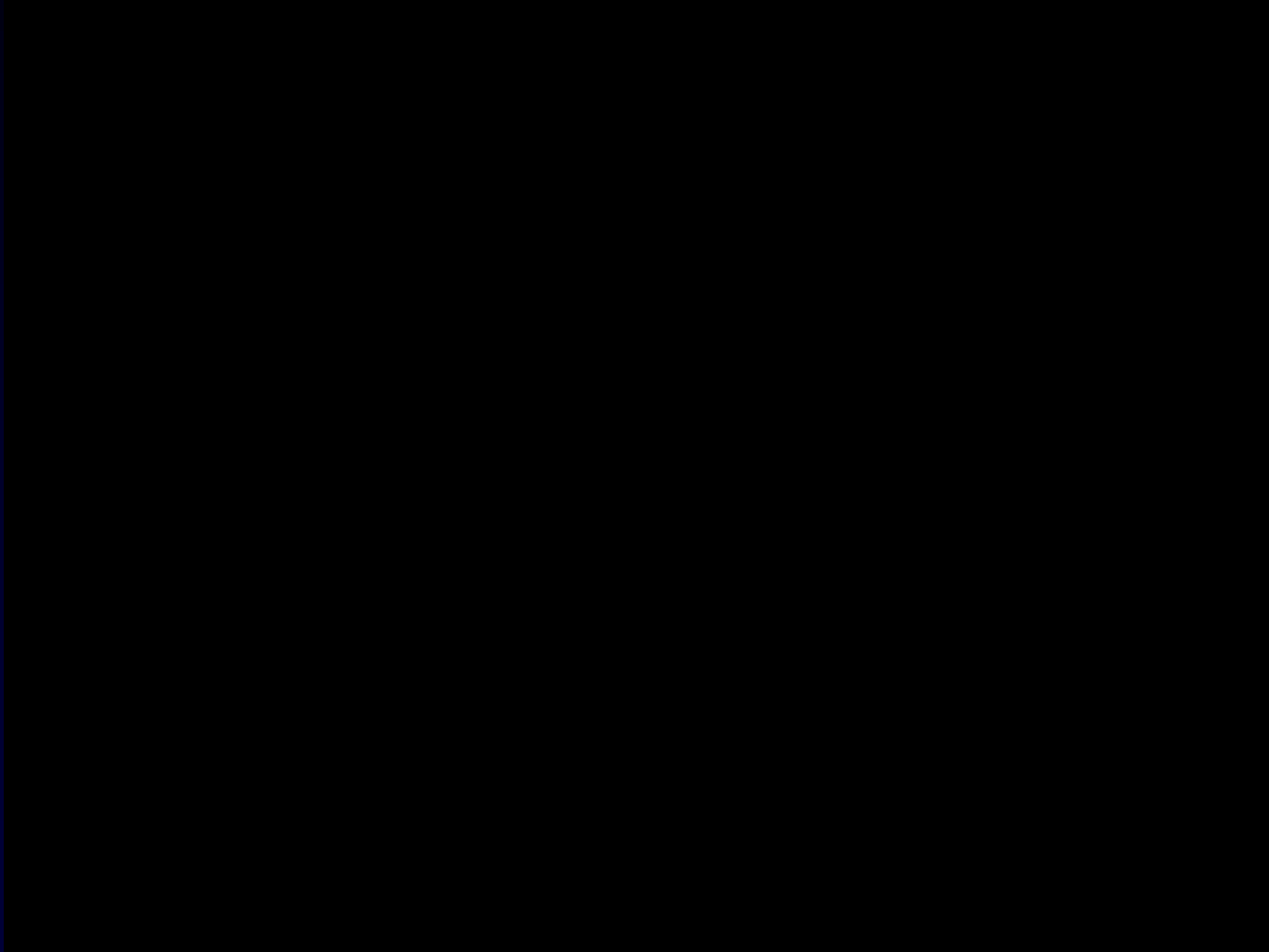
- Το αυγό δεν παρουσιάζει εμφανή ασυμμετρία.
- Με συσπάσεις της μήτρας τα ωάρια προωθούνται στη σπερματοθήκη.
- Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα καθώς τα ωάρια μετακινούνται προς τη μήτρα μέσω της σπερματοθήκης.
- Η γονιμοποίηση ακολουθείται από ενεργοποίηση του αυγού (ολοκλήρωση της μείωσης και σχηματισμό του κελύφους).
- Η είσοδος του σπερματοζωαρίου είναι **απαραίτητη** για την έναρξη της εμβρυογένεσης (ΜΤΟC, κεντροσωμάτιο και πρωτεΐνη (εc)).



Σπερματοζωάρια

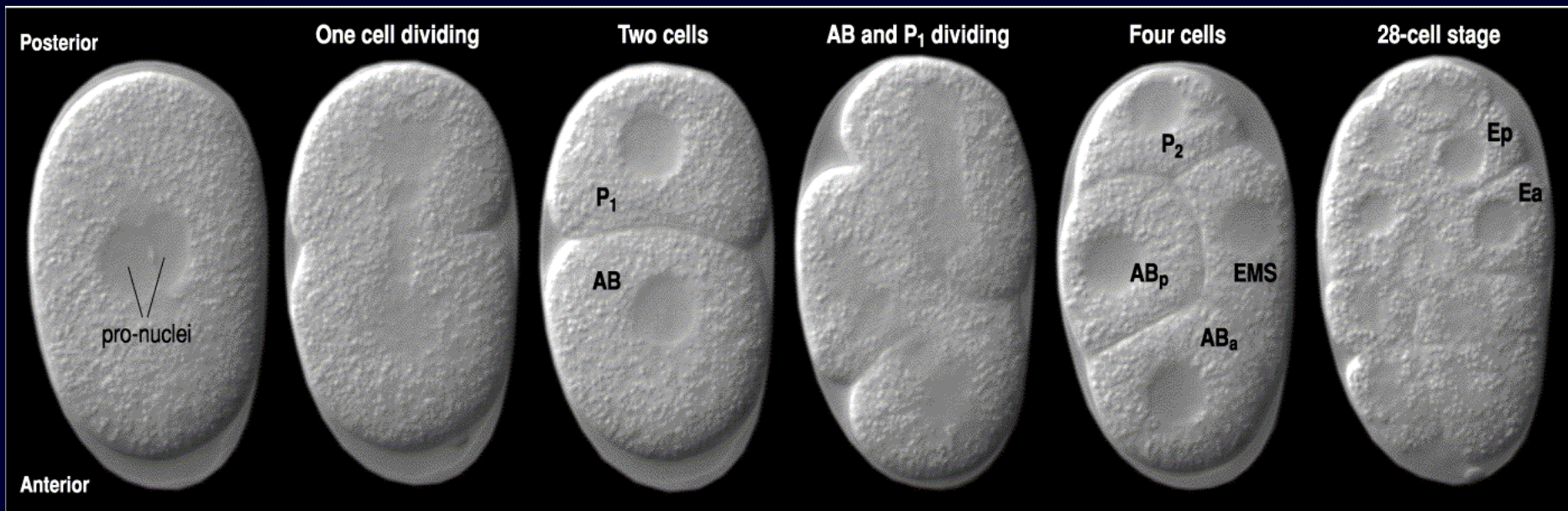


Η πρώτη αυλάκωση στον *C. elegans*

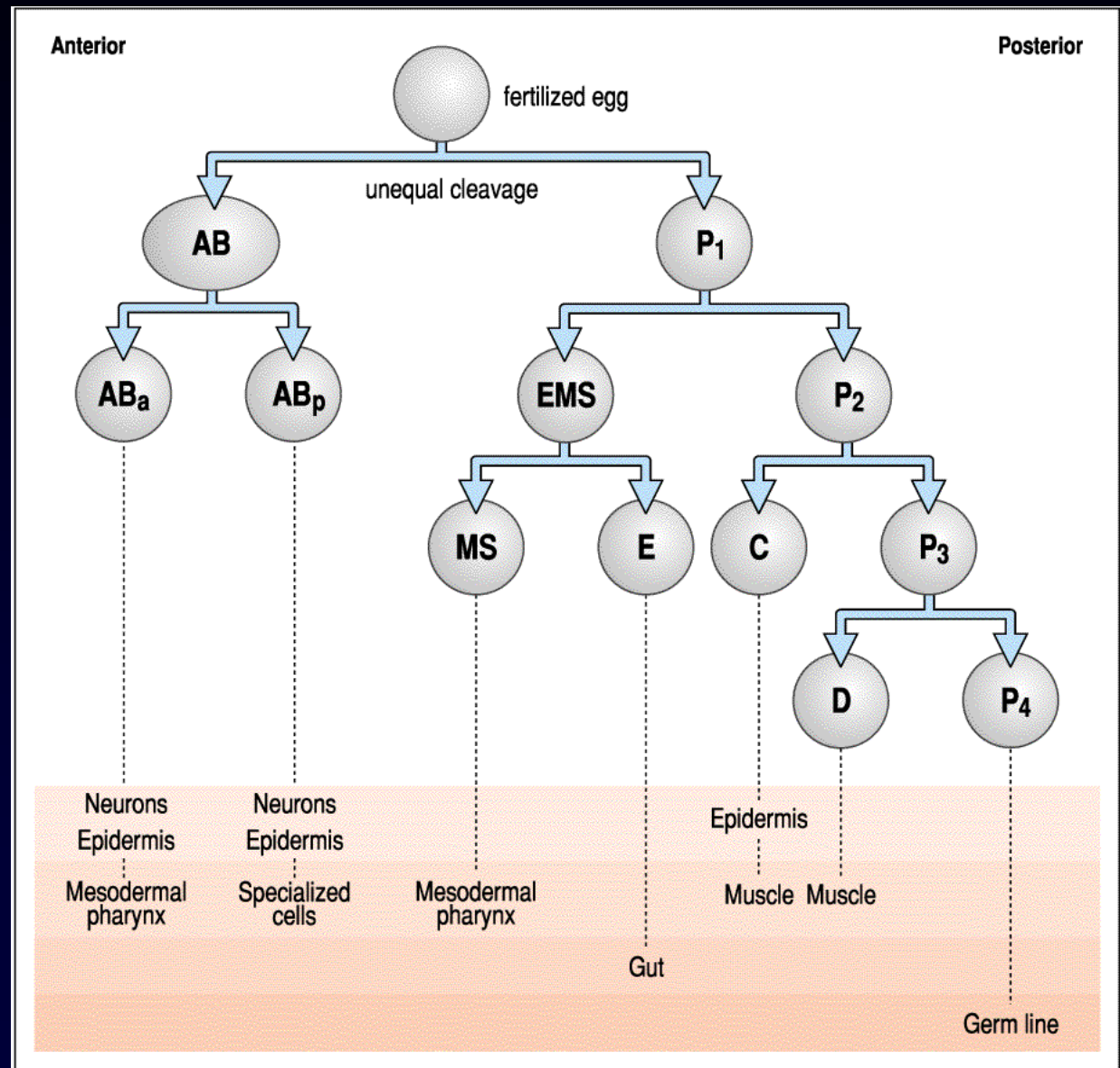
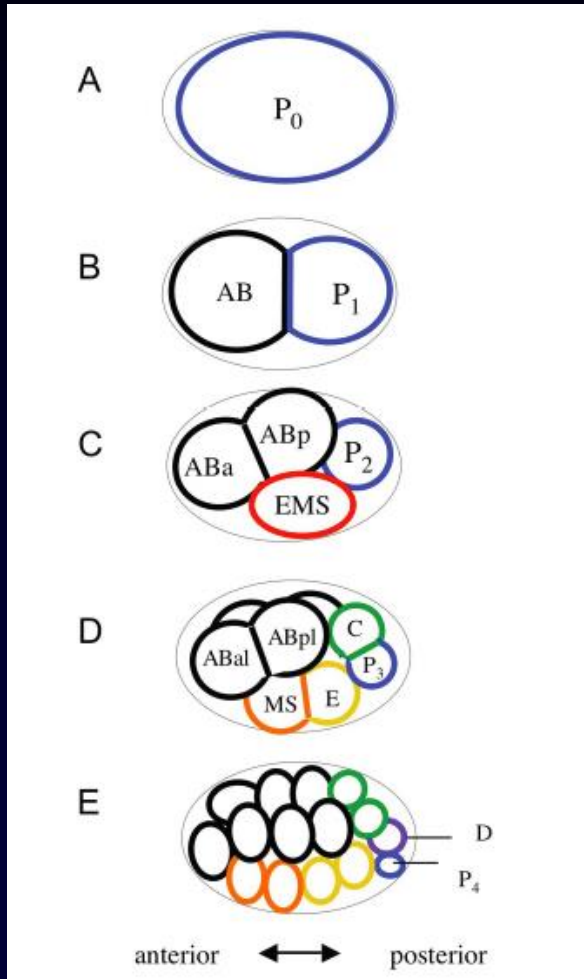


Η αυλάκωση στον *C. elegans*

- Ολοβλαστική αυλάκωση.
- Η πρώτη διαίρεση είναι ασύμμετρη η αύλακα σχηματίζεται κοντύτερα προς το οπίσθιο άκρο και δημιουργούνται δυο κύτταρα το AB και το P₁.
- Οι αυλακωτικές διαιρέσεις είναι ασύμμετρες – στις διαιρέσεις της πρώϊμης αυλάκωσης σχηματίζονται ένα ιδρυτικό κύτταρο (founder cells-AB,MS,E,D,C) και ένα βλαστικό κύτταρο (stem cells P₁-P₄). Από κάθε ιδρυτικό κύτταρο παράγονται διαφοροποιημένα κύτταρα.
- Ψευδοαυλάκωση



Κυτταρική γενεαλογία (cell lineage) σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του *C. elegans*

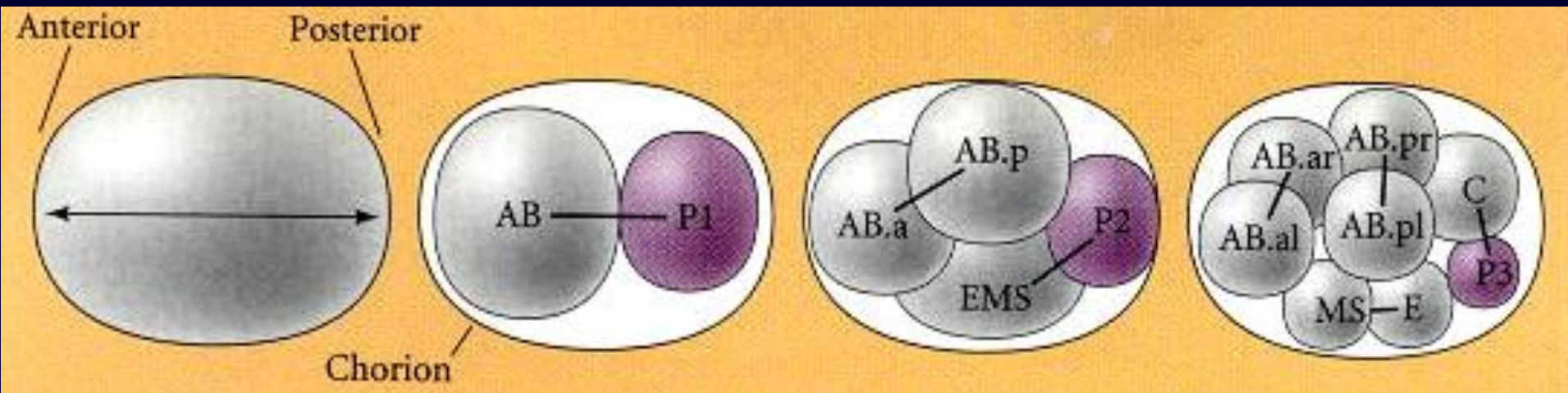


Πώς ονομάζουμε τα κύτταρα του *C. elegans*

Πολλές φορές τα κύτταρα στον *C. elegans* τα ονομάζουμε με βάση τη θέση τους ως προς τα αδελφικά τους κύτταρα.

π.χ. AB.a1= το κύτταρο που έχει προέλθει από τη διαίρεση του AB.a και βρίσκεται αριστερά.

Το AB.a προέρχεται από τη διαίρεση του AB και είναι το κύτταρο που βρίσκεται πλησιέστερα στο εμπρόσθιο άκρο του εμβρύου.



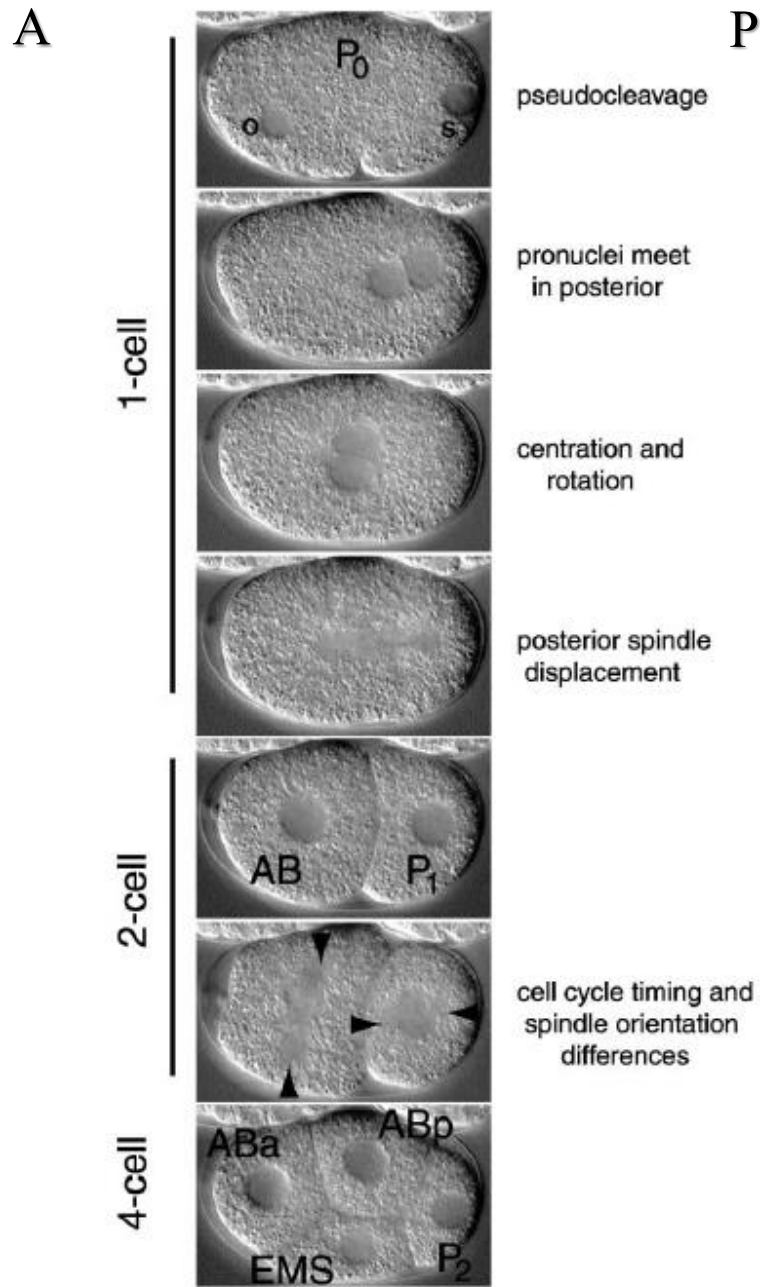
Η αυλάκωση στον *C. elegans*

Time Elapsed: 00:00:37

Focal plane: 6

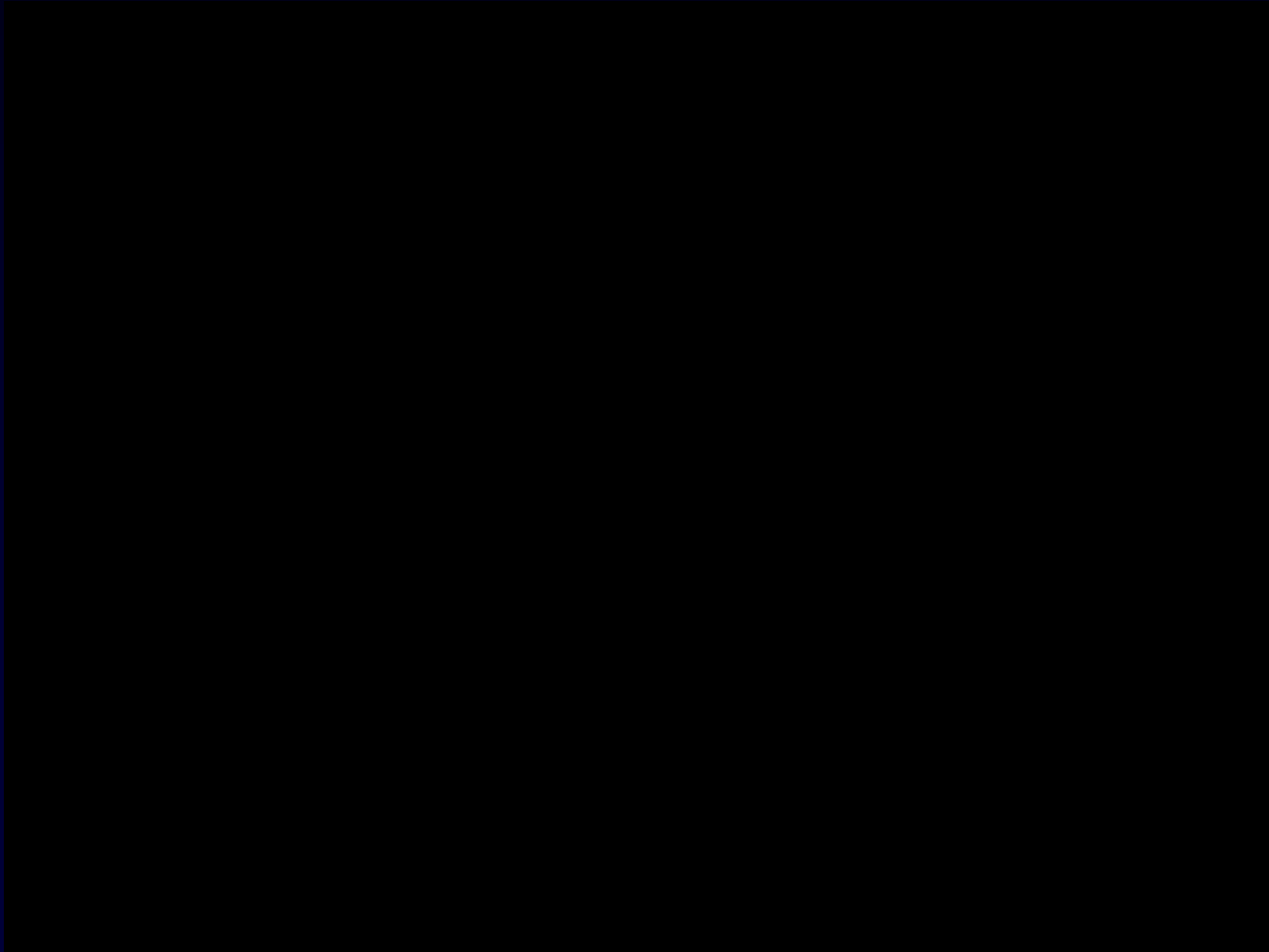


Η αυλάκωση στον *C. elegans*

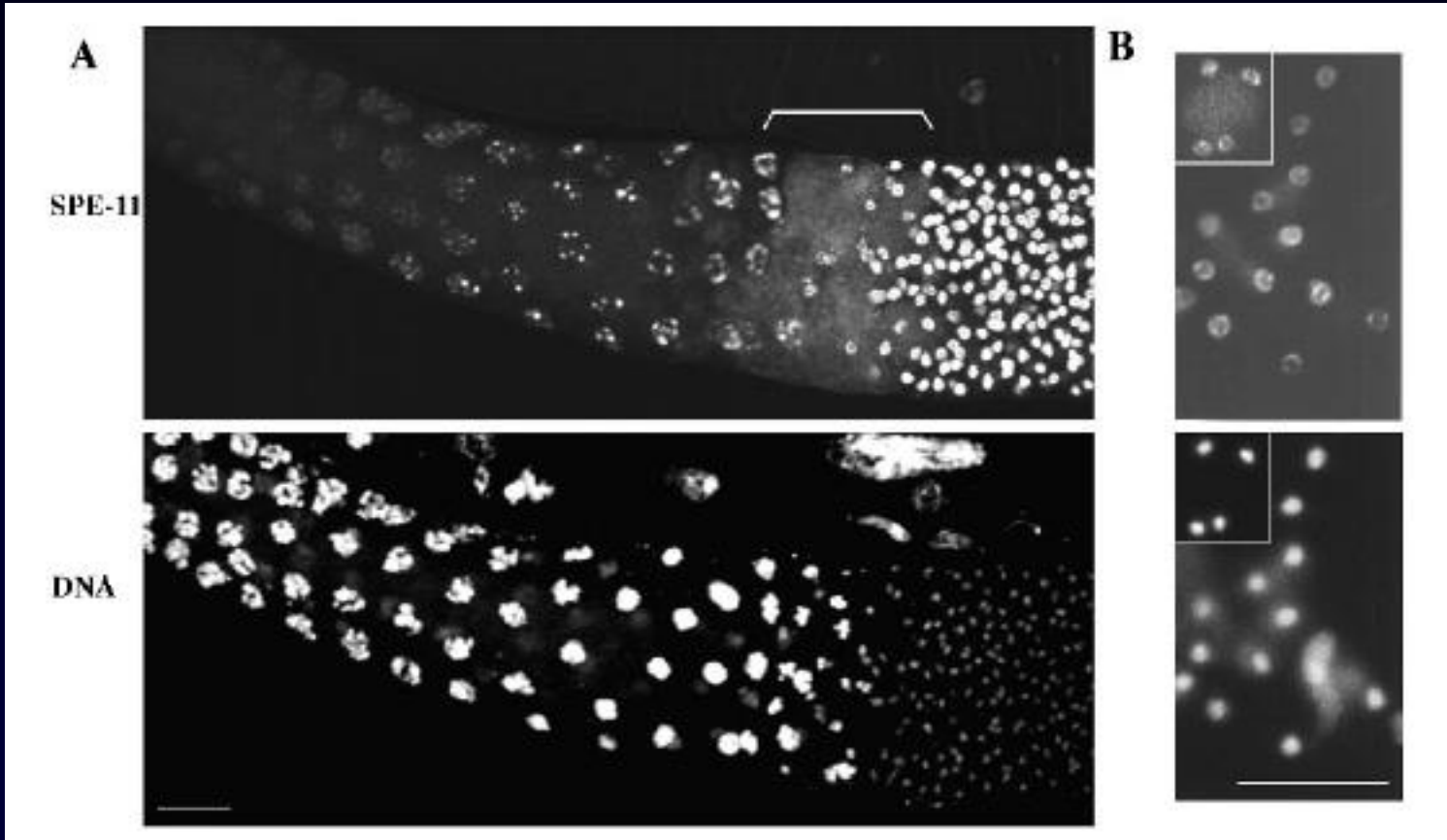


- Κατά τη δεύτερη διαίρεση το AB διαιρείται ισημερινά (κάθετα στον εμπροσθοπίσθιο άξονα) ενώ το P₁ μεσημβρινά = περιστροφική αυλάκωση.
- Από το AB προκύπτουν τα ABa και ABp, (a: anterior, p: posterior) ενώ από το P₁ το EMS και το P₂.
- Τα βλαστικά κύτταρα διαιρούνται πάντα μεσημβρινά και από κάθε διαίρεση προκύπτει ένα ιδρυτικό κύτταρο εμπρόσθια και ένα βλαστικό κύτταρο οπίσθια.

**Προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται προκειμένου να αποδειχθεί
ότι ένα μόριο πράγματι ενέχεται σε μια συγκεκριμένη αναπτυξιακή
διαδικασία
Find it-loose it-move it**



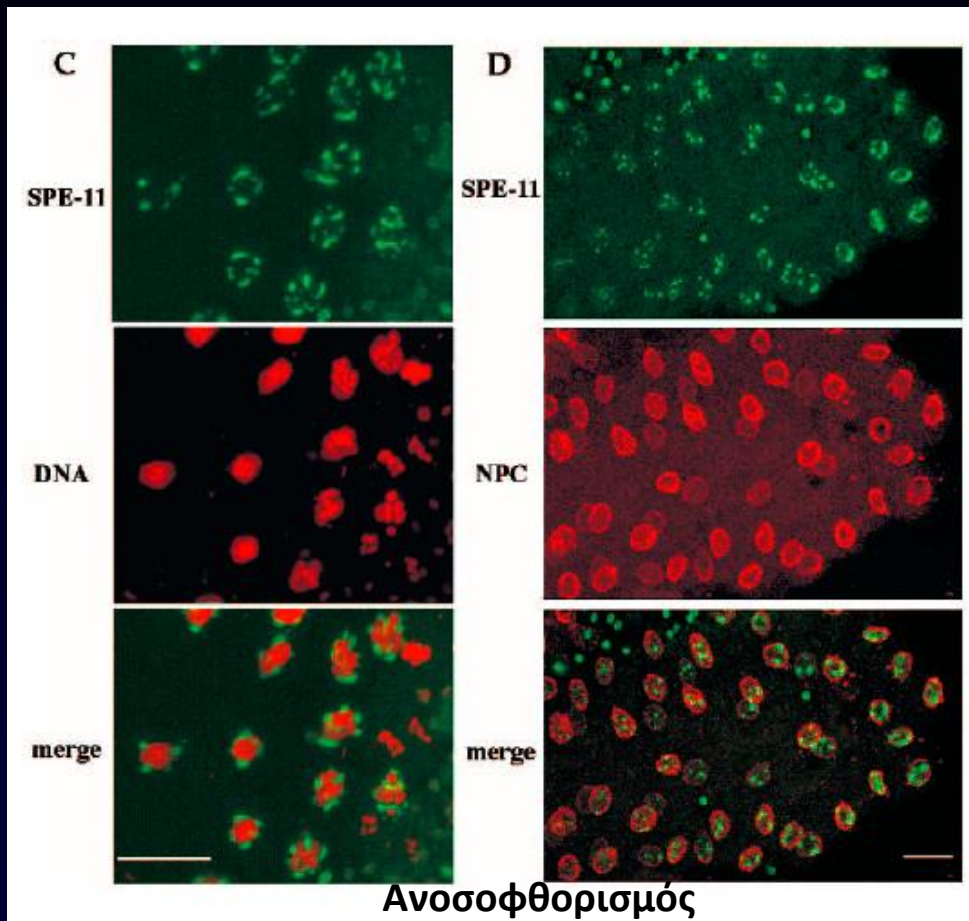
Τα έμβρυα που προέρχονται από γονιμοποίηση με σπερματοζωάρια μεταλλαγμάτων *spe-11* δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά



Εντοπισμός
Έκφραση
Αναστολή

Μεταλλάξεις πατρικής επίδρασης

Μεταλλάξεις πατρικής επίδρασης



Η SPE-11:

- Πυρηνική πρωτεΐνη, λειτουργία?
- Εκφράζεται κατά τη σπερματογένεση και την πρόιμη ανάπτυξη.
- Έμβρυα από σπερματοζωάρια *spe-11* διασώζονται αν τα ωάρια εκφράζουν **εκτοπικά** την SPE-11.
- Δεν αποτελεί στοιχείο του κεντροσωματίου.

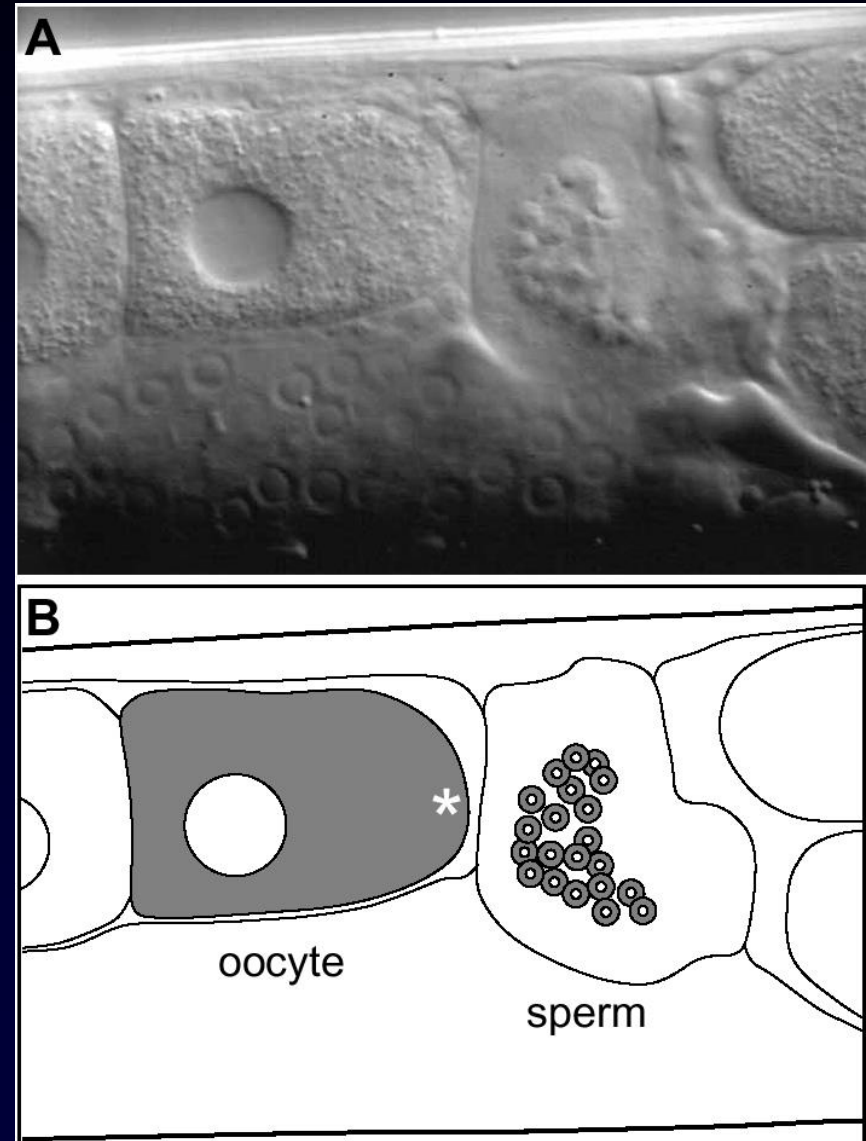
Τα σπερματοζωάρια του *C. elegans* είναι πολύ μικρά σε σχέση με τα ωάρια (1%v/v). Για ποιο λόγο μια πρωτεΐνη να εκφράζεται σε αυτά και όχι στα ωάρια;

Προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται προκειμένου να αποδειχθεί ότι ένα μόριο πράγματι ενέχεται σε μια συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία

- Έκφραση- δράση (προβλεπόμενος ρόλος)
- Αναστολή
- Εκτοπική έκφραση ή/και Υπερέκφραση

Ο σχηματισμός του εμπροσθοπίσθιου άξονα στον *C. elegans*

- Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας σχηματίζεται στη μακριά διάσταση του ωαρίου
- Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας δεν είναι καθορισμένος πριν από τη γονιμοποίηση.
- Το άκρο που βρίσκεται πλησιέστερα στο σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου (point of sperm entry) γίνεται το μελλοντικό οπίσθιο άκρο του εμβρύου.
- Πώς μπορούμε να το αποδείξουμε?



