

Η πρώιμη ανάπτυξη του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*

1.1.	Εισαγωγή.	1
1.2.	Ανατομία του ενήλικου	2
1.3	Η εμβρυϊκή ανάπτυξη.	4
1.4	Η εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα.....	6
1.5	Τα γονίδια par.	8
1.6	Μικροϊνίδια, μικροσωληνίσκοι και εμπροσθοπίσθιος άξονας.....	9
1.7	Πολιότητα και σχηματισμός της ατράκτου κατά την πρώτη διαίρεση.....	10
1.8	Εξειδίκευση των βλαστομεριδίων κατά την αυλάκωση.....	12
1.8.1.	Αυτόνομη εξειδίκευση στη γενεαλογία του P1.....	12
1.8.2.	Κατά συνθήκη εξειδίκευση βλαστομεριδίων.....	16
1.8.3.	Το μονοπάτι Wnt και η εξειδίκευση του EMS.....	16
1.8.3.	Το μονοπάτι Notch και η εξειδίκευση του ABp.....	20
1.9	Ρύθμιση της έκφρασης κατά την πρώιμη ανάπτυξη του <i>C. elegans</i>	21
1.10	Η διαφοροποίηση του φάρυγγα: από τα γονίδια μητρικής επίδρασης στα ζυγωτικά.....	24
1.11	Ετεροχρονικά γονίδια.....	26
1.11.1.	Τα γονίδια lin-14 και lin-4.	
1.12	Βιβλιογραφία.	29



Η πρώιμη ανάπτυξη του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*

1.1. Εισαγωγή

Στα μέσα της δεκαετίας του '60 ο Sydney Brenner άρχισε να ψάχνει για έναν απλό οργανισμό στον οποίο θα μπορούσε να μελετήσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη χρησιμοποιώντας γενετικές και μοριακές μεθόδους. Κατέληξε στο νηματώδη του εδάφους *Caenorhabditis elegans* (**Εικόνα 1.1**) για τον οποίο οι εμβρυολόγοι Goldschmidt και Boveri είχαν δείξει ότι περιέχει μικρό αριθμό χρωμοσωμάτων (5 ζεύγη αυτοσωμικών και το φυλετικό XX) και αποτελείται από λίγα κύτταρα τα οποία προκύπτουν μέσω αμετάβλητων κυτταρικών γενεαλογιών.

Ο *Caenorhabditis elegans* είναι ένας μικρός νηματώδης σκώληκας (μήκους 1mm), αποτελείται από 959 σωματικά κύτταρα, των οποίων η γενεαλογία έχει μελετηθεί με απευθείας παρατήρηση στο μικροσκόπιο δεδομένου ότι η επιδερμίδα του ζώου είναι διαφανής. Επιπλέον, τα κύτταρα του οργανισμού αυτού προκύπτουν μέσω κυτταρικών γενεαλογιών που είναι χαρακτηρισμένες και αμετάβλητες από άτομο σε άτομο. Τα περισσότερα άτομα είναι ερμαφρόδιτα αλλά υπάρχουν (σπάνια) και αρσενικά ζώα (**Εικόνα 1.2**). Η αναπαραγωγή γίνεται είτε με αυτογονιμοποίηση είτε με ζευγάρισμα μεταξύ ενός ερμαφρόδιτου και ενός αρσενικού ζώου.

Ο *Caenorhabditis elegans* αναπτύσσεται εύκολα στο εργαστήριο σε τρυβλία με άγαρ και τρέφεται με βακτήρια. Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.3**. Την εμβρυογένεση που ολοκληρώνεται σε 15h στους 20 °C ακολουθούν τέσσερα στάδια προνύμφης (L1-L4) μέχρι την ωρίμανση του ενηλίκου ατόμου, που απαιτεί 50 ακόμα ώρες.

Ο *C. elegans* έχει σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων (για πολυκύτταρος οργανισμός) και η πρωτοταγής αλληλουχία του γονιδιώματός του είναι γνωστή (ο πρώτος πολυκύτταρος οργανισμός του οποίου η πρωτοταγής αλληλουχία έγινε γνωστή- **Εικόνα 1.4**) Το γονιδιώμά του περιλαμβάνει περίπου 19000 γονίδια. Από τα γονίδια αυτά περίπου 200 ενέχονται στην ανάπτυξη του ζώου. Πολλά από τα γονίδια αυτά είναι ομόλογα γονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί σε άλλα ασπόνδυλα ή σε σπονδυλόζωα (*Hox*, γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του Wnt, TGF-β και Notch κ.α.).

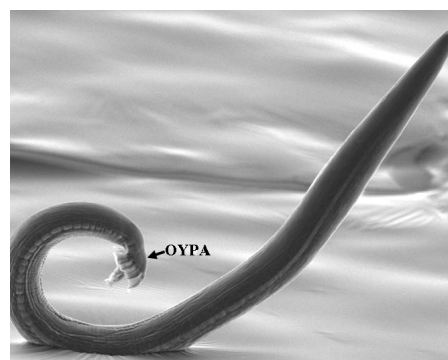
Εκτός από τα παραπάνω πλεονεκτήματα ο *C. elegans* διαθέτει ένα ακόμα: προσφέρεται ιδιαίτερα για γενετική ανάλυση. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε έναν από τους βασικούς λόγους για τους οποίους ο οργανισμός αυτός επιλέχθηκε από τον Brenner. Επειδή τα ερμαφρόδιτα άτομα αναπαράγονται με αυτογονιμοποίηση, στα πειράματα μεταλλαγμένης, τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα διαχω-



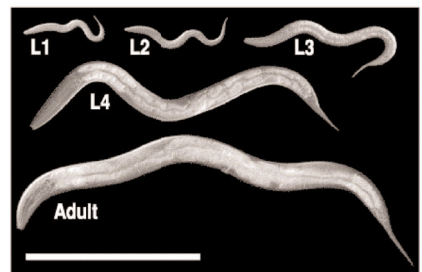
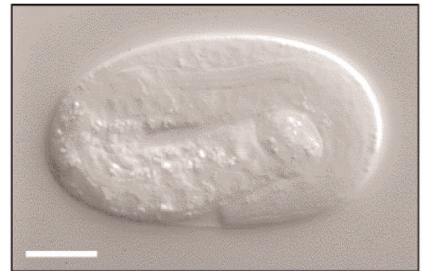
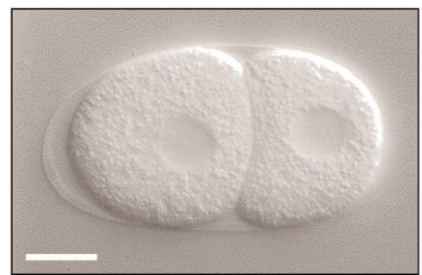
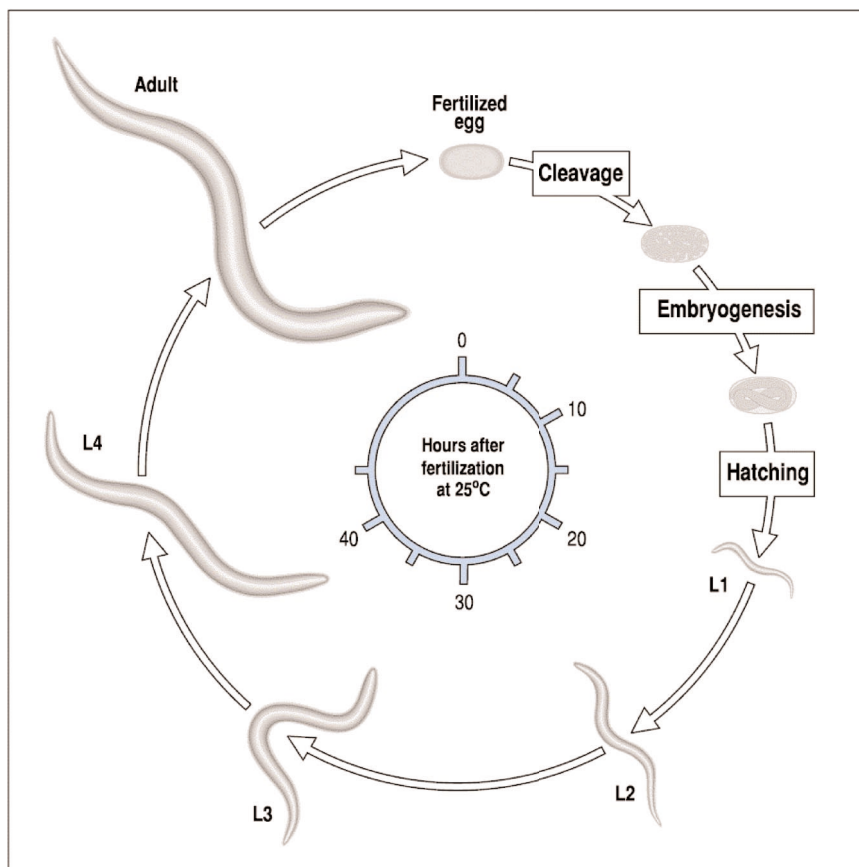
Εικόνα 1.1: Ο νηματώδης *C.elegans* (ερμαφρόδιτο άτομο).

Από την ιστοσελίδα:

<http://www.wormatlas.org/handbook/bodyshape.htm>

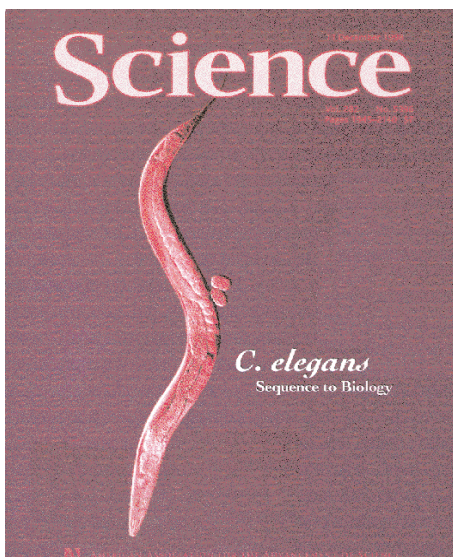


Εικόνα 1.2: Αρσενικό άτομο *C.elegans*. Τα αρσενικά άτομα αποτελούνται από 1031 κύτταρα. Προκύπτουν από την τυχαία απώλεια ενός εκ των δύο X χρωμοσωμάτων (στη φύση εμφανίζονται με συχνότητα 1:700). Στην ουρά διακρίνονται χαρακτηριστικά εξαρτήματα (βέλος) που χρησιμοποιούνται κατά το ζευγάρισμα για τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων στο ερμαφρόδιτο άτομο. Από την ιστοσελίδα: <http://www.wormatlas.org/handbook/bodyshape.htm>



Εικόνα 1.3: Ο κύκλος ζωής του *C.elegans*. Στις φωτογραφίες παρουσιάζονται ένα έμβryo στο στάδιο των δύο κυττάρων (επάνω), ένα έμβryo μετά τη γαστριδίωση (στη μέση) και οι προνύμφες των τεσσάρων σταδίων συγκριτικά με ένα ενήλικο άτομο (κάτω). Ράβδος κλίμακας: 10μM (επάνω και στη μέση) και 5μM (κάτω). Από το βιβλίο *Principles of Development*.

ρίζονται μετά από δύο γενιές αυτόματα, χωρίς να απαιτούνται διασταυρώσεις (**Εικόνα 1.5**). Η ευκολία αυτή οδήγησε στη δημιουργία μεγάλου αριθμού μεταλλαγμάτων τα οποία αναλύθηκαν με γενετικές μεθόδους με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση μονοπατιών που ενέχονται σε μια σειρά διαδικασιών όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός θάνατος, κ.α. Ο χαρακτηρισμός των στοιχείων τα οποία συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά διευκολύνθηκε ιδιαίτερα με την ανάλυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *C. elegans* έτσι σήμερα πολλοί από τους μηχανισμούς που ενέχονται στις παραπάνω διαδικασίες είναι γνωστοί σε βάθος.



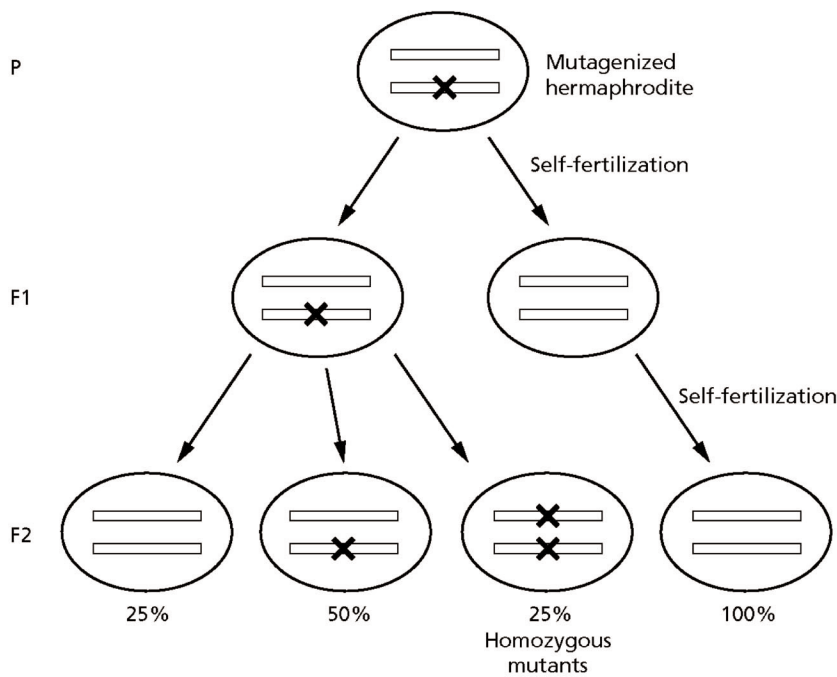
Εικόνα 1.4: Το τεύχος του περιοδικού *Science* στο οποίο δημοσιεύτηκε η αλληλουχία του *C.elegans* (*Science*, **282**: 1945-2140, 1998).

Σημείωση: Σε όλες τις εικόνες ή τις φωτογραφίες τα έμβρυα είναι προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο τμήμα αριστερά και το ραχιαίο τμήμα επάνω. Εξάιρεση αποτελεί η Εικ 1.10.

1.2 Ανατομία του ενήλικου

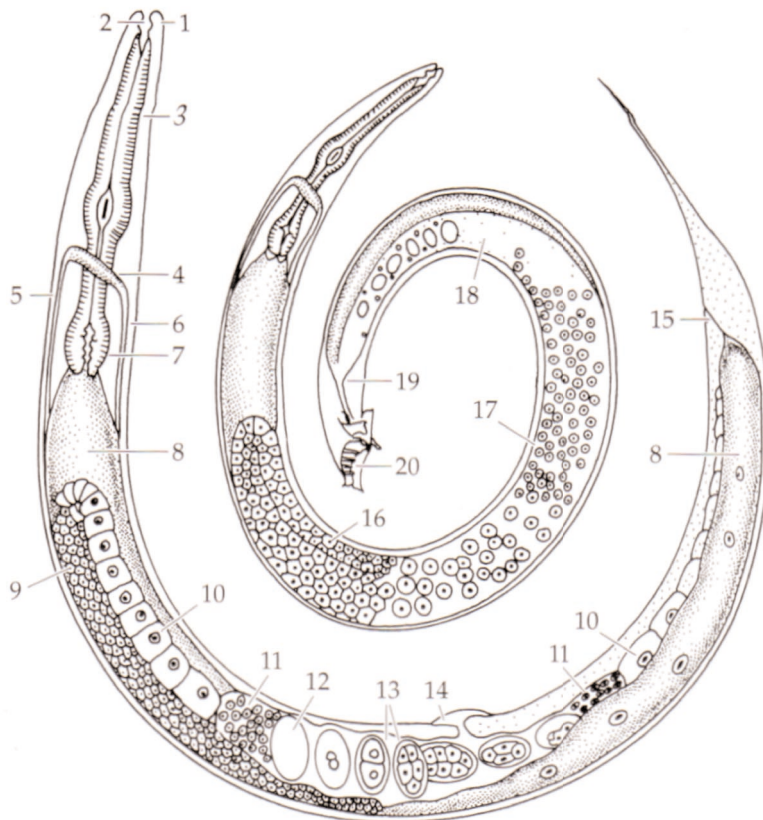
Η ανατομία του του *C. elegans* είναι απλή (**Εικόνα 1.6**). Το ζώο καλύπτεται από ένα περίβλημα (επιδερμίδα) το οποίο εκκρίνεται από την υποδερμίδα, που έχει πάχος ενός μόνον κυττάρου. Κάτω από την υποδερμίδα υπάρχουν τέσσερις επιμήκεις ζώνες μονοκύτταρων μυϊκών κυττάρων (συνολικά 81 κύτταρα) τα οποία υποστηρίζουν τον υδροστατικό σκελετό που στηρίζει το ζώο. Το πεπτικό σύστημα είναι απλό- αποτελείται από τον μυώδη φάρυγγα και το έντερο. Το νευρικό σύστημα περιλαμβάνει περίπου 300 κύτταρα που σχηματίζουν το νευρικό δακτύλιο ο οποίος περιβάλλει το φάρυγγα, το κοιλιακό και ραχιαίο σχοινί καθώς και τα ουραία γάγγλια.

