

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

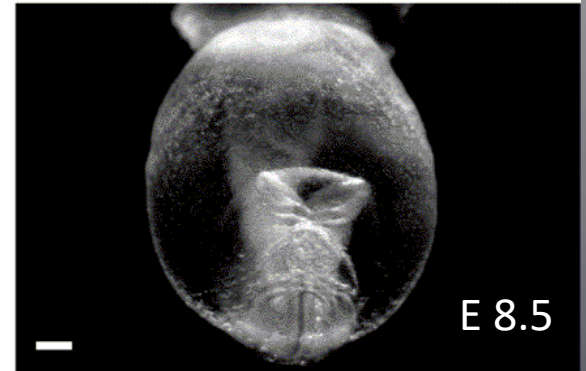
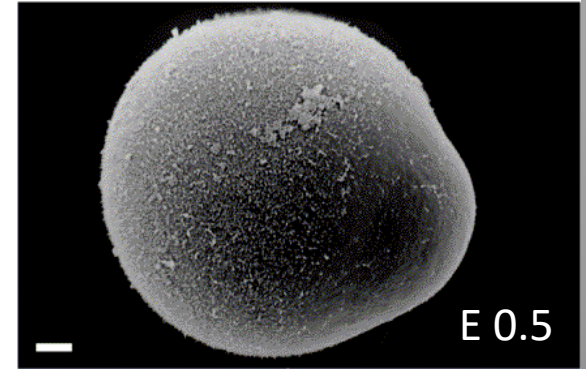
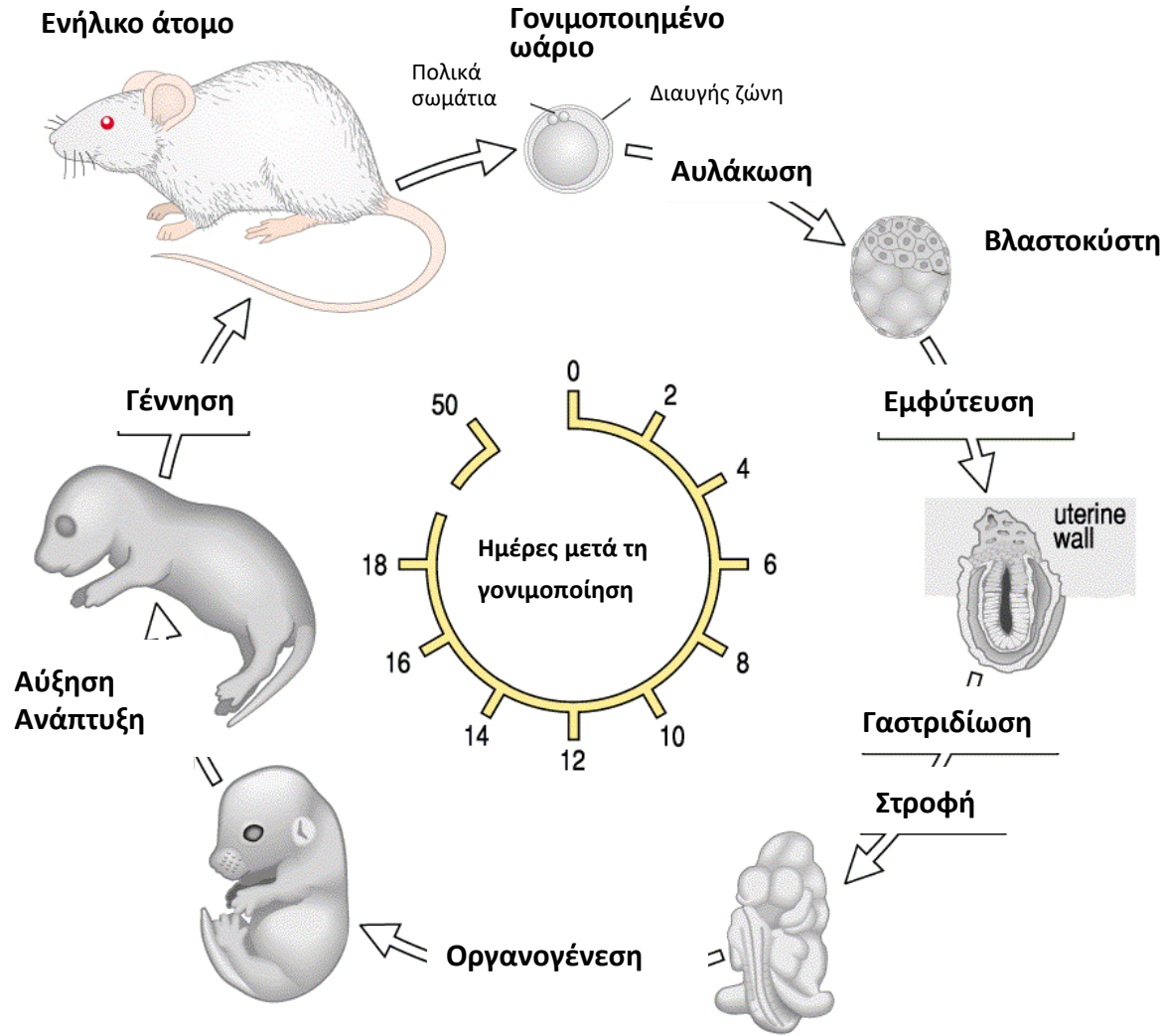
Ανάπτυξης



## Ενότητα 6

Η πρώιμη ανάπτυξη του ποντικού

# Mus Musculus



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

# Τα πλεονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

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

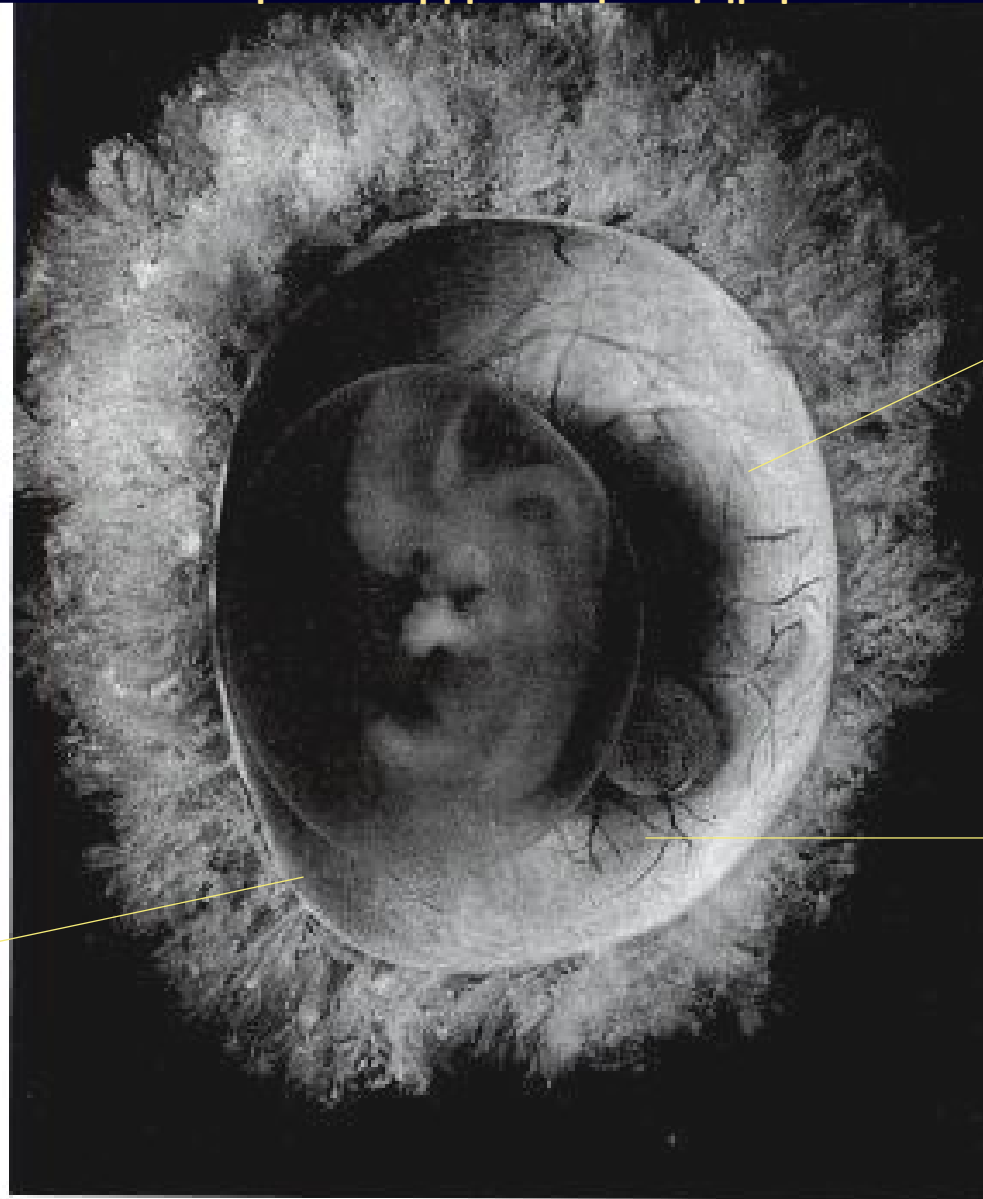
(«An unfortunate feature of genetic model organisms is that the easier they are to work with, the worse they are as models for the animal that most funding agencies find most interesting, namely ourselves.» Daniel St Johnston)

# Τα μειονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

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

# Το έμβρυο των θηλαστικών

Ανθρώπινο έμβρυο στην 40η ημέρα

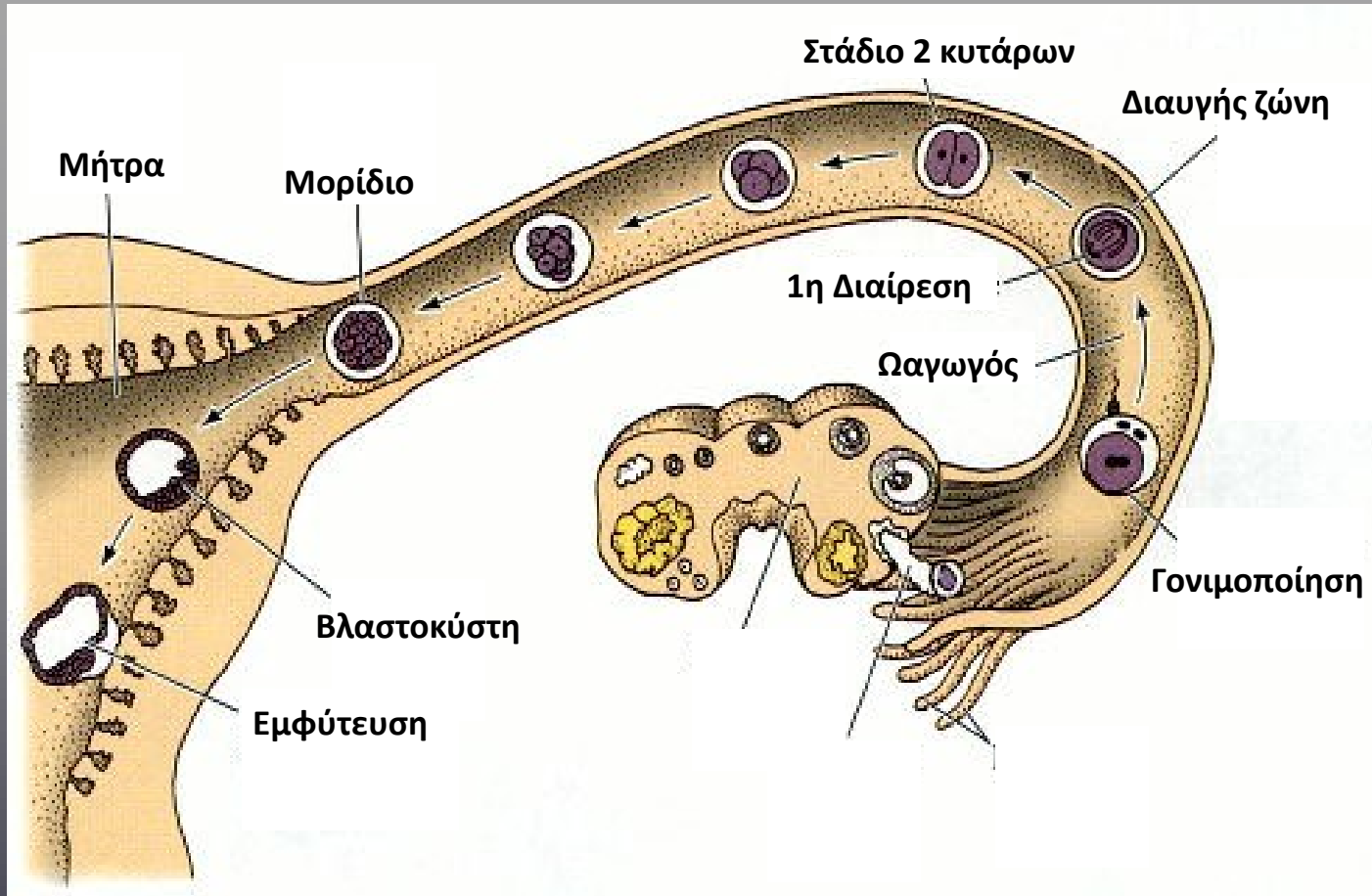


χόριο

Λεκιθικός  
σάκος

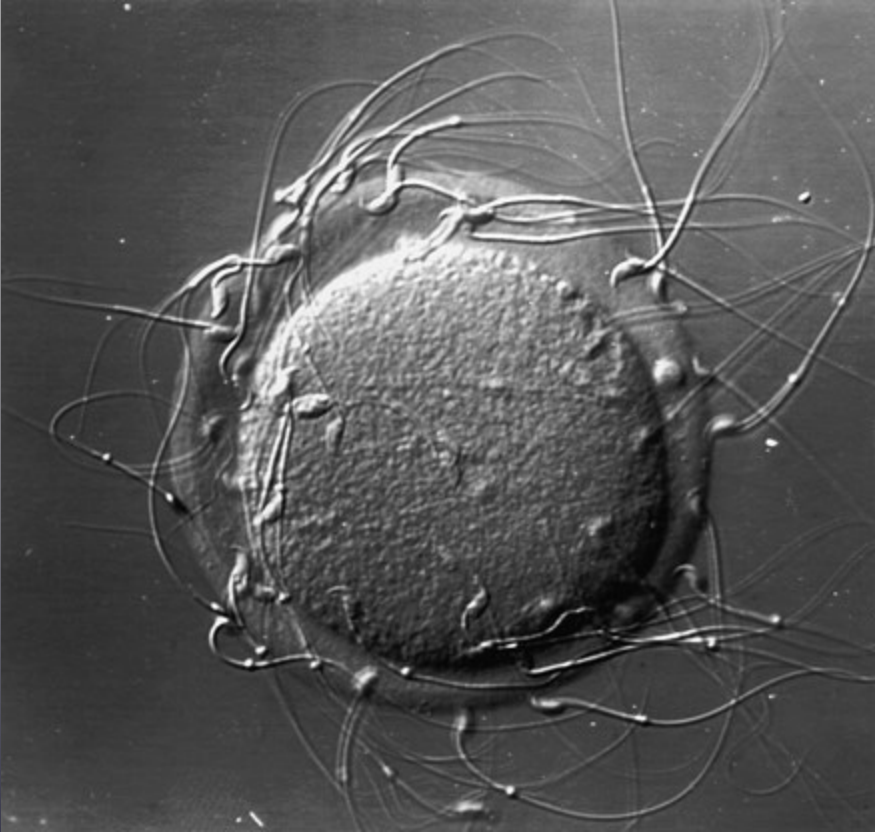
άμνιο

# Γονιμοποίηση - Αυλάκωση



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

# Γονιμοποίηση



Η γονιμοποίηση περιλαμβάνει τέσσερα γεγονότα:

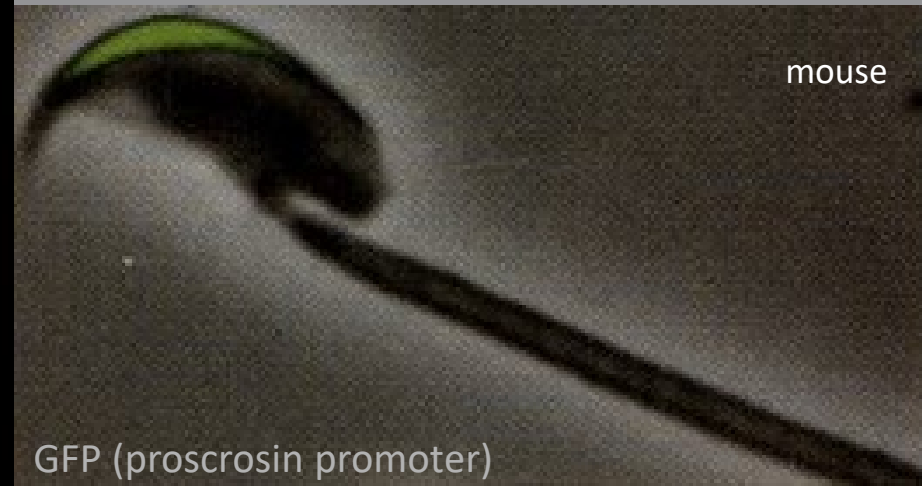
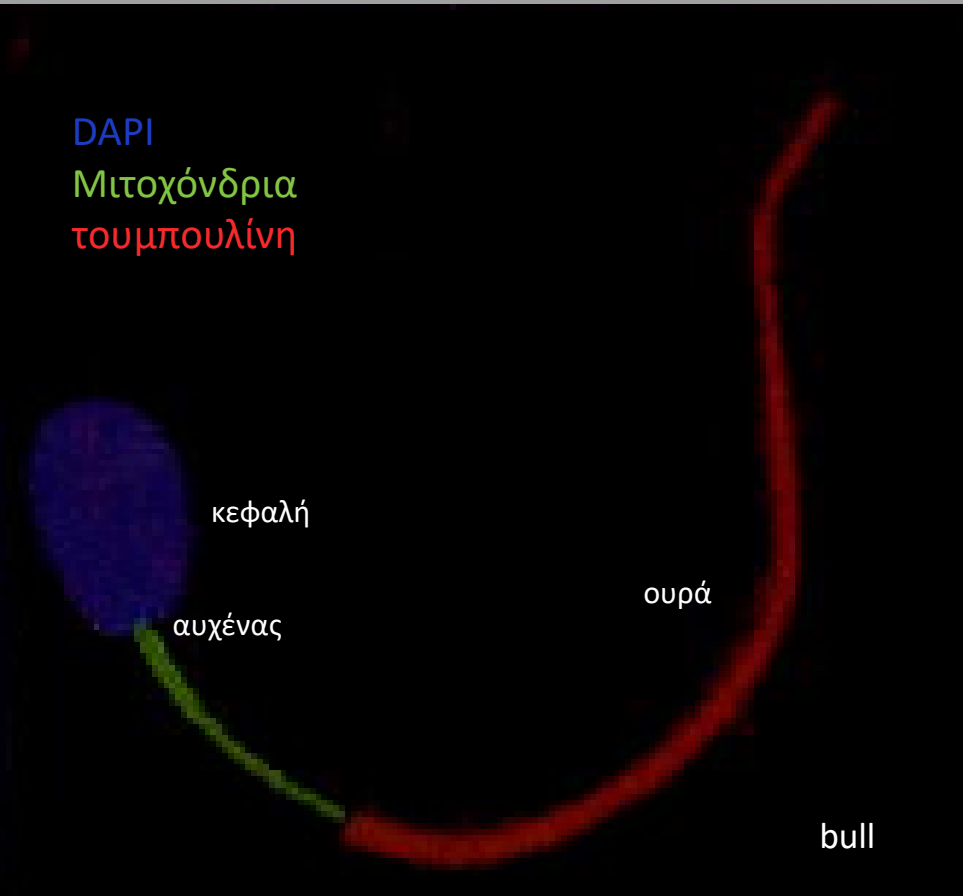
➤ Επαφή/αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό το στάδιο εξασφαλίζει ότι οι γαμέτες ανήκουν στο ίδιο είδος.

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

➤ Σύντηξη των προπυρήνων.

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

# Δομή των γαμετών: α.σπερματοζωάρια





## Δομή των γαμετών: β.ωάρια



A: ακτινωτός στέφανος (εσ. cumulus)

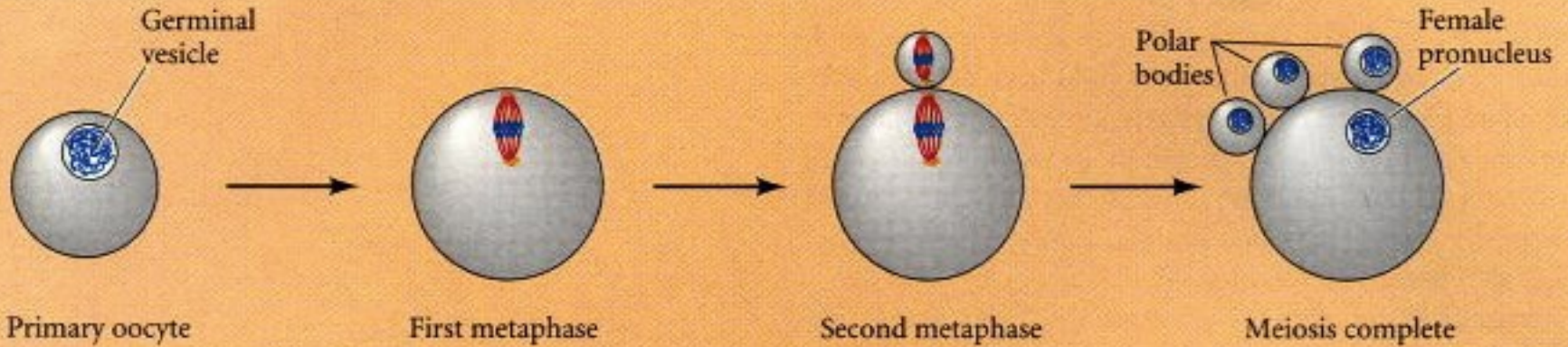
B: ωάριο πριν τη γονιμοποίηση (hamster)

Γ: διαυγής ζώνη

Δ: πολικό σωματίο

Ε: φλοιός (κοκκία)

# Δομή των γαμετών: β.ωάρια



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

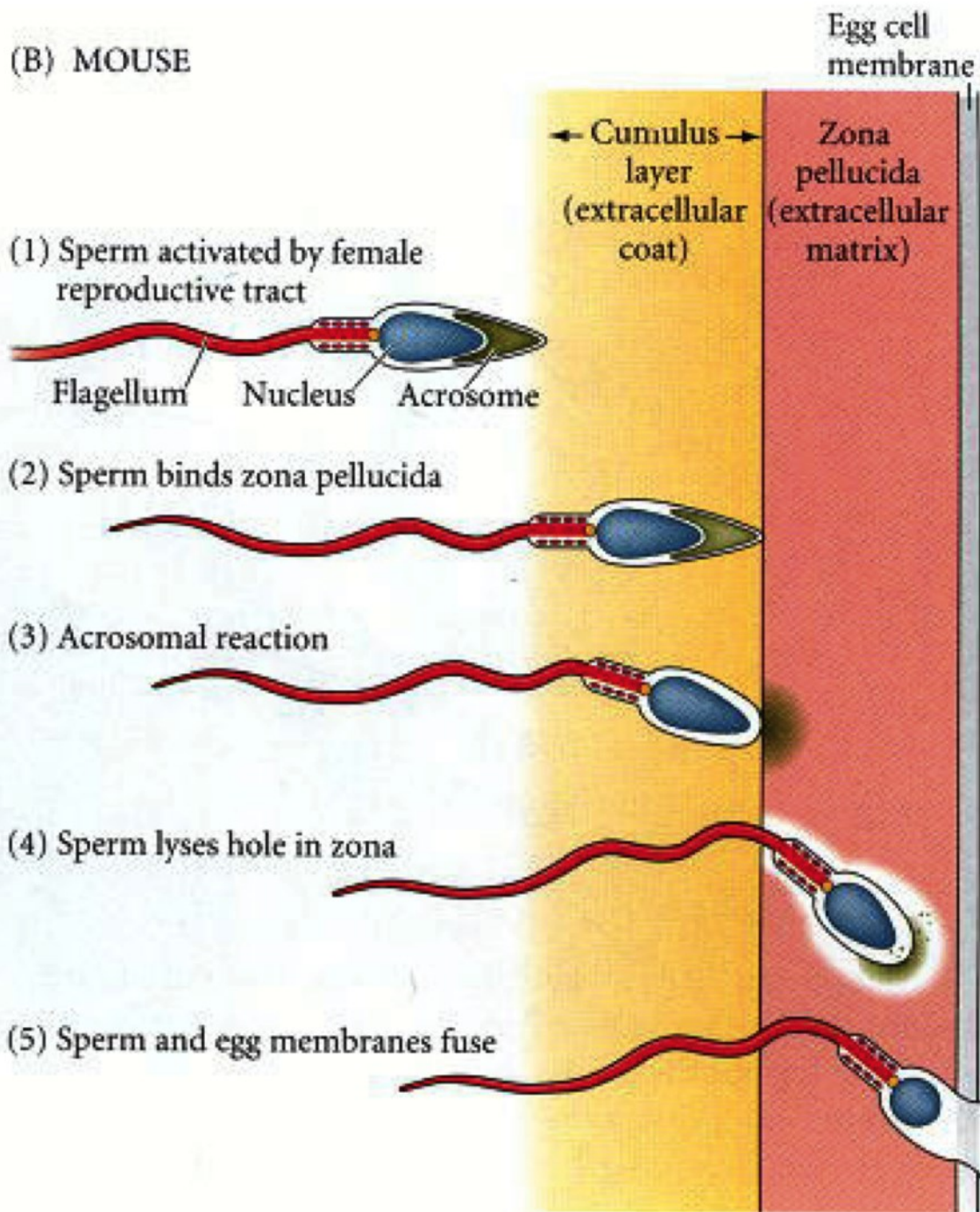
The nemertean worm  
*Cerebratulus*  
The polychaete worm  
*Chaetopterus*  
The mollusc  
*Dentalium*  
The core worm  
*Pectinaria*  
Many insects  
Starfish



The lancelet  
*Branchiostoma*  
Amphibians  
Most mammals  
Fish

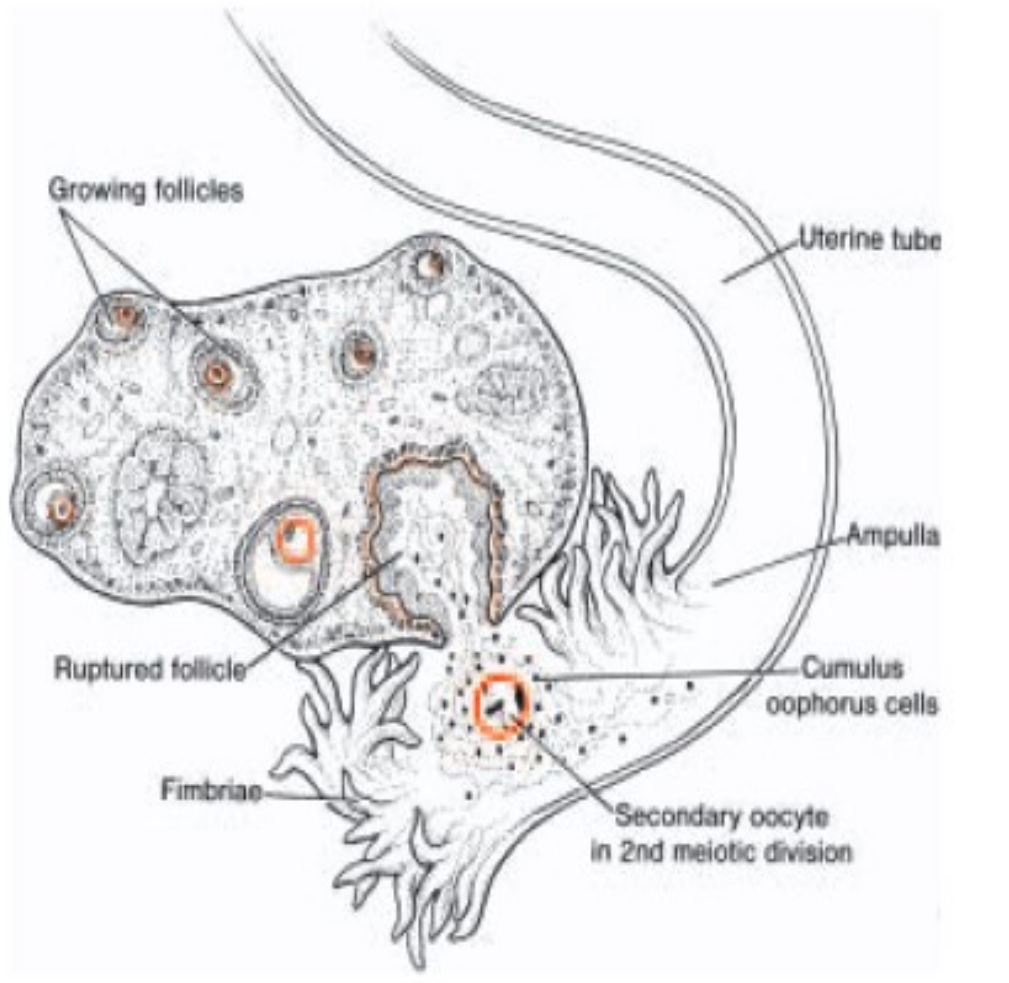
Cnidarians  
(e. g., anemones)  
Sea urchins

(B) MOUSE



Από την εκσπερμάτωση  
στη γονιμοποίηση.

# Ενεργοποίηση



➤  $280 \times 10^6$  σπερματοζωάρια - 200 στον ωαγωγό

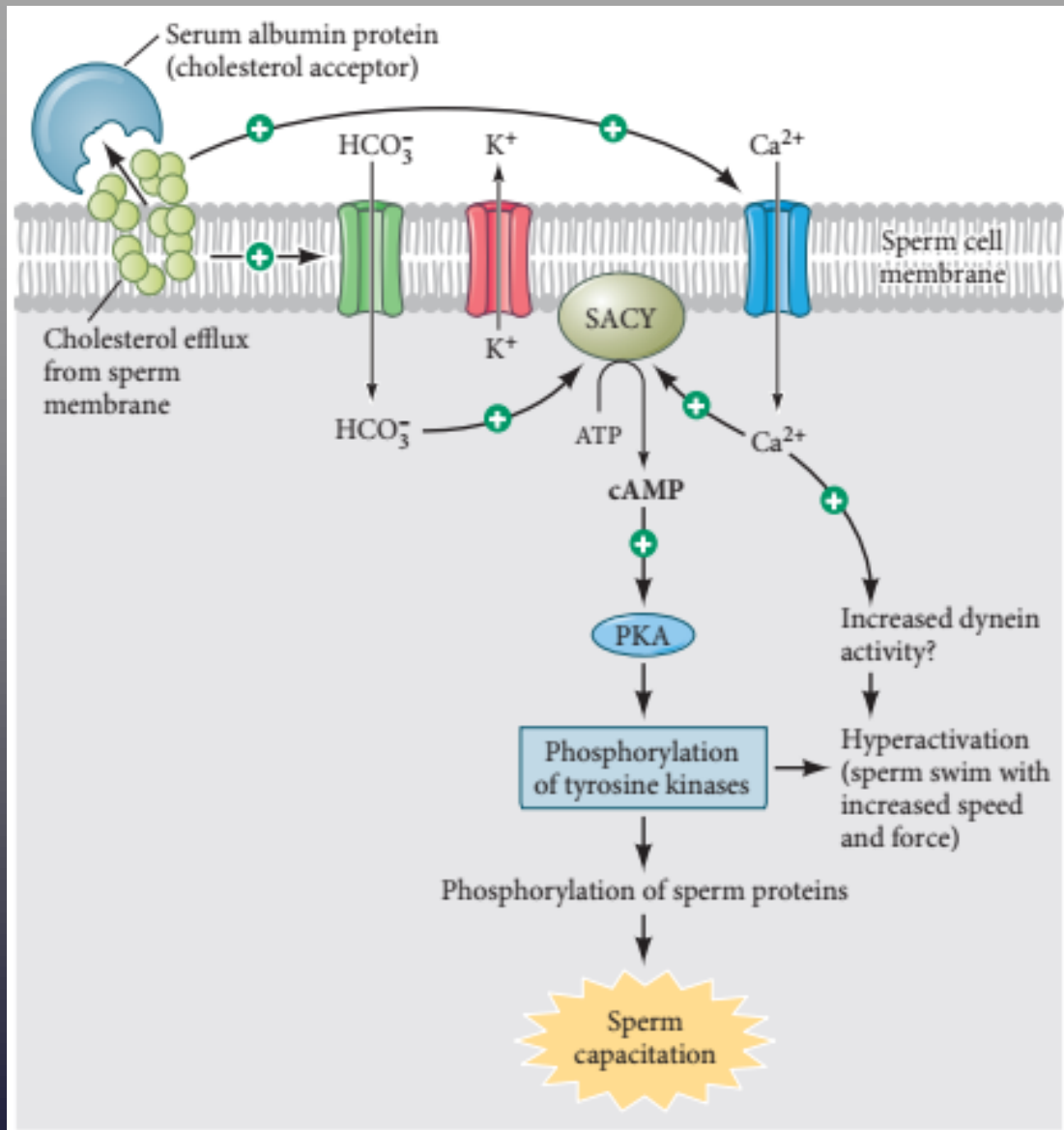
➤ Υπάρχει χημειοτακτισμός όπως σε άλλα είδη;

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

➤ Τα σπερματοζωάρια είναι ανίκανα να γονιμοποιήσουν τα ωάρια (μπλοκάρονται στον ακτινωτό στέφανο) εκτός και αν παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα

➤ Τι συμβαίνει στο σπερματοζωάριο κατά την ενεργοποίησή του;

# Ενεργοποίηση



➤ Αλλαγες στη μεμβράνη

➤ Απομάκρυνση της χοληστερόλης από αλβουμίνες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος (pH)

➤ Απομάκρυνση πρωτεϊνών/ υδατανθράκων (εμποδίζουν αλληλεπιδράσεις με διαυγή ζώνη)

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

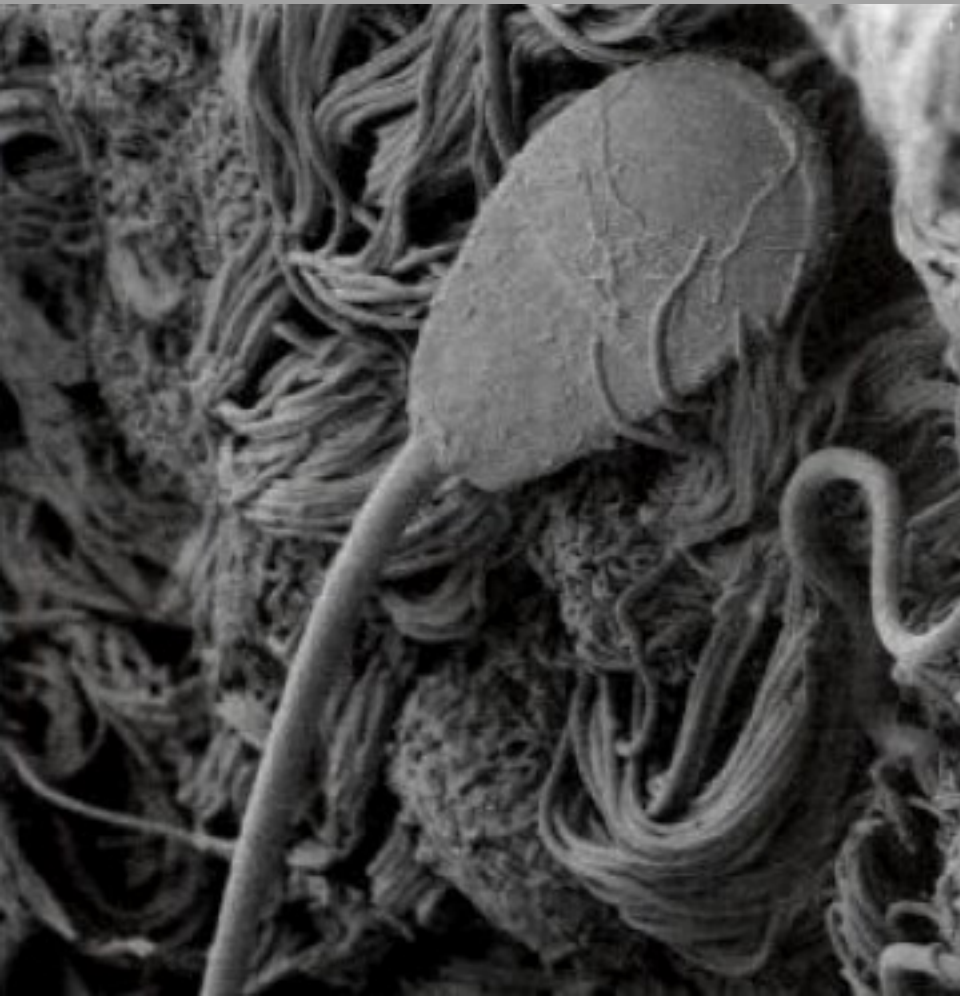
➤ Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών.

Πώς συνδέονται μεταξύ τους αυτές οι αλλαγές;

➤ Αδενυλική κυκλάση cAMP PKA αλλαγή δυναμικού.

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

# Ενεργοποίηση



➤ Τα μη ενεργοποιημένα σπερματοζώαρια προσδέονται ενεργά στις μεμβράνες των κυττάρων του ωαγωγού στον ισθμό.

➤ Η πρόσδεση είναι παροδική και αναιρείται από την ενεργοποίηση.

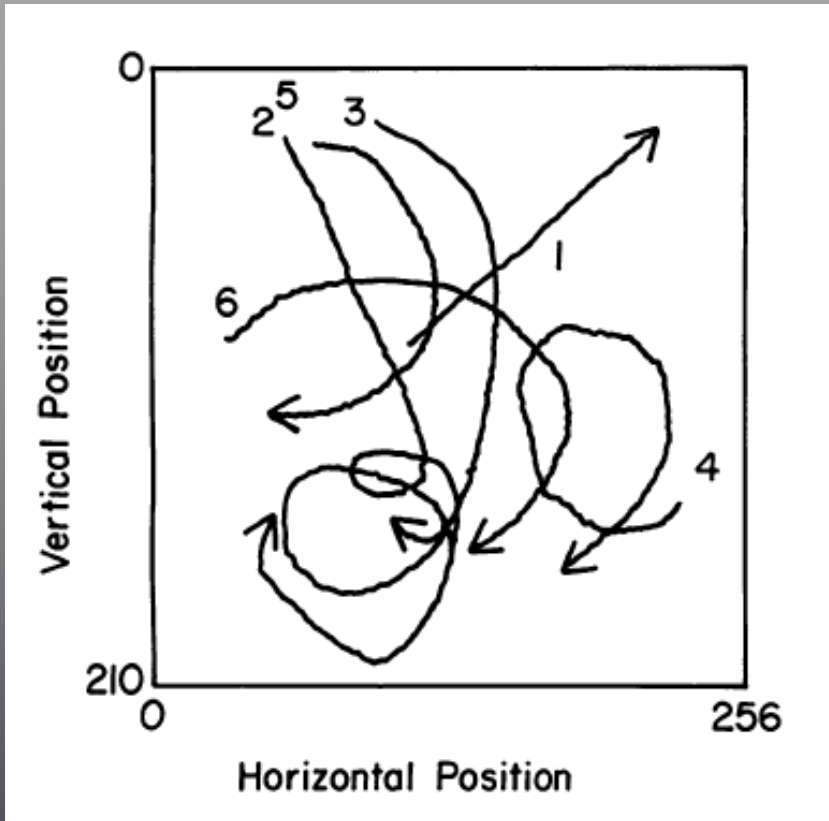
Η πρόσδεση αυτή φαίνεται ότι:

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

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

Σπερματοζώαριο προσδεμένο στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού.

# Χημειοτακτισμός - Θερμοτακτισμός



➤ Θερμοτακτισμός

➤ Διαφορά θερμοκρασίας ισθμού αυχένα 2 οC

➤ Τα σπερματοζωάρια μετακινούνται από ψυχρότερες προς θερμότερες (0.014 οC) περιοχές

➤ Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

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

➤ Είναι πιθανό κάτι τέτοιο να ισχύει και στα θηλαστικά.

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

➤ Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

➤ Προγεστερόνη??

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

➤ Πέρασμα από cumulus

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

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



# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

Πρωτεΐνη επάνω στο σπερματοζώαριο ικανή να αναγνωρίσει το  
ωάριο



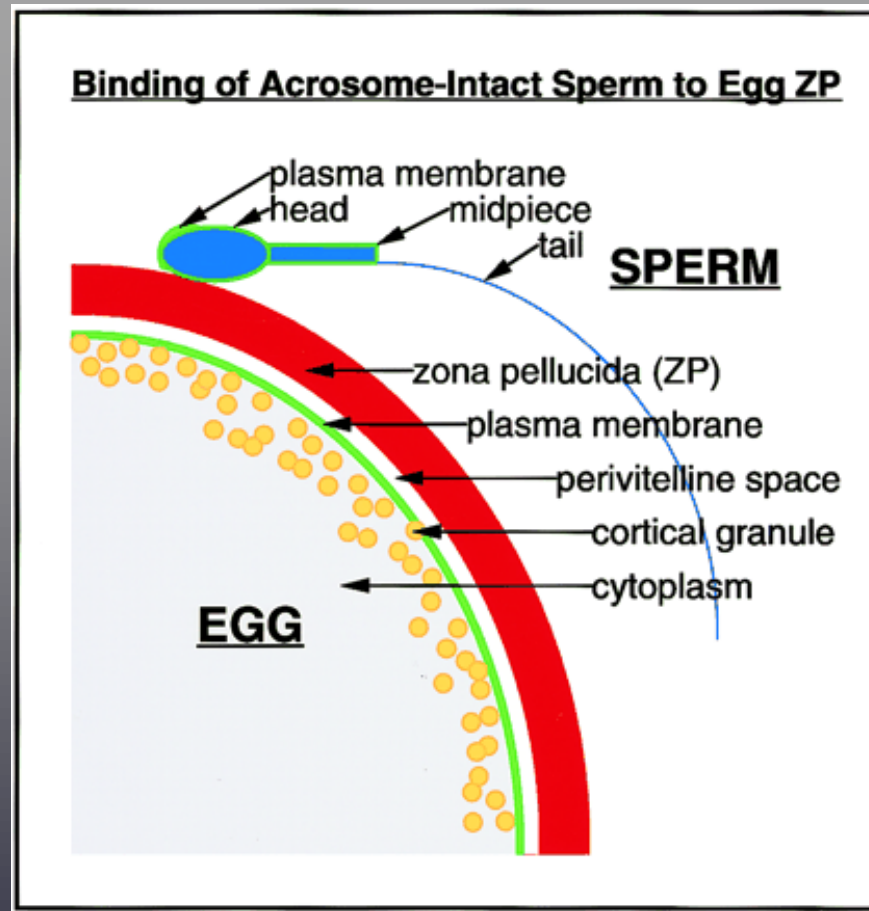
Αναγνώριση



Πρόσδεση σε έναν “υποδοχέα” στο ωάριο

Εμπλοκή γλυκοπρωτεϊνών

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

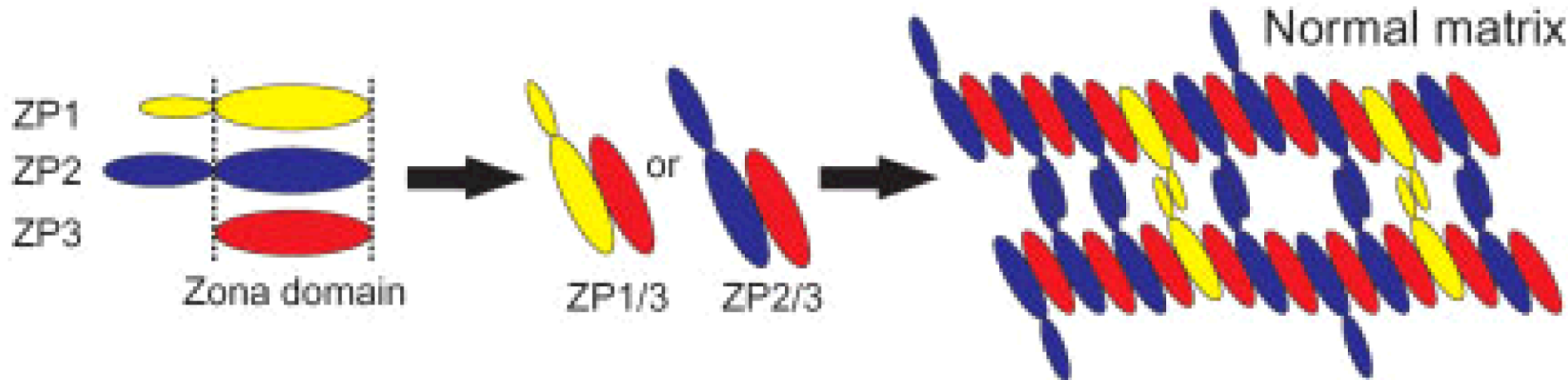


Η διαυγής ζώνη αποτελείται από από γλυκοπρωτεΐνες και ενέχεται:

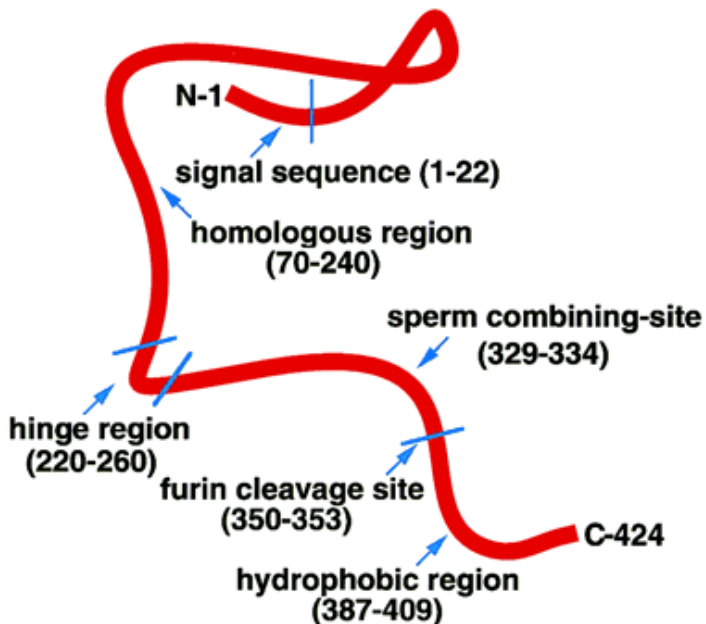
➤στην ειδική πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και

➤στην έναρξη της ακρωσμικής αντίδρασης

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών



## LANDMARKS OF THE mZP3 POLYPEPTIDE

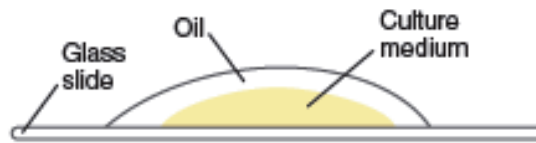


➤ Η διαυγής ζώνη αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP2 και ZP3. Κωδικοποιούνται από γονίδια που φαίνεται ότι ελέγχονται από παράγοντες bHLH

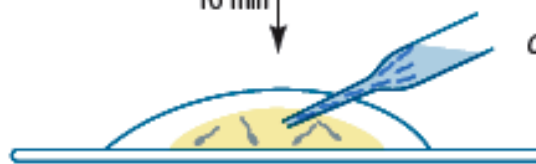
➤ Η ZP3 είναι η πρωτεΐνη που ενέχεται στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