Ο σχηματισμός του εμπροσθοπίσθιου άξονα στον *C. elegans*

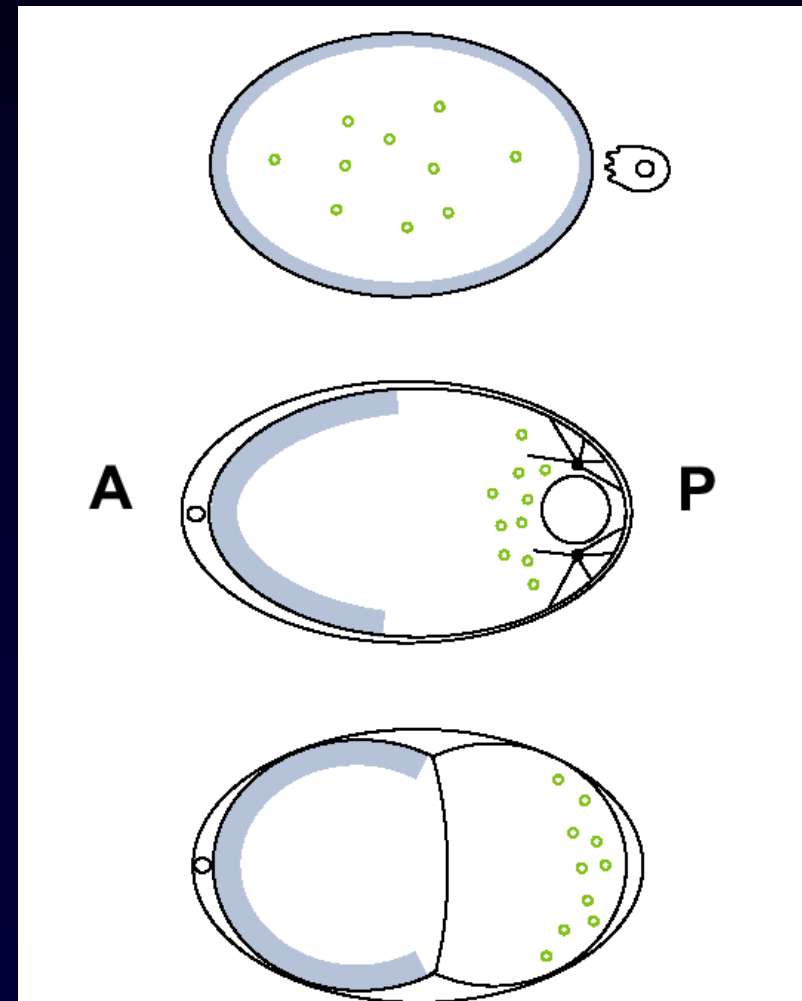
Η είσοδος του σπερματοζωαρίου ακολουθείται από το σχηματισμό ενός κυτταροπλασματικού ρεύματος το οποίο φαίνεται ότι κατανέμει ασύμμετρα στο ζυγωτό διάφορα μόρια ή συμπλέγματα μορίων.

Περιφερειακό κυτταρόπλασμα - ΕΠ

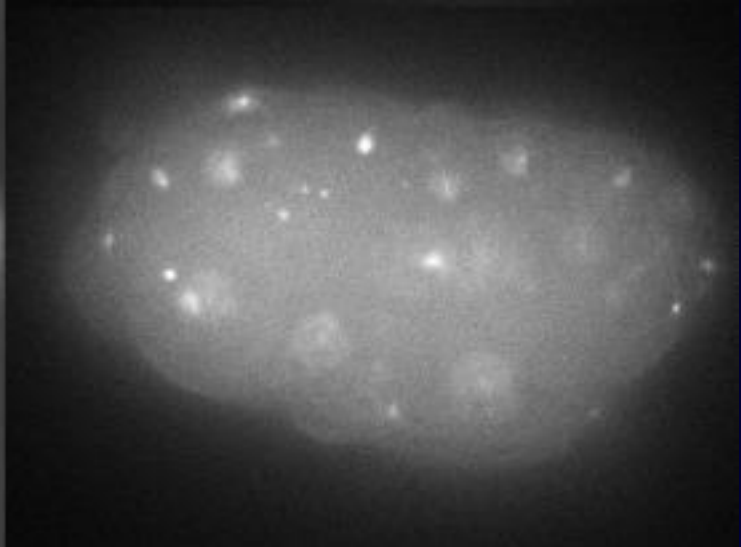
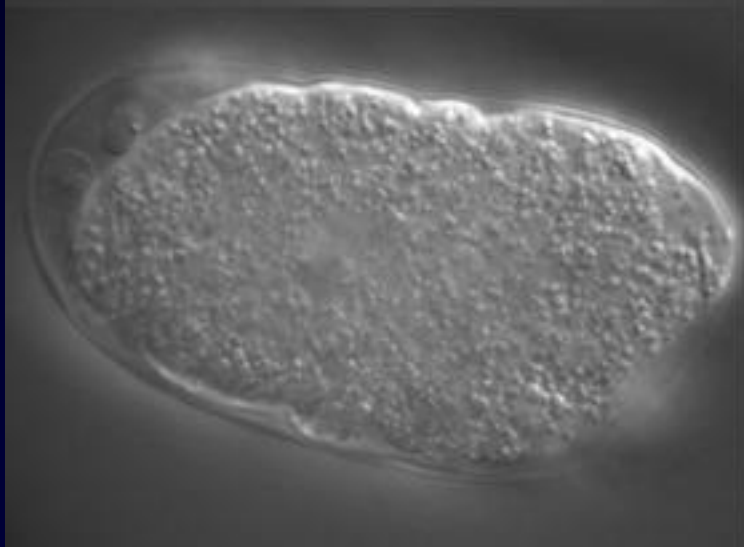
Κεντρικό κυτταρόπλασμα- ΟΠ

Συμμετέχουν:

- Μικροϊνίδια στην αναδιοργάνωση και στο σχηματισμό της ατράκτου. (κυτοχλασίνη)
- Στη διαδικασία ενέχεται και το κεντριόλιο του σπερματοζωαρίου καθώς οργανώνει μικροσωληνίσκους.



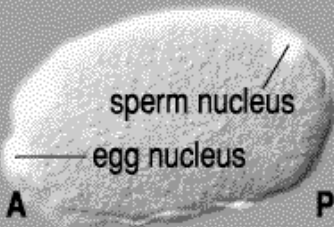
Τα κοκκία Ρ



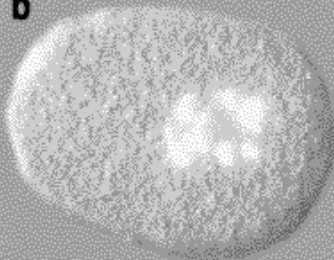
Chromosomes

P granules

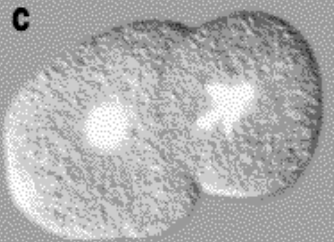
a



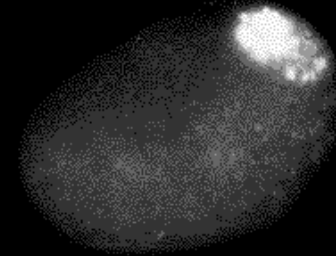
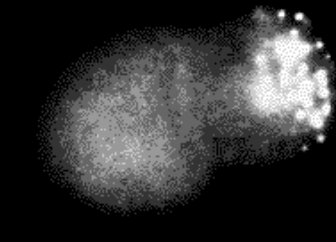
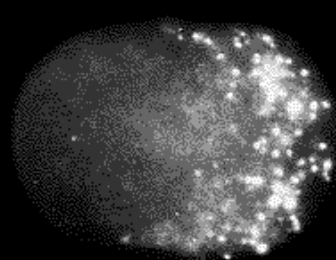
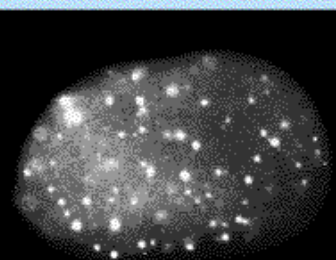
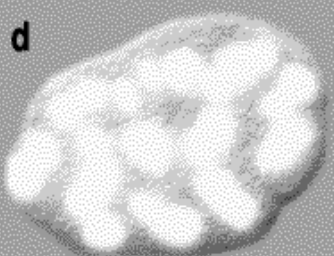
b



c



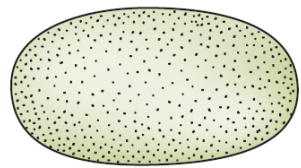
d



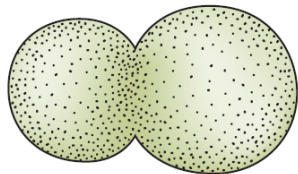
Τα κοκκία P

- Ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία κατανέμονται ασύμμετρα μετά τη γονιμοποίηση.
- Περιέχουν RNA-ελικάσες, πολυμεράσες πολυ-Α, παράγοντες έναρξης της μετάφρασης κ.α.
- Μετά από κάθε διαίρεση παραμένουν στο βλαστικό κύτταρο.
- Κυτοχλασίνη D αναστέλλει τη μετακίνηση των κοκκίων P.
- Συμμετοχή μικροϊνιδίων.

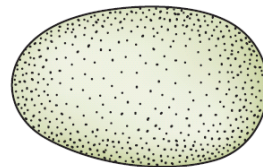
Η μεταγραφή των ζυγωτικών γονιδίων ξεκινά στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων όμως γονίδια μητρικής επίδρασης (περίπου 100) ελέγχουν την ανάπτυξη μέχρι την έναρξη της γαστριδίωσης (28 κύτταρα)



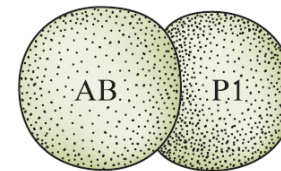
Προπυρήνες



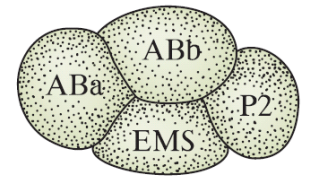
Ψευδοαυλάκωση



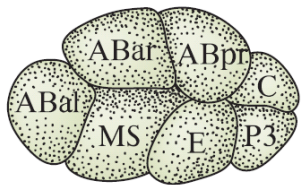
Ζυγωτό



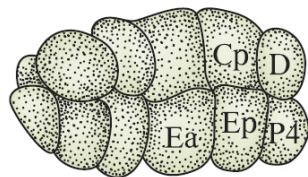
2 κύτταρα



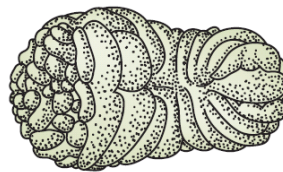
4 κύτταρα



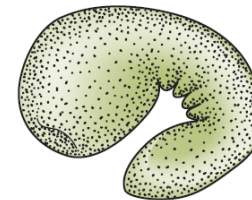
8 κύτταρα



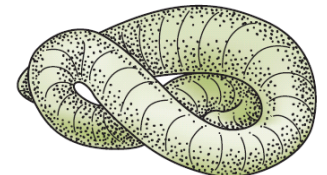
Πρώμο γαστρίδιο



Comma

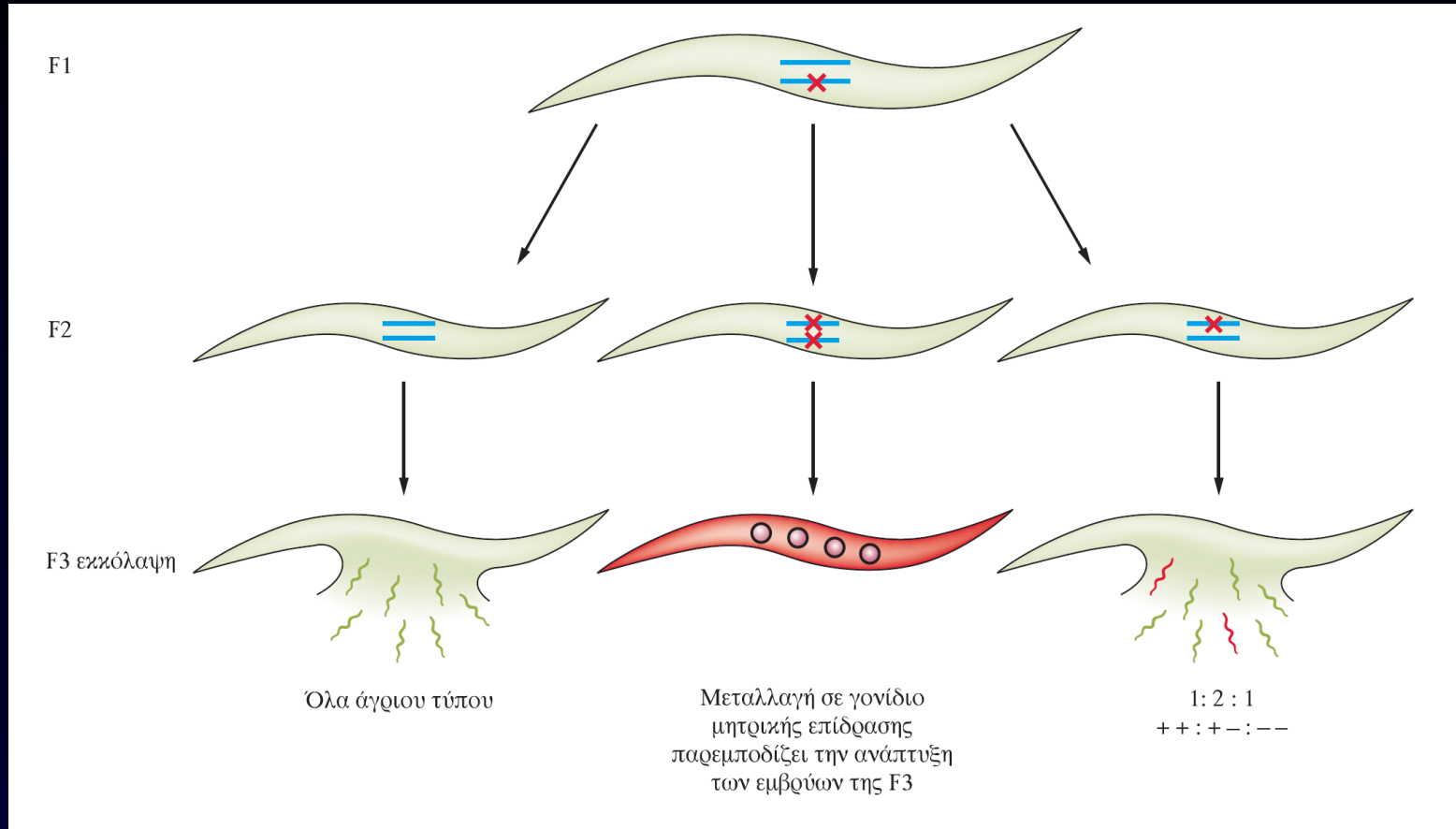


Πρώιμη επιμήκυνση



Όψιμη επιμήκυνση

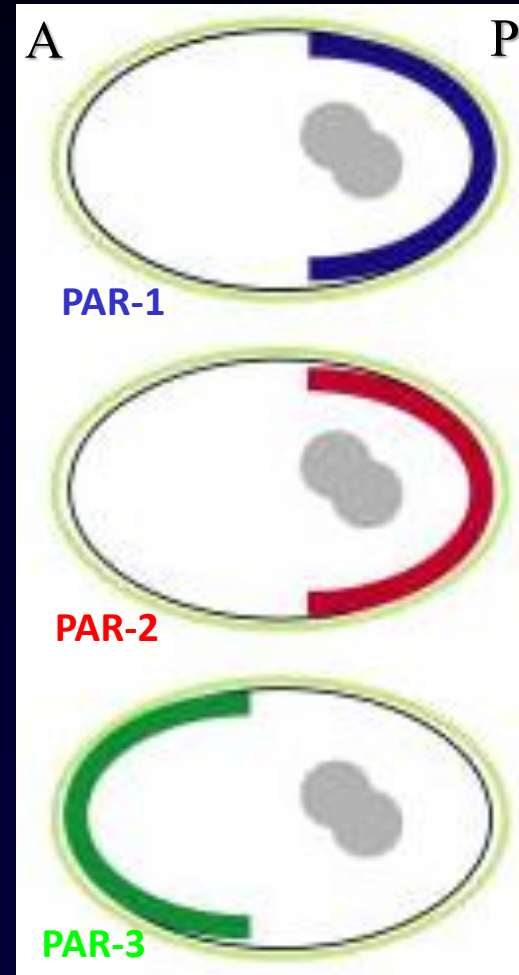
Τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του *C. elegans* ελέγχονται από γονίδια μητρικής επίδρασης



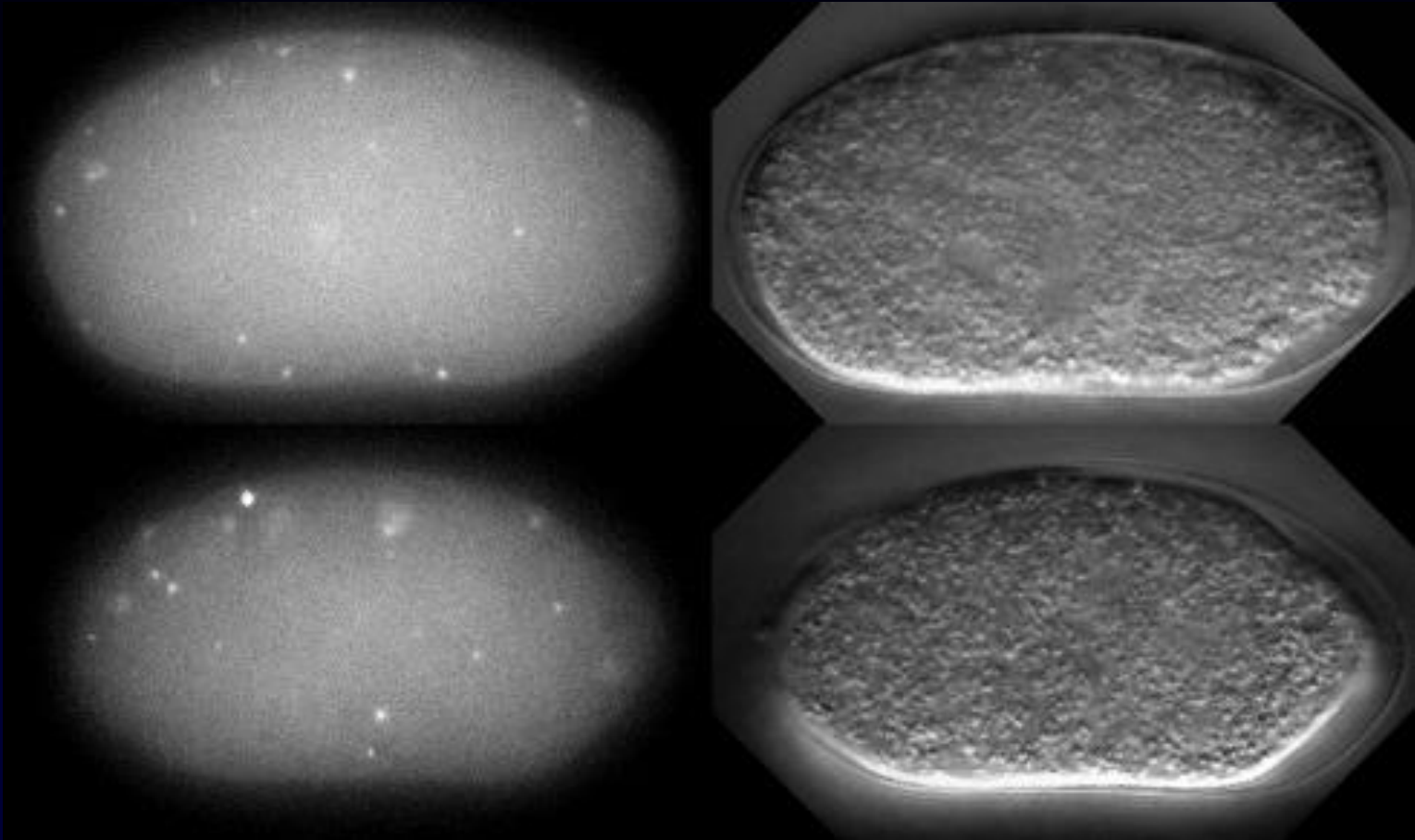
Σάρωση μεταλλαξιγένεσης για την ανεύρεση μεταλλαγών σε γονίδια μητρικής επίδρασης. Τα ερμαφρόδιτα δεν διαθέτουν γεννητικό πόρο επομένως δεν είναι σε θέση να γεννήσουν αυγά. Προκειμένου να απελευθερωθούν οι προνύμφες κατατρώνουν το σώμα του γονέα. Τα άτομα της F2 τα οποία φέρουν έμβρυα των οποίων η ανάπτυξη έχει σταματήσει λόγω μεταλλαγής σε γονίδιο μητρικής επίδρασης παραμένουν στο σώμα του γονέα.

Τα μεταλλάγματα *par* (partitioning defective mutants)

- Επηρεάζουν την κατανομή των κοκκίων P ή άλλων καθοριστών
- Αλλαγές στα επίπεδα αυλάκωσης
- Αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης άλλων γονιδίων
- Το έμβryo που προκύπτει χαρακτηρίζεται από συμμετρικές διαιρέσεις και απουσία διαφοροποίησης.
- Έχουν χαρακτηριστεί 6 μεταλλάξεις PAR.
- Διαφορετική κατανομή.
- Διαφορετικά στάδια.
- Διαφορετικά μέρια.

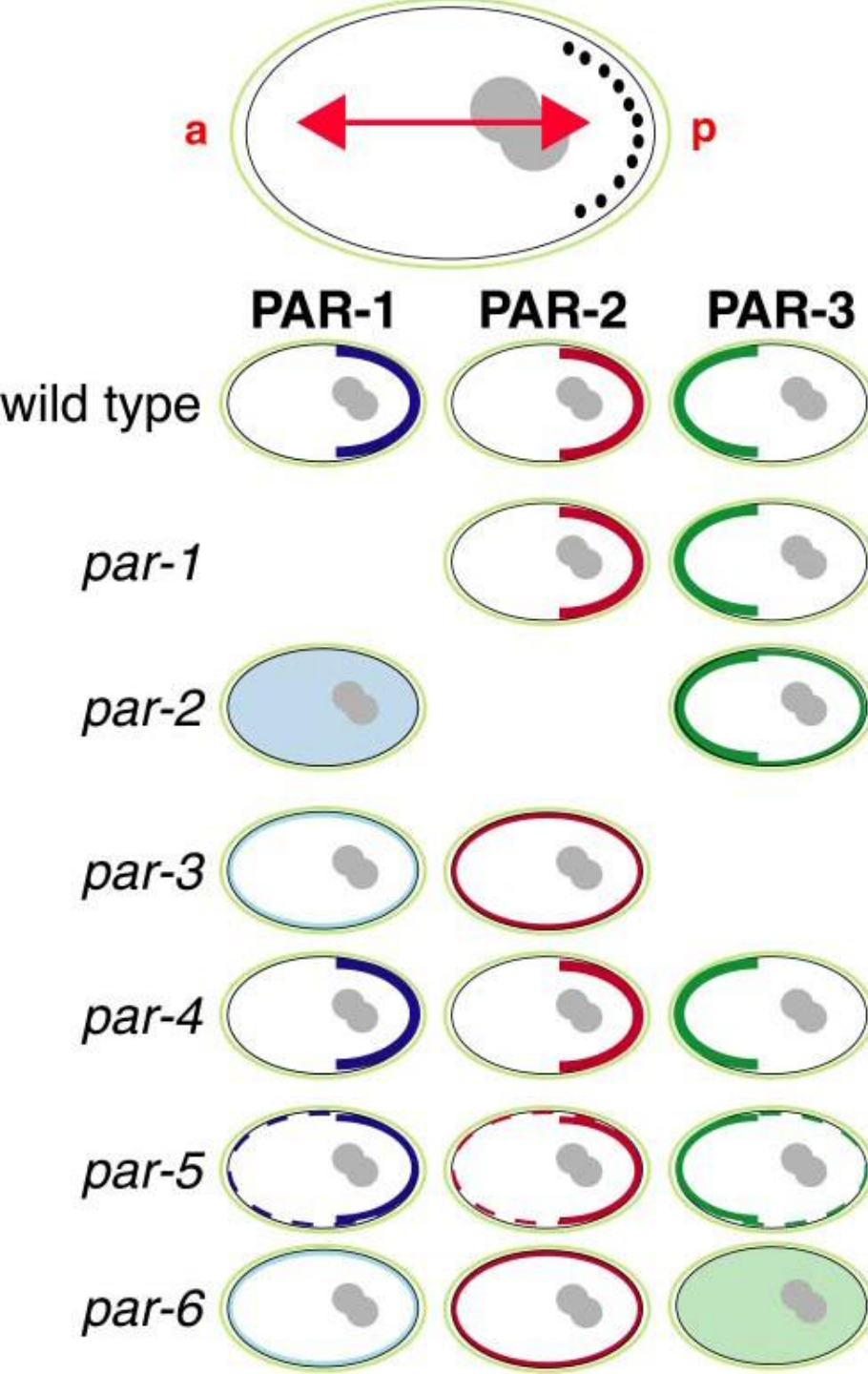


Τα γονίδια *par*



Η κατανομή των κοκκίων P απουσία PAR2 και PAR5

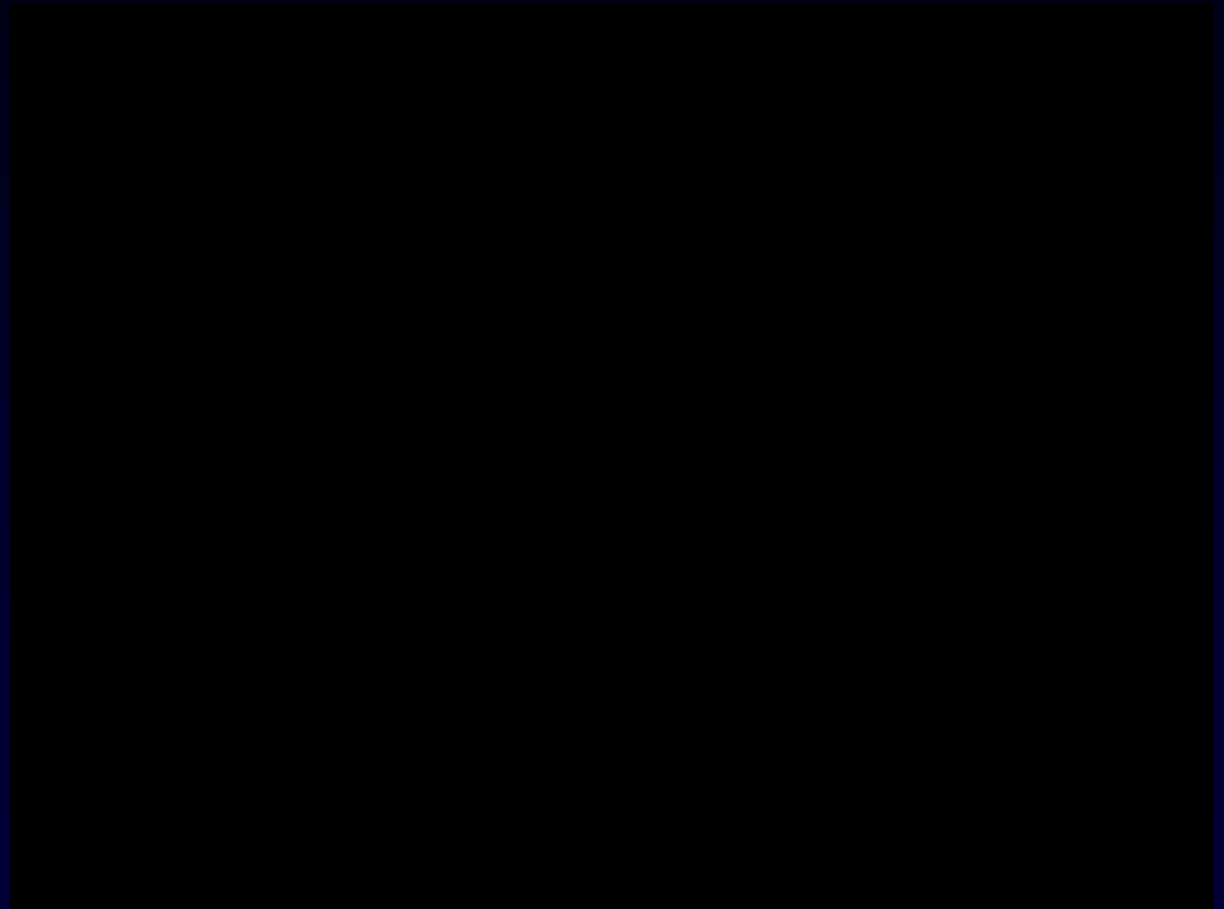
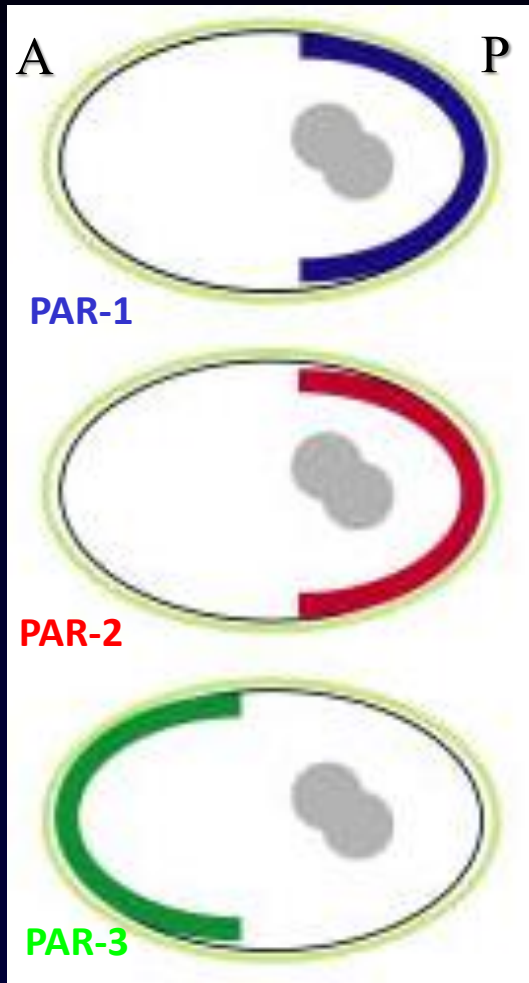
Τα μεταλλάγματα *par*



Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων *par*.

Μεταλλάξεις του ενός επηρεάζουν την κατανομή των υπολοίπων

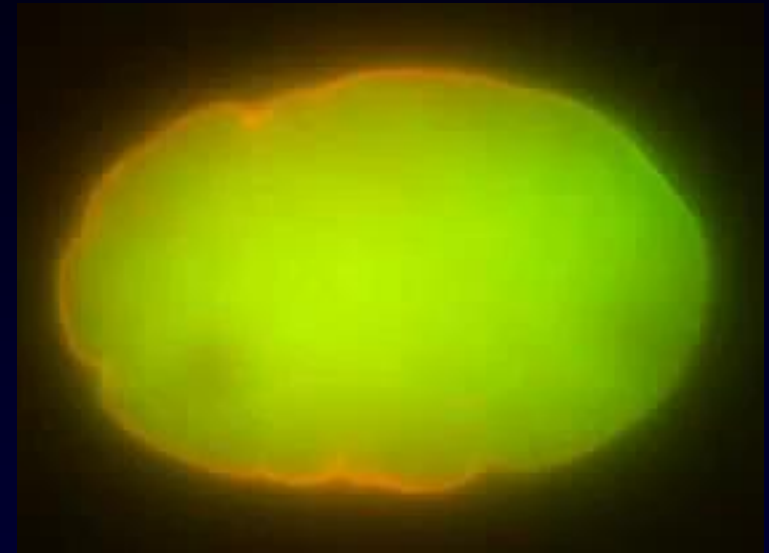
Οι πρωτεΐνες PAR



PAR-2:GFP

Οι πρωτεΐνες PAR

- Κατανέμονται ομοιόμορφα πριν από την γονιμοποίηση.
 - Μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου κατανέμονται ασύμμετρα στο περιφερικό κυτταρόπλασμα (φλοιός).
 - Για την κατανομή τους απαιτούνται μικροσωληνίσκοι.
-
- Τα γονίδια PAR συνεργάζονται για τον ορθό σχηματισμό των μιτωτικών ατράκτων και για το διαχωρισμό και την κατανομή διαφόρων παραγόντων.



PAR-2 GFP
PAR-6 mcherry

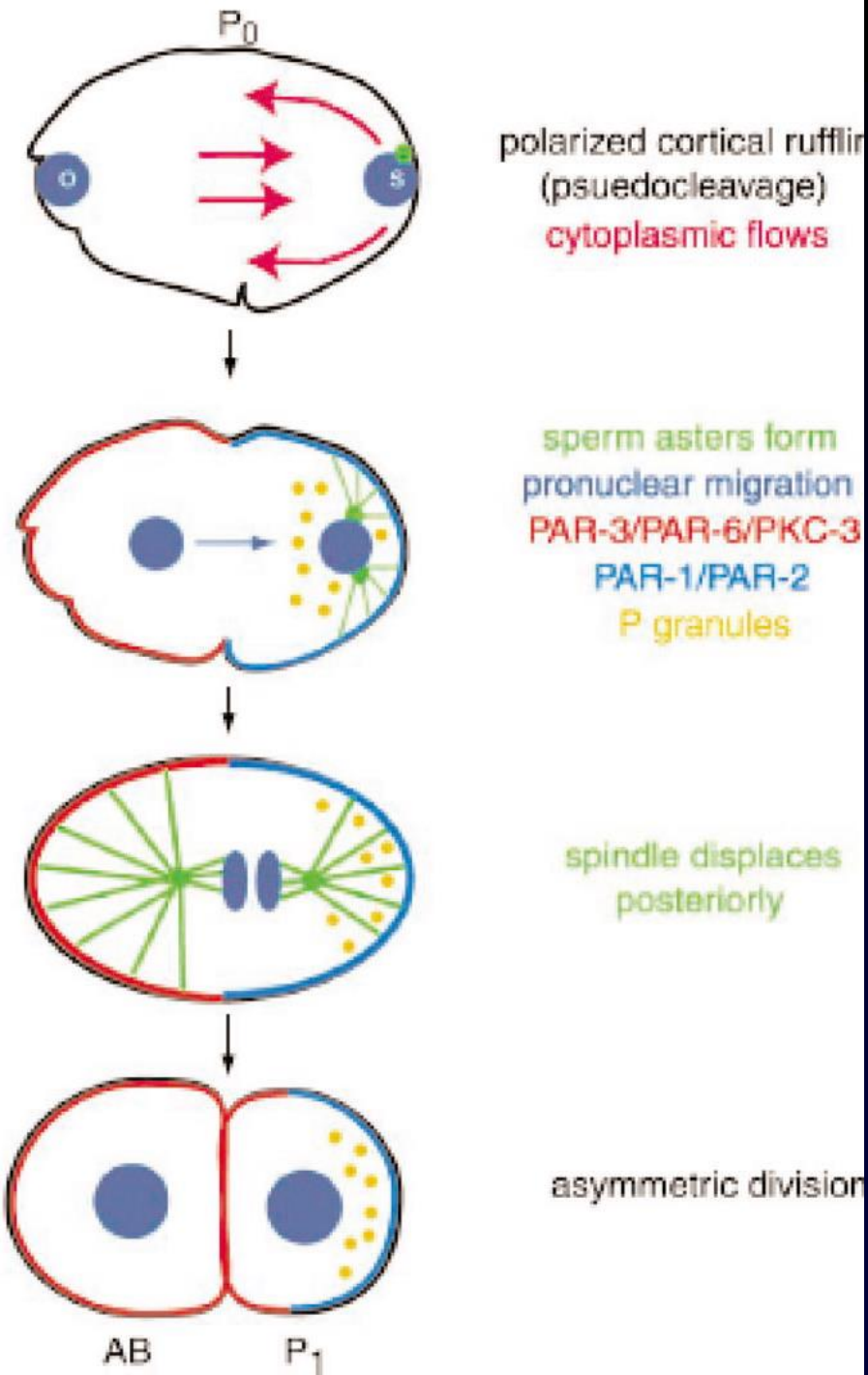
Τα γονίδια *par*

Πρωτεΐνες PAR

- PAR-1: κυτταροσκελετική MARK κινάση σερίνης-θρεονίνης
- PAR-2: περιέχει δακτυλίους RING επικράτεια πρόσδεσης ATP
- PAR-3: περιέχει επικράτεια PDZ, ομόλογη με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με PKC, αλληλεπιδρά με PAR-6
- PAR-4: ? Ομόλογη με ανθρώπινη πρωτεΐνη
- PAR-5: πρωτεΐνη 14-4-3
- PAR-6: περιέχει επικράτεια PDZ, αλληλεπιδρά με PAR-3

Δεν είναι απολύτως σαφής ο τρόπος με τον οποίο τα γονίδια *par* ρυθμίζουν τα επίπεδα αυλάκωσης ή την κατανομή διαφόρων μορίων στο έμβρυο.