Παρόλο που τα περισσότερα άτομα του *C. elegans* είναι ερμαφρόδιτα περιστασιακά εμφανίζονται και αρσενικά άτομα (αποτελούνται από 1031 κύτταρα) που διαφέρουν μορφολογικά κυρίως στην ουρά, στην οποία αναπτύσσονται εξαρτήματα τα οποία είναι απαραί-



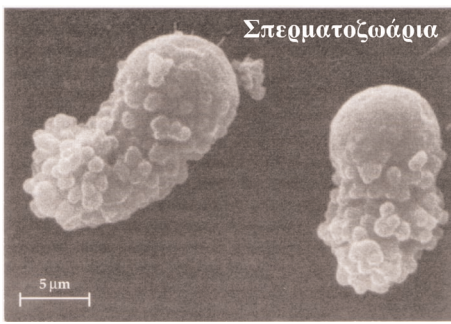
Εικόνα 1.5.: Σχηματική απεικόνιση του αυτόματου διαχωρισμού των υπολειπόμενων αλληλομόρφων (X) μετά από δύο γενιές. Από το βιβλίο *Essential Developmental Biology*.

τητα για το ζευγάρι (Εικ.1.2). Τα αρσενικά άτομα δημιουργούνται αυθόρμητα στην περίπτωση που κατά τη μείωση χαθεί ένα από τα δύο XX χρωμοσώματα. Τα σπερματοζώαρια που παράγονται από τα αρσενικά άτομα είναι πολύ περισσότερα από αυτά που παράγονται από τα ερμαφρόδιτα -έτσι σε περίπτωση διασταύρωσης αρσενικού με ερμαφρόδιτο ζώο η συμβολή των σπερματοζωαρίων του ερμαφρόδιτου είναι πρακτικά ανύπαρκτη.



Εικόνα 1.6.: Σχηματική απεικόνιση ερμαφρόδιτου και αρσενικού *C. elegans*. Εξωτερικά παρουσιάζεται το ερμαφρόδιτο άτομο. Στο αρσενικό άτομο σημειώνονται μόνο οι δομές του αναπαραγωγικού συστήματος. 1: ένα από τα έξι χείλη, 2: στόμα, 3: φάρυγγας, 4:νευρικός δακτύλιος, 5: ραχιαίο νευρικό σχοινί, 6: κοιλιακό νευρικό σχοινί, 7: οπίσθιος φάρυγγας, 8: έντερο, 9: ωογόνια, 10: ωοκύτταρα, 11: σπερματοζώαρια, 12: άρτι γονιμοποιημένα ωάρια, 13: πρώιμα αυλακωτικά στάδια, 14: γεννητικός πόρος, 15: προκτός, 16: σπερματογόνια 17: σπερματοζώαρια, 18: σπερματικός αγωγός, 19: αμάρα, 20: θύλακος ζευγαρώματος. Από το βιβλίο *Embryology*.

1.3. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη



Εικόνα 1.7.: Σπερματοζωάρια του *C. elegans*. Διακρίνονται τα ψευδοπόδια. Από το βιβλίο *Embryology*.

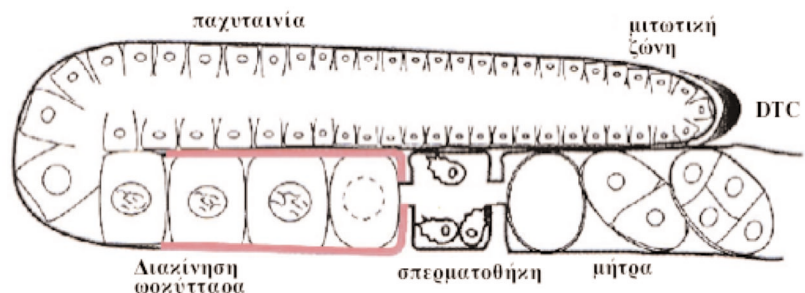
Το μεγαλύτερο τμήμα του εσωτερικού του σώματος του *C. elegans* καταλαμβάνει η γονάδα η οποία αποτελείται από δυο λοβούς καθώς και τον γεννητικό πόρο από τον οποίο διέρχονται, μετά τη γονιμοποίηση, κατά τη γέννηση στο στάδιο της αυλάκωσης, τα έμβρυα (**Εικόνα 1.7**). Στο εσωτερικό της γονάδας τα κύτταρα που βρίσκονται πλησιέστερα στο γεννητικό πόρο ωριμάζουν σε αρσενικούς γαμέτες οι οποίοι στερούνται μαστιγίου, κινούνται αμοιβαδοειδώς σχηματίζοντας ψευδοπόδια και αποθηκεύονται στη σπερματοθήκη (**Εικόνα 1.8**, 1.7). Τα κύτταρα που βρίσκονται μακριά από το γεννητικό πόρο διαιρούνται συνεχώς σχηματίζοντας ένα συγκύτιο (Εικ.1.8). Τα ωκύτταρα είναι μικρά με διάμετρο περίπου 50nm και προκύπτουν μετά από τη δημιουργία κυτταρικών μεμβρανών στο συγκύτιο. Τα ωκύτταρα του *C. elegans* βρίσκονται σταματημένα στην πρώτη μειωτική διαίρεση.

Παρουσία σπερματοζωαρίων τα ωκύτταρα προωθούνται ένα-ένα στη σπερματοθήκη όπου λαμβάνει χώρα η γονιμοποίηση. Τα σπερματοζωάρια εγκολπώνονται στο άκρο του ωκυττάρου καθώς αυτό εισέρχεται στη σπερματοθήκη (**Εικόνα 1.9**). Η είσοδος του σπερματοζωαρίου ευθύνεται για την ενεργοποίηση του ωκυττάρου, την ολοκλήρωση της πρώτης και δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, τη δημιουργία του κελύφους που περιβάλλει το έμβρυο και την εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Τα πολικά σωματίδια σχηματίζονται στο άκρο του αυγού που βρίσκεται απέναντι από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου (Εικ.1.9). Επιπλέον η γονιμοποίηση αποτελεί το έναυσμα για να ξεκινήσει η αυλάκωση. Καθώς αυλακώνονται, τα έμβρυα κινούνται στη μήτρα και τελικά γεννιούνται από τον γεννητικό πόρο στο τέλος της αυλάκωσης.

Το ζυγωτό (P0) του *C. elegans* ακολουθεί ολοβλαστική περιτροφική αυλάκωση (**Εικόνα 1.10**). Οι πρώιμες αυλακωτικές διαίρεσεις είναι ασύμμετρες: σε κάθε μια από τις πρώτες πέντε διαιρέσεις σχηματίζεται ένα ιδρυτικό κύτταρο (AB, E, MS, C και D) και ένα βλαστικό κύτταρο (P1, P2, P3, και P4). Τα βλαστικά κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα, πάντοτε μεσημβρινά παράγοντας εμπρόσθια τα ιδρυτικά κύτταρα και οπίσθια τα βλαστικά κύτταρα. Τα ιδρυτικά κύτταρα είναι δεσμευμένα και από αυτά παράγονται διαφοροποιημένα κύτταρα (**Εικόνα 1.11**).

Η πρώτη αυλακωτική διαίρεση είναι άνιση και ασύμμετρη και διαιρεί το P0 σε ένα μεγάλο εμπρόσθιο κύτταρο, το AB, και σε ένα μικρότερο οπίσθιο κύτταρο, το P1. Από την διαίρεση του AB προκύπτει ένα εμπρόσθιο κύτταρο το ABa και ένα οπίσθιο θυγατρικό κύτταρο το ABp. Από το ABa προκύπτουν παράγωγα του εξωδέρματος

Εικόνα 1.8.: Σχηματική παράσταση της ωογένεσης η οποία λαμβάνει χώρα στον ένα λοβό της γονάδας του *C. elegans*. Η δημιουργία των ωκυττάρων ξεκινά στη μιτωτική ζώνη όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας ένα συγκύτιο. Τα κύτταρα εξέρχονται από τη μιτωτική ζώνη, ξεκινούν την πρώτη μειωτική διαίρεση και καθώς ολοκληρώνουν την παχυταινία, λαμβάνει χώρα η κυτταροποίηση που ακολουθείται από την αύξηση του μεγέθους τους. Παρουσία σπερματοζωαρίων τα ωκύτταρα προχωρούν στη διακίνηση- απουσία σπερματοζωαρίων η πρόοδος της μείωσης αναστέλλεται. Κάθε 23 min περίπου το ωκύτταρο που βρίσκεται πλησιέστερα στη σπερματοθήκη προχωρά στη μετάφαση-ενώ ταυτόχρονα το περιφερειακό κυτταρόπλασμα του (φλοιός) υφίσταται αναδιοργάνωση. Το τμήμα της γονάδας που βρίσκεται δίπλα από τη σπερματοθήκη περικλείεται από ένα έλυτρο (υποδεικνύεται με κόκκινο χρώμα) που αποτελείται από πέντε κύτταρα τα οποία υποβοηθούν με τις συσπάσεις τους την είσοδο του ωκυττάρου στη σπερματοθήκη. Ακολουθεί η γονιμοποίηση. Η μείωση ολοκληρώνεται μετά τη γονιμοποίηση. Τα έμβρυα προωθούνται στη μήτρα καθώς αυλακώνονται. Από *Kuwabara, 2003*.



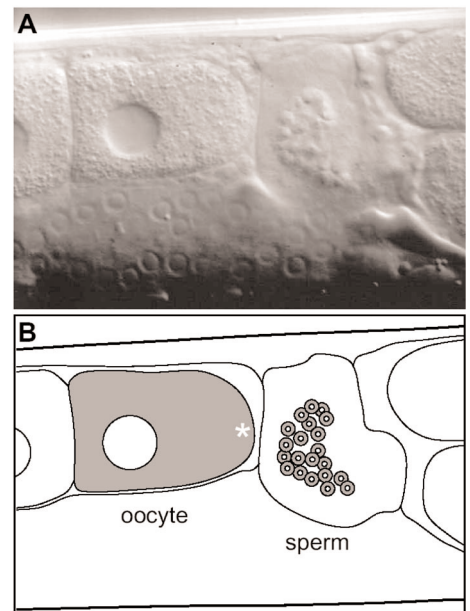
(επιδερμίδα και νευρικό σύστημα) καθώς και κύτταρα του μυώδους φάρυγγα. Από το AB_r προκύπτουν παράγωγα του εξωδέρματος (επιδερμίδα και νευρικό σύστημα) καθώς και μερικά εξειδικευμένα κύτταρα. Από τη διαίρεση του P1 προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα, το P2 και το EMS από το οποίο προκύπτει το E και το MS. Οι απόγονοι του E σχηματίζουν το έντερο και οι απόγονοι του MS σχηματίζουν μαζί με ορισμένους από τους απογόνους του AB_a το φάρυγγα. Από τη διαίρεση του P2 προκύπτει το P3 και το C, από το οποίο προκύπτει επιδερμίδα και μυϊκός ιστός. Το P3 διαιρείται και δίνει το P4 και το D από το οποίο προκύπτει μυϊκός ιστός. Από το P4 προκύπτουν αποκλειστικά τα κύτταρα της γαμετικής σειράς.

Η αυλάκωση ελέγχεται από γονίδια μητρικής επίδρασης (περίπου 100 μέχρι στιγμής) και ολοκληρώνεται στο στάδιο των 28 κυττάρων περίπου 100 min μετά τη γονιμοποίηση, οπότε ξεκινά η γαστριδίωση.

Η γαστριδίωση ξεκινά με την εισδοχή των προδρόμων του εντέρου E_a και E_p (Εικόνα 1.12), τα οποία ακολουθεί στη συνέχεια το P4, οι απόγονοι του MS, οι μυοβλάστες απόγονοι των C και D καθώς και τα κύτταρα του φάρυγγα που είναι απόγονοι του AB_a. Η κοιλιακή αύλακα, μια δομή ανάλογη με το βλαστοπόρο, κλείνει μετά από έξι περίπου ώρες, στο στάδιο των 290 κυττάρων, με επιβολή των προδρόμων της υποδερμίδας (Εικόνα 1.13). Ακολουθεί μια περίοδος 6 ωρών, κατά την οποία τα κύτταρα μετακινούνται και σχηματίζονται τα όργανα, ενώ παράλληλα παρατηρείται εκτεταμένη επιμήκυνση του εμβρύου.

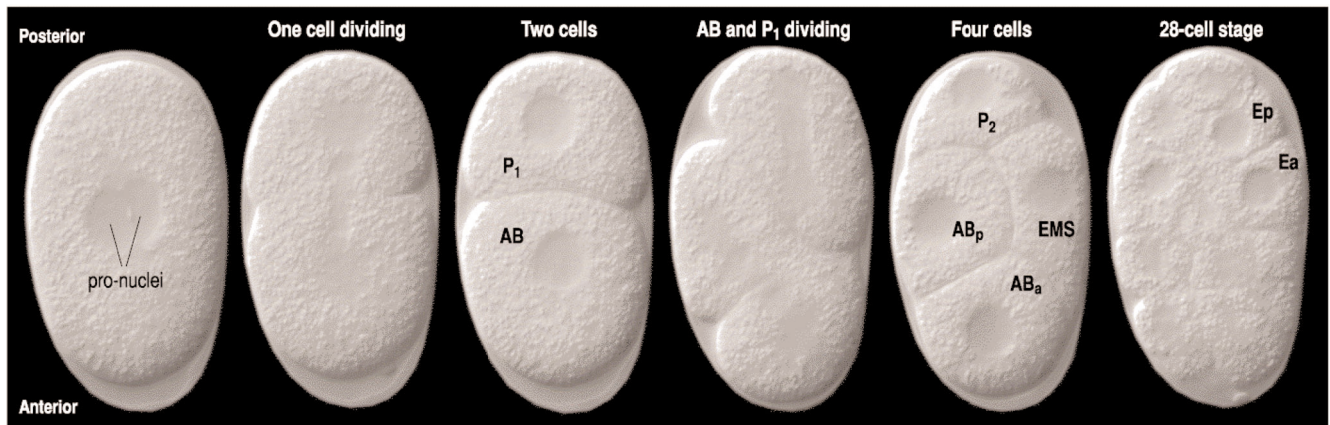
Οι προνύμφες πρώτου σταδίου εκκολάπτονται μετά από 16 περίπου ώρες και αποτελούνται από 558 κύτταρα. Στις επόμενες 2-3 ημέρες λαμβάνουν χώρα τέσσερις εκδύσεις και τελικά προκύπτει το ώριμο άτομο που αποτελείται από 959 σωματικά και 2000 γαμετικά κύτταρα και ζει περίπου 18 ημέρες. Στον ώριμο *C. elegans* δεν παρατηρούνται άλλες κυτταρικές διαιρέσεις - οι ιστοί αυξάνονται αποκλειστικά με αύξηση των κυττάρων που τους συγκροτούν.