(a) Control without competitor

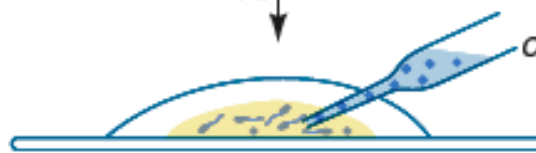


10 min



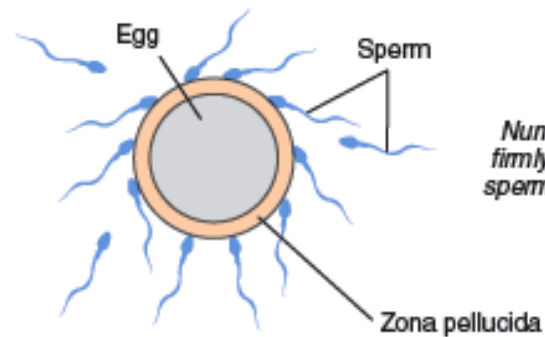
Capacitated sperm added

1 h



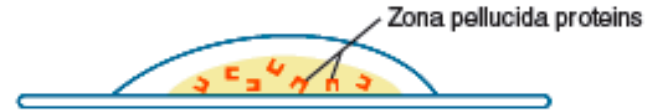
Ovulated unfertilized eggs added

Further incubation

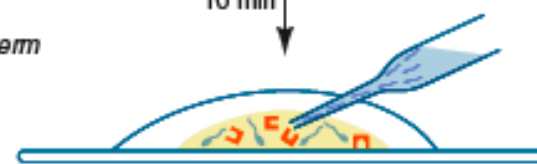


Number of firmly bound sperm scored

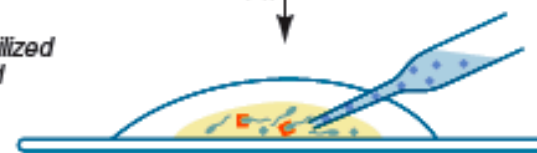
(b) Experiment with competitor



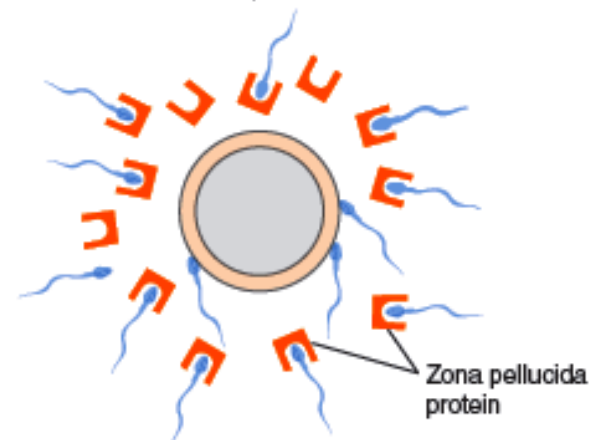
10 min



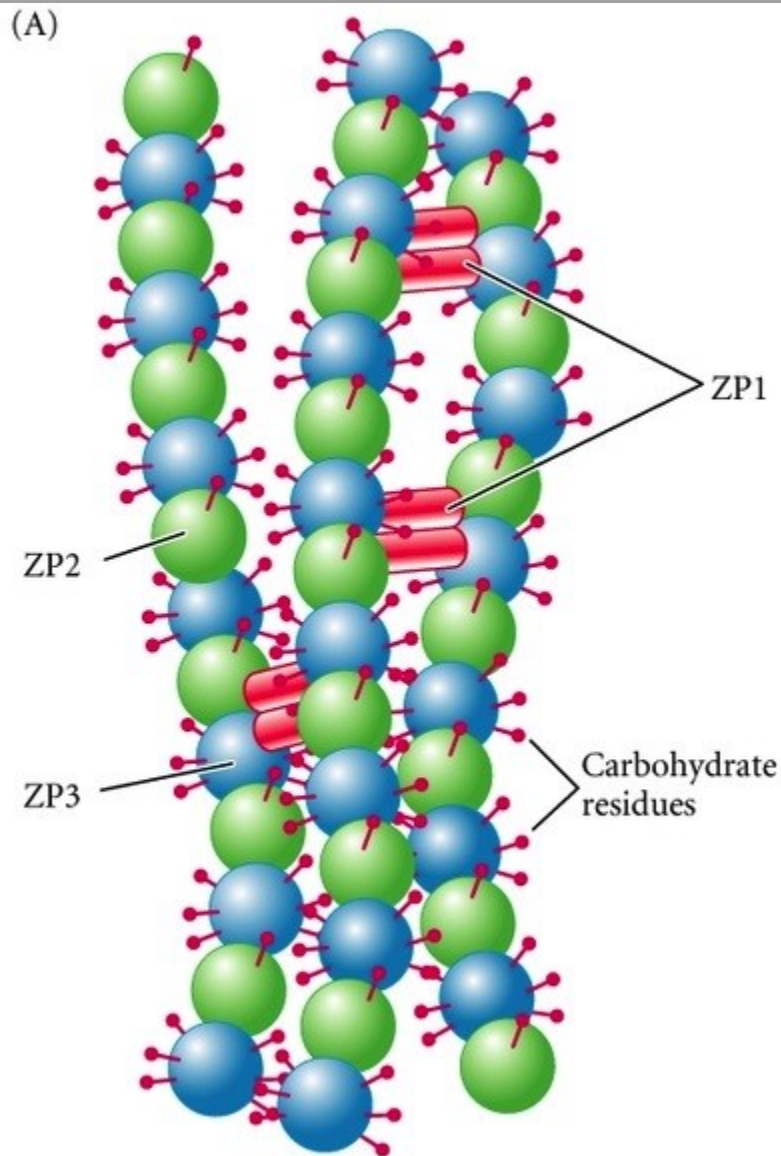
1 h



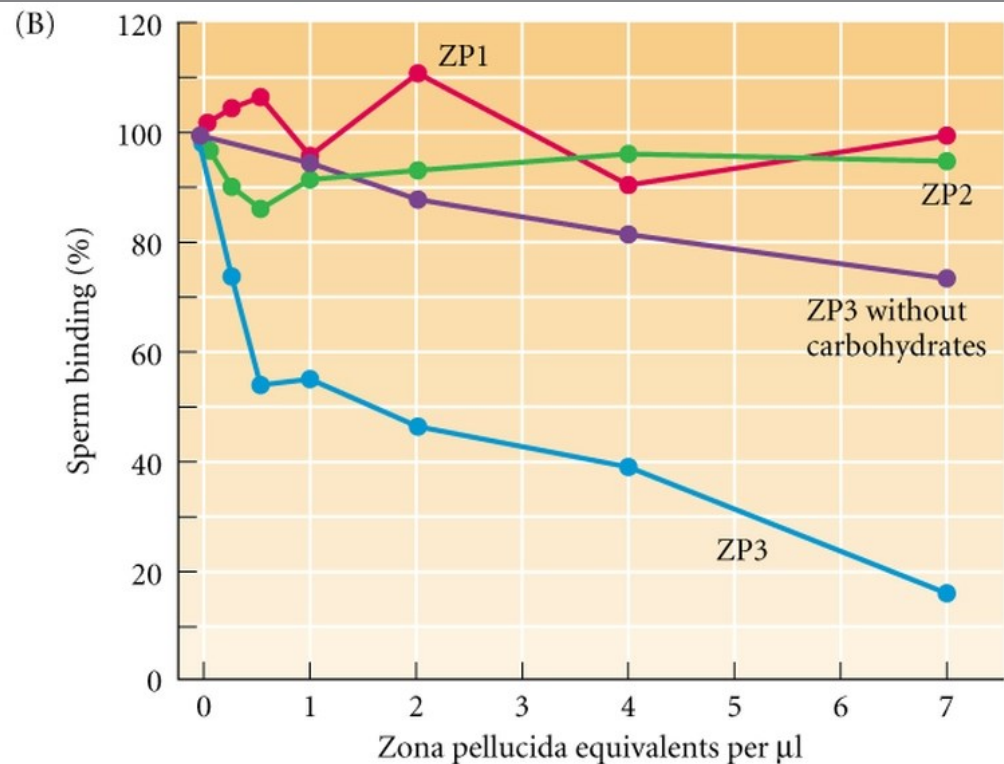
Further incubation



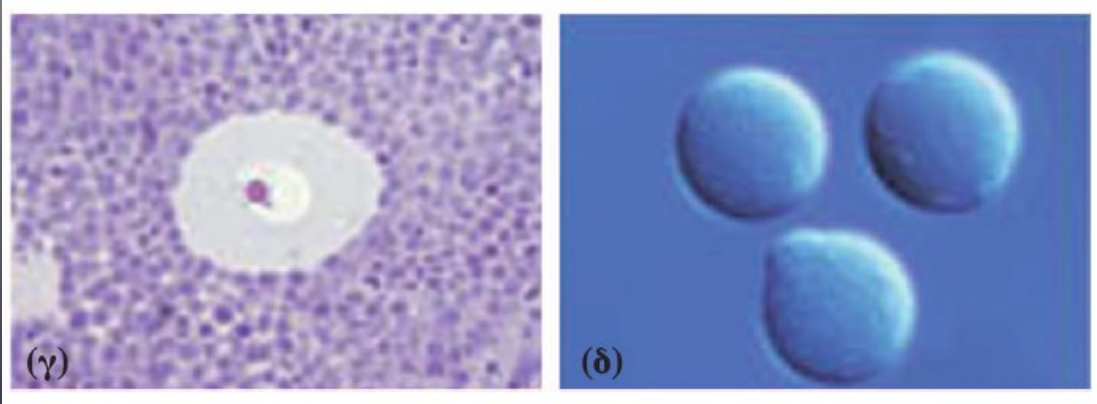
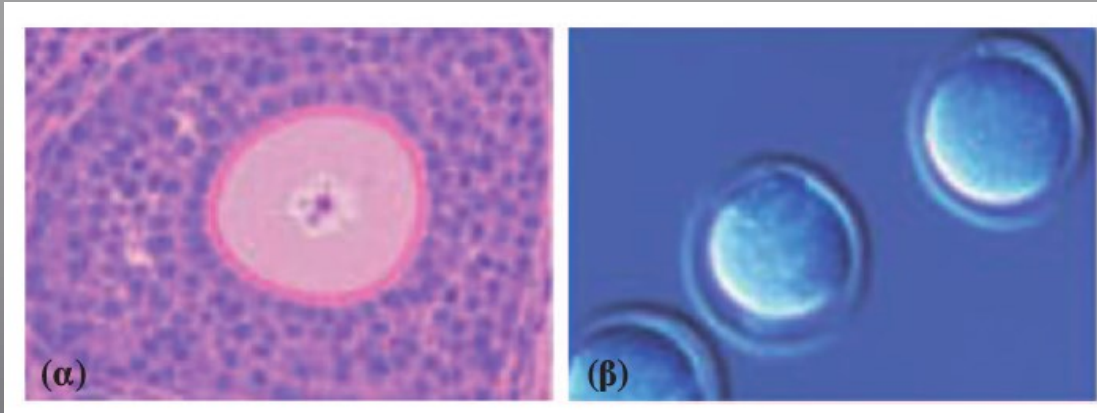
# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών



➤ Προεπάση των σπερματοζωαρίων με καθαρή ZP3 εμποδίζει την πρόσδεση των σπερματοζωαρίων στα ωάρια. Τα κατάλοιπα των υδατανθράκων παίζουν και αυτά ρόλο.



# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών



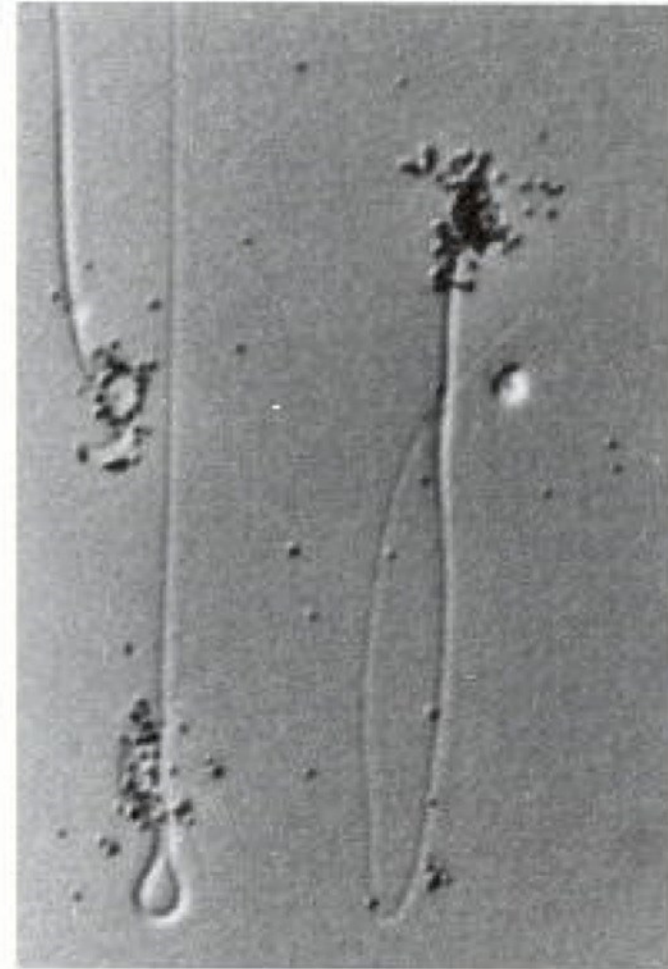
Τα ωάρια από θηλυκά άτομα στα οποία έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ZP3 στερούνται διαφανούς ζώνης: (α, β) φυσιολογικά ωάρια, (γ, δ) ωάρια από θηλυκά άτομα από τα οποία απουσιάζει η ZP3.

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

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών



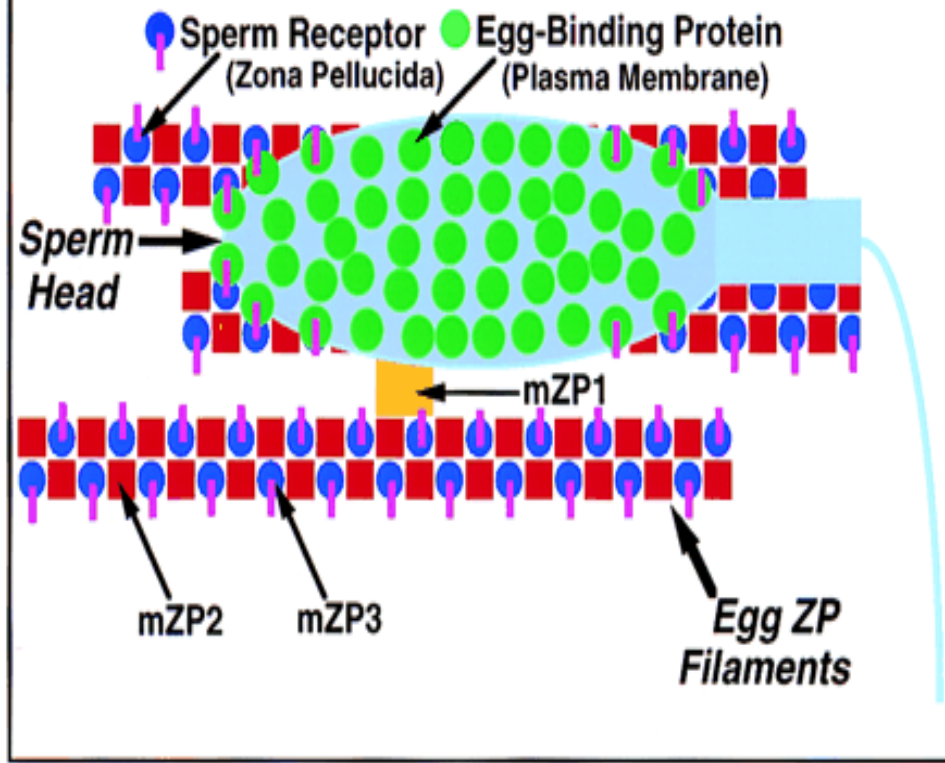
(B)



Στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου εντοπίζονται «υποδοχείς» για την ZP3

# Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

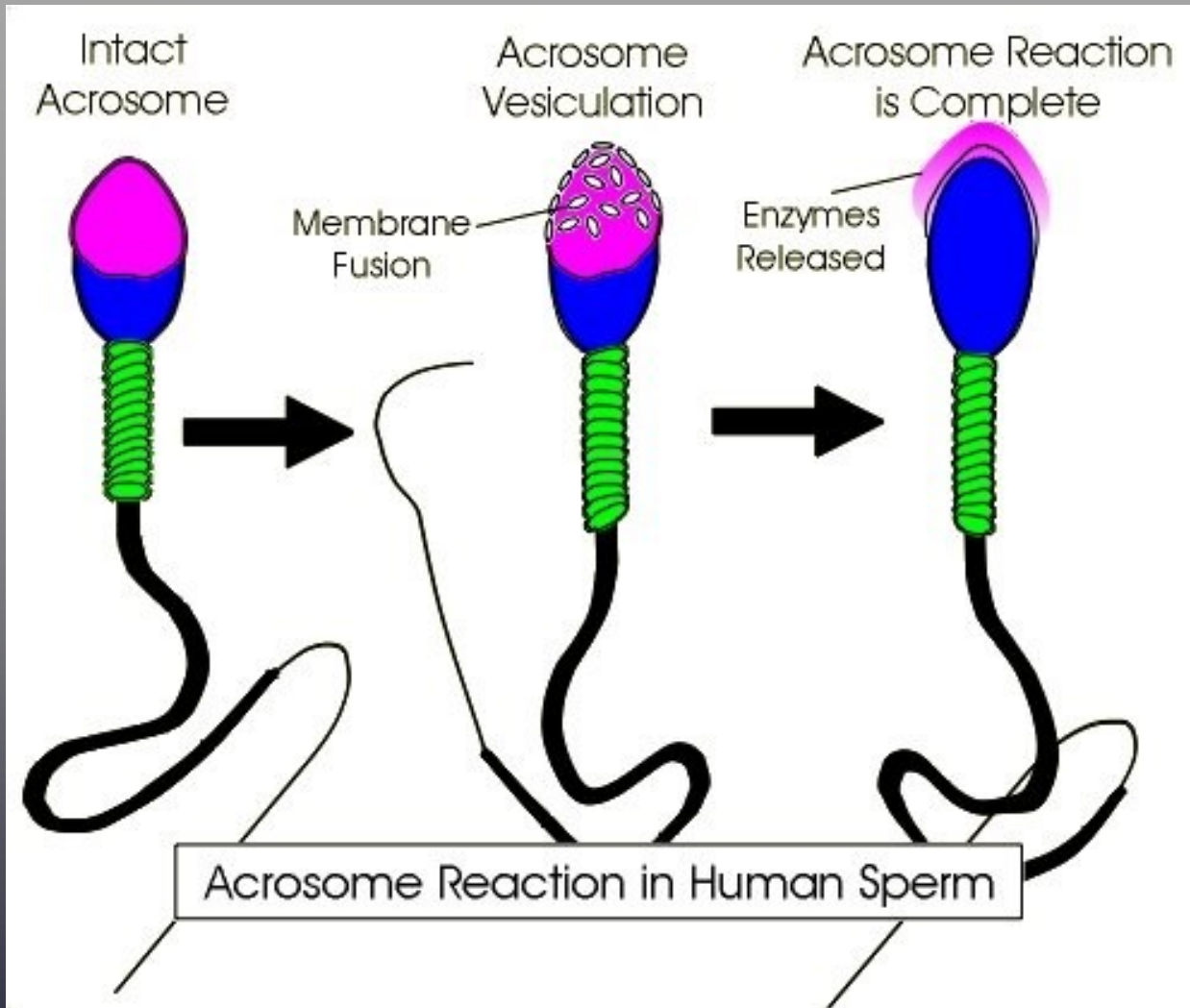
## Binding of Sperm to Zona Pellucida Filaments



Η πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου που αναγνωρίζει τη ZP3 είναι μια επιφανειακή  $\beta$ -1,4-γαλακτοζυλο-τρανσφεράση (GalT) η οποία προσδένεται ισχυρά σε αυτή. Η αλληλεπίδραση της ZP3 με την GalT προκαλεί την ακρωσική αντίδραση.

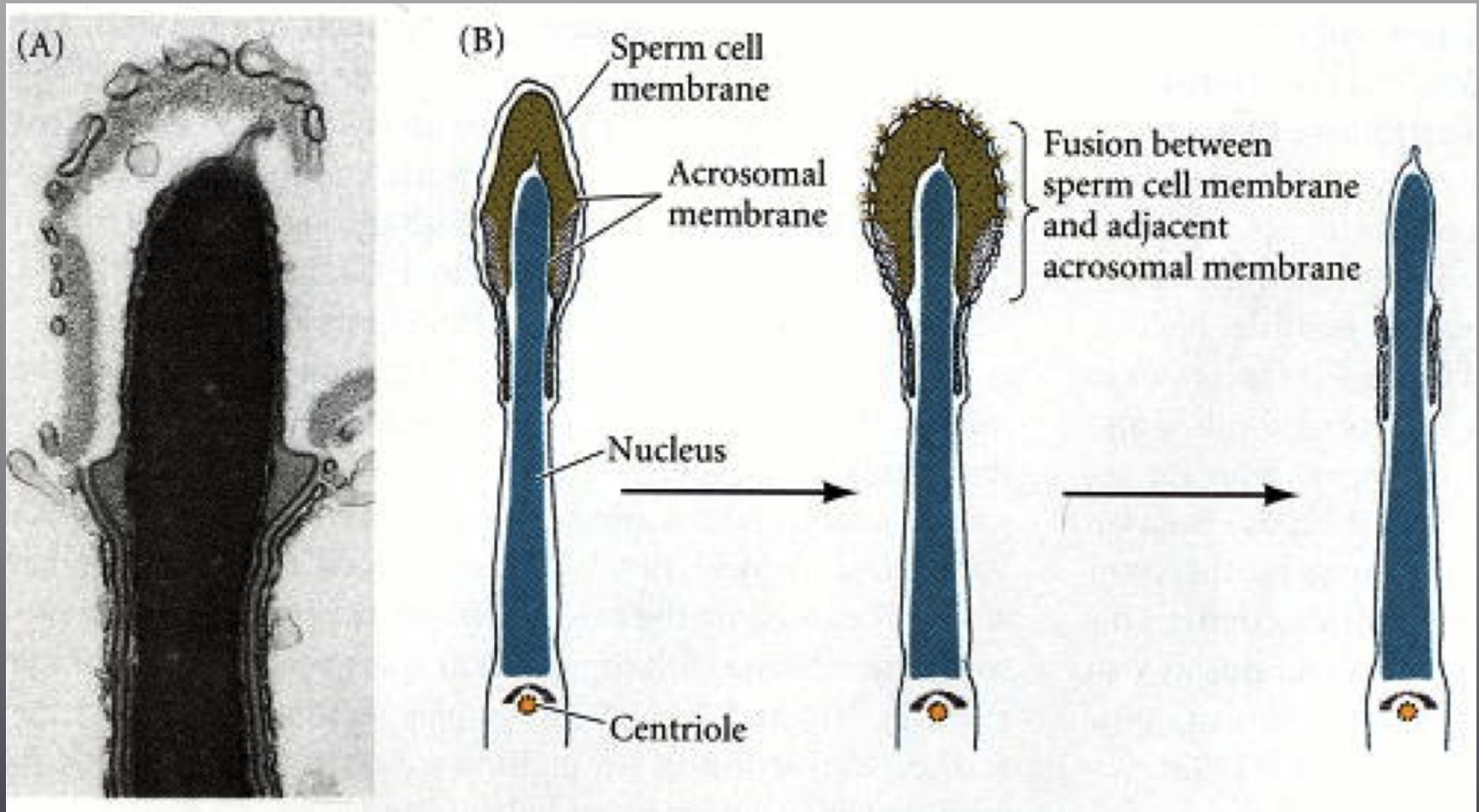


# Η ακροσωμική αντίδραση



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

# Η ακροσωμική αντίδραση



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

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

➤ Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (ακροσίνη - διαφανής ζώνη)

# Η ακροσωμική αντίδραση

➤ Στο στάδιο αυτό η αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου διεκπεραιώνεται από τις ADAM

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

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

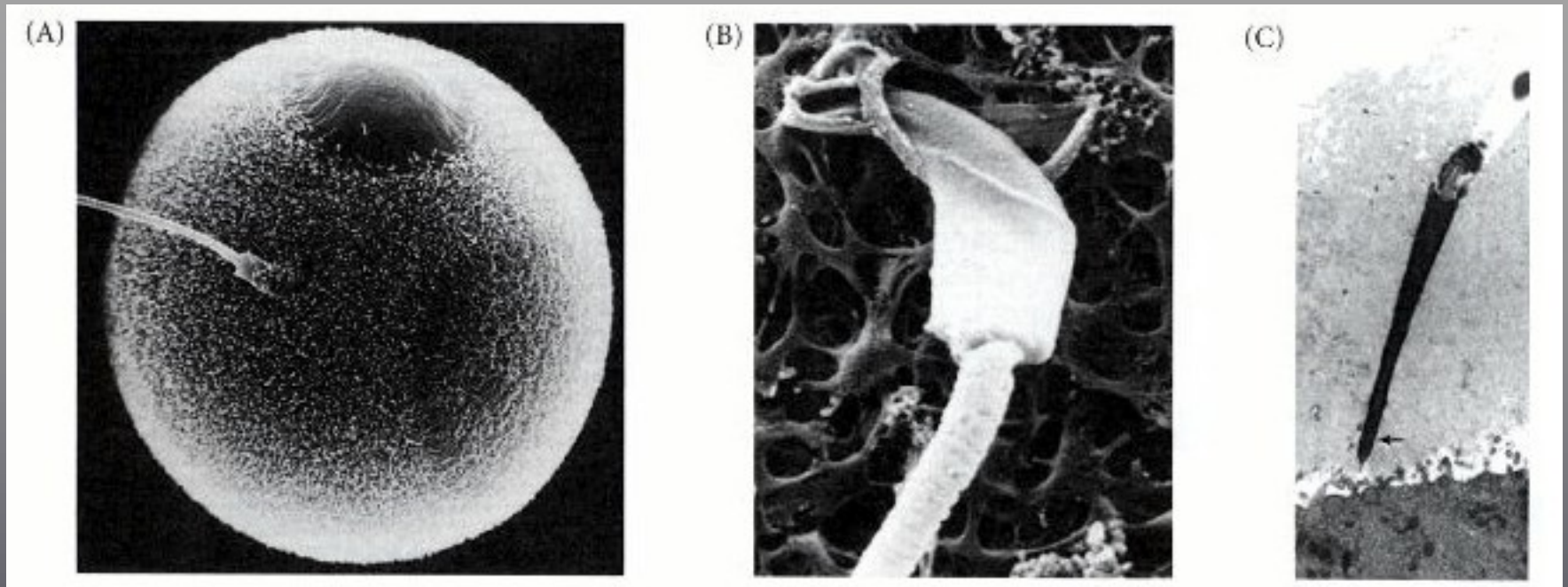
➤ Τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει η φερτιλίνη β ή η κυριτεστίνη εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα.

➤ Πιθανός στόχος των ADAM : η ιντεγκρίνη α6

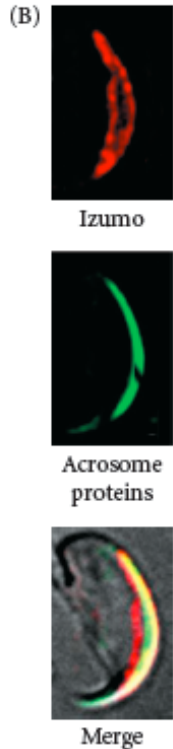
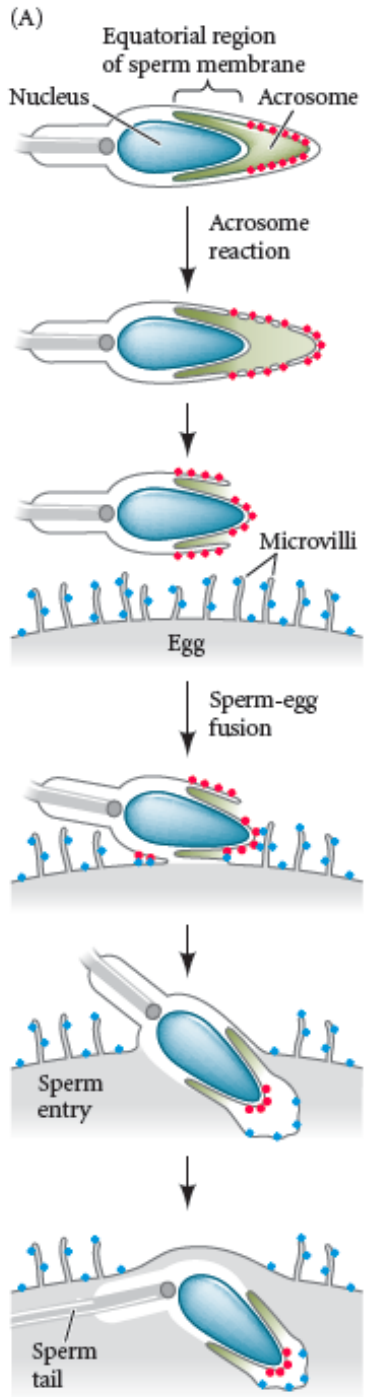
➤ Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της α6 παρεμποδίζουν την γονιμοποίηση *in vitro*.

➤ Ωστόσο τα knock out ιντεγκρίνης 6 έχουν φυσιολογική γονιμότητα.

# Σύντηξη γαμετών



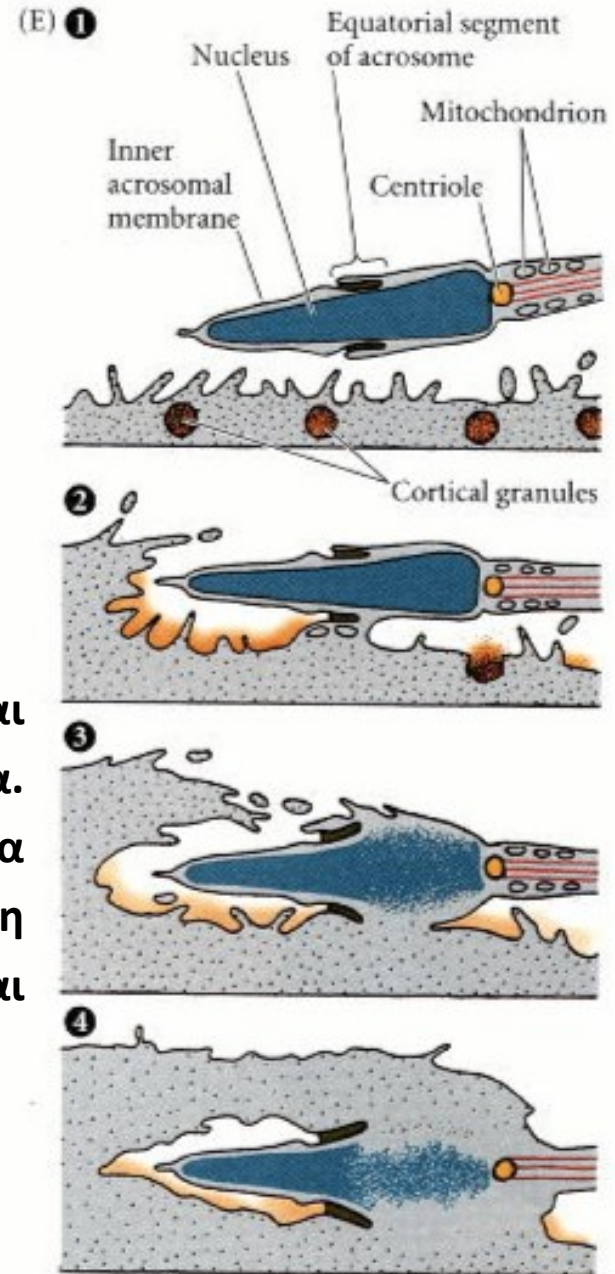
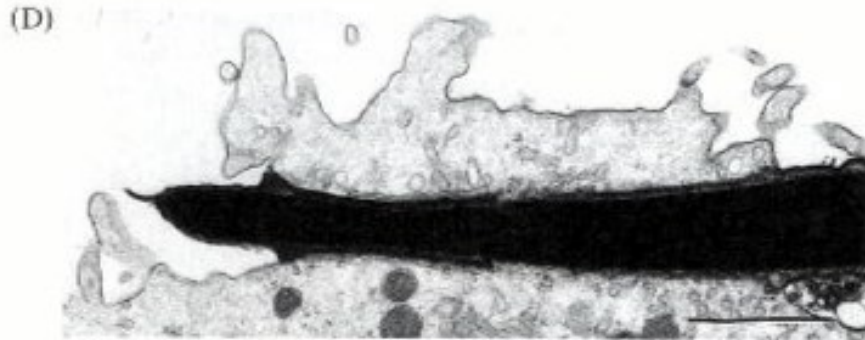
- Η επαφή ωαρίου-σπερματοζωαρίου γίνεται στο πλαϊό του σπερματοζωαρίου .
- Φαίνεται ότι ενέχεται μια πρωτεΐνη που συνδέεται με ιντεγκρίνες η CD9.
- Η CD9 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ωαρίου.
- Στο knock-out του CD9 τα θηλυκα είναι στείρα- αποτυχία στη σύντηξη.
- Μπορεί να γίνει διάσωση με ένεση mRNA του CD9.



# Σύντηξη γαμετών

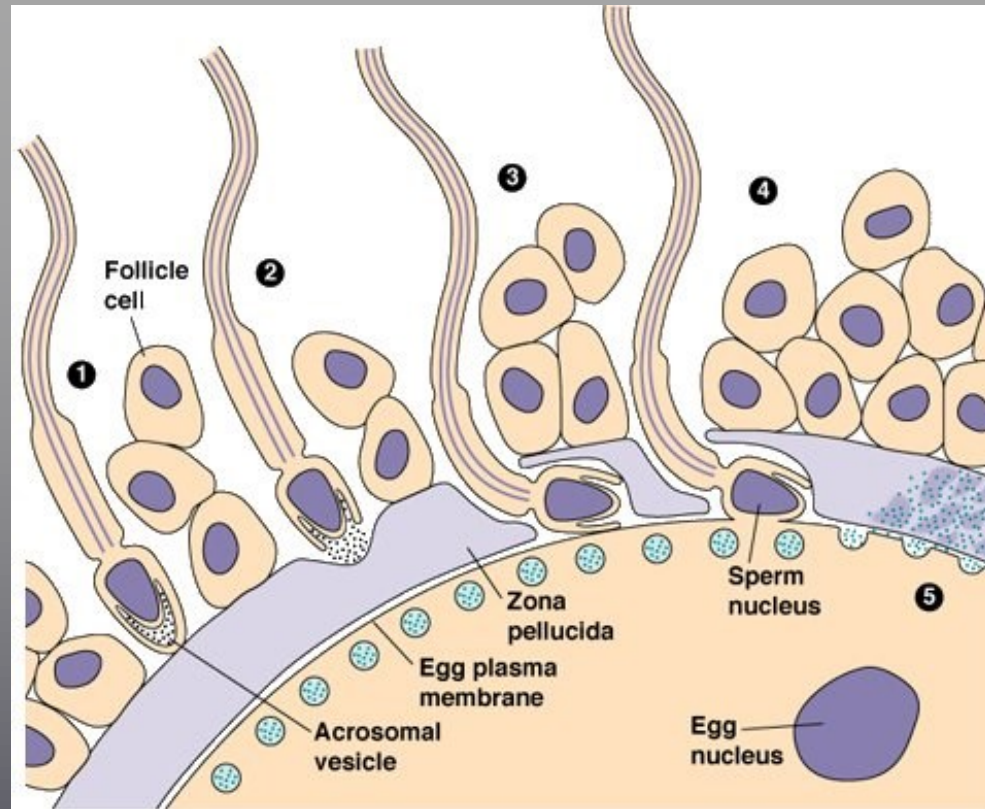
- Η CD9 στρατολογείται στη μεμβράνη του ωοκυττάρου από την Juno .
- Η Juno αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου την Izumo (με επικράτειες ανοσοσφαιρίνης)
- Knock out του γονιδίου *Izumo* - τα σπερματοζωάρια δεν ολοκληρώνουν τη σύντηξη
- Knock out του γονιδίου *Juno* ούτε πρόσδεση του σπερματοζωαρίου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

# Η αντίδραση του φλοιού



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

# Η αντίδραση του φλοιού



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

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

➤ Πρωτεάσες που αποικοδομούν τη ZP2.

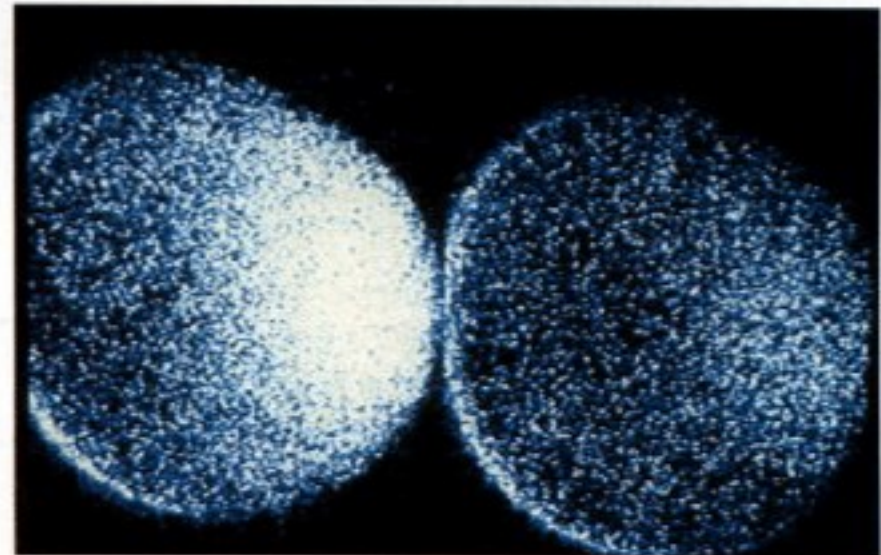
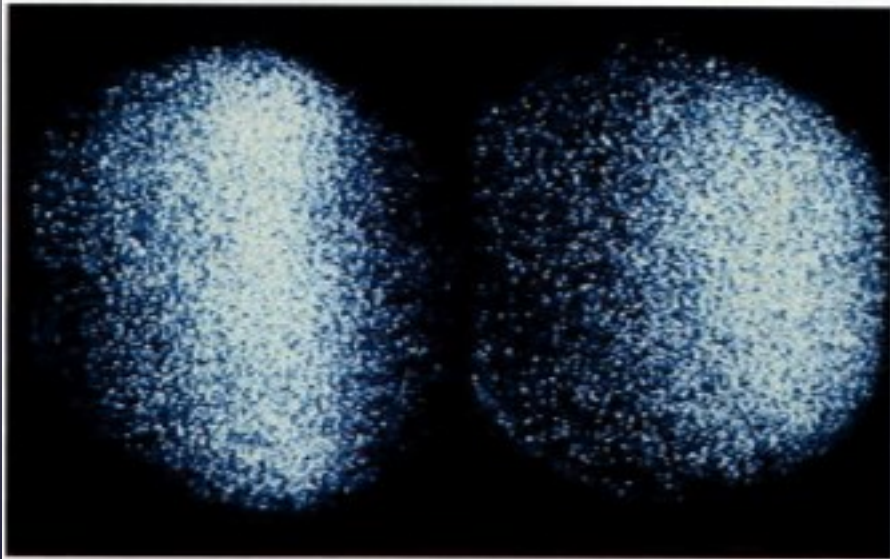
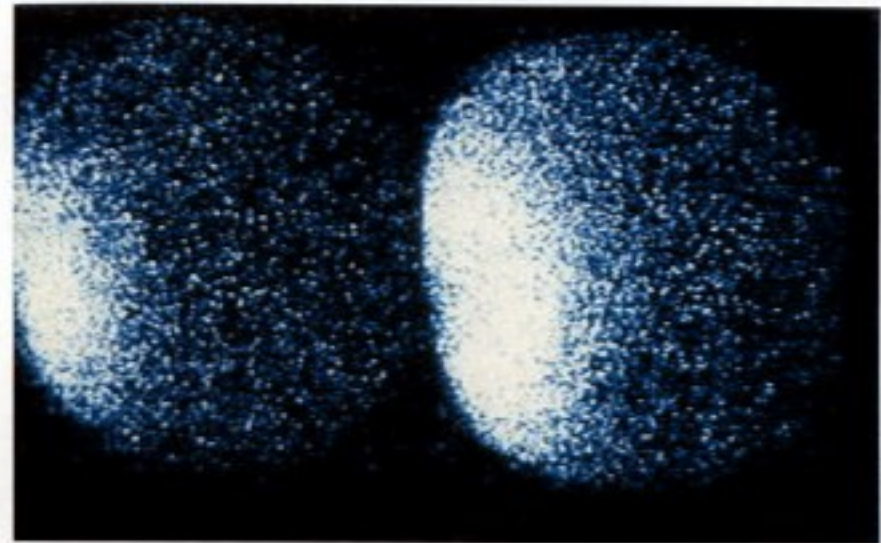
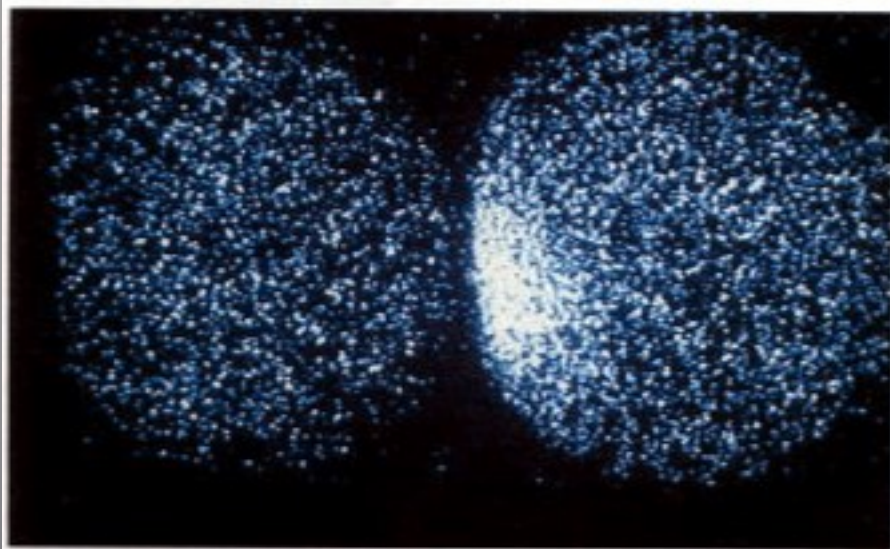
➤ Αναστολείς της ακροσίνης

➤ Φράγμα στην πολυσπερμία.

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

➤ Αύξηση του ενδοκυττάριου Ca.- απελευθέρωσή του από ενδοπλασματικό δίκτυο.

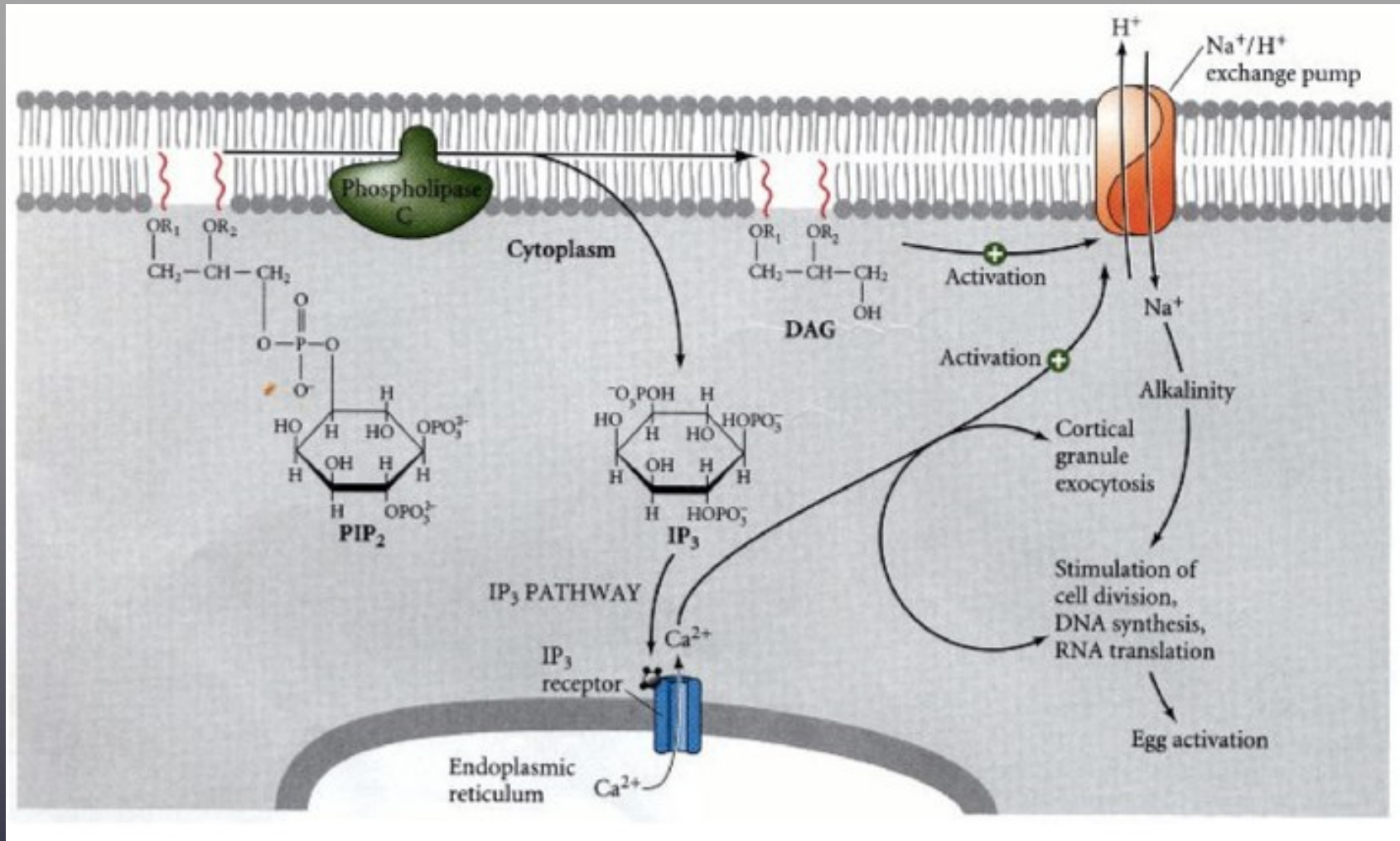
## Απελευθέρωση ενδοκυττάρριου Ca



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



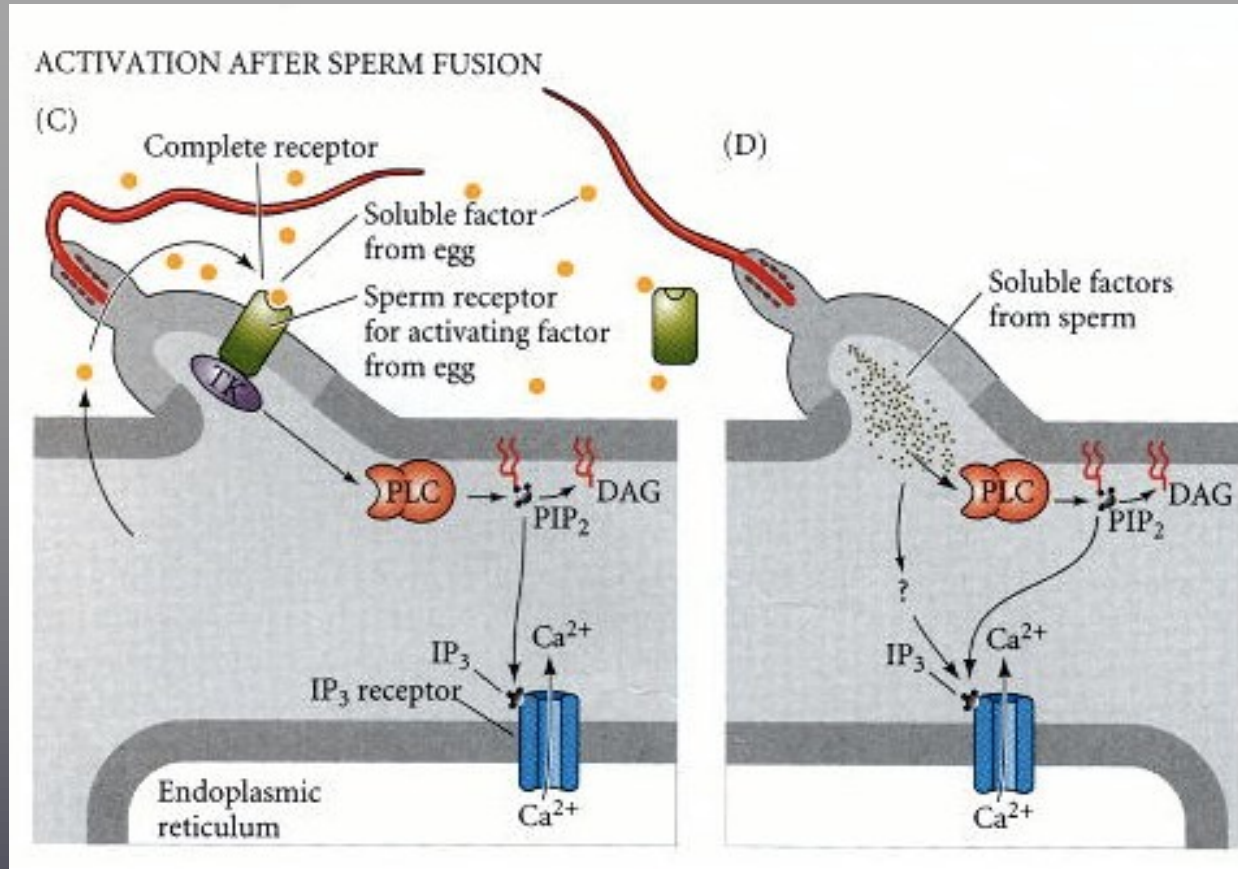
# Πώς δίνεται το έναυσμα για την απελευθέρωση Ca;



➤ Το IP<sub>3</sub> ενέχεται στην απελευθέρωση του Ca<sup>2+</sup> παρεμποδίζοντας τον υποδοχέα του αναστέλλεται η απελευθέρωση του Ca<sup>2+</sup>.

➤ Το IP<sub>3</sub> παράγεται από το PIP<sub>2</sub> μετά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C.

# Τι ενεργοποιεί τη φωσfolιπάση C;



➤ Υπάρχουν αρκετές φωσfolιπάσες.

➤ Υπάρχουν πολλά πιθανά μονοπάτια ενεργοποίησής τους.