Αλληλεπιδράσεις με τον κυτταροσκελετό



Εγκαθίδρυση Εμπροσθοπίσθιου άξονα Σύνοψη

- 1) Είσοδος σπερματοζωαρίου - δημιουργία κυτταροπλασματικών ρευμάτων - πολικότητα
- 2) Τα κοκκία P μετακινούνται στο οπίσθιο άκρο
- 3) Ασύμμετρη κατανομή των PAR (στα βλαστικά κύτταρα)
- 4) Ασύμμετρη διαίρεση??

Πολικότητα και σχηματισμός της ατράκτου στην πρώτη αυλακωτική διαίρεση

Η εγκαθίδρυση πολικότητας δεν αρκεί- Προκειμένου να προχωρήσει ομαλά η ανάπτυξη θα πρέπει η άτρακτος να είναι μετατοπισμένη.

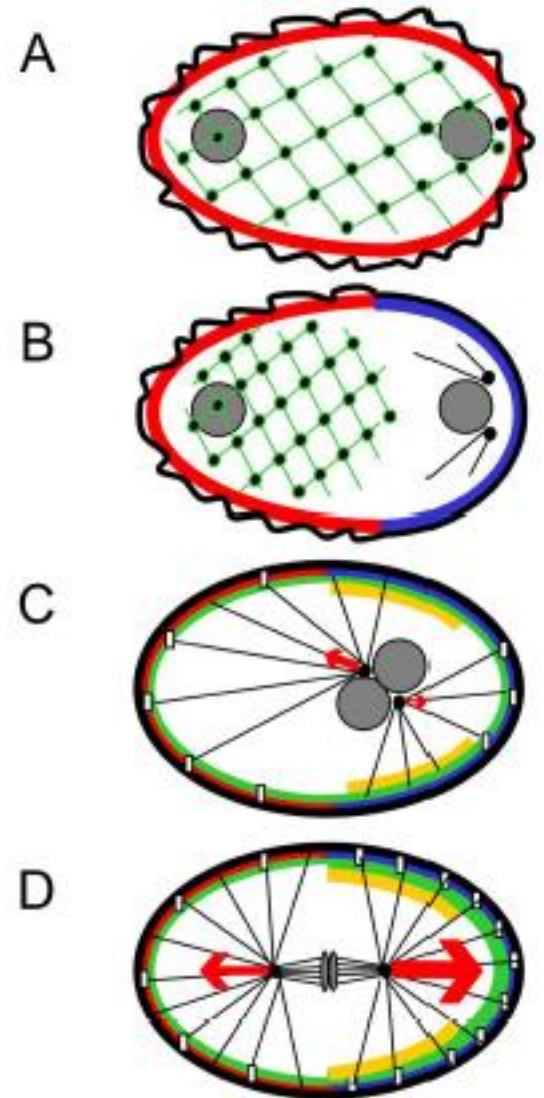
Έχει δειχθεί ότι
η μετατόπιση οφείλεται στη διαφορά των δυνάμεων που ασκούνται στα δύο κεντροσώματα

Απαιτούνται:

PAR-3: επηρεάζει τη σταθερότητα των MT

PAR-2: PAR-3 (περιορίζει την ενεργότητά της στο εμπρόσθιο τμήμα).

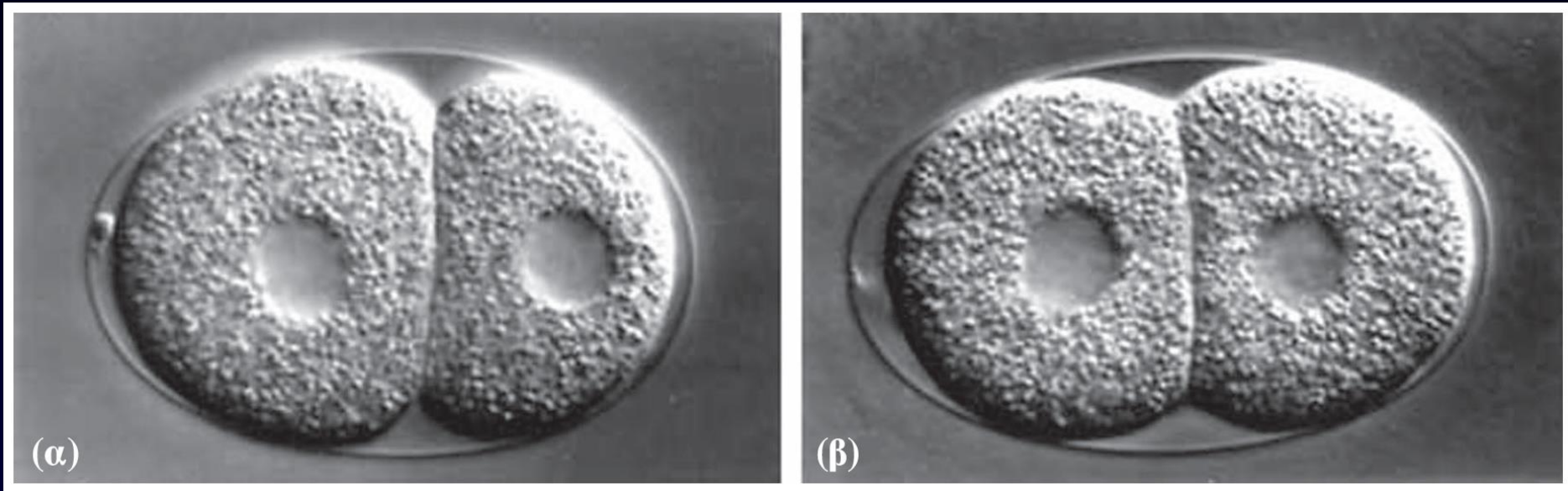
par-2,3 μεταλλάγματα???



Κεντρόσωμα: μαύροι δίσκοι, μικροσωληνίσκοι: μαύρες γραμμές με γκριζό χρώμα οι προπυρήνες οι πυρήνες και τα χρωμοσώματα

PAR-3/PAR-6 κόκκινο περιφερειακό κυτταρόπλασμα, PAR-2 και PAR-1: μπλε, GPR-1/2 πράσινο cortical LET-99: χρυσαφί

Ο ρόλος του γονιδίου *par-3* στην αυλάκωση

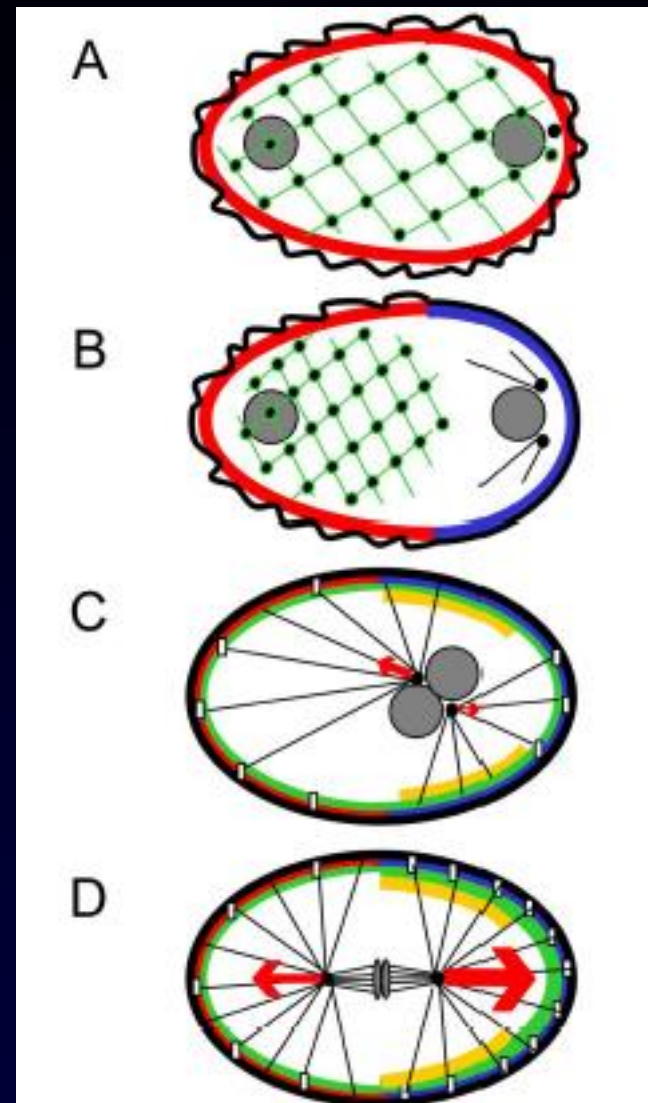


(α) Έμβρυο άγριου τύπου στο οποίο διακρίνονται τα κύτταρα AB και P1. (β) Έμβρυο που έχει προκύψει από ωάριο από το οποίο απουσιάζει το λειτουργικό προϊόν του *par-3*. Τα δύο βλαστομερίδια έχουν το ίδιο μέγεθος. Από τη δημοσίευση Goldstein & Macara (2007) *Developmental Cell* **13**, 609-622, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Elsevier.

Πολικότητα και σχηματισμός της ατράκτου στην πρώτη αυλακωτική διαίρεση

- GPR1/2 και LET-99 ρυθμιστές ειδικών υπομονάδων Gα (goa-1, gr16)
- Μεταλλάγματα goa-1, gr16 εμφανίζουν πολικότητα αλλά και προβλήματα στην μετατόπιση της ατράκτου.
- **Μονοπάτι πρωτεϊνών G που ενεργοποιείται (δεν υπάρχει προσδέτης) – στόχος του μονοπατιού στοιχεία της ατράκτου (δυνεΐνη?)**

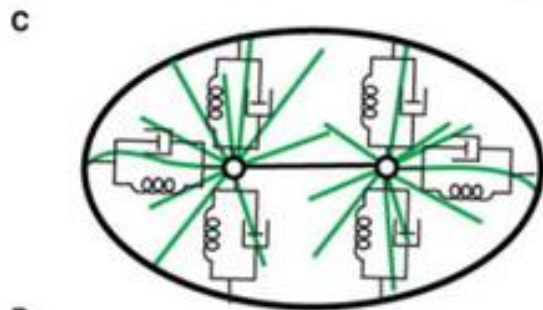
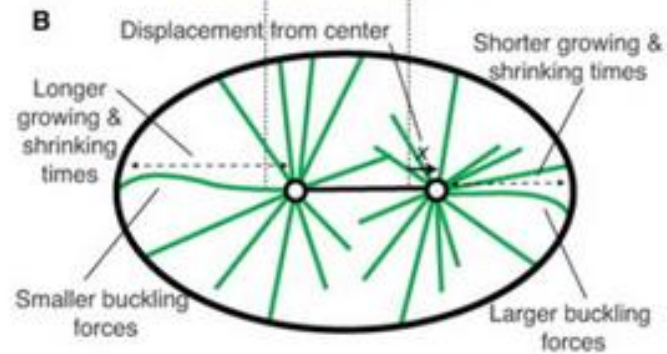
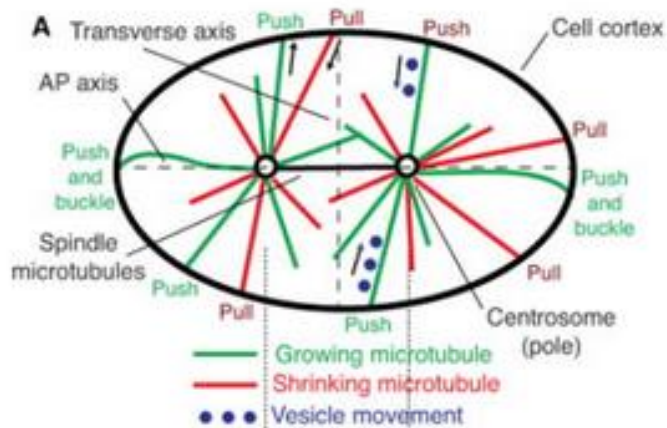
Τα παραπάνω δρουν στο ίδιο μονοπάτι - καθοδικά απο τις PAR.



Κεντρόσωμα: μαύροι δίσκοι, μικροσωληνίσκοι: μαύρες γραμμές με γκριζό χρώμα οι προπηρόνες οι πηρόνες και τα χρωμοσώματα

PAR-3/PAR-6 κόκκινο περιφερειακό κυτταρόπλασμα, PAR-2 και PAR-1: μπλε, GPR-1/2 πράσινο cortical LET-99: χρυσαφί

Πολικότητα και σχηματισμός της ατράκτου στην πρώτη αυλακωτική διαίρεση

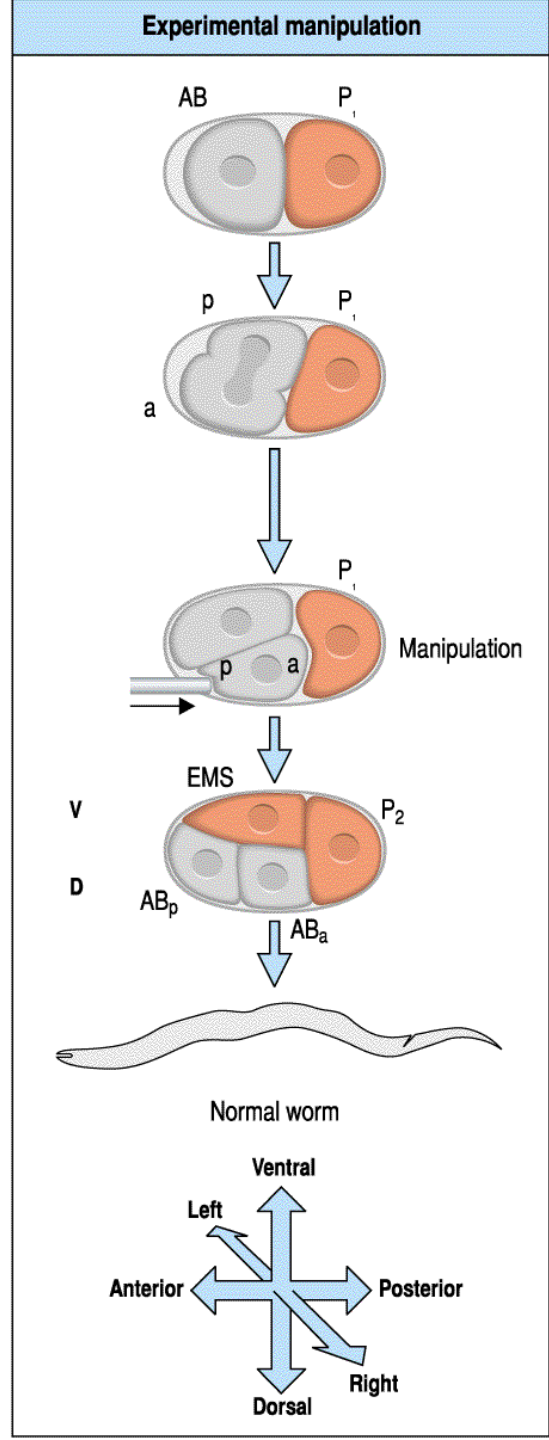
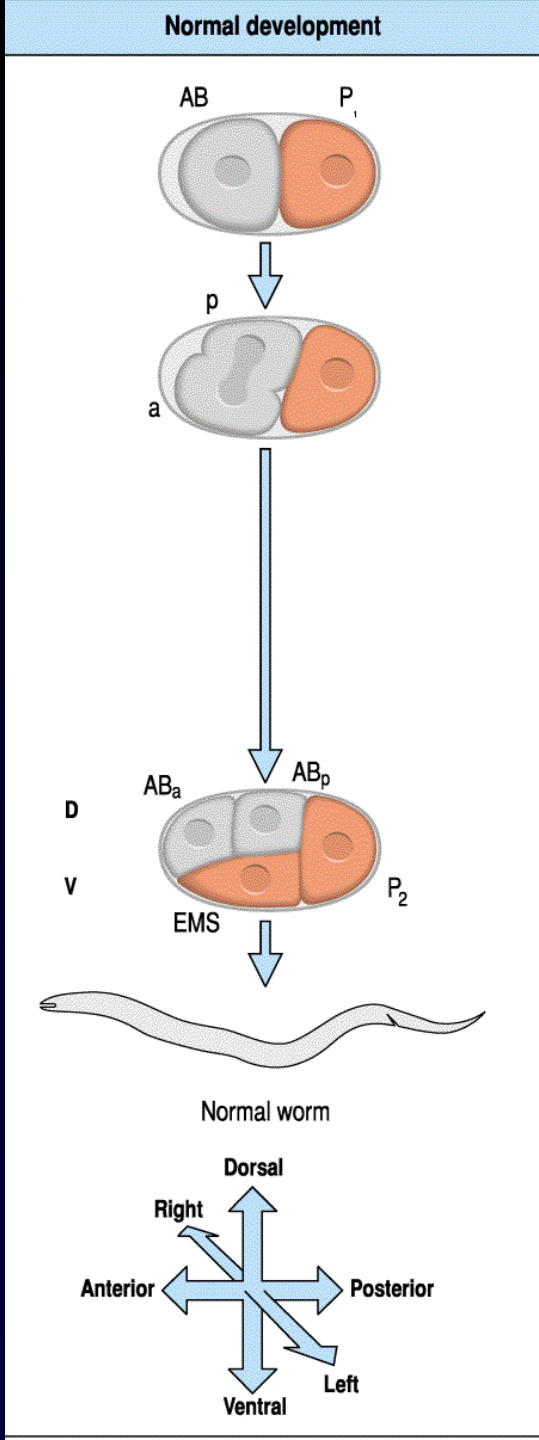


Models of spindle centering

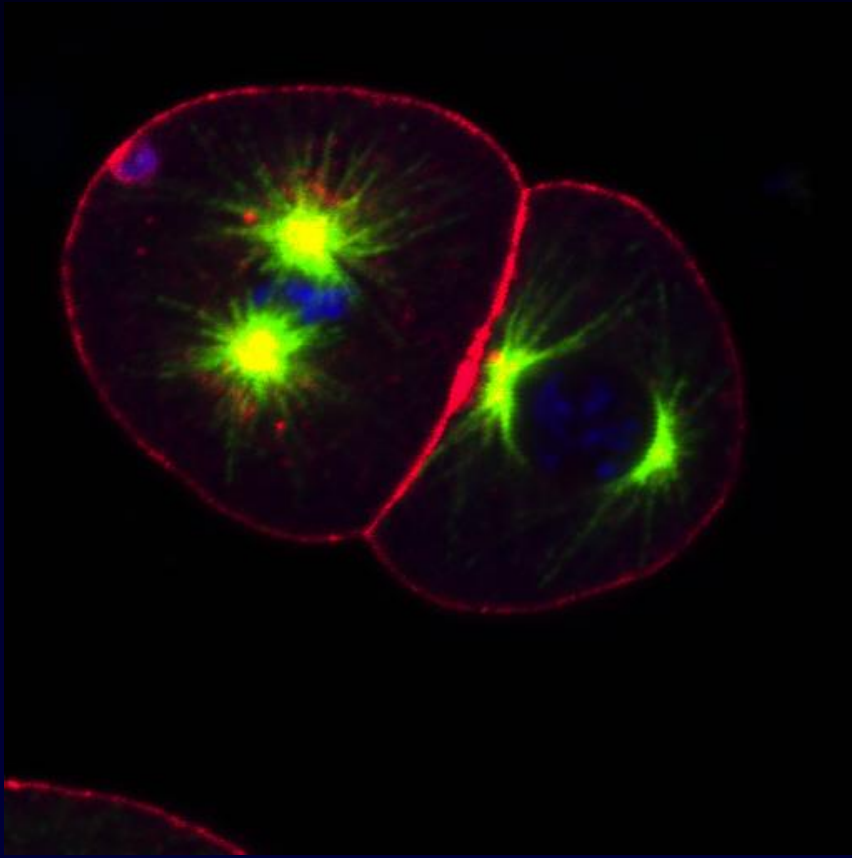
A Three force-generating mechanisms operating on astral microtubules: (i) pushing by microtubules, shown in green, growing against the cell cortex, (ii) pulling by microtubules, shown in red, shortening while maintaining contact with the cortex, and (iii) hydrodynamic force generated by movement of vesicles, shown in blue, moving towards the center of the aster. The pushing and vesicles forces are centering, meaning that they move the aster and the spindle towards the cell center. The pulling forces can be centering or anti-centering depending on the details of cell shape and cortical attachment. B Origins of length-dependent pushing forces. Displacement of the spindle to the right leads to larger leftwards restoring force because (i) the microtubules spend less time growing and shrinking from the right-hand cortex, and (ii) the buckling forces are larger for the shorter microtubules on the right. C Spring and dashboard model of the spindle showing the equivalent mechanical circuit for pushing microtubule arrays. D Microtubule buckling after contact with the cortex (show cortex). Upper microtubule: clamped at the aster center and fixed at the cortex (but free to pivot). Lower microtubule: clamped at the aster center and free to slide along the cortex. If there is friction at the cortex, the microtubule will initially buckle as shown in the upper part, but then transition to the shape shown after sliding. Bioessays. 2017 Nov; 39(11): 10.1002/bies.201700122.

Ο σχηματισμός του ραχιοκοιλιακού άξονα

- Ο ραχιοκοιλιακός άξονας εγκαθιδρύεται στο στάδιο των 4-κυττάρων.
- Μηχανική περιστροφή του ABp αντιστρέφει τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα.
- ABp: καθορίζει τη ραχιαία πλευρά.
- EMS: καθορίζει την κοιλιακή πλευρά.



Αυτόνομη αλλά και κατά συνθήκη εξειδίκευση ελέγχουν την ταυτότητα των βλαστομεριδίων του *C. elegans*



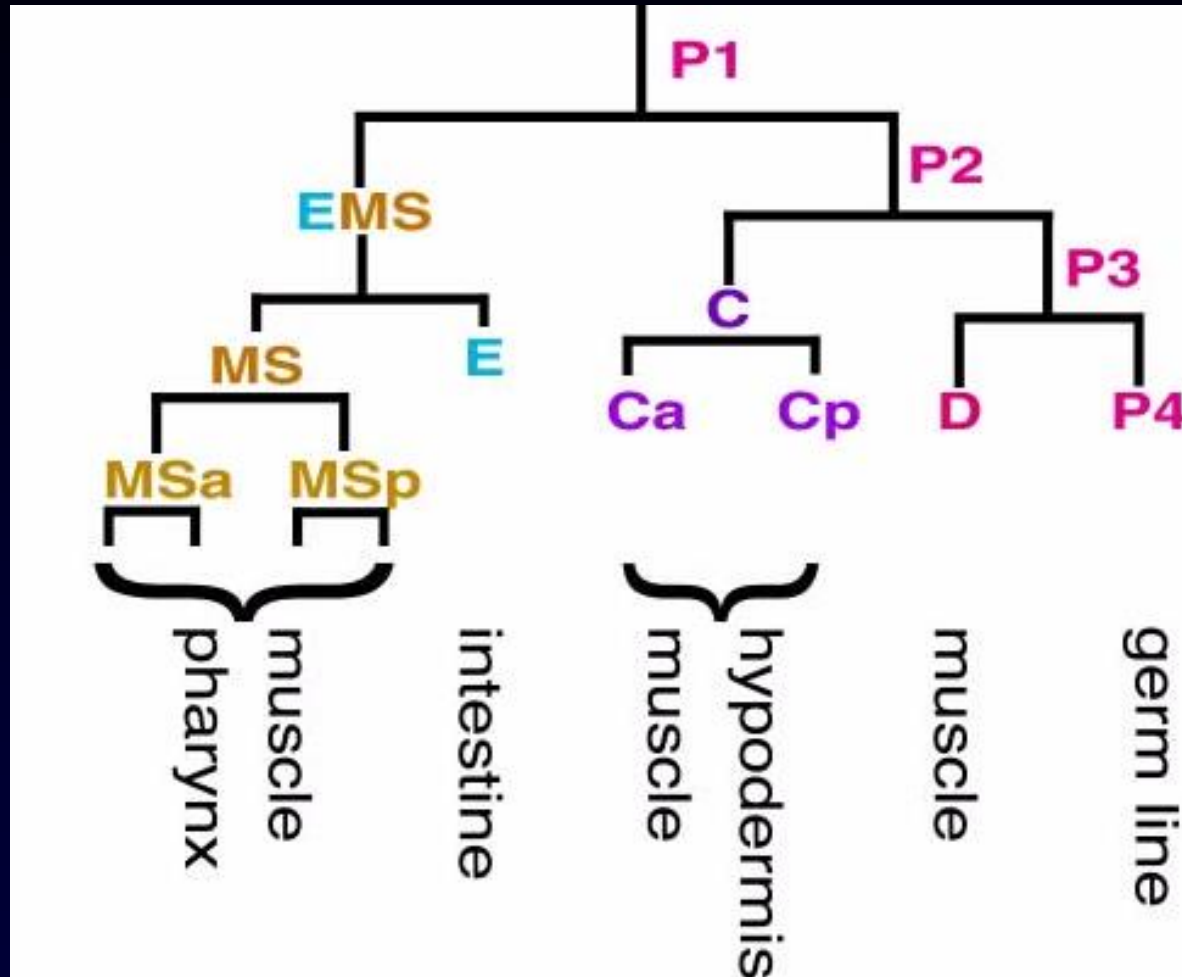
- Διαχωρισμός ή καταστροφή των βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο κυττάρων:
- οι απόγονοι του P1 σχηματίζουν όλους τους κυτταρικούς τύπους που θα έδιναν φυσιολογικά.
- οι απόγονοι του AB σχηματίζουν μόνο μερικούς από τους κυτταρικούς τύπους που θα έδινε φυσιολογικά.



P1: αυτόνομη εξειδίκευση

AB: κατά συνθήκη εξειδίκευση

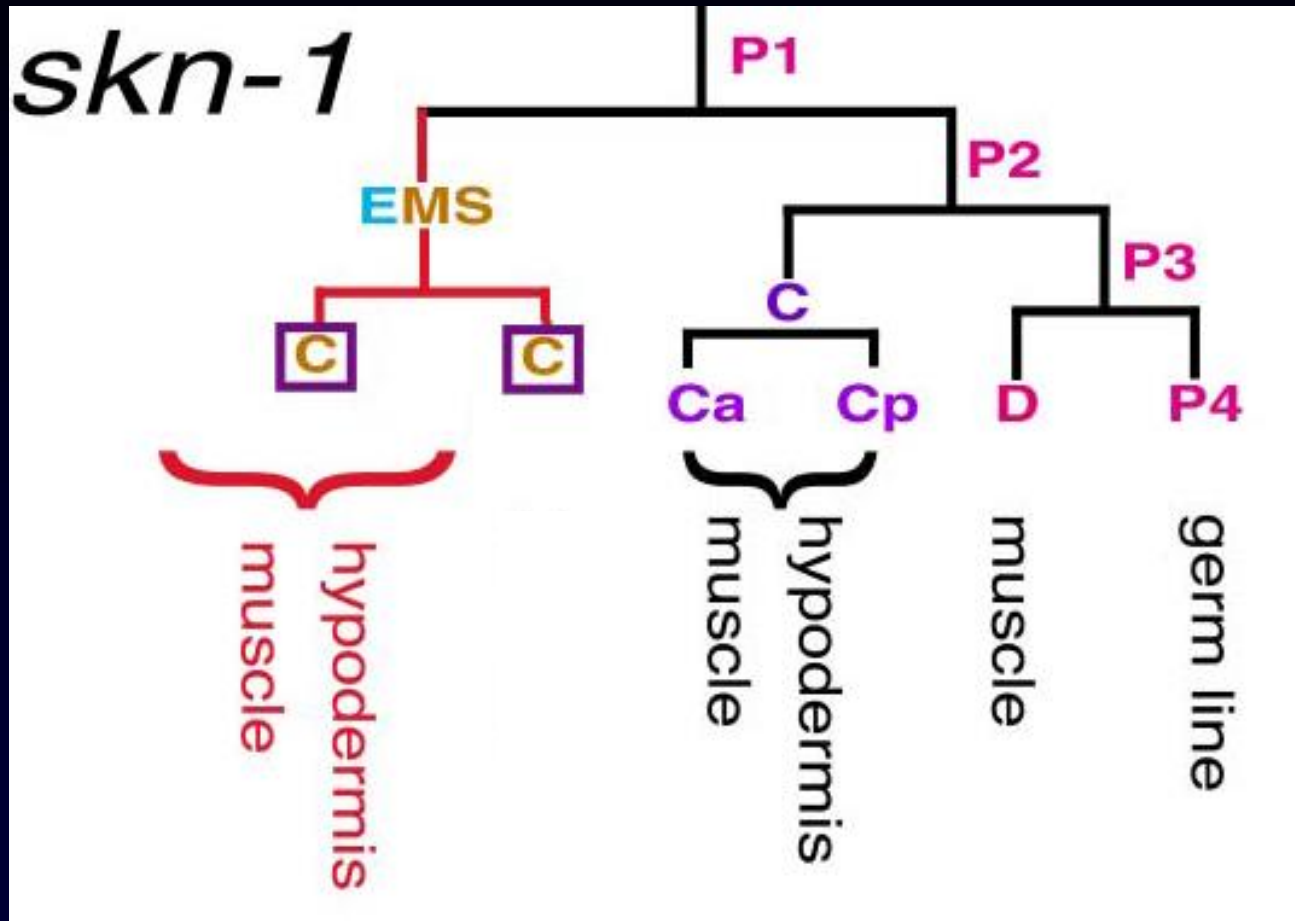
Αυτόνομη εξειδίκευση και η κυτταρική γενεαλογία του P1



Κοκκία P: κατανέμονται πάντα στο βλαστικό κύτταρο καθορίζουν τη γαμετική σειρά

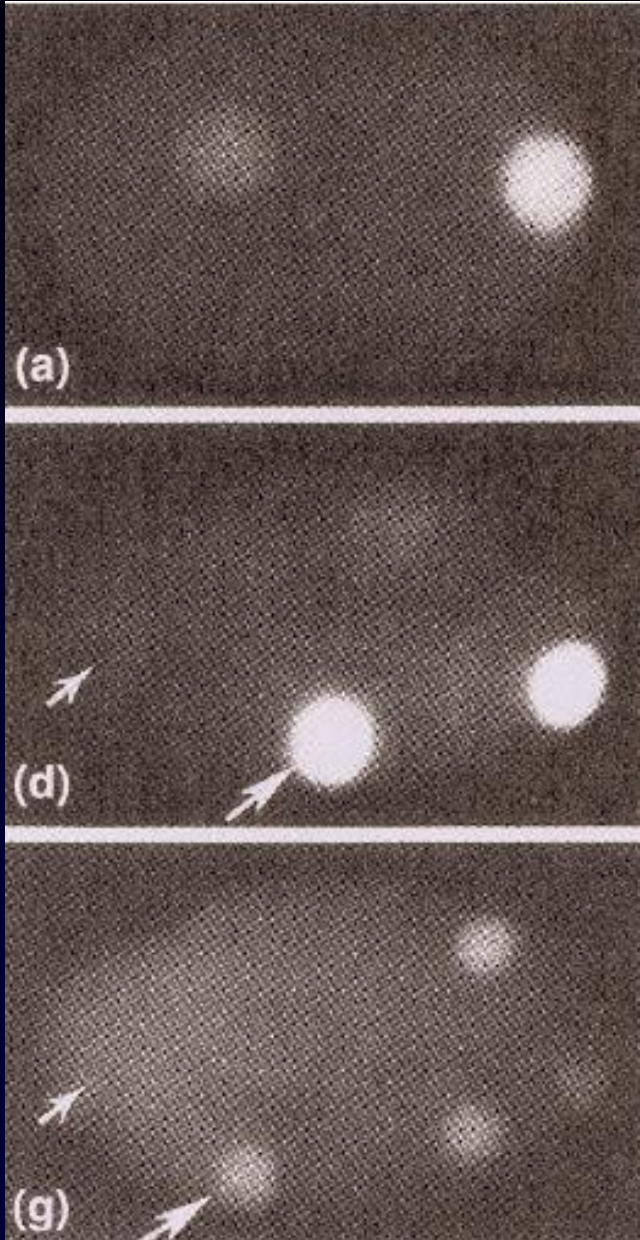
SKN-1, PAL-1 και PIE-1: καθορίζουν την τύχη των ιδρυτικών MS, C, E και D (μεταγραφικοί παράγοντες)

Έμβρυα από ωάρια *skn-1* χαρακτηρίζονται από την απουσία εντέρου και φαρυγγικών μυών



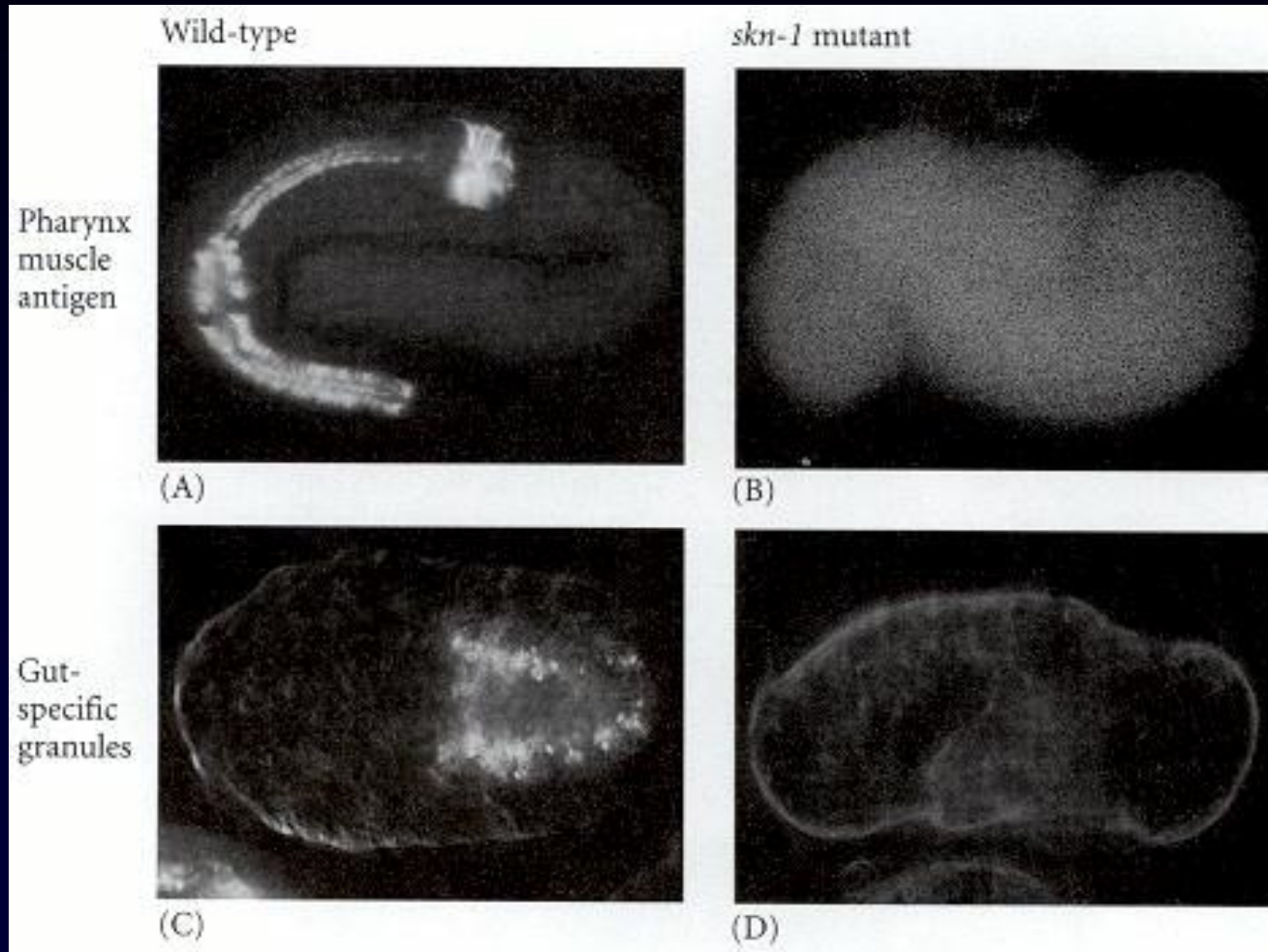
- P1, EMS και MS σε πειράματα απομόνωσης - μύες του φάρυγγα
- Απουσία της SKN-1 -αντί για μύες του φάρυγγα, επιδερμίδα.
- Επιπλέον το E μετατρέπεται σε C (προβλήματα και στο έντερο) .