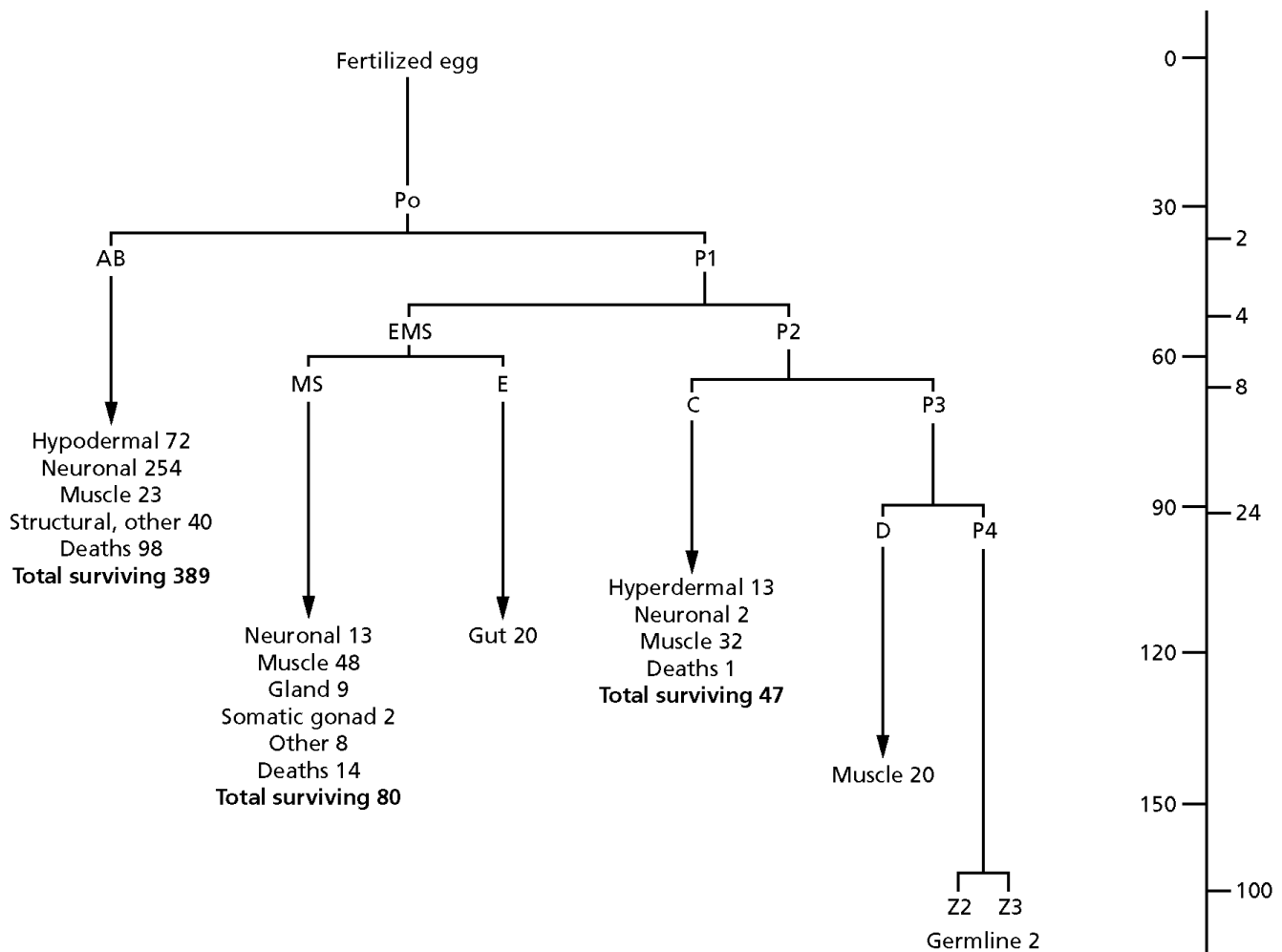
Όσο πιο κάτω από συνθήκες πείνας ή αυξημένης πυκνότητας πληθυσμού, προνύμφες που φυσιολογικά θα προχωρούσαν στο στάδιο L3 εισέρχονται σε ένα στάδιο που μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες και ονομάζεται dauer. Οι προνύμφες dauer δεν τρέφονται, είναι σχεδόν ακίνητες και εμφανίζονται ανθεκτικές σε αντιξοές συνθήκες διαβίωσης (π.χ. ξηρασία). Σε περιπτώσεις αυξημένης πυκνότητας πληθυσμού για την είσοδο στο στάδιο dauer ευθύνεται η αυξημένη συγκέντρωση μιας φερομόνης που παράγεται ιδιοστατικά από



Εικόνα 1.9.: Η γονιμοποίηση στον *C. elegans*. (A) Φωτογραφία από μικροσκοπία Nomarski. (B) Σχηματική απεικόνιση της φωτογραφίας (A). Διακρίνεται το ωοκύτταρο μέσα στον ωαγωγό και τα σπερματοζώαρια στη σπερματοθήκη. Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στο άκρο του ωοκύτταρου (σημειώνεται με αστερίσκο) καθώς αυτό προωθείται στη σπερματοθήκη. Τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα προωθούνται στη μήτρα. Από Golstein and Hird, 1996.

Εικόνα 1.10.: Ολοβλαστική περιστροφική αυλάκωση στον *C. elegans*. Μετά τη γονιμοποίηση οι προπυρήνες του ωοκυττάρου και του σπερματοζωαρίου συντήκονται. Από την πρώτη αυλάκωση προκύπτουν εμπρόσθια το βλαστομερίδιο AB και οπίσθια το βλαστομερίδιο P1. Στην επόμενη αυλακωτική διαίρεση το AB διαιρείται ισημερινά ενώ το P1 μεσημβρινά (περιστροφική αυλάκωση). Από τη διαίρεση του AB προκύπτουν τα AB_a και AB_p και από τη διαίρεση του P1 το EMS και το P2. Η αυλάκωση ολοκληρώνεται στο στάδιο των 28 κυττάρων. Από το βιβλίο *Principles of Development*.





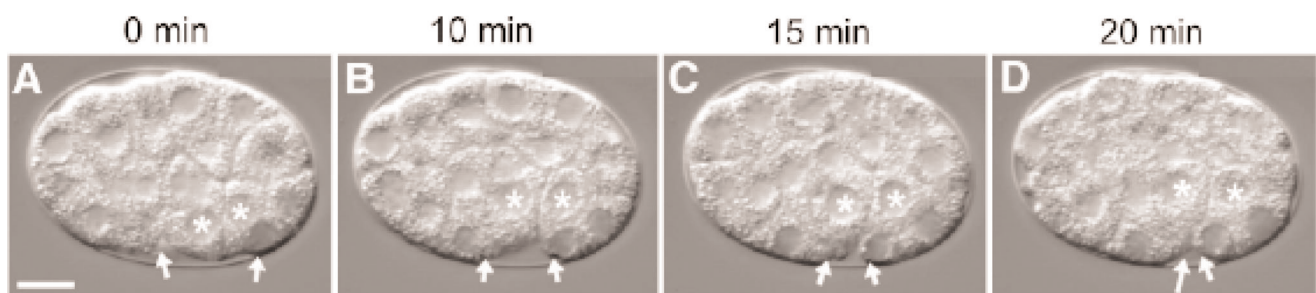
Εικόνα 1.11: Πρώιμη κυτταρική γενεαλογία του *C.elegans*. Από το βιβλίο *Essential Developmental Biology*.

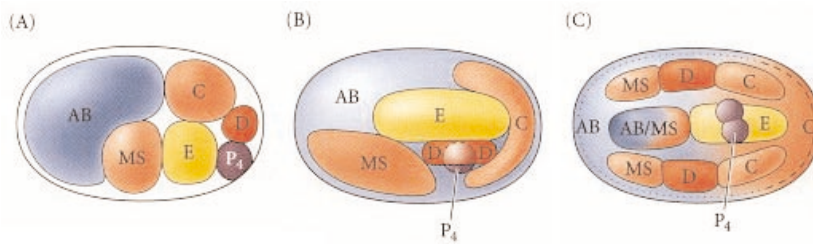
τις προνύμφες (Riddle et al.1997). Οι προνύμφες dauer συνεχίζουν την ανάπτυξη τους όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος ξαναγίνουν ευνοϊκές.

1.4. Η εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα

Το αυγό του *C. elegans* δεν παρουσιάζει ασυμμετρία. Ο πρώτος άξονας που εγκαθιδρύεται είναι ο εμπροσθοπίσθιος άξονας, στη μακριά διάσταση του αυγού. Βασικό ρόλο στην εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα παίζει το σπερματοζωάριο. Μετά τη γονιμοποίηση το σύμπλοκο του αρσενικού προπυρήνα με το κεντροσωμάτιο δημιουργεί ένα κυτταροπλασματικό ρεύμα το οποίο το προωθεί στον πόλο που βρίσκεται πλησιέστερα στο σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου. Ο πόλος αυτός αποτελεί το μελλοντικά οπίσθιο άκρο του ζώου (Hird et al.1996, Hird and White 1993, Golstein and Hird 1996). Πειράματα στα οποία, πριν από τη γονιμοποίηση, τα ωάρια

Εικόνα 1.12: Πλευρική άποψη ενός εμβρύου *C. elegans* κατά την έναρξη της γαστριδίωσης. Η γαστριδίωση ξεκινά με την εισδοχή των Ea και Ep (υποδεικνύονται με αστερίσκο) η οποία ολοκληρώνεται σε 20 min. Από *Lee and Goldstein, 2003*.



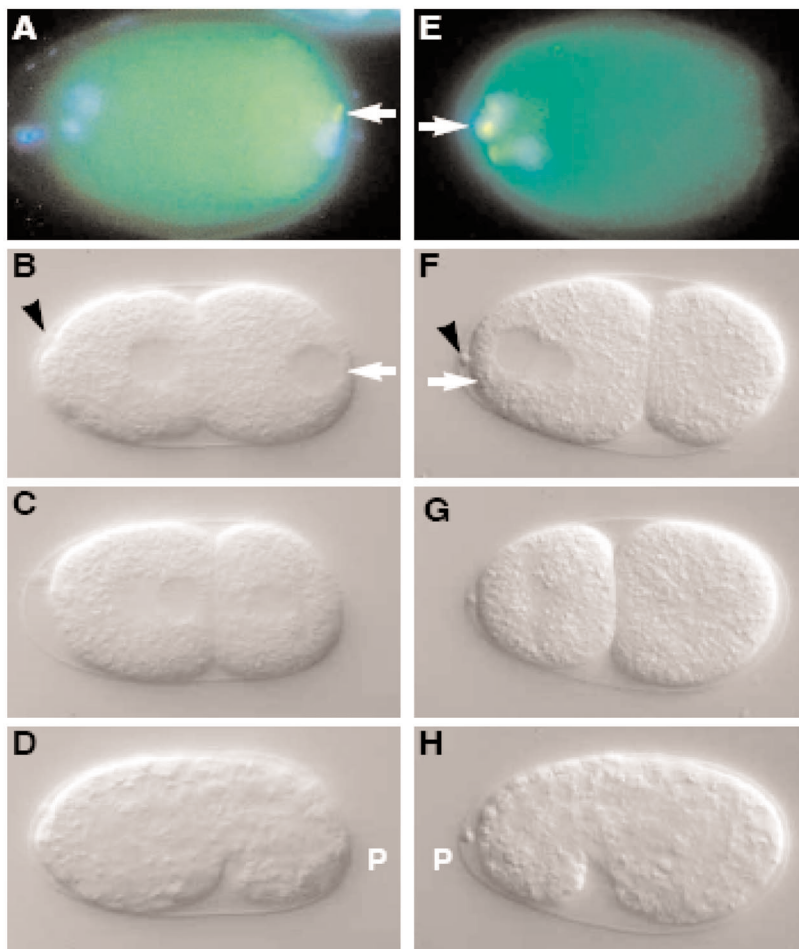


περιστρέφονται μέσα στη γονάδα έτσι ώστε καθώς προωθούνται στη σπερματοθήκη η είσοδος του σπερματοζωαρίου να γίνεται σε διαφορετικά σημεία τους, έδειξαν ότι το μελλοντικά οπίσθιο άκρο του εμβρύου εντοπίζεται πάντα στο άκρο που βρίσκεται κοντά στο σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου (**Εικόνα 1.14**) (Golstein and Hird 1996).

Η είσοδος του σπερματοζωαρίου στο αυγό αποτελεί το έναυσμα για το σχηματισμό δύο κυτταροπλασματικών ρευμάτων: α) το περιφερειακό κυτταρόπλασμα μετακινείται προς το εμπρόσθιο τμήμα ενώ β) το κεντρικό κυτταρόπλασμα μετακινείται προς το οπίσθιο άκρο (Hird and White 1993). Επιπλέον, στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα λαμβάνει χώρα μια διαδικασία που ονομάζεται ψευδοαυλάκωση: το εμπρόσθιο περιφερειακό κυτταρόπλασμα εμφανίζεται αδρό, το οπίσθιο λείο ενώ παράλληλα δημιουργείται μια δομή αύλακας. Η ψευδοαυλάκωση δεν είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του *C. elegans*. Τα έμβρυα στα οποία η διαδικασία αυτή αναστέλλεται αναπτύσσονται φυσιολογικά (Rose et al. 1995).

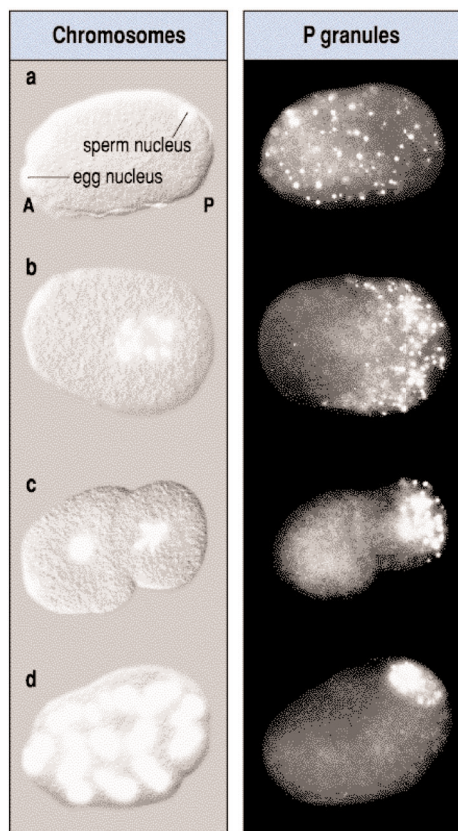
Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση της γαστριδίωσης του *C. elegans*. (A) Παρουσιάζονται οι θέσεις των ιδρυτικών κυττάρων και των απογόνων τους κατά την έναρξη της γαστριδίωσης. (B) Οι θέσεις των ιδρυτικών κυττάρων και των απογόνων τους στο στάδιο των 102 κυττάρων στο μέσο της γαστριδίωσης όταν έχει ολοκληρωθεί η μετανάστευση των απογόνων των E, D και P4. (C) Οι θέσεις των ιδρυτικών κυττάρων και των απογόνων τους κατά την ολοκλήρωση της γαστριδίωσης. Με κουνιόδες και με διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύονται οι περιοχές της υποδεσμίδας που σχηματίζονται από τη γενεαλογία του AB και C αντίστοιχα. Από το βιβλίο *Developmental Biology*.

Normal Reversed



Εικόνα 1.14: Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας εγκαθιδρύεται κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου. Παρουσιάζονται φυσιολογικά (A-D) και έμβρυα με αναστραμμένη πολικότητα (E-H). (A,E) Ανοσοφθορισμός με το μονοκλωνικό αντίσωμα SP56 που αναγνωρίζει αντιγόνα του σπερματοζωαρίου (πράσινο χρώμα-βέλη), υποδεικνύοντας έτσι το σημείο εισόδου του στο ωοκύτταρο. Τα έμβρυα έχουν επίσης χρωσθεί με DAPI (μπλε) για να είναι ορατοί οι πυρήνες.

(A) Φυσιολογικά το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου βρίσκεται κοντά στον αρσενικό προπυρήνα. (E) Στο έμβρυο αυτό μετά από κατάλληλους χειρισμούς το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου βρίσκεται κοντά στον θηλυκό προπυρήνα. (B-D και F-H) Μικροσκοπία Nomarski των εμβρύων (A) και (E). (B, F) Το P0 κατά τη διάρκεια των κυτταροπλασματικών κινήσεων. (B) Ο προπυρήνας του ωοκυττάρου ολοκλήρωσε τη μείωση και μεταναστεύει προς τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου. Το πολικό σωματίο έχει σχηματιστεί (κεφαλή βέλους) στο μελλοντικά εμπρόσθιο άκρο (βέλος). (F) Το σπερματοζωάριο (βέλος) έχει εισέλθει στο ωοκύτταρο σε μια θέση που βρίσκεται κοντά στον πυρήνα του. Ο προπυρήνας του ωοκυττάρου παραμένει δίπλα στον προπυρήνα του σπερματοζωαρίου. Το πολικό σωματίο σημειώνεται με βέλος. (C,G) Στάδιο 2 κυττάρων το P1 σχηματίζεται στην πλευρά στην οποία βρίσκεται το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου. (D,H) Στάδιο κόμα με P σημειώνεται το οπίσθιο άκρο. Από Golstein and Hird, 1996.



Εικόνα 1.15.: Κατανομή των κοκκίων P μετά από τη γονιμοποίηση. Παρουσιάζεται η κατανομή των κοκκίων P από τη γονιμοποίηση μέχρι το τέλος της αυλάκωσης. Στην αριστερή στήλη έχει χρησιμοποιηθεί DAPI για να είναι ορατοί οι πυρήνες και στη δεξιά στήλη παρουσιάζεται ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι των κοκκίων P. (a) Γονιμοποιημένο αυγό. Οι προπυρήνες εντοπίζονται στα άκρα του εμβρύου ενώ τα κοκκία P είναι ομοιογενώς κατανεμημένα. (b) Σύντηξη των προπυρήνων. Τα κοκκία P έχουν ήδη μετακινηθεί στο μελλοντικά οπίσθιο τμήμα του εμβρύου. (c) Στάδιο 2 κυττάρων. Τα κοκκία P κατανέμονται αποκλειστικά στο P1. (d) Στάδιο 26 κυττάρων. Τα κοκκία P εντοπίζονται μόνον στο P4 από το οποίο θα προκύψουν τα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Από το βιβλίο *Principles of Development*.