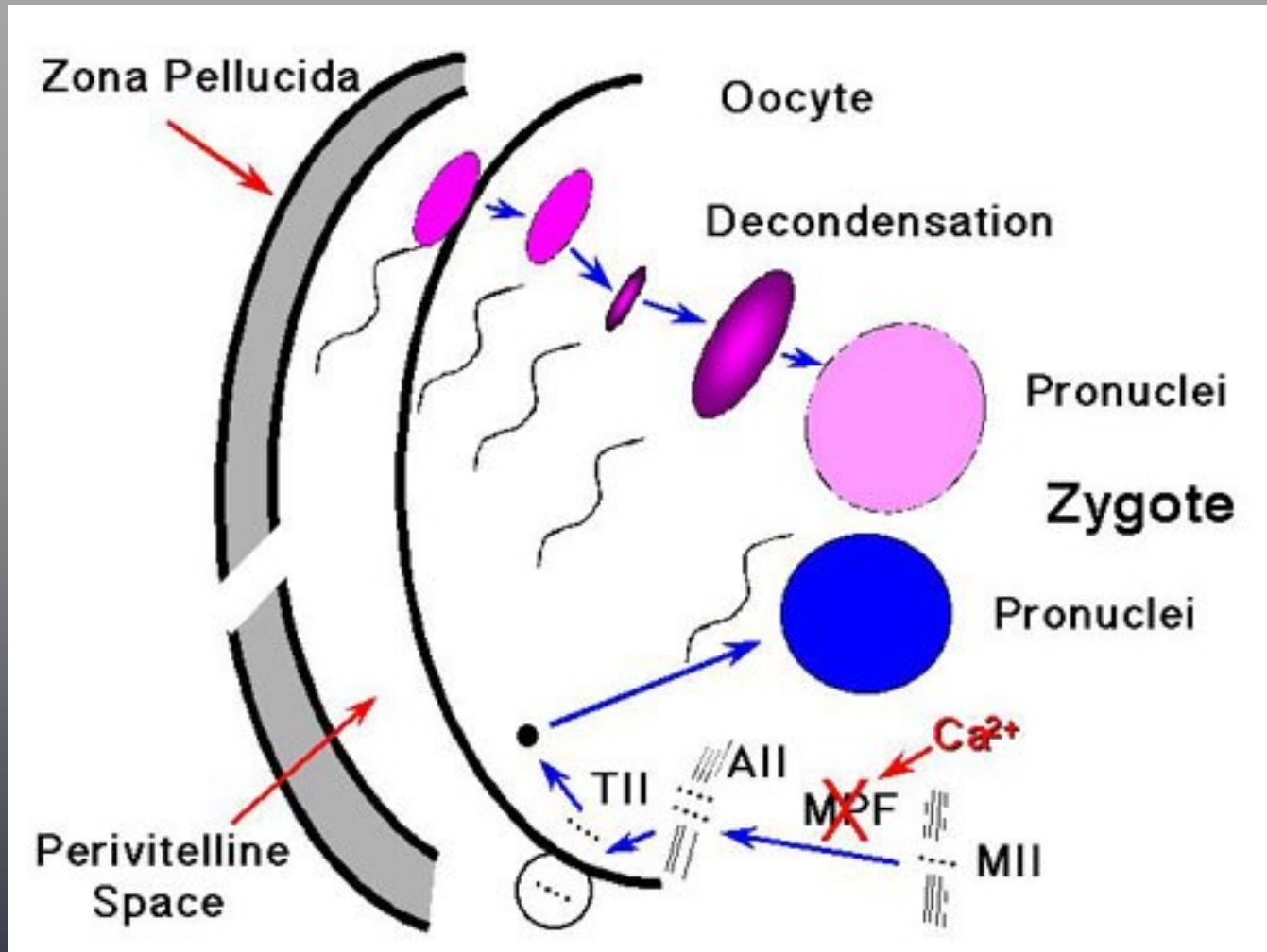
➤ Υπάρχουν διαφορές από είδος σε είδος.

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

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

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

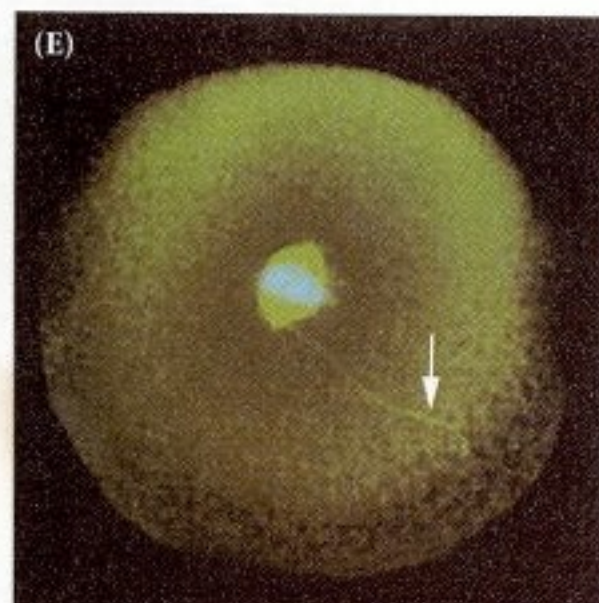
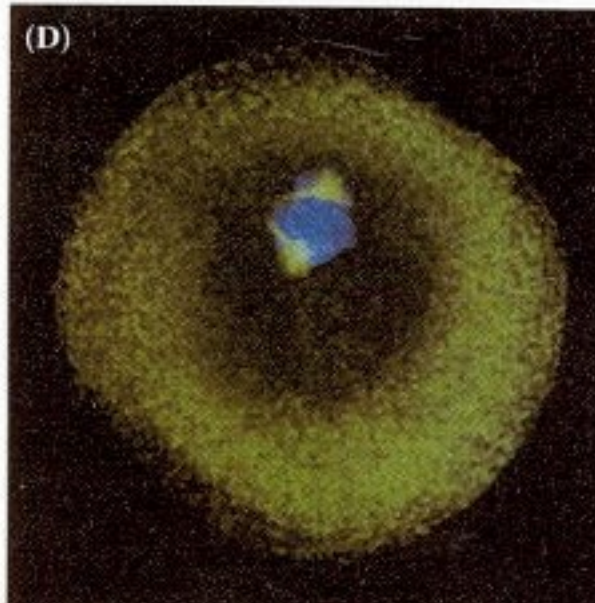
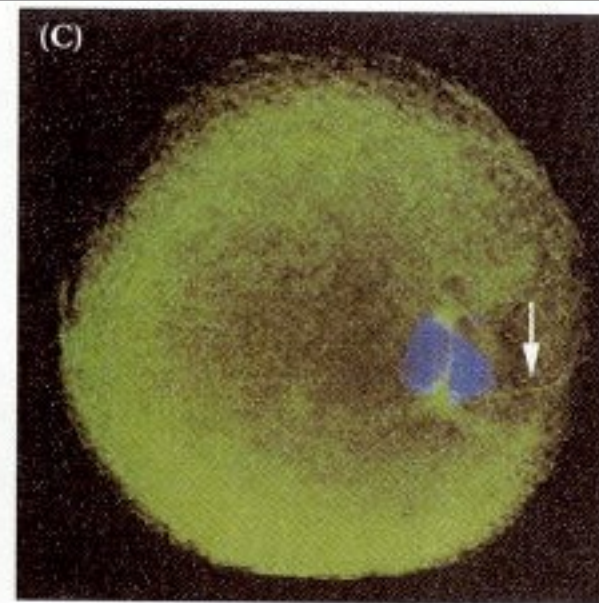
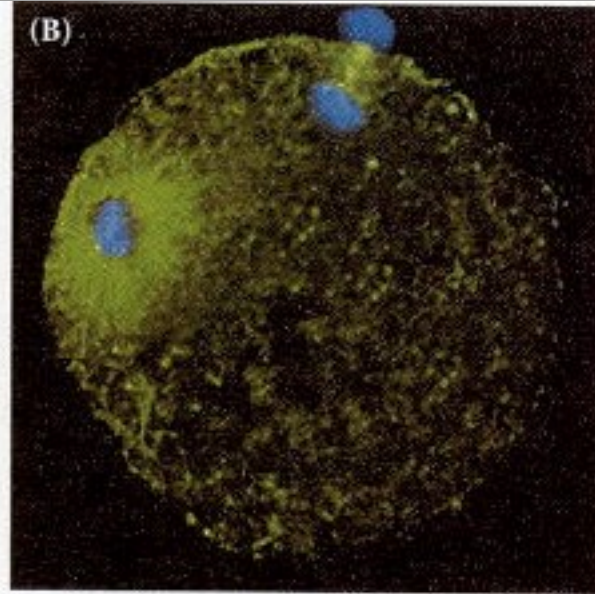
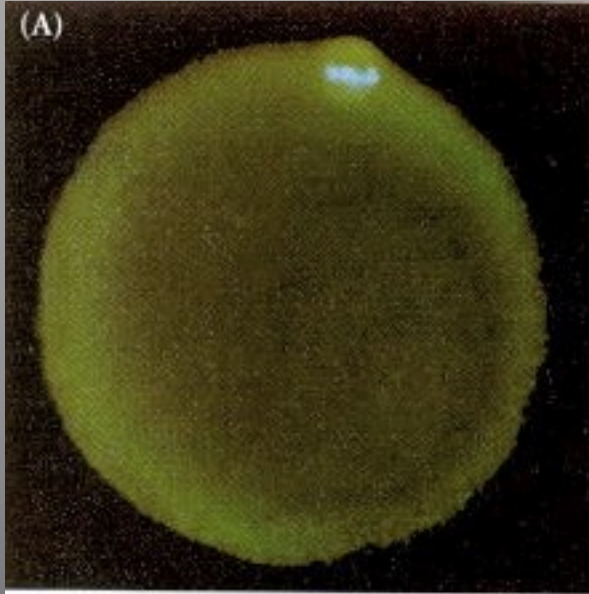
## Μετανάστευση προπυρήνων



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

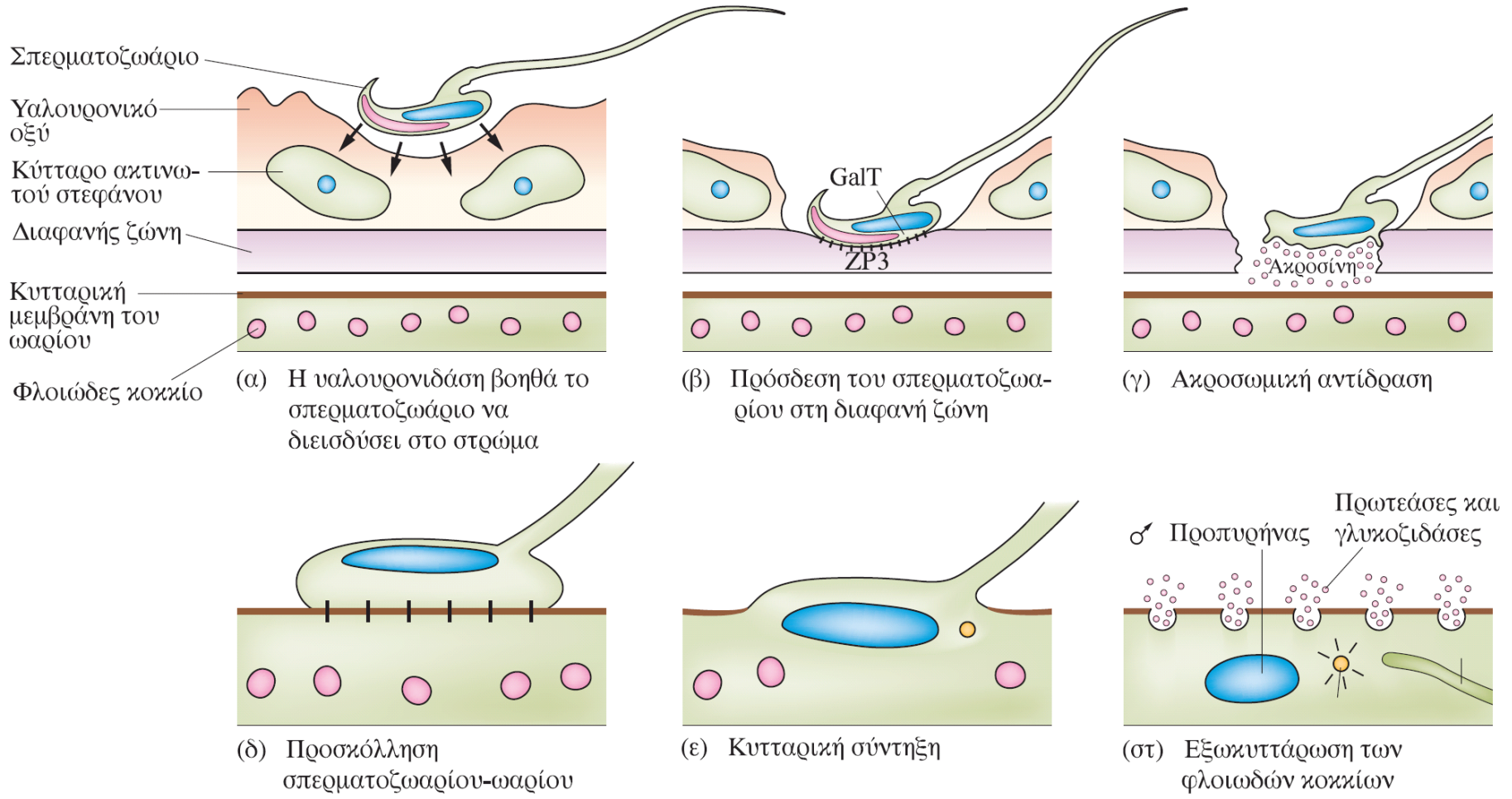
➤ Η σύνθεση DNA γίνεται ανεξάρτητα σε κάθε πυρήνα.

# Μετανάστευση προπυρήνων



Η σύνθεση DNA γίνεται ανεξάρτητα σε κάθε πυρήνα. Δεν υπάρχει σύντηξη πυρήνων!

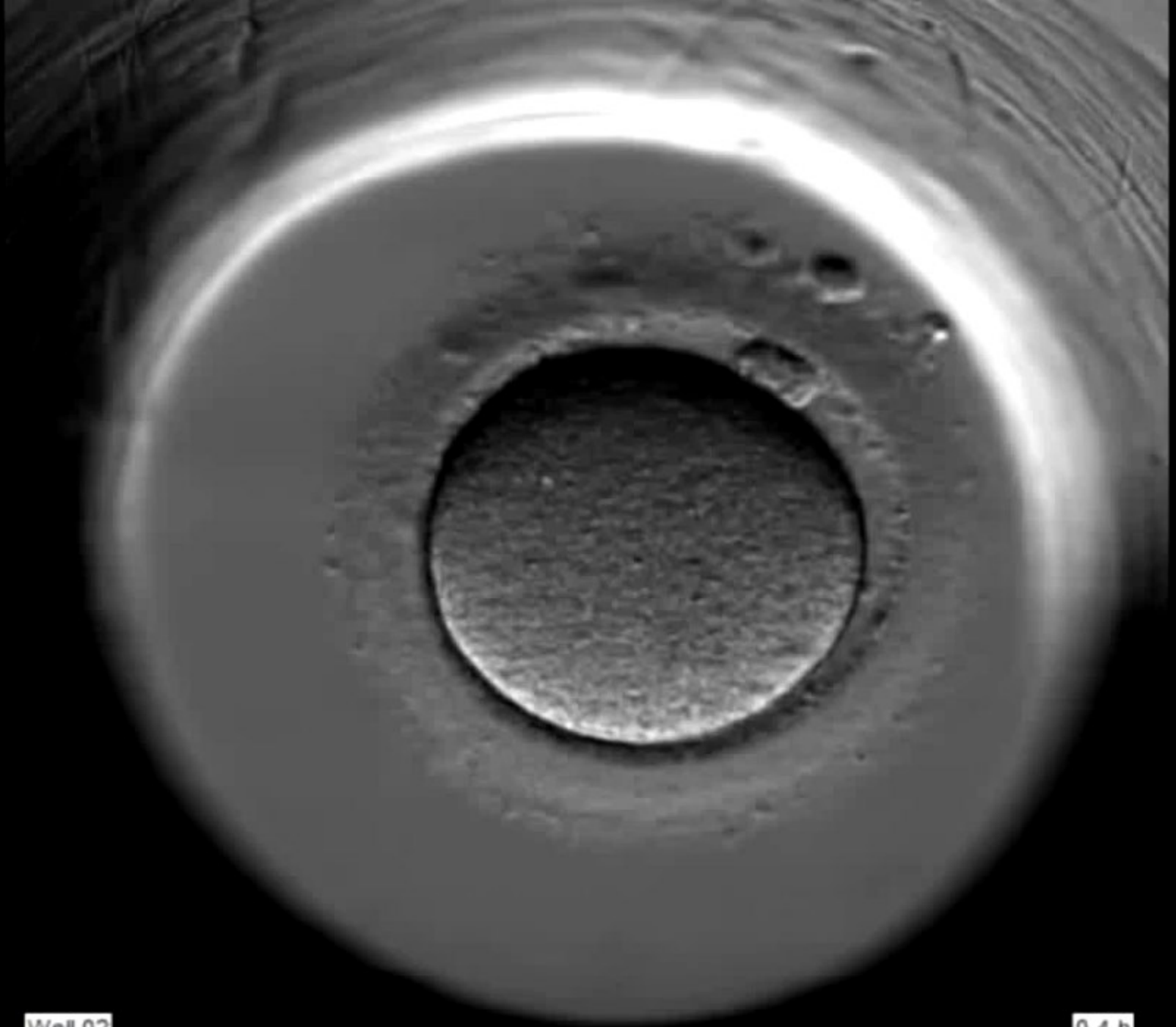
# Η γονιμοποίηση στα θηλαστικά



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

# Η γονιμοποίηση και ο χρόνος.. (Αχινός)

1. Επαφή, αναγνώριση & πρόσδεση σπερματοζωαρίου σε ωάριο (0 sec)
2. Αύξηση δυναμικού μεμβράνης/Παρεμπόδιση πολυσπερμίας (2 sec)
3. Σύντηξη σπερματοζωαρίου με τη μεμβράνη του ωαρίου (10 sec)
4. Φλοιϊκή αντίδραση (30 sec)
5. Σχηματισμός μεμβράνης γονιμοποίησης (1 min)
6. Μετανάστευση σπερματοζωαρίου στο κέντρο του ωαρίου (1,5 min)
7. Έναρξη αποσυμπύκνωσης πυρήνα σπερματοζωαρίου (2 min)
8. Σύντηξη προπυρήνων ωαρίου & σπερματοζωαρίου (12 min)
9. Έναρξη σύνθεσης DNA (20 min)
10. Πρώτη κυτταρική διαίρεση – αυλάκωση (90 min)

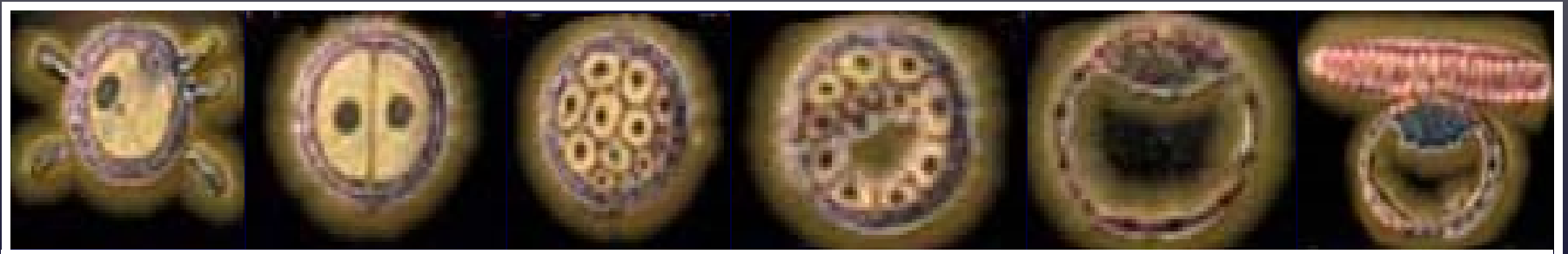


Well 02

0.4 h

# Τι είναι η αυλάκωση;

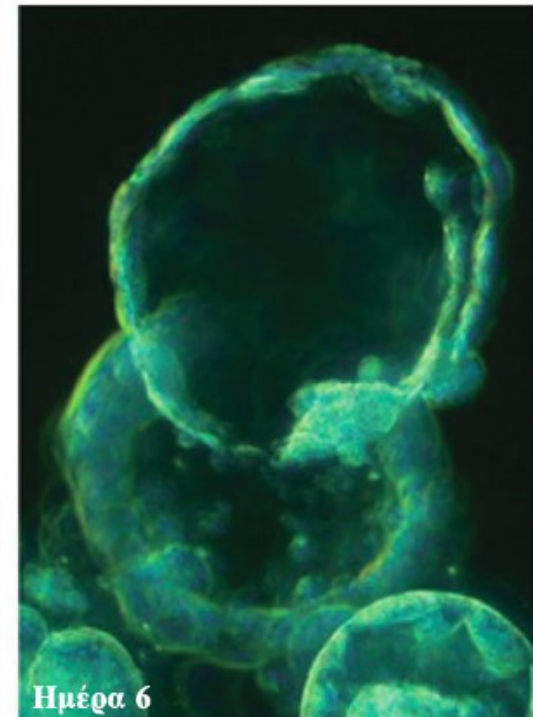
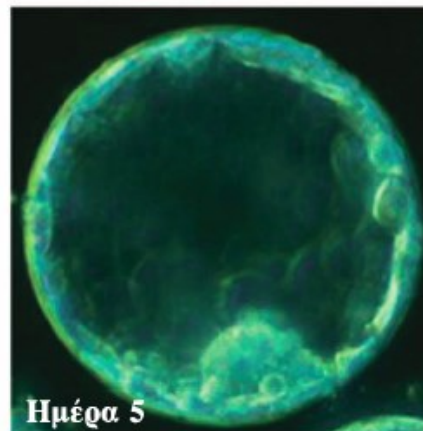
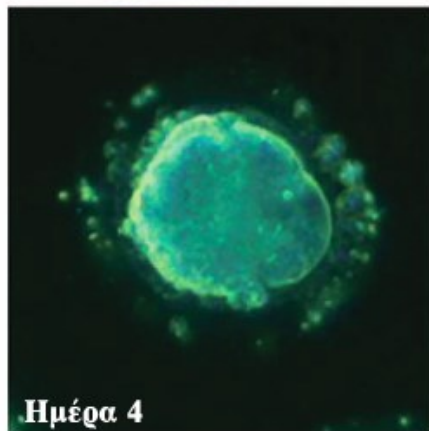
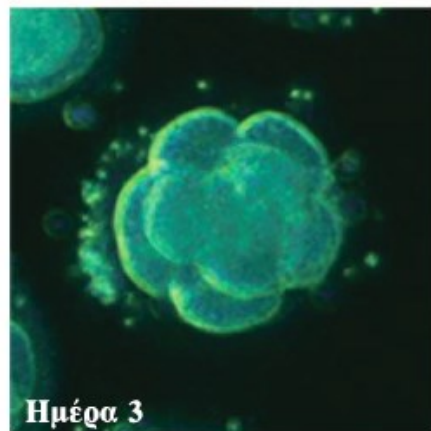
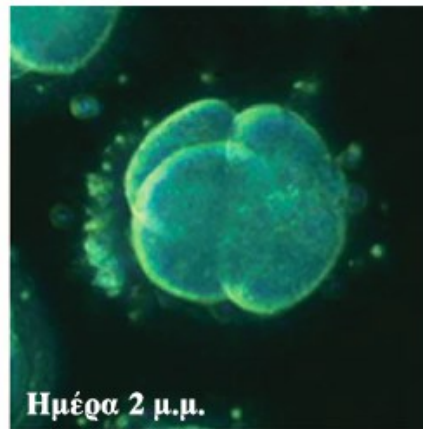
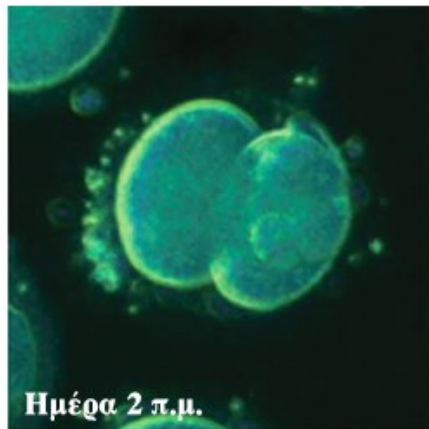
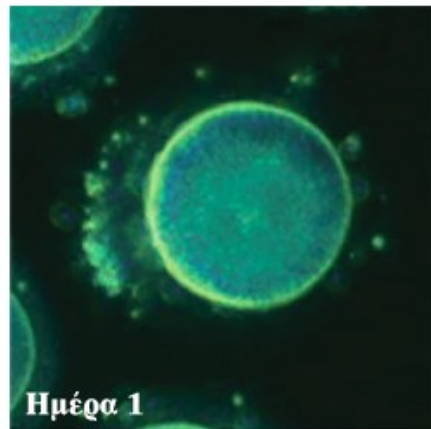
- Μια σειρά κυτταρικών διαιρέσεων έτσι το ζυγωτό μετατρέπεται σε μια πολυκύτταρη βλαστοκύστη. Τα κύτταρα κατά την αυλάκωση ονομάζονται βλαστομερίδια.
- Στις μιτωτικές αυτές διαιρέσεις δεν υπάρχουν οι φάσεις G1 και G2, αλλά εναλλαγή των M και S.
- Κατά την αυλάκωση δεν αυξάνεται το μέγεθος έτσι η βλαστοκύστη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



Αυλάκωση σε ένα ανθρώπινο έμβρυο



# Τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπου

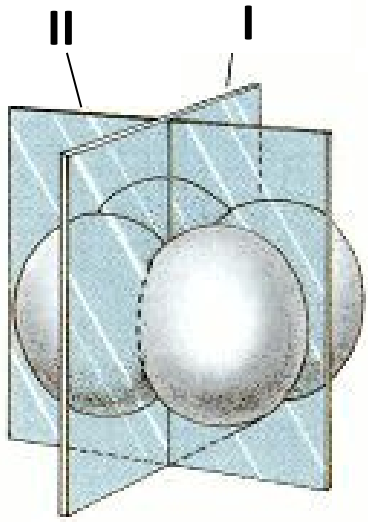


Γονιμοποιημένο ωάριο, στάδιο δύο κυττάρων, στάδιο τεσσάρων κυττάρων, στάδιο οκτώ κυττάρων, συμπαγές μορίδιο, βλαστοκύστη, εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη. Ευγενική παραχώρηση του Dr K. Loewke, Stanford University.

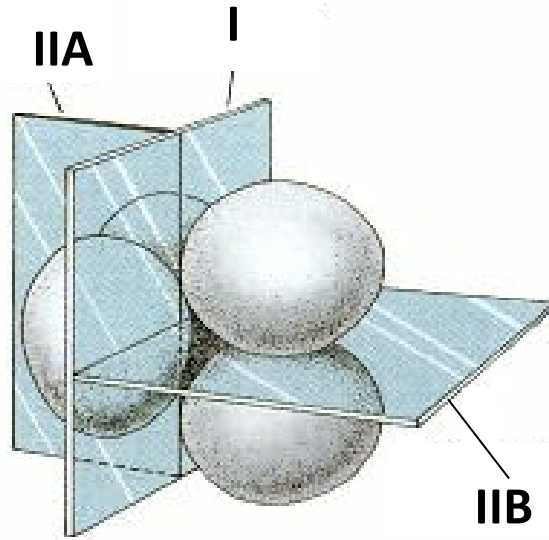
# Χαρακτηριστικά της αυλάκωσης στα θηλαστικά

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

# Περιστροφική αυλάκωση



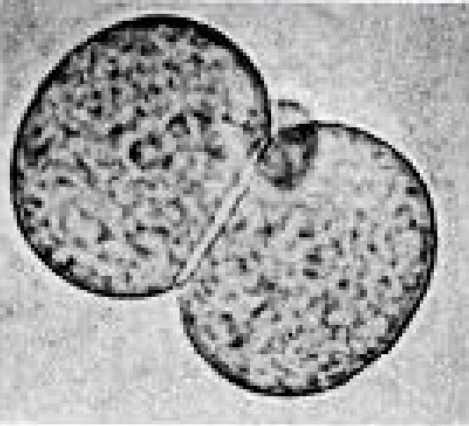
A: Εχινόδερμα,  
Αμφίβια



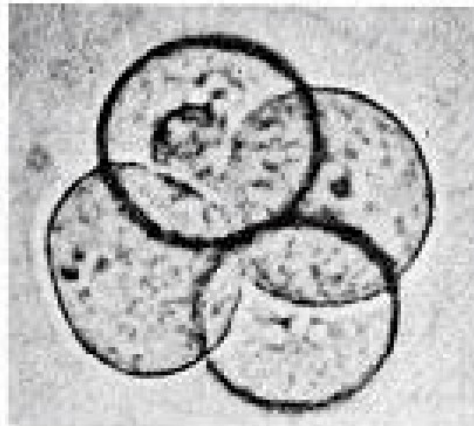
B: Θηλαστικά

**Πρώτο** αυλακωτικό επίπεδο (I)  
**μεσημβρινό.**

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



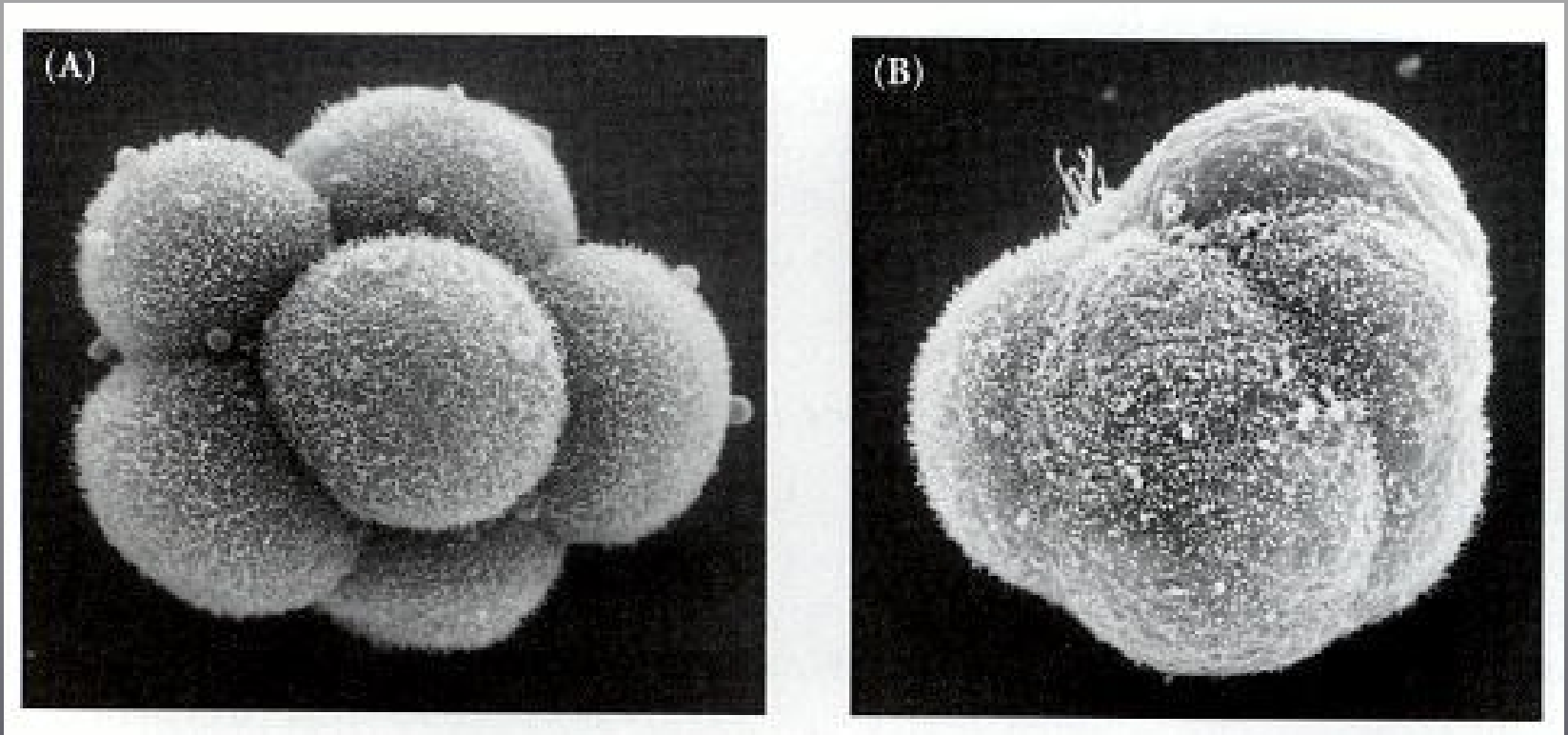
Στάδιο 2 κυτ.



Στάδιο 4 κυτ.

Οι δύο πρώτες διαιρέσεις σε ένα  
έμβryo ποντικού.

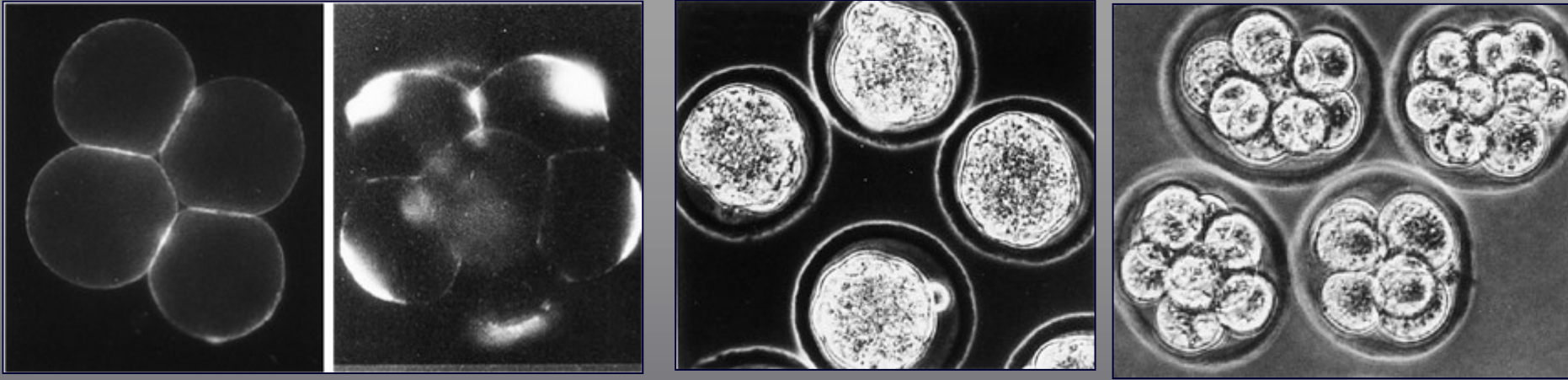
# Σύμπληξη



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

# Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπληξη;

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



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

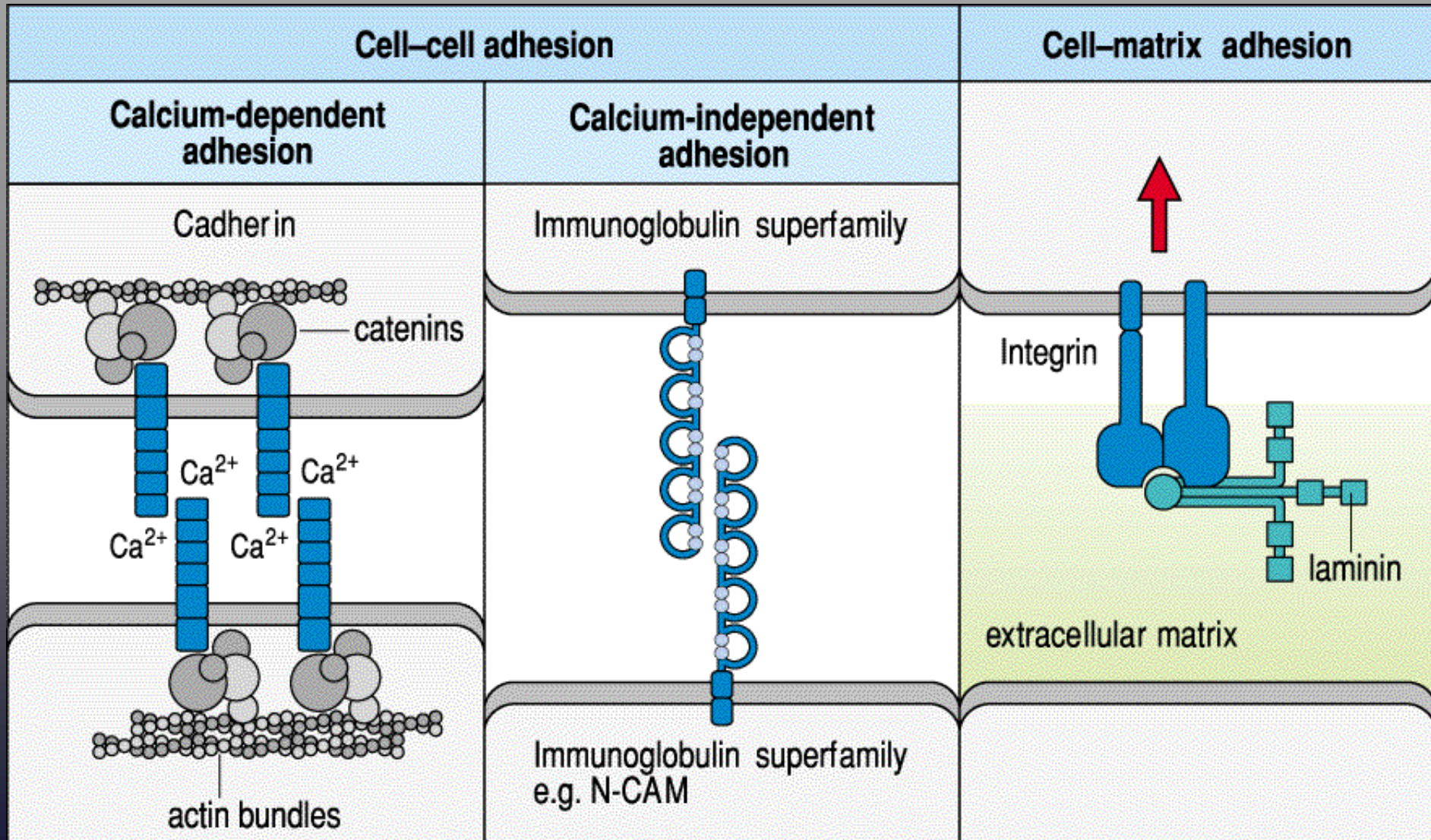
2: Αναστολή της πύκνωσης με τη χρήση αντιορού έναντι της καδερίνης E. (A) Φυσιολογική πύκνωση απουσία αντιορού. (B) Πολλαπλασιασμός των κυττάρων χωρίς όμως πύκνωση παρουσία αντισωμάτων έναντι της καντερίνης E.

## ➤ Μεταβολές στον κυτταροσκελετό π.χ. σχηματισμός μικρολαχνών

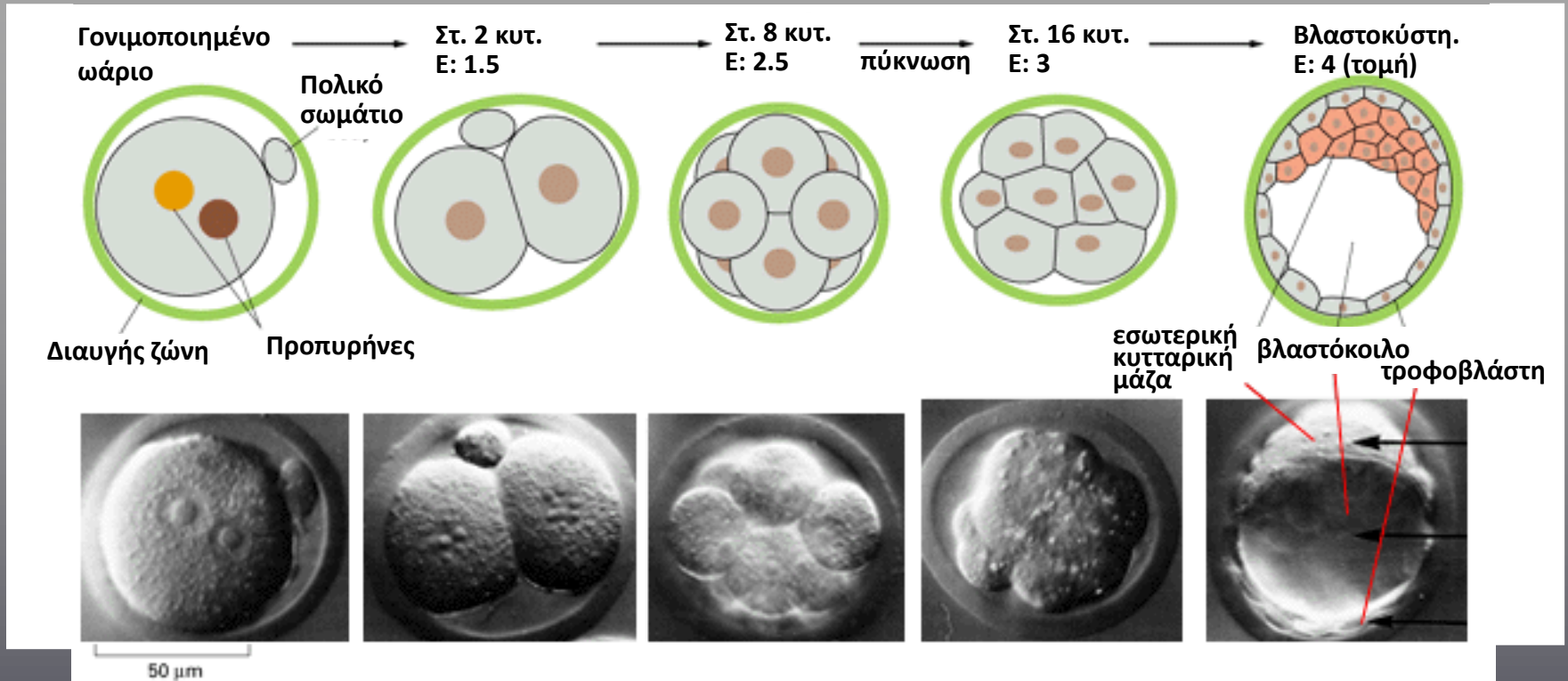
## ➤ Μόρια κυτταρικής συνάφειας π.χ. καδερίνη E.

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

# Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)



# Σχηματισμός μοριδίου και βλαστοκύστης



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

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

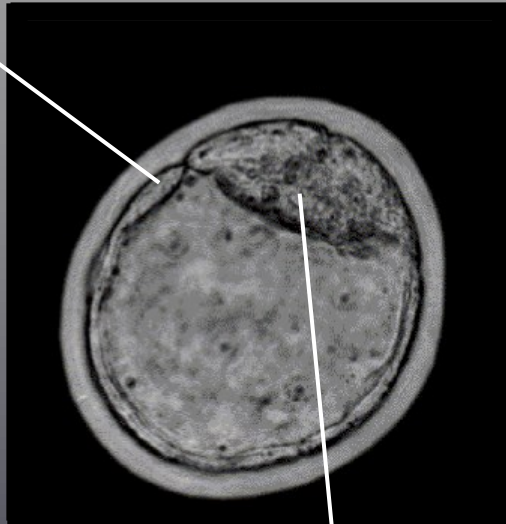
Ο διαχωρισμός των δύο κυτταρικών πληθυσμών της βλαστοκύστης αποτελεί σημαντικό διαφοροποιητικό γεγονός στην ανάπτυξη των θηλαστικών.

Τροφοβλάστη



χόριο :

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



Εσωτερική κυτταρική μάζα

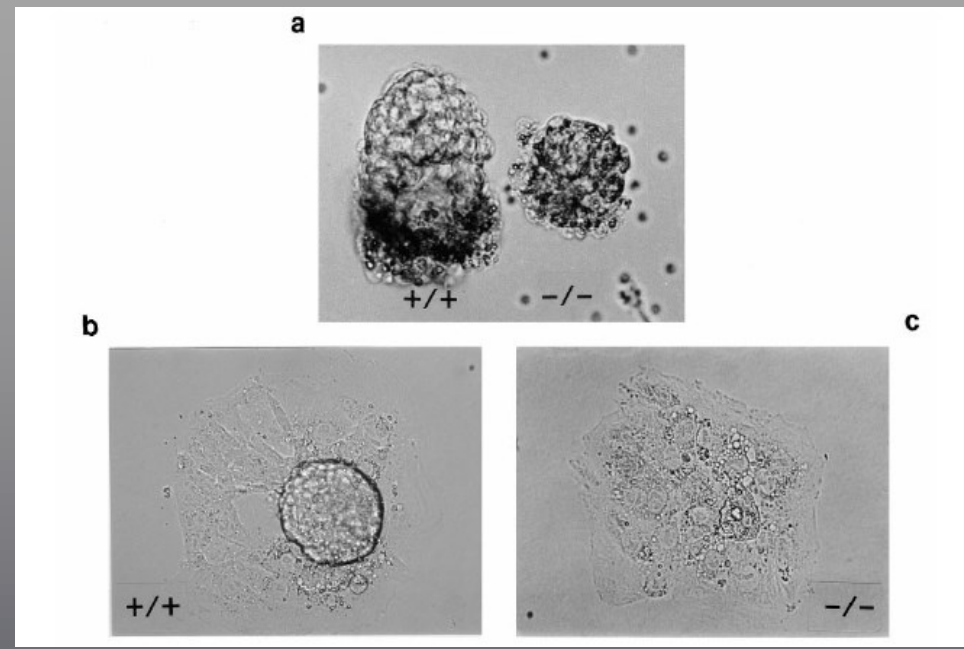
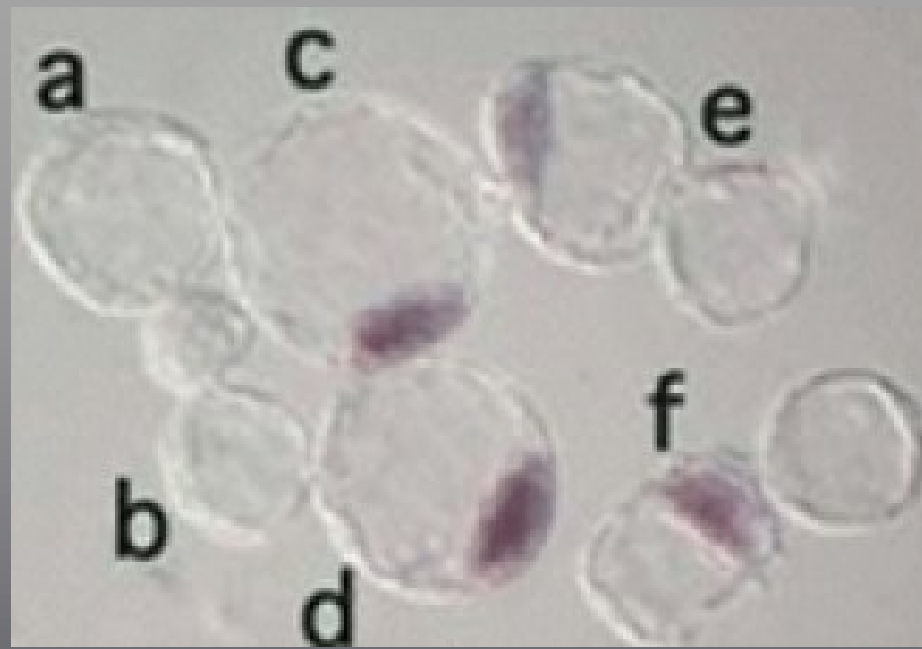


έμβρυο (τελικά το ζώο)  
εξωεμβρυϊκές δομές

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



# Oct-4



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

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

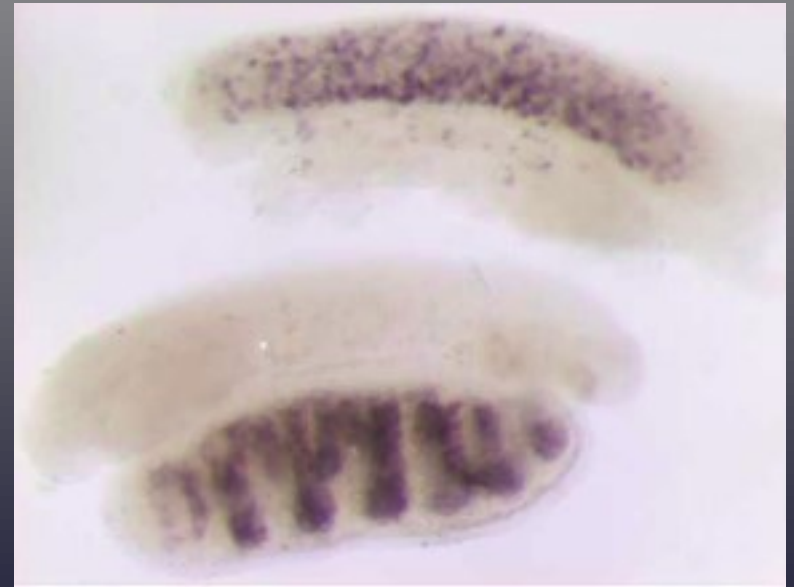
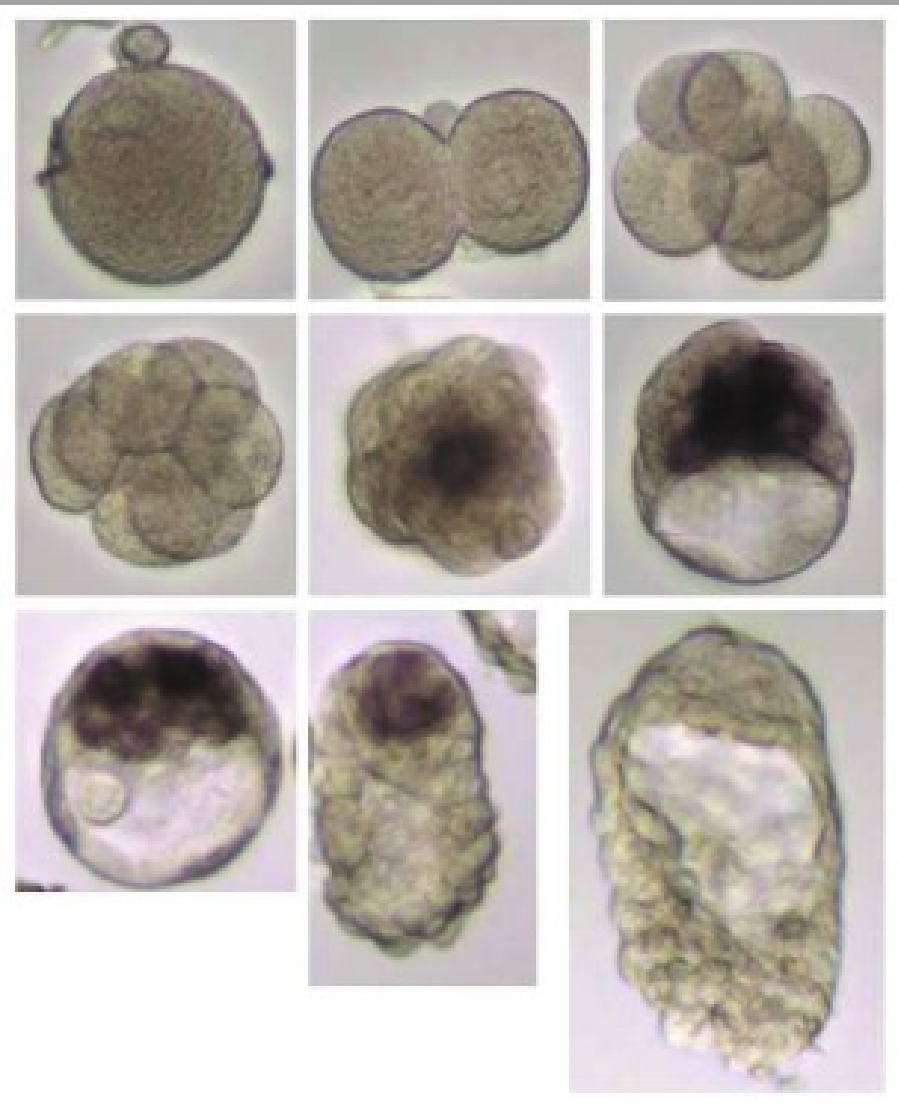
➤ Εμβρυα από τα οποία απουσιάζει η Oct-4 πεθαίνουν Ε 5.