Έμβρυα από ωάρια *skn-1* χαρακτηρίζονται από την απουσία εντέρου και φαρυγγικών μυών

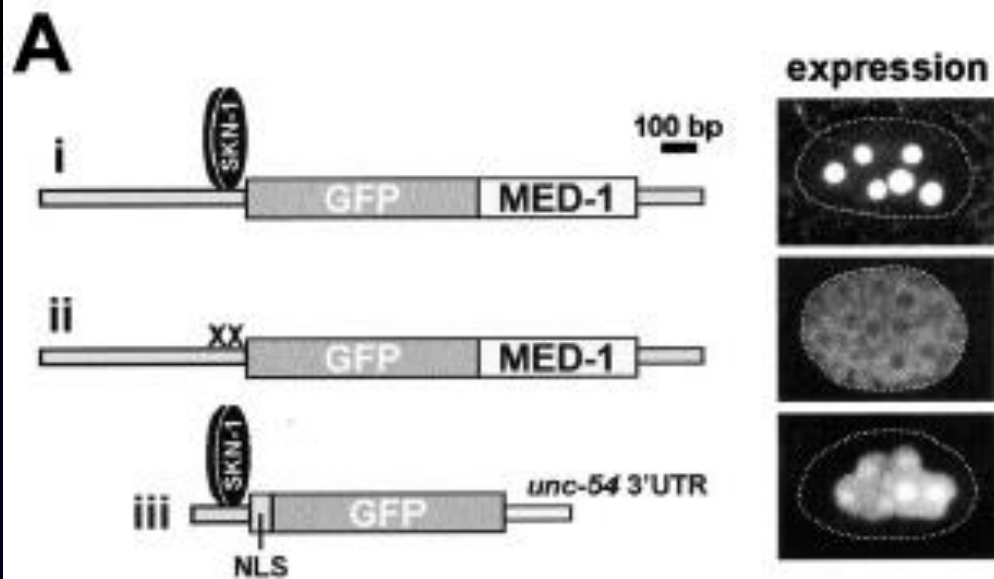


- Η SKN-1 εκφράζεται στο P1, στο P2 και το EMS και σε χαμηλά επίπεδα στα E, MS, P3 και C.
- Η έκφραση της SKN-1 εκτοπικά στο AB μεταβάλλει το πεπρωμένο του- υιοθετεί το πεπρωμένο του MS.
- Η SKN-1 εμπλέκεται στον καθορισμό του πεπρωμένου της γενεαλογίας του P1.

Έμβρυα από ωάρια από τα οποία απουσιάζει το προϊόν *skn-1* χαρακτηρίζονται από την απουσία εντέρου και φαρυγγικών μυών

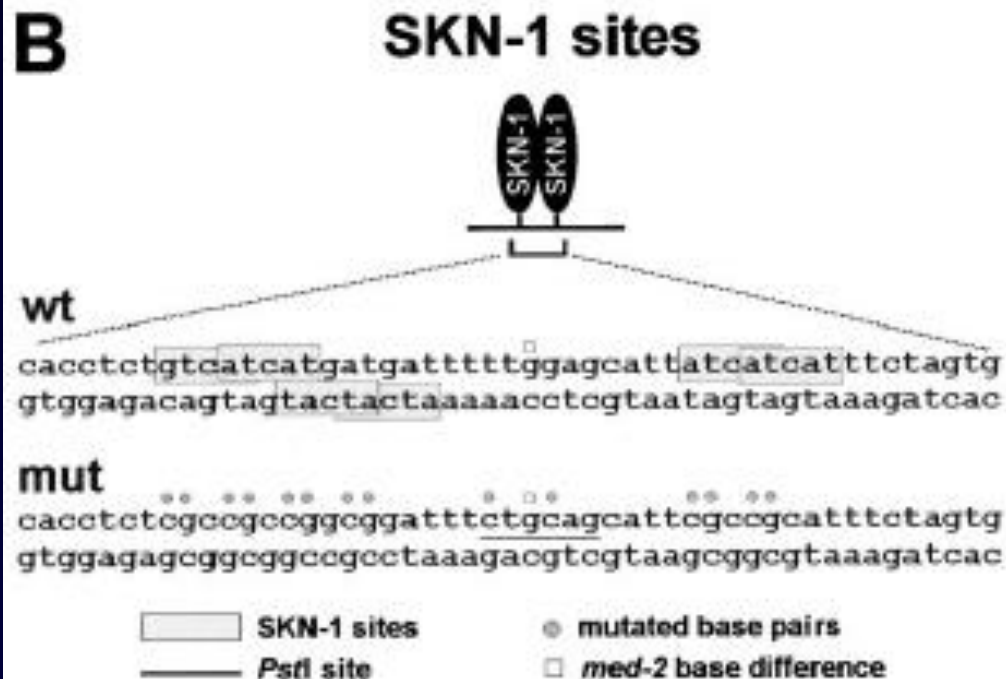


Το *skn-1* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα της bZip/homeodomain. Μητρικό mRNA, ασύμμετρη μετάφραση

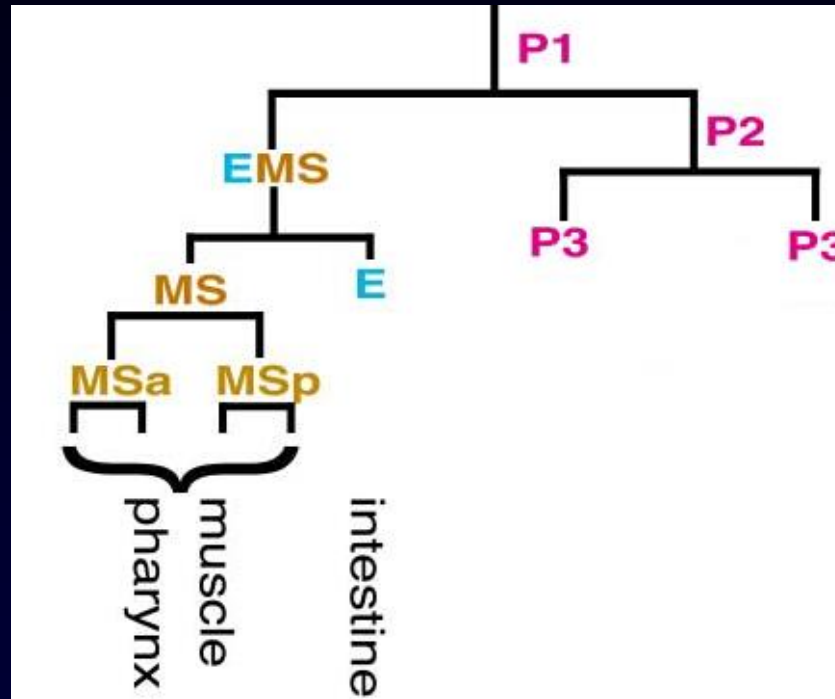


Η SKN-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των *med-1* και *med-2*

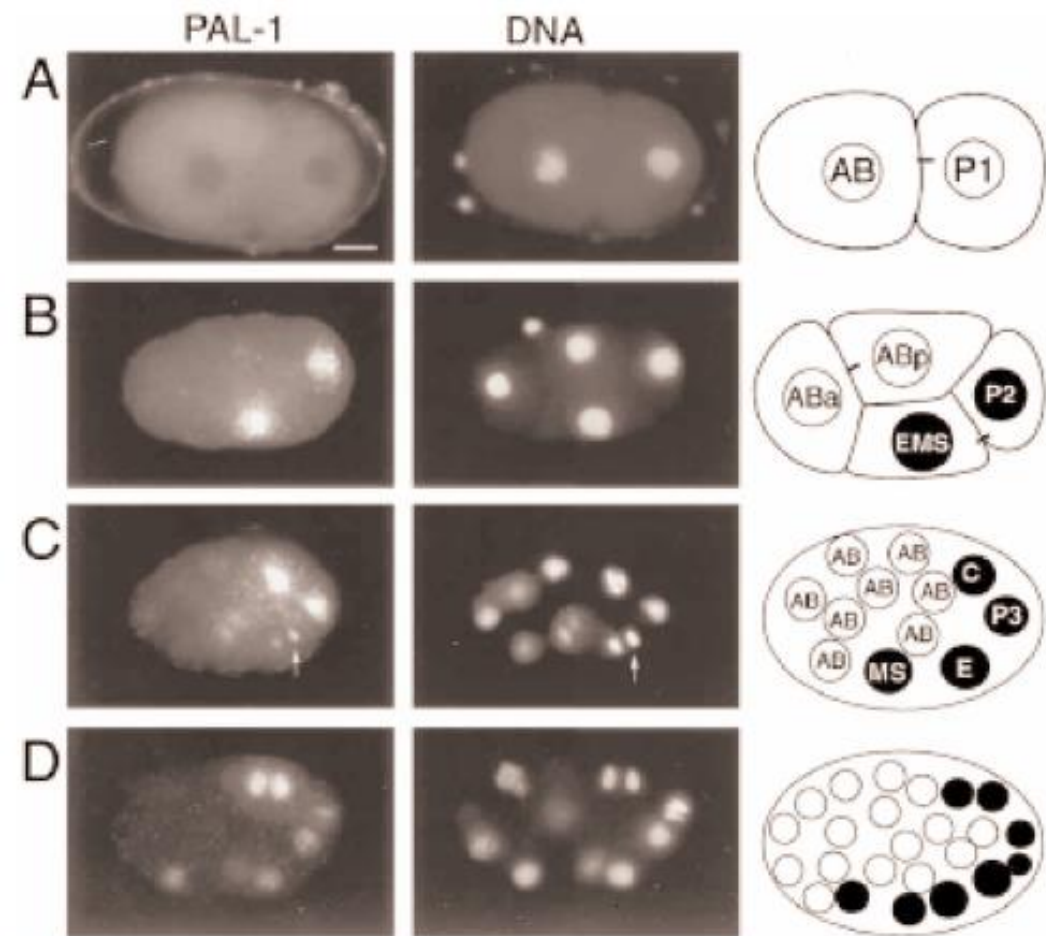
- MED-1 και MED-2 : GATA ζυγωτικοί μεταγραφικοί παράγοντες
- Η SKN-1 αναγνωρίζει ρυθμιστικά στοιχεία στον υποκινητή των MED-1 και MED-2.
- Έκτοπη έκφραση των *med* μετατρέπει μη EMS κύτταρα σε EMS απουσία της SKN-1.
- Απουσία τους – ίδιος φαινότυπος με απουσία SKN-1



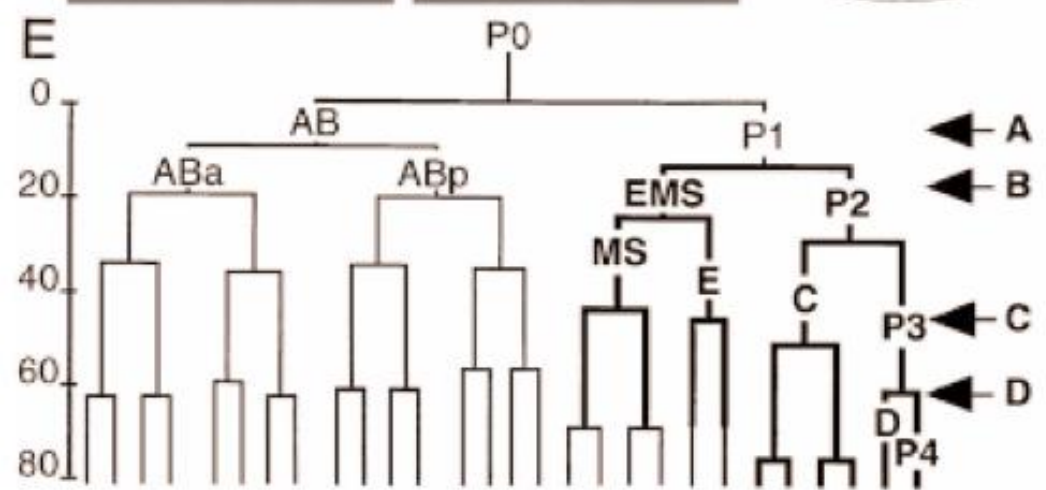
Στα έμβρυα από ωάρια από τα οποία απουσιάζει το προϊόν του *ral-1* παρατηρείται απουσία των σωματικών απογόνων του P2



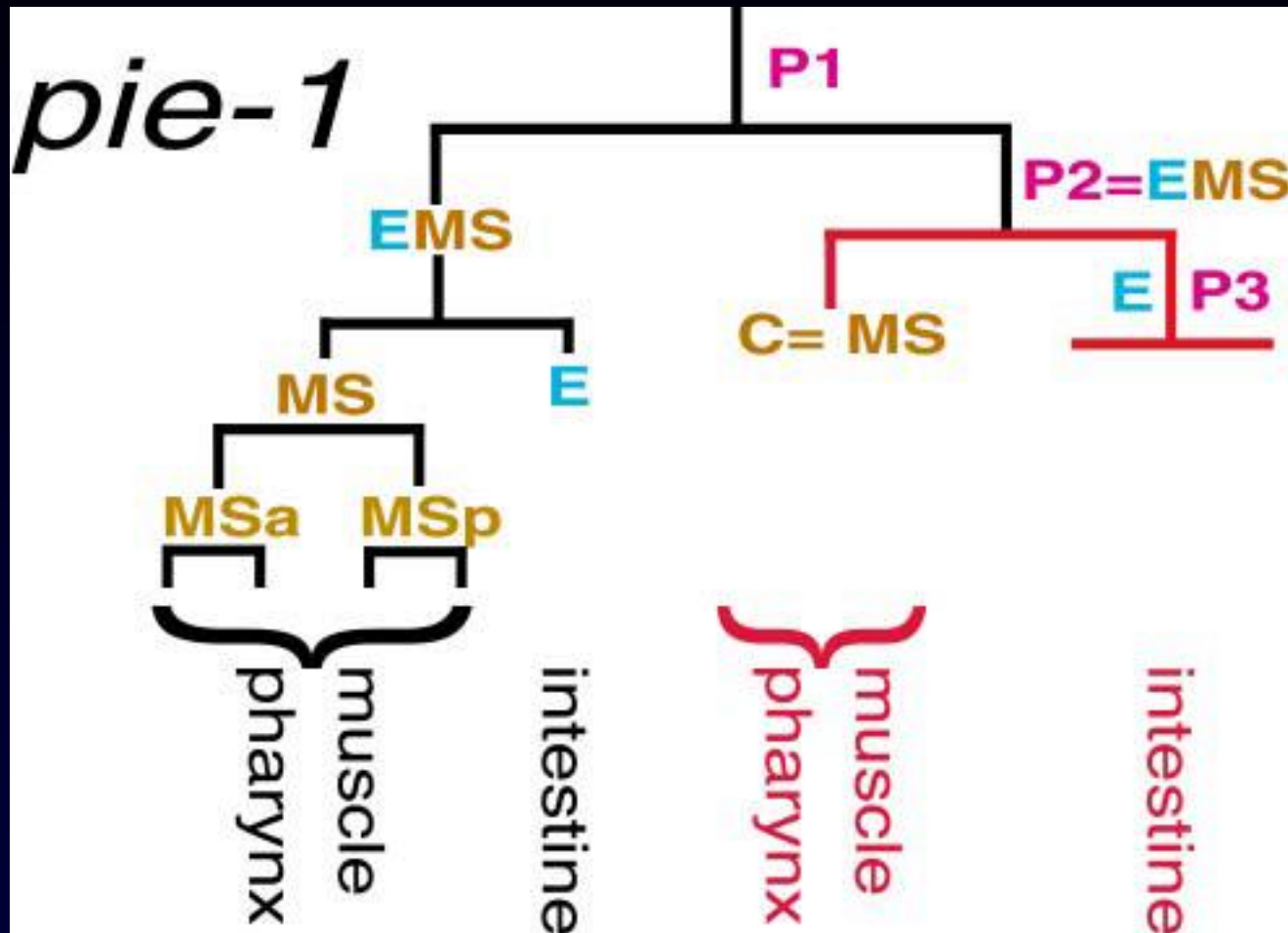
- Μεταγραφικός παράγοντας - περιέχει homeodomain
- Ομόλογη της Caudal, μητρικό μήνυμα μετάφραση τοπική
- Η μετάφραση του *ral-1* ρυθμίζεται από τη MEX-3 (RNA binding protein)
- Η SNK-1 αναστέλλει την PAL-1



Η SNK-1 αναστέλλει την PAL-1



Η PIE-1 απαιτείται για την τύχη της γαμετικής σειράς

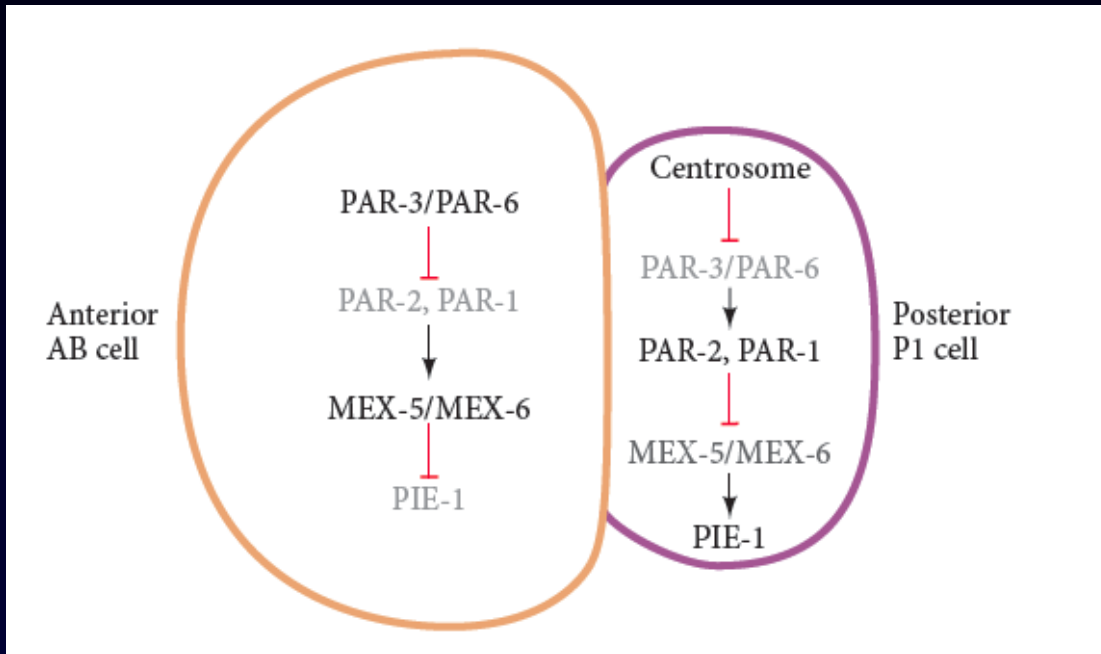


PIE-1 Μεταγραφικός παράγοντας- zinc finger

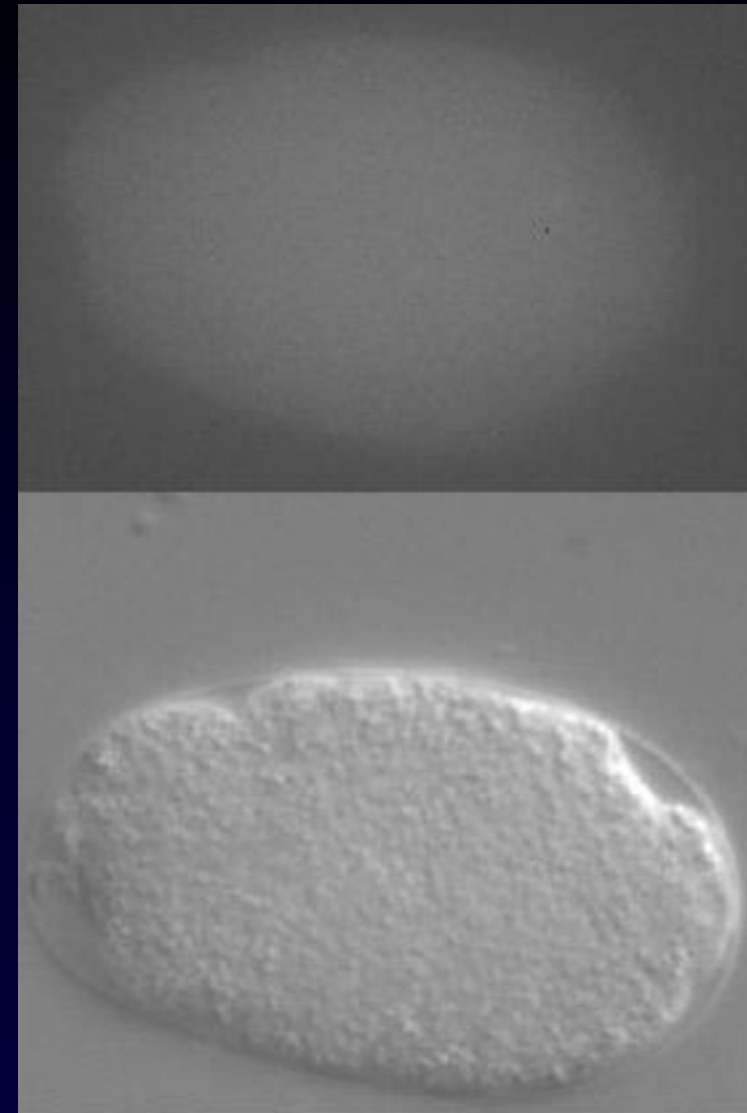
Καταστέλλει το *skn-1*

Καταστέλλει τη μεταγραφή στα κύτταρα της γαμετικής σειράς

Έκφραση της PIE-1 κατά την αυλάκωση

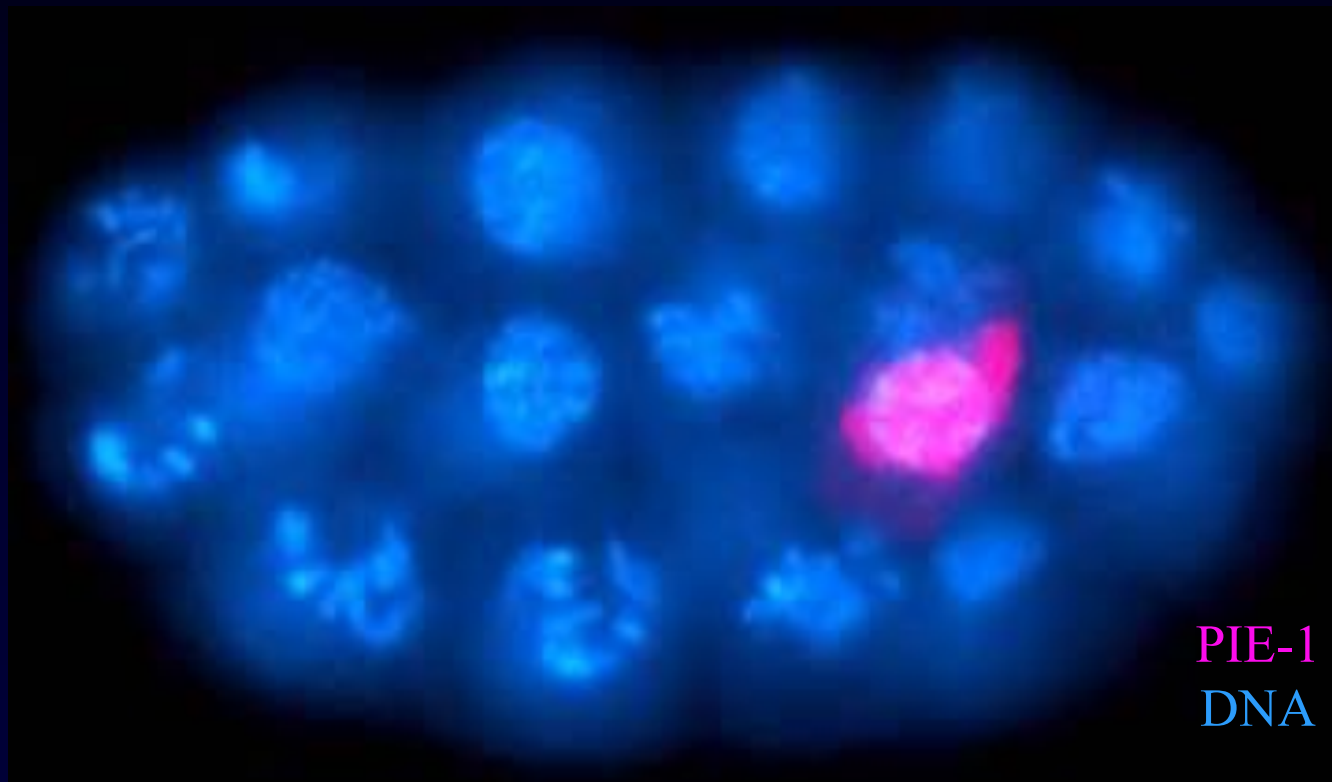


Segregation of PIE-1 determinant into the P1 blastomere at the 2-cell stage. The sperm centrosome inhibits the presence of the PAR-3/ PAR-6 complex in the posterior of the egg. This allows the function of PAR-2 and PAR-1, which inhibit the MEX-5 and MEX-6 proteins that would degrade PIE-1. So while PIE-1 is degraded in the resulting anterior AB cell, it is preserved in the posterior P1 cell. (After Gönczy and Rose 2005.) Gilbert+Barresi 11th ed

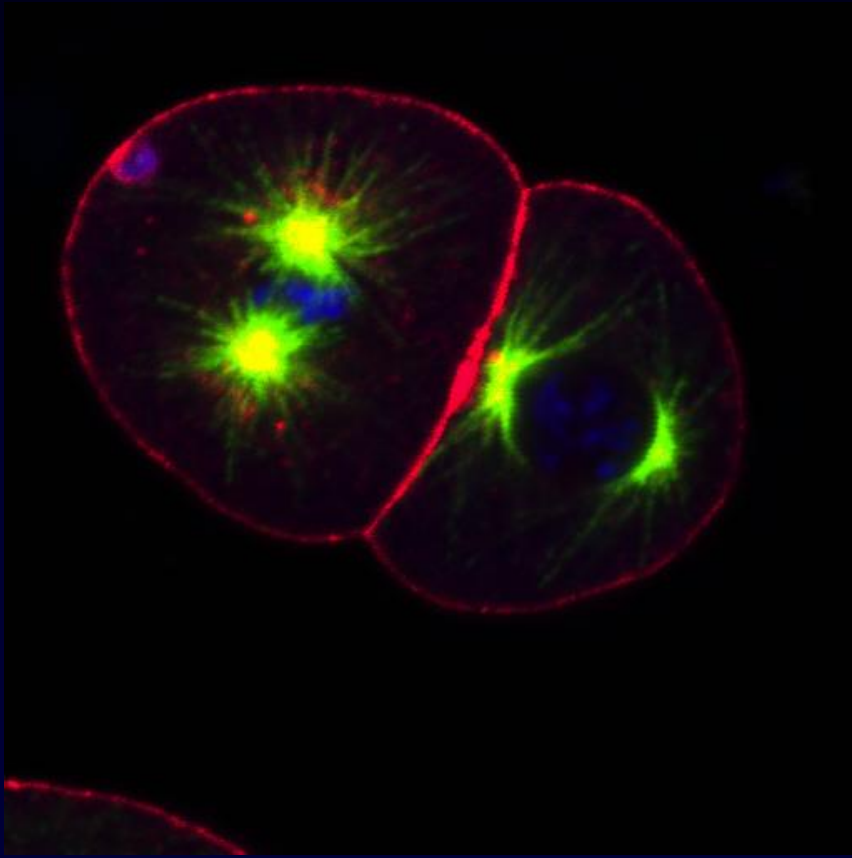


PIE-1:GFP

Η έκφραση της P1E-1 στα κύτταρα της γαμετικής σειράς
συνεχίζεται και μετά την αυλάκωση



Αυτόνομη αλλά και κατά συνθήκη εξειδίκευση ελέγχουν την ταυτότητα των βλαστομεριδίων του *C. elegans*



Διαχωρισμός ή καταστροφή των βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο κυττάρων:

☒ οι απόγονοι του P1 σχηματίζουν όλους τους κυτταρικούς τύπους που θα έδιναν φυσιολογικά.

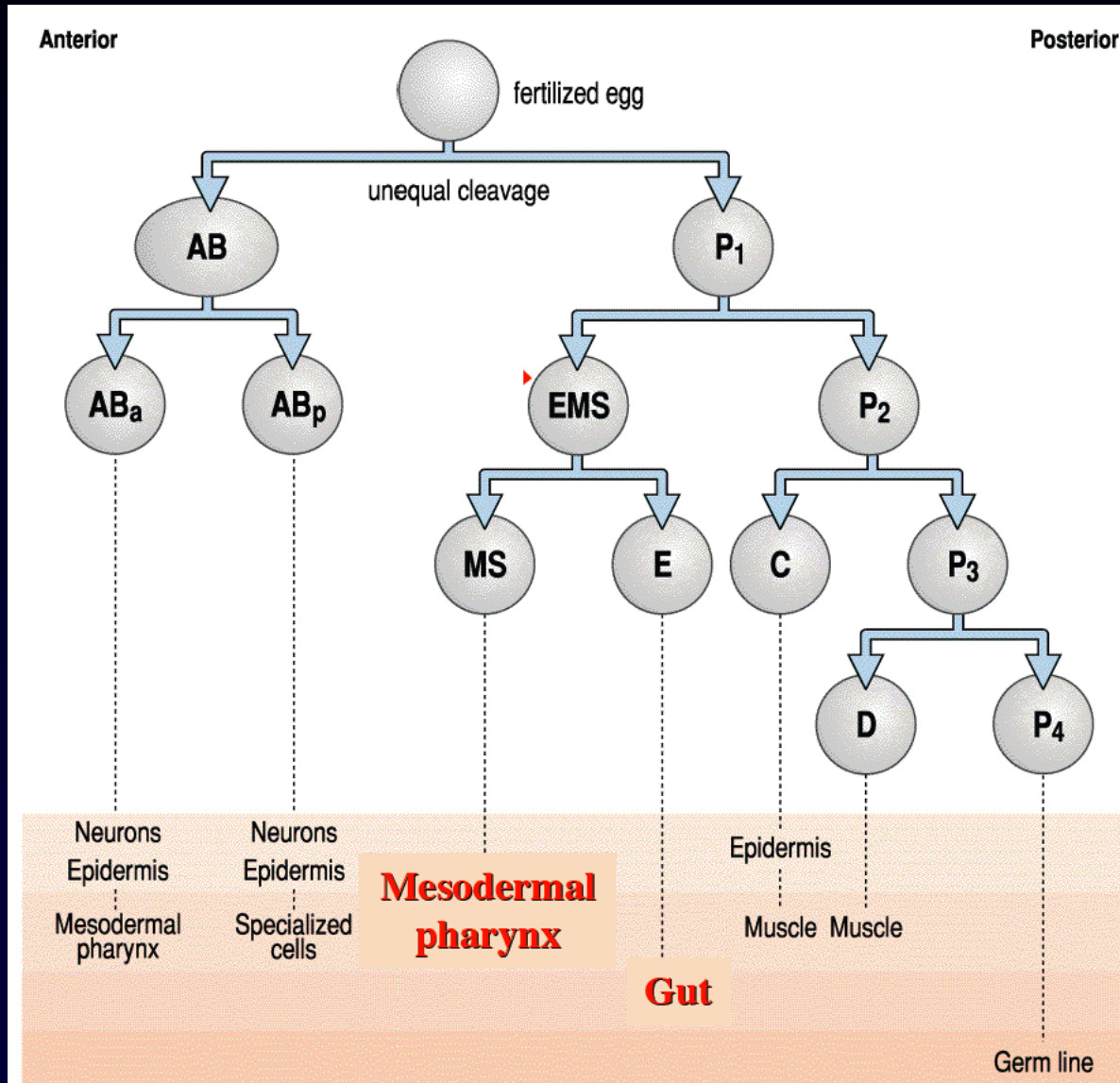
☒ οι απόγονοι του AB σχηματίζουν μόνο μερικούς από τους κυτταρικούς τύπους που θα έδινε φυσιολογικά.