Τα κυτταροπλασματικά ρεύματα που δημιουργούνται από το σύμπλοκο του αρσενικού προπυρήνα με το κεντρόσωμα, έχουν σαν αποτέλεσμα την ασύμμετρη κατανομή διαφόρων συμπλόκων κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Χαρακτηριστική περίπτωση συμπλόκων που κατανέμονται ασύμμετρα μετά τη γονιμοποίηση αποτελούν τα κοκκία P (**Εικόνα 1.15**) και οι πρωτεΐνες PAR. Τα κοκκία P είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία αποτελούνται από διάφορες πρωτεΐνες, όπως ελικάσες RNA, poly(A) πολυμεράσες, παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (Amiri et al. 2001, Smith et al. 2002, Wang et al. 2002). Πριν από τη γονιμοποίηση τα κοκκία P κατανέμονται ομοιόμορφα στο αυγό. Μετά από τη γονιμοποίηση μετακινούνται στο οπίσθιο τμήμα του ζυγωτού και, σε κάθε μια από τις κυτταρικές διαιρέσεις που ακολουθούν, κατανέμονται αποκλειστικά στο βλαστικό κύτταρο (P1-P4) (Εικ. 1.15) (Strome and Wood 1983).

1.5. Τα γονίδια *par*

Τα γονίδια *par* είναι μια ομάδα που περιλαμβάνει έξι γονίδια μητρικής επίδρασης των οποίων οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την πολικότητα του εμβρύου. Οι μεταλλάξεις στα έξι γονίδια *par* (*partitioning defective*) διαταράσσουν την πολικότητα κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα, επηρεάζοντας μεταξύ άλλων την κατανομή των κοκκίων P, την ψευδοαυλάκωση, τις κυτταροπλασματικές κινήσεις, την θέση της ατράκτου κατά την πρώτη διαίρεση και το πεπρωμένο των βλαστομεριδίων (Boyd et al. 1996, Guo and Kemphues 1995, Watts et al. 2000, Tak-Jun and Kemphues 1999, Wollenfang and Seydoux 2000). Η ανάπτυξη των εμβρύων που προέρχονται από μεταλλάγματα *par* είναι ανώμαλη με διαιρέσεις που είναι σύγχρονες και συμμετρικές. Επιπλέον, τα έμβρυα αυτά σταματούν την ανάπτυξή τους χωρίς να σχηματίσουν αναγνωρίσιμους κύτταρικούς τύπους.

Πριν από τη γονιμοποίηση οι πρωτεΐνες PAR κατανεμονται ομοιόμορφα στο αυγό. Μετά τη γονιμοποίηση όμως η κατανομή των πρωτεϊνών αυτών περιορίζεται στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα στο εμπρόσθιο ή οπίσθιο τμήμα του εμβρύου (Boyd et al. 1996, Guo and Kemphues 1995, Watts et al. 2000, Tak-Jun and Kemphues 1999, Wollenfang and Seydoux 2000, Cuenca et al. 2003). Η PAR-1 και η PAR-2 (**Εικόνα 1.16**) εντοπίζονται στο οπίσθιο ήμισυ του περιφερειακού κυτταροπλάσματος, ενώ η PAR-3 και η PAR-6 στο εμπρόσθιο (Boyd et al. 1996, Guo and Kemphues 1995, Hung and Kemphues 1999). Οι PAR-4 και PAR-5 δεν εμφανίζουν πολικότητα στην κατανομή τους- κατανέμονται όμως και αυτές κατά κύριο λόγο στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα (Morton et al 2002, Watts et al. 2002).

Τα γονίδια *par* δρουν κατά κύριο λόγο στη διάρκεια του πρώτου κυτταρικού κύκλου του εμβρύου. Η άποψη αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση των εμβρύων που στερούνται των πρωτεϊνών PAR: στα έμβρυα αυτά εμφανίζονται προβλήματα στην πρόοδο και την ολοκλήρωση της πρώτης αυλακωτικής διαίρεσης. Επιπλέον, από πειράματα που έχουν γίνει με θερμοευαίσθητες μεταλλάξεις έχει δειχθεί ότι αν η μετάβαση στη μη επιτρεπτική θερμοκρασία γίνει μετά από

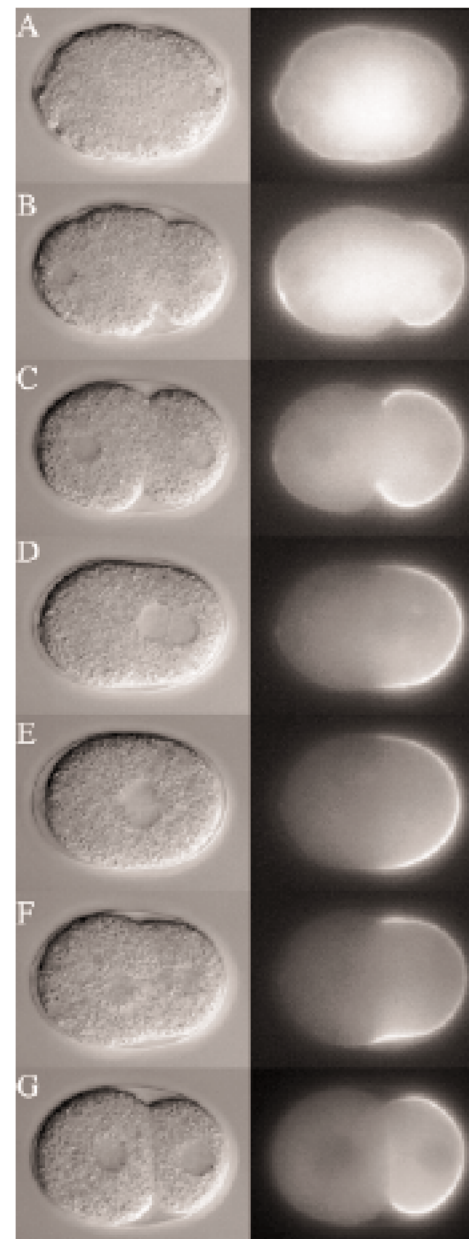
την πρώτη αυλακωτική διαίρεση, τότε δεν παρατηρούνται ιδιαίτερα προβλήματα στην ανάπτυξη του εμβρύου (Morton et. al 1992).

Τα γονίδια *par* κωδικοποιούν προϊόντα με διάφορες ενεργότητες (**Εικόνα 1.17**). Το γονίδιο *par-1* κωδικοποιεί μια κινάση με ενεργότητα κινάσης Ser/Thr. Ο ρόλος της PAR-1 στον *C. elegans* δεν είναι γνωστός, ωστόσο φαίνεται ότι οι ομόλογές της πρωτεΐνες στη *Drosophila* και στα θηλαστικά ενέχονται στην αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων (Drewes et. al 1997, Riechman et. al 2002, Shulman et al 2000). Το γονίδιο *par-4* κωδικοποιεί επίσης μια πρωτεΐνη με ενεργότητα κινάσης Ser/Thr, ενώ τα προϊόντα των *par-3* και *par-6* φέρουν επικράτειες PDZ (μία και τρεις αντίστοιχα)(Rose and Kemphues 1998). Η PAR-5 είναι μια πρωτεΐνη 14-3-3 (Morton et al. 2002) ενώ η PAR-2 φέρει μια επικράτεια δακτύλου RING (Levitan et al.1994). Στο εμπρόσθιο ήμισυ του περιφερειακού κυτταροπλάσματος εκτός από τις PAR-3 και PAR-6 εντοπίζεται και μια μη τυπική κινάση, η PKC-3, που εμπλέκεται σε αρκετές περιπτώσεις ασύμμετρης διαίρεσης (Tabuse et al. 1998, Doe and Bowerman 2001). Μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια *par* επηρεάζουν την κατανομή των υπολοίπων (**Εικόνα 1.18**) γεγονός που υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες PAR συνεργάζονται προκειμένου να εγκαθιδρυθεί ο εμπροσθοπίσθιος άξονας δηλαδή να διευθετηθούν σωστά οι μιτωτικές άτρακτοι και να διαχωριστούν στα βλαστομερίδια τα προϊόντα των γονιδίων μητρικής επίδρασης (βλ. παρακάτω). Ο τρόπος όμως με τον οποίο τα γονίδια αυτά ελέγχουν τις προαναφερθείσες διαδικασίες παραμένει εν πολλοίς άγνωστος.

1.6. Μικροϊνίδια, μικροσωληνίσκοι και εμπροσθοπίσθιος άξονας

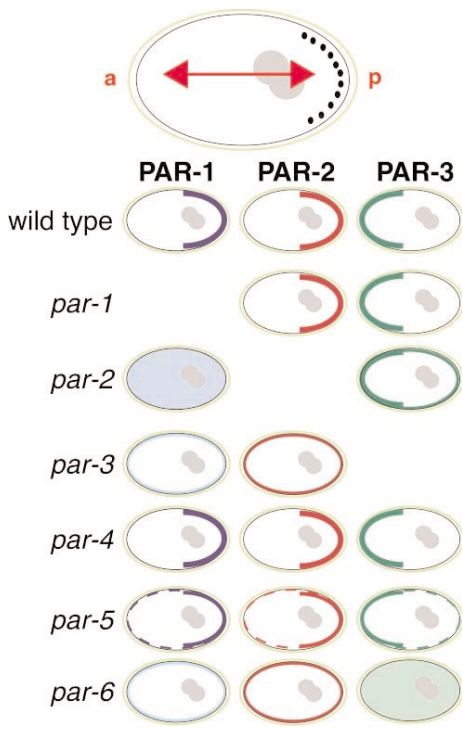
Ο τρόπος με τον οποίο οι δομές και οι παράγοντες του σπερματοζωαρίου δρουν για να επιτευχθεί η κατανομή των κυτταροπλασματικών όπως π.χ. των πρωτεϊνών PAR στο κυτταρόπλασμα δεν είναι ξεκάθαρος. Η συνεισφορά του σπερματοζωαρίου συνίσταται στον προπυρήνα, το κεντρόσωμα και μερικούς άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες. Ο προπυρήνας δεν φαίνεται να χρειάζεται για την εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα καθώς η απομάκρυνσή του δεν επηρεάζει την πολικότητα του ζυγωτού (**Εικόνα 1.19** Shadler and Shakes 2000). Επομένως, οι δομές του σπερματοζωαρίου που ενέχονται στη δημιουργία της αρχικής ασύμμετρίας είναι το κεντροσωματιο και οι μικροσωληνίσκοι του αστέρα. Πράγματι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου διαταράσσουν την πολικότητα κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα (Wallefang and Seydoux, 2000). Πάντως για την ωρίμανση του πατρικής προέλευσης κεντροσωματιού φαίνεται ότι απαιτούνται και προϊόντα γονιδίων μητρικής επίδρασης (O'Connell et al. 2000, Rappleye et al. 2002).

PAR-1	Κυτταροσκελετική κινάση MAPK με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης
PAR-2	Πρωτεΐνη με δακτύλιους RING
PAR-3	Περιέχει επικράτεια PDZ πιθανόν αλληλεπιδρά με PKC
PAR-4	?
PAR-5	Πρωτεΐνη 14-4-3
PAR-6	Περιέχει επικράτεια PDZ



Εικόνα 1.16.: Δυναμική κατανομή της PAR-2 κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Για την μελέτη της κατανομής έχει χρησιμοποιηθεί η κατασκευή GFP::PAR-2 στην οποία το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της GFP έχει συντηχθεί στο αμινοτελικό άκρο της PAR-2. Η ανάλυση της κατανομής της υβριδικής πρωτεΐνης έχει γίνει με τη λήψη ταινίας σε κατάλληλο μικροσκόπιο (time lapse). Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται οπτικές τομές Nomarski και στη δεξιά στήλη οι ίδιες τομές με μικροσκοπία φθορισμού. (A) Γονιμοποίηση-διακρίνονται οι προπυρήνες (B) Σχηματισμός κυτταροπλασματικού ρεύματος (C) ψευδοαυλάκωση (D) Σύντηξη προπυρήνων (E) Περιστροφή της ατράκτου (F) Μίτωση (G) Στάδιο 2 κυττάρων. Από Cuenca et al.2003.

Εικόνα 1.17.: Οι πρωτεΐνες PAR.



Εικόνα 1.18.: Η απουσία μιας πρωτεΐνης PAR επηρεάζει την κατανομή άλλων πρωτεϊνών PAR. Παρουσιάζεται η κατανομή των PAR1-3 σε έμβρυα άγριου τύπου καθώς και σε έμβρυα που στερούνται τις PAR1-6.

Ωστόσο φαίνεται ότι στην εγκαθίδρυση πολικότητας συμμετέχουν και άλλα στοιχεία του κυτταροσκελετού (Shelton et al. 1999, Guo and Kemphues 1996, Hird and White 1993, Hill and Strome 1990, Strome and Wood 1983). Αναστολείς του πολυμερισμού των μικροϊνιδίων, όπως η κυτοχάλασίνη, αναστέλλουν τις κυτταροπλασματικές κινήσεις και την ψευδοαυλάκωση, ενώ οι προπυρήνες συντήκονται στο κέντρο του αυγού και η πρώτη διαίρεση είναι συμμετρική. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την αδρανοποίηση με dsRNA των *nmy-2* (non-muscle myosin heavy chain II) ή *mhc-4* (myosin light chain). Η μείωση των προϊόντων των *mhc-4* και *nmy-2* έχει ως αποτέλεσμα προβλήματα στην κατανομή των PAR-2 και PAR-3 (Shelton et al. 1999). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η NMY-2 αλληλεπιδρά με την PAR-1 (Guo and Kemphues 1996) χωρίς όμως να είναι γνωστό το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής.

Τέλος, έχει ταυτοποιηθεί ένα γονίδιο πατρικής επίδρασης το *spe-11* το οποίο κωδικοποιεί μια νέα πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας. Η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται τόσο για την εγκαθίδρυση πολικότητας όσο και για την ολοκλήρωση της μείωσης του θηλυκού προπυρήνα και για το σχηματισμό του κελύφους (Browning and Strome 1996, Hill et al. 1989).

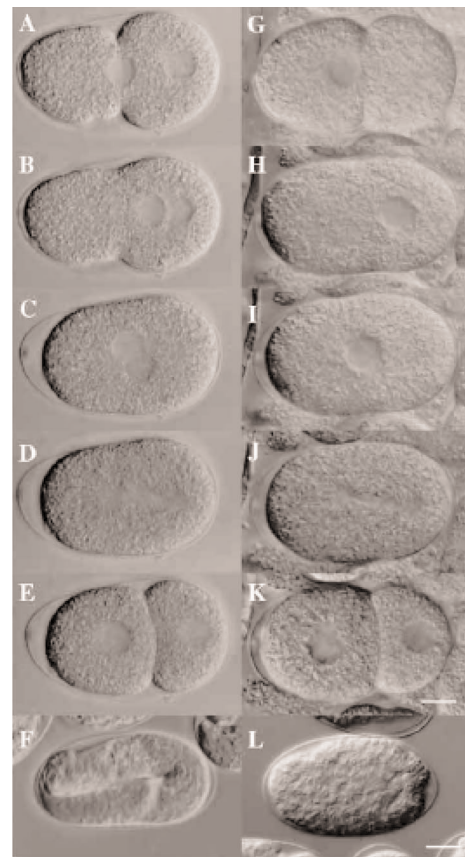
1.7. Πολικότητα και σχηματισμός της ατράκτου κατά την πρώτη αοβλακωτική διαίρεση

Αναφερθήκαμε ήδη στα γεγονότα που οδηγούν στην εγκαθίδρυση πολικότητας κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα του εμβρύου (συνοπτικά παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.20**). Ωστόσο η εγκαθίδρυση της πολικότητας δεν αρκεί: θα πρέπει, προκειμένου να προχωρήσει η ανάπτυξη, η διαίρεση του P0 να είναι ασύμμετρη. Με ποιο τρόπο επιτυγχάνεται η μετατόπιση της ατράκτου προς το οπίσθιο ήμισυ του P0; Η μετατόπιση της ατράκτου συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάφασης εξαιτίας διαφοράς μεταξύ των δυνάμεων που ασκούνται στα δύο κεντροσωμάτια (Grill et al. 2001). Για τη μετατόπιση αυτή απαιτούνται τα προϊόντα των γονιδίων *par-2* και *par-3*. Φαίνεται ότι η PAR-3 επηρεάζει τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, ενώ η PAR-2 είναι αυτή που περιορίζει την ενεργότητα της PAR-3 στο εμπρόσθιο ήμισυ του εμβρύου. (Labbe et al. 2003). Σε έμβρυα από ομόζυγα μεταλλάγματα *par-2* ή *par-3* η άτρακτος δεν μετατοπίζεται και η διαίρεση του ζυγωτού είναι συμμετρική. Φαίνεται λοιπόν ότι τα προϊόντα των *par-2* και *par-3* επιδρούν στην άτρακτο είτε έμμεσα είτε άμεσα. Ανεξάρτητα πάντως από αυτό για τη διεκπεραίωση της μετατόπισης απαιτούνται και άλλες πρωτεΐνες, όπως η LIN-5, και οι υπομονάδες Ga των ετεροδιμερών πρωτεϊνών G, GOA-1 και GPA-16. Η LIN-5 είναι μια πρωτεΐνη που έχει τη δομή του σπειροειδούς σπειράματος και εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια, ενώ η GOA-1 και GPA-16 κατανέμονται στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα, στους αστέρες (Lorson et al. 2000, Gotta and Arhinger 2001). Σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζουν οι GOA-1 και GPA-16 εμφανίζονται προβλήματα στη μετατόπιση της ατράκτου, ωστόσο τα