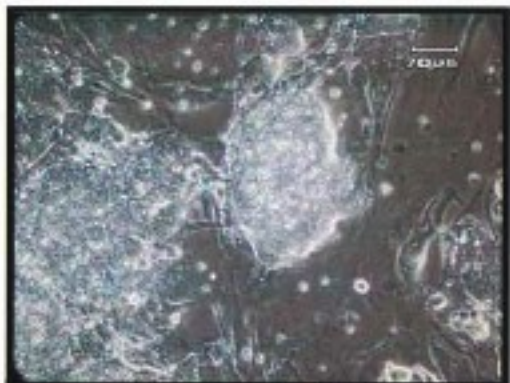
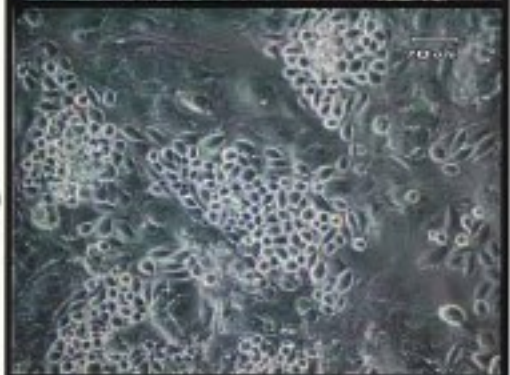
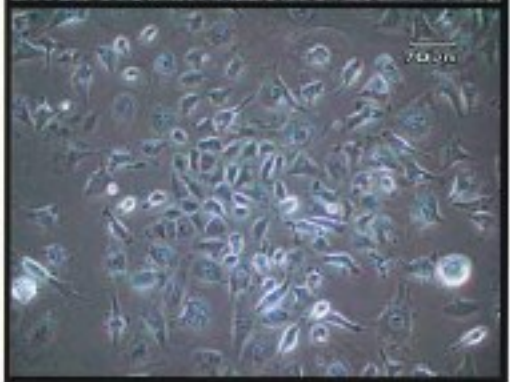
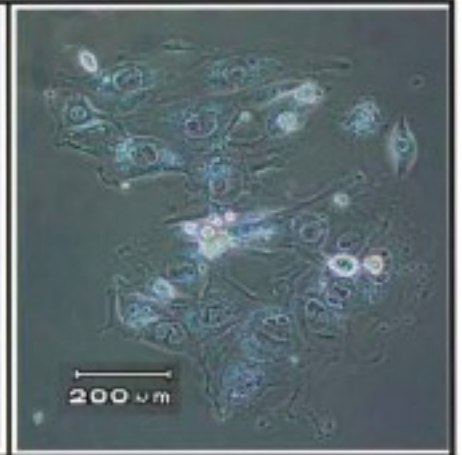
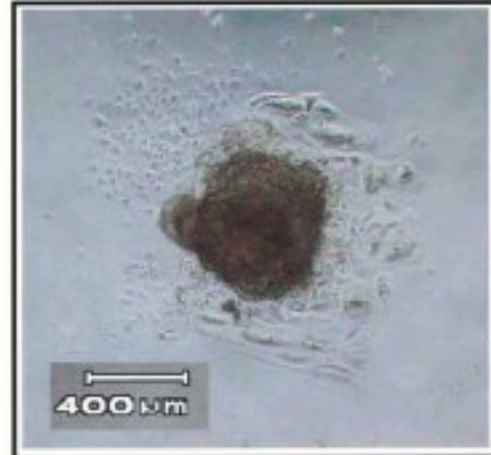
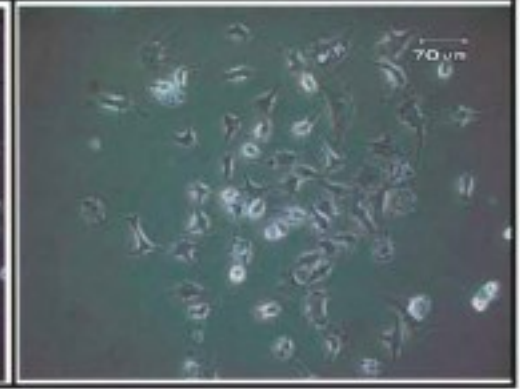
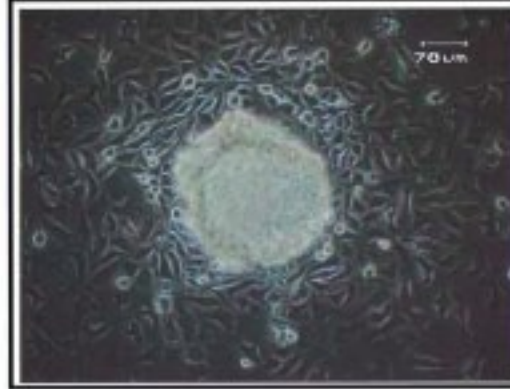
➤ Αλλαγές στα επίπεδα του Oct-4 έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των κυττάρων της ΕΚΜ .

# Nanog

➤ Μεταγραφικός παράγοντας που φέρει ομοιοεπικράτεια.

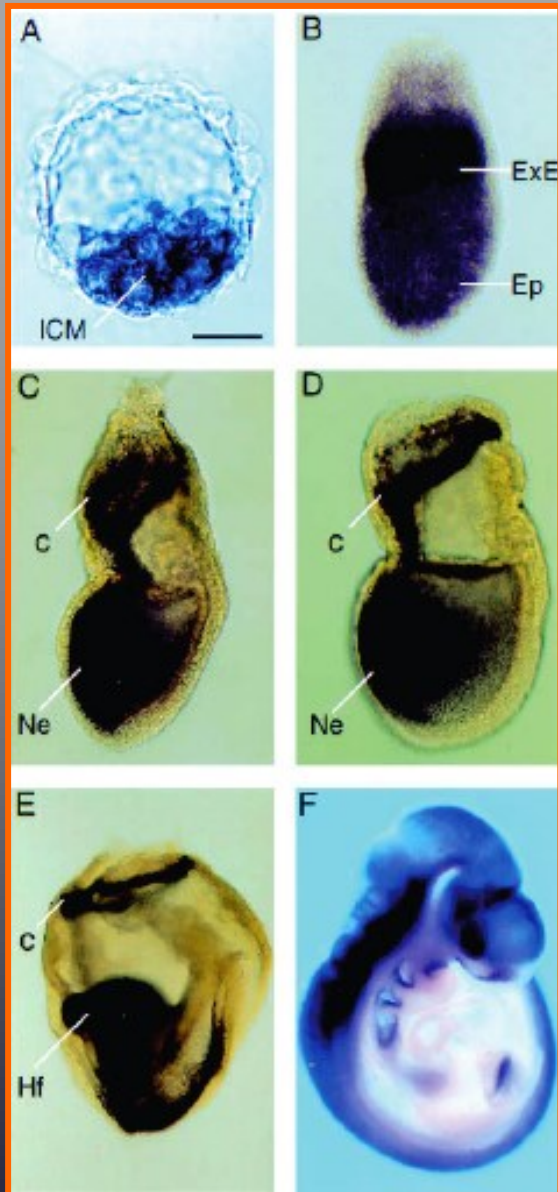
➤ Η έκφραση της nanog περιορίζεται σε ΕΚΜ και εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα (embryonic germ cells).



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

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

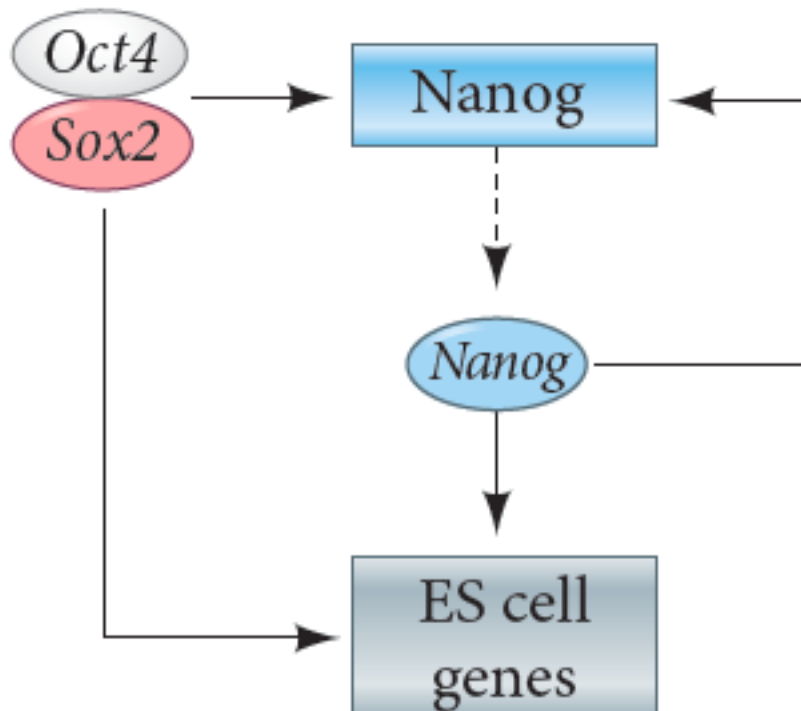
# Sox-2



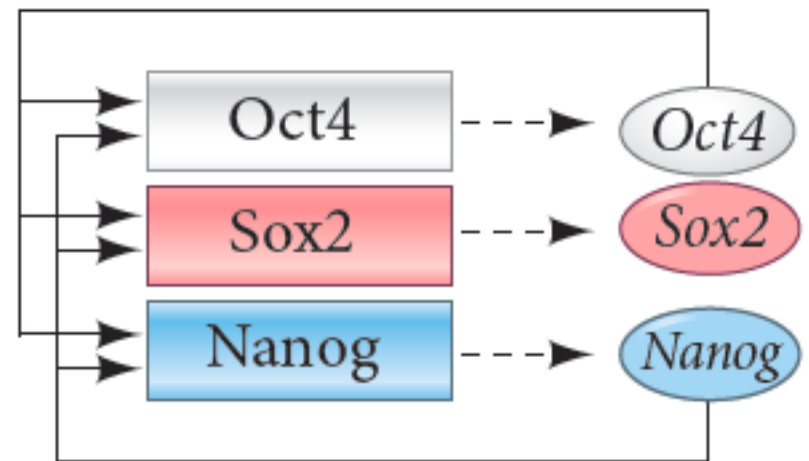
- Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας SRY (φέρει HMG box)
- Εκφράζεται στην ΕΚΜ (όχι αποκλειστικά)
- Εκφράζεται και στο ΝΣ
- Αλληλεπιδρά με τον Oct4.
- Στα ΚΟ τα έμβρυα πεθαίνουν κατά την Ε6.5
- Επειδή εκφράζεται και στα ωκύτταρα πιθανόν το μητρικό προϊόν επιτρέπει την επιβίωση ως την Ε 6.5.
- Παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας.

# Παράγοντες πολυδυναμίας

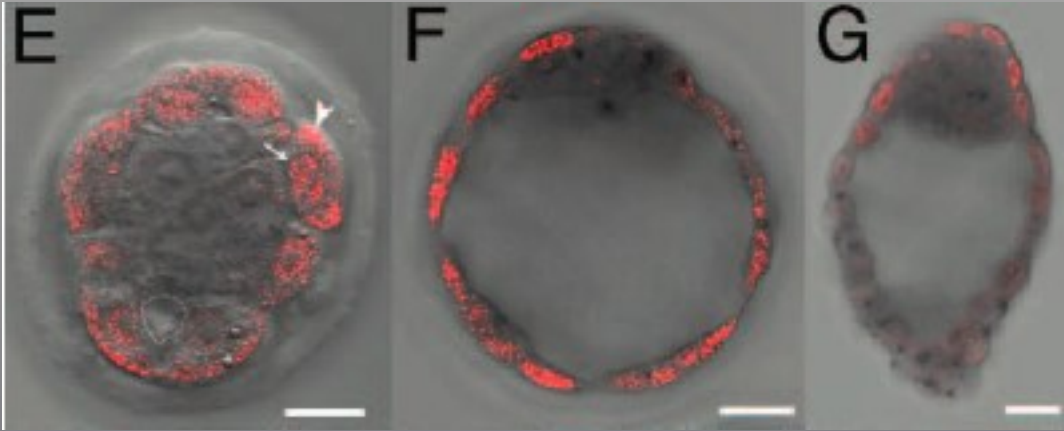
(A)



(B)



# Το γονίδιο Cdx2



➤ Ομόλογο του caudal

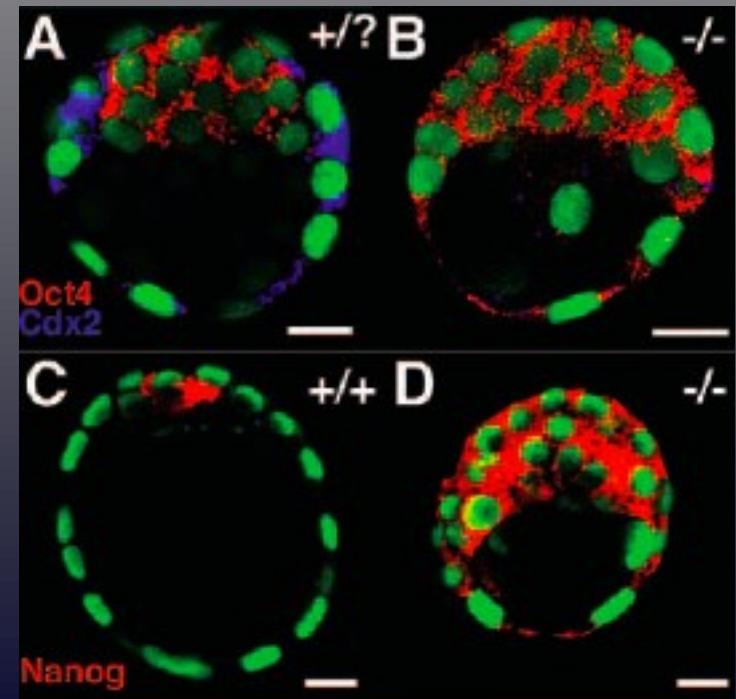
➤ Φέρει ομοιοεπικράτεια

➤ Εκφράζεται στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος (TE)

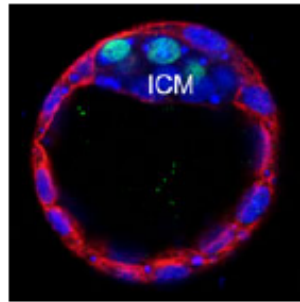
➤ Καταστέλλει την έκφραση των Oct4 και nanog στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος.

➤ Ο Oct4 καταστέλλει την έκφραση του cdx2 στην ΕΚΜ.

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



# Το γονίδιο Cdx2



## Mice develop without maternal Cdx2

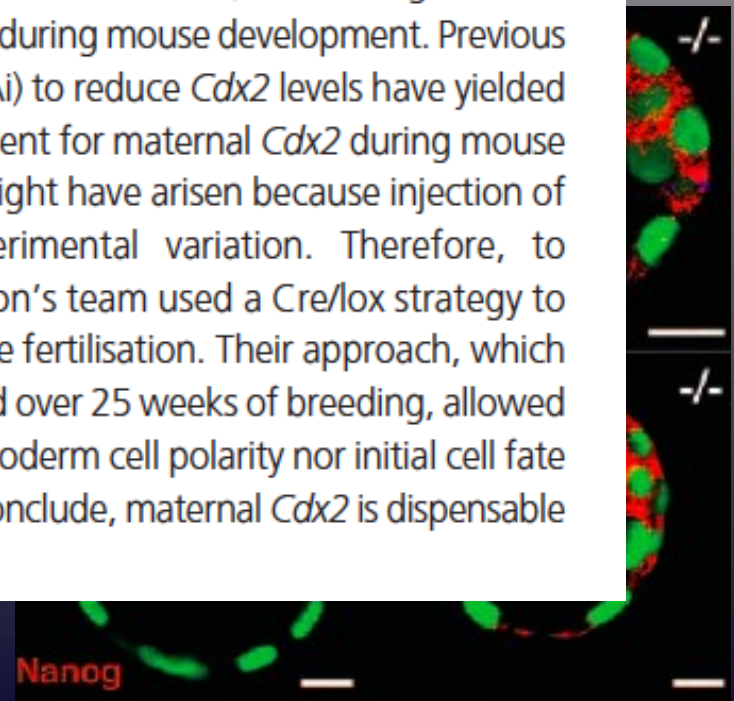
Maternal genes, which are transcribed in the female germline during oogenesis, play variable roles in embryonic patterning. In frog embryos, for example, differentially localised maternal factors regulate early cell fate decisions. By contrast, the contribution of maternal factors to mammalian embryo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

Καταστέλλει την έκφραση του Oct4 στα κύτταρα του τροφωδερμίου.

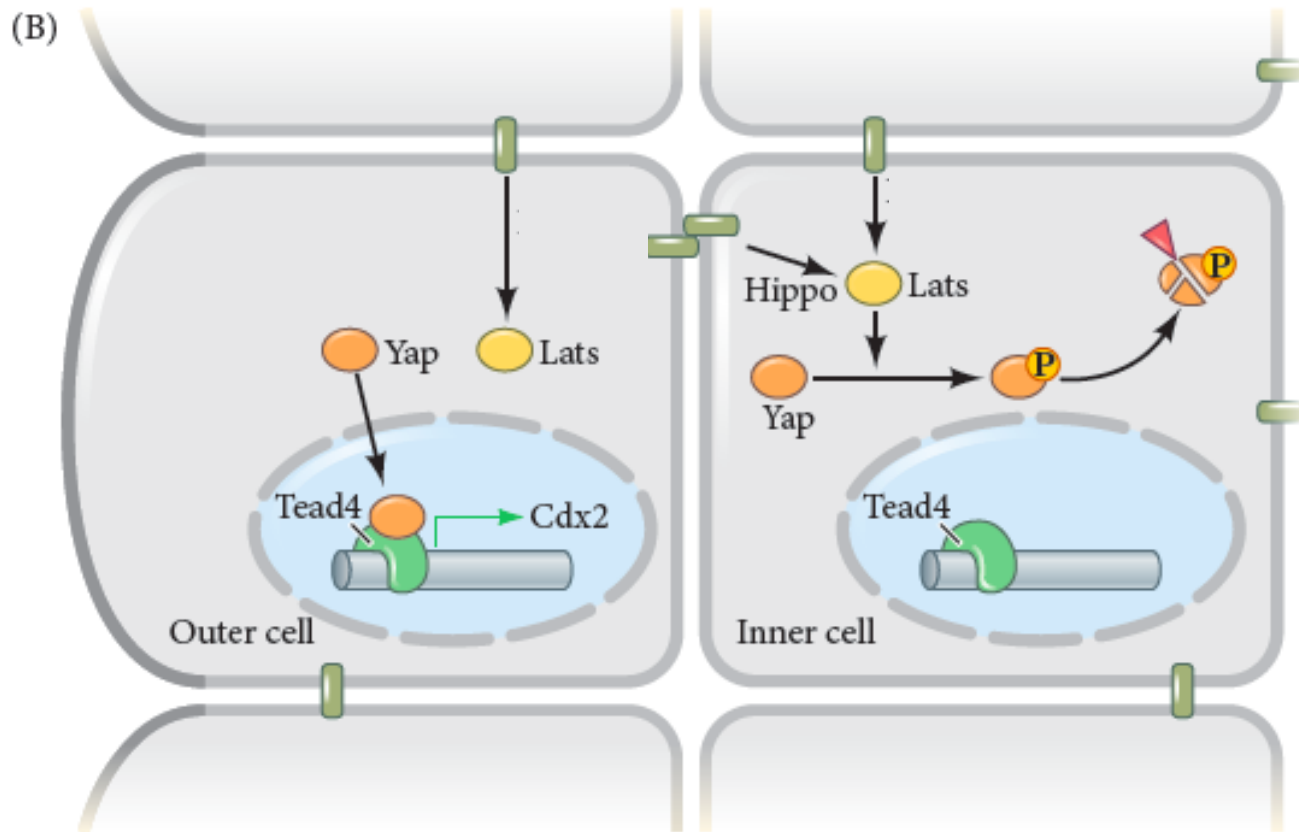
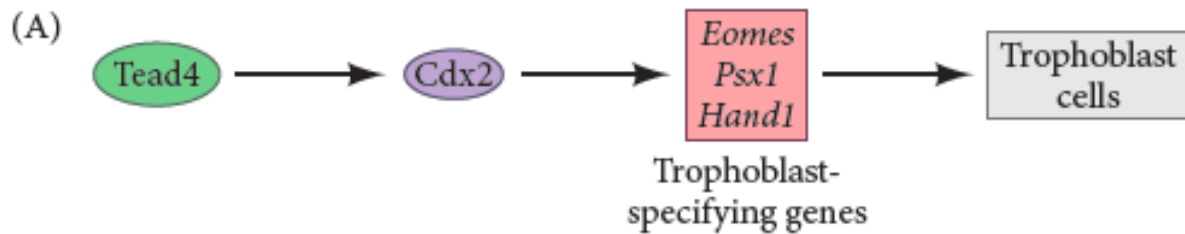
Ο Oct4 καταστέλλει την έκφραση του Cdx2 στην ΕΚΜ.

Οι Oct4 και *cdx2* είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχεται στη διαφοροποίηση του

δα του

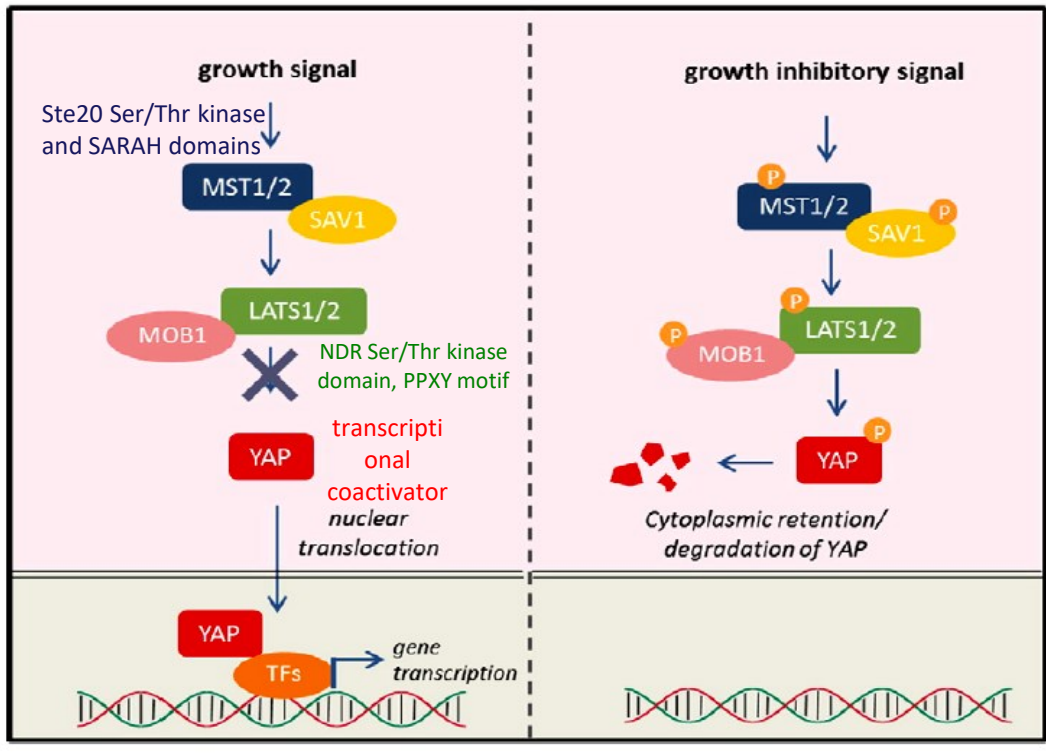


# Τι επάγει το Cdx2;



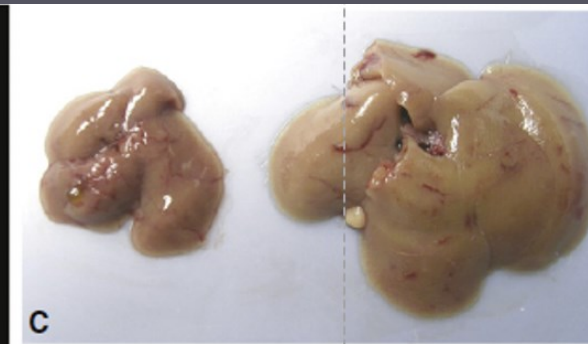
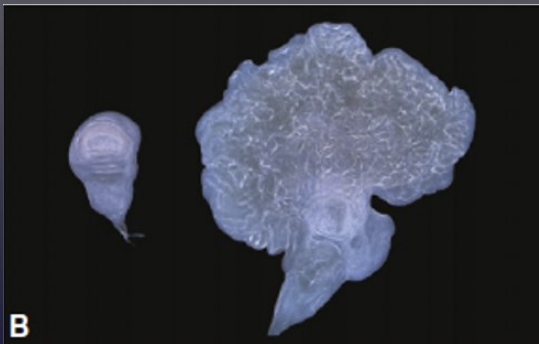


# Το μονοπάτι Hippo (θηλαστικά)



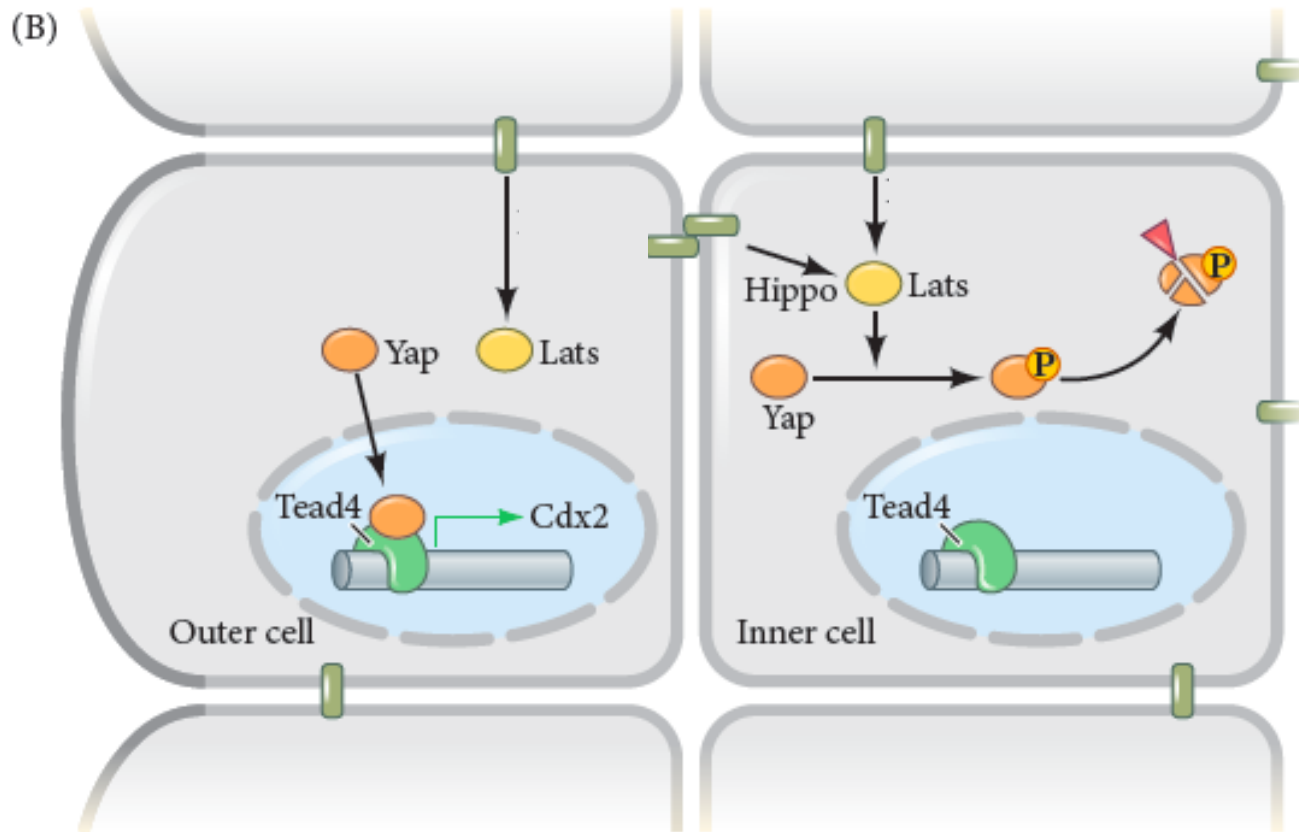
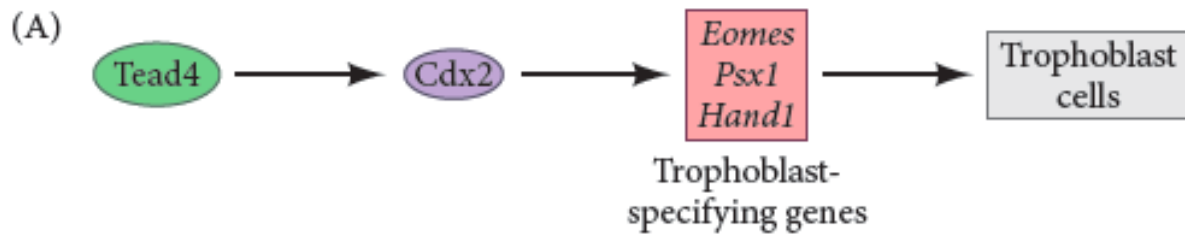
- Το μονοπάτι Hippo χαρακτηρήστηκε αρχικά από το ρόλο του στην αύξηση
- Συντηρημένο μεταξύ των ειδών από το *Drosophila melanogaster* μέχρι τον άνθρωπο

## Υπερέκφραση YAP

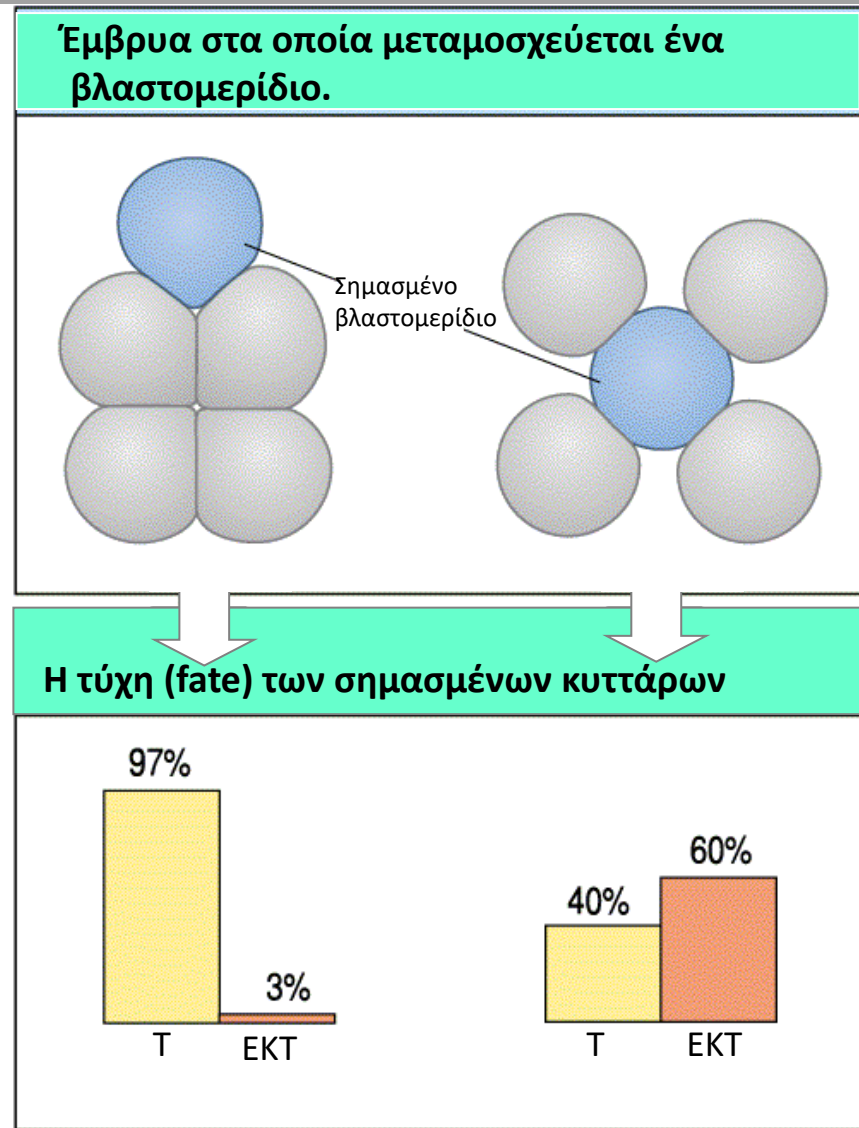
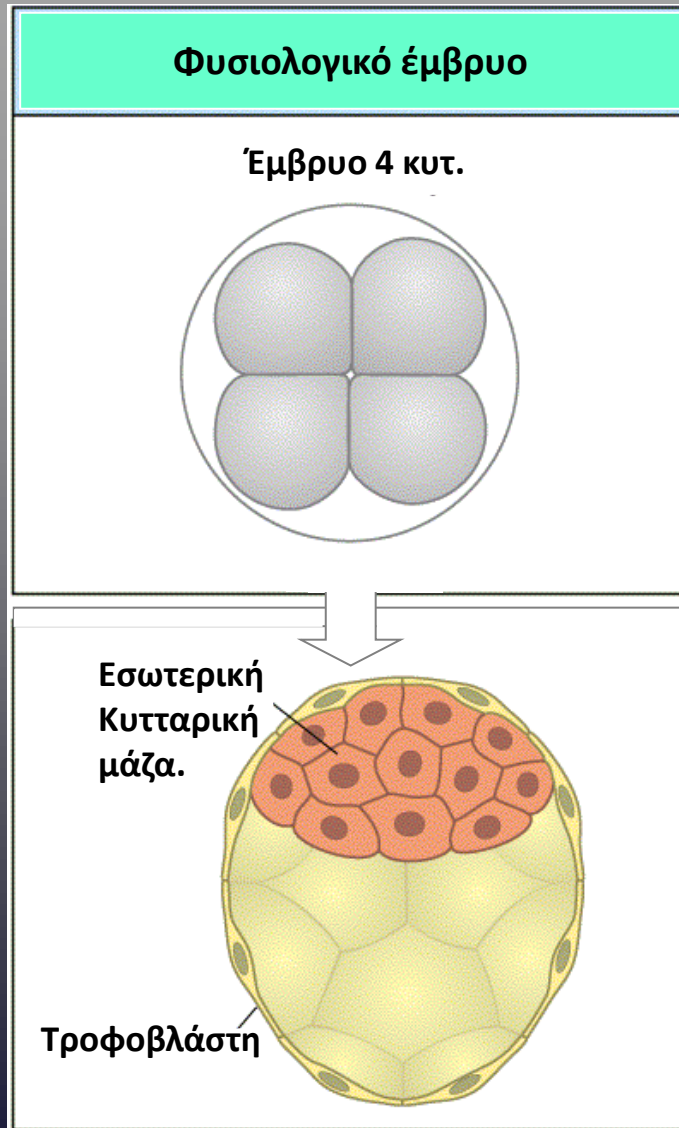


- Αριστερα – *D. melanogaster* δίσκος ενήλικου
- Δεξιά- ποντικός ήπαρ

# Τι επάγει το Cdx2;



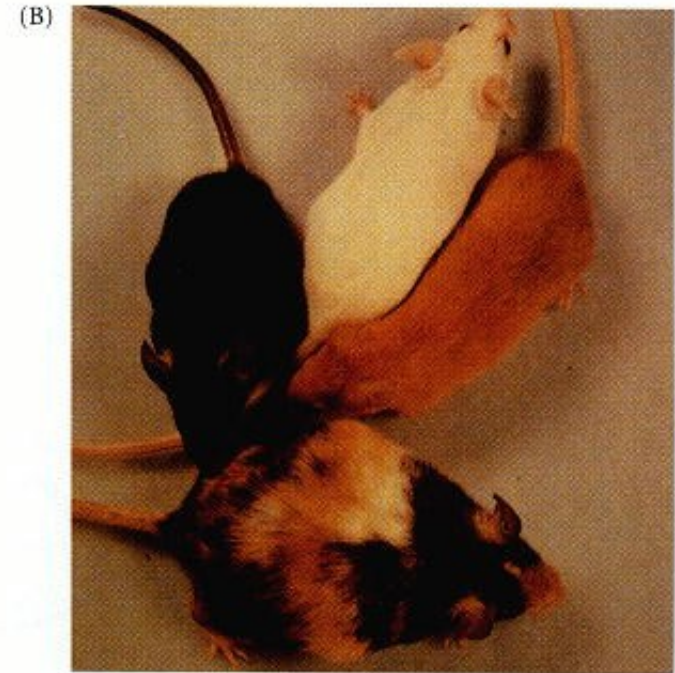
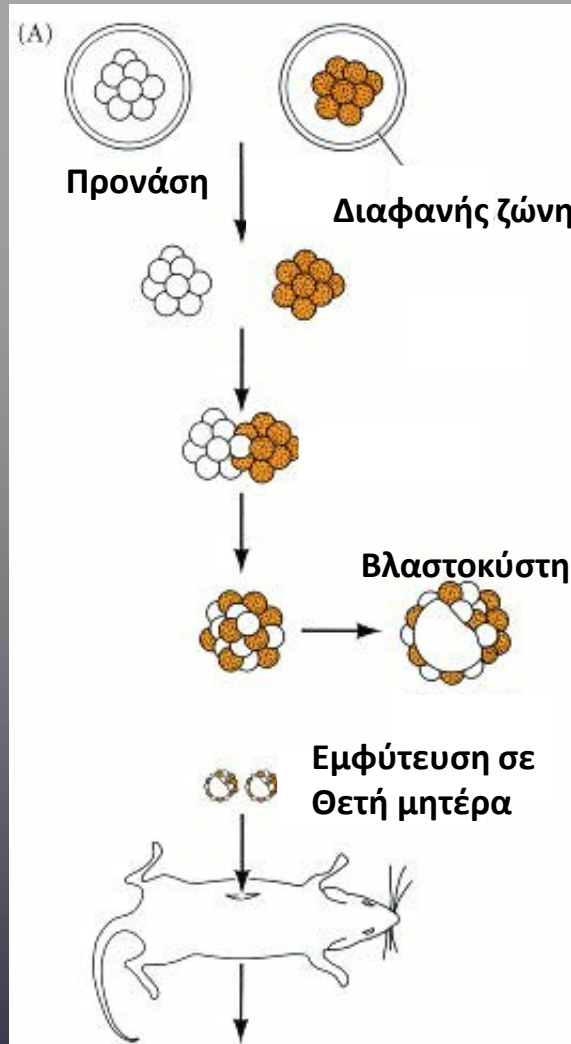
# Τι καθορίζει αν ένα κύτταρο θα ανήκει στην τροφοβλάστη ή την εσωτερική κυτταρική μάζα;



Η θέση του στο έμβryo μετά τη σύμπτυξη.

# Πόσα κύτταρα σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα;

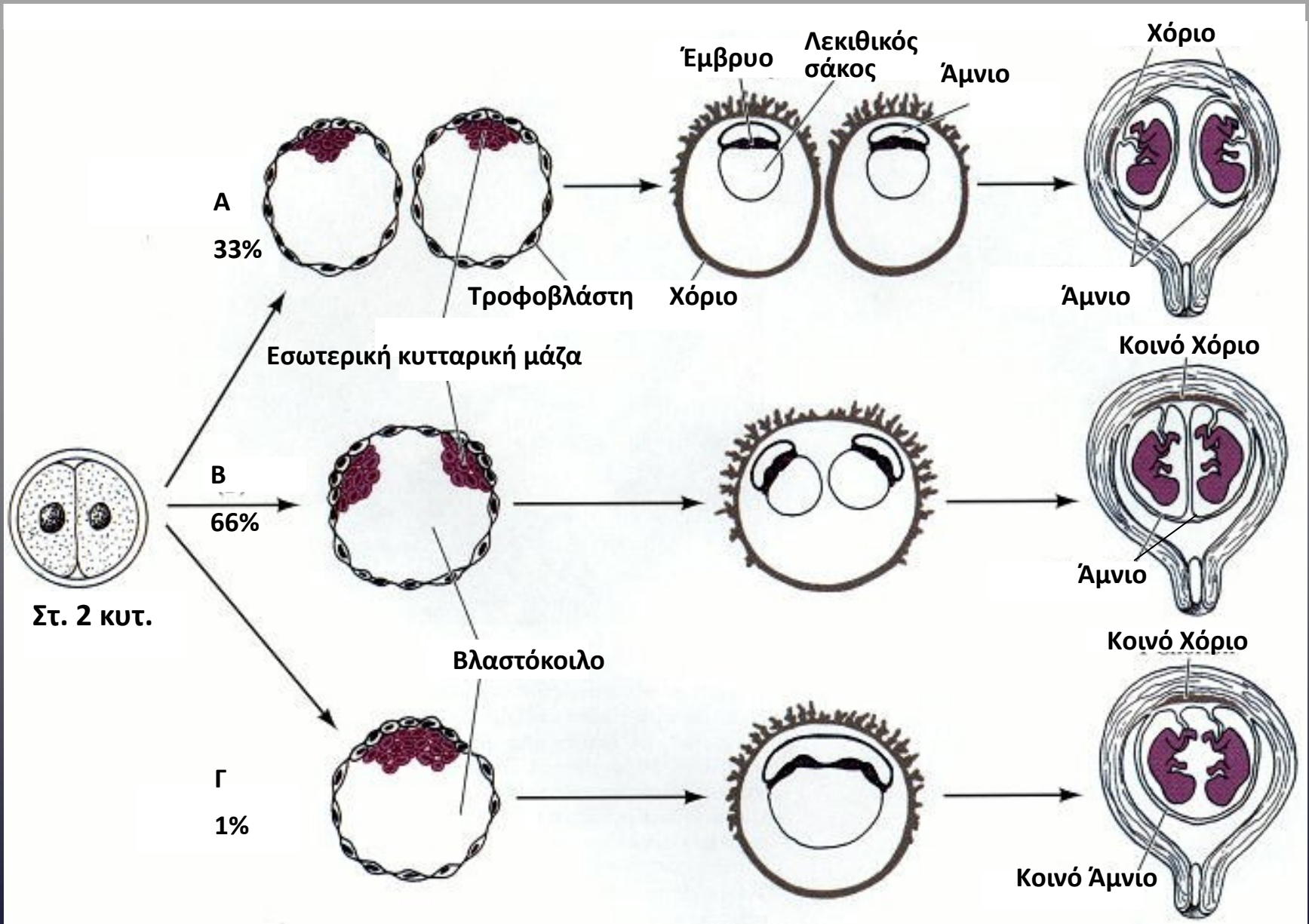
Πειράματα με χιμαιρικά έμβρυα έδειξαν ότι η εσωτερική κυτταρική μάζα προκύπτει από τους απογόνους τριών από τα οκτώ κύτταρα του εμβρύου.



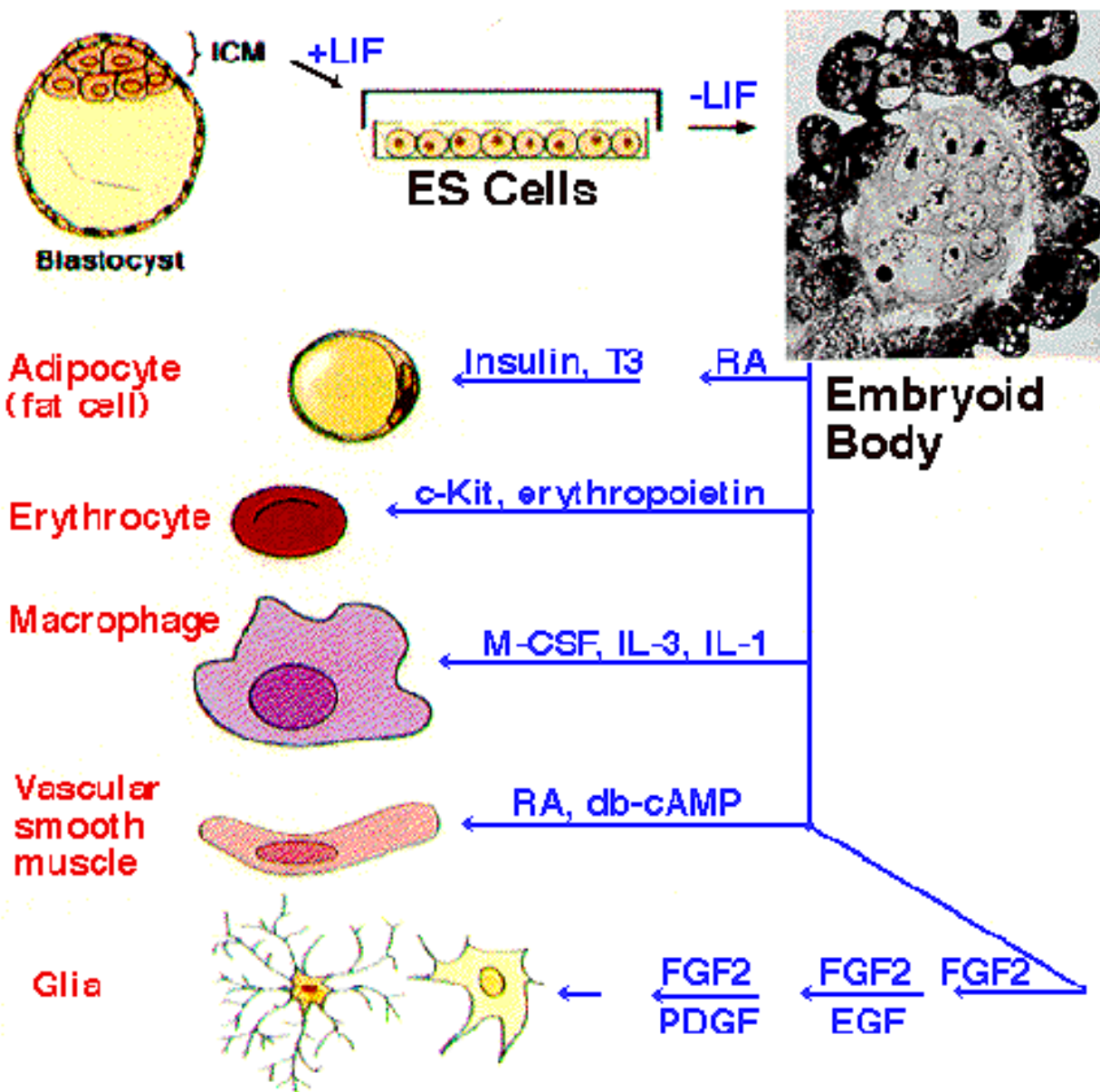
Ένα χιμαιρικό ποντίκι που έχει προέλθει από σύντηξη τριών εμβρύων με διαφορετικό χρώμα τριχώματος. Φαίνονται και οι απόγονοί του απόδειξη ότι κύτταρα και από τα τρία έμβρυα έδωσαν κύτταρα της γαμετικής σειράς.