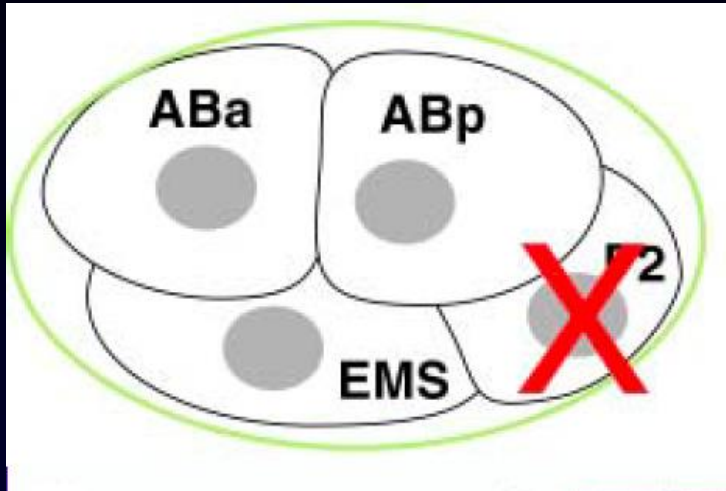
P1: αυτόνομη εξειδίκευση

AB: κατά συνθήκη εξειδίκευση

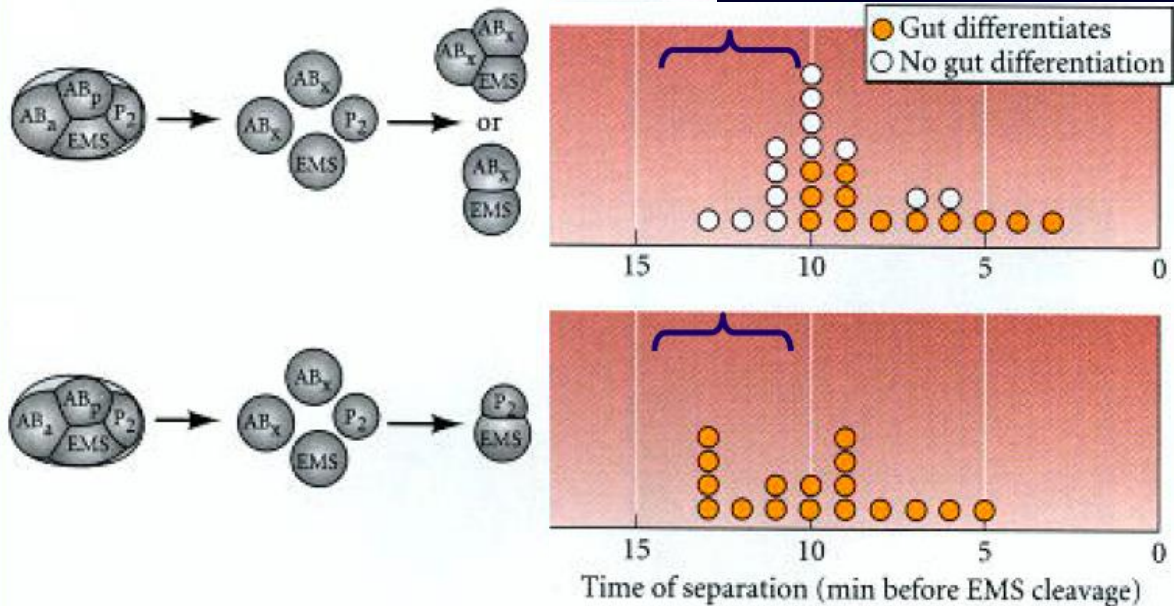
Κατά συνθήκη εξειδίκευση κατά την πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans*



Κατά συνθήκη εξειδίκευση κατά την πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans*



Απουσία του P2 το EMS διαιρείται συμμετρικά δίνοντας δύο MS

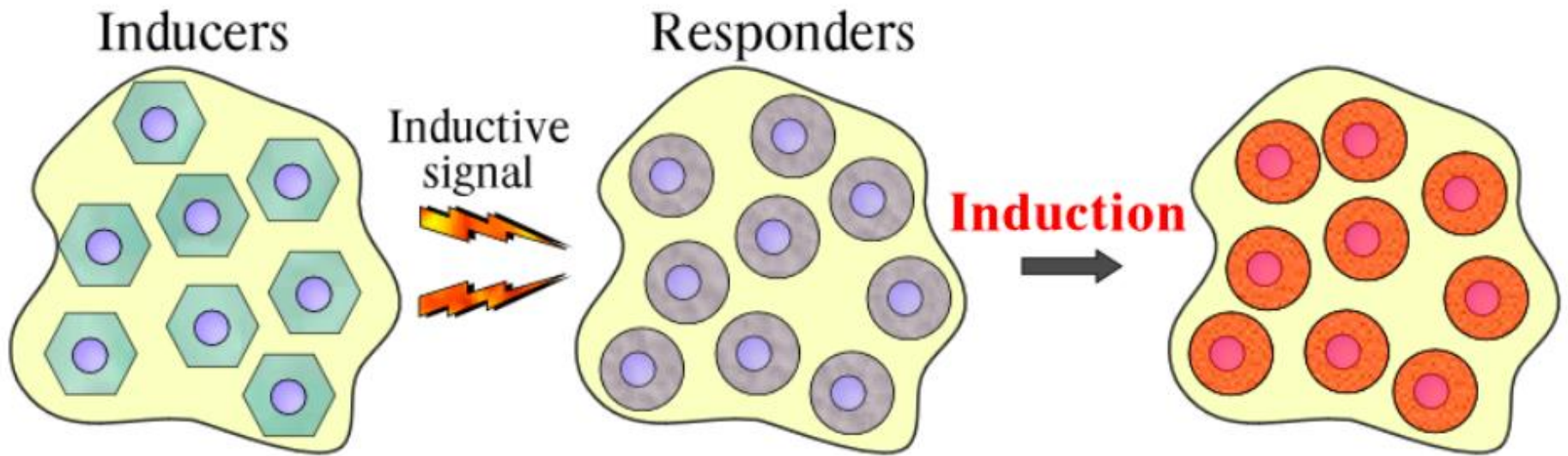


Ανασυνδυασμός EMS με ABa ή ABp ή και τα δύο

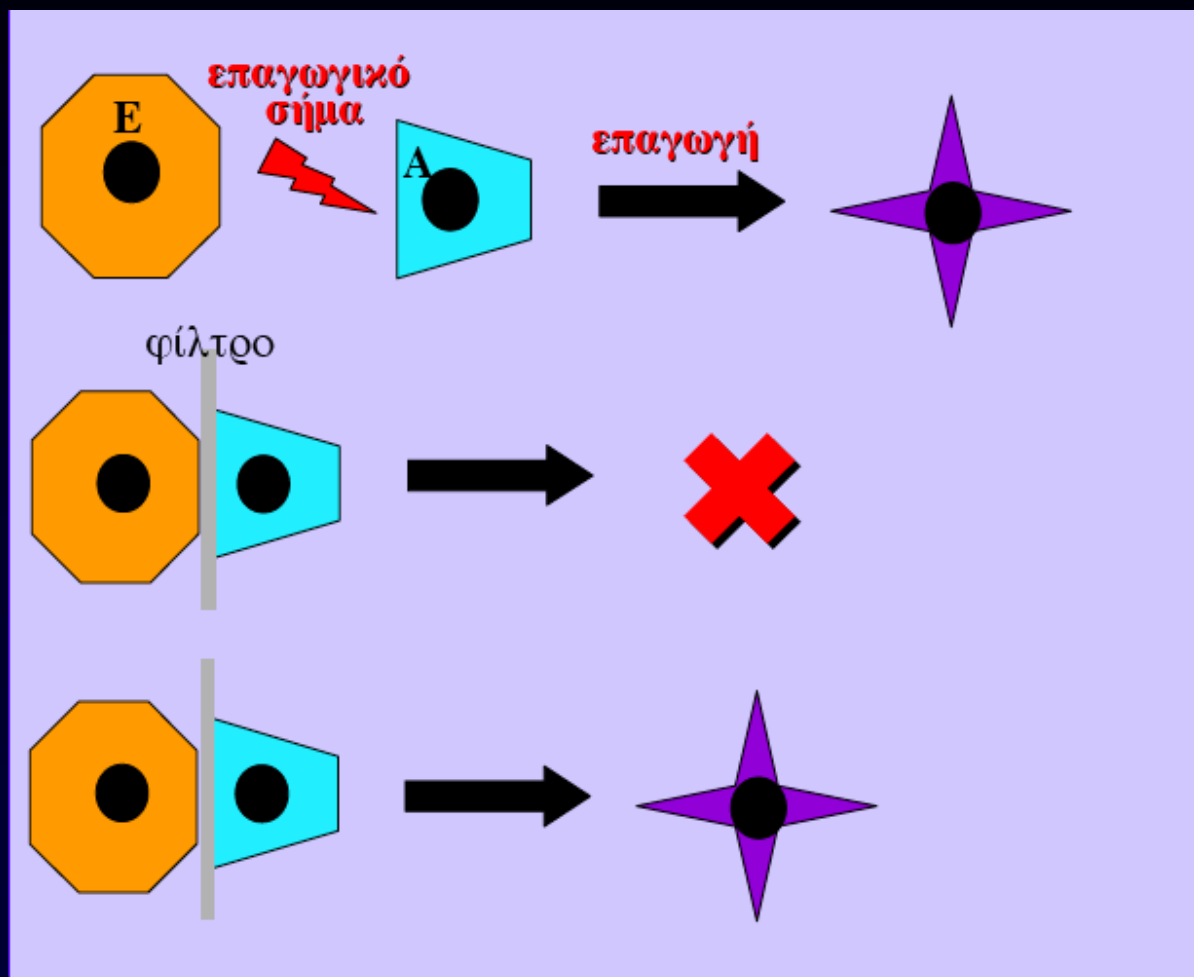
Ανασυνδυασμός EMS με P2

Επαγωγή

Επαγωγή (induction) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μια ομάδα κυττάρων του εμβρύου που ονομάζονται επαγωγείς μεταβιβάζουν σήματα σε μια δεύτερη ομάδα που ονομάζονται αποδέκτες επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τη διαφοροποίησή τους.



Ποια είναι η φύση των επαγωγικών σημάτων;



Τα επαγωγικά γεγονότα που διεκπεραιώνονται από διαχυτά μόρια χαρακτηρίζονται ως παρακρινή (paracrine). Τα επαγωγικά φαινόμενα που εξαρτώνται από την κυτταρική επαφή χαρακτηρίζονται ως αντικρινή (juxtacrine). Τα εκκρινόμενα επαγωγικά σήματα ονομάζονται παρακρινείς παράγοντες ή παράγοντες αύξησης και διαφοροποίησης.

Ποια είναι η φύση των επαγωγικών σημάτων;

Η επαγωγή επιτελείται από συντηρημένες οικογένειες παρακρινών παραγόντων:

- Οικογένεια FGF (fibroblast growth factor- παράγοντας αύξησης ινοβλαστών).
- Οικογένεια Hedgehog.
- Οικογένεια TGFβ (Transforming growth factor β- παράγοντας μετασχηματισμού β).
- Οικογένεια Wnt (wingless-integrated).

Οι παρακρινείς παράγοντες αναγνωρίζονται από υποδοχείς και ενεργοποιούν μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Ανάπτυξη και μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Κατά την ανάπτυξη ενεργοποιούνται από τους παρακρινείς παράγοντες μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συναντώνται και σε άλλες διαδικασίες όπως:

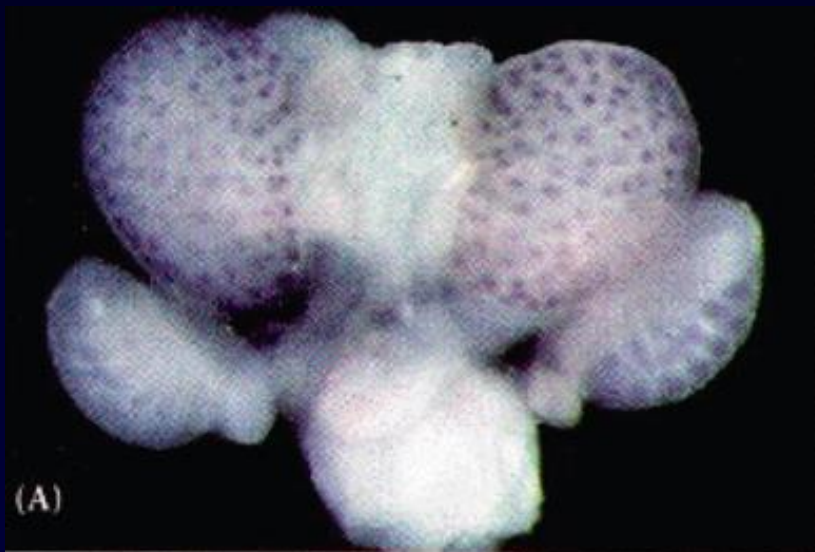
- Μονοπάτια υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης
- Μονοπάτια που ενεργοποιούν τους SMAD
- Μονοπάτια JAK-STAT

αλλά και μονοπάτια που ενέχονται κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη:

- Μονοπάτι Wnt
- Μονοπάτι hedgehog

Η οικογένεια παραγόντων Wnt

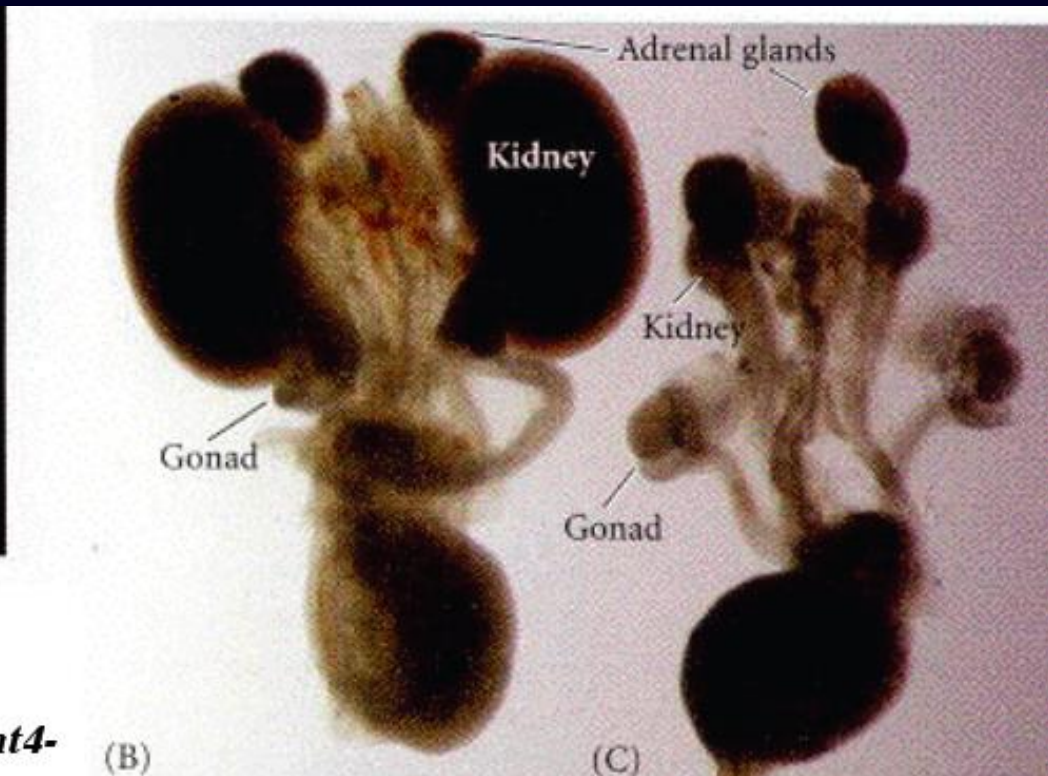
- Μεγάλη οικογένεια παραγόντων που περιλαμβάνει πάνω από 11 μέλη στα σπονδυλόζωα – πάνω από 15 στον άνθρωπο
- Παλιά οικογένεια (μέλη της απαντούν τόσο στα πρωτοστόμια όσο και τα δευτεροστόμια
- Γλυκοπρωτεΐνες με υψηλή περιεκτικότητα σε κατάλοιπα κυστεΐνης-αδιάλυτοι
- Ενέχονται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες.



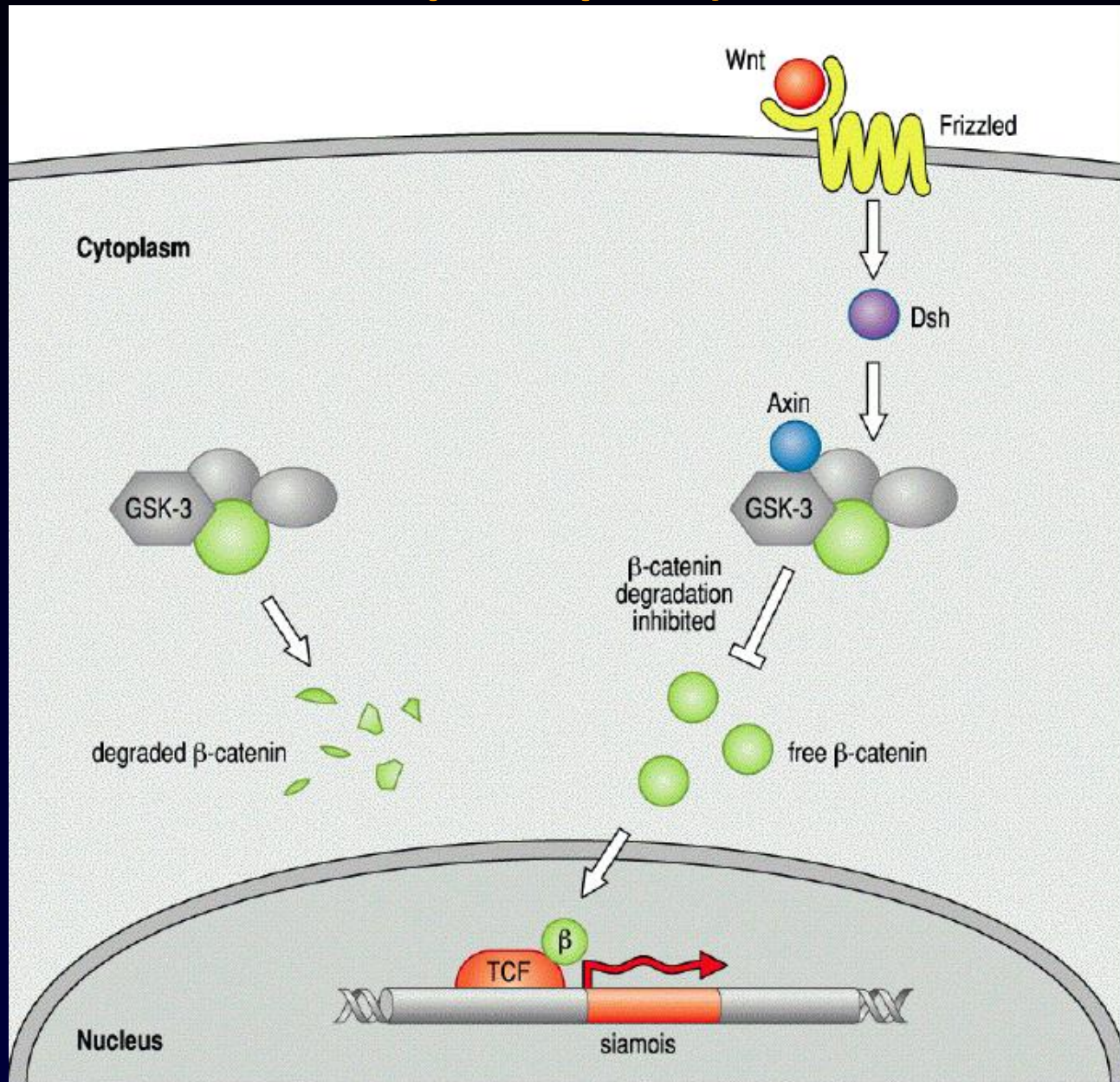
A: E14 ISH *Wnt4* urogenital organs

B: urogenital rudiment newborn wt

C: urogenital rudiment newborn *wnt4*⁻/*wnt4*⁻

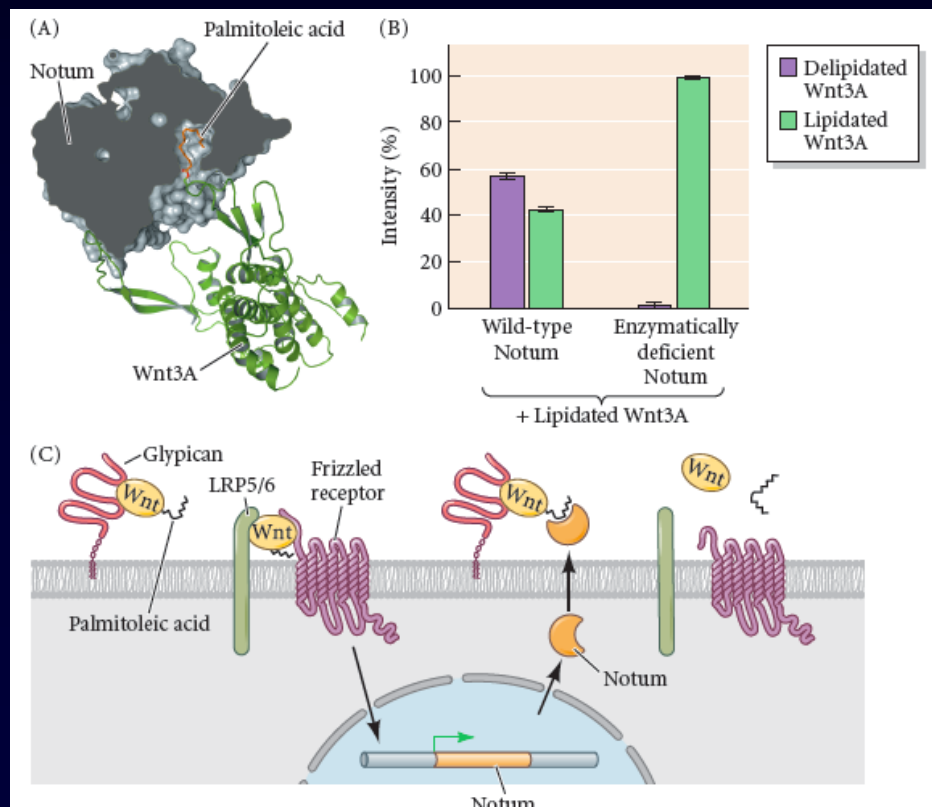


Το κανονικό μονοπάτι Wnt (παρακρινές επαγωγικό φαινόμενο)



Το μονοπάτι Wnt

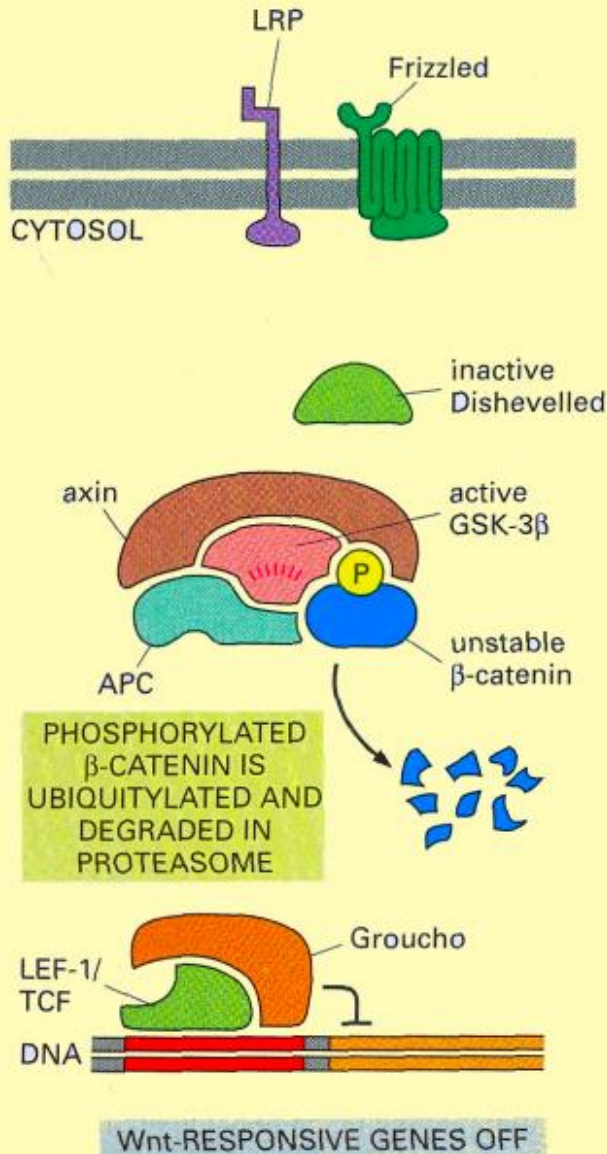
- Οι παράγοντες Wnt συντίθενται στο ER και τροποποιούνται με την προσθήκη λιπιδίων (παλμιτικό & παλμιτολεϊκό) από την *O*-ακετυλοτρανσφεράση Porcupine.
- Απουσία Porcupine οι Wnt δεν εκκρίνονται και συσσωρεύονται στο ER.
- Η έκκριση από την κυτταρική μεμβράνη γίνεται είτε με απλή διάχυση, ή με εξωσώματα ή με λιποπρωτεϊνικά σωμάτια.
- Οι Wnt (με τα λιπίδια) προσδένονται τόσο στη γλυκικήνη (πρωτεογλυκάνη) οπότε περιορίζεται η διάχυση τους ή στον υποδοχέα.
- Η Notum (υδρολάση) ενεργοποιείται από το μονοπάτι Wnt και δρα αποκόπτοντας τα λιπίδια.
- Αρνητική ανάδραση!! Μείωση σηματοδότησης.
Το *Notum* επάγεται από τη σηματοδότηση Wnt.
- Μόρια ανταγωνιστές: Secreted frizzled-related protein (Sfrp), Wnt inhibitory factor (Wif), Dickkopf (Dkk)



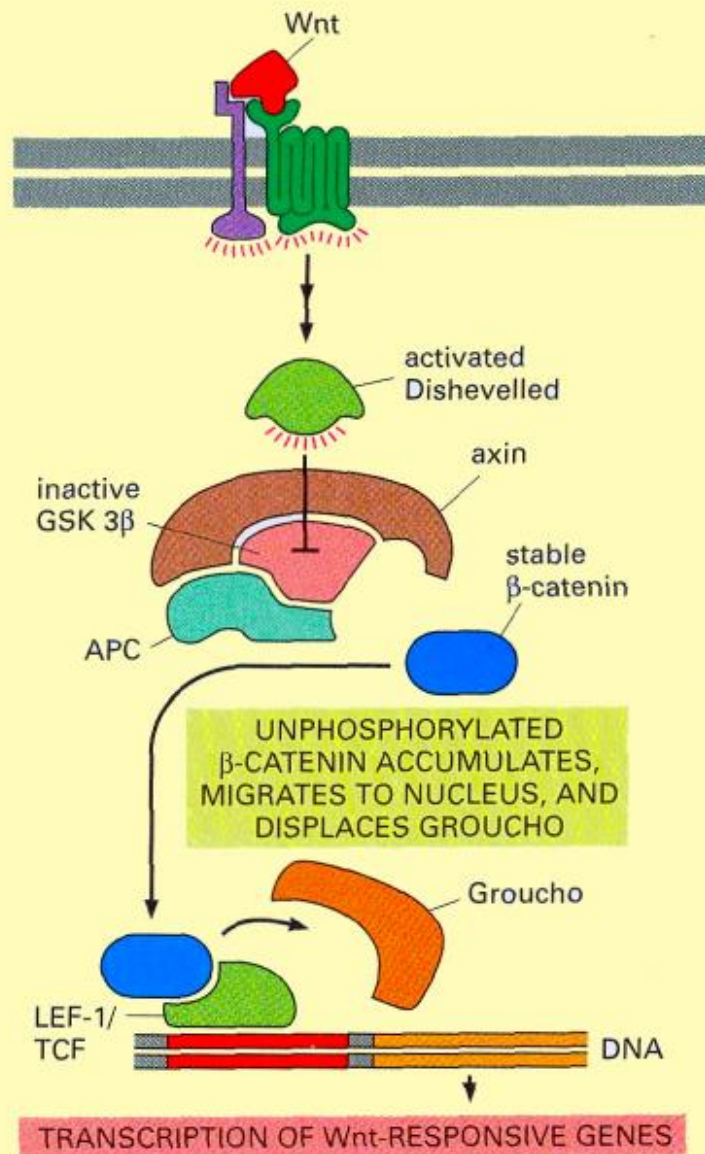
(A : Gilbert & Barresi; B:Kakugawa et al. 2015.)

Το κανονικό μονοπάτι Wnt

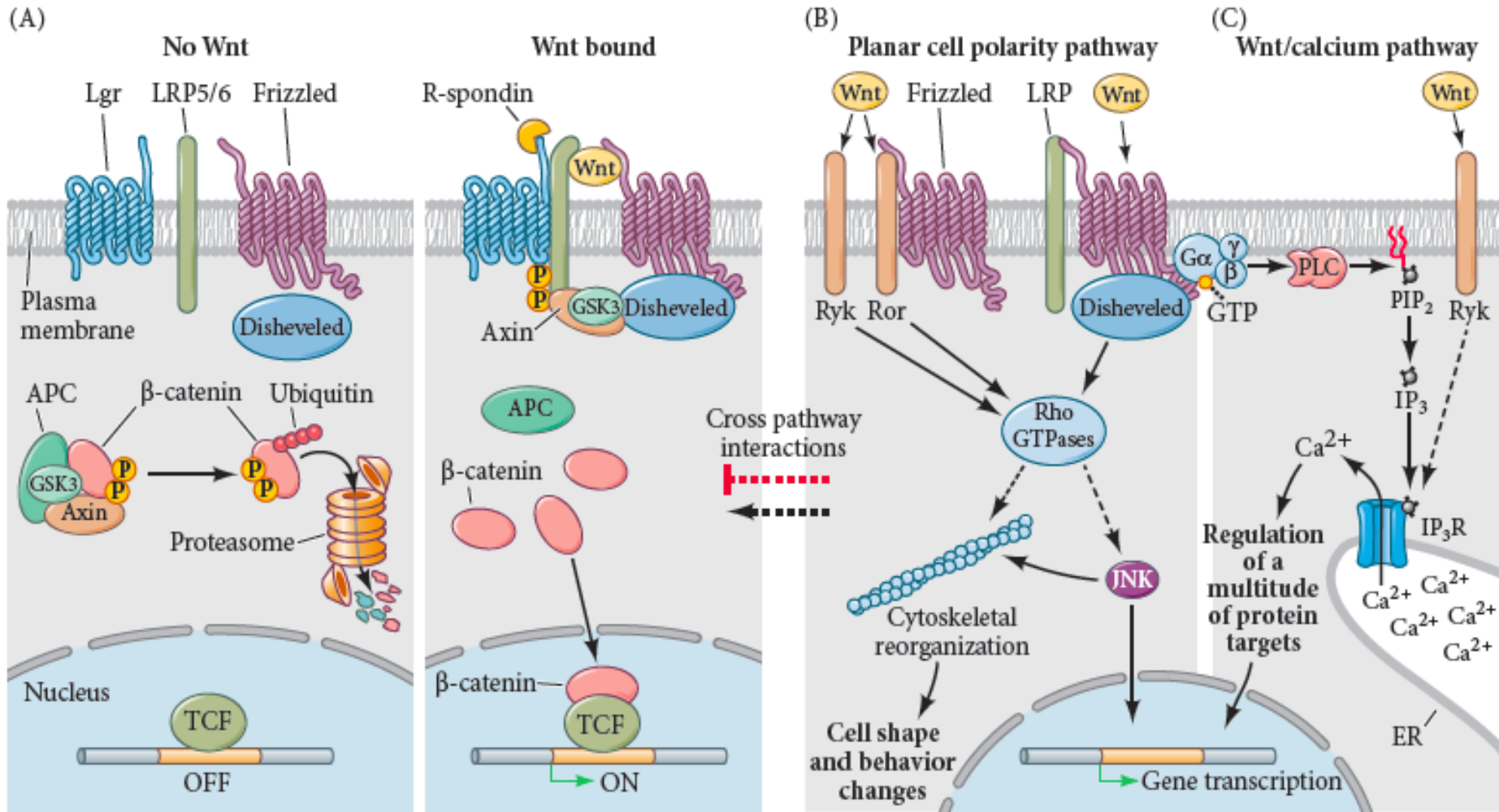
(A) WITHOUT Wnt SIGNAL



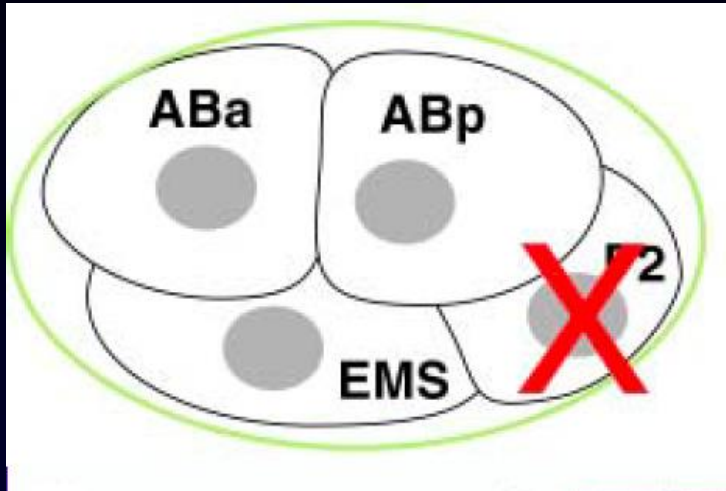
(B) WITH Wnt SIGNAL



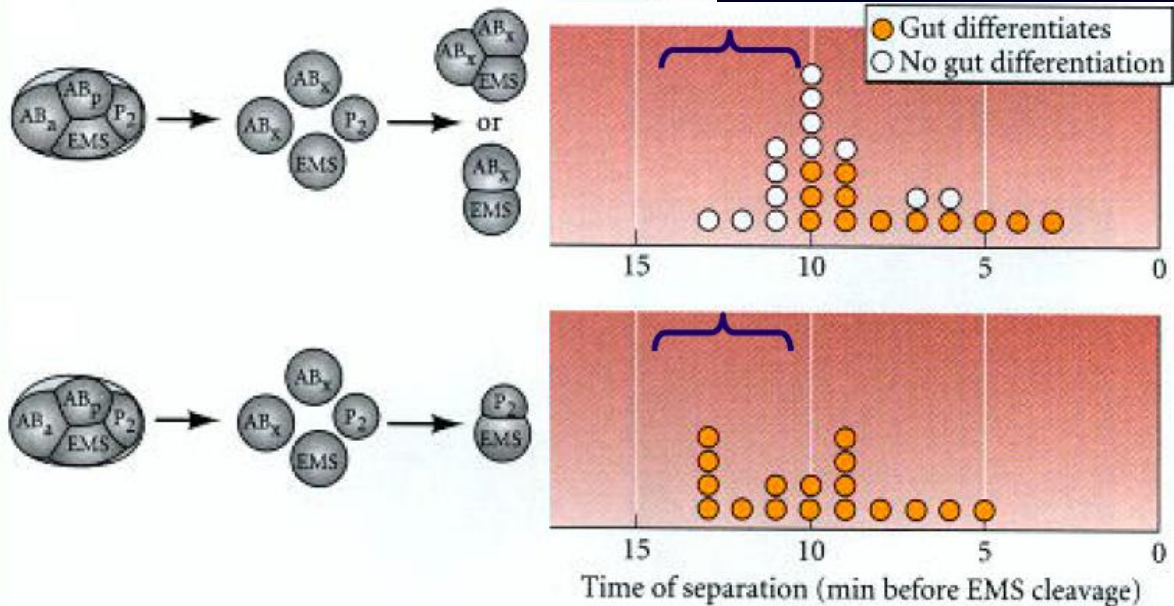
Τα μονοπάτια Wnt (κανονικό, πολικότητας, ασβεστίου)



Κατά συνθήκη εξειδίκευση κατά την πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans*