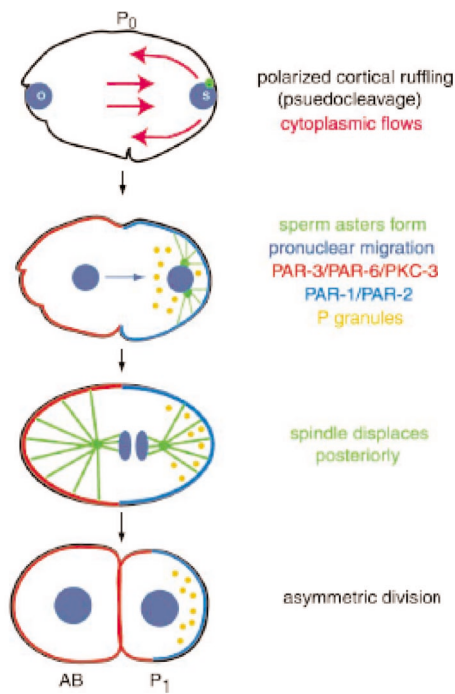
έμβρυα αυτά εμφανίζουν πολικότητα κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Από γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων αυτών και των μεταλλάξεων *par-3* και *par-2* φάνηκε ότι τα *goa-1* και *gra-16* δρουν επιστατικά στα *par-3* και *par-2* γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά δεν δρουν σε ένα παράλληλο μονοπάτι αλλά αποτελούν διαμεσολαβητές που δρουν καθοδικά από τις PAR και συμμετέχουν στους μηχανισμούς που ευθύνονται για την ασύμμετρη διαίρεση του P0 (Lorson et al. 2000, Gotta and Arhinger 2001, Miller and Rand 2000). Οι GOA-1 και GPA-16 αλληλεπιδρούν και με τα προϊόντα δύο ομόλογων τους γονιδίων των *gpr-1* και *gpr-2* τα οποία είναι πρωτεΐνες που έχουν τη δομή σπειρωτού σπειράματος. Σε έμβρυα στα οποία απουσιάζουν οι GPR-1 και GPR-2 η πρώτη αυλακωτική διαίρεση είναι συμμετρική. Οι GPR-1 και GPR-2 εντοπίζονται στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα και στην αρχή της ανάφασης κατανέμονται ασύμμετρα, με υψηλότερη συγκέντρωση στο οπίσθιο ήμισυ του εμβρύου (Εικόνα 1.21). Η αλληλεπίδραση των GPR-1/2 με τις GOA-1 και GPA-16 οδηγεί στην ενεργοποίηση των τελευταίων. Επομένως οι άνισες δυνάμεις που ασκούνται από τους πόλους θα πρέπει να οφείλονται στη διαφορική ενεργοποίηση του μονοπατιού Gα στο εμπρόσθιο και οπίσθιο πόλο του εμβρύου (Colombo et al. 2003). Το μονοπάτι αυτό φαίνεται ότι ενέχεται και στους μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την ασύμμετρη διαίρεση των νευροβλαστών της *Drosophila* (Cai et al. 2003).

Ένα άλλο γονίδιο το οποίο ενέχεται τη μετατόπιση της ατράκτου του P0 είναι το *let-99*. Στο ζυγωτό η LET-99, μια πρωτεΐνη που φέρει επικράτεια DEP, κατανέμεται σε μια ζώνη η οποία εντοπίζεται πλησιέστερα προς τον οπίσθιο πόλο. Η κατανομή της LET-99 εξαρτάται από τα προϊόντα των γονιδίων *par*. Στα μεταλλάγματα *let-99* τα άκρα της ατράκτου αιωρούνται εμπρός πίσω και η μετατόπιση είναι προβληματική ή δεν συμβαίνει καθόλου. Επειδή για την συμπεριφορά αυτή απαιτείται δυνεϊνή είναι δυνατόν να υποθέσουμε ότι η LET-99 ρυθμίζει τις δυνάμεις που ασκούνται στους αστέρες ώστε τελικά η δύναμη που ασκείται από το οπίσθιο κεντρόσωμα να είναι μεγαλύτερη και επομένως η άτρακτος να μετατοπίζεται προς τα πίσω (Tsu et al. 2002, 2003). Ωστόσο η ενεργότητα της LET-99 φαίνεται να απαιτείται κατά κύριο λόγο για τις ασύμμετρες διαιρέσεις των βλαστικών κυττάρων P1 και P2 αφού σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η LET-99, η διαίρεση του P0 είναι ασύμμετρη.

Ανάλογοι μηχανισμοί με αυτούς που μόλις περιγράφηκαν φαίνεται ότι λειτουργούν και για την διευθέτηση της ατράκτου διαιρέσεις των βλαστικών κυττάρων (P1-P4): για τη διεκπαιραίωσή τους χρειάζονται τόσο τα γονίδια *par* αλλά και κάποιοι από τους διαμεσολαβητές που ήδη αναφέρθηκαν για τη διαίρεση του P0.

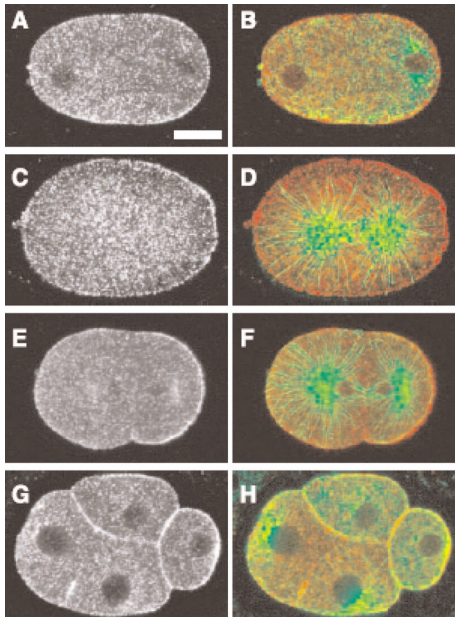


Εικόνα 1.19.: Για την εγκαθίδρυση της πολικότητας κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα δεν απαιτείται ο προπυρήνας του σπερματοζωαρίου. Παρουσιάζεται η πρόωμη ανάπτυξη ενός εμβρύου άγριου τύπου (A-F) και ενός εμβρύου που έχει προέλθει από γονιμοποίηση με απύρηνο σπερματοζωάριο (G-L). (A, G) Διακρίνονται οι προπυρήνες (B,H) η μετακίνηση του πυρήνα του ωοκυττάρου λαμβάνει χώρα παρουσία ή απουσία του προπυρήνα του σπερματοζωαρίου (C,I) οι πυρήνες μετατοπίζονται στο κέντρο του εμβρύου (D,J) η πρώτη μίτωση (E,K) και στα δύο έμβρυα τα εμπρόσθια βλαστομερίδια είναι μεγαλύτερα (F,L) το έμβρυο άγριου τύπου προχωρά την ανάπτυξή του ενώ το έμβρυο που έχει προέλθει από γονιμοποίηση με απύρηνο σπερματοζωάριο σχηματίζει μια σφαίρα από πολυπύρηνια κύτταρα. Από Shadler and Shakes, 2000.



Εικόνα 1.20.: Εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Η είσοδος του σπερματοζωαρίου ακολουθείται από τη δημιουργία των κυτταροπλασματικών ρευμάτων με αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση της πολικότητας. Οι πρωτεΐνες PAR κατανέμονται ασύμμετρα και ο πυρήνας του ωοκυττάρου μεταναστεύει προς το οπίσθιο άκρο. Επίσης τα κοκκία P μετακινούνται προς το οπίσθιο άκρο. Αποτέλεσμα της πολικότητας αυτής είναι η μετατόπιση της ατράκτου καθώς και η ασύμμετρη κατανομή αρχετών καθοριστών που διανέμονται μόνο στο ένα από τα δύο βλαστομερίδια. Από *Lyczak et al. 2002*.

Εικόνα 1.21.: Οι GPR-1/2 κατανέμονται ασύμμετρα στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα. (A,C, E, G) Ανοσοφθορισμός με αντισωμα έναντι των GPR-1/2 (B, D, F, H) Ανοσοφθορισμός με αντισωμα έναντι των GPR-1/2 (κόκκινο) και της tubulin (πράσινο). (A,B) γονιμοποιημένο αυγό-πρόφαση (C, D) γονιμοποιημένο αυγό-μετάφαση (E, F) στάδιο 2 κυττάρων (G, H) στάδιο 4 κυττάρων. Από *Colombo et al. 2003*.



1.8. Εξειδίκευση των βλαστομεριδίων κατά την αυλάκωση

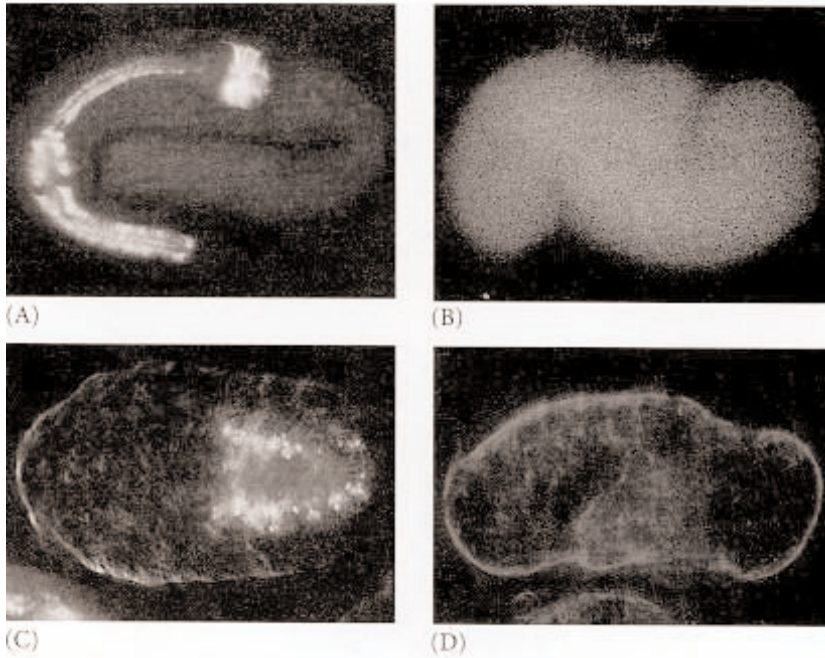
Αρχικά η πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans* θεωρήθηκε μία περίπτωση μωσαϊκής ανάπτυξης. Ωστόσο, γρήγορα διαπιστώθηκε από πειράματα διαχωρισμού βλαστομεριδίων ότι εκτός από αυτόμνη εξειδίκευση, στην πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans* παρατηρείται και κατά συνθήκη εξειδίκευση. Αν, για παράδειγμα, στο στάδιο των δύο κυττάρων τα AB και P1 διαχωριστούν και καλλιεργηθούν ξεχωριστά, τότε μόνον οι απόγονοι του P1 σχηματίζουν όλους τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά θα έδιναν στο οπίσθιο ήμισυ του εμβρύου. Αντίθετα, οι απόγονοι του AB σχηματίζουν μερικούς μόνο από τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά θα έδιναν. Το πείραμα αυτό υποδεικνύει ότι η εξειδίκευση του P1 γίνεται αυτόνομα, ενώ για την κατά συνθήκη εξειδίκευση του AB απαιτείται καποιο σήμα που παράγεται από το P1 (Priess and Thomson 1987).

1.8.1 Αυτόνομη εξειδίκευση στη γενεαλογία του P1

Όπως προαναφέρθηκε το πεπρωμένο των κυττάρων της γενεαλογίας P καθορίζεται αυτόνομα. Η ασύμμετρη κατανομή των κοκκίων P στα βλαστικά κύτταρα υποδεικνύει ότι η δομές αυτές δρουν ως μορφογενετικοί καθοριστές. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά αυτά συμπλέγματα αποτελούνται από διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες ενέχονται στην εξειδίκευση των κυττάρων της γαμετικής σειράς. Έτσι έλλειψη των προϊόντων αυτών οδηγεί σε στειρότητα. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του γονιδίου *pgl-1*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε RNA (Kawasaki et al. 1988), καθώς και των γονιδίων *glh-1*, *glh-2* που κωδικοποιούν ελικάσες οι οποίες είναι ομόλογες με το προϊόν του γονιδίου *vasa* που εντοπίζεται στα πολικά κοκκία της *Drosophila* (Gruidi et al. 1996). Αν και δεν έχει αποδειχθεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα κοκκία P ενέχονται στη ρύθμιση της μετάφρασης.

Τρία γονίδια μητρικής επίδρασης, τα *skn-1*, *pal-1* και *pie-1*, κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που δρουν ως μορφογενετικοί καθοριστές και ενέχονται στην εξειδίκευση των ιδρυτικών κυττάρων MS, E, C και D της γενεαλογίας P.

Εμβρυα από ωάρια που προέρχονται από ομόζυγα μεταλλάγματα *skn-1* στερούνται του εντέρου και του οπίσθιου τμήματος του μεσοδερμικού φάρυγγα (**Εικόνα 1.22**). Στα έμβρυα αυτά το πεπρωμένο των απογόνων του EMS μεταβάλλεται: αντι να σχηματίσουν το έντερο και τμήμα του φάρυγγα εξειδικεύονται ως κύτταρα της επιδερμίδας, δηλαδή το EMS συμπεριφέρεται ως C (Bowerman et al. 1992, 1993). Η SKN-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των παραγόντων που φέρουν βασικά φορτισμένα φερμουάρ (Blackwell et al. 1994). Αρχικά η SKN-1 απαντάται σε χαμηλά επίπεδα στο AB και το P1, γρήγορα όμως η συγκεντρωσή της στο P1 αυξάνεται (**Εικόνα 1.23**). Ακολούθως στο στάδιο των 4



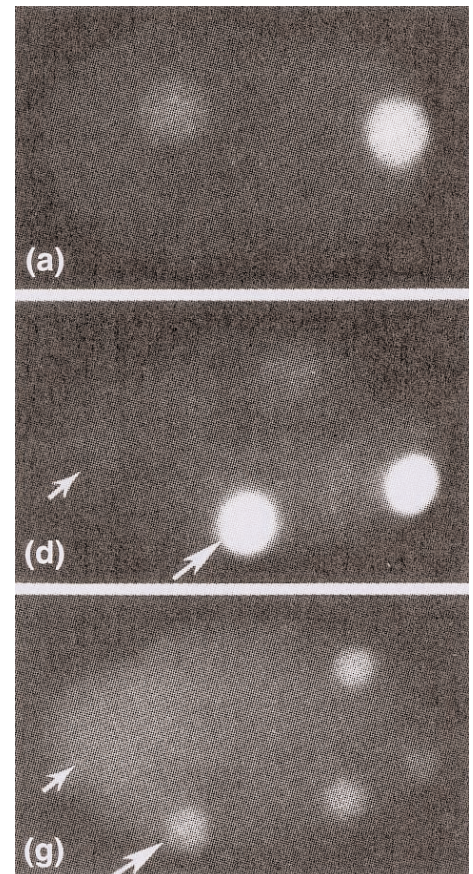
Εικόνα 1.22.: Τα έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η SKN-1 χαρακτηρίζονται από ανωμαλίες στην ανάπτυξη του εντέρου και του φάρυγγα. (A, C) έμβρυα άγριου τύπου (B, D) έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η SKN-1. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα που αναγνωρίζει είτε μυϊκά αντιγόνα του φάρυγγα (A,B) είτε κοκκία του εντέρου (C,D). Από Bowerman et al. 1992.

κυττάρων εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο P2 και το EMS, ενώ στο στάδιο των 8 κυττάρων ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα στα E, MS, P3 και C. Ωστόσο τα μόνα κύτταρα που επηρεάζονται σε έμβρυα από μεταλλάγματα *skn-1* είναι οι απόγονοι του EMS. Η παρουσία της SKN-1 είναι ικανή να μεταβάλλει το πεπρωμένο των κυττάρων της γενεαλογίας του AB: παρουσία υψηλών επιπέδων SKN-1 οι απόγονοι του AB υιοθετούν το πεπρωμένο του MS (Mello et al. 1992).