# Σχηματισμός μονοζυγωτικών διδύμων (άνθρωπος)



# Διαφοροποίηση των ES *in vitro*

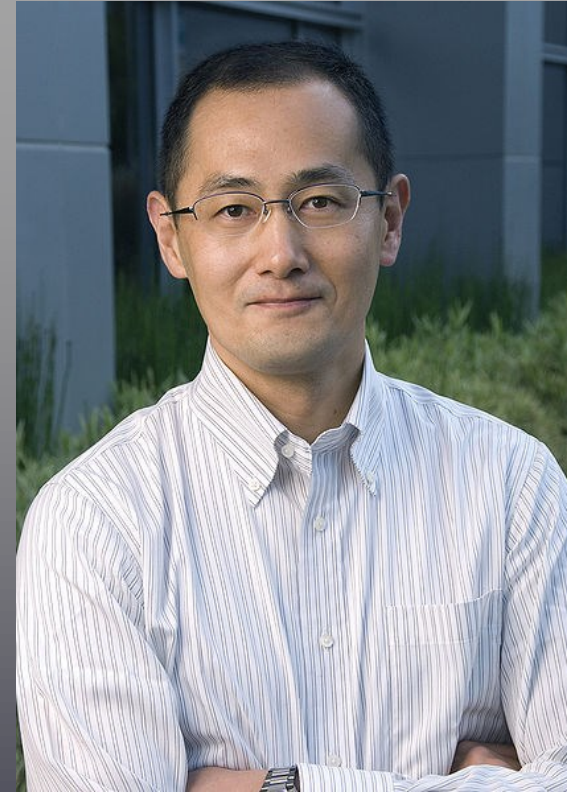


## 2012 Nobel Prize in Medicine



**J. Gurdon**

**Department of Zoology, University of Cambridge**



**S. Yamanaka**

**Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco**

**"revolutionized our understanding of how cells and organisms develop"**

# The Washington Post

***FDA OKs 1st Embryonic Stem Cell Trial***

***By Steven Reinberg***

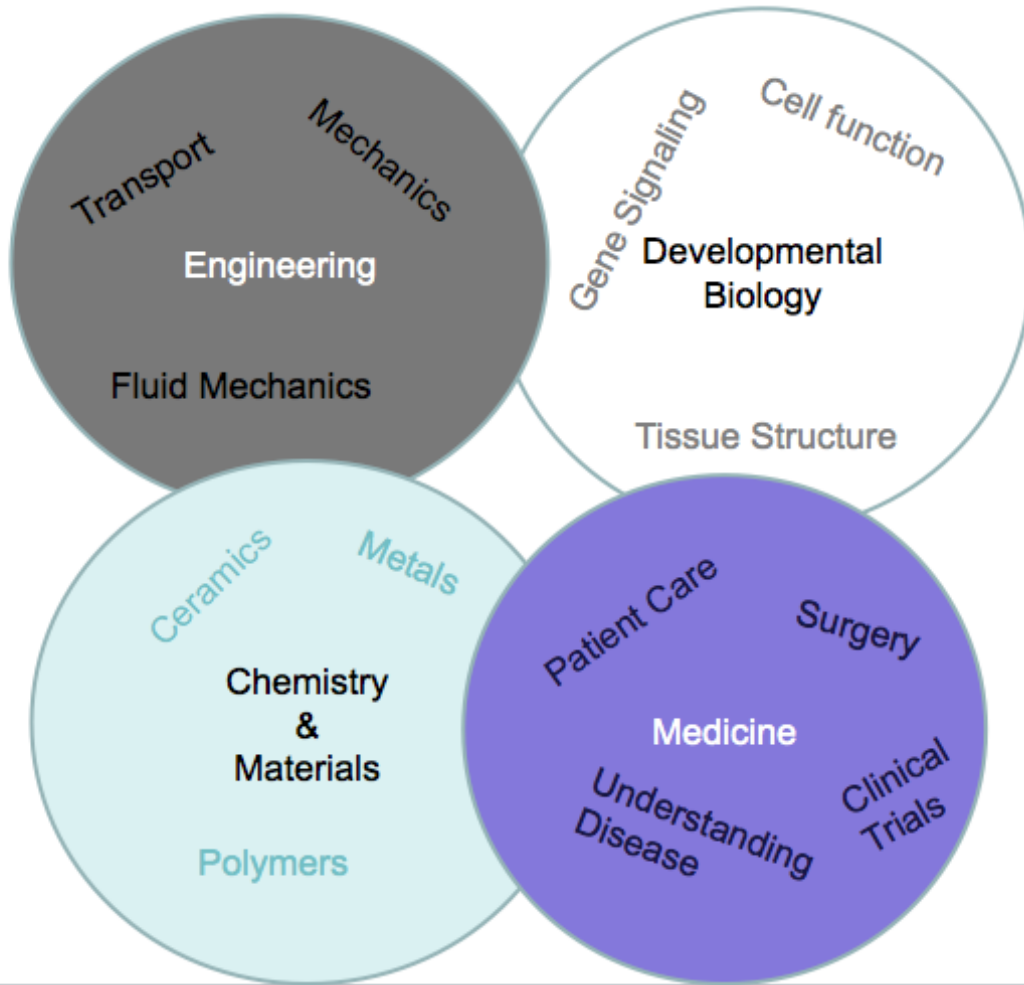
***HealthDay Reporter***

***Friday, January 23, 2009; 12:00 AM***

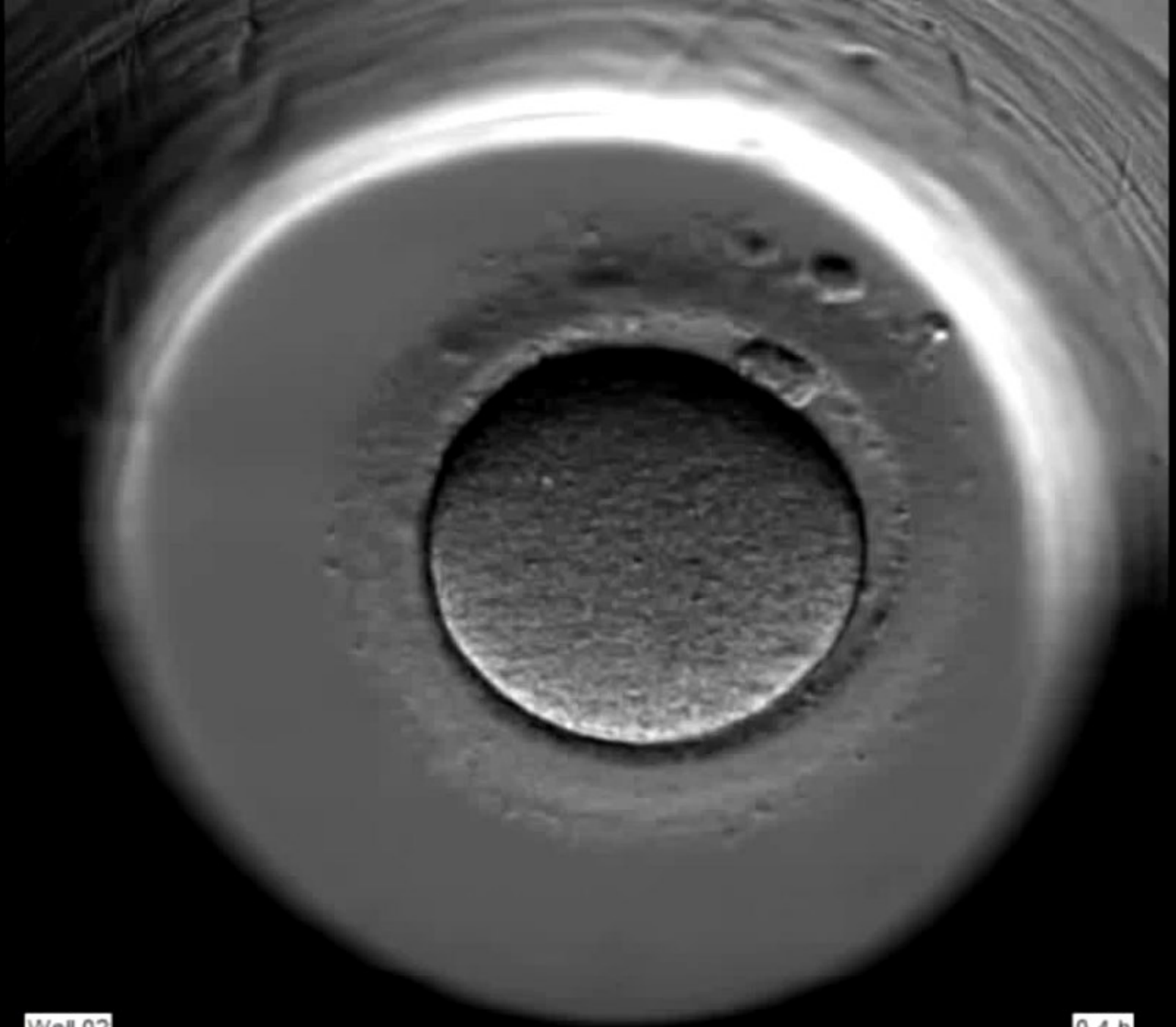
***FRIDAY, Jan. 23 (HealthDay News) -- The first human trial using embryonic stem cells as a medical treatment has been approved by the U.S. Food and Drug Administration.***



# Αναγέννηση: Μηχανική Ιστών



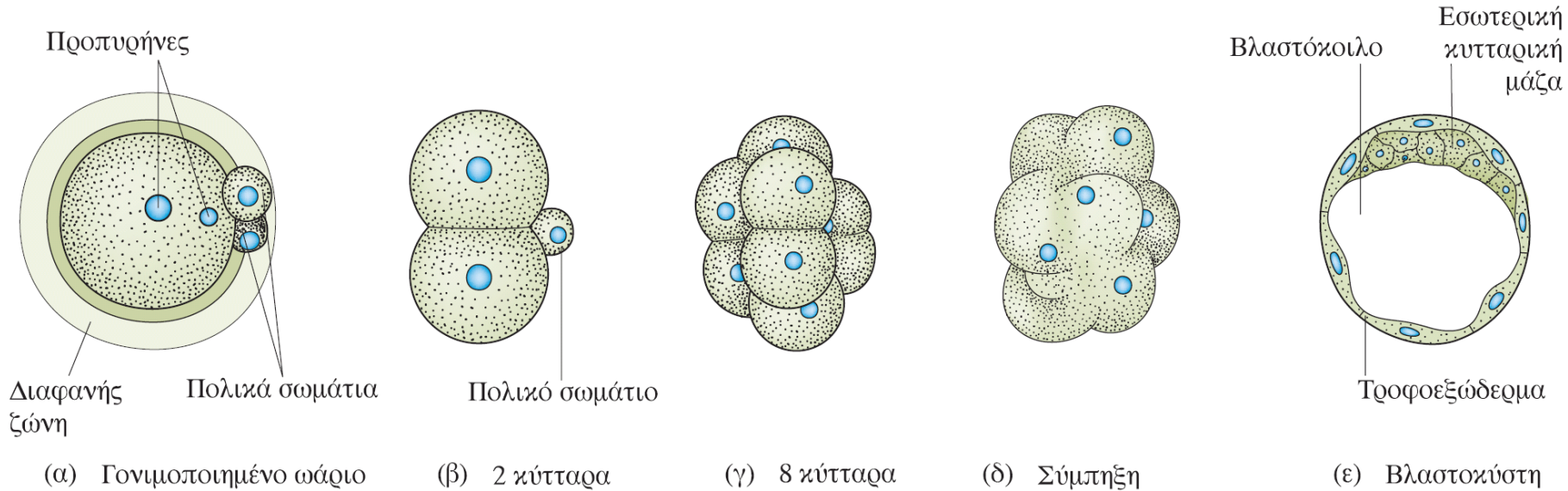
**Περισσότερα για τα βλαστοκύτταρα και την  
αναγέννηση  
στο μάθημα  
«Βιολογία βλαστοκυττάρων και  
αναγέννησης» !**



Well 02

0.4 h

# Πρώιμη ανάπτυξη



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



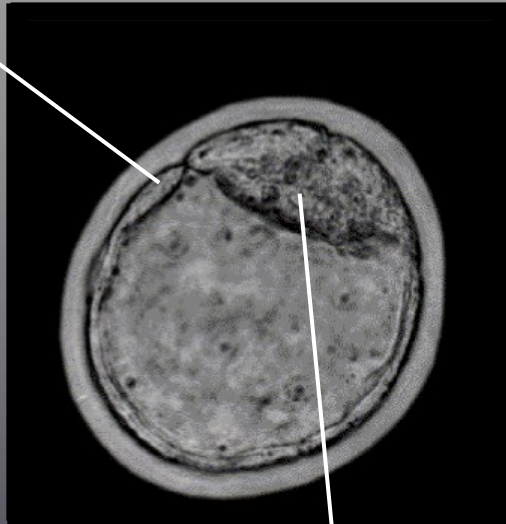
Δανάη  
G. Klimt  
1907

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

Τροφοβλάστη



χόριο :



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

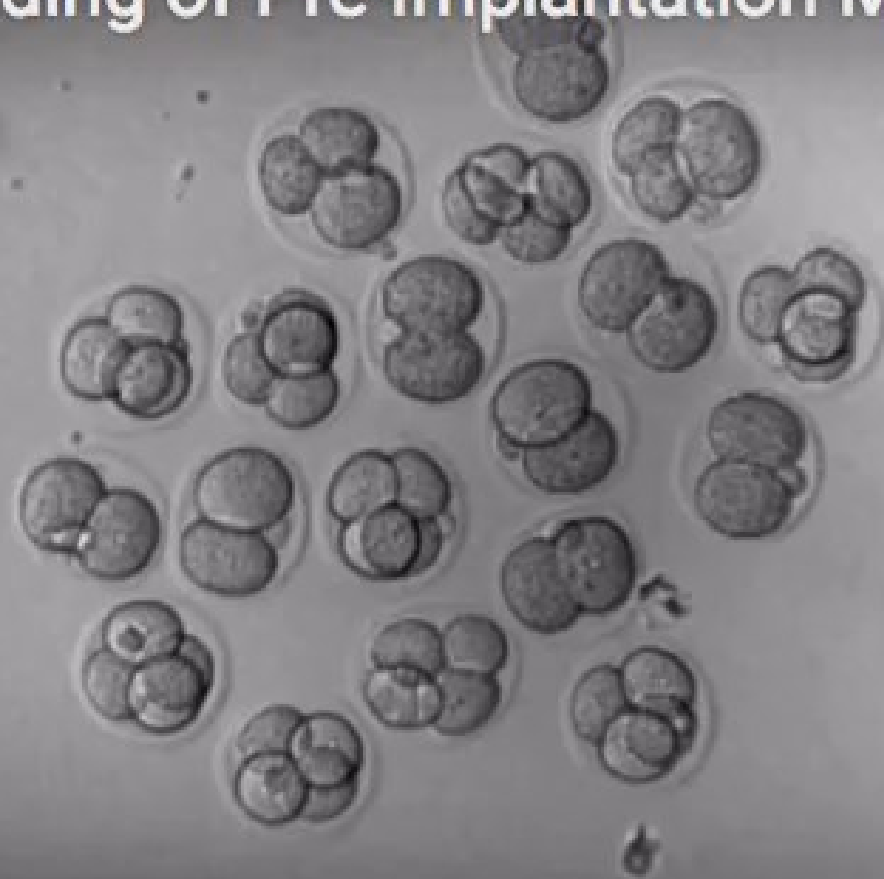
Εσωτερική κυτταρική μάζα



έμβρυο (τελικά το ζώο)  
εξωεμβρυϊκές δομές

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

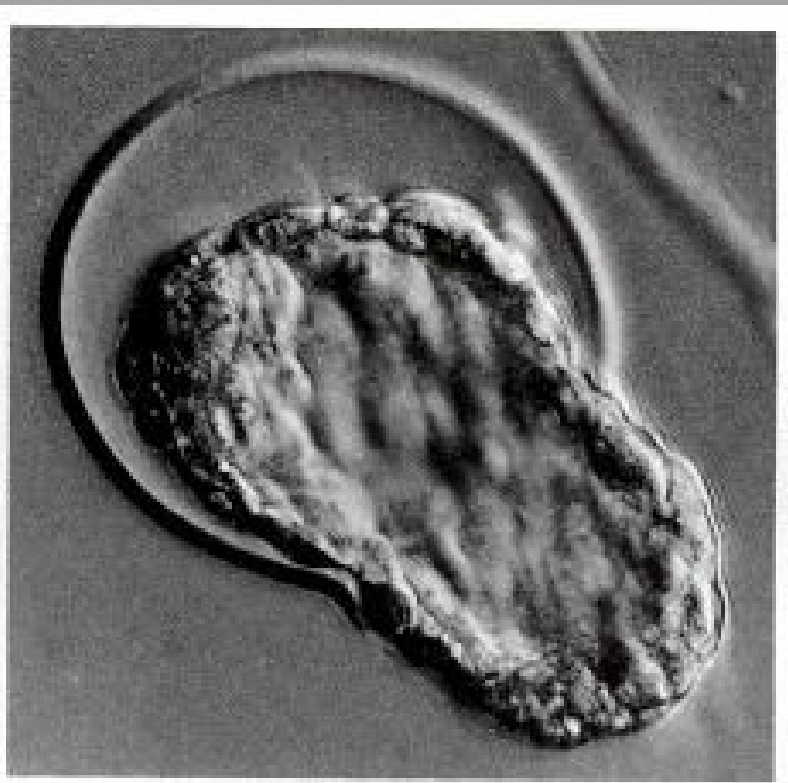
# Recording of Pre-Implantation Mous



4:00:00

40  $\mu$ m

# Έξοδος από τη διαφανή ζώνη



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

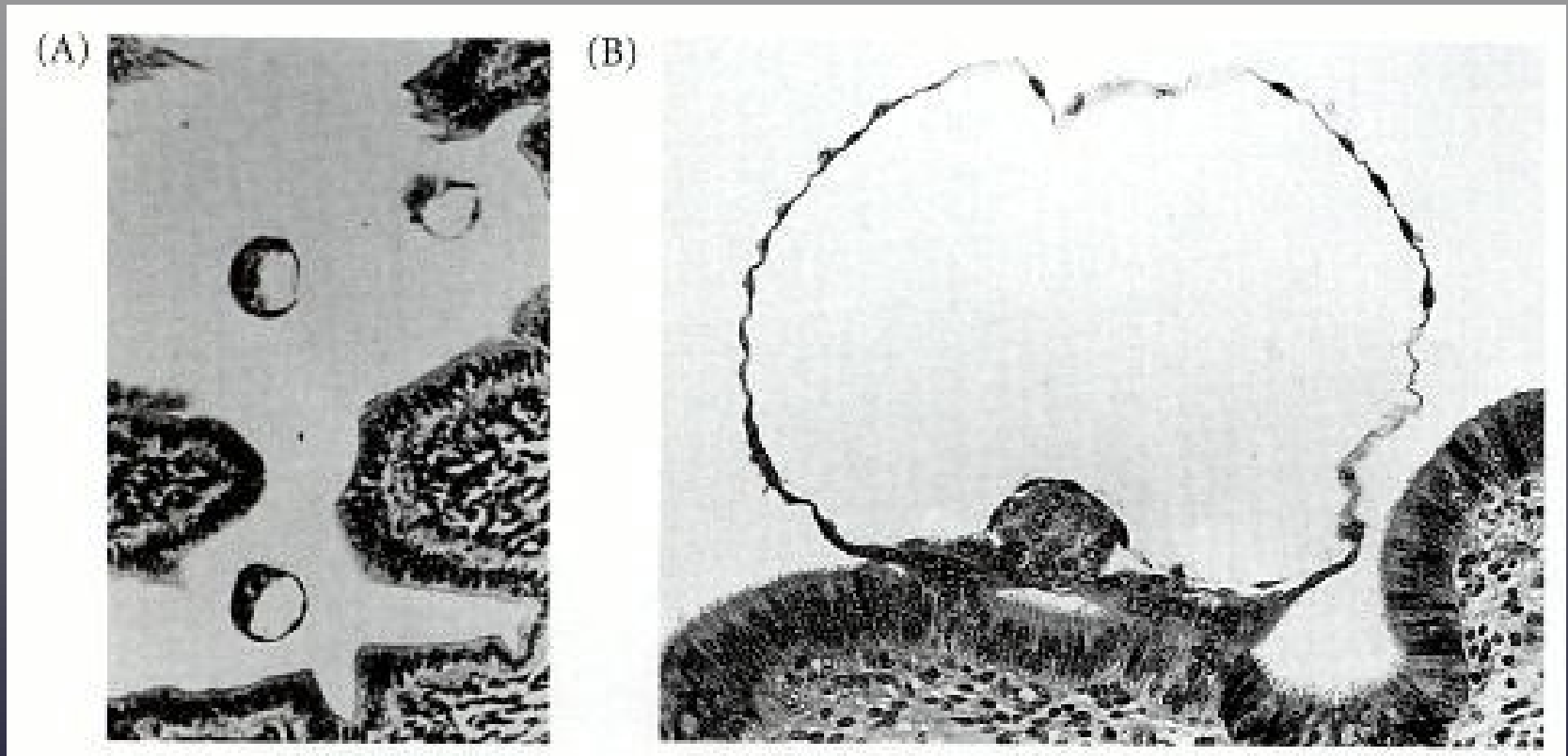
α. Στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.  
β. Προστατεύει από την πολυσπερμία.  
γ. Εμποδίζει την προσκόλληση του εμβρύου στα τοιχώματα του ωαγωγού.

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



# Εμφύτευση

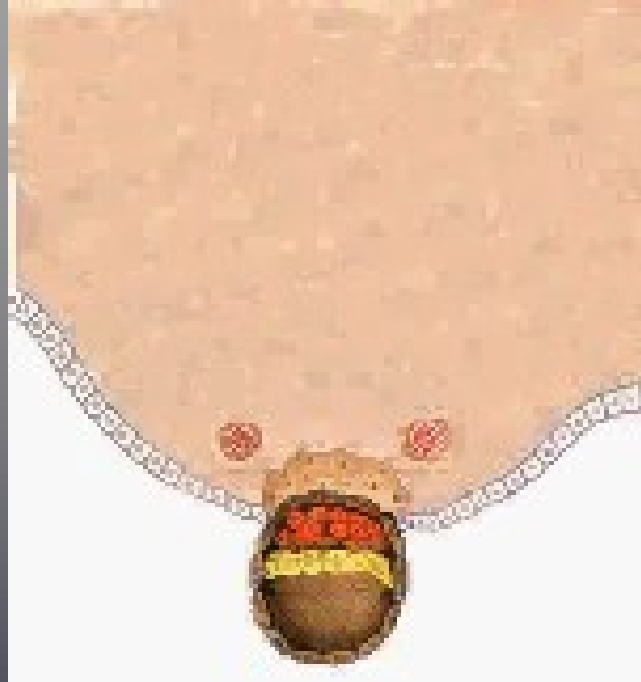
➤ Μετά την εκκόλαψη από τη διαφανή ζώνη η βλαστοκύστη προσκολλάται στο ενδομήτριο. Ακολουθεί η εμφύτευση στα τοιχώματα της μήτρας, μια διαδικασία αλληπίδρασης ανάμεσα σε δυο οργανισμούς τη μητέρα και το έμβryo.



(A) Βλαστοκύστεις ποντικού που εισέρχονται στη μήτρα.

(B) Εμφύτευση βλαστοκύστης πιθήκου rhesus.

# Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;



# Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)

## Cell-cell adhesion

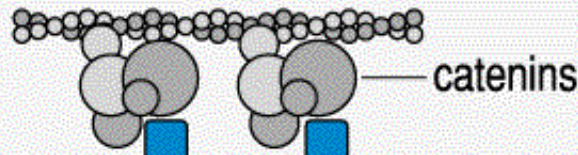
## Cell-matrix adhesion

### Calcium-dependent adhesion

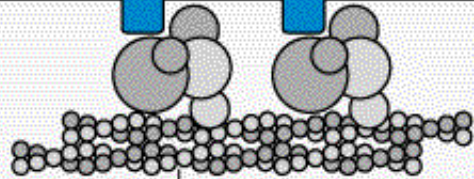
### Calcium-independent adhesion

Cadherin

Immunoglobulin superfamily



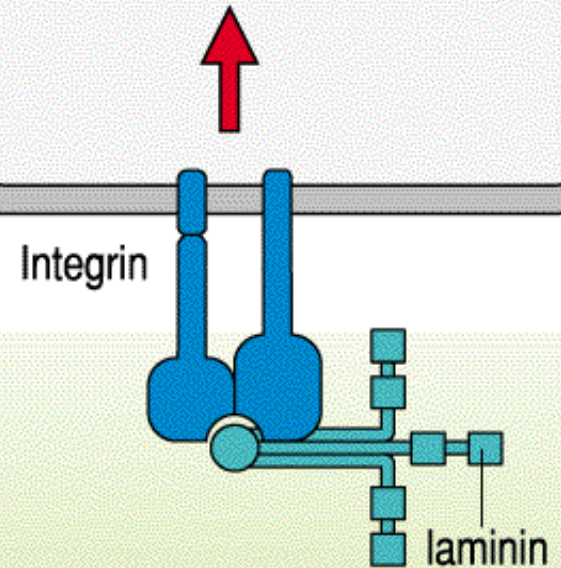
Ca<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup>  
Ca<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup>



actin bundles



Immunoglobulin superfamily  
e.g. N-CAM



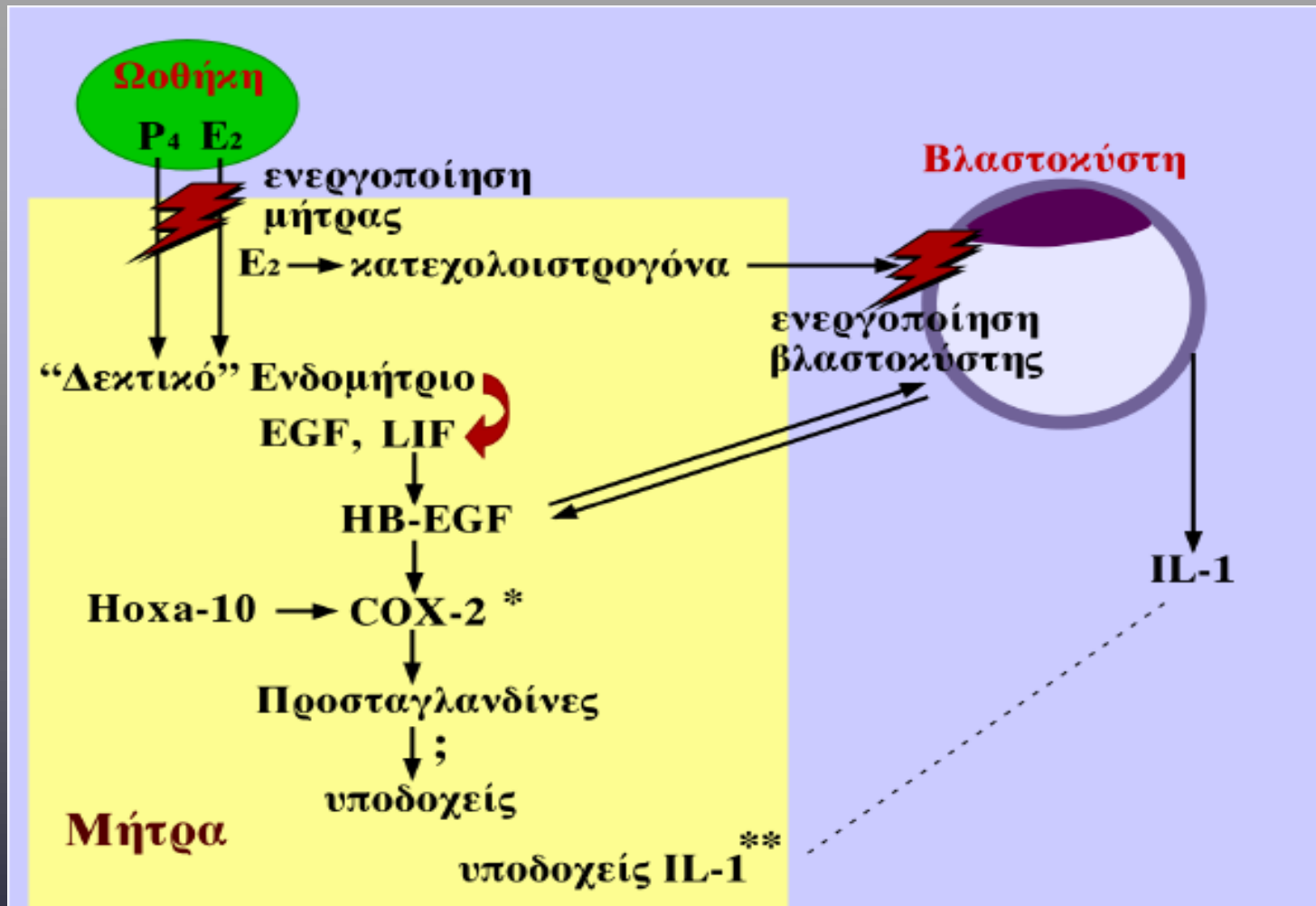
extracellular matrix

laminin

# Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

A.

Ο ρόλος της προγεστερόνης και των οιστρογόνων , κυκλοζυγενάση



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

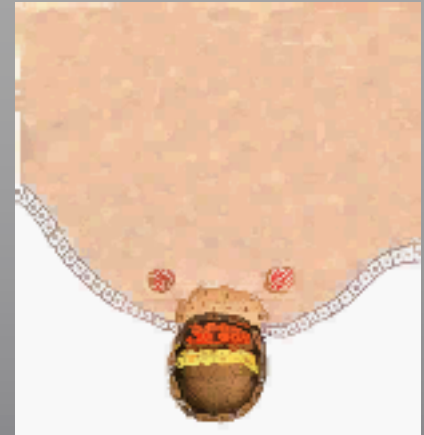
\*\*Απουσία υποδοχέων IL-1 το έμβryo ΔΕΝ προσκολλάται στη μήτρα.

# Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

## B. Μόρια κυτταρικής συνάφειας

➤ Αρκετά συστήματα κυτταρικής συνάφειας (adhesion systems) εμπλέκονται στην προσκόλληση του τροφοβλάστη στη μήτρα.

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



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

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

# Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

## EMBRYOGLUE®

Implantation promoting medium for  
increased take-home baby rate



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

4 May 2016

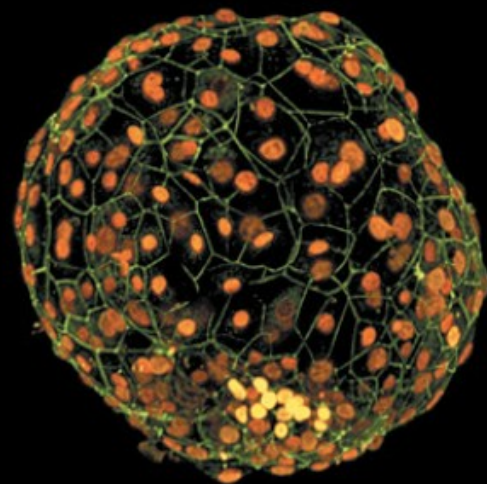
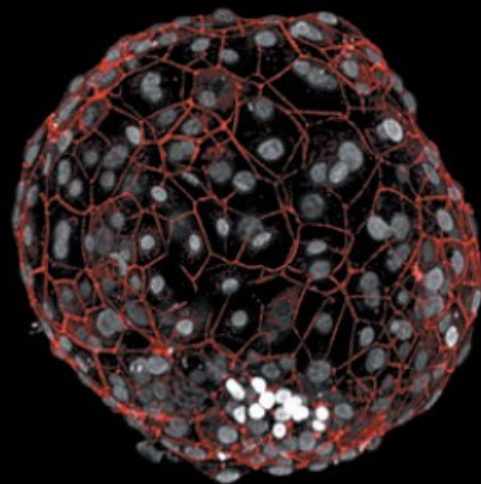
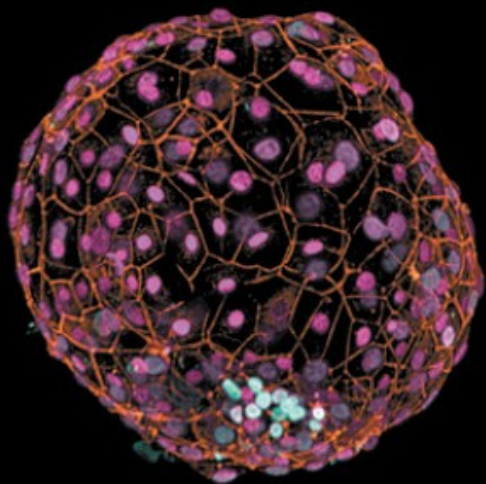
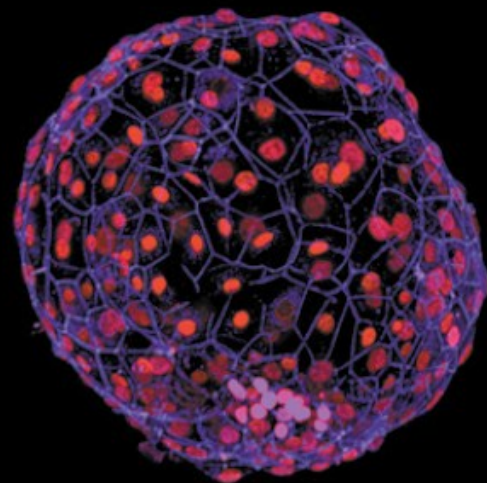
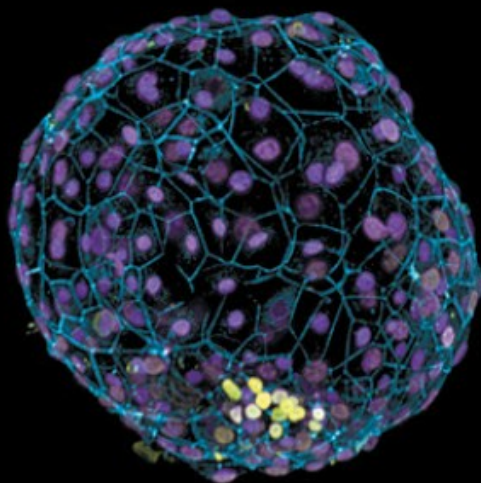
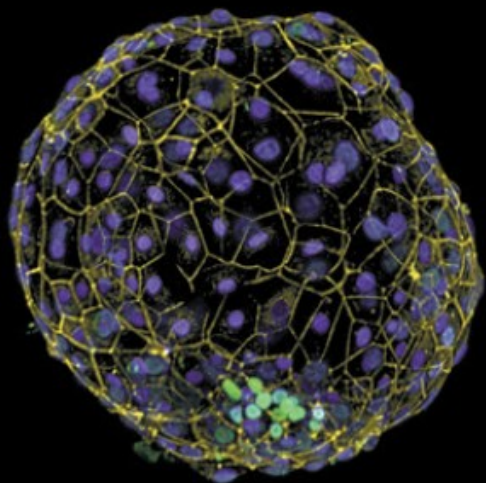
Marta N. Shahbazi<sup>1,5</sup>, Agnieszka Jedrusik<sup>1,5</sup>, Sanna Vuoristo<sup>1,5</sup>, Gaelle Recher<sup>1,6</sup>, Anna Hupalowska<sup>1</sup>, Virginia Bolton<sup>2</sup>, Norah M. E. Fogarty<sup>3</sup>, Alison Campbell<sup>4</sup>, Liani G. Devito<sup>2</sup>, Dusko Ilic<sup>2</sup>, Yakoub Khalaf<sup>2</sup>, Kathy K. Niakan<sup>3</sup>, Simon Fishel<sup>4</sup> and Magdalena Zernicka-Goetz<sup>1,7</sup>

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

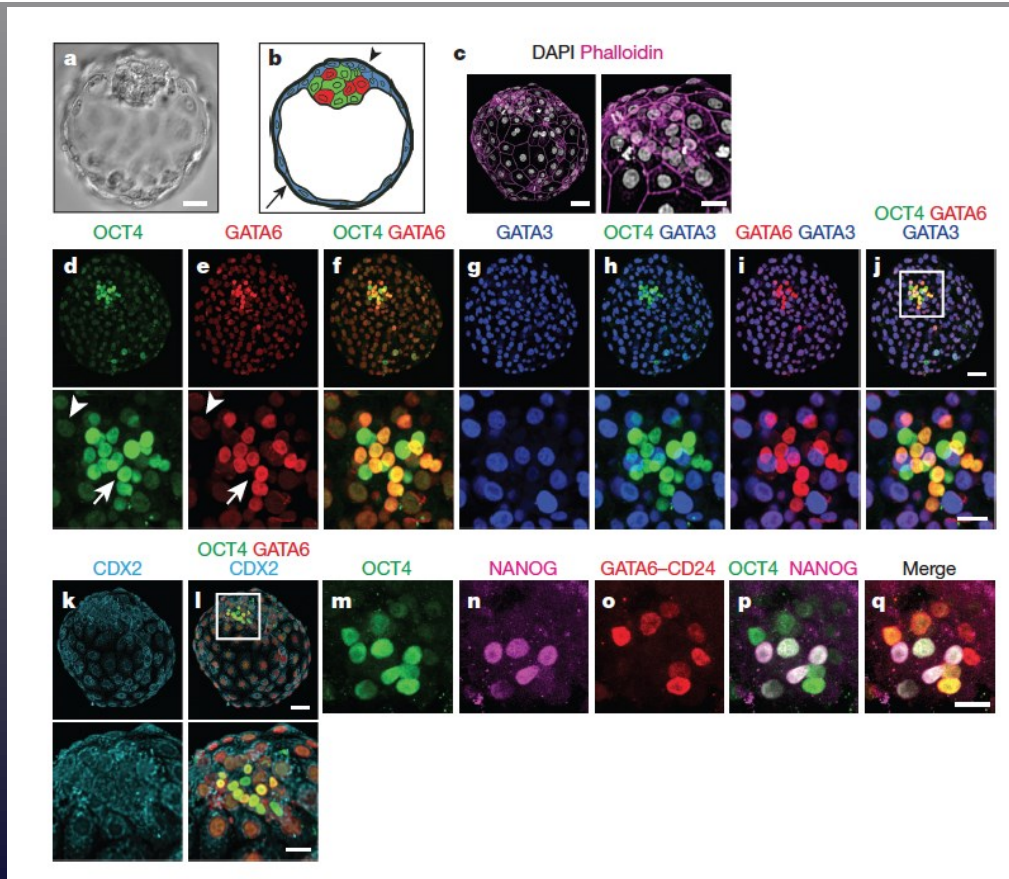
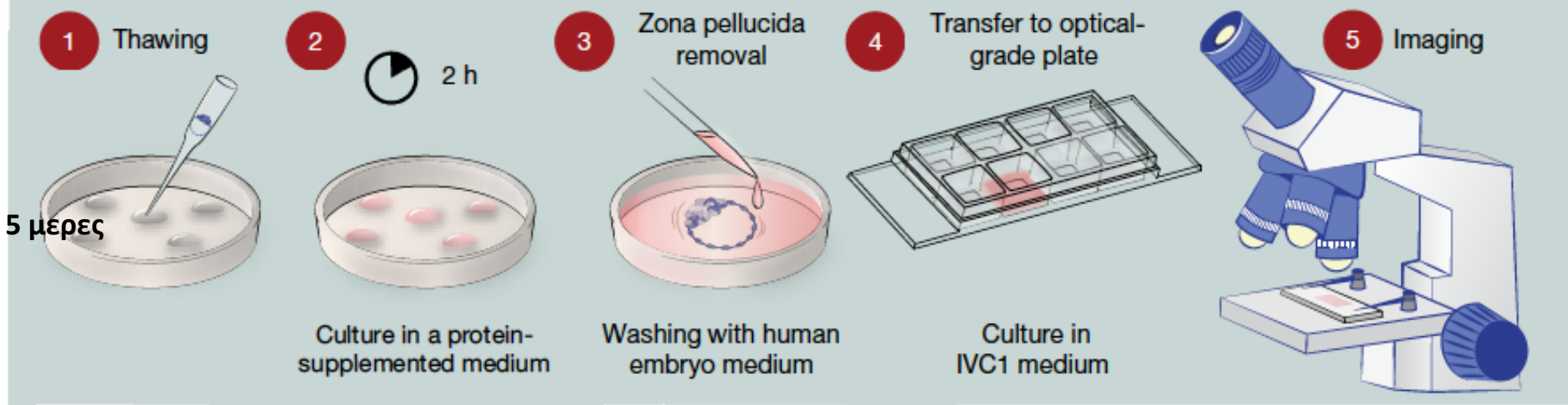
Alessia Deglincerti<sup>1\*</sup>, Gist F. Croft<sup>1\*</sup>, Lauren N. Pietila<sup>1</sup>, Magdalena Zernicka-Goetz<sup>2</sup>, Eric D. Siggia<sup>3</sup> & Ali H. Brivanlou<sup>1</sup>

# Human embryos grown in lab for longest time ever

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







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

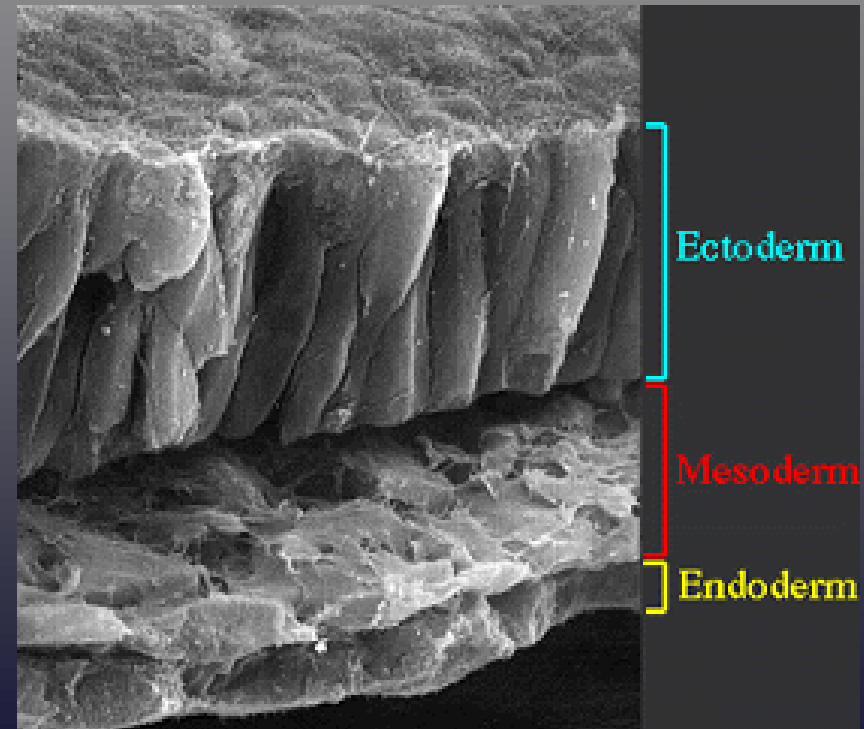
# Τι είναι η γαστριδίωση;

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

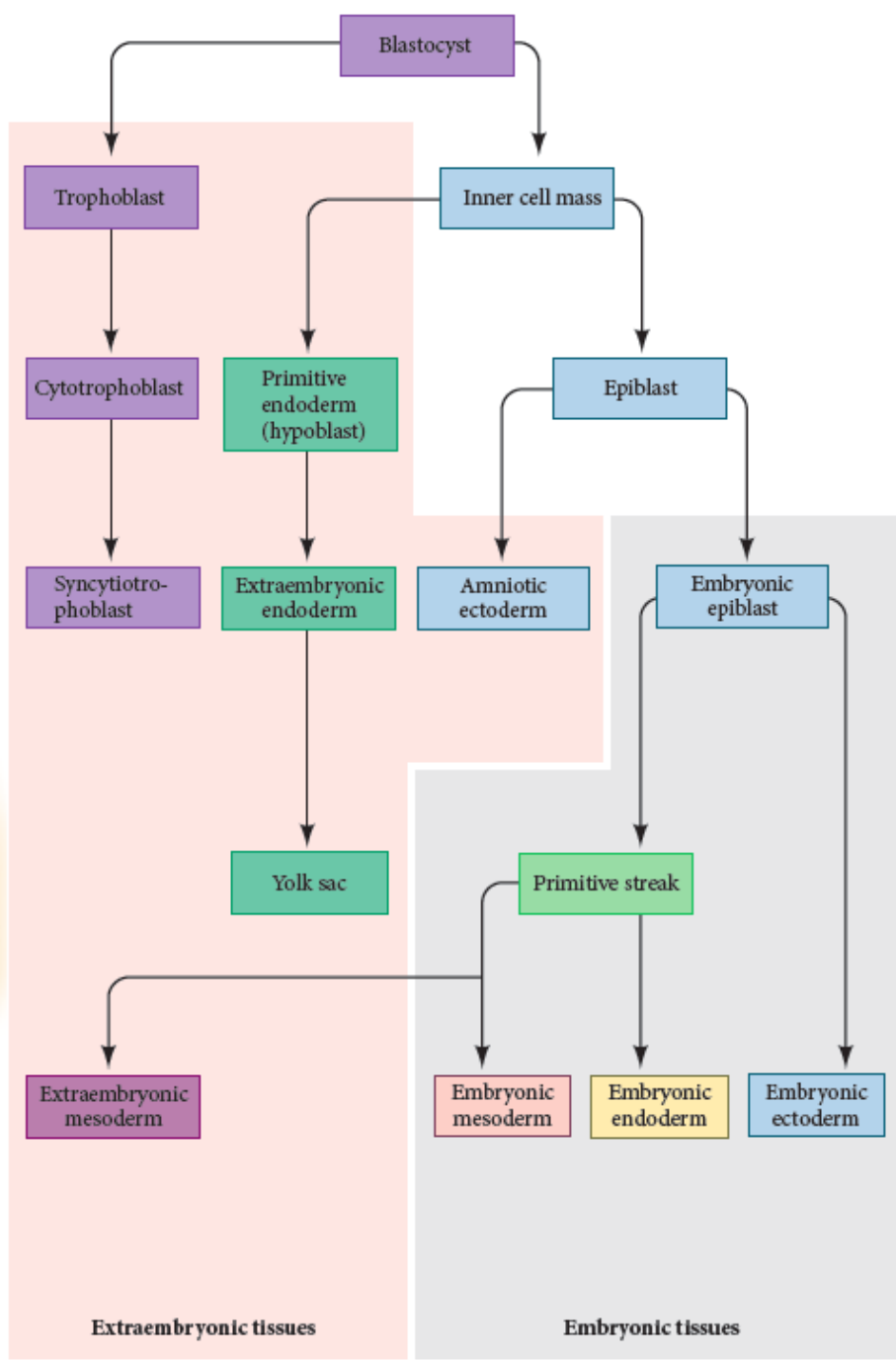
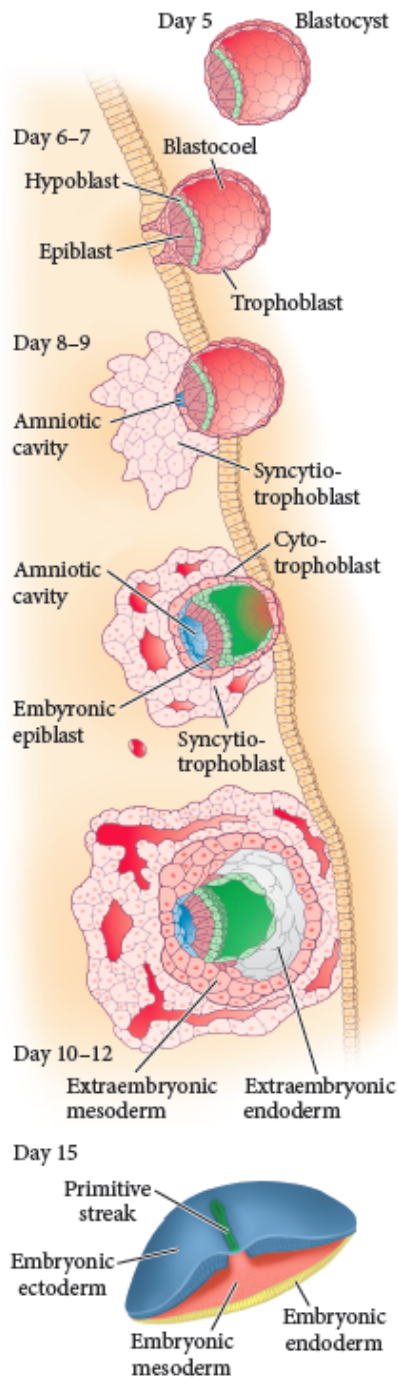
➤ Η διαδικασία με την οποία οργανώνεται το βασικό πλάνο του σώματος.

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

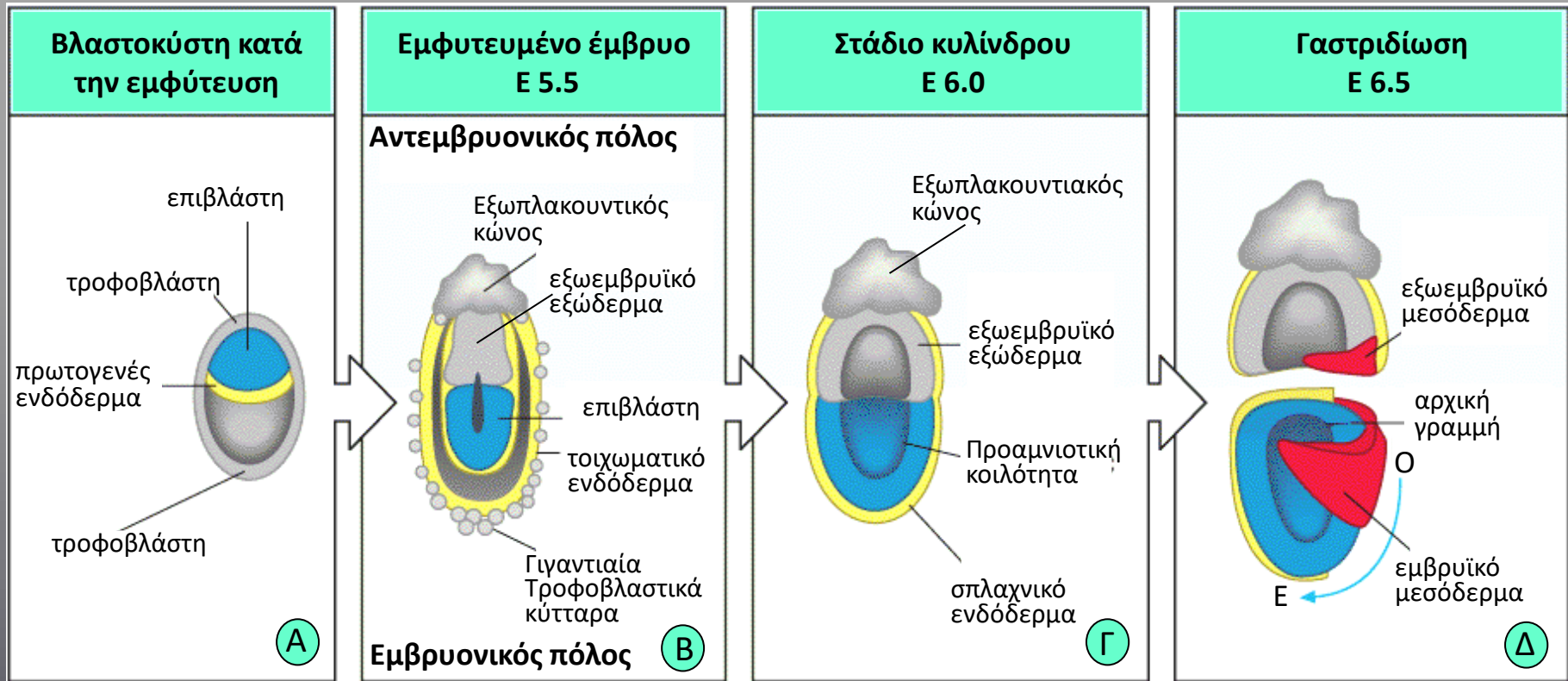
➤ Η γαστριδίωση των θηλαστικών μοιάζει αρκετά με αυτή των πτηνών.