Απουσία του P2 το EMS διαιρείται συμμετρικά δίνοντας δύο MS

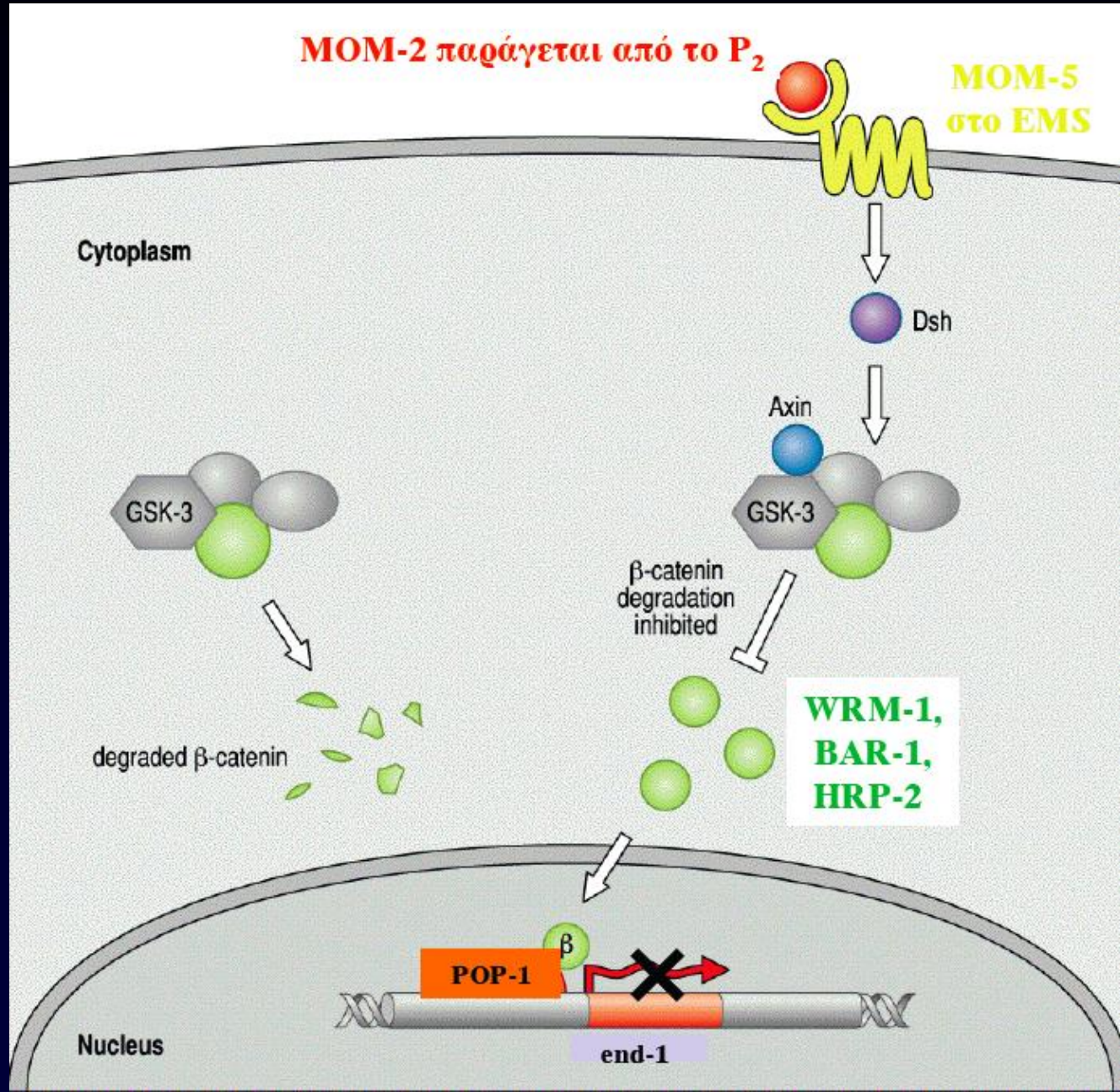


Ανασυνδυασμός EMS με ABa ή ABp ή και τα δύο

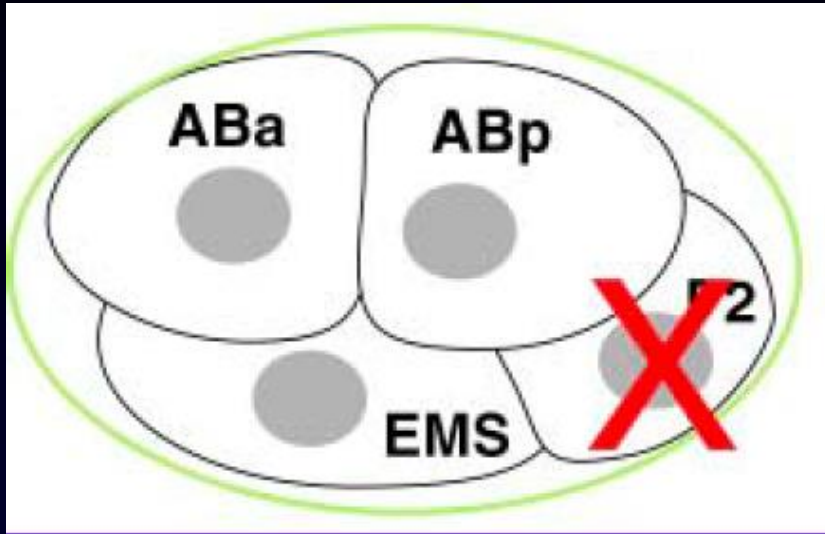
Ανασυνδυασμός EMS με P2

Το Ε σχηματίζεται από το τμήμα του EMS που είναι σε επαφή με το P2

Μονοπάτι Wnt και εξειδίκευση στον *C.elegans*

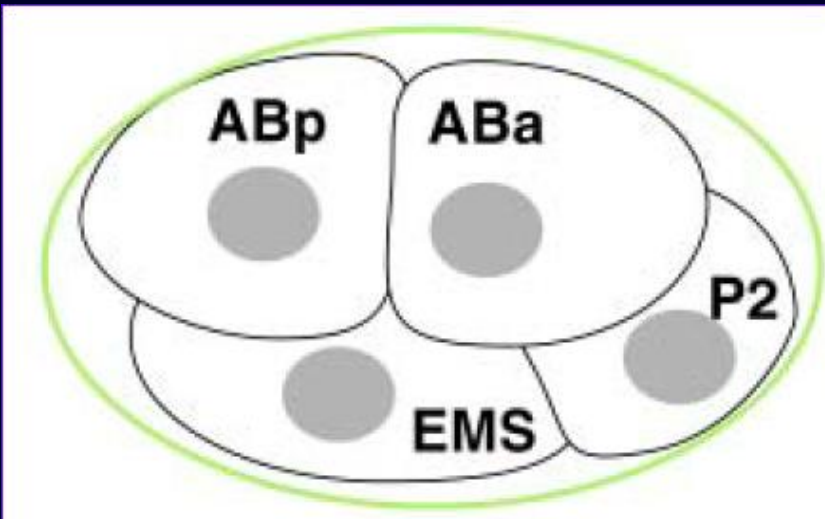


Κατά συνθήκη εξειδίκευση βλαστομεριδίων κατά την πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans*



Καταστροφή του P2

ABp δεν δίνει όλους τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά θα έδινε

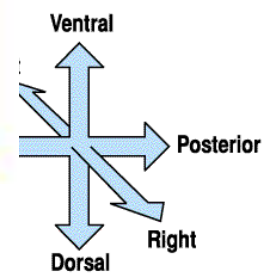
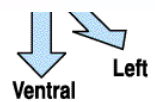
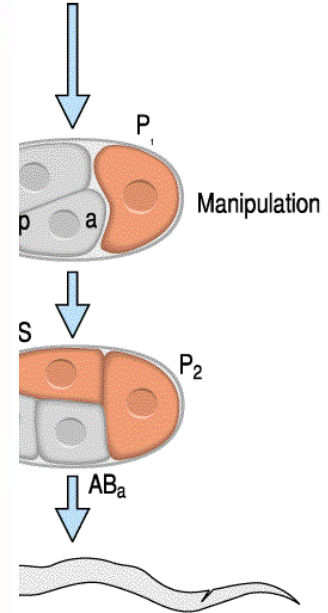
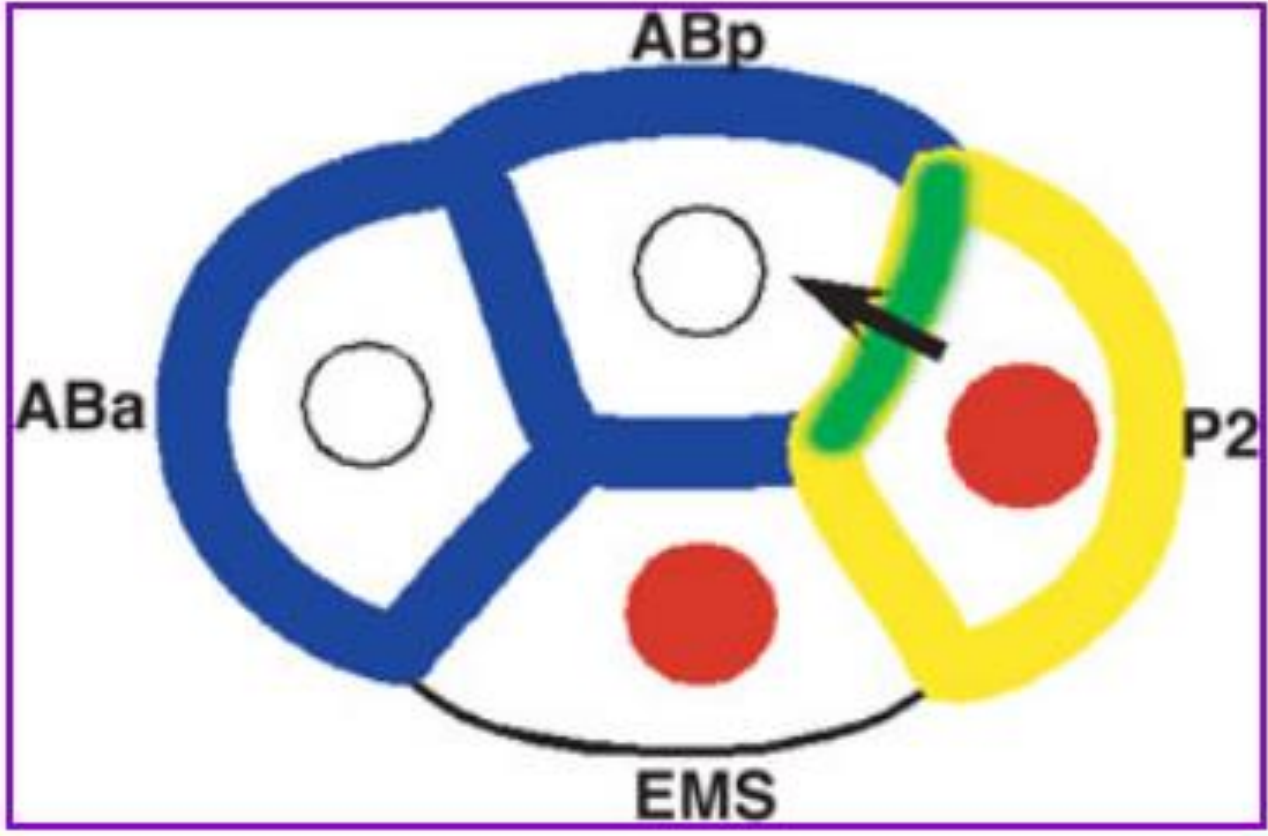
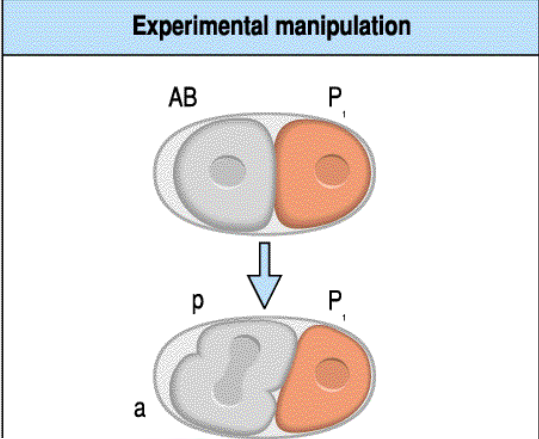
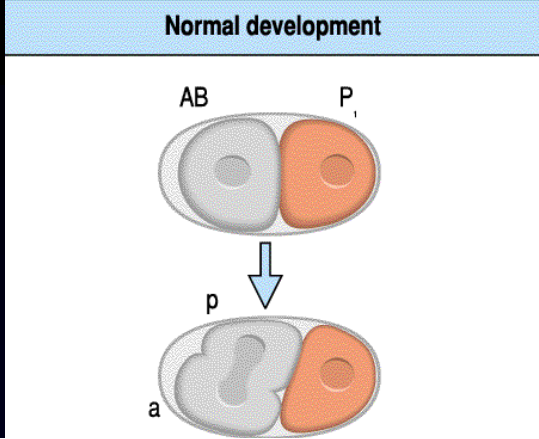


Αντιμετάθεση ABa, ABp

ABa δίνει όλους τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά δίνει το ABp

Για την εξειδίκευση του ABp απαιτείται επαφή με το P2

Ο σχηματισμός του ραχιοκοιλιακού άξονα

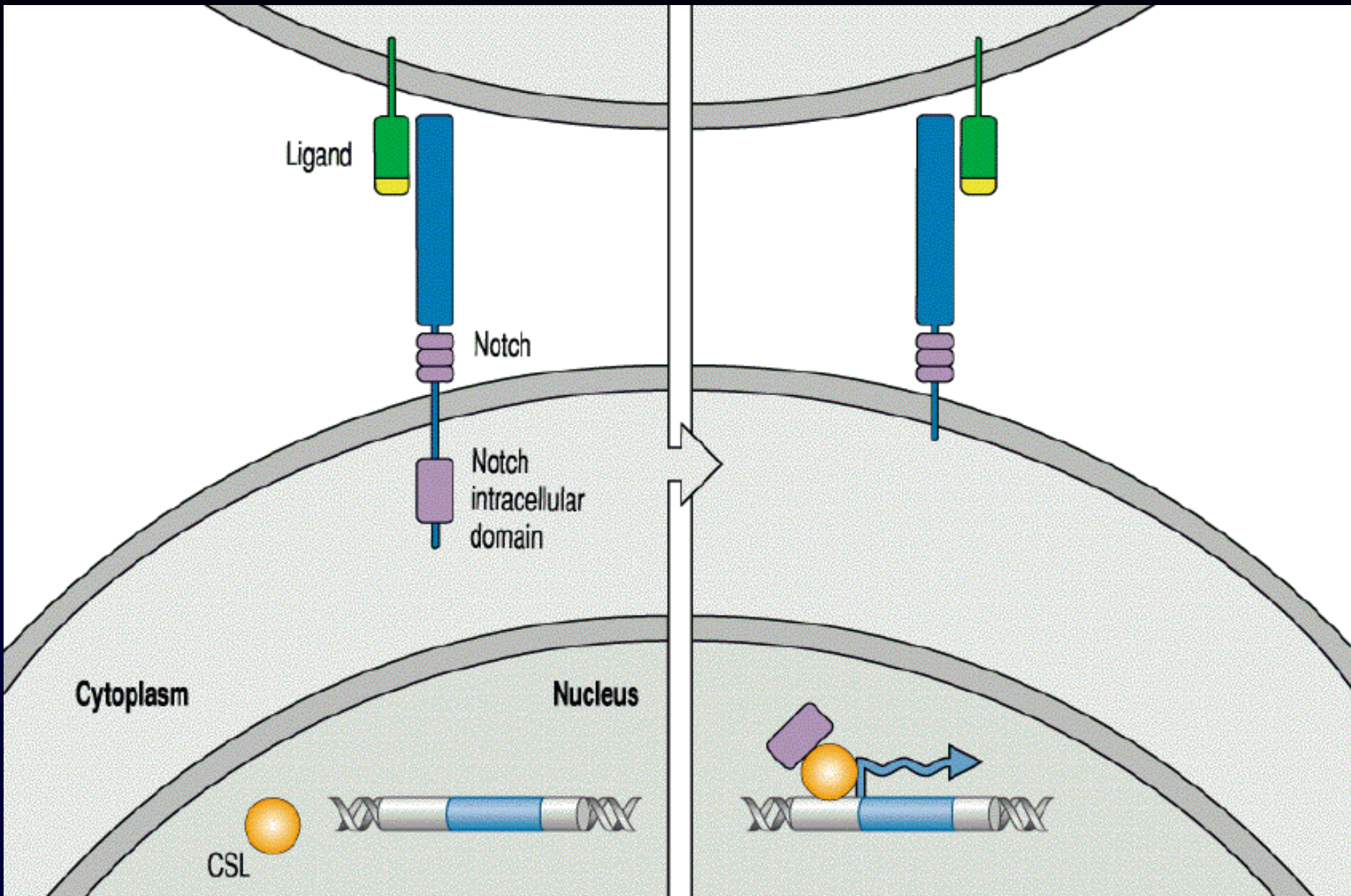


εγκαθιδρύει
κυττάρων.

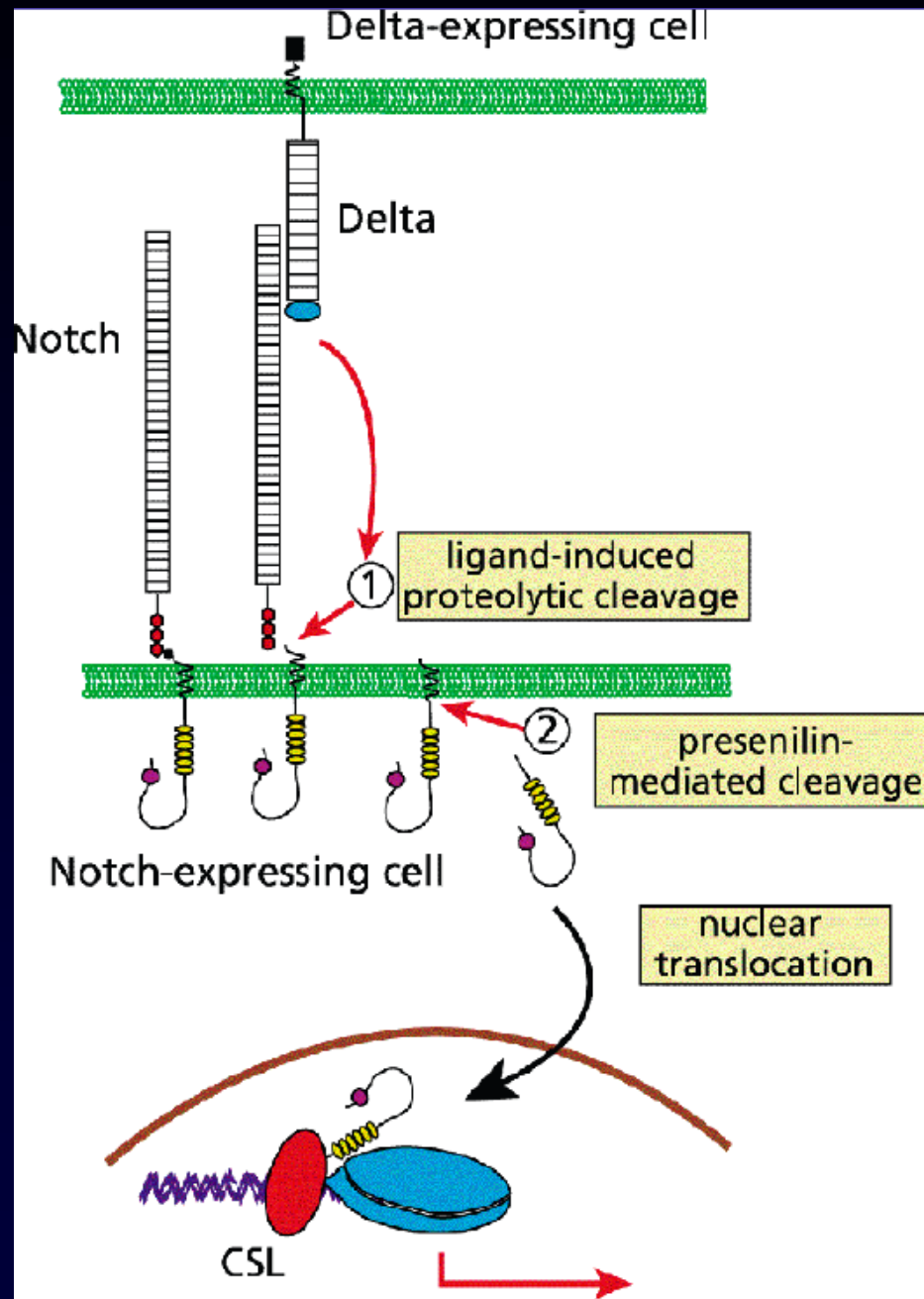
Μηχανική
αντιστροφή
άξονα.

ABp: καθορίζει

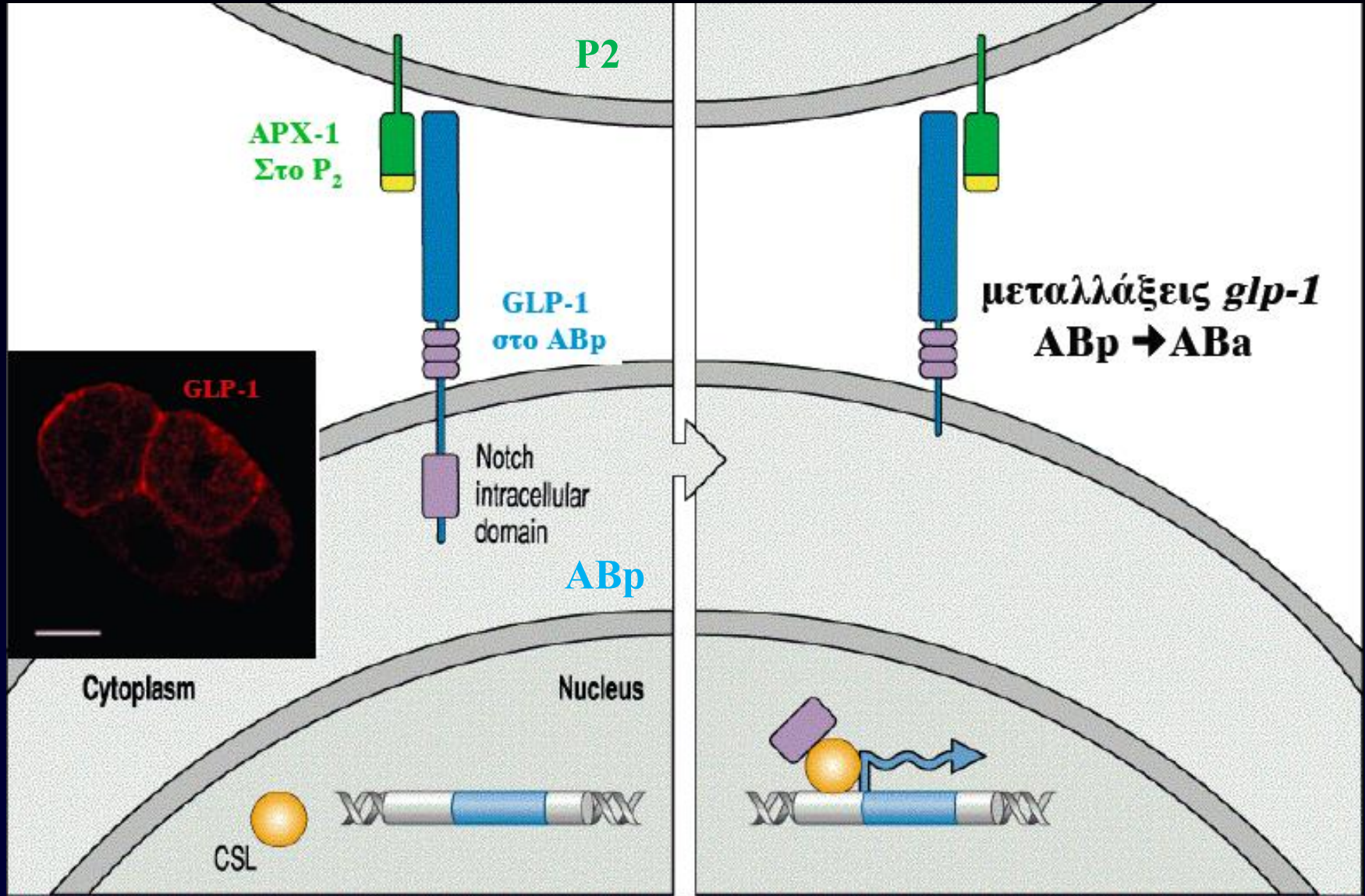
Το μονοπατι Notch (αντικρινές επαγωγικό φαινόμενο)



Το μονοπάτι Notch



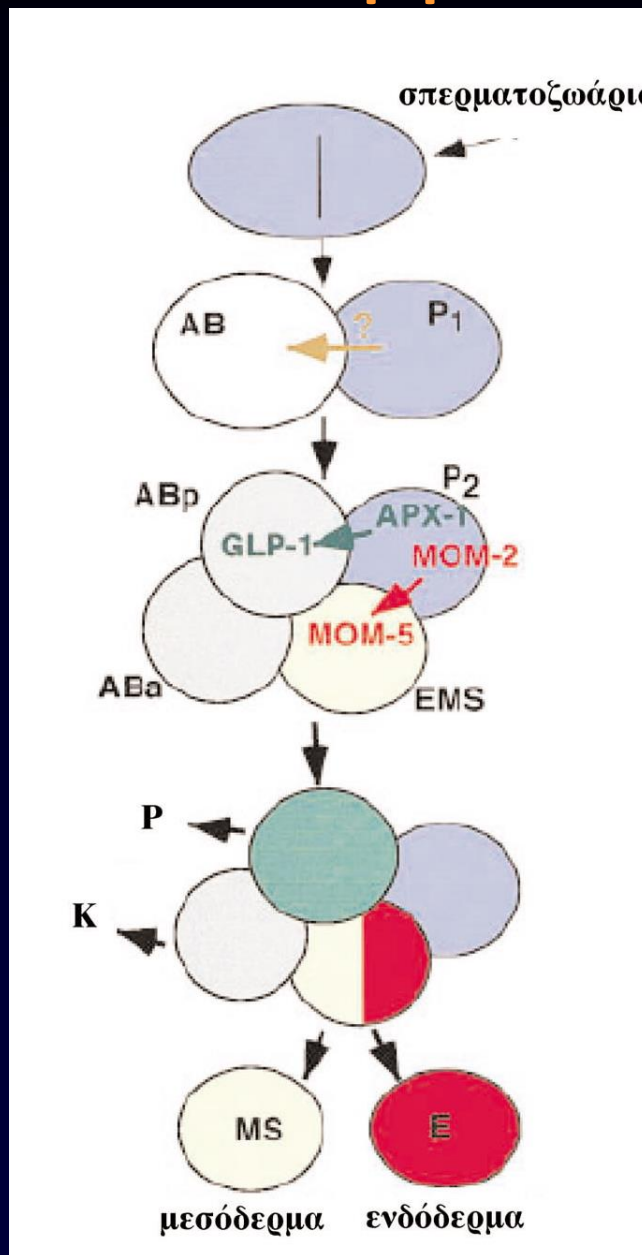
Το μονοπάτι Notch και η τύχη του ABp



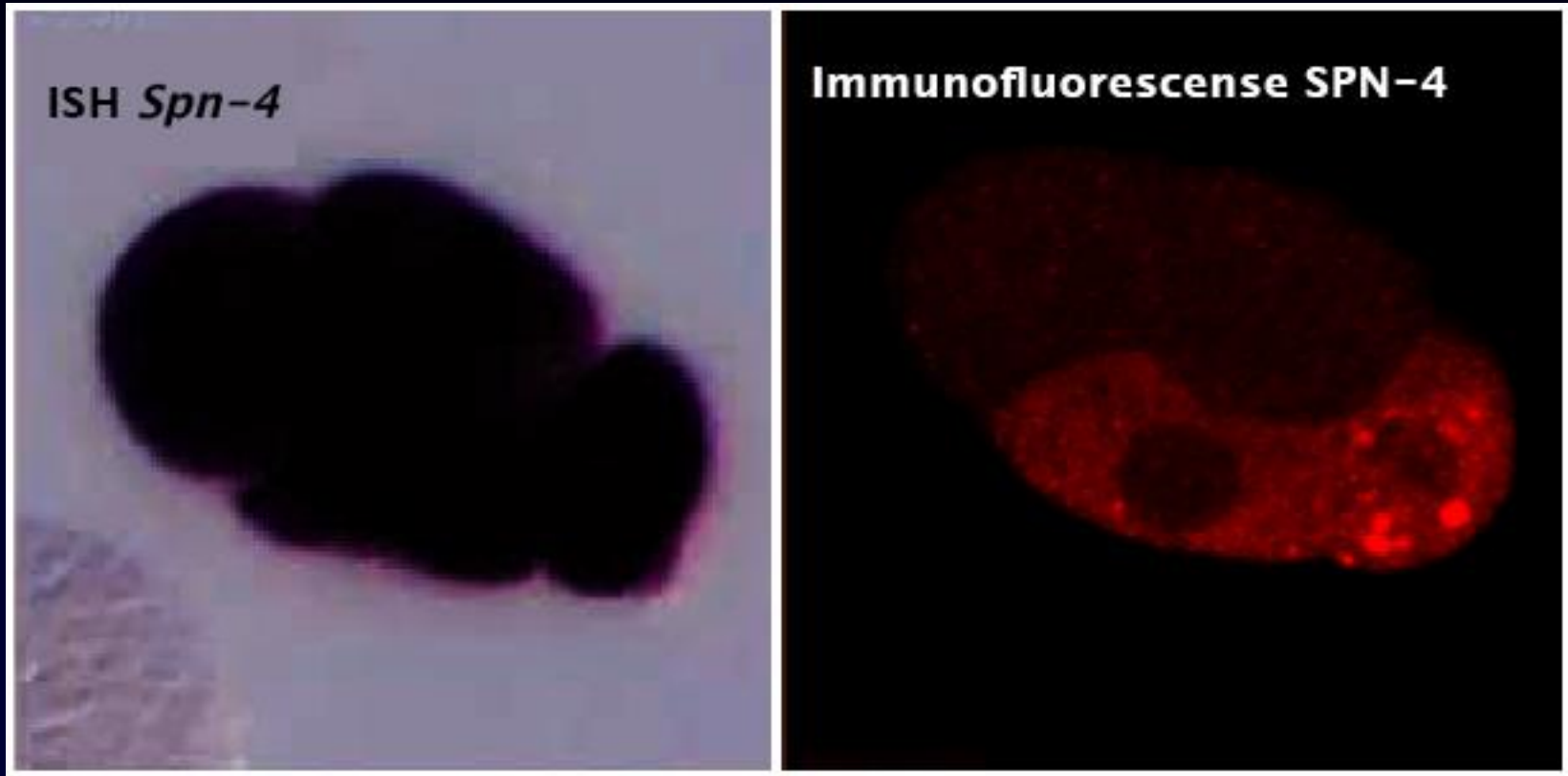
Η αλληλεπίδραση GLP-1/APX-1 δημιουργεί ασυμμετρία και καθορίζει το ραχιαίο-κοιλιακό άξονα

Εγκαθίδρυση Ραχαιοκοιλιακού άξονα

Σύνοψη

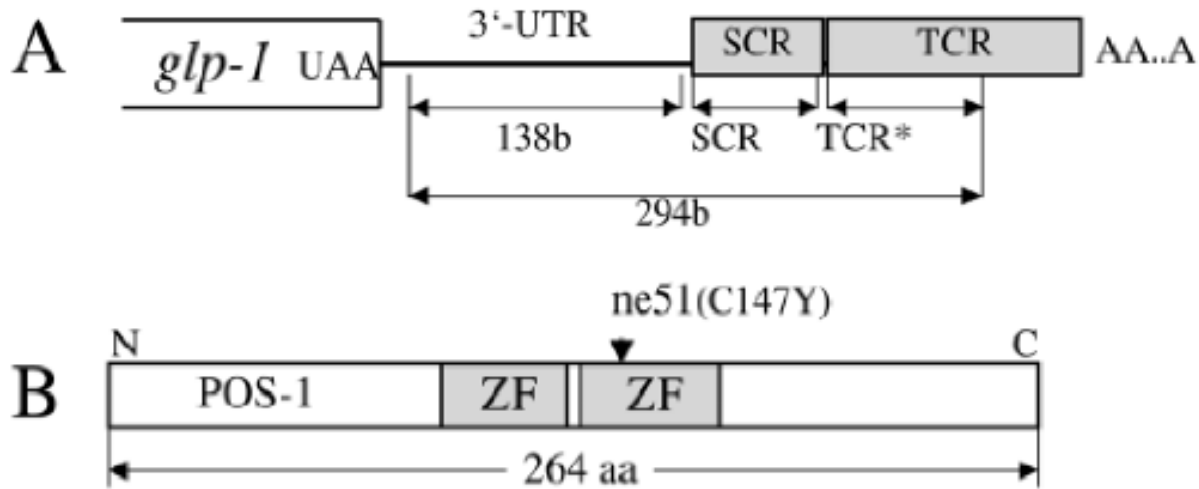


Μετάφραση μητρικών mRNA

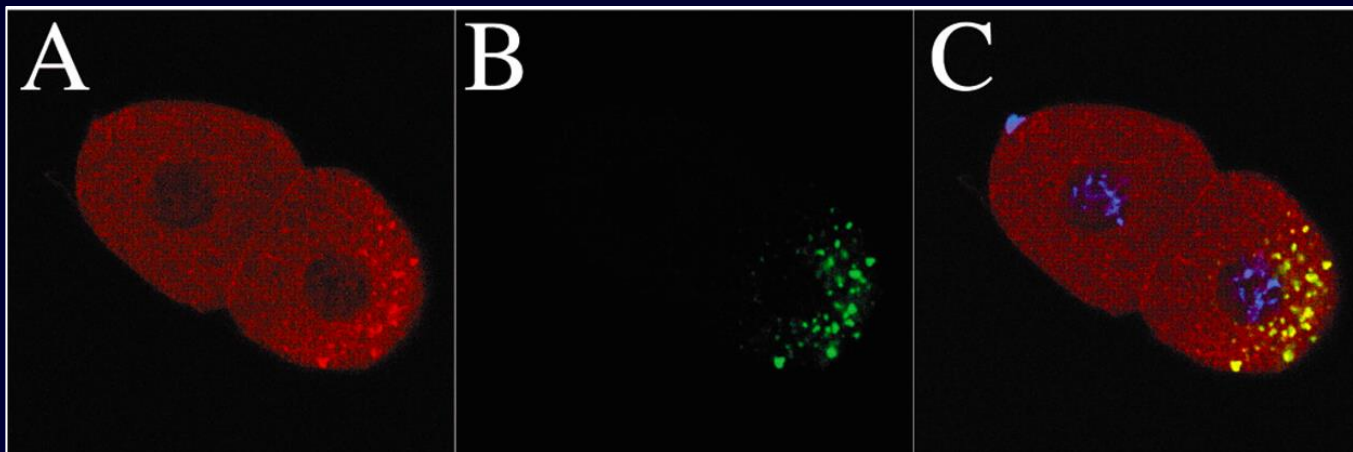


Πολλά μητρικά μηνύματα κατανέμονται ομοιόμορφα αλλά μεταφράζονται διαφορεικά στο έμβryo!

Μετάφραση μητρικών mRNA

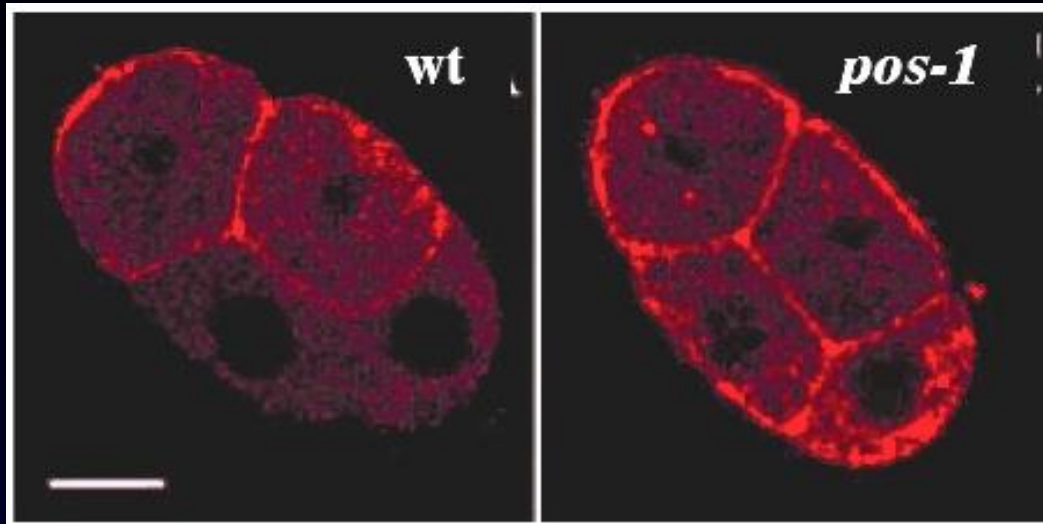


Στην 3' UTR του mRNA *glp1* εντοπίζονται ρυθμιστικές αλληλουχίες που ελέγχουν τη μετά-φραση του *glp1* και αναγνωρίζονται από την POS-1 και τη SPN-4.