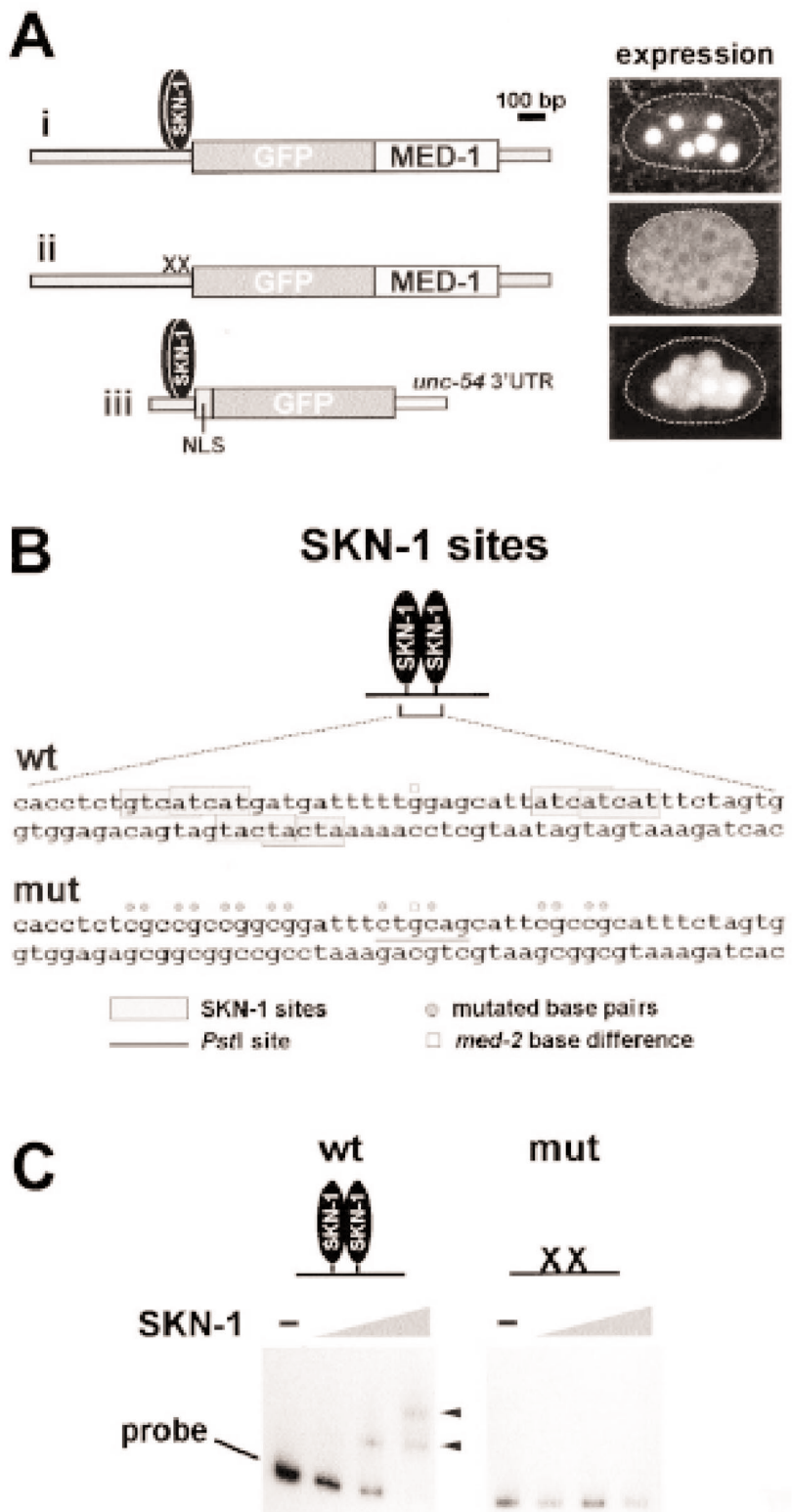
Η SKN-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή άλλων γονιδίων, όπως των *med-1* και *med-2* τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 1.24, Maduro et al. 2001). Όπως και τα έμβρυα που προέρχονται από ομόζυγα μεταλλάγματα *skn-1* τα έμβρυα στα οποία απουσιάζουν οι MED1/2 στερούνται του οπισθίου τμήματος του φάρυγγα (που προκύπτει από το MS) και του εντέρου (που προκύπτει από το E). Έκφραση των *med-1* και *med-2* μπορεί να διασώσει έμβρυα που προέρχονται από ομόζυγα μεταλλάγματα *skn-1*. Επιπλέον, έκφραση των *med-1* και *med-2* είναι δυνατόν να μετατρέψει μη EMS βλαστομερίδια σε EMS. Τα *med-1* και *med-2* αρχίζουν να εκφράζονται ζυγωτικά στο στάδιο των 6 κυττάρων (Maduro et al. 2001).

Το γονίδιο *pie-1* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που φέρει δακτύλους CCCH. Η PIE-1 απαντάται αποκλειστικά στα βλαστικά κύτταρα και απαιτείται για την εξειδίκευσή τους. Λίγο μετά τη γονιμοποίηση η PIE-1 κατανέμεται ομοιόμορφα στο ζυγώτο, πριν όμως από την πρώτη αυλακωτική διαίρεση εντοπίζεται στο οπίσθιο ήμισυ του εμβρύου και τελικά ανιχνεύεται μόνο στο P1 (Εικόνα 1.25, Mello et al. 1996, Tenenhaus et al. 1998). Η ασύμμετρη κατανομή της PIE-1 στο βλαστικό κύτταρο επαναλαμβάνεται και στις επόμενες διαιρέσεις των P1, P2 και P3. Αντίθετα η PIE-1 κατανέμεται συμμετρικά κατά τη συμμετρική διαίρεση του P4 (Εικ. 25, Mello et al. 1996). Έμβρυα που προέρχονται μεταλλάγματα *pie-1* στερούνται των απογόνων του P2. Στα έμβρυα αυτά το P2 συμπεριφέρεται ως EMS. Φαίνεται ότι ο ρόλος της PIE-1 είναι να καταστέλλει τη μεταγραφή στα βλαστικά κύτταρα και στα πρόδρομα κύτταρα της γαμετικής σειράς

Εικόνα 23.: Κατανομή της SKN-1 κατά τις πρώτες αυλακωτικές διαιρέσεις. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της SKN-1 (a) στάδιο 2 κυττάρων, (d) στάδιο 4 κυττάρων (g) στάδιο 8 κυττάρων. Από το βιβλίο *Analysis of Biological Development*.

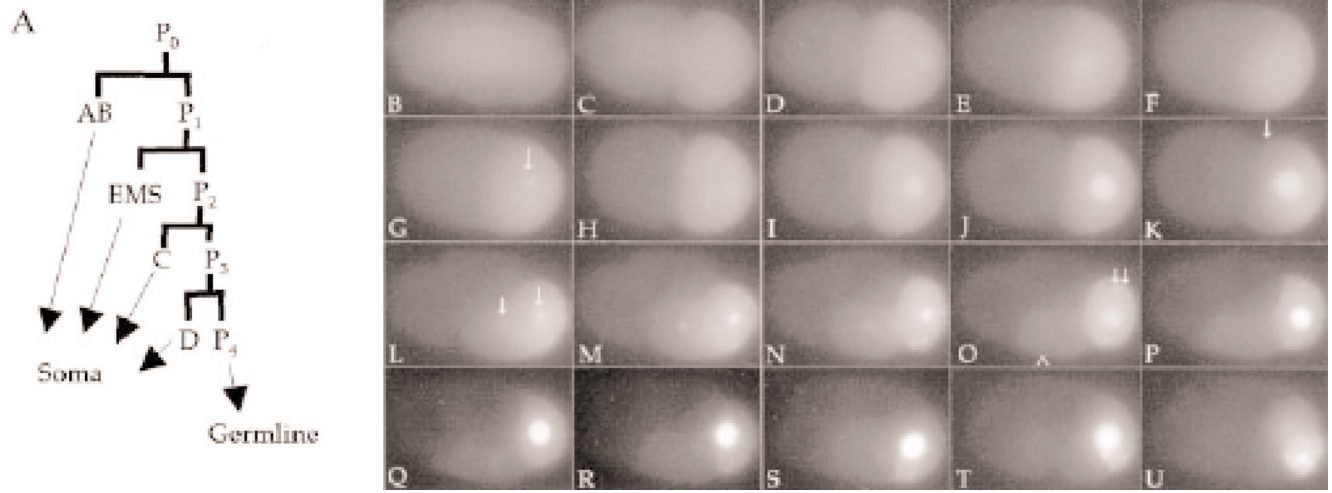


Εικόνα 1. 24: Η SKN-1 αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποκινητή του *med-1*. Α. (i,ii) Η SKN-1 αναγνωρίζει αλληλουχίες στον υποκινητή του *med-1*. Η έκφραση του υβριδικού γονιδίου αναφοράς (GFP::MED-1) καταστέλλεται αν οι θέσεις αναγνώρισης της SKN-1 μεταλλαχθούν. (iii) ένα τμήμα μήκους 180bp που περιέχει θέσεις αναγνώρισης της SKN-1 μπορεί να κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GFP (NLS: πεπτίδιο πυρηνικού εντοπισμού) (B) Η αλληλουχία των θέσεων αναγνώρισης της SKN-1 (wt) και η μεταλλαγμένη αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε στο Aii και στο C. (C) Η SKN-1 αλληλεπιδρά *in vitro* με το τμήμα DNA που μήκους 180bp το οποίο περιλαμβάνει τις θέσεις αναγνώρισής της. Πειράματα EMSA στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης τμήμα μήκους 180bp το οποίο περιλαμβάνει τις θέσεις αναγνώρισής της (wt) καθώς και τμήμα μήκους 180bp στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισής της SKN-1 έχουν μεταλλαχθεί (mut). Η συγκέντρωση της SKN-1 αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Από *Maduro et al. 2001*.



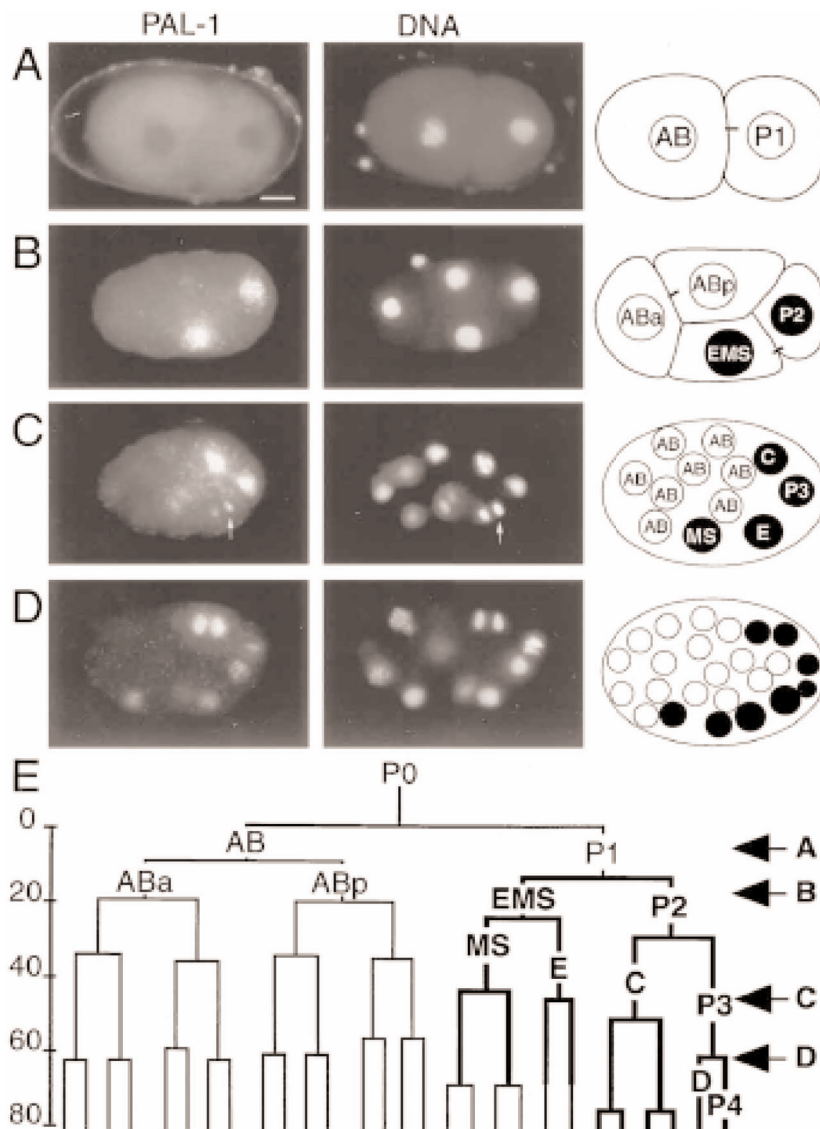
(Mello et al. 1992, 1996, Seydoux et al. 1996). Ένας από τους στόχους της PIE-1 είναι η SKN-1. Απουσία *pie-1* η ενεργότητα της SKN-1 δεν αναστέλλεται και έτσι το P2 υιοθετεί το πεπρωμένο του EMS (Mello et al. 1992).

Το γονίδιο *pal-1* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που φέρει μια ομοιοεπικράτεια και είναι ομόλογος με το προϊόν του γονιδίου *caudal* της *Drosophila*. Η PAL-1 εντοπίζεται στον πυρήνα του P2 και του EMS, καθώς και στους πυρήνες όλων των απογόνων τους (μέχρι το στάδιο των 24 κυττάρων- **Εικόνα 1.26**). Παρότι η PAL-



1 απαντάται τόσο στο P2 όσο και στο EMS, η ενεργότητά της απαιτείται μόνον για την εξειδίκευση των σωματικών απογόνων του P2. Σε έμβρυα που προέρχονται από μεταλλάγματα *pal-1* απουσιάζουν οι απόγονοι των C και D. Η δράση της PAL-1 στο EMS και τους απογόνους του αναστέλλεται από την SKN-1, γεγονός που εξηγεί το φαινότυπο των εμβρύων που προέρχονται από ομόζυγα μεταλλάγματα *pal-1* (Hunter et al.1996).

Εικόνα 1.25.: Δυναμική κατανομή της PIE-1 κατά τα πρώιμα στάδια της αυλάκωσης. (A) Οι τέσσερις πρώτες διαιρέσεις είναι ασύμμετρες και οδηγούν στο σχηματισμό ενός ιδρυτικού (AB, EMS,C,D) και ενός βλαστικού κυττάρου (P1,P2,P3,P4). Για την μελέτη της κατανομής έχει χρησιμοποιηθεί η κατασκευή PIE-1::GFP στην οποία το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της GFP έχει συντηχθεί στο αμινοτελικό άκρο της PAR-2. Η ανάλυση της κατανομής της υβριδικής πρωτεΐνης έχει γίνει με τη λήψη ταινίας σε κατάλληλο μικροσκόπιο φθορισμού (time lapse). Παρουσιάζονται τα στάδια από τη γονιμοποίηση μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων. (B-H) στάδιο ενός κυττάρου, (I-M) στάδιο 2 κυττάρων, (Q-U) στάδιο 6/8 κυττάρων. Η ταινία υπάρχει στην ιστοσελίδα www.molecule.org/cgi/content/full/6/2/445/D/C1. Τα βέλη υποδεικνύουν το οπίσθιο κεντροσωμάτιο (G) την παρουσία της PIE-1::GFP μόνο στο βλαστικό κύτταρο (K), τα κεντροσωμάτια (L) και τα κοκκία P (O). Η κεφαλή του βέλους στο O υποδεικνύει την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων PIE-1::GFP στο EMS. Από Reese et al. 2000.



Εικόνα 1.26.: Κατανομή της PAL-1 κατά την πρώιμη ανάπτυξη. (A-D) Ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της PAL-1 (αριστερή στήλη). Στη μεσαία στήλη φαίνονται οι πυρήνες (χρώση με DAPI) και στη δεξιά στήλη παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα. (B) Η PAL-1 ανιχνεύεται στο στάδιο των 4 κυττάρων στους πυρήνες των βλαστομεριδίων EMS και P2. (C) Όλοι οι απόγονοι του P1 εκφράζουν PAL-1 στο στάδιο των 12 κυττάρων. (D) Όλοι οι απόγονοι του P1 εκφράζουν PAL-1 στο στάδιο των 15-24 κυττάρων. (E) Η γενεαλογία των κυττάρων που εκφράζουν PAL-1. Οι έντονες γραμμές και τα έντονα γράμματα υποδεικνύουν κύτταρα στα οποία ανιχνεύεται PAL-1. Αριστερά φαίνεται ο χρόνος. Τα βέλη υποδεικνύουν τα στάδια που φαίνονται στις φωτογραφίες A-D. Από Hunter et al.1996.

Οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες που αναφέρθηκαν σε αυτή την ενότητα δρουν ως μορφογενετικοί καθοριστές και παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη των αναπτυξιακών γεγονότων που ρυθμίζουν τη γενεαλογία του P1. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το φαινότυπο των εμβρύων που προέρχονται από διπλά μεταλλάγματα *skn-1;pie-1*: στα έμβρυα αυτά δεν παρατηρούνται διαφοροποιημένα κύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι το πεπρωμένο κάθε βλαστομεριδίου καθορίζεται από το συνδυασμό των παραγόντων που εντοπίζονται σε αυτό, δημιουργώντας τελικά ρυθμιστικά κυκλώματα που προωθούν συγκεκριμένα αναπτυξιακά γεγονότα.

1.8.2 Κατά συνθήκη εξειδίκευση βλαστομεριδίων

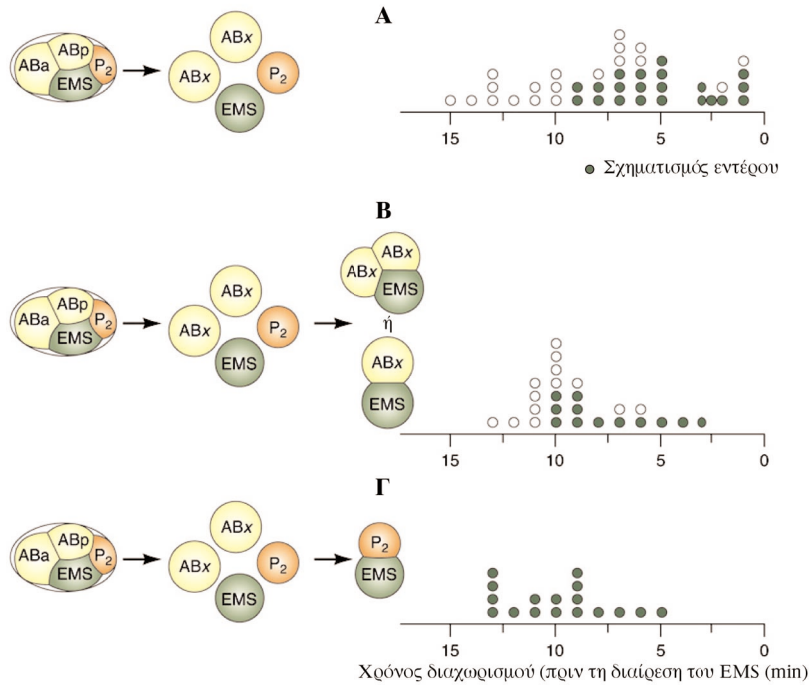
Θα αναφερθούμε τώρα σε δύο παραδείγματα βλαστομεριδίων (ABr και EMS) τα οποία εξειδικεύονται μέσω της δράσης ειδικών σηματοδοτικών μορίων που παράγονται από το P2.

Αν κατά το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων το βλαστομερίδιο P2 απομακρυνθεί από το έμβρυο τότε: α) το EMS διαιρείται συμμετρικά και έτσι αντί για το E και το MS προκύπτουν δύο κύτταρα MS. β) το ABr δίνει μερικούς μόνο από τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά θα έδινε. Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι τα βλαστομερίδια EMS και ABr δεν εξειδικεύονται αυτόνομα αλλά χρειάζονται το P2.

1.8.3 Το μονοπάτι *Wnt* και η εξειδίκευση του EMS

Εκτός από τα πειράματα τα οποία προαναφέρθηκαν σχετικά με την απομάκρυνση του P2 από το έμβρυο, πειράματα ανασυνδυασμού βλαστομεριδίων έχουν δείξει ότι προκειμένου να διαιρεθεί ασύμμετρα το EMS και επομένως να σχηματιστεί το ενδόδερμα του *C. elegans*, απαιτείται κάποιο σήμα που παράγεται από το P2. Στα πειράματα αυτά τα τέσσερα βλαστομερίδια διαχωρίζονται και στη συνέχεια το EMS είτε καλλιεργείται μόνο του *in vitro* είτε ανασυνδυάζεται με το P2 ή με κάποιο από τα ABa ή ABr. Αν ο διαχωρισμός των βλαστομεριδίων γίνει αμέσως μετά το σχηματισμό του EMS, τότε ενδόδερμα σχηματίζεται μόνο στην περίπτωση που το EMS ανασυνδυαστεί με το P2. Αν ο διαχωρισμός συμβεί αργότερα τότε τόσο από το EMS όσο και από τον ανασυνδυασμό EMS/ABx προκύπτουν ενδοδερμικά κύτταρα (**Εικόνα 1.27**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η δυνατότητα των απογόνων του EMS να εξειδικευθούν σε ενδόδερμα εξαρτάται από κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα αμέσως μετά το σχηματισμό του βλαστομεριδίου αυτού (Goldstein et al. 1992).

Σε ένα φυσιολογικό έμβρυο το ιδρυτικό κύτταρο E σχηματίζεται στην περιοχή του EMS που βρίσκεται σε επαφή με το P2. Το ίδιο συμβαίνει και στα πειράματα ανασυνδυασμού: ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό του EMS, το επίπεδο της διαίρεσής του είναι



Εικόνα 1.27.: Εικόνα 1.27: Πειράματα απομόνωσης-ανασυνδυασμού βλαστομεριδίων. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται συνοπτικά το πείραμα και στη δεξιά στήλη το αποτέλεσμα. Στη δεξιά στήλη κάθε κύκλος αντιπροσωπεύει ένα πείραμα (με πράσινο υποδεικνύονται τα πειράματα στα οποία σχηματίζονται κύτταρα εντέρου).

(Α) Πειράματα απομόνωσης. Μετά την απομόνωσή του από τα υπόλοιπα βλαστομερίδια το EMS καλλιεργείται, και στους απόγονους του εξετάζεται η παρουσία ή μη των χαρακτηριστικών κοκκίων ραβδίτινης τα οποία σχηματίζονται μόνο στα κύτταρα του εντέρου. Προκειμένου οι απόγονοι του EMS να σχηματίσουν εντερικά κύτταρα, θα πρέπει η απομόνωσή του να γίνει αρκετά λεπτά μετά το σχηματισμό του, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ικανότητά του να σχηματίζει εντερικά κύτταρα εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με άλλα κύτταρα. (Β) Απομόνωση του EMS και ανασυνδυασμός του με το ABa, το ABp ή και τα δύο. Τα αποτελέσματα είναι ίδια με το (Α). (Γ) Απομόνωση του EMS και ανασυνδυασμός του με το P2. Όταν το EMS ανασυνδυάζεται με το P2, τότε σχηματίζονται εντερικά κύτταρα ανεξάρτητα από τον χρόνο κατά τον οποίο έγινε η απομόνωση του EMS.

Από το βιβλίο *Analysis of Biological Development*, τα αποτελέσματα είναι από Goldstein, 1992.

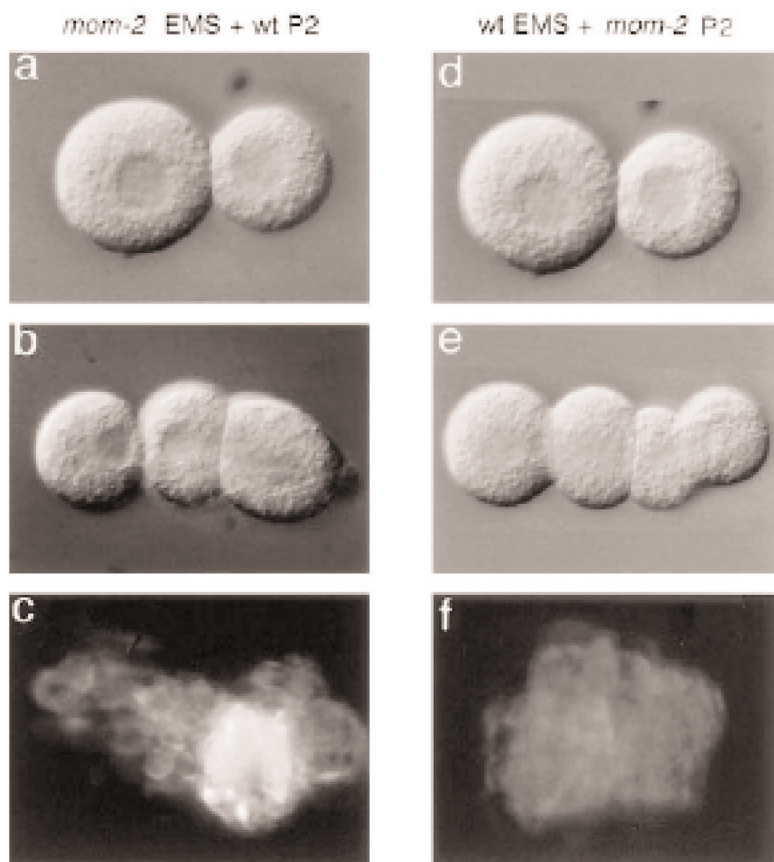
παράλληλο με το επίπεδο επαφής P2/EMS με αποτέλεσμα το E να σχηματίζεται πάντοτε στην πλευρά του EMS που εφάπτεται με το P2, ενώ το MS σχηματίζεται μακριά από αυτό. Κάτι τέτοιο δε φαίνεται να συμβαίνει αν ο ανασυνδυασμός του EMS γίνει με κάποιο από τα ABx. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το P2 εκτός από το πεπρωμένο του E το P2 επηρεάζει και το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου (Goldstein et al. 1993).

Ποια είναι η φύση του σήματος που δρά στο EMS; Προκειμένου να χαρακτηριστούν γονίδια μητρικής επίδρασης που ενέχονται στην εξειδίκευση του E έγινε μεταλλαξιγένεση και ανάλυση μεταλλαγμάτων στα οποία οι απόγονοι του E αντί για έντερο σχηματίζουν μεσοδερματικά παράγωγα. Έτσι χαρακτηρίστηκαν 5 γονίδια *mom* (**more mesoderm**) (Thorpe et al. 1997, Rocheleau et al. 1997). Έμβρυα που προέρχονται από ερμαφρόδιτα μεταλλάγματα *mom⁻* στερούνται εντέρου, καθώς στα έμβρυα αυτά το EMS διαιρείται συμμετρικά σε δύο MS.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των γονιδίων *mom* έγιναν πειράματα ανασυνδυασμού EMS/P2 στα οποία το ένα από τα δύο βλαστομερίδια προέρχονταν από έμβρυο το οποίο στερείτο κάποιο από τα προϊόντα των μητρικών γονιδίων *mom*. Από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι τα *mom-1*, *mom-2* και *mom-3* απαιτούνται στο P2 ενώ το *mom-4* στο EMS (η ανάλυση δεν έδωσε αποτελέσματα για το *mom-5*) (Εικόνα 1.28, Thorpe et al. 1997). Μερικά από τα προϊόντα των γονιδίων *mom* είναι ομόλογα με πρωτεΐνες του μονοπατιού Wnt το οποίο ενέχεται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες στη *Drosophila* αλλά και στα σπονδυλόζωα: το *mom-2* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ομόλογη με τους παράγοντες Wnt, το *mom-5* μια πρωτεΐνη ομόλογη με τη *frizzled*, και το *mom-1* μια πρωτεΐνη ομόλογη με την *porcupine* (Εικόνα 1.29) (Thorpe et al. 1997, Rocheleau et al. 1997).

Εκτός από τα *mom-1,2,5* τρία ακόμα γονίδια που ενέχονται στο μονοπάτι Wnt και την εξειδίκευση του E έχουν χαρακτηριστεί με βάση την ομολογία τους με γονίδια άλλων οργανισμών: το *wrm-1*, το

Εικόνα 1.28.: Το προϊόν του *mom-2* απαιτείται στο P2 και όχι στο EMS. Τα βλαστομερίδια P2 και EMS απομονώθηκαν από έμβρυα άγριου τύπου ή/και από έμβρυα από τα οποία απουσίαζε η MOM-2 και ανασυνδυάστηκαν ώστε να σχηματιστούν μωσαϊκά έμβρυα. Τα έμβρυα καλλιιεργήθηκαν για 20h και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία των εντερικών κυττάρων. (a και d) Τα ανασυνδυασμένα βλαστομερίδια σε μικροσκοπία Nomarski. Το έμβρυο στο (a) αποτελείται από ένα βλαστομερίδιο P2 άγριου τύπου (μικρότερο κύτταρο) και ένα βλαστομερίδιο EMS από ένα έμβρυο που στερείται MOM-2. Το έμβρυο στο (d) αποτελείται από ένα βλαστομερίδιο P2 από ένα έμβρυο που στερείται MOM-2 και ένα βλαστομερίδιο EMS από ένα έμβρυο άγριου τύπου. (b και e) Η διαίρεση του EMS στα παραπάνω έμβρυα. Η διαίρεση αυτή γίνεται φυσιολογικά και στα δύο αυτά κύτταρα. (c και f) Τα ανασυνδυασμένα έμβρυα στο τέλος της επώασης. Ανίχνευση των κοκκίων ραβδίτινης τα οποία χαρακτηρίζουν τα εντερικά κύτταρα. Τα εντερικά κύτταρα δεν σχηματίζονται όταν η MOM-2 απουσιάζει από το P2 (f). Από Thorpe et al. 1997.



το *gsk-3* και το *apr-1* (Rocheleau et al. 1997). Το *wrm-1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ομόλογη με την β -catenin, το *gsk-3* την GSK-3 και το *apr-1* μια πρωτεΐνη ομόλογη με την APC (Εικ.1.29). Έμβρυα από τα οποία απουσιάζει κάποιο από τα τρία παραπάνω προϊόντα εμφανίζουν προβλήματα στην ανάπτυξη του ενδοδέρματος. (Rocheleau et al. 1997). Εκτός από τα παραπάνω γονίδια στην εξειδίκευση του E φαίνεται ότι παίζει ρόλο και το γονίδιο *rop-1*. Η POP-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας HMG, ομόλογος με τον TCF/LEF που αποτελεί το τελικό στοιχείο του μονοπατιού Wnt και εκφράζεται στα περισσότερα εμβρυϊκά κύτταρα (Lin et al 1995). Έμβρυα που προέρχονται από ερμαφρόδιτα μεταλλάγματα *rop-1* στερούνται των κυτταρικών τύπων που προκύπτουν από το MS επειδή, στα έμβρυα αυτά το EMS διαιρείται συμμετρικά και δίνει δύο E. Επομένως για την εξειδίκευση του E απαιτείται καταστολή της POP-1.

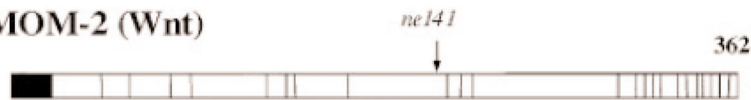
Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι για την εξειδίκευση του E χρειάζεται ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt. Υπάρχει όμως μια διαφορά σε σχέση με το κλασικό μονοπάτι Wnt: στην περίπτωση αυτή η ενεργοποίηση του μονοπατιού δεν οδηγεί στην ενεργοποίηση αλλά στην καταστολή της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα που βρίσκεται καθοδικά στο μονοπάτι.

Στην εξειδίκευση του E ενέχεται εκτός από το μονοπάτι Wnt και ένα μονοπάτι κινάσης MAP που δρα παράλληλα. Το προϊόν του *mom-4* είναι μια MAPKK (κινάση που ανήκει στην οικογένεια των κινασών των κινασών MAP) ομόλογη με την TAK των σπονδυλοζώων (Shin et.al 1999, Meneghini et al. 1999). Η MOM-4 φωσφορυλιώνει την LIT-4 μια κινάση MAP που, όταν φωσφορυλλιώνεται αλληλεπιδρά με τη WRM-1 και τη φωσφορυλλιώνει. Ακολουθως το σύμπλοκο

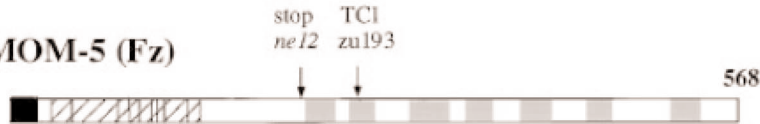
MOM-1 (Porc)



MOM-2 (Wnt)



MOM-5 (Fz)



WRM-1 (Arm)



APR-1



WRM-1/ LIT-4 φωσφορυλλώνει την POP-1 (Rocheleau et. al 1999, Shin et.al 1999, Meneghini et al. 1999).