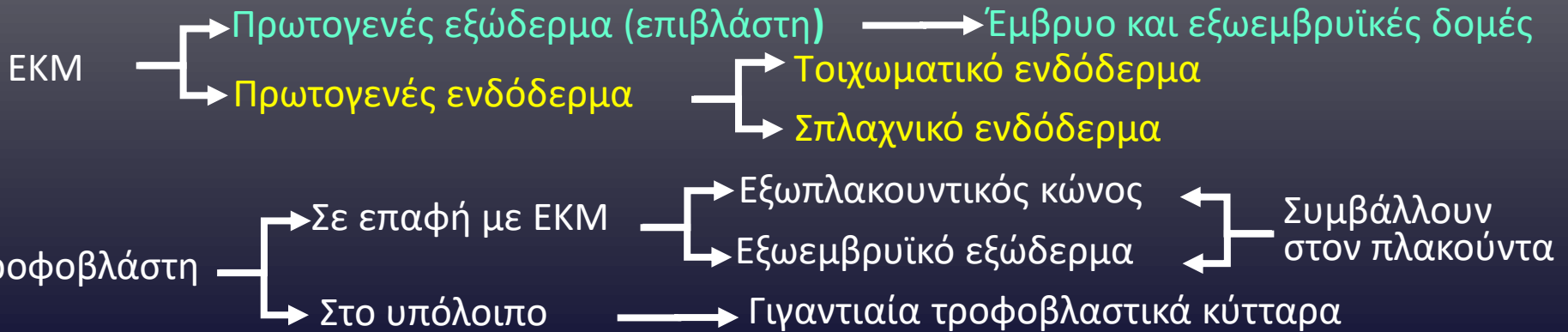




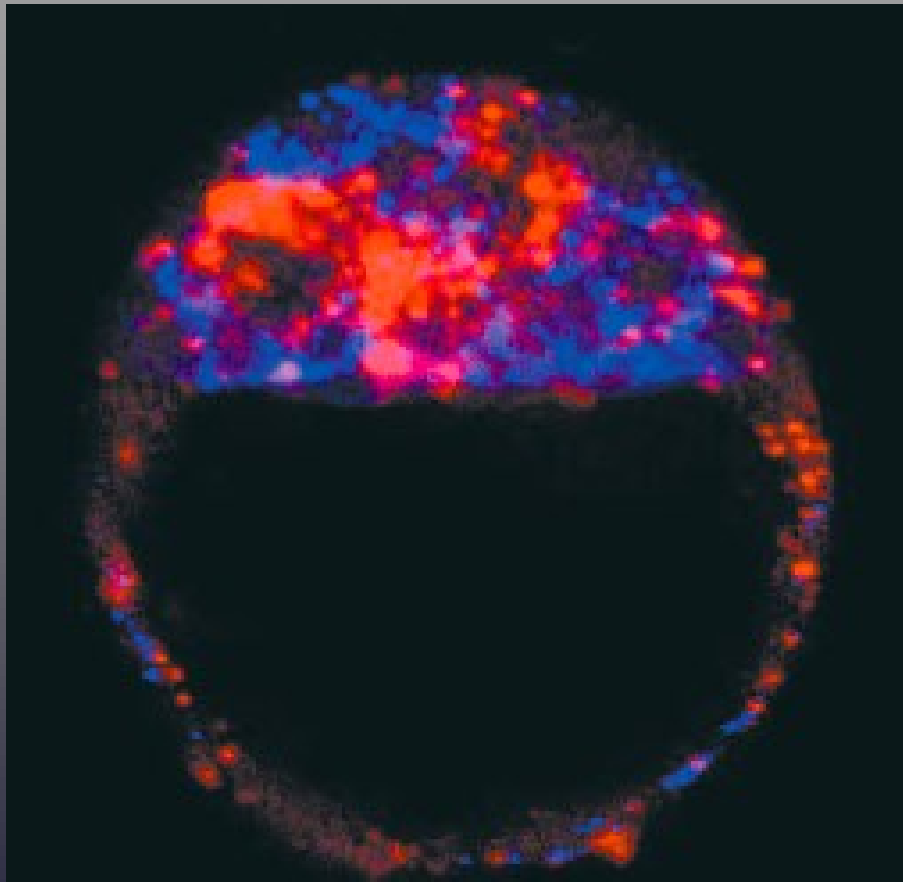
# Γαστριδίωση I



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



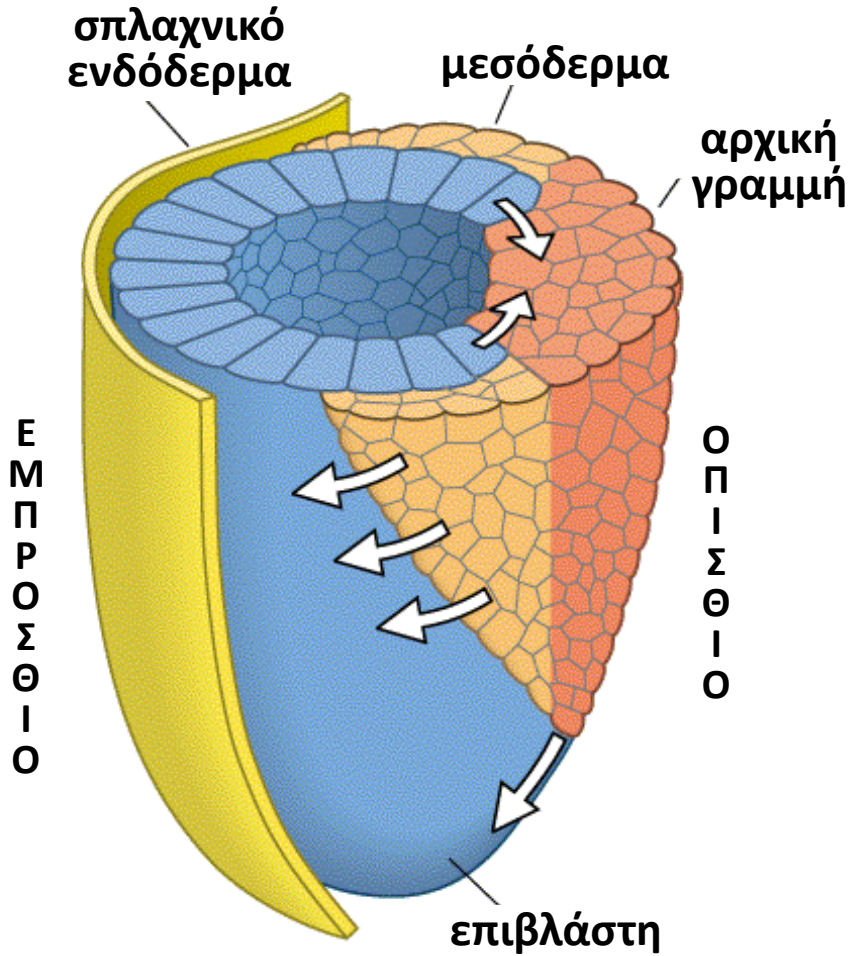
# Πρώιμη ανάπτυξη



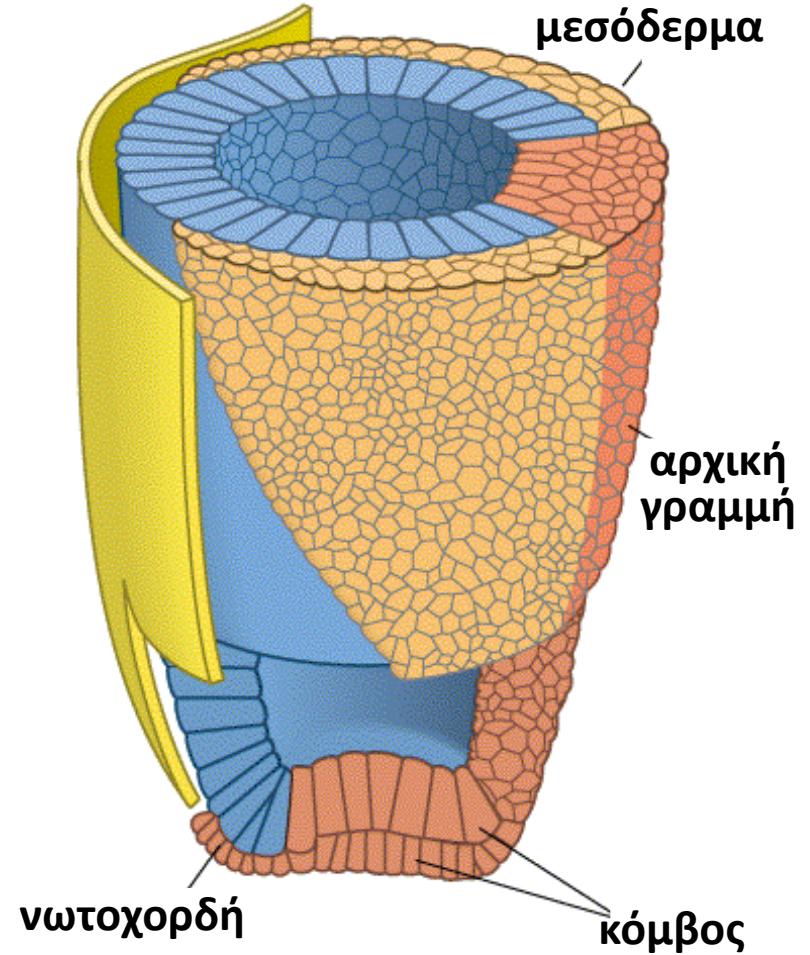
- Τυχαία ενεργοποίηση του Nanog (μπλε) και του GATA6 (κόκκινο) στην εσωτερική κυτταρική μάζα την E 3.5.
- Χρονική συνιστώσα?
- Σηματοδότηση FGF (υψηλότερη = πρωτογενές ενδόδερμα)
- **Nanog = επιβλάστη**
- **GATA6 = πρωτογενές ενδόδερμα**
- Στην E 4.5 οι δυο πληθυσμοί θα διαχωριστούν και το σπλαχνικό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

# Γαστριδίωση II

Ε 6.5 : Σχηματισμός αρχικής γραμμής



Ε 7.5 : Πρώιμη κεφαλική καταβολή



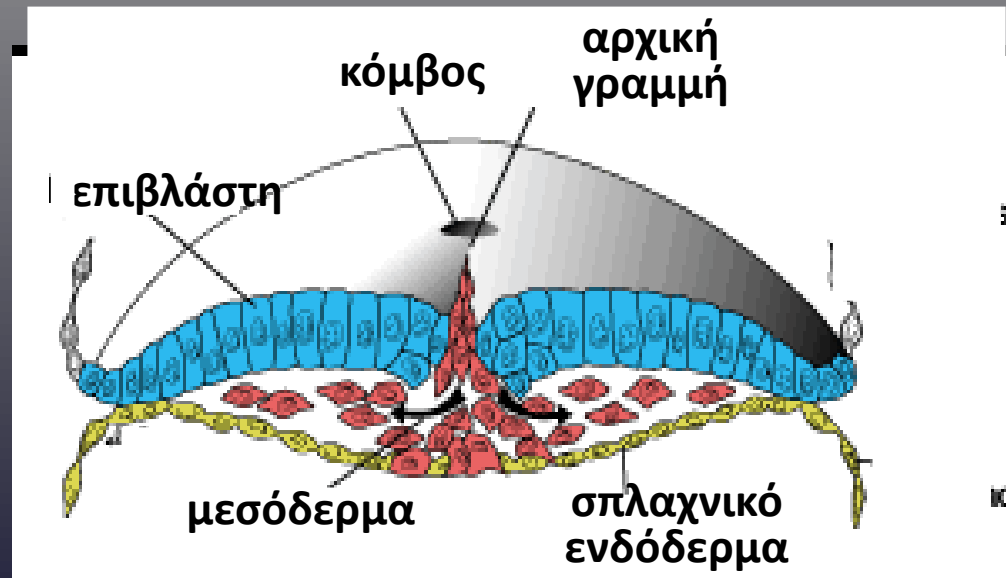
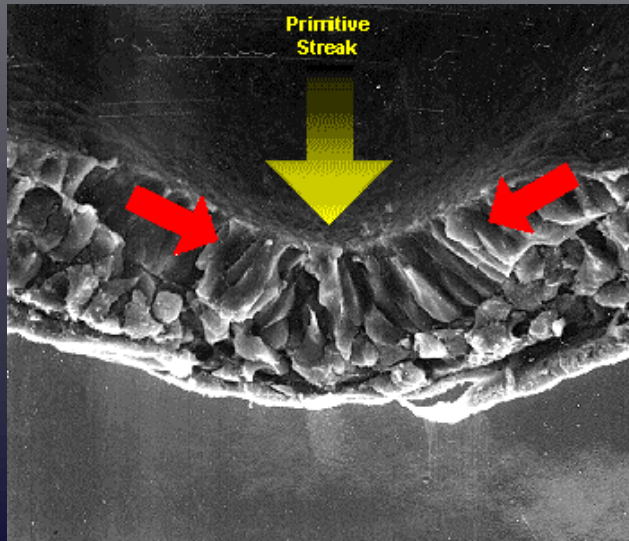
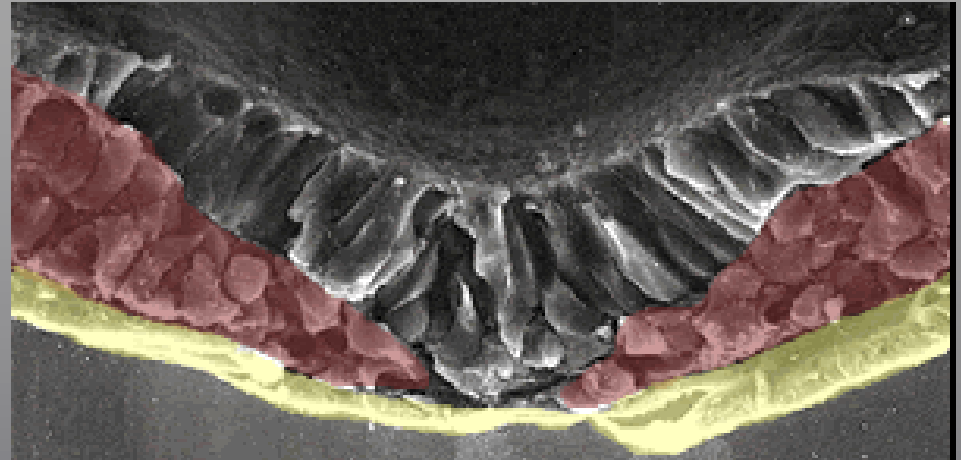
# Γαστριδίωση III : Σχηματισμός αρχικής γραμμής

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

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

➤ Το κεφαλικό άκρο είναι ο κόμβος (node).

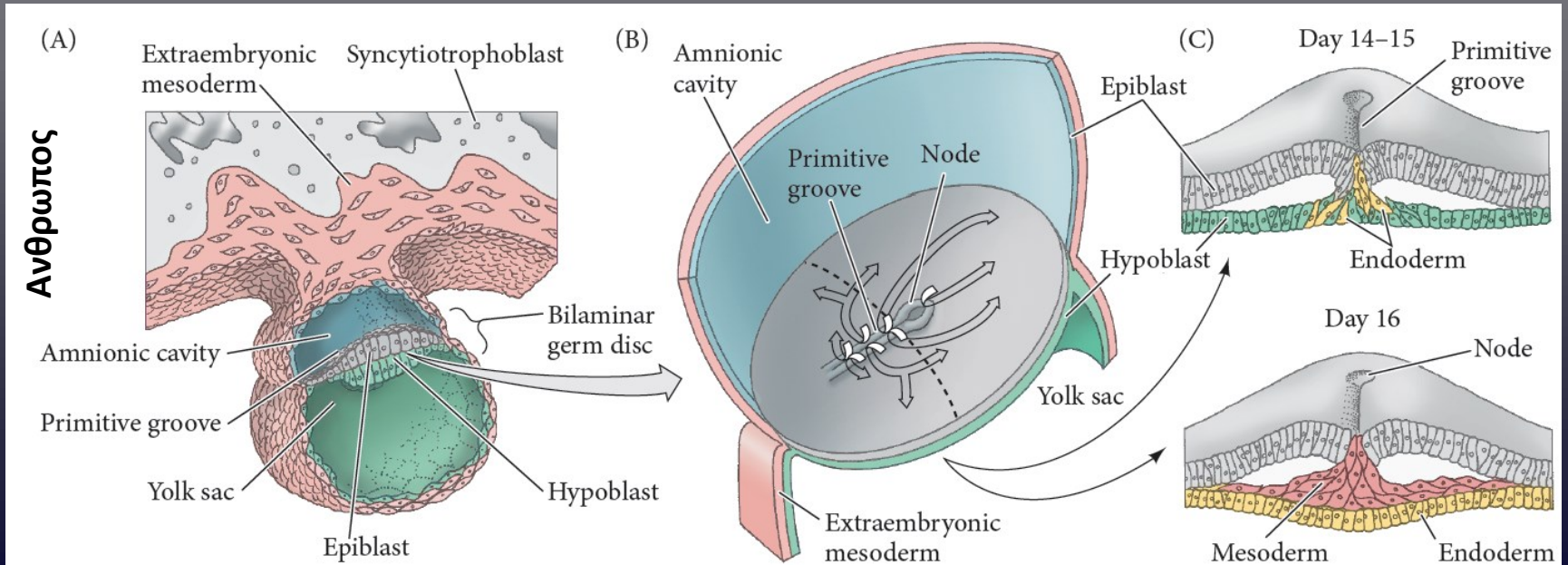
➤ Η αρχική γραμμή χαρακτηρίζει το οπίσθιο τμήμα του εμβρύου.

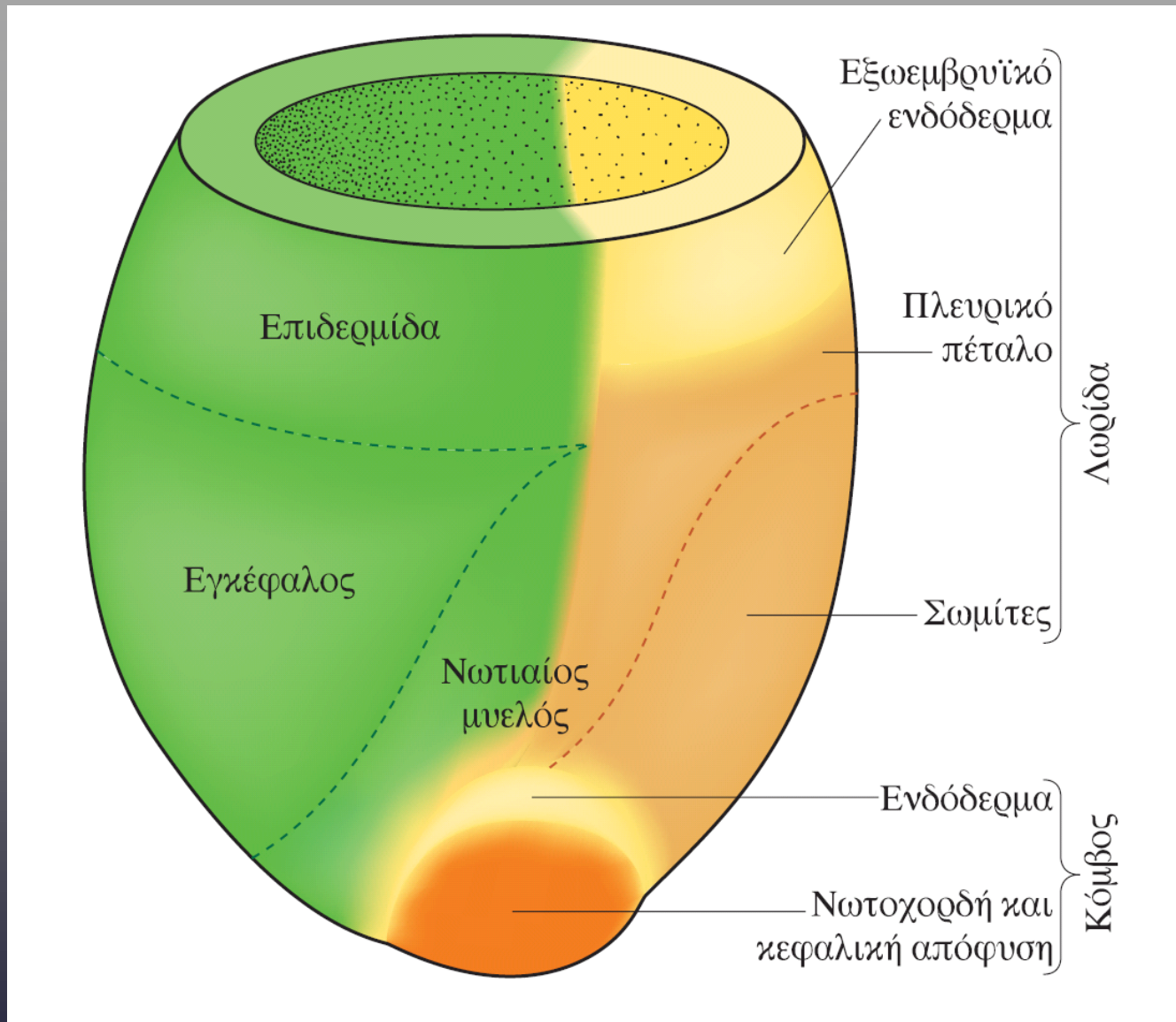




# Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων

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



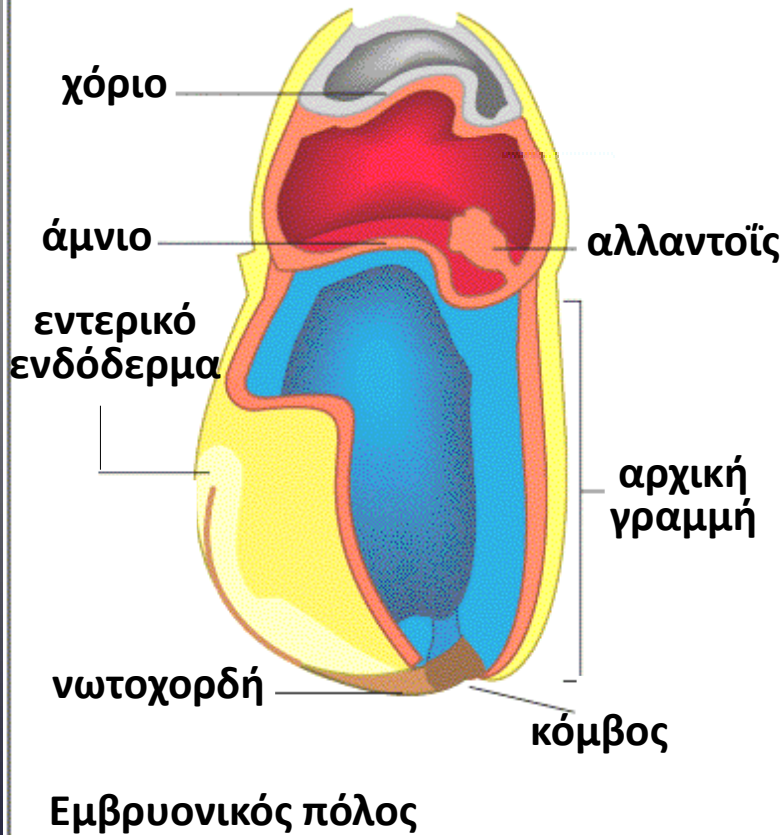


Χάρτης πεπρωμένου του σταδίου της όψιμης αρχικής λωρίδας. Στην πραγματικότητα τα όρια είναι πιο ασαφή λόγω της ανάμειξης μεταξύ των κυττάρων.

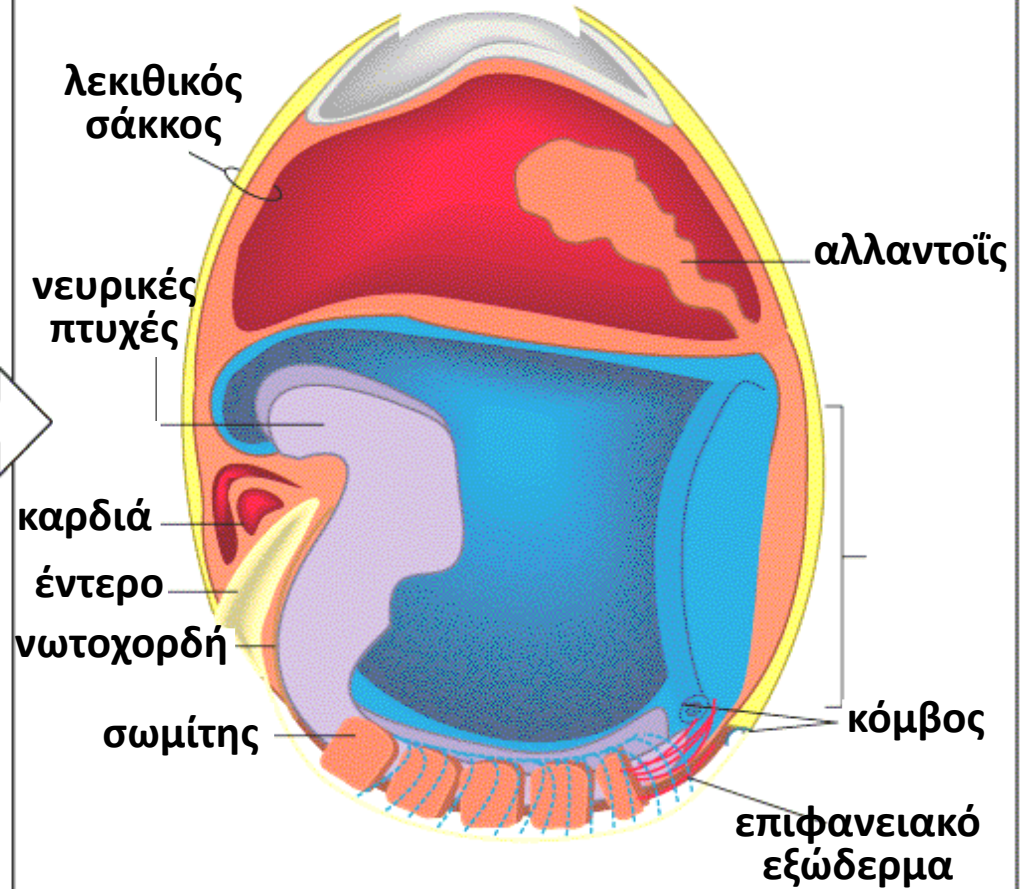
# Γαστριδίωση - Έναρξη Νευριδίωσης

**Ε 7.5 : Αρχική γραμμή σε πλήρη ανάπτυξη**

Αντεμβρυονικός πόλος



**Ε 8.5 : Σχηματισμός νευρικών πτυχών**



# Τέλος γαστριδίωσης- Στροφή

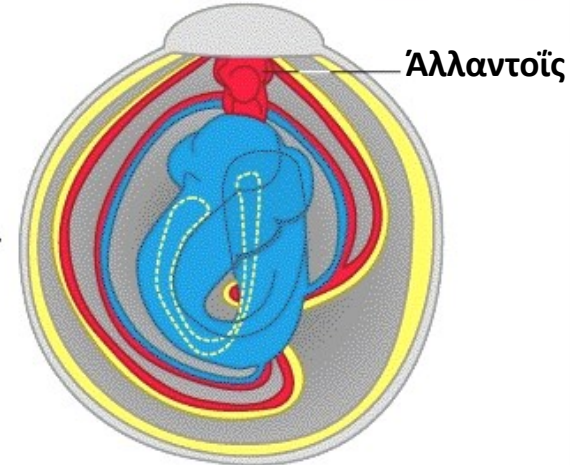
Ε 8.5 : Σχηματισμός νευρικών πτυχών



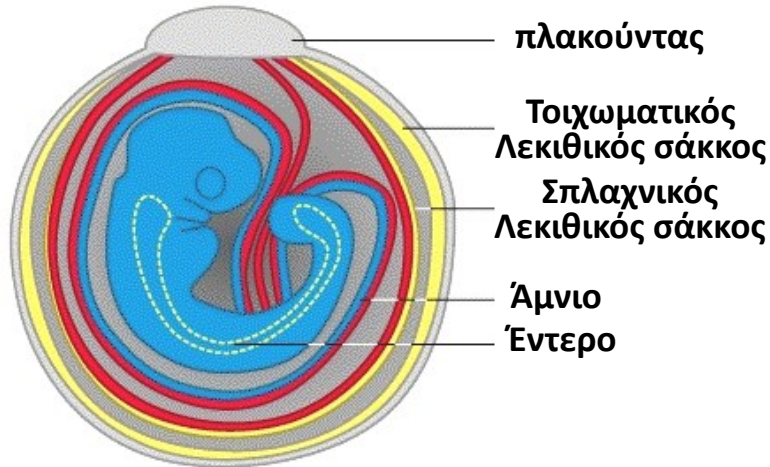
3-4 ώρες μετά



Ε 9.0



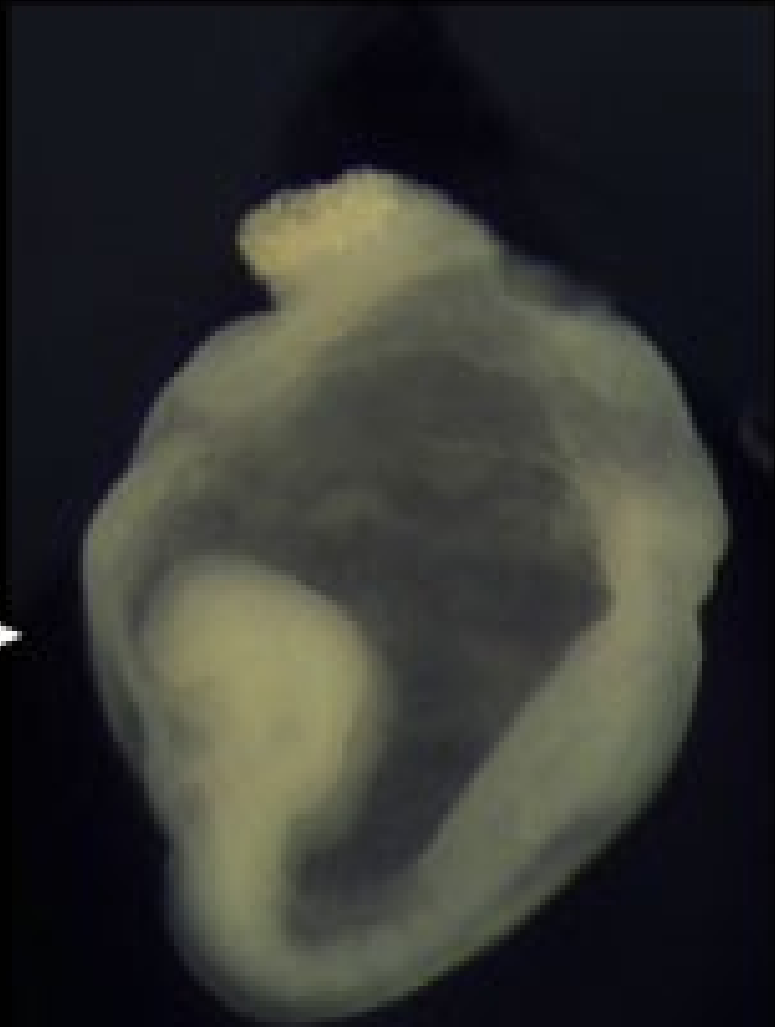
Ε 9.5 : Τέλος γαστριδίωσης



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



e7.5



e8.5

# Γαστριδίωση: Οι όροι

Γαστριδύση: Gastrulation

Πρωτογενές ενδόδερμα: Primitive endoderm

Τοιχωματικό ενδόδερμα: Parietal endoderm

Γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα: Trophoblast giant cells

Εξωεμβρυϊκό εξώδερμα: Extra-embryonic mesoderm

Προαμνιακή κοιλότητα: Proamniotic cavity

Σπλαχνικό ενδόδερμα: Visceral endoderm

Επιβλάστη: Eriblast

Εμπρόσθιο: Anterior

Οπίσθιο: Posterior

Αρχική γραμμή: Primitive streak

Κόμβος: Node

Νωτοχορδή: Notochord

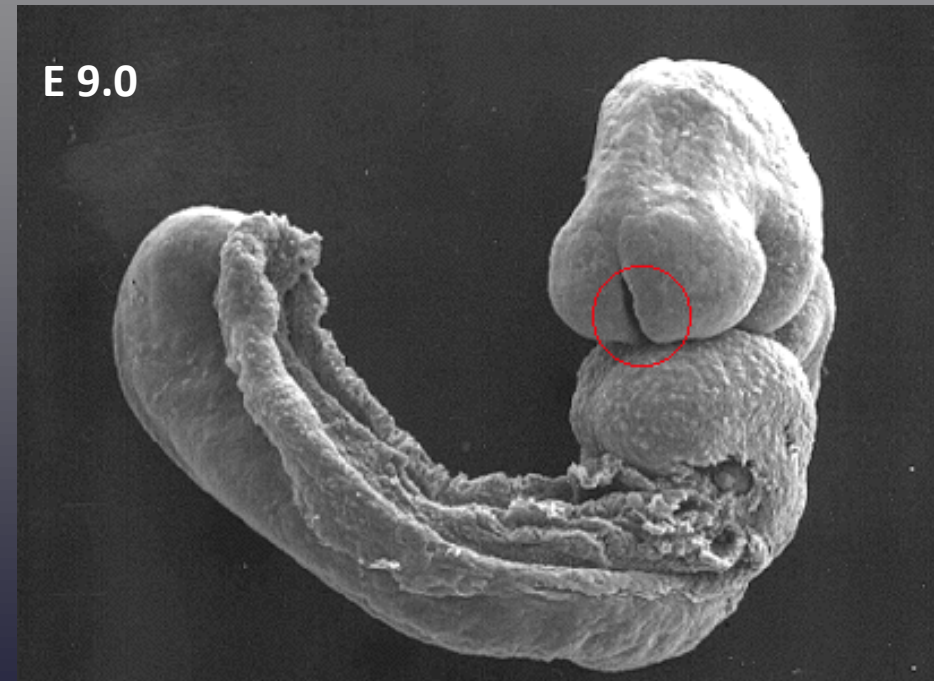
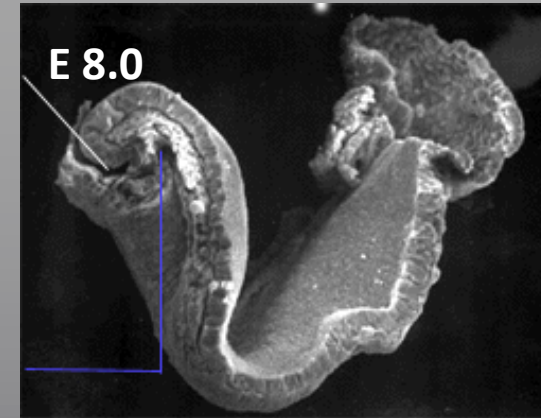
Αλλαντοΐς: Allantois

Νευρικές πτυχές: Neural folds

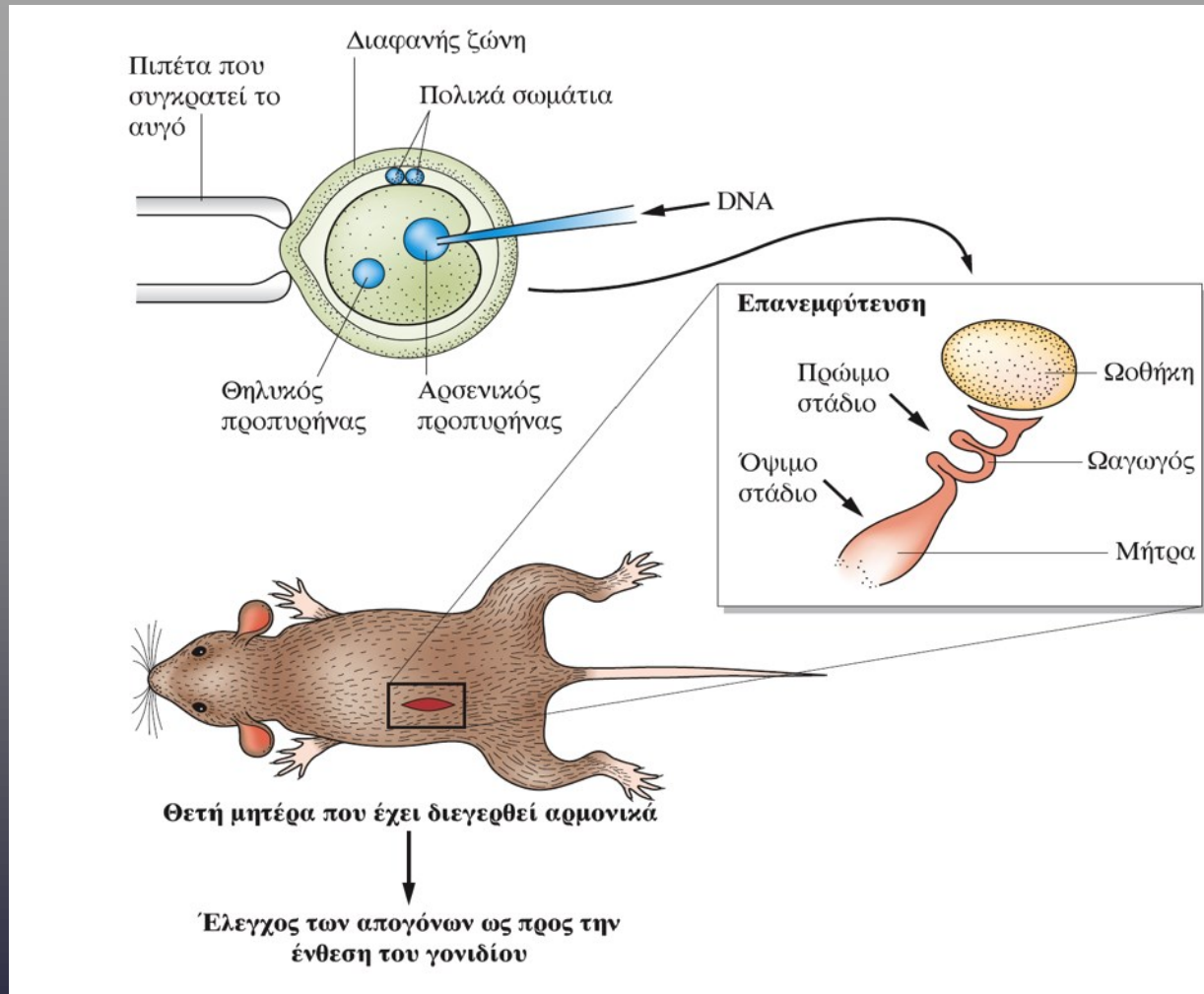
Σωμίτης: Somite

Επιφανειακό εξώδερμα: surface ectoderm

Εξωπλακουντικός κώνος: ectoplacental cone

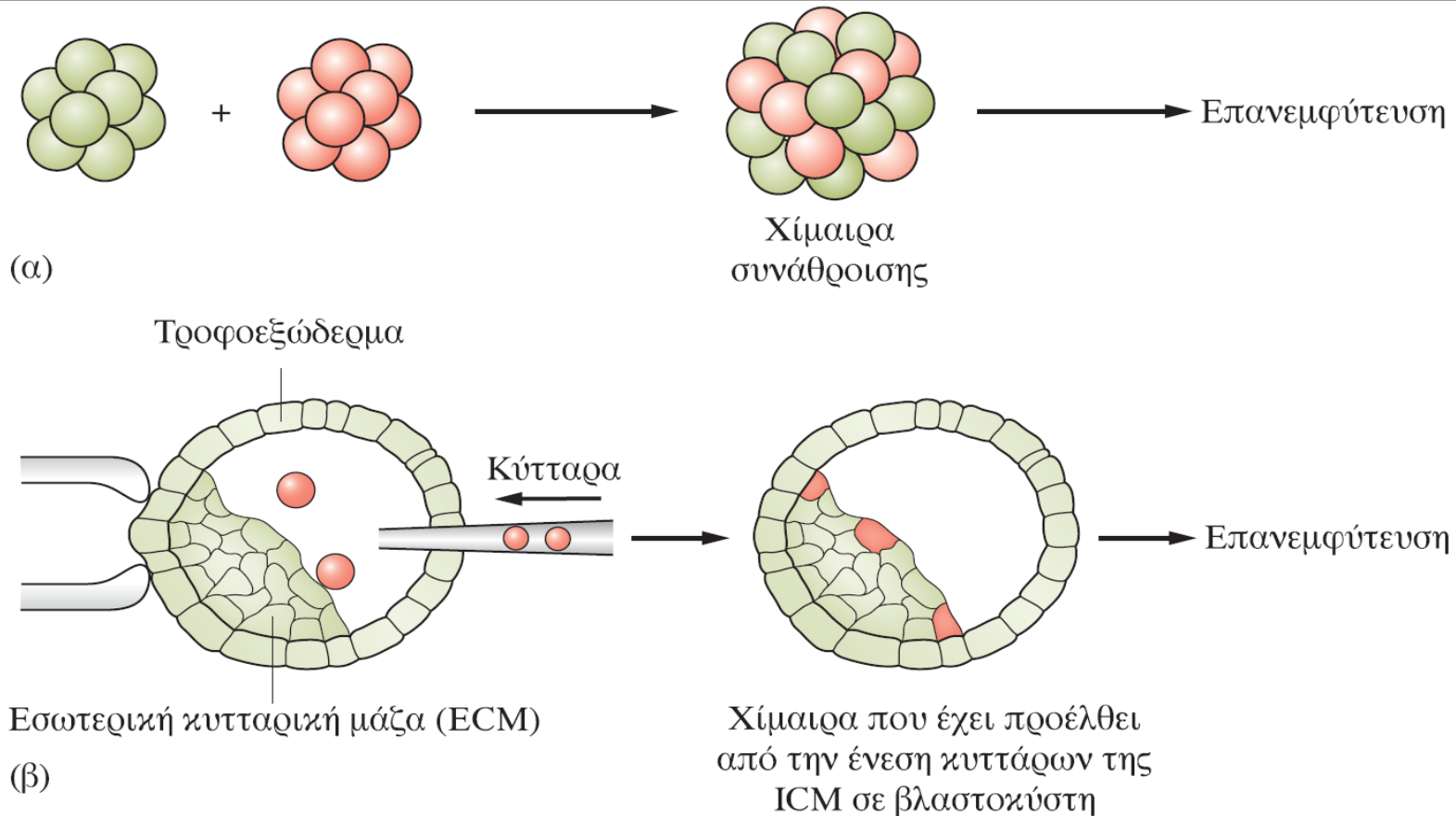


# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



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

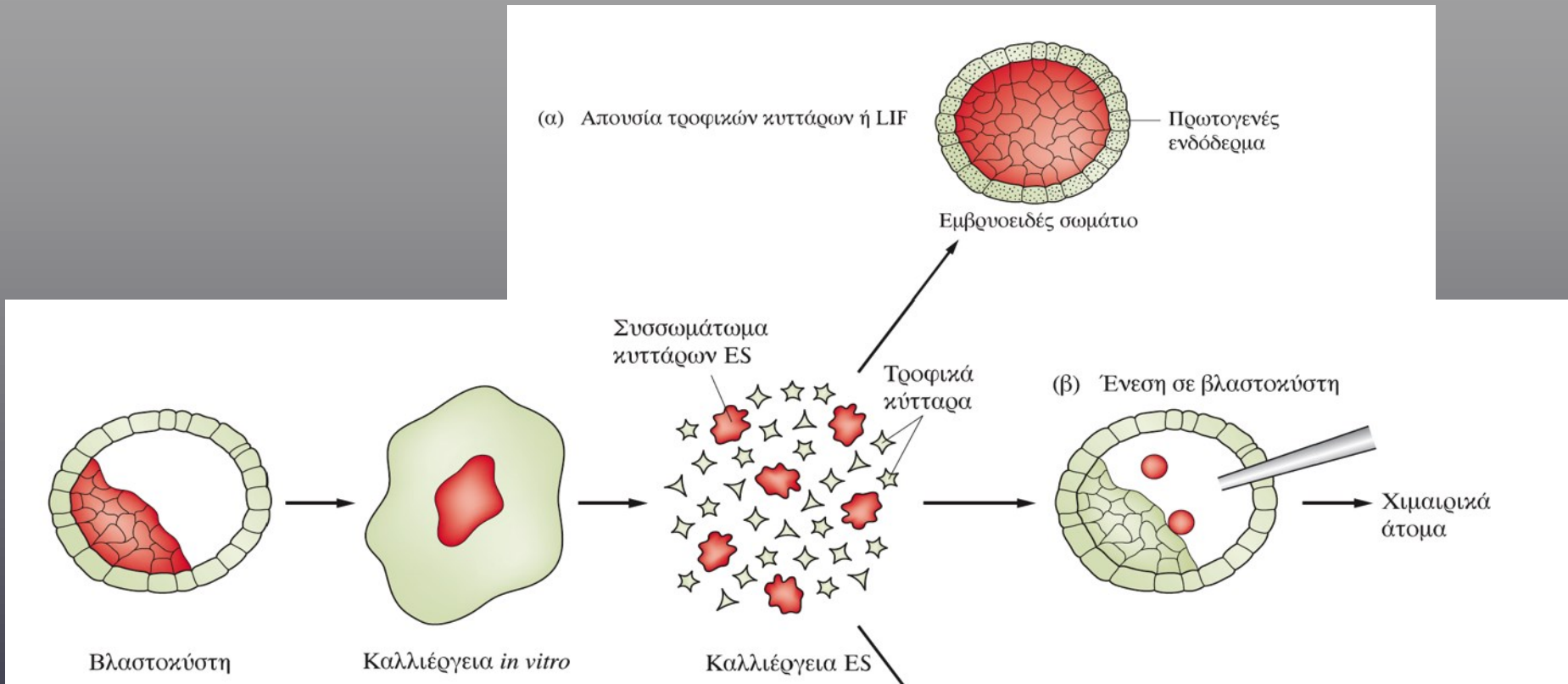
# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



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

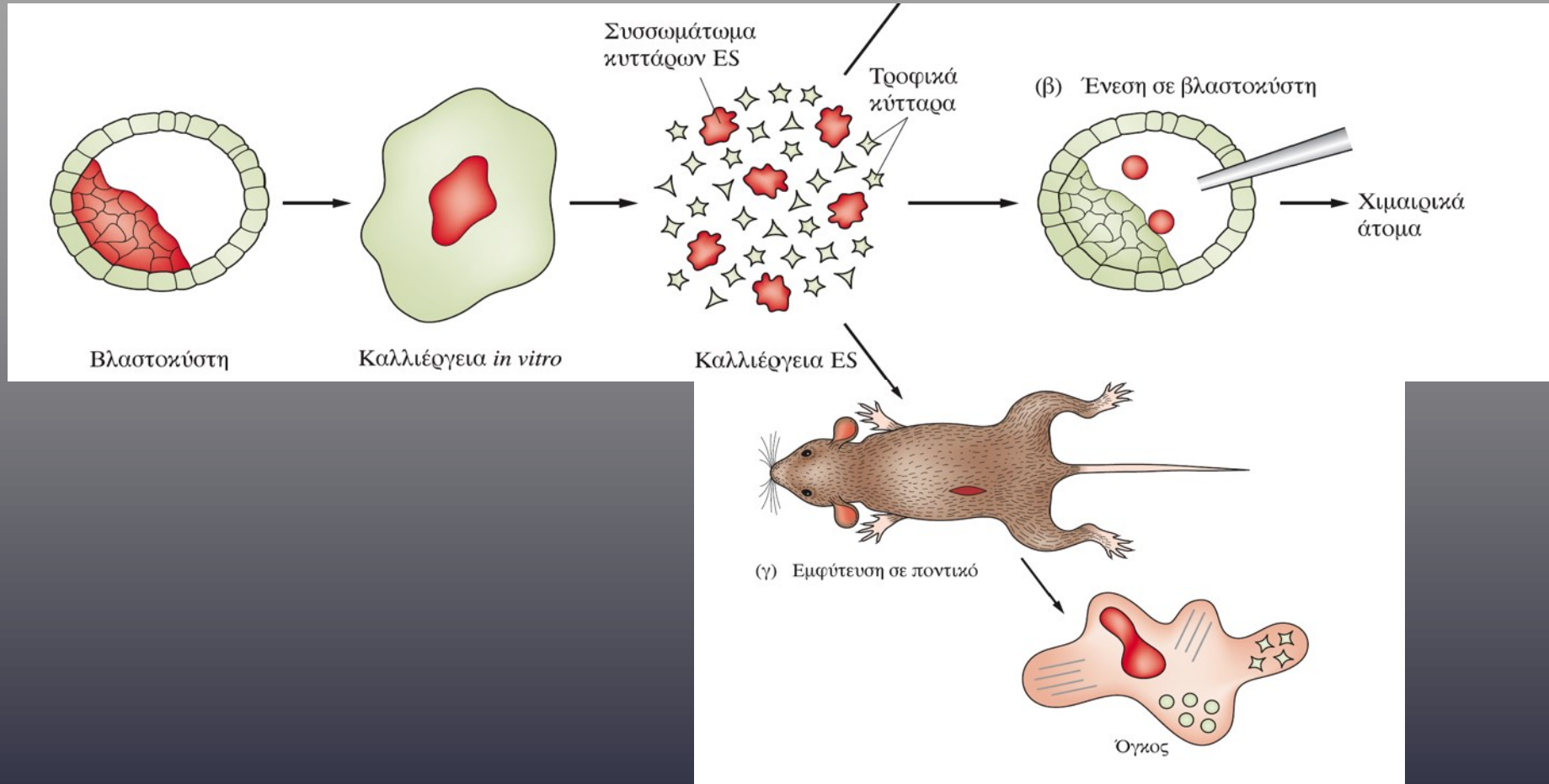


# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



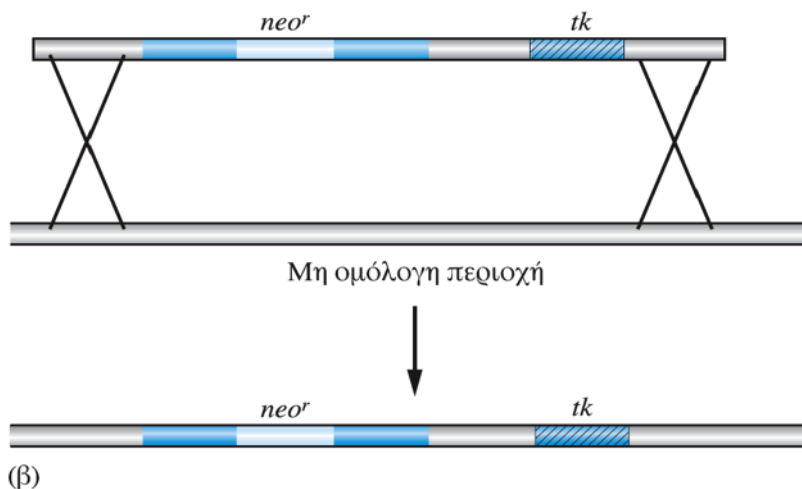
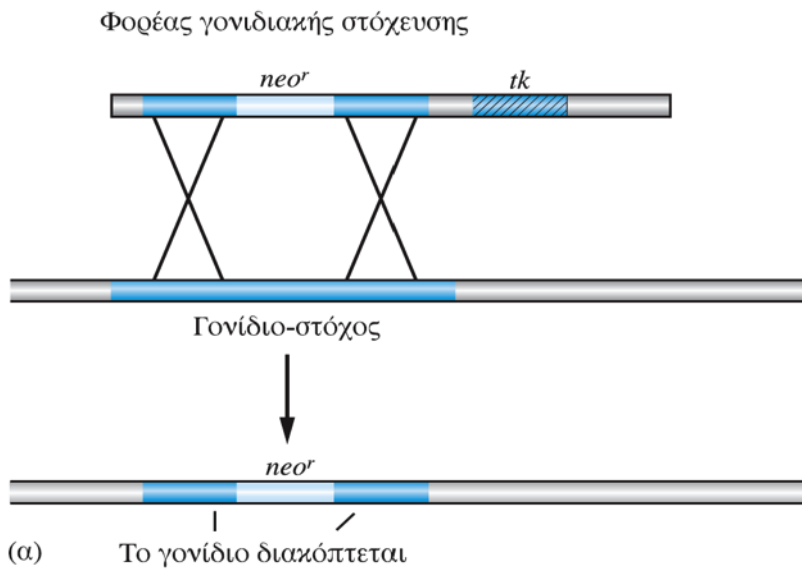
Κύτταρα ES. (α) Η αφαίρεση των τροφικών κυττάρων προκαλεί διαφοροποίηση *in vitro* των κυττάρων ES σε εμβρυοειδή σωματία.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