Co-localization of SPN-4 and the P granules. Wild-type embryos were stained with an anti-SPN-4 antibody (red, A) and mabK76, which recognizes P granules (green, B). (C) is a merged image and includes a DAPI-stained image (blue). The granular staining of the anti-SPN-4 antibody matches the mabK76 staining pattern of the P granules (C, yellow dots).
doi: 10.1242/dev.00469

Μετάφραση μητρικών mRNA



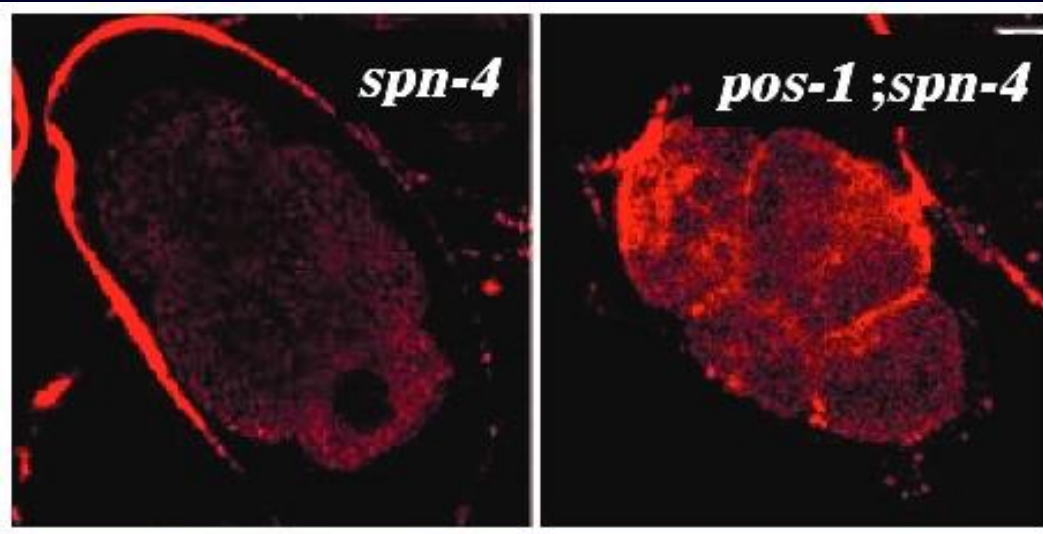
Κατανομή της **GLP-1** σε έμβρυα:

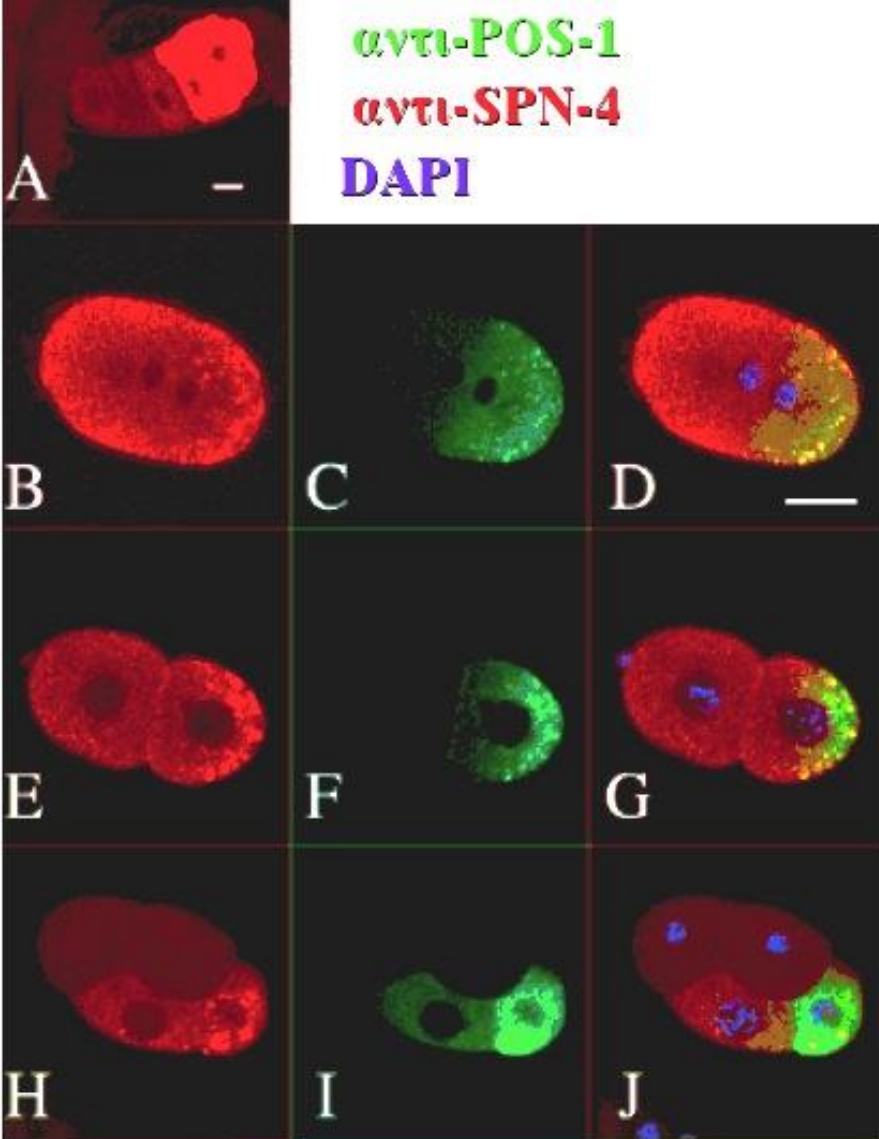
Άγριου τύπου

Απουσία προϊόντος *pos-1*

Απουσία προϊόντος *spr-4*

Απουσία προϊόντων *pos-1* και *spr-4*





αντι-POS-1
αντι-SPN-4
DAPI

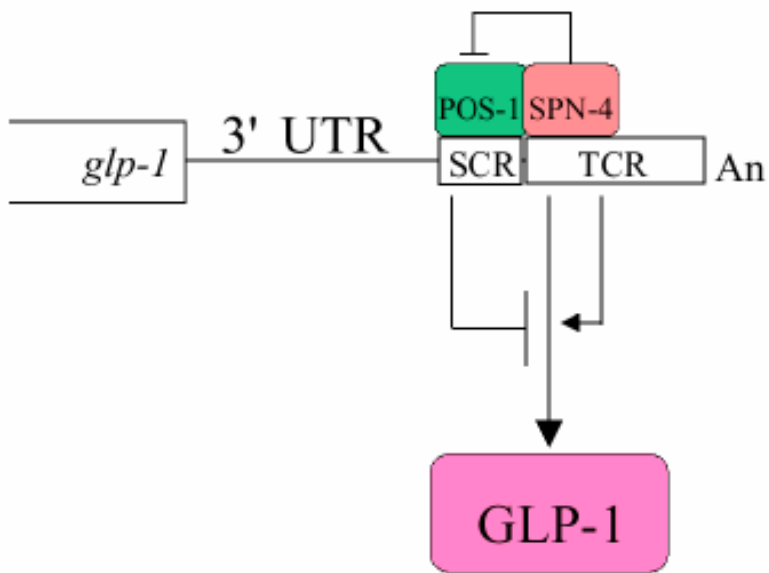
Μετάφραση μητρικών mRNA

Οι POS-1 και SPN-4 εκφράζονται στο αυγό και στο έμβρυο P0 στα οποία δεν εκφράζεται η GLP-1.

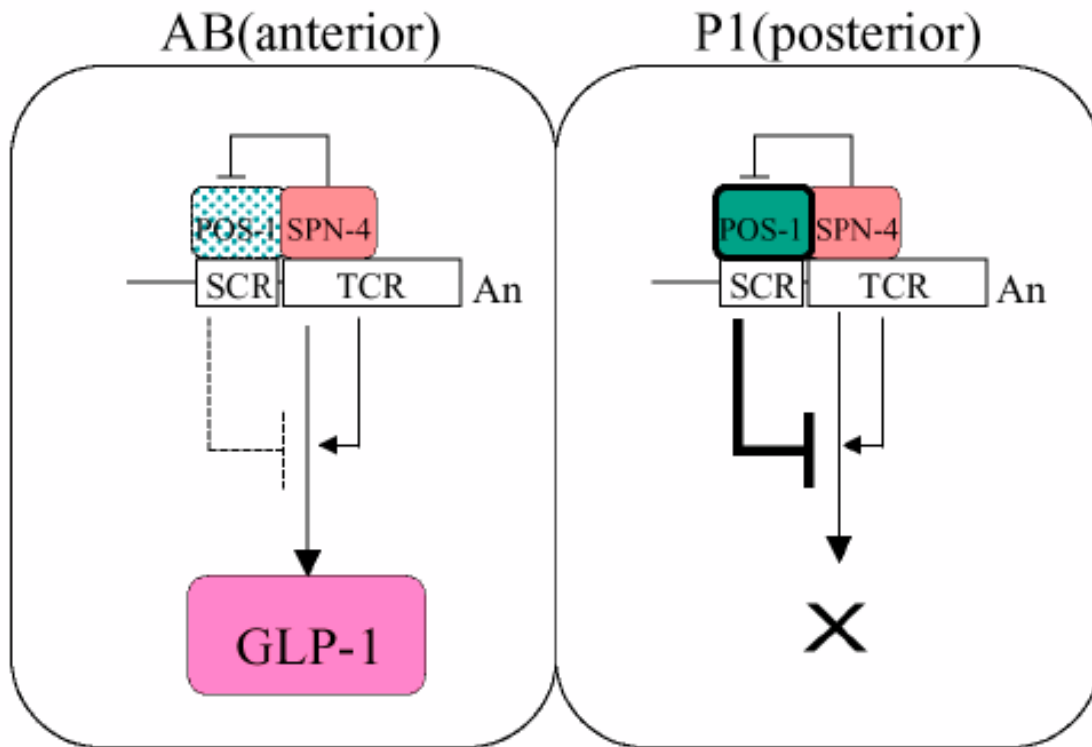


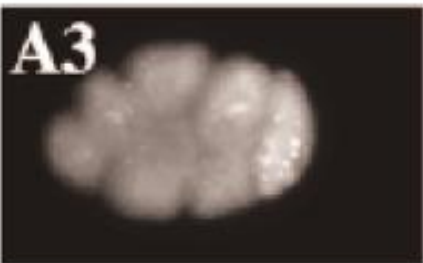
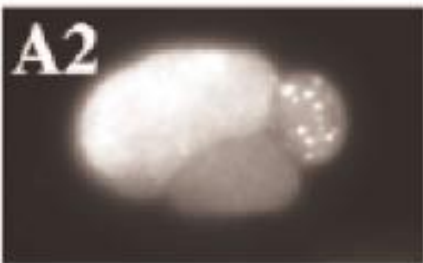
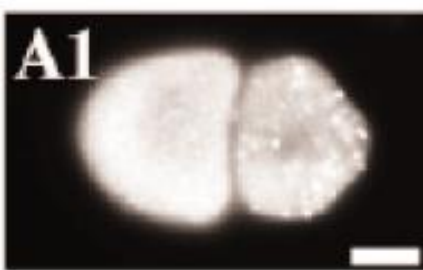
* Η POS-1 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και στα ABa, ABr!!

Μετάφραση μητρικών mRNA



Η SPN-4 ελέγχει και τη μεταφραση των μυνημάτων *skn-1* και *pal-1*.



A

Μετάφραση μητρικών mRNA

Μια σειρά από RNA-binding πρωτεΐνες ελέγχουν τη μετάφραση των μητρικών μυνημάτων.

B

uninjected



mex-3 (RNAi)

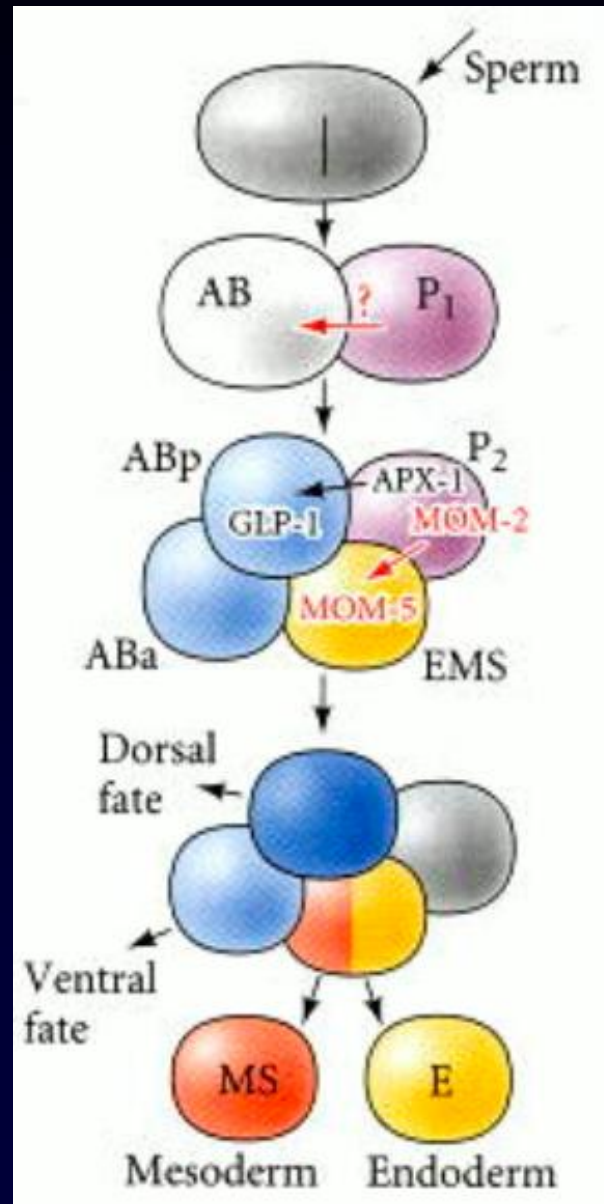
A: έκφραση της MEX-3

B: έκφραση της PAL-1 παρουσία ή απουσία της MEX-3

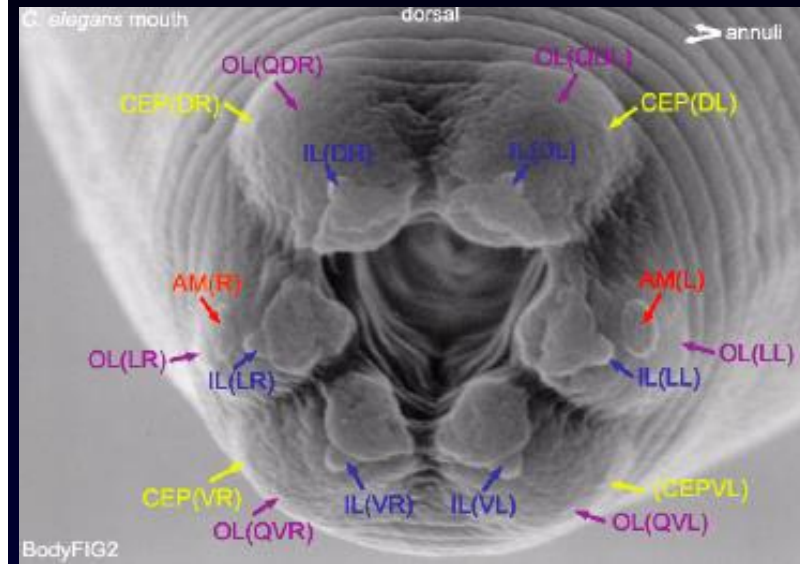
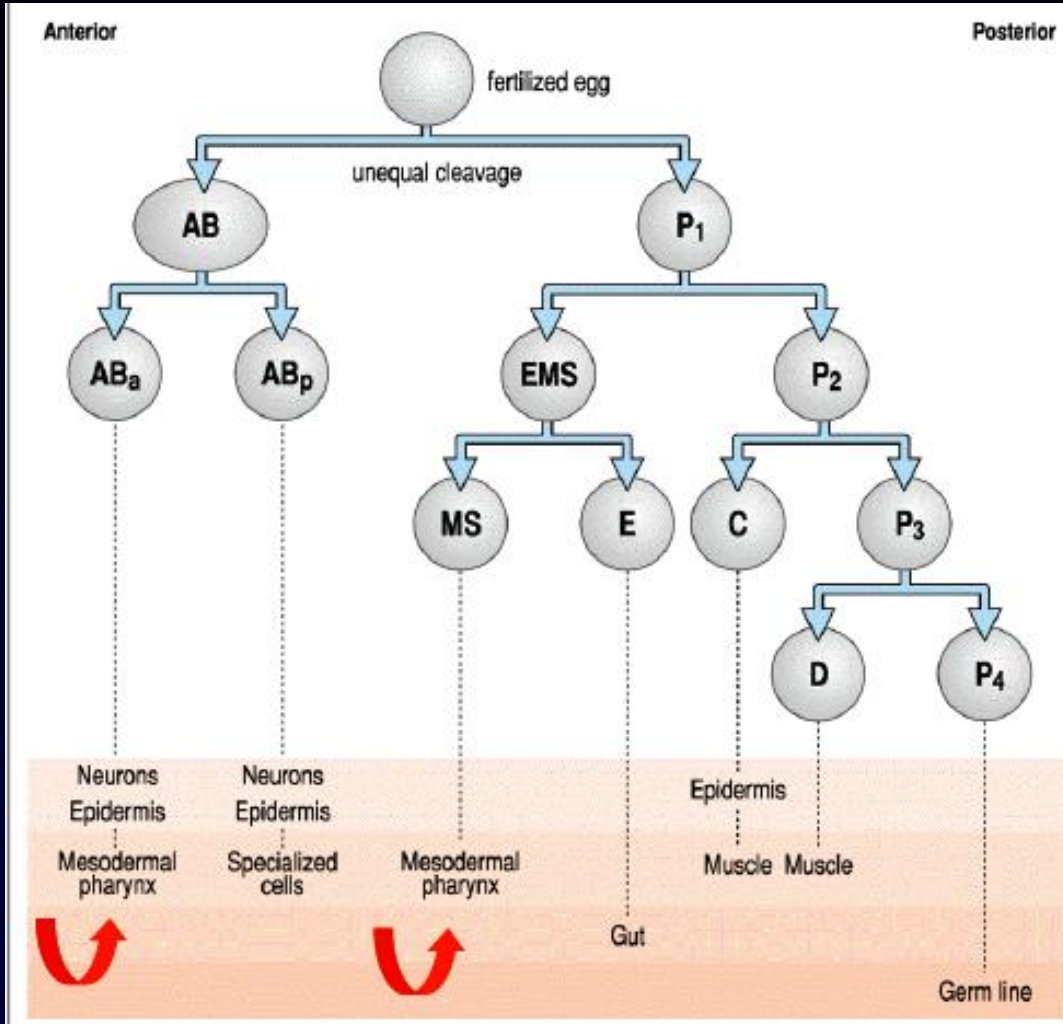
Πώς επηρεάζεται η PAL-1 όταν απουσιάζει η MEX-3?

Πώς ελέγχει η MEX-3 την έκφραση της PAL-1?

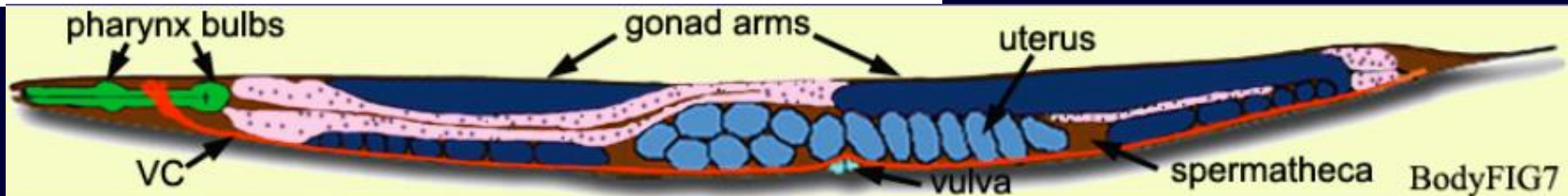
Κυτταρική επικοινωνία στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων



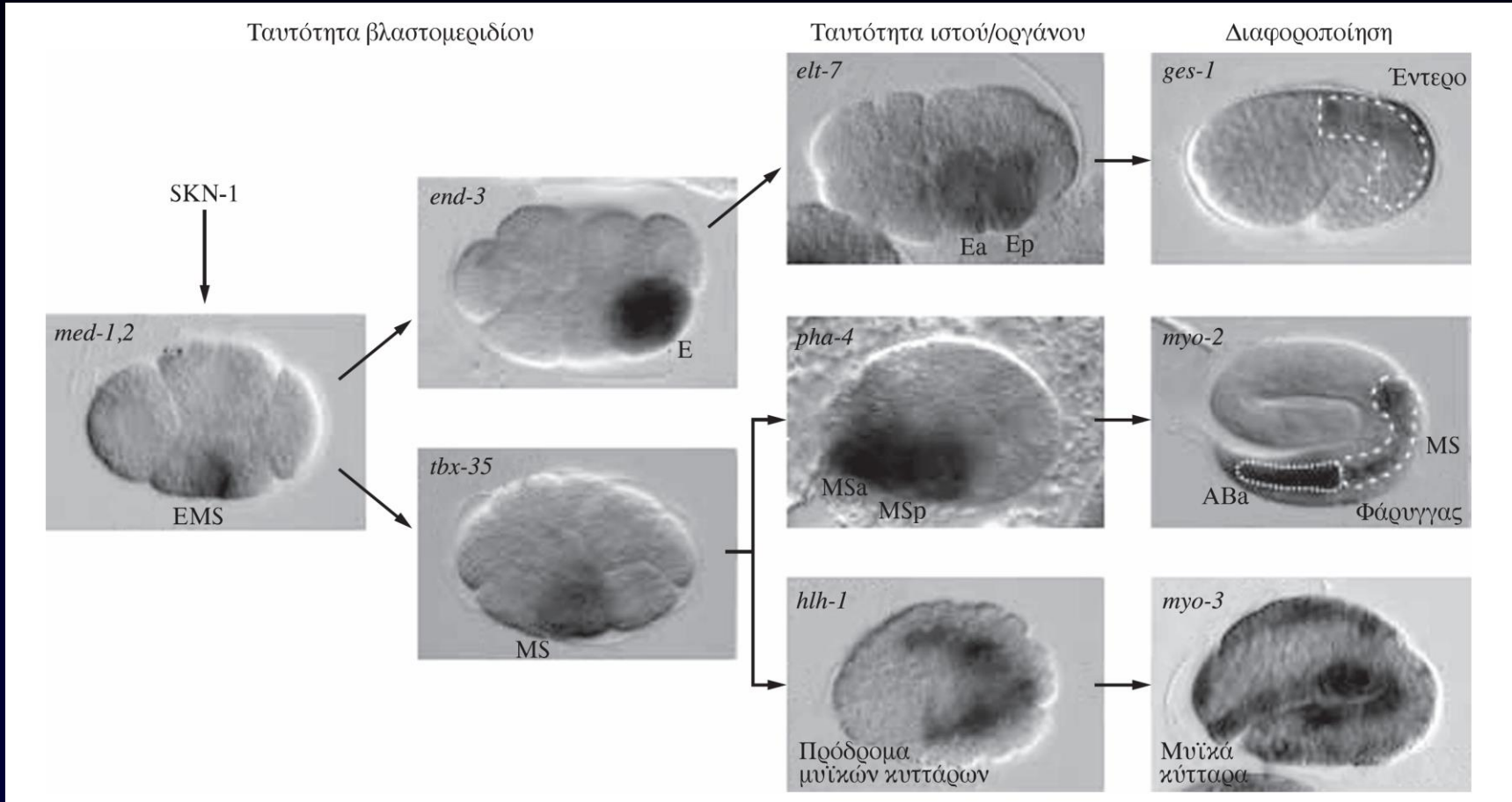
Η ανάπτυξη του φάρυγγα Από τα γονίδια μητρικής επίδρασης στα ζυγωτικά



Ο Φάρυγγας αναπτύσσεται από δύο γενεαλογίες



Ανάλυση της έκφρασης ζυγωτικών γονιδίων με πειράματα υβριδοποίησης *in situ*

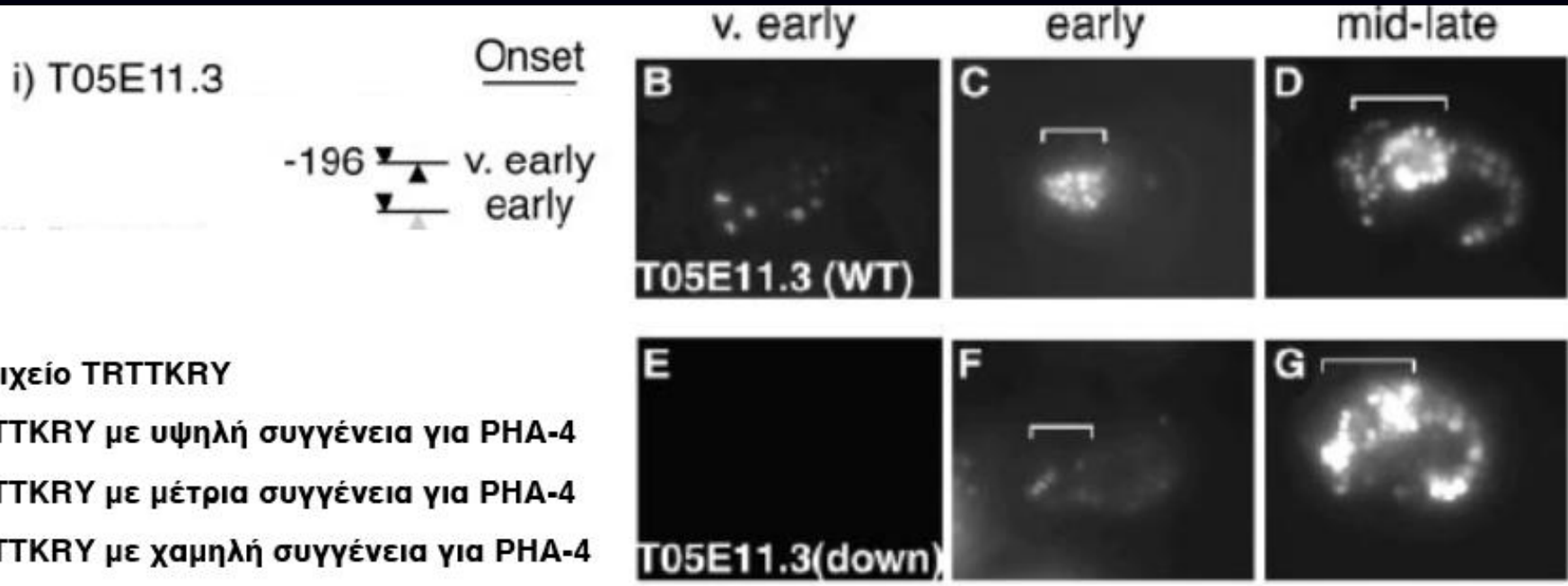


Η έκφραση των ζυγωτικών γονιδίων είναι αποτέλεσμα του εντοπισμού καθοριστών. Από τη δημοσίευση Maduro & Rothman (2002) *Developmental Biology* 246, 68-85, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Elsevier.

Το γονίδιο *rha-4* είναι υπεύθυνο για την ταυτότητα των κυττάρων του φάρυγγα

- μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας forkhead (HNF3β)
- απαιτείται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του φάρυγγα (ts mutants)
- αναγνωρίζει την αλληλουχία TRTTKRY
- ενεργοποιεί σχεδόν **όλα τα γονίδια** που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό όλων των κυτταρικών τύπων του φάρυγγα.

Το γονίδιο *pha-4* είναι υπεύθυνο για την ταυτότητα των κυττάρων του φάρυγγα



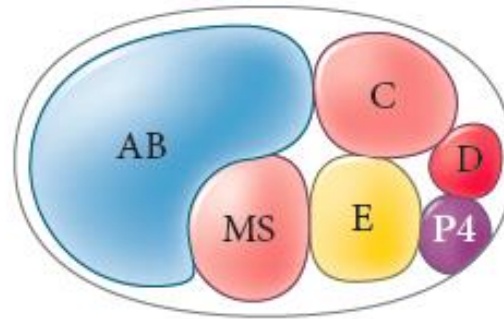
Η έκφραση σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ελέγχεται από διαφορετικά στοιχεία TRTTKRY τα οποία η PHA-4 αναγνωρίζει με διαφορετική συγγένεια.

Γονίδια που φέρουν στοιχεία TRTTKRY με υψηλή συγγένεια για τη PHA-4 αρχίζουν να εκφράζονται σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του φάρυγγα. Μεταλλαγές που μεταβάλλουν τη συγγένεια τέτοιων στοιχείων έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη της έκφρασης με καθυστέρηση 2-3 ωρών.

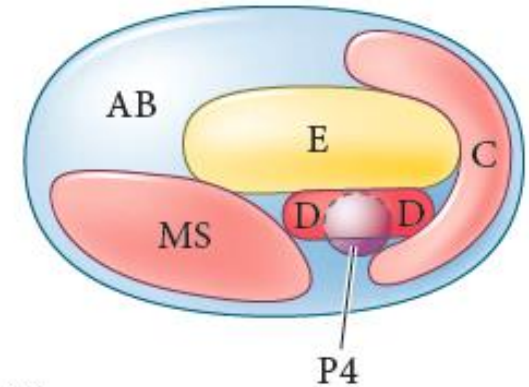
Γαστριδίωση

- Ξεκινά στο στάδιο των 26 κυττάρων
- Εα, Ερ μεταναστεύουν κοιλιακά προς το εσωτερικό
- Ακολουθεί το P4.
- Ακολουθούν τα μεσοδερμικά κύτταρα απόγονοι MS, C και D.
- Πρόδρομα φαρυγγικά (AB)
- Επιβολή των υποδερμικών προγόνων (απόγονοι AB και C)

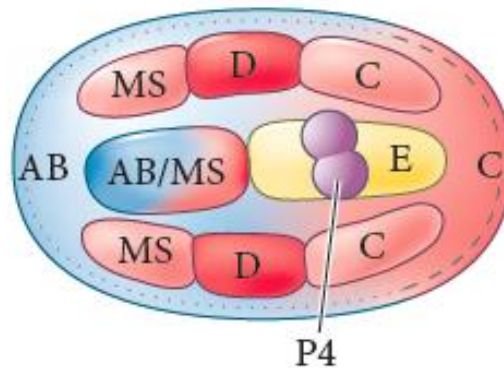
(A) 26-cell stage



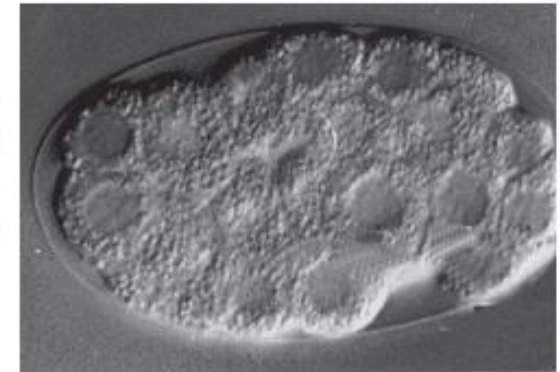
(B) 102-cell stage



(C) end of gastrulation

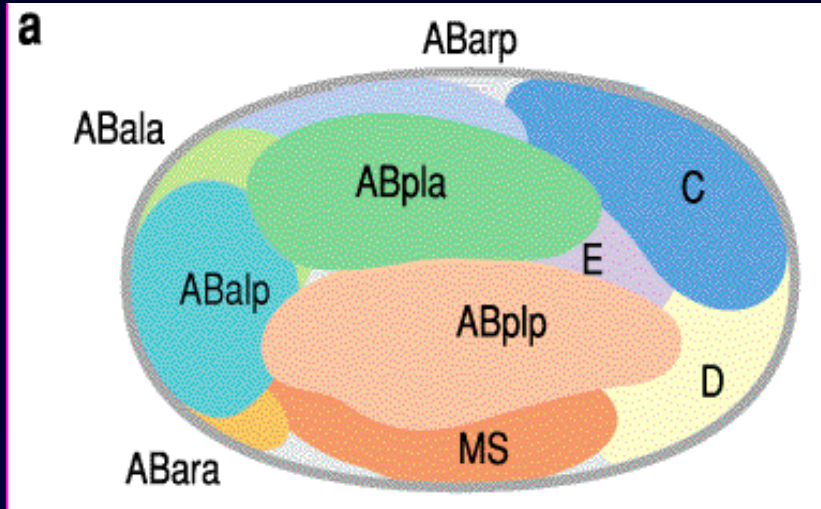


(D) 26-cell stage



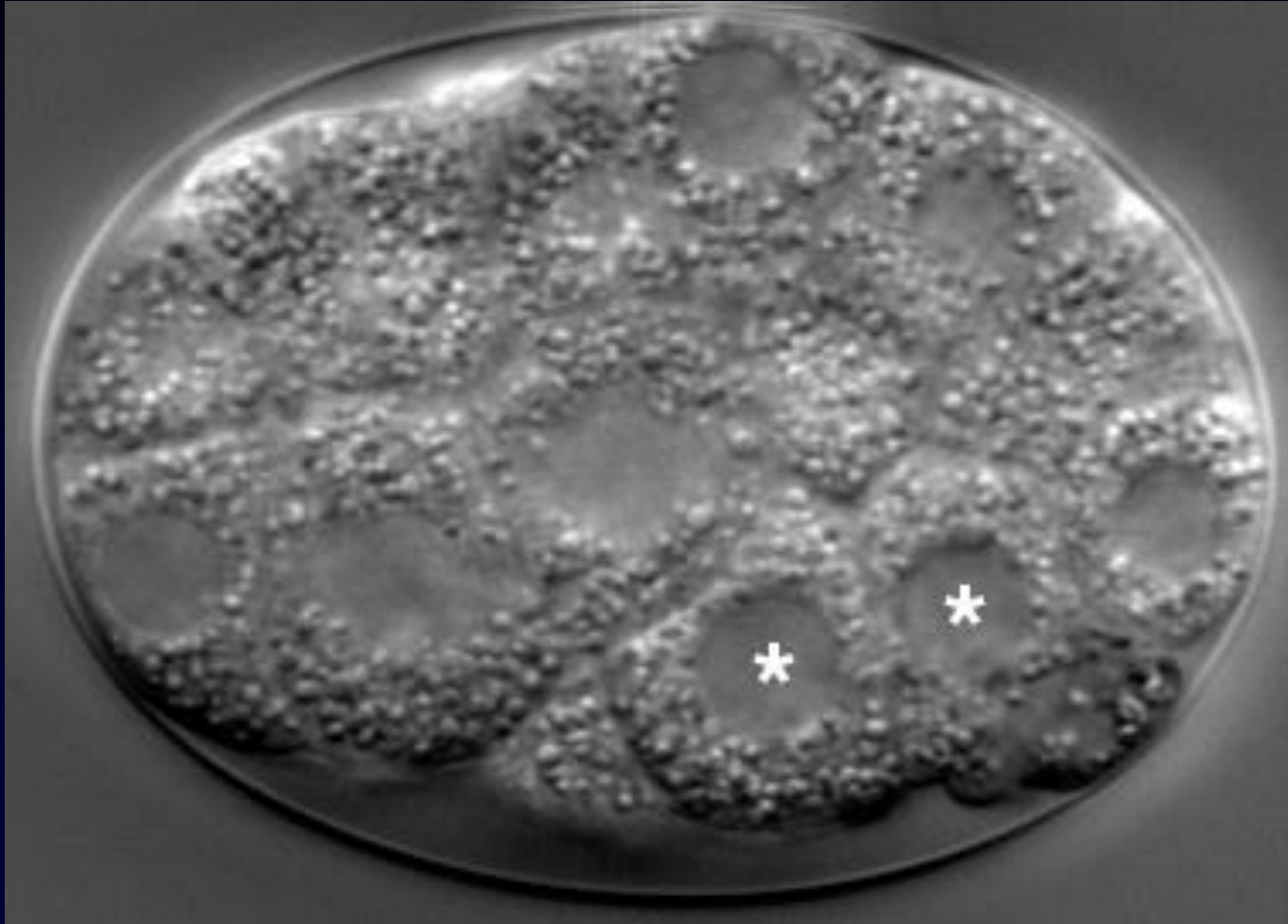
Γαστριδίωση

- Ξεκινά περίπου στο στάδιο των 26 κυττάρων
- Eα, Eρ μεταναστεύουν κοιλιακά προς το εσωτερικό
- Ακολουθεί το P4.
- Ακολουθούν τα μεσοδερμικά κύτταρα απόγονοι MS, C και D.
- Πρόδρομα φαρυγγικά (AB)
- Επιβολή των υποδερμικών προγόνων (απόγονοι AB και C)

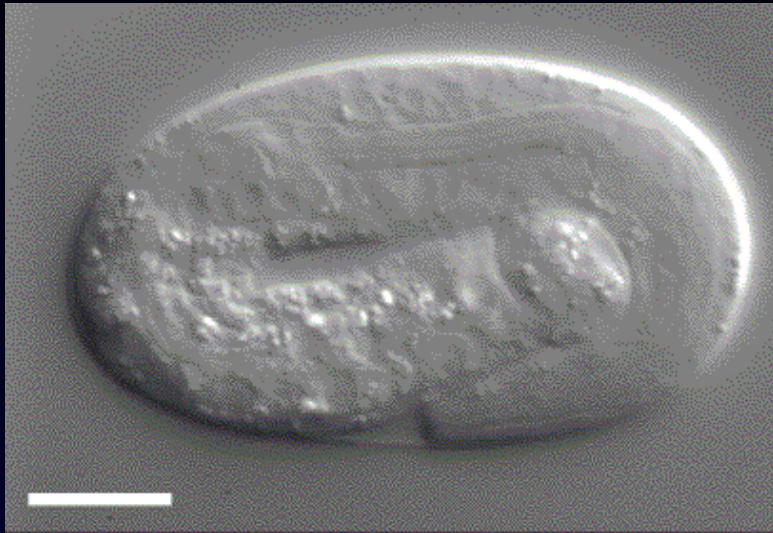


Χάρτης πεπρωμένου στο στάδιο των 80 κυττάρων ανάλογα με το βλαστομερίδιο από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα

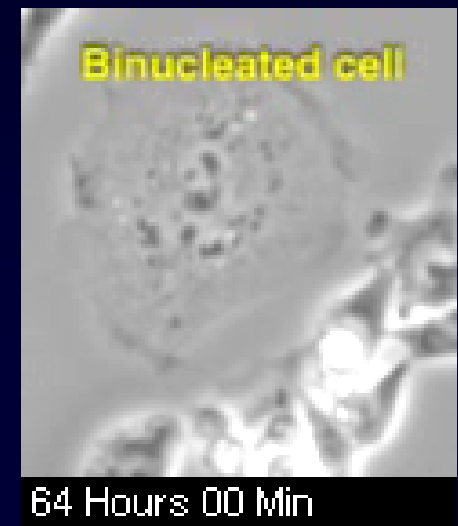
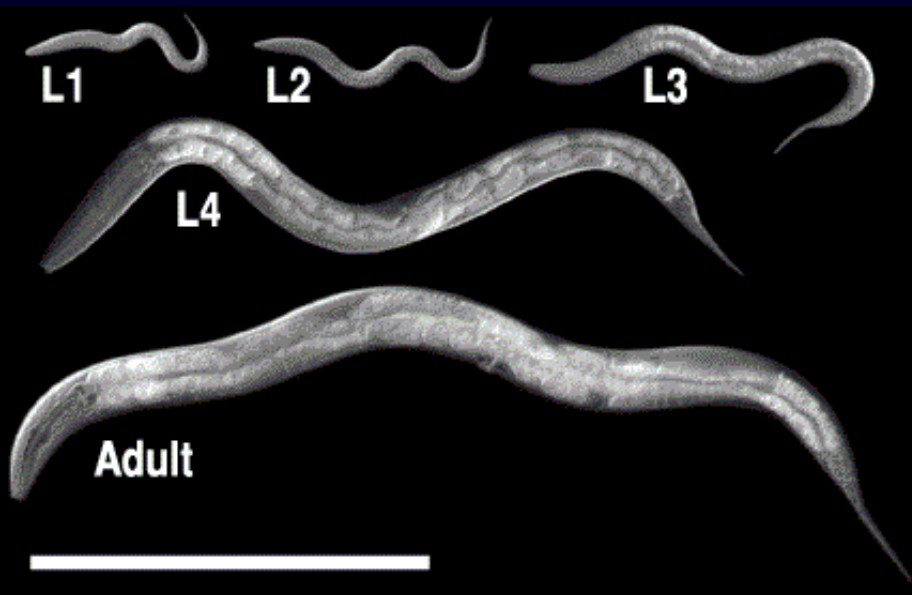
Γαστριδίωση



Τέλος γαστριδίωσης



- Σχηματισμός οργάνων
- Επιμήκυνση
- Προνύμφη
- Η προνύμφη έχει 558 κύτταρα
- 131 κύτταρα έχουν ακολουθήσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο
- Τέσσερις εκδύσεις
- Όριμο άτομο



Cite as: J. S. Packer *et al.*, *Science*
10.1126/science.aax1971 (2019).

A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution

Jonathan S. Packer^{1*}, Qin Zhu^{2*}, Chau Huynh¹, Priya Sivaramakrishnan³, Elicia Preston³, Hannah Dueck^{3†}, Derek Stefanik⁴, Kai Tan^{3,5,6,7}, Cole Trapnell¹, Junhyong Kim^{4‡}, Robert H. Waterston^{1‡}, John I. Murray^{3‡}

¹Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA, USA. ²Genomics and Computational Biology Graduate Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. ³Department of Genetics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. ⁴Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. ⁵Division of Oncology and Center for Childhood Cancer Research, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA. ⁶Department of Pediatrics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. ⁷Department of Cell and Developmental Biology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

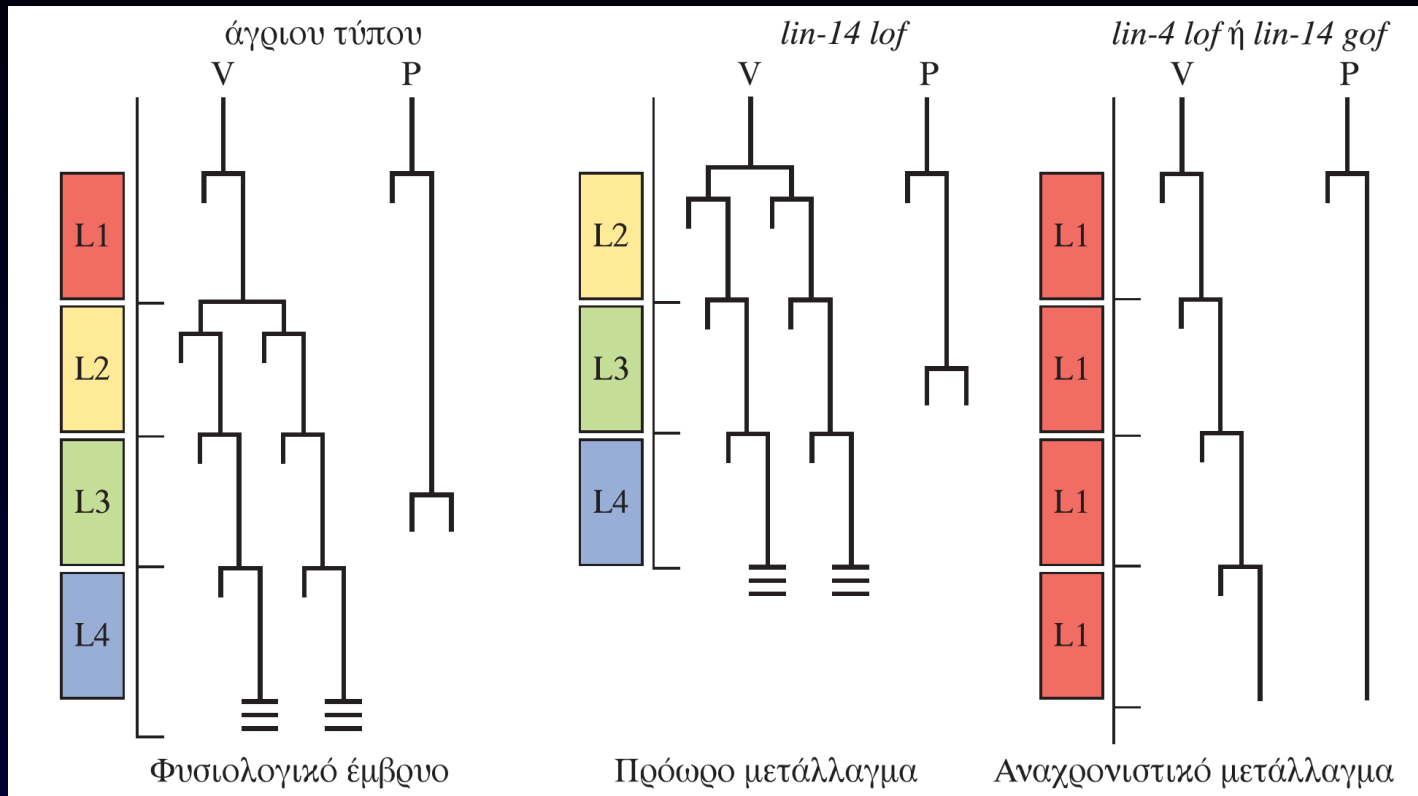
*These authors contributed equally to this work.

†Present address: National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

‡Corresponding author. Email: junhyong@sas.upenn.edu (J.K.); watersto@uw.edu (R.H.W.); jmurr@pennmedicine.upenn.edu (J.I.M.)

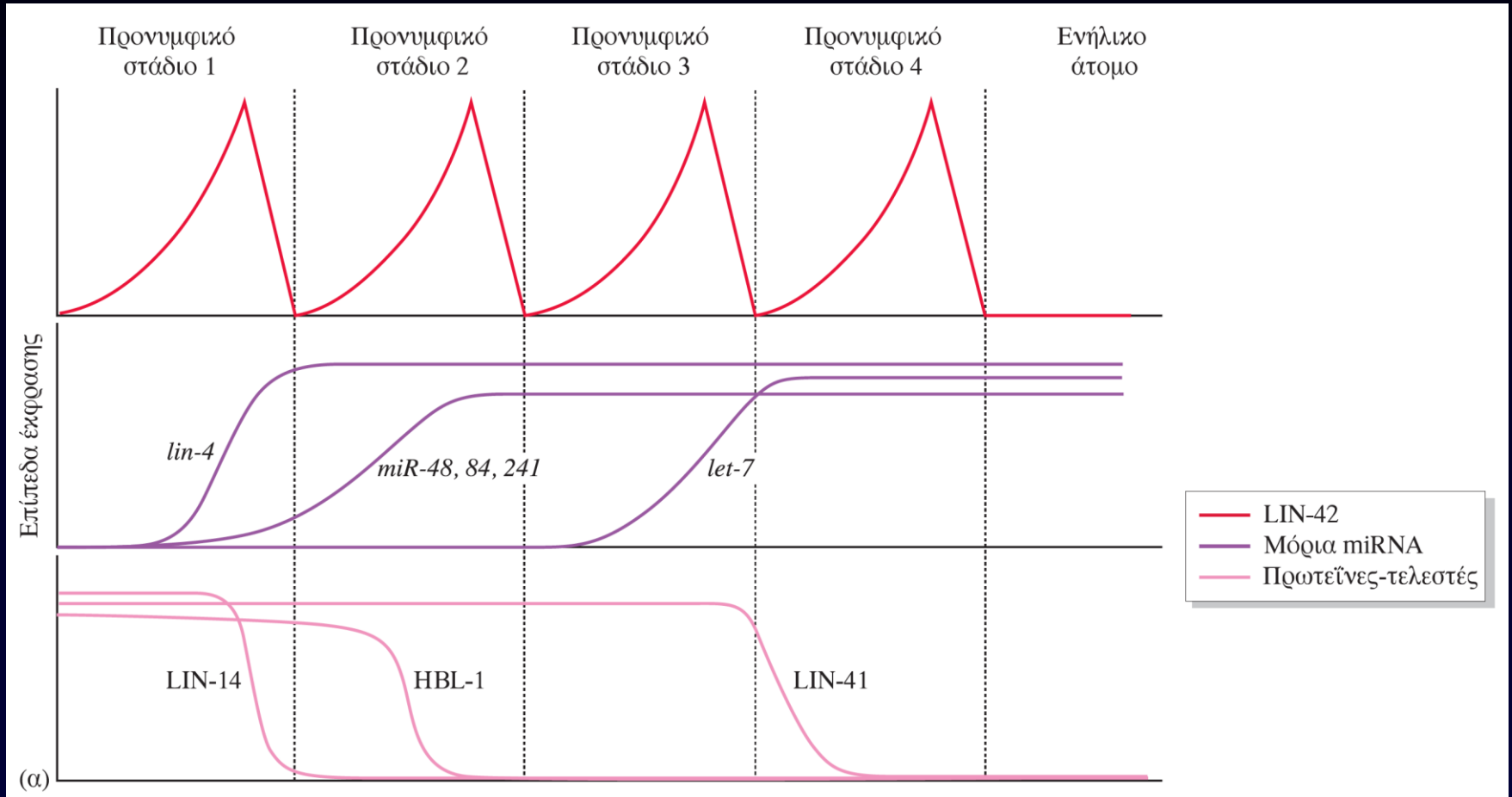
Caenorhabditis elegans is an animal with few cells, but a striking diversity of cell types. Here, we characterize the molecular basis for their specification by profiling the transcriptomes of 86,024 single embryonic cells. We identify 502 terminal and pre-terminal cell types, mapping most single-cell transcriptomes to their exact position in *C. elegans*' invariant lineage. Using these annotations, we find that: 1) the correlation between a cell's lineage and its transcriptome increases from mid to late gastrulation, then falls dramatically as cells in the nervous system and pharynx adopt their terminal fates; 2) multilineage priming contributes to the differentiation of sister cells at dozens of lineage branches; and 3) most distinct lineages that produce the same anatomical cell type converge to a homogenous transcriptomic state.

Ετεροχρονικές μεταλλάξεις



Παρουσιάζονται δύο γενεαλογίες της προνύμφης, οι V και P. Κατά την ανάπτυξη οι δύο γενεαλογίες εμφανίζουν πολύ διαφορετικά προγράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι γενεαλογίες V και P επηρεάζονται συντονισμένα στα μεταλλαγμένα στελέχη. Στα πρόωρα μεταλλάγματα παρατηρείται παράλειψη ενός σταδίου, ενώ στα αναχρονιστικά μεταλλάγματα παρατηρείται επανάληψη γεγονότων του σταδίου L1. lof: απώλεια λειτουργίας, gof: κέρδος λειτουργίας.

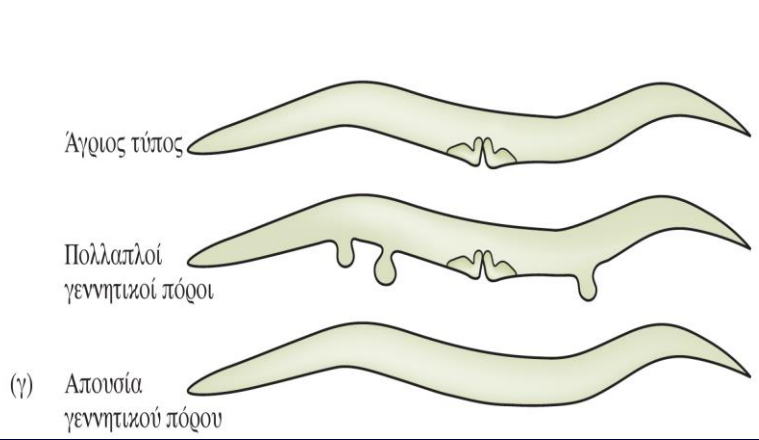
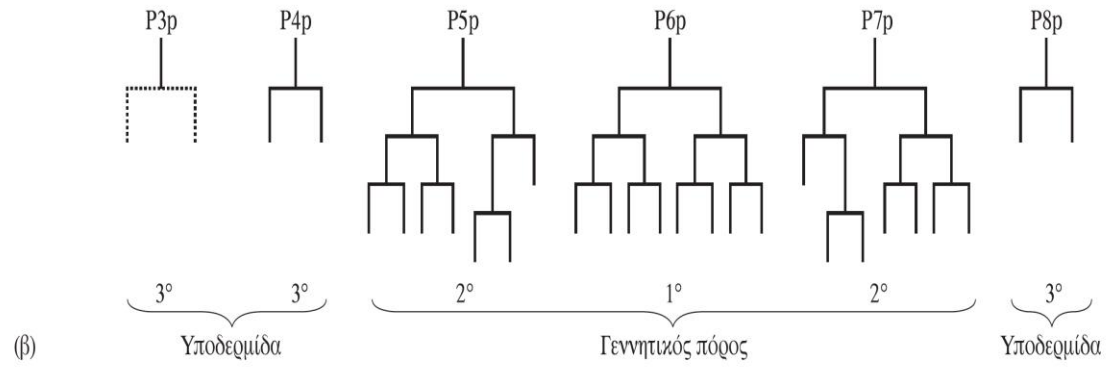
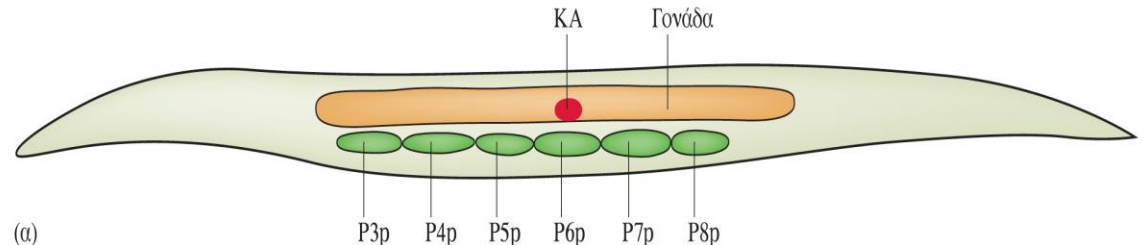
Ετεροχρονικές μεταλλαγές



(α) Διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *lin-42*, που είναι ομόλογο του *per*, των μορίων microRNA και των πρωτεϊνών των οποίων τη μετάφραση καταστέλλουν.

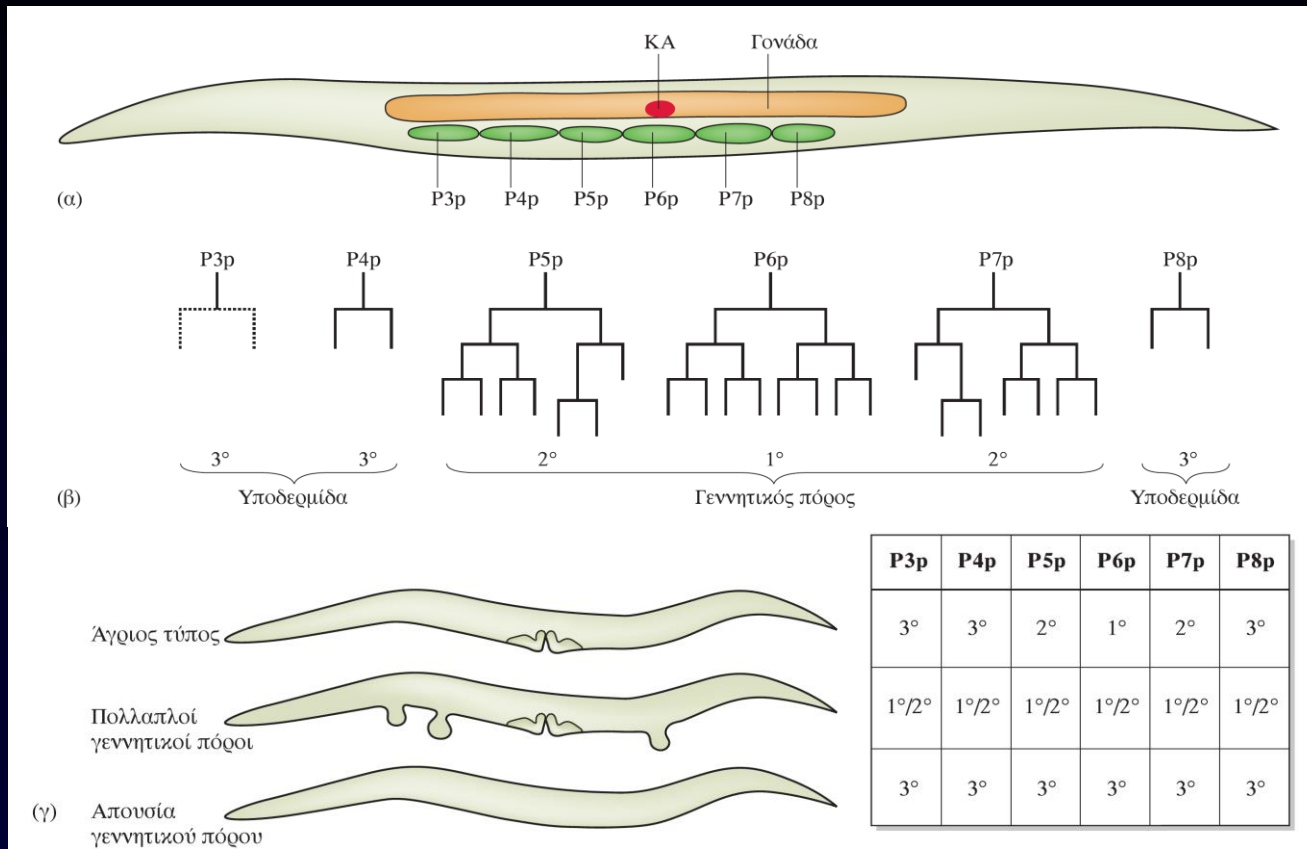
Ο γεννητικός πόρος

- Δομή της επιδερμίδας
- Αναπτύσσεται από τα κύτταρα **P5p**, **P6p** και **P7p**: οπίσθια θυγατρικά κύτταρα - απόγονοι των εμβρυϊκής προέλευσης εξωδερμικών κυττάρων P5, P6 και P7
- **P5p**: επτά απόγονοι που συμμετέχουν στον γεννητικό πόρο.
- **P6p**: οκτώ απόγονοι
- **P7p**: επτά απόγονοι
- P3p, P4p και P8p: 2 απογόνους το καθένα – φυσιολογικά σχηματίζουν την υποδερμίδα



P3p	P4p	P5p	P6p	P7p	P8p
3°	3°	2°	1°	2°	3°
1°/2°	1°/2°	1°/2°	1°/2°	1°/2°	1°/2°
3°	3°	3°	3°	3°	3°

Ο γεννητικός πόρος

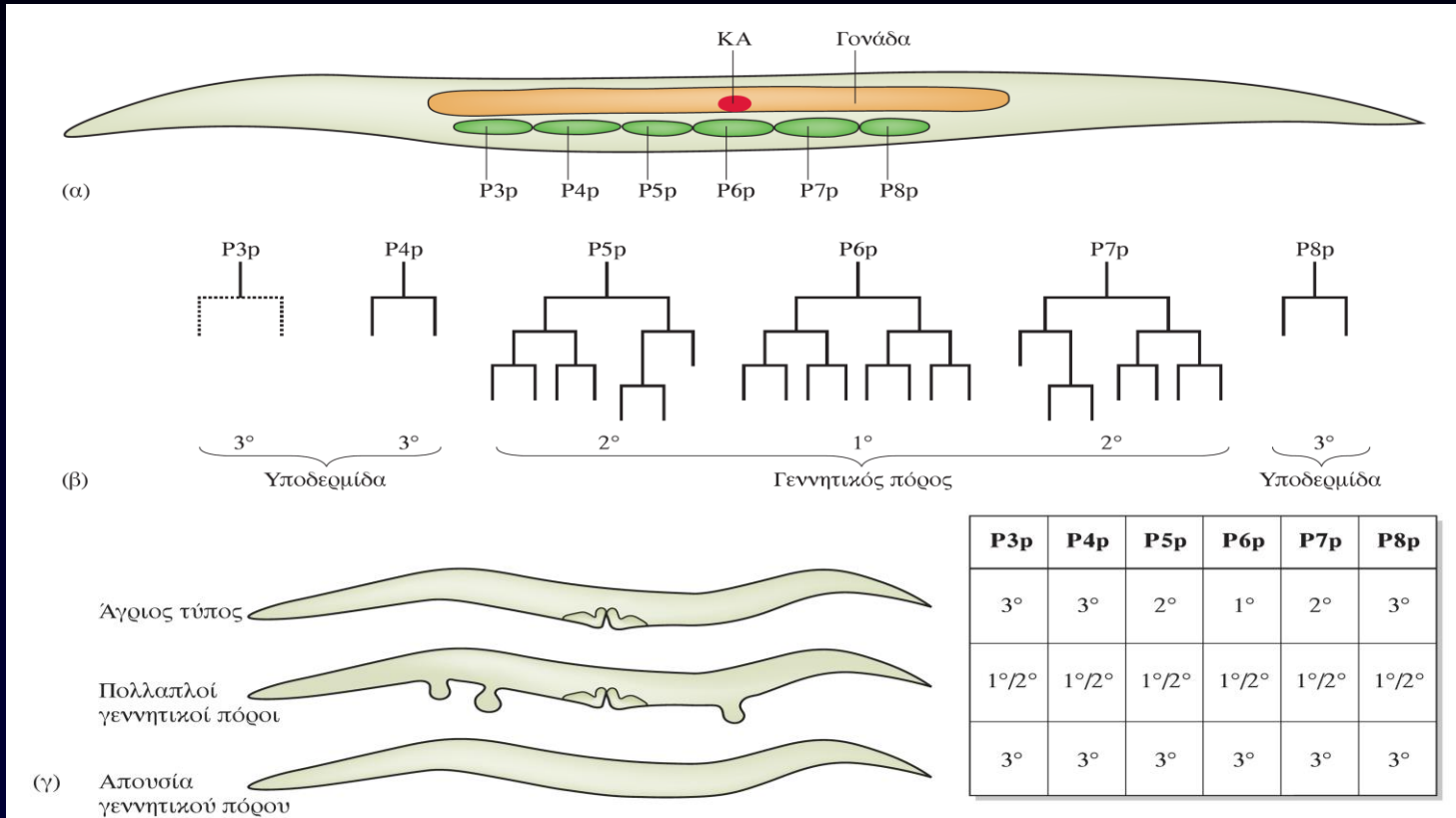


Τα έξι κύτταρα P3p-P8p αποτελούν μια **ομάδα ισοδυναμίας** επειδή όλα είναι ικανά να δώσουν απογόνους που είναι δυνατόν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του γεννητικού πόρου, ενώ επίσης, κάτω από πειραματικές συνθήκες, είναι εφικτό να υποκαταστήσουν το ένα το άλλο – Σχέση με το **Κυτταρο αγκύρωσης (KA)**

Θανάτωση με λέιζερ του KA: Τα P3p-P8p ακολουθούν το 3°-οχι γενετικός πόρος

Μεταλλάγματα displaced gonad = KA μετακινείται σε σχέση με τα P3p-P8p = κοντινότερο σε KA

Ο γεννητικός πόρος

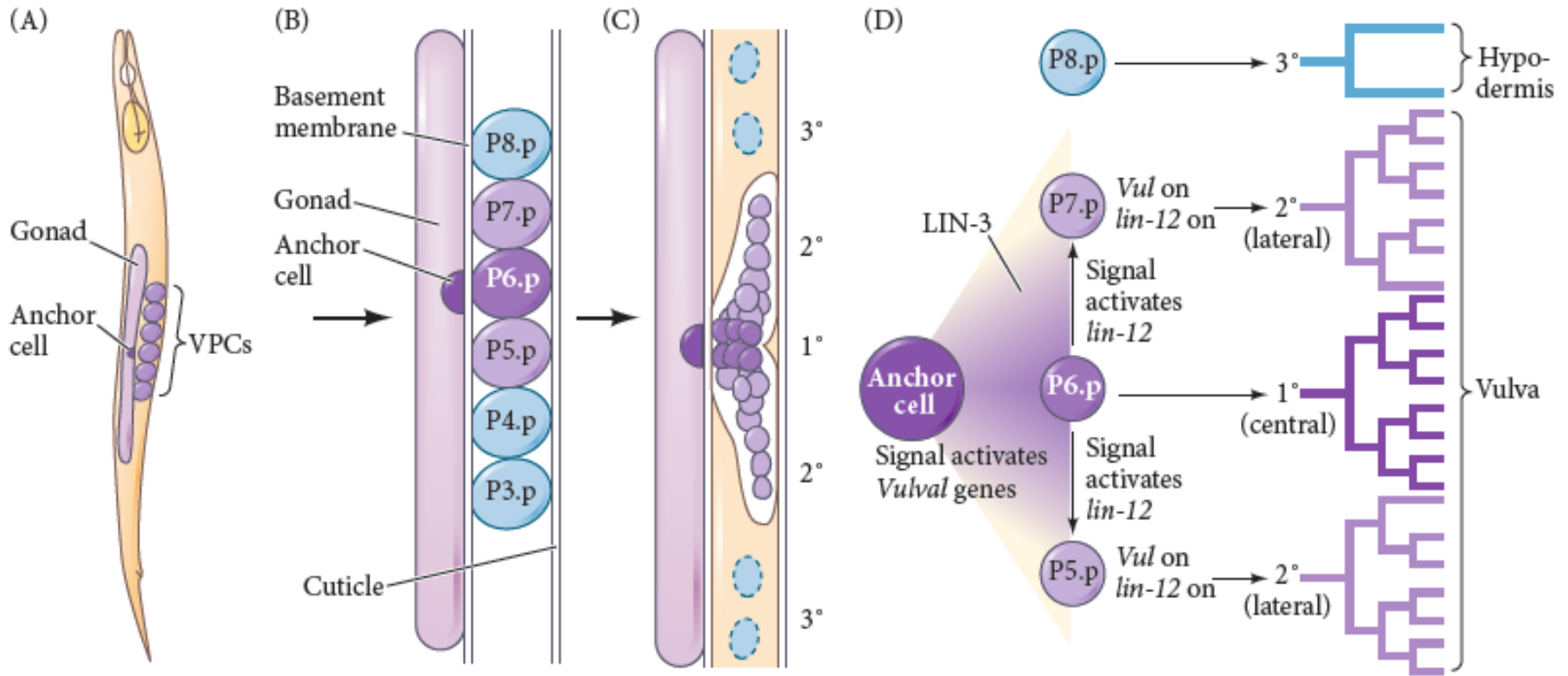


Δύο κύριες ομάδες μεταλλαγμάτων:

vuivaless = απουσιάζει ο γεννητικός πόρος (ιδιος φαινότυπος με καταστροφή KA),

Multivuiva = πολλαπλοί γεννητικοί πόροι από την ομάδα κυττάρων P3p-P8p.

Ο γεννητικός πόρος



Μεταλλάγματα *vulvaless* : φαινότυπος = με απουσία anchor cell

(Κύτταρο Αγκύρωσης)

Μονοπάτι EGF (διαβάθμιση συγκέντρωσης).

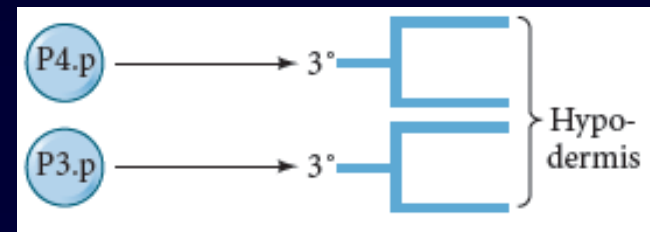
EGF = *lin - 3* .

Υποδοχέας *let - 23* .

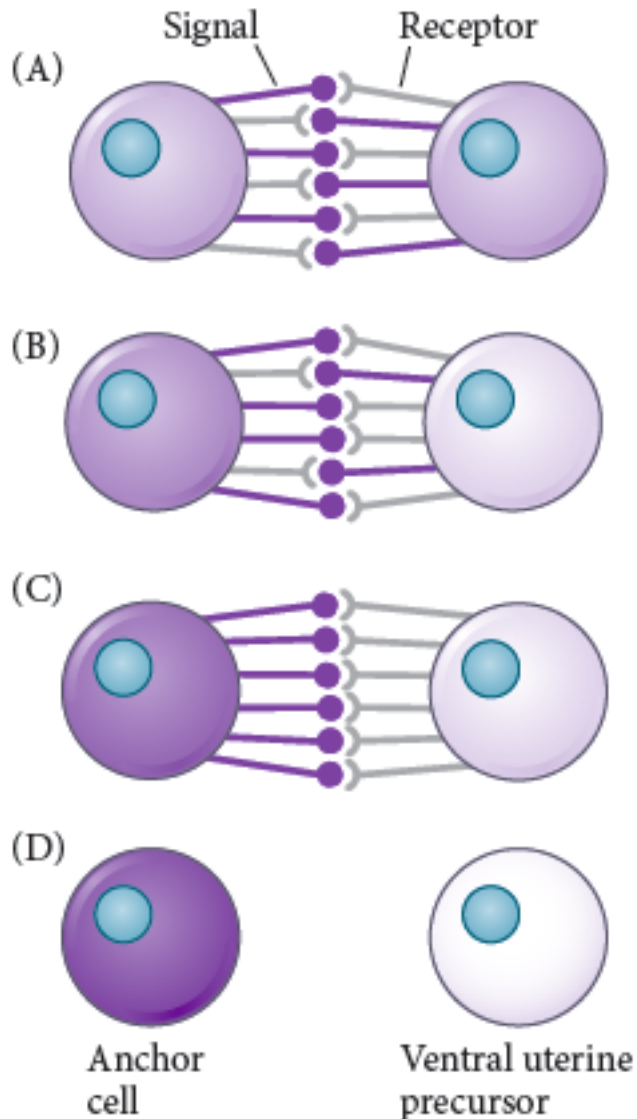
Ras = *let - 60* ,

Loss - of - function *let-60* = *vulvaless* phenotype

gain - of - function *let-60* = *multivulva* phenotype



Ο γεννητικός πόρος



Πώς όμως προκύπτει το κύτταρο αγκύρωσης?
Πλευρική αναστολή = Μονοπάτι Notch
Z1.ppp και Z4.aaa με το ίδιο δυναμικό παράγουν
διαφορετικά επίπεδα υποδοχέα-σήματος (*lag-2*, *lin*
12).

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα καταστέλλει την
έκφραση του προσδέτη και επάγει την έκφραση του
Notch!

Στοχαστικό φαινόμενο που όμως ενισχύεται (βλ. A
προς D!!)

Στην εξειδίκευση γενεαλογίας AB???

(Greenwald and Rubin 1992.)