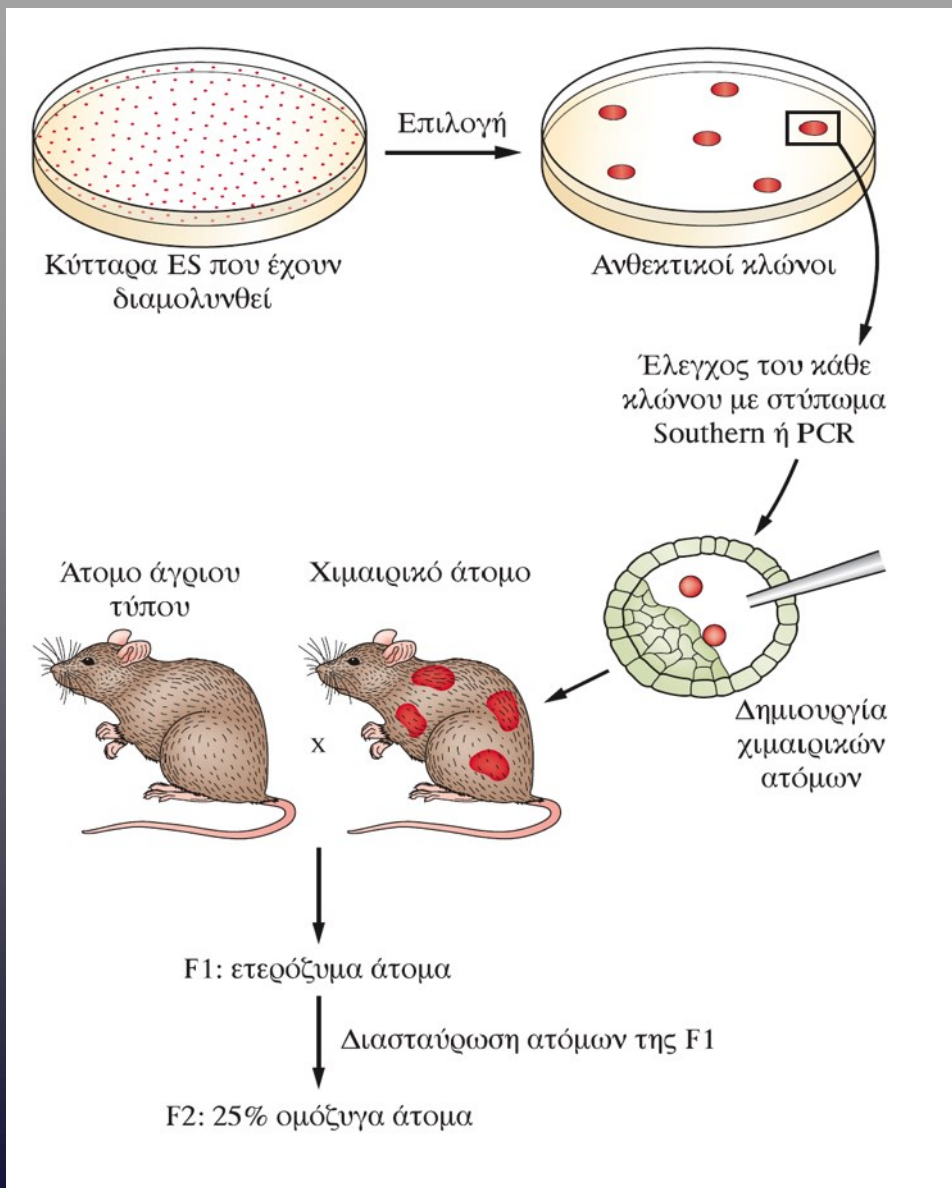
Κύτταρα ES. (β) Όταν κύτταρα ES ενίενται σε βλαστοκύστεις, τότε είναι δυνατόν να αναπτυχθούν χιμαιρικά άτομα. (γ) Όταν κύτταρα ES εμφυτεύονται κάτω από τη νεφρική κάψα, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί τερατοκαρκίνωμα.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



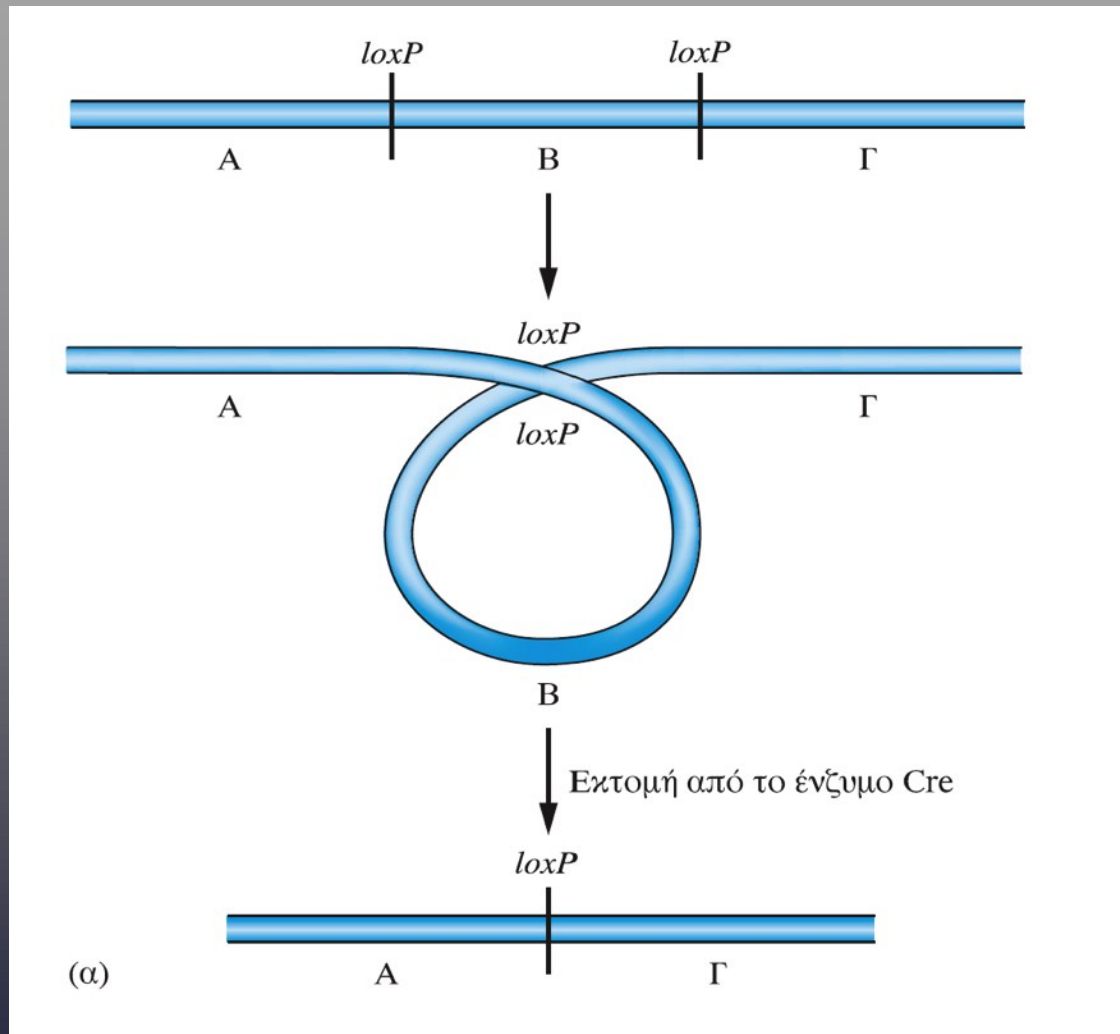
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων. (α) Ο ομόλογος ανασυνδυασμός διαταράσσει το γονίδιο-δέκτη και προκαλεί ένθεση του *neor* αλλά όχι του *tk*. (β) Η απλή ένθεση έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή του *neor* και του *tk* στο γονιδίωμα.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



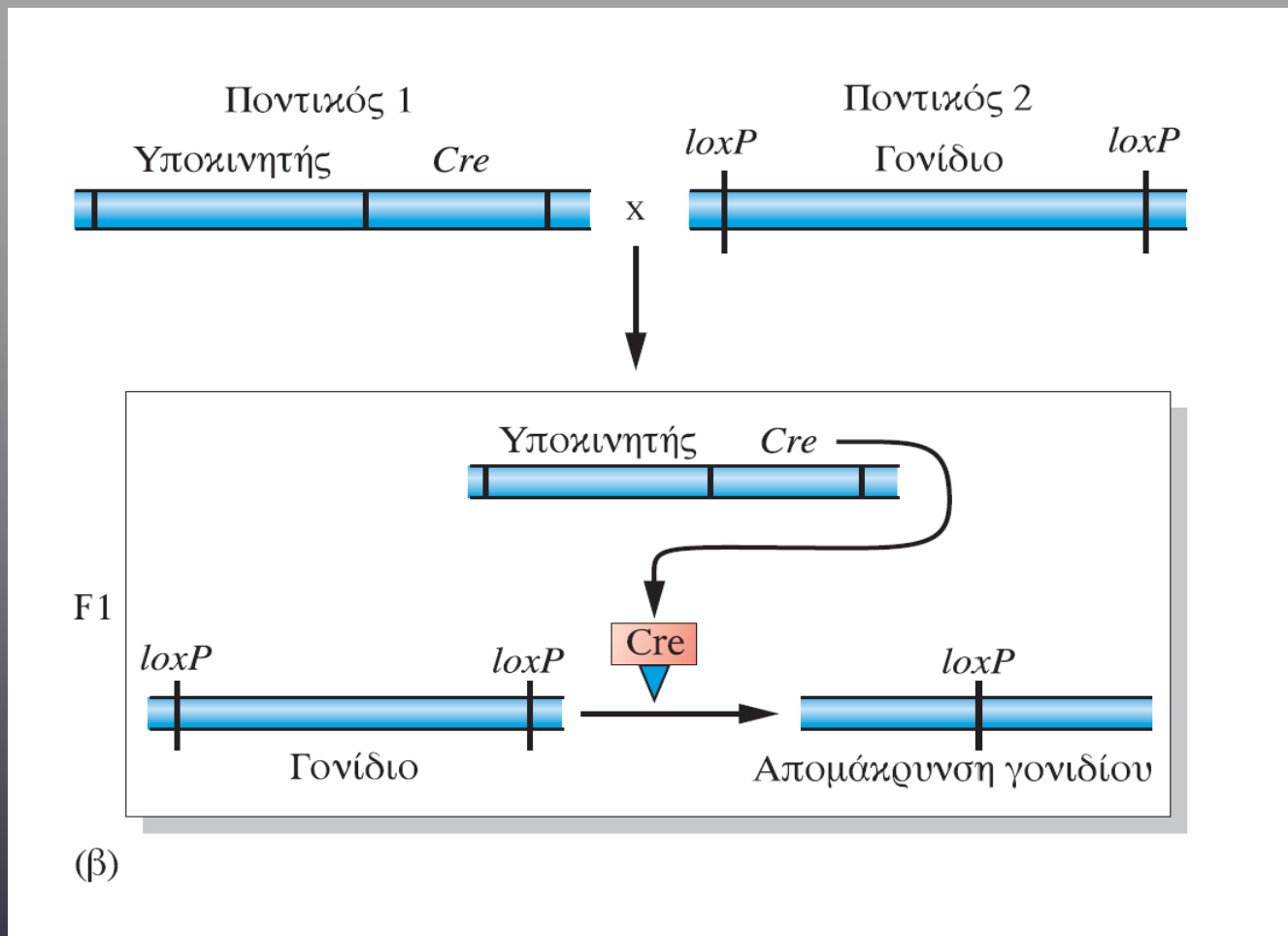
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε κύτταρα ES.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



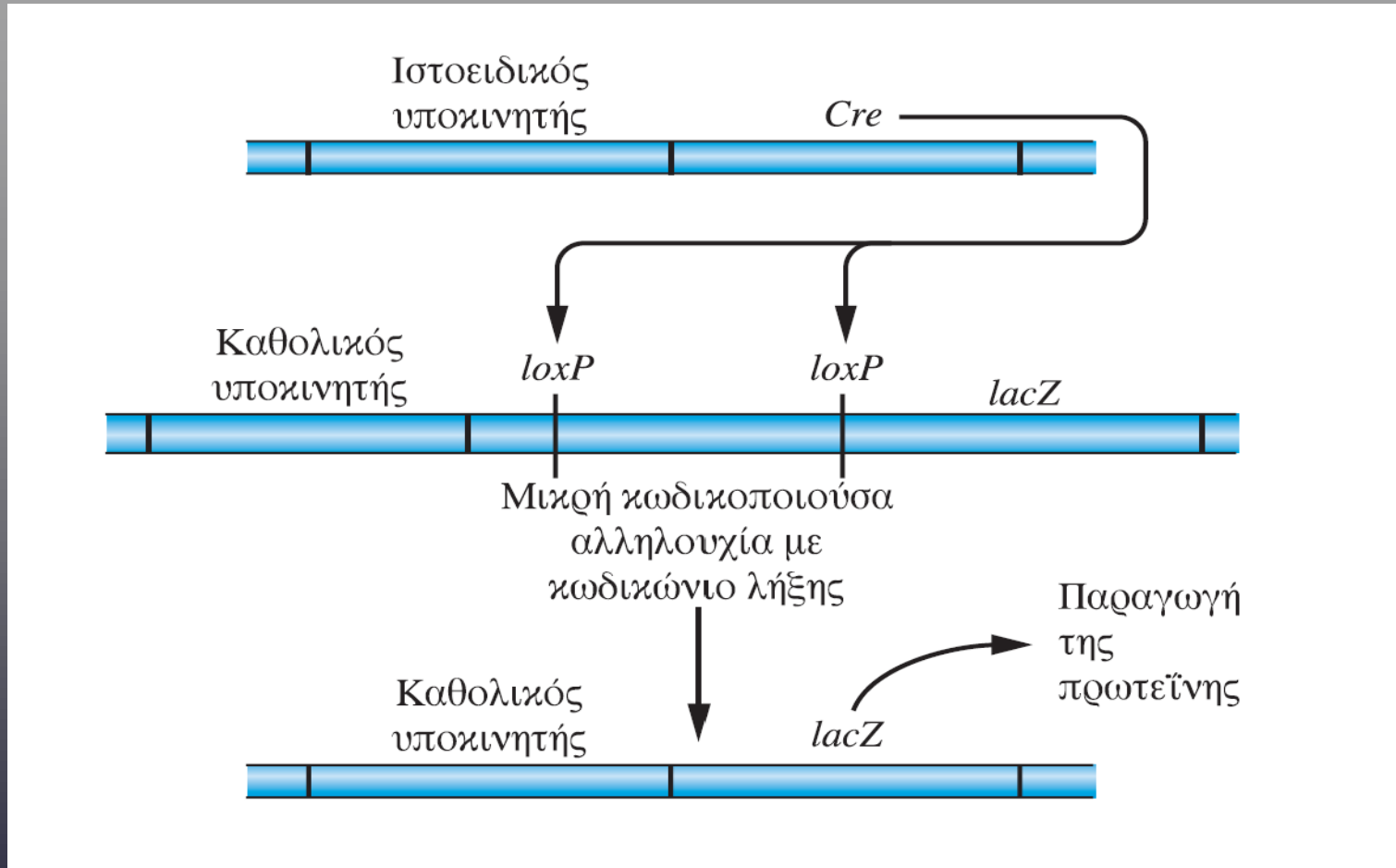
Σύστημα *cre-lox*. (α) Το ένζυμο ανασυνδυασμού Cre αποκόπτει το DNA που εντοπίζεται ανάμεσα σε δύο θέσεις *loxP*.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



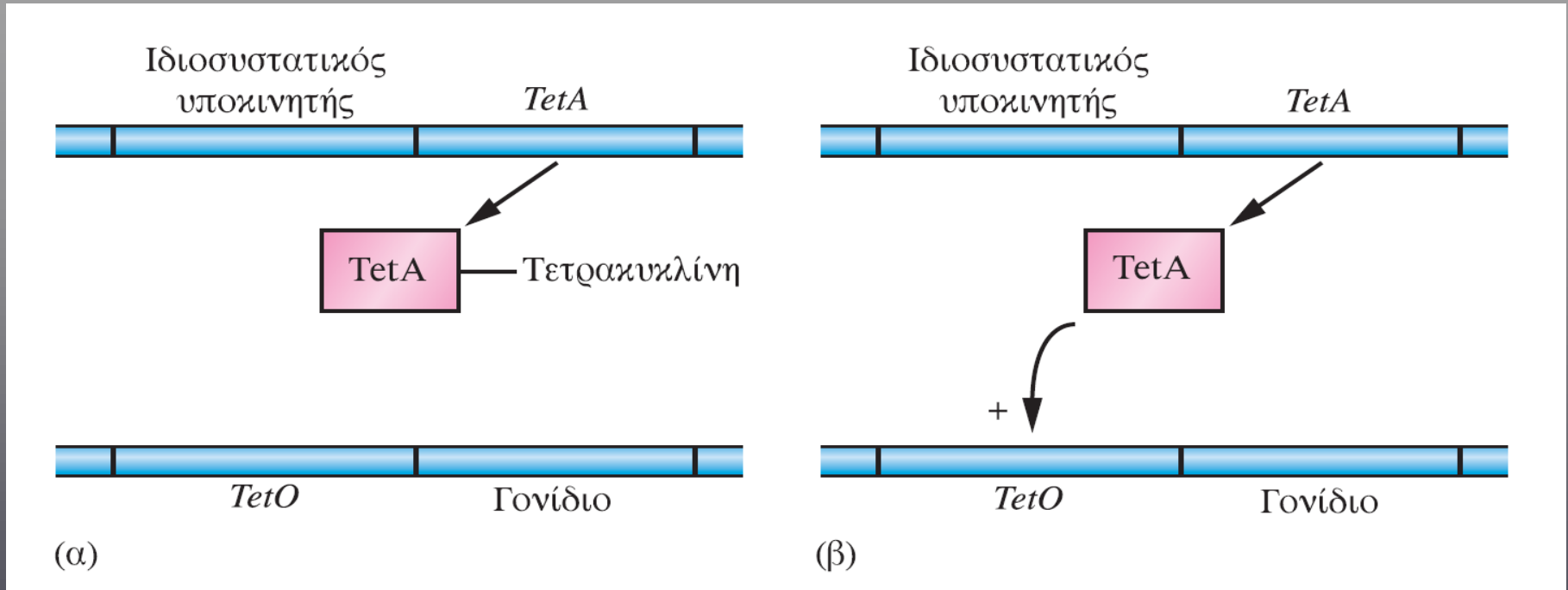
Σύστημα *cre-lox*. (β) Όταν διασταυρώνονται τα στελέχη 1 και 2, το *cre* μεταγράφεται από τον ιστοειδικό υποκινητή που το εντοπίζεται αναοδικά από αυτό με αποτέλεσμα την εκτομή του γονιδίου που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις θέσεις *loxP*.

# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



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

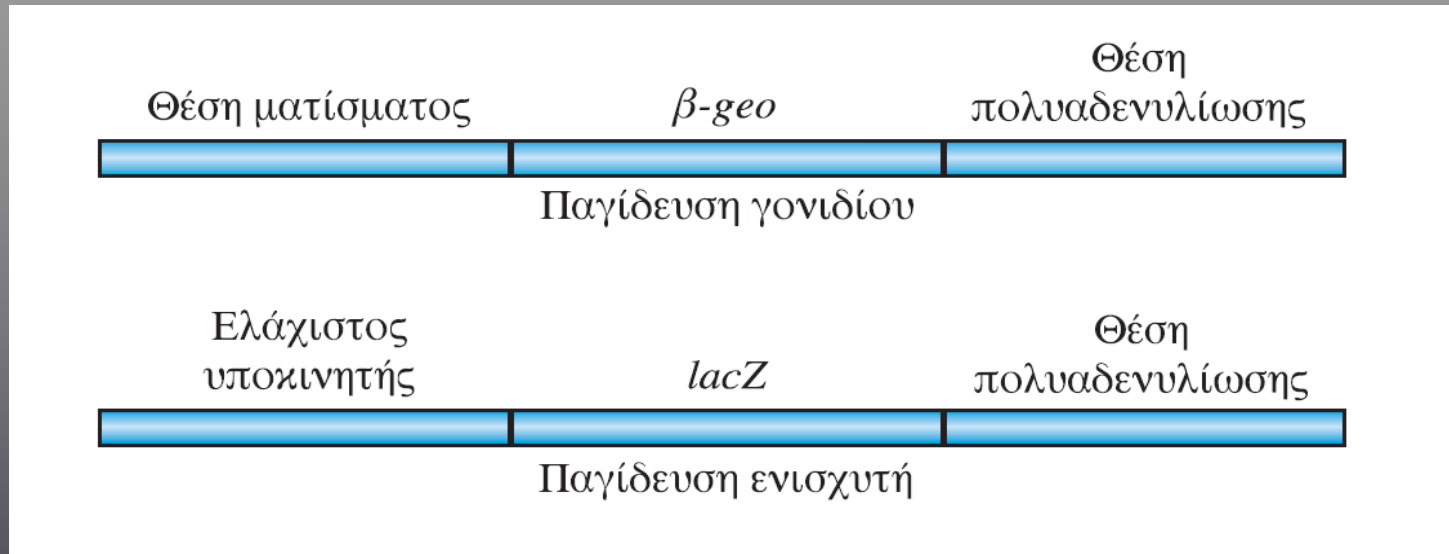
# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



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

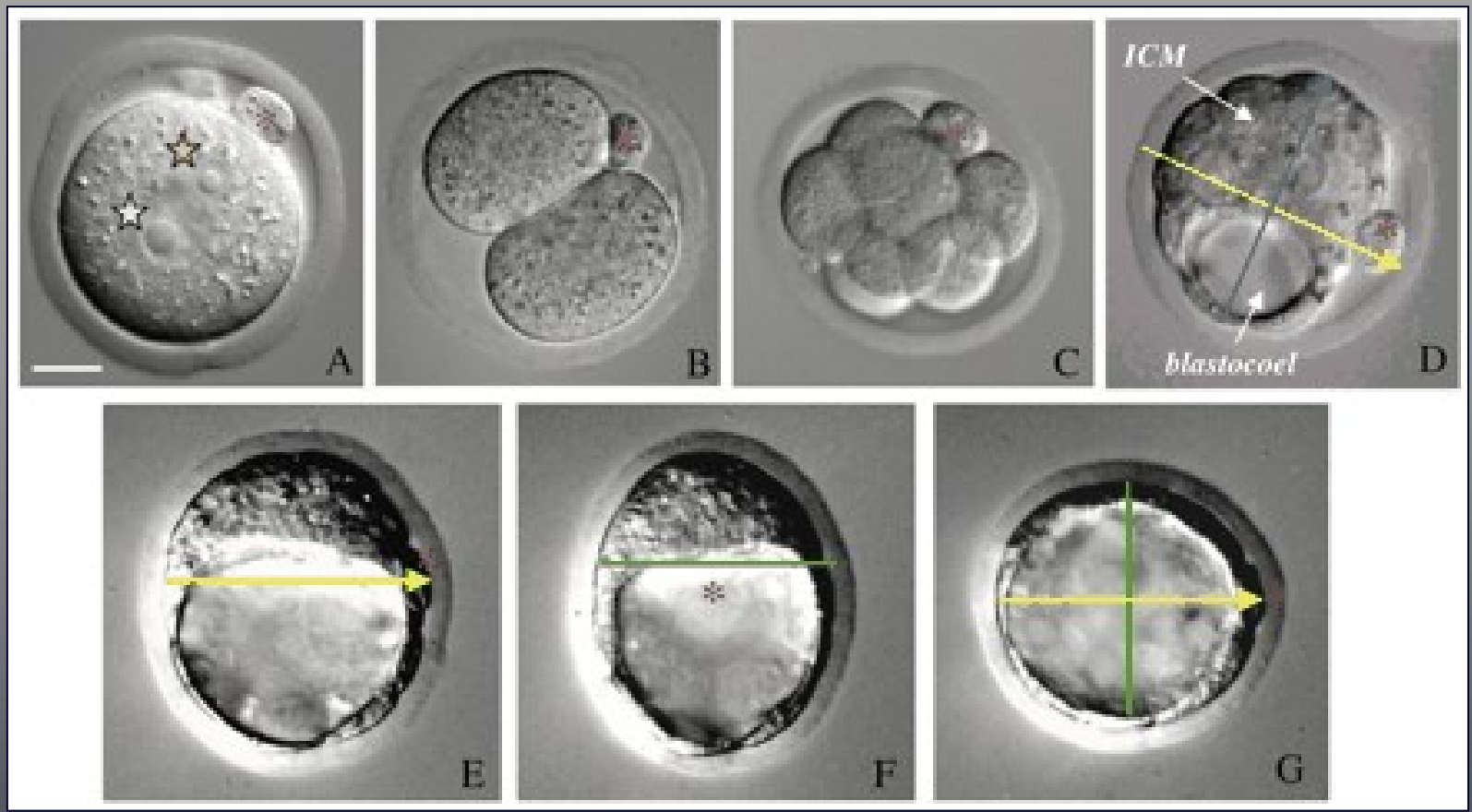


# Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



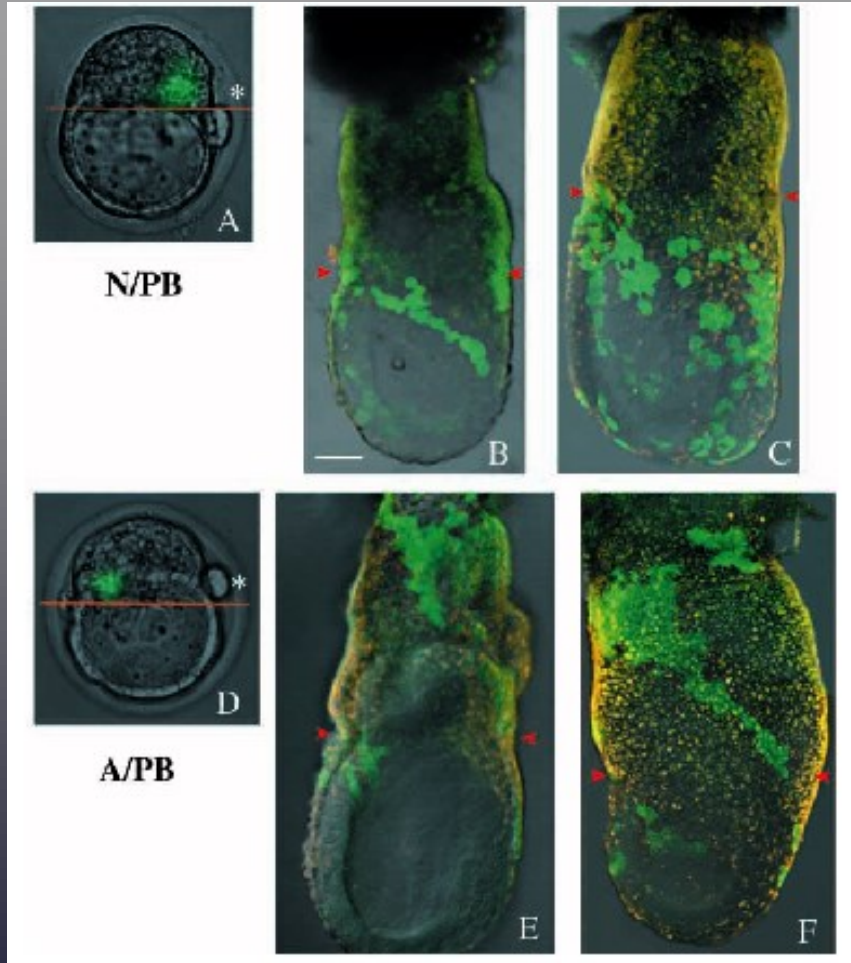
Παγίδευση γονιδίου και παγίδευση ενισχυτή.

# Καθορισμός αξόνων: Ασυμμετρία στη βλαστοκύστη



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

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



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

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

Οι αστερίσκοι δείχνουν τα πολικά σωματίδια.

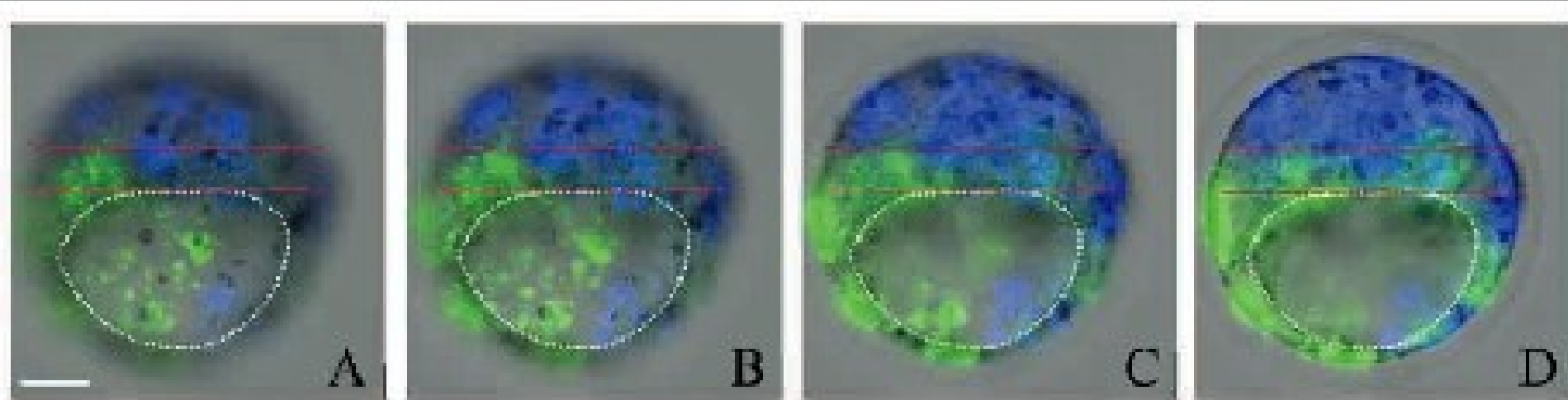
(B),(C),(E) και (F) Έμβρυα E 6.5 ή στα οποία μελετάται η κατανομή των απογόνων (σπλαχνικό ενδόδερμα) των κυττάρων που παρουσιάζονται στο (A) και (D). Τα βέλη δείχνουν τα όρια ανάμεσα στην εμβρυονική και αντεμβρυονική περιοχή.

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

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

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

# Καθορισμός αξόνων: Πώς δημιουργείται η ασυμμετρία στη βλαστοκύστη;



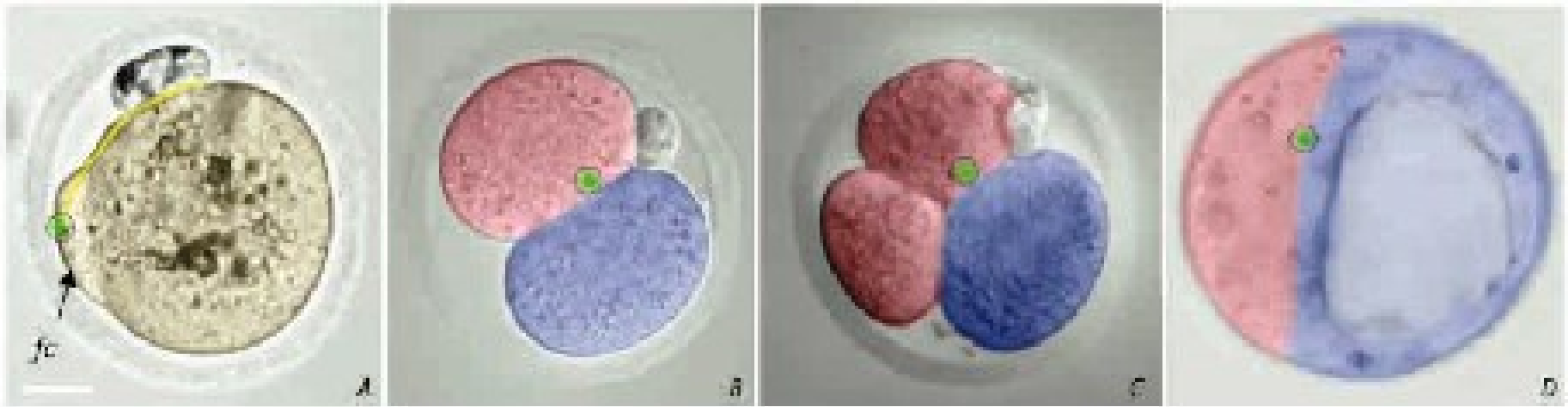
➤ Σήμανση των βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο κυττάρων, με δύο διαφορετικές χρωστικές.

➤ Ανάπτυξη εμβρύων σε βλαστοκύστεις.

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

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

# Καθορισμός αξόνων



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

➤ Πιο νωρίς = Επιβλάστη, πιο αργά = υποβλάστη

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

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

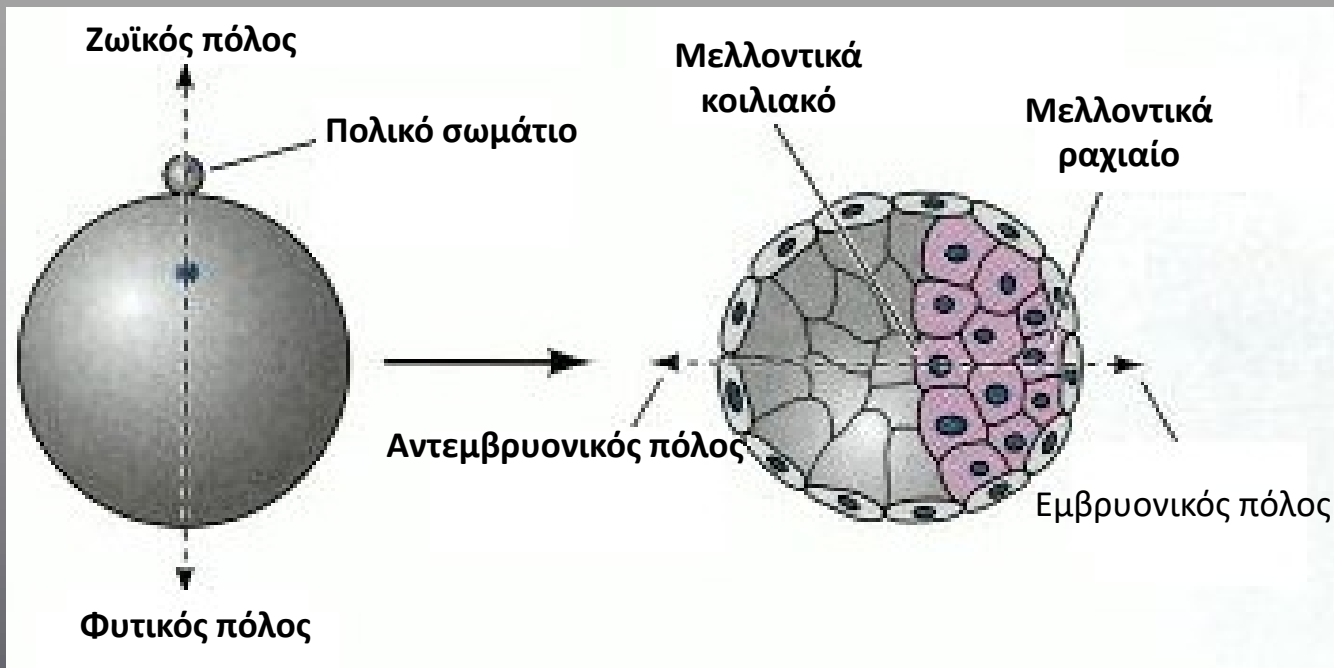
➤ Επανακαθορισμός όταν χωρίζονται τα βλαστομερίδια;

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

➤ Υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον που επανακαθορίζουν την πολικότητα;

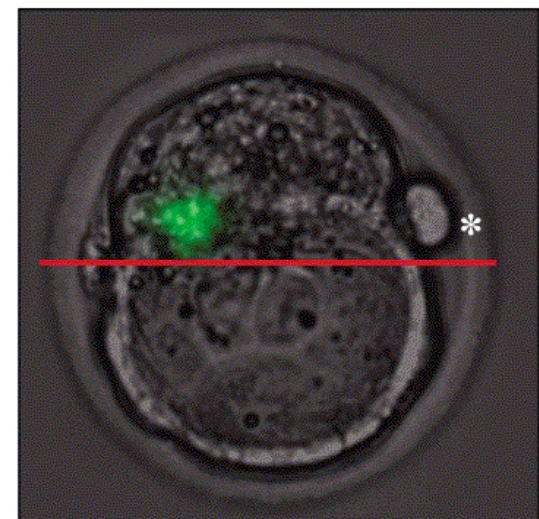
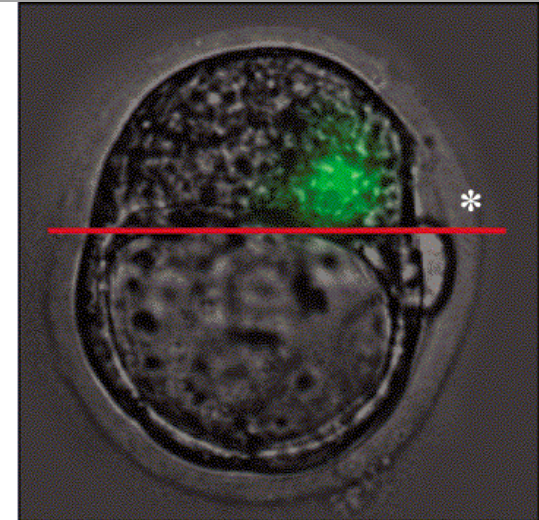
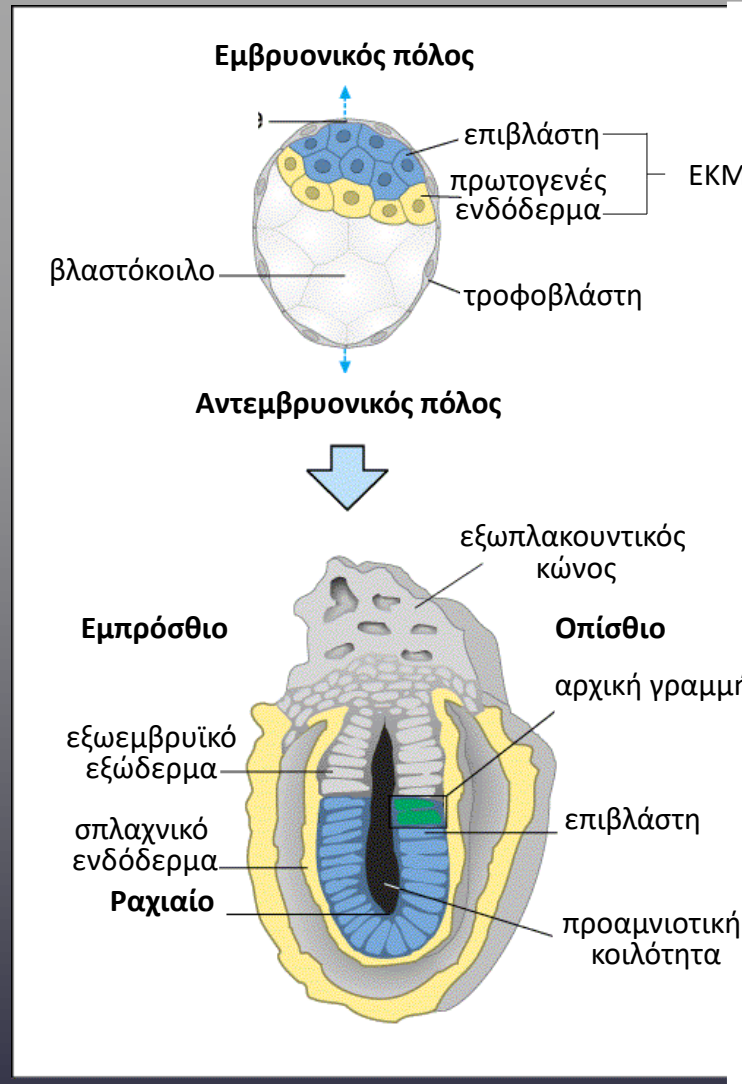


# Ο ραχιαίος- κοιλιακός άξονας



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

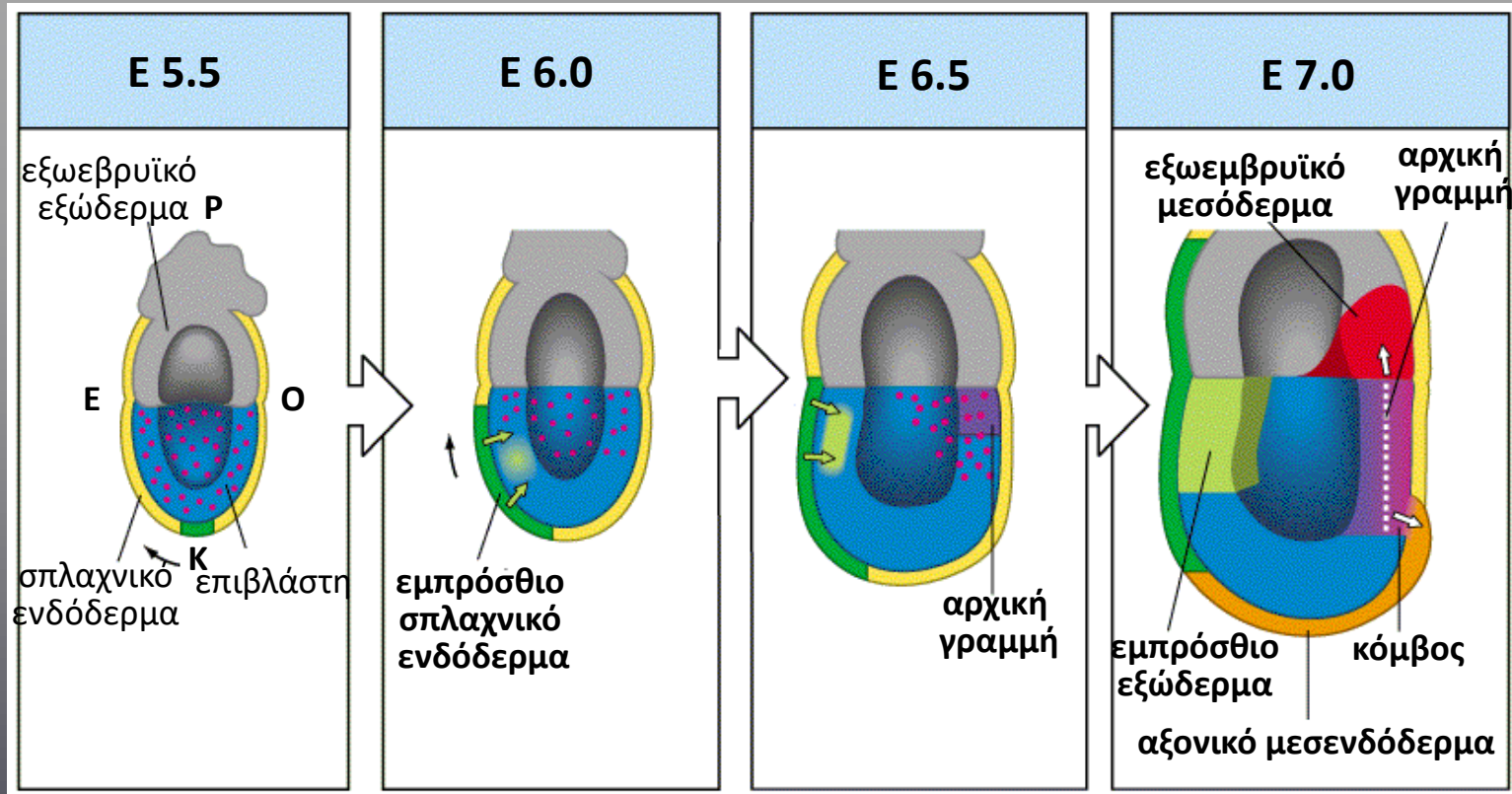
# Καθορισμός αξόνων



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

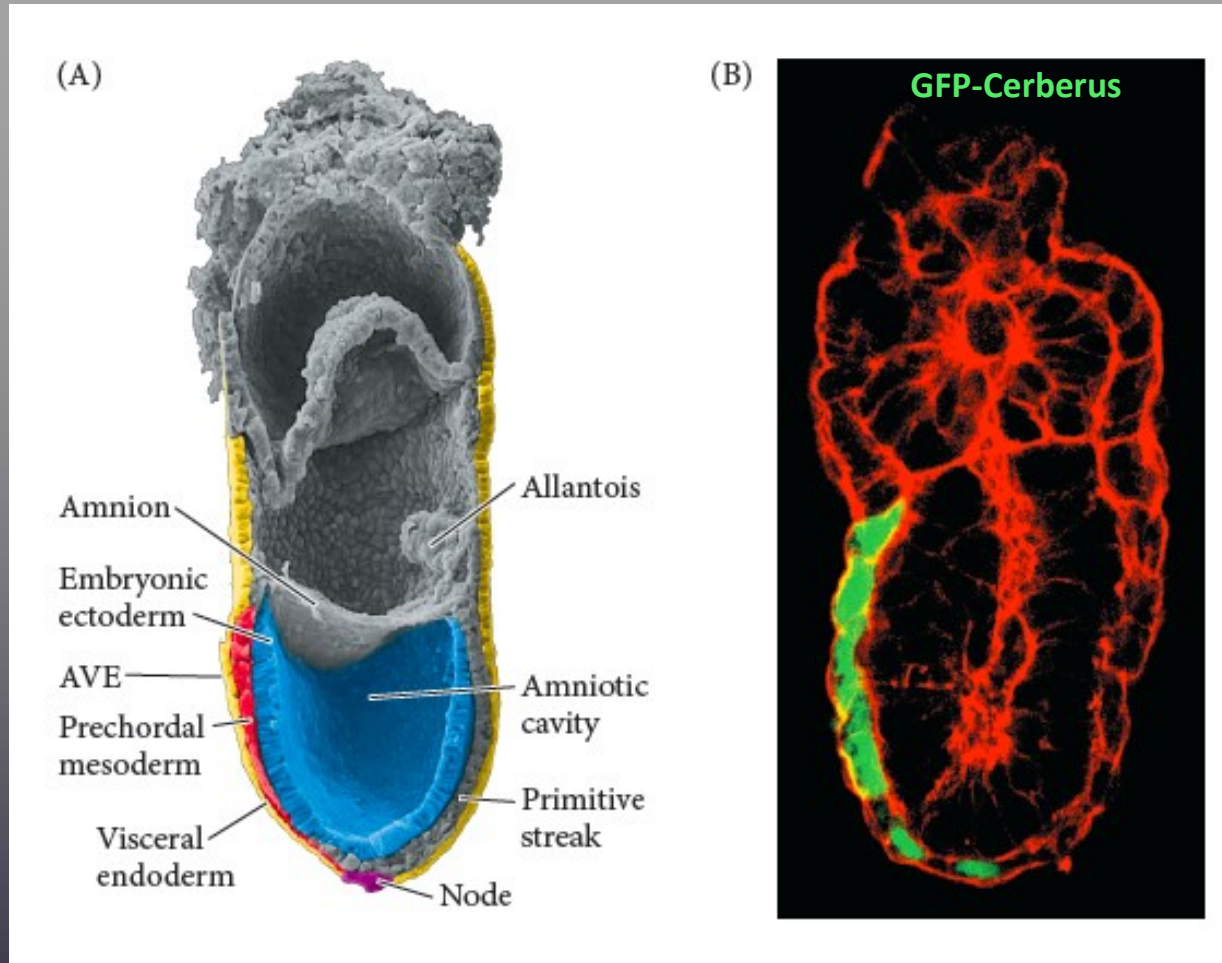


# Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



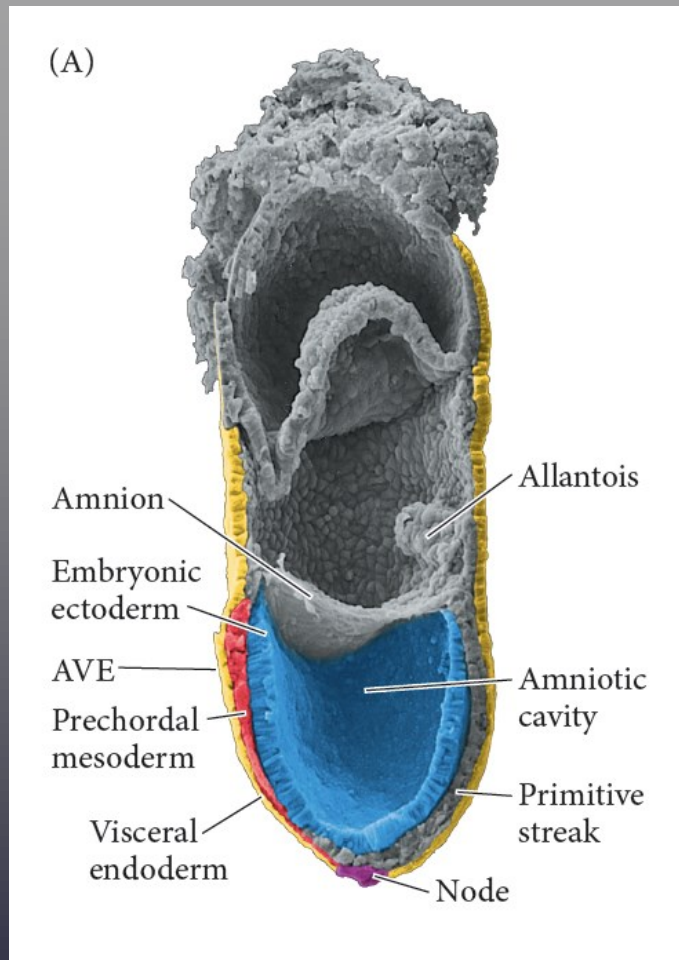
➤ Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο «κέντρα ελέγχου» : ο κόμβος (node) και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (anterior visceral endoderm). Ο κόμβος είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό του κορμού και συνεργάζεται με το AVE για το σχηματισμό του εμπρόσθιου τμήματος. Οι δύο αυτές περιοχές εκφράζουν ομόλογα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

# Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο κέντρα ελέγχου: ο κόμβος και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα.

# Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



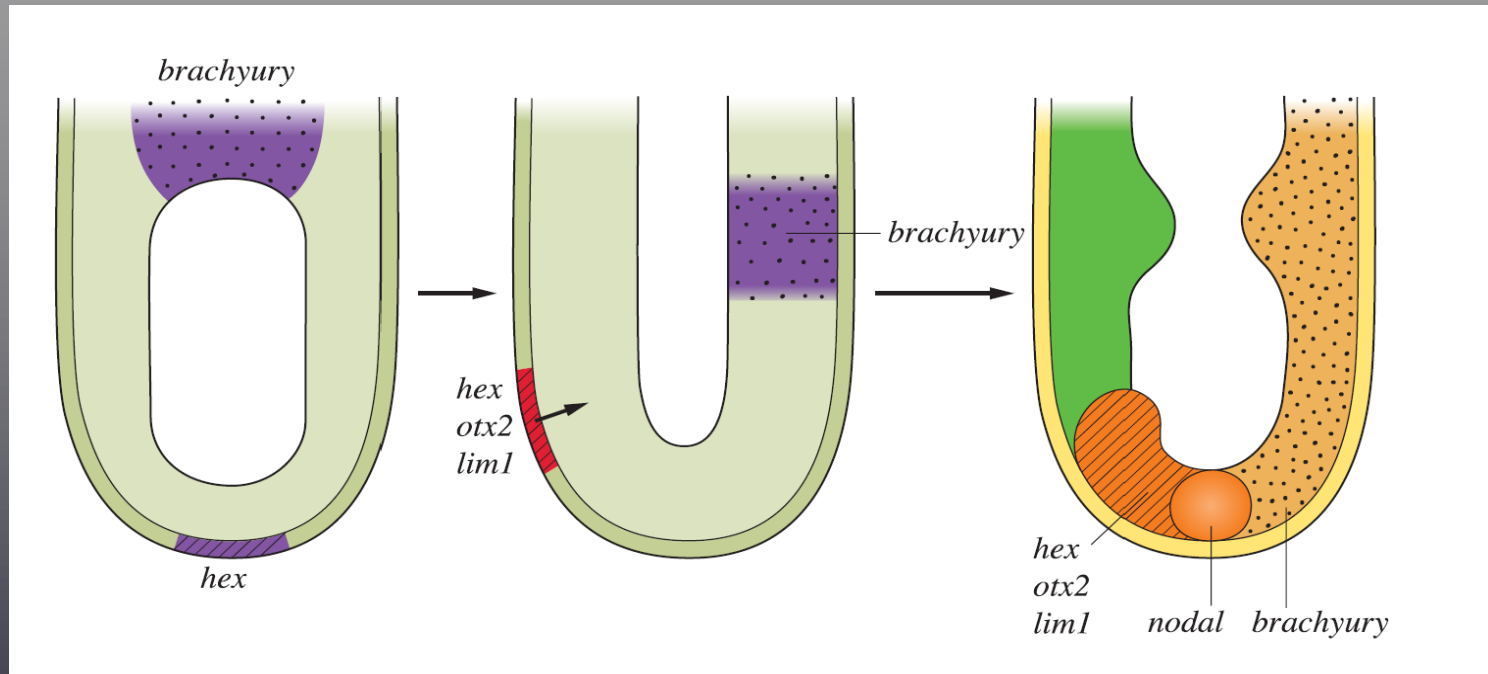
- BMP4 από το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα επάγει τα κύτταρα της επιβλάστης να παράγουν Wnt3a και Nodal.
- Το AVE παρεμποδίζει τη σηματοδότηση καθώς παράγει Cerberus, Lefty-1, Dickkopf, Cerberus  
Θυμηθείτε τι γίνεται στα αμφίβια!!!!
- Ο κόμβος (εμπρόσθιο τμήμα τη αρχικής γραμμής) παράγει Chordin, η νωτοχορδή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

# Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

ko nodal : αδυναμία σχηματισμού προτύπου

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

Ko smad2 : απουσία Ε/Ο προτύπου



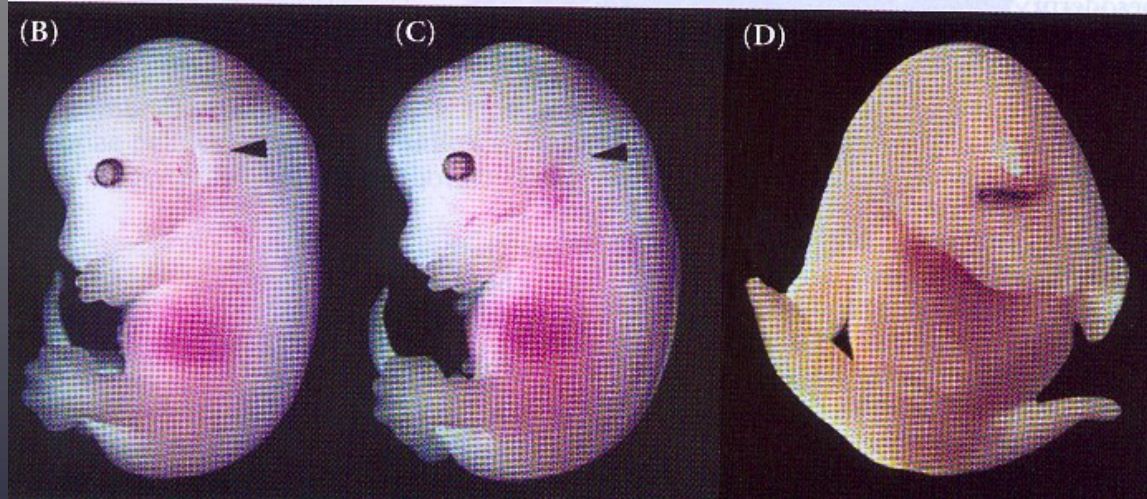
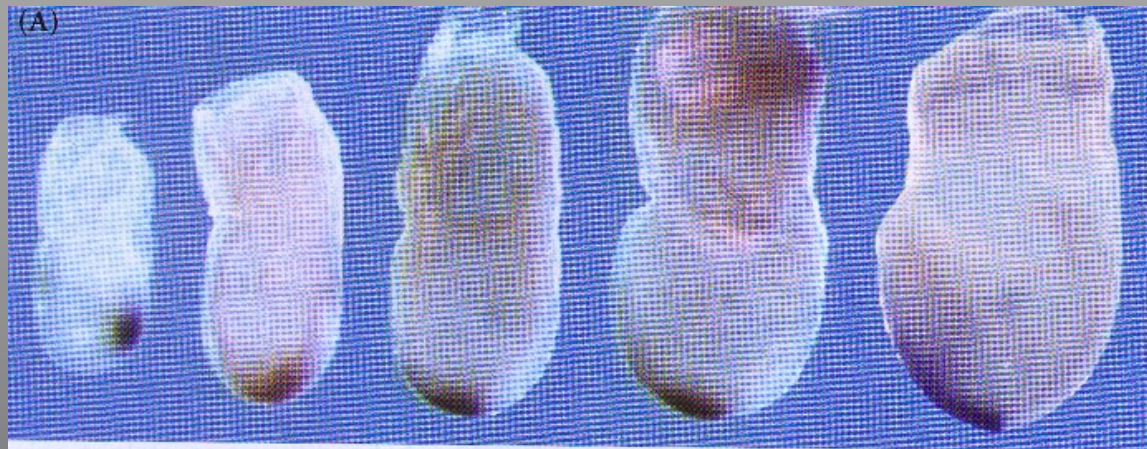
- Έκφραση hex (dickkopf, lefty, cerberus like) στο σπλαχνικό ενδόδερμα (περιφέρεια).
- Έκφραση του brachyury στο κεντρικό τμήμα της επιβλάστης.
- Η έκφραση των μορίων αυτών επάγεται από BMP4 που εκφράζεται από τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς

# Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και ο κόμβος

Knock out *noggin* και *chordin* (Εικ. Α).

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

Τι επάγει τον κόμβο και το AVE;



Bachiller et al. Nature, 403: 658-661

# Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα

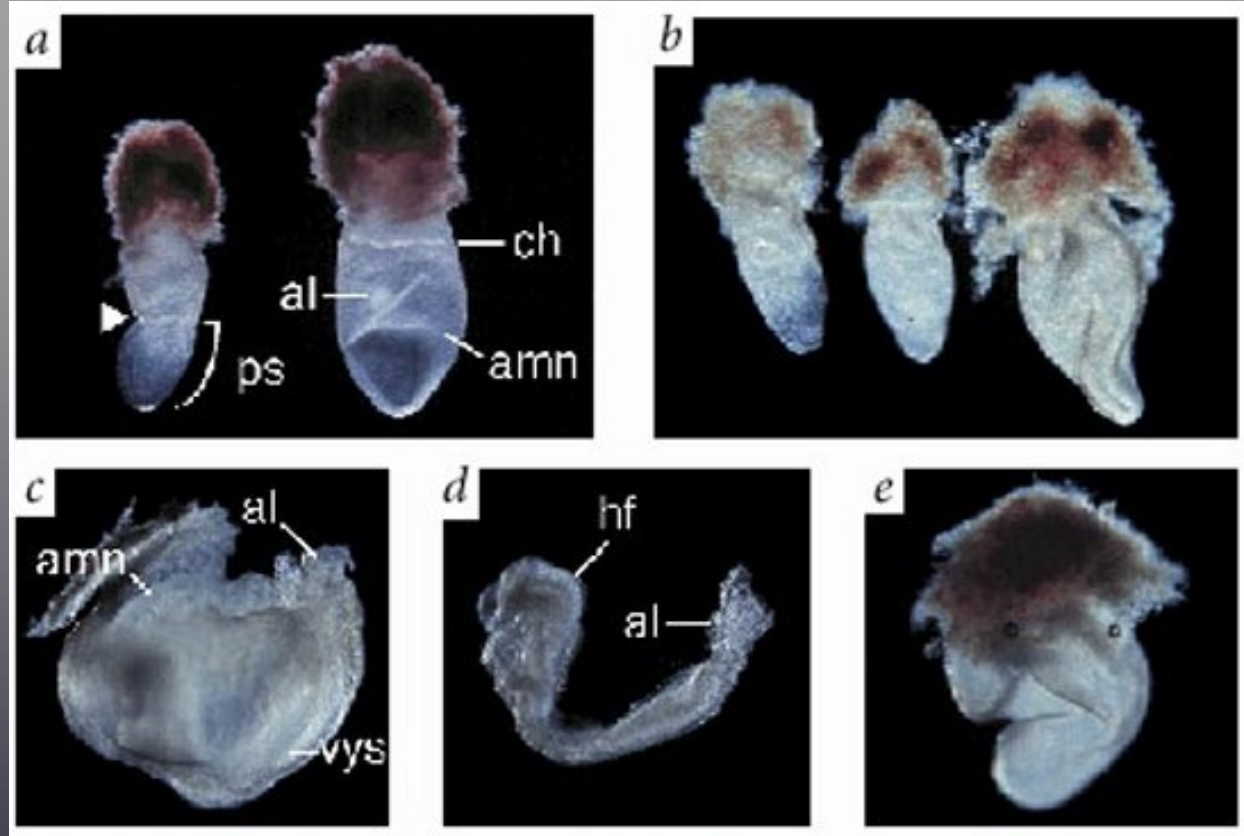
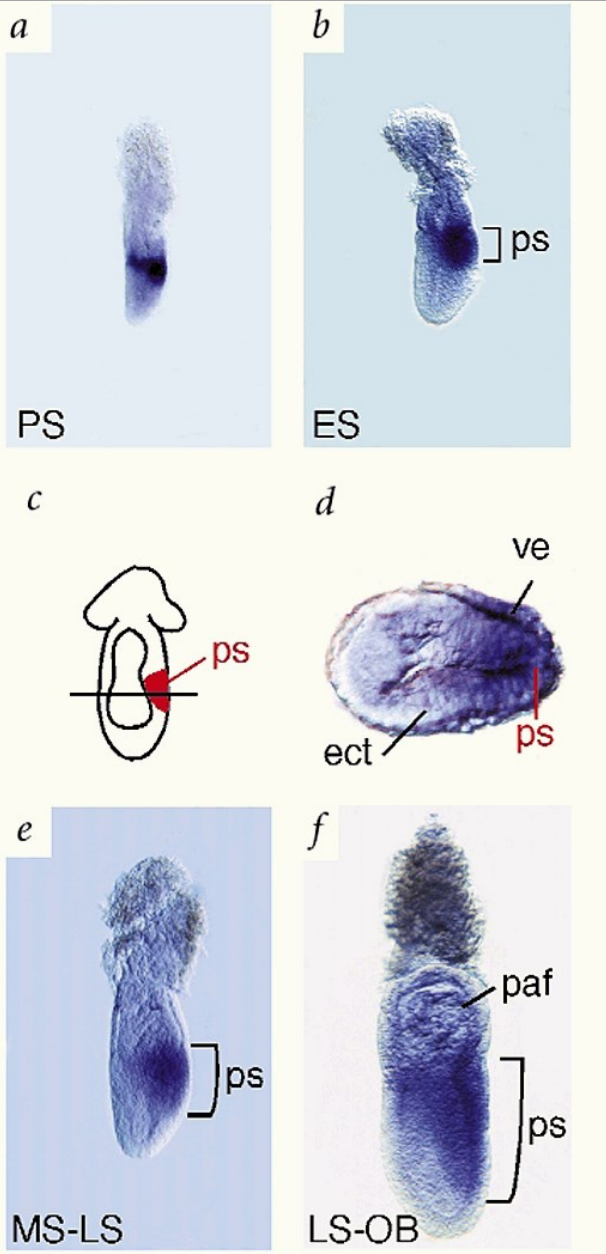
➤ Το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα σχηματίζεται στο εμπρόσθιο πάντα άκρο **πριν** από τον κόμβο, και η αρχική γραμμή δημιουργείται ακριβώς απέναντί του.

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



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

# Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



↗ *wnt3 ko*

↗ Η έκφραση του *wnt3*

# Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα

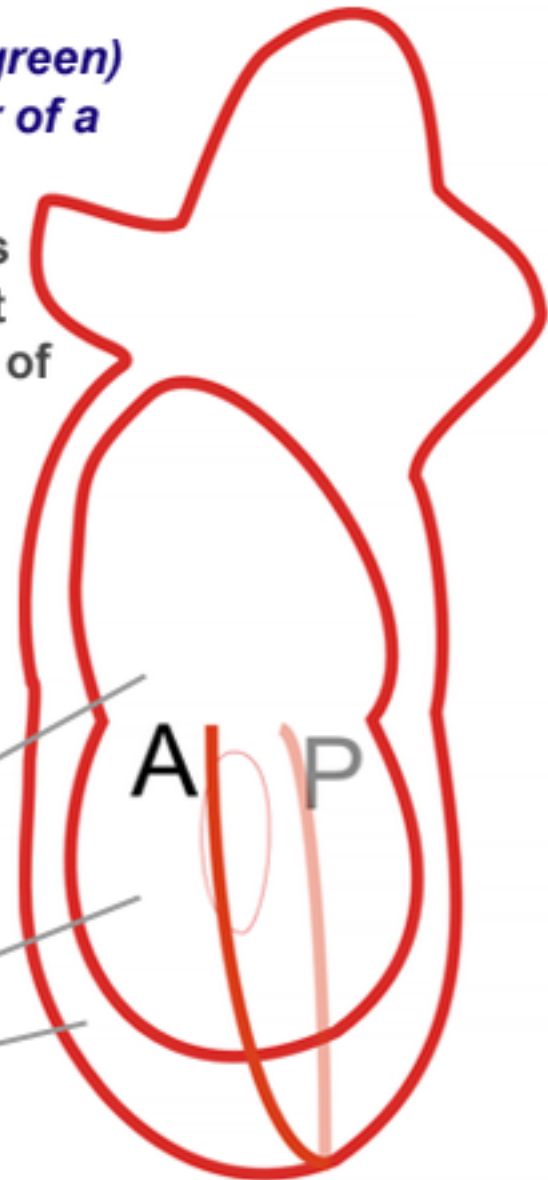
***Anterior visceral endoderm cells (in green) migrating to the presumptive anterior of a 5.5 dpc mouse embryo***

The following movie shows two views of the same embryo, with and without the brightfield image. The orientation of the embryo is as shown at right, with the presumptive anterior facing the viewer. AVE cells can be seen migrating from the distal tip, towards the presumptive anterior of the embryo.

Extraembryonic ectoderm

Epiblast (embryonic ectoderm)

Visceral endoderm

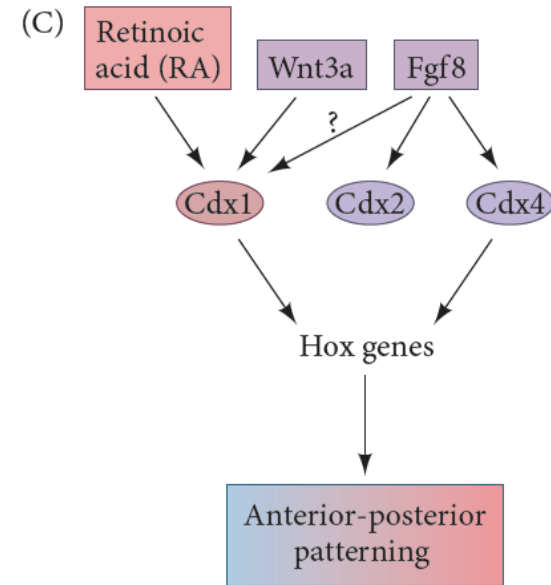
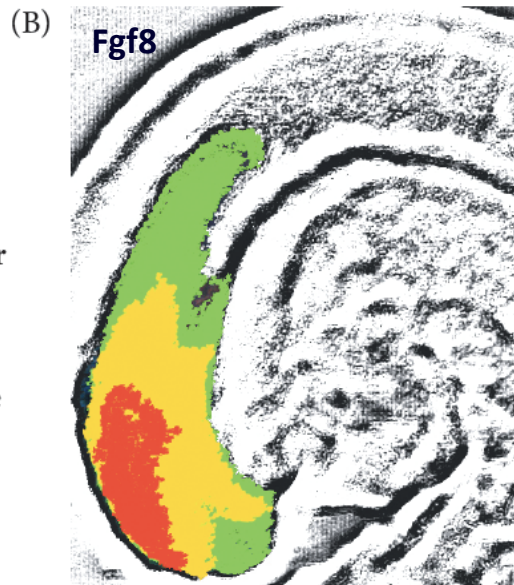
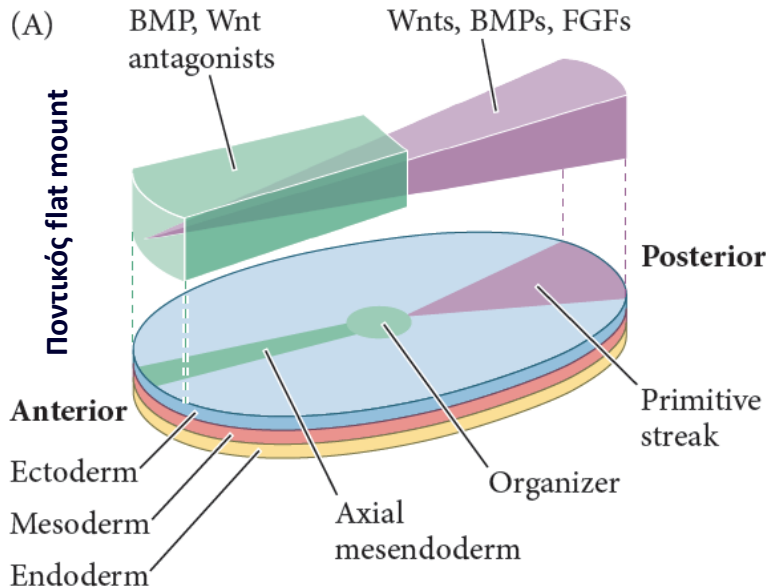




# Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

## ➤ Cdx-Hox

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



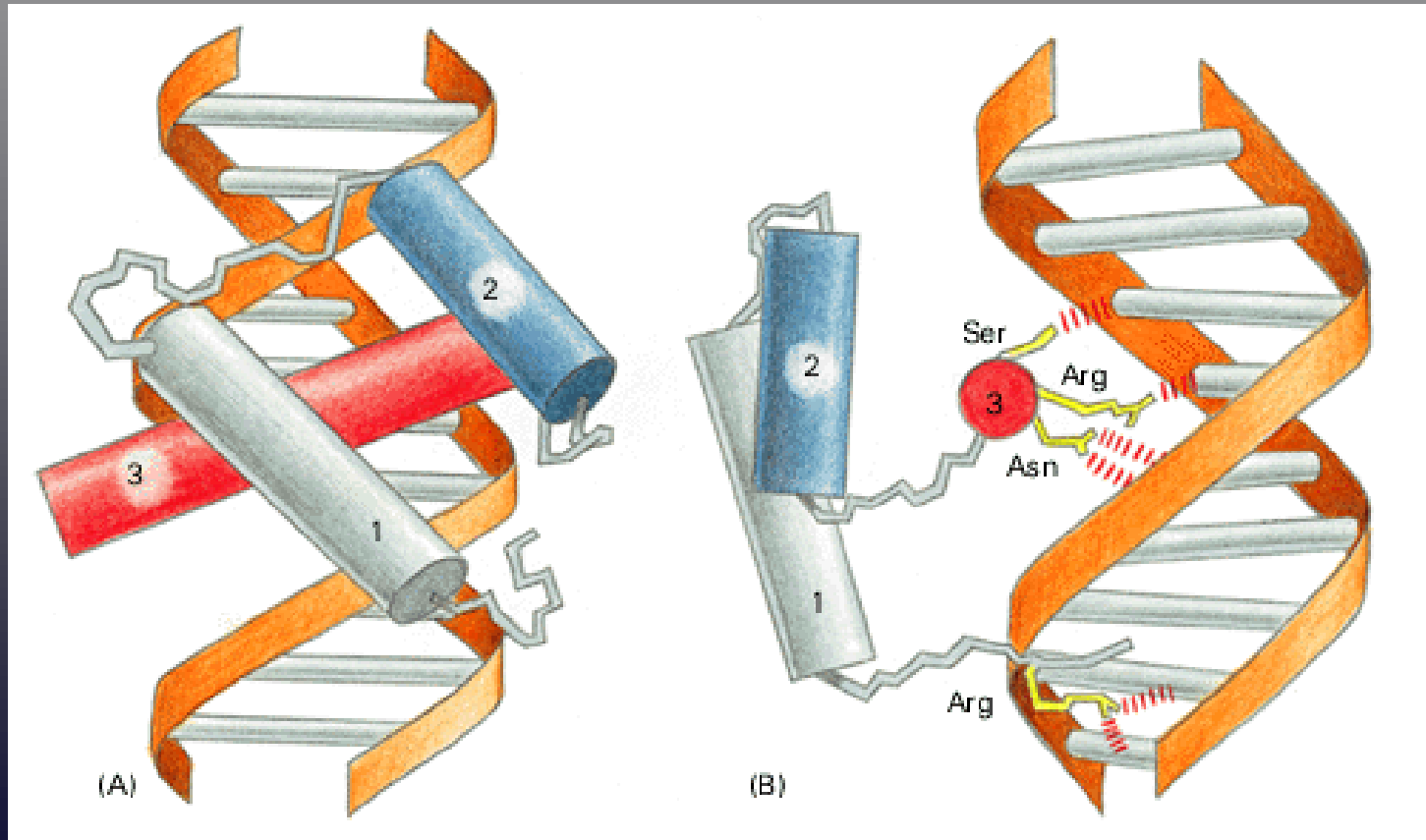
## Καθορισμός αξόνων : ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και τα γονίδια *Hox*

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

**Evo-Devo: εξέλιξη και ανάπτυξη**

# Τα γονίδια *Hox*

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

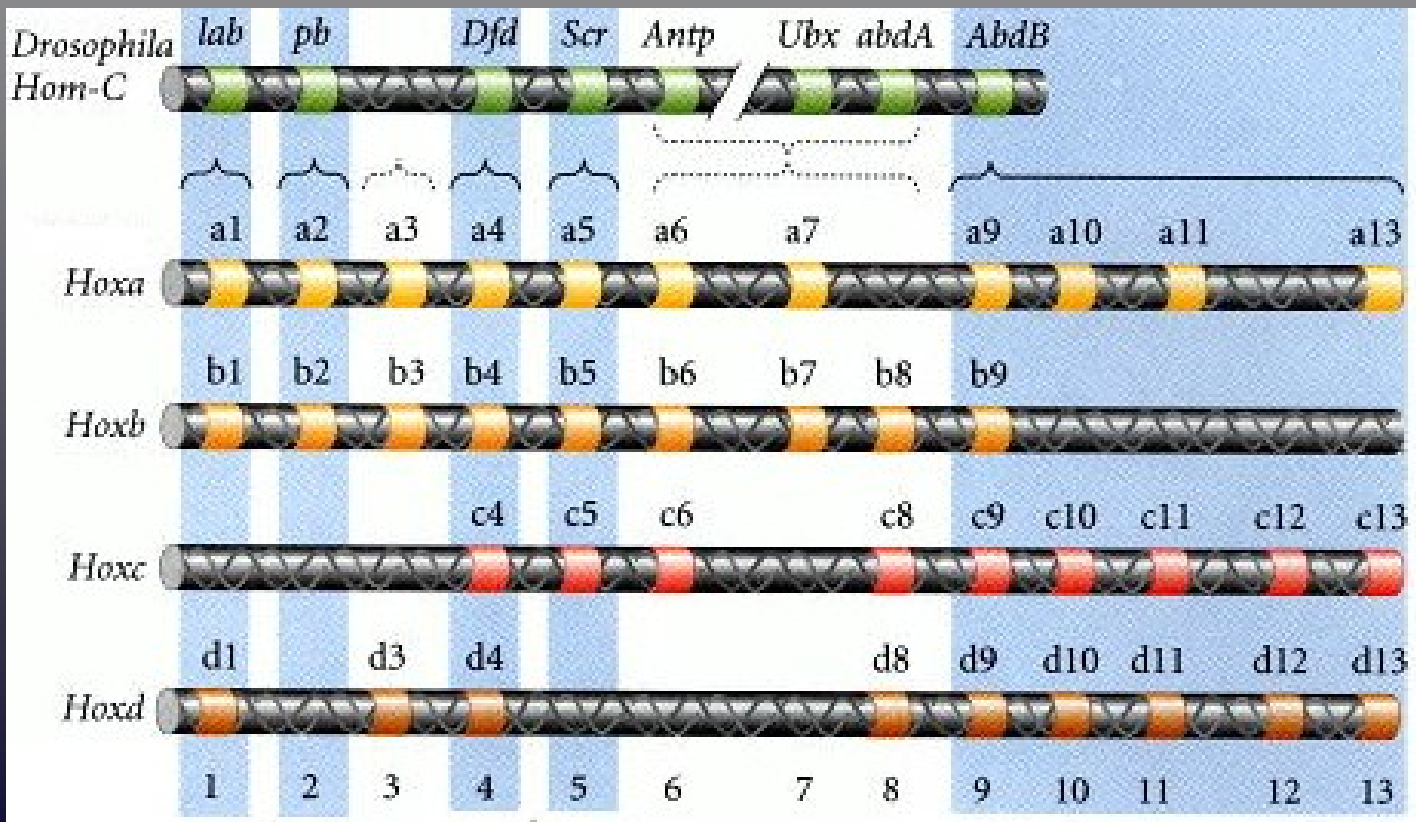


# Τα γονίδια *Hox*

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

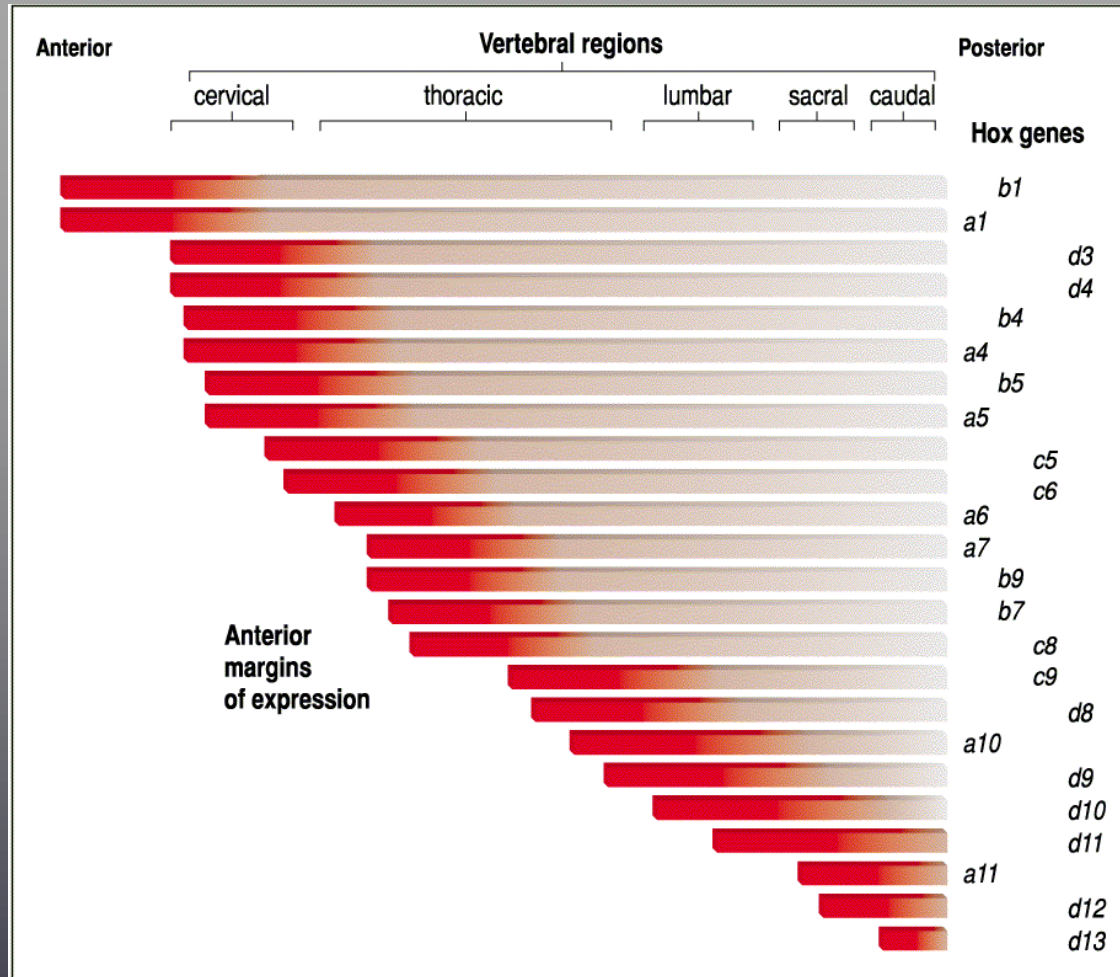
➤ Στον ποντικό (και στον άνθρωπο) υπάρχουν τέσσερα μη συνδεδεμένα συμπλέγματα που ονομάζονται *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* και *Hoxd* και εδράζονται στα χρωμοσώματα 6, 11, 15 και 2 αντίστοιχα.

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





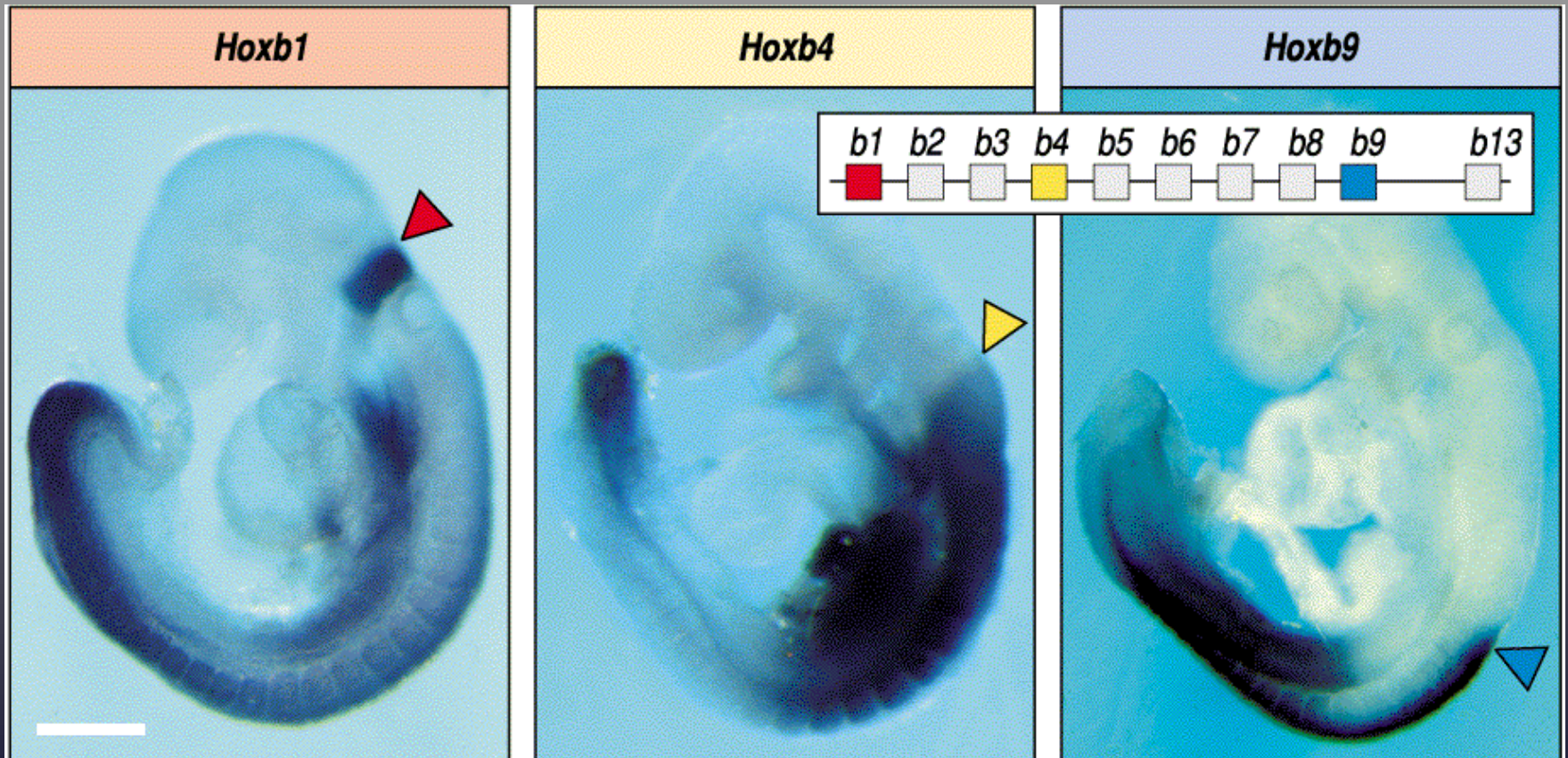
# Τα γονίδια *Hox* και τα πρότυπα έκφρασής τους



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

# Τα γονίδια *Hox*

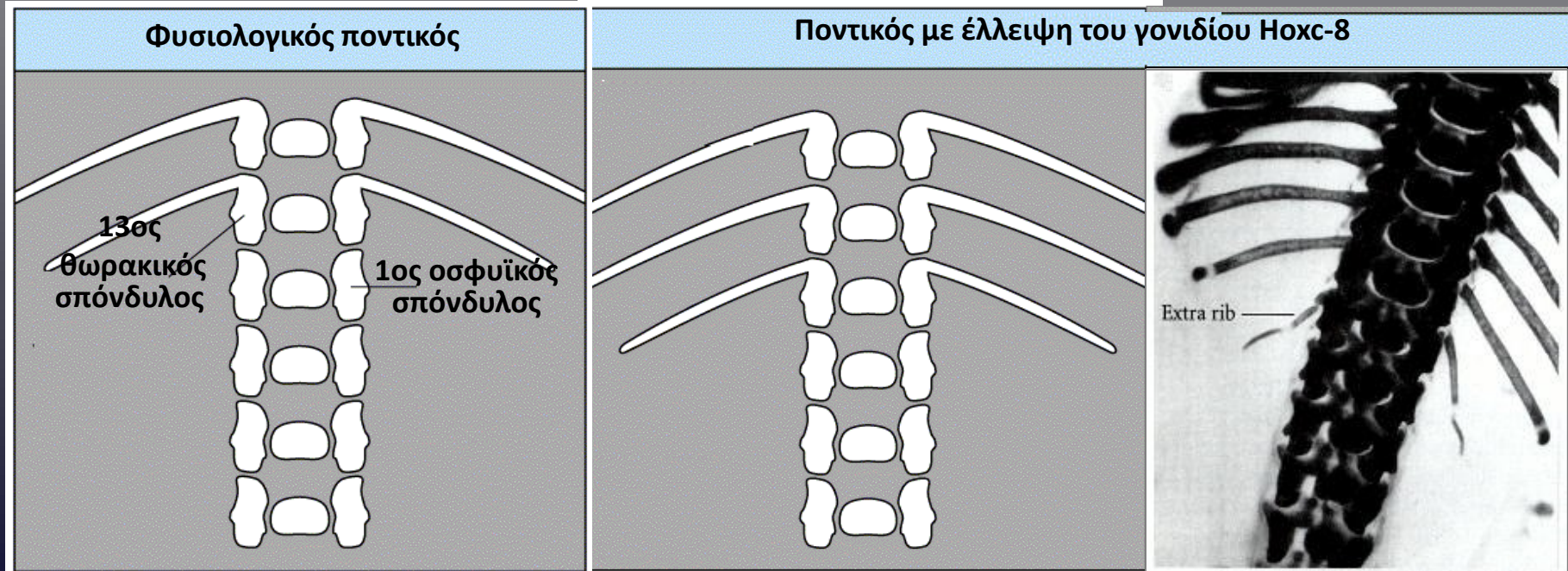
➤ Η έκφραση των γονιδίων *Hox* στα θηλαστικά ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τη *Drosophila*. Έτσι τα ομόλογα των των *labial*, *proboscipedia* και *deformed* εκφράζονται στο εμπρόσθιο τμήμα ενώ τα ομόλογα του *Abdominal-B* στο οπίσθιο.



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

# Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

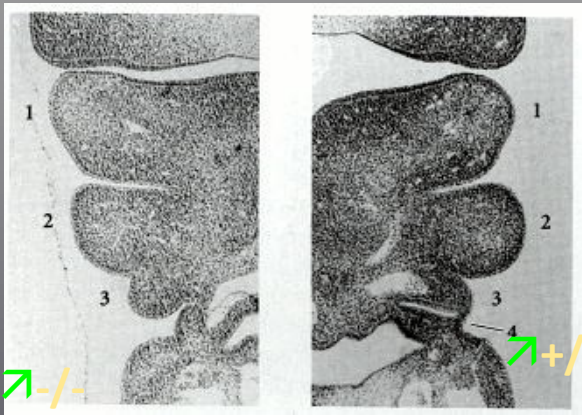
➤ Μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της ενεργότητας των γονιδίων *Hox* οδηγούν πολλές φορές σε ομοιωτικό μετασχηματισμό. Οι μεταλλάξεις αυτές ονομάζονται ομοιωτικές. Ο φαινότυπος εμφανίζεται στο εμπρόσθιο όριο της έκφρασής του γονιδίου και όργανα ή δομές μετασχηματίζονται σε αντίστοιχα όργανα ή δομές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





# Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

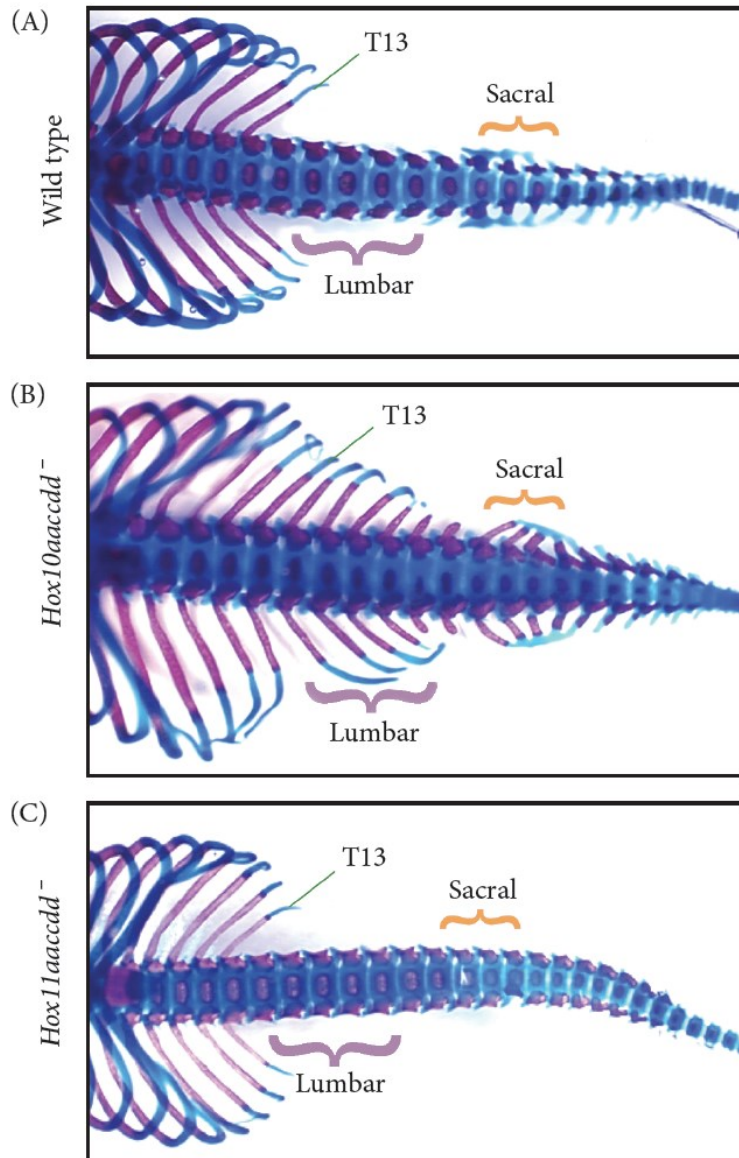
➤ Διαφορετικά γονίδια *Hox* είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό δομών και οργάνων κατά μήκος του Ε-Ο άξονα.



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

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

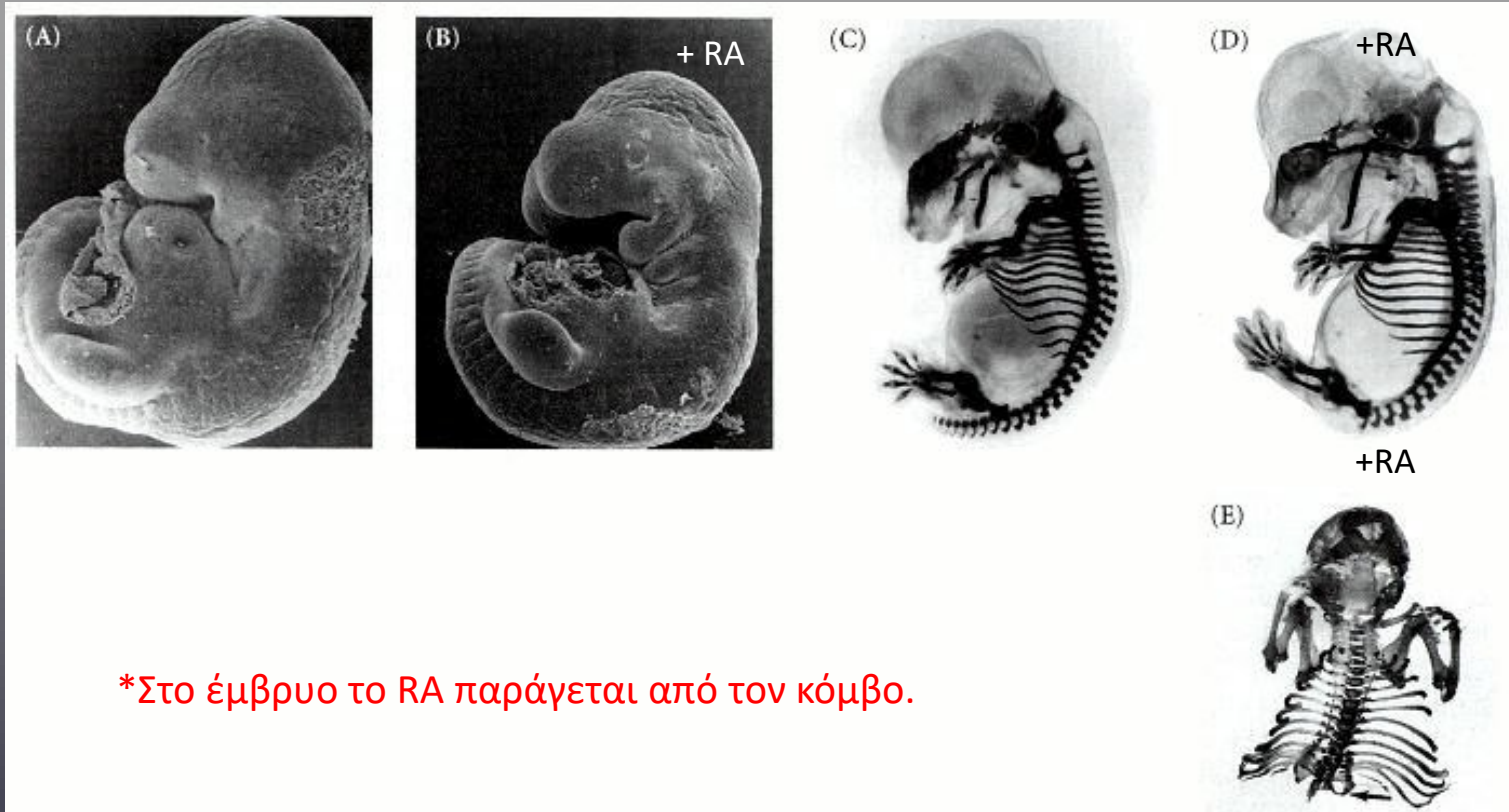
# Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*



Axial skeletons of mice in gene knockout experiments. Each photograph is of an 18.5 day embryo, looking upward at the ventral region from the middle of the thorax toward the tail. (A) Wild-type mouse. (B) Complete knockout of *Hox10* paralogues (*Hox10aacdd*) converts lumbar vertebrae (after the thirteenth thoracic vertebrae) into ribbed thoracic vertebrae. (C) Complete knockout of *Hox11* paralogues (*Hox11aacdd*) transforms the sacral vertebrae into copies of lumbar vertebrae. (Wellik and Capecchi 2003)

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

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



\* Στο έμβρυο το RA παράγεται από τον κόμβο.

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