Όπως προαναφέρθηκε η αλληλεπίδραση P2/EMS ενέχεται και στον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου στο EMS. Σε πειράματα ανασυνδυασμού βλαστομεριδίων (από έμβρυα από ερμαφρόδιτα άτομα άγριου τύπου ή από ερμαφρόδιτα άτομα ομόζυγα για μεταλλάξεις γονιδίων του μονοπατιού Wnt) φάνηκε ότι μερικά μόνον από τα γονίδια αυτά ενέχονται στον προσανατολισμό της ατράκτου (Schlesinger et.al 1999). Συγκεκριμένα ενώ τα γονίδια *mom-2*, *mom-5*, καθώς και το *gsk-3* απαιτούνται τόσο για τον ορθό προσανατολισμό της ατράκτου όσο και για το πεπρωμένο των απογόνων του EMS, το *wrm-1* απαιτείται μόνο για την εξειδίκευση των απογόνων του EMS, και όχι για τον προσανατολισμό της ατράκτου. Φαίνεται λοιπόν ότι καθοδικά από τη GSK-3 το μονοπάτι διακλαδίζεται σε δύο παρακλάδια, ένα που αφορά στον προσανατολισμό της ατράκτου και ένα που αφορά στον καθορισμό του πεπρωμένου των απογόνων του EMS. Στο τελευταίο παρακλάδι δρα η WRM-1 η οποία μετατοπιζόμενη στον πυρήνα σε σύμπλοκο με τη LIT-1, καταστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα POP-1 στο κύτταρο E (Schlesinger et.al 1999). Το παρακλάδι του μονοπατιού Wnt που ενέχεται στον προσανατολισμό της ατράκτου διεκπεραιώνεται και αυτό από προϊόντα γονιδίων μητρικής επίδρασης. Απομένει να χαρακτηριστούν τα κυτταροπλασματικά αυτά προϊόντα.

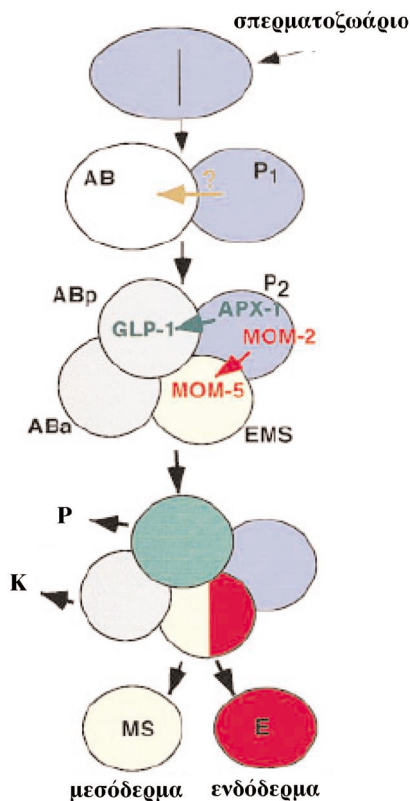
Ένα ακόμα μονοπάτι που ενέχεται τόσο στον προσανατολισμό της ατράκτου της διαίρεσης του EMS, όσο και στην εξειδίκευση του E είναι το μονοπάτι Src (Bei et al. 2002).

Εικόνα 29.: Διαγραμματική αναπαράσταση των WRM-1, APR-1, MOM-1, MOM-2 και MOM-5. Οι πρωτεΐνες δεν έχουν σχεδιαστεί υπό κλίμακα και παρουσιάζονται βάσει των αλληλουχιών των cDNA ή/και των γενωμικών αλληλουχιών. Τα πεπτίδια-οδηγοί και οι διαμεμβρανικές επικράτειες υποδεικνύονται με μαύρο και γκριζό χρώμα αντίστοιχα. Τα βέλη στις MOM-1, MOM-2 και MOM-5 υποδεικνύουν τη θέση γνωστών μεταλλάξεων. Η WRM-1 φέρει 12 μοτίβα armadillo (διάστικτα τμήματα) τα οποία εμφανίζουν 23% ταυτότητα με την ανθρώπινη β-catenin και 22% ταυτότητα με την ARMADILLO της *Drosophila*. Η APR-1 είναι πολύ μικρότερη από την ομόλογό της στον άνθρωπο (APC), ωστόσο και οι δύο πρωτεΐνες φέρουν επτά μοτίβα armadillo που εμφανίζουν ταυτότητα 31%. Επιπλέον τόσο η APR-1 όσο και η APC φέρουν την αλληλουχία I/L-L-X-E/R-C/S-I-X-S-A/E-M-P-T/K η οποία θεωρείται σημαντική για την αλληλεπίδραση με τη β-catenin. Η MOM-1 εμφανίζει 29% ταυτότητα με την Porcupine της *Drosophila*. Η MOM-2 εμφανίζει 34% ταυτότητα με την Wingless της *Drosophila* και 35% ταυτότητα με τη Wnt2 του ανθρώπου. Τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα κυστεΐνης υποδεικνύονται με κάθετες γραμμές. Η MOM-5 εμφανίζει 37% ταυτότητα με τη Frizzled της *Drosophila* και 34% με τη Frizzled2 του ανθρώπου. Το γραμμωσσιασμένο τμήμα υποδεικνύει την εξωκυτάρια περιοχή CRD (cysteine-rich extracellular domain) η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση με τους παράγοντες Wnt. Τα χαρακτηριστικά κατάλοιπα κυστεΐνης υποδεικνύονται με κάθετες γραμμές. Από Rocheleau et al. 1997.

1.8.4. Το μονοπάτι Notch και η εξειδίκευση του ABp

Εκτός από την εξειδίκευση του EMS το κύτταρο P2 ενέχεται και στην εξειδίκευση του ABp και την εγκαθίδρυση του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα.

Αν στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων γίνει μια αμοιβαία μετάθεση των ABa και ABp, το έμβρυο που προκύπτει είναι φυσιολογικό επομένως, τα δύο αυτά κύτταρα γεννιούνται ισοδύναμα (Priess and Thomson 1987). Ωστόσο στη φυσιολογική ροή των πραγμάτων το καθένα από τα δύο αυτά κύτταρα δίνει διαφορετικούς απογόνους: το ABa νευρώνες, επιδερμίδα και τον εμπρόσθιο φάρυγγα, ενώ το ABp μόνον επιδερμίδα και νευρώνες. Θα πρέπει λοιπόν το πεπρωμένο αυτών των δύο κυττάρων να καθορίζεται από τη θέση τους στο έμβρυο. Πειράματα στα οποία καταστρέφεται το P2 λίγο μετά τη γέννησή του έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια κάποιων από τους κυτταρικούς τύπους που δημιουργούνται από τους απογόνους του ABp (Bowerman et al.1992). Ακόμη, πειράματα στα οποία ένα επιπλέον ABa μεταμοσχεύεται έτσι ώστε να είναι σε επαφή με το P2 έχουν δείξει ότι αυτό το κύτταρο συμπεριφέρεται πλέον σαν ABp και οι απόγονοί του δίνουν όλους τους κυτταρικούς τύπους που φυσιολογικά προκύπτουν από το ABp. Τέλος, πειράματα στα οποία παρεμποδίζεται η επαφή του ABp με το P2 έχουν το ίδιο αποτέλεσμα με τα πειράματα στα οποία το P2 απομακρύνεται από το έμβρυο (Mello et al 1994). Τα παραπάνω πειράματα υποδεικνύουν ότι για την εξειδίκευση των απογόνων του ABp είναι απαραίτητη η επαφή μεταξύ ABp και P2.



Εικόνα 1.30.: Σύνοψη των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο έμβρυο των 4 κυττάρων του *C. elegans*. Από Han, 1997.

Δύο από τα γονίδια που ενέχονται στην αλληλεπίδραση ABp-P2 είναι τα *glp-1* και *apx-1*, τα οποία είναι ομόλογα των γονιδίων *Notch* και *Delta* αντίστοιχα. Σε έμβρυα που προέρχονται από ερμαφρόδιτα μεταλλάγματα *glp-1* το ABp συμπεριφέρεται σαν ABa (Moskowitz et al 1994). Η GLP-1 είναι η ομόλογη της Notch και εντοπίζεται στο βλαστομερίδιο AB και τους απογόνους του. Εφόσον η GLP-1 δεν συντίθεται στο P2 θα πρέπει το P2 να συνθέτει ένα μόριο που αναγνωρίζεται από την GLP-1 και αλληλεπιδρά με αυτή ούτως ώστε να διεκπεραιωθεί η επαγωγή. Το μόριο αυτό είναι η APX-1, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη ομόλογη ενός εκ των προσδετών της Notch, της Delta. Τα έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η APX-1 χαρακτηρίζονται από την παρουσία υπερανεπτυγμένων εμπρόσθιων φάρυγγικών δομών και απουσία δομών που συγκροτούνται από απογόνους του ABp. (Mango et al.1994). Η αλληλεπίδραση της GLP-1 με την APX-1 καταστρέφει τη συμμετρία μεταξύ των ABa και ABp, και εγκαθιδρύει τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα, επειδή επάγει διαφορετικό πεπρωμένο στους απογόνους του AB.

Στην **Εικόνα 30** παρουσιάζονται συνοπτικά οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στο έμβρυο του *C. elegans* κατά το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων.

1. 9. Ρύθμιση της έκφρασης κατά την πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans*

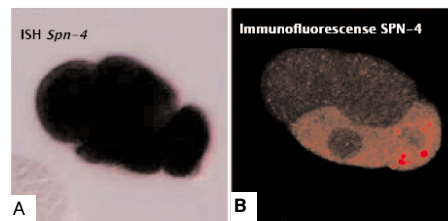
Η πρώιμη ανάπτυξη του *C. elegans* βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο γονιδίων μητρικής επίδρασης. Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τα μητρικά mRNA συνήθως κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιμοποιημένο αυγό. Η μετάφρασή τους όμως φαίνεται ότι γίνεται εντοπισμένα, δεδομένου ότι τα προϊόντα εντοπίζονται σε ένα μόνο τμήμα του εμβρύου (**Εικόνα 1.31**).

Η κατανομή των SKN-1, PIE-1, PAL-1 και GLP-1 ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες PAR. Για παράδειγμα η δράση της PAR-1 απαιτείται προκειμένου να κατανεμηθεί η PIE-1 στα βλαστικά κύτταρα (Tenenhaus et al 1998, Reese et al 2000). Επιπλέον, σε έμβρυα που προέρχονται από ωάρια από μεταλλάγματα *par-1*, η PAL-1 απουσιάζει και η SKN-1 κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλα τα βλαστομερίδια (Kemphues 2000). Εκτός από την PAR-1 και άλλα γονίδια *par* επηρεάζουν την κατανομή των SKN-1, PIE-1, PAL-1 και GLP-1 χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό.

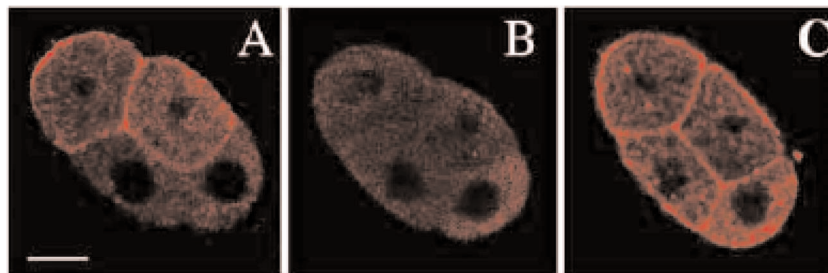
Μια άλλη ομάδα γονιδίων με ρυθμιστικό ρόλο κατά την πρώιμη ανάπτυξη περιλαμβάνει γονίδια όπως τα *mex-5/6*, *ros-1* και *mex-1* τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τα μητρικά mRNA και προάγουν ή καταστέλλουν τη μετάφρασή τους (Draper et al 1996, Schubert et al 2000, Tabara et al 1999). Από τη γενετικά πειράματα φαίνεται ότι τα γονίδια αυτά δρουν καθοδικά από τα γονίδια PAR και έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τη μετάφραση αρκετών μητρικών RNA.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση του γονιδίου *glp-1*. Το mRNA *glp-1* εντοπίζεται στο ωοκύτταρο και σε όλα τα βλαστομερίδια μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων. Η GLP-1 ωστόσο εντοπίζεται αρχικά στο AB και στη συνέχεια μόνο στα ABa και ABp (Evans 1994). Η μετάφραση του mRNA *glp-1* ρυθμίζεται τοπικά και χρονικά από *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία δρουν θετικά ή αρνητικά και βρίσκονται στο 3' UTR του (Evans 1994). Το προϊόν του γονιδίου μητρικής επίδρασης, *ros-1* που κατανέμεται στα οπίσθια βλαστομερίδια αναγνωρίζει ένα από τα στοιχεία αυτά και ελέγχει αρνητικά τη μετάφραση του mRNA *glp-1*. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.32** σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η POS-1, η GLP-1 ανιχνεύεται σε όλα τα βλαστομερίδια, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ρόλος της POS-1 είναι να καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA *glp-1* στα EMS και P2 (Ogura et al. 2003). Η POS-1 ρυθμίζει τη μετάφραση και άλλων μητρικών mRNA όπως του APX-1 (Tabara et al. 1999).

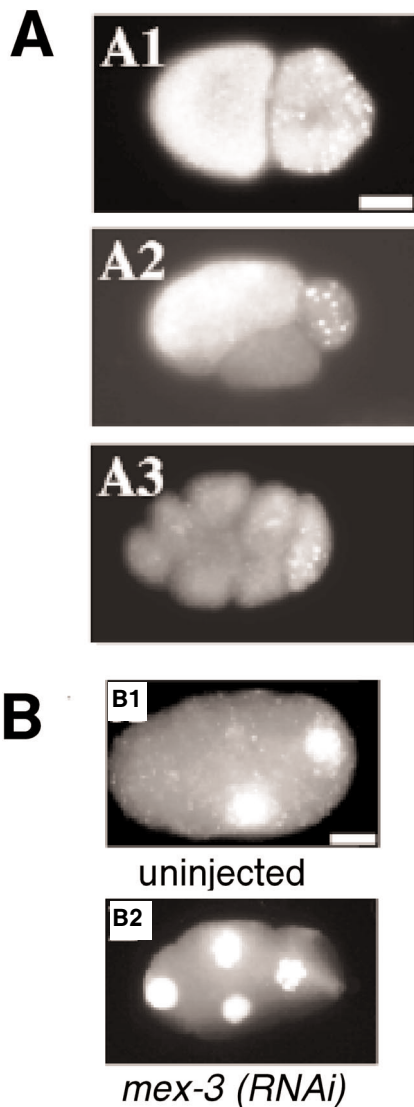
Η κατανομή των SKN-1, PIE-1 και PAL-1 ρυθμίζεται κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε για την GLP-1. Πριν από τη γονιμοποίηση τα mRNA των γονιδίων αυτών κατανέμονται ομοιό-



Εικόνα 1. 31.: (A) Κατανομή του mRNA του γονιδίου *spn-4* (υβριδοποίηση *in situ*) στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. (B) Κατανομή της πρωτεΐνης SPN-4 στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Παρότι το mRNA *spn-4* ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα και στα τέσσερα βλαστομερίδια, η πρωτεΐνη SPN-4 ανιχνεύεται μόνο στα οπίσθια βλαστομερίδια. Από Ogura, 2003.



Εικόνα 1. 32.: Μελέτη της κατανομής της GLP-1 στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα αντι-GLP-1. Η ράβδος που υποδεικνύει την κλίμακα είναι 10μM. (A) Έμβρυο άγριου τύπου η GLP-1 ανιχνεύεται μόνο στα εμπρόσθια βλαστομερίδια. (B) Έμβρυο *glp-1(RNAi)* στο έμβρυο αυτό η GLP-1 απουσιάζει. (C) Έμβρυο από το οποίο απουσιάζει η POS-1: η GLP-1 ανιχνεύεται και στα τέσσερα βλαστομερίδια. Από Ogura, 2003.



Εικόνα 1. 33.: (A1-A3) Μελέτη της κατανομής της MEX-3. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα αντι-MEX-3. (B) Απουσία MEX-3 η PAL-1 κατανέμεται ομοιόμορφα και στα τέσσερα βλαστομερίδια. (B1) Κατανομή της PAL-1 σε ένα έμβρυο άγριου τύπου στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. (B2) Κατανομή της PAL-1 σε ένα έμβρυο από το οποίο απουσιάζει η MEX-3 στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Η ράβδος που υποδεικνύει την κλίμακα είναι 10μΜ. Από Huang, 2002.

μορφα ωστόσο οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε μερικά μόνο βλαστομερίδια. Η μετάφραση των μητρικών αυτών mRNA ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από πρωτεΐνες που προσδέονται σε RNA. Για παράδειγμα η μετάφραση του mRNA *pal-1* καταστέλλεται από το προϊόν του γονιδίου MEX-3. Στα οπίσθια βλαστομερίδια στα οποία εκφράζεται η MEX-3 η PAL-1 απουσιάζει (Εικ. 33). Σε έμβρυα από ωάρια από μεταλλάγματα *mex-3* όλα τα βλαστομερίδια εκφράζουν PAL-1 (Hunter and Kenyon 1996, Draper et al. 1996) (Εικόνα 1.33). Όπως και η προαναφερθείσα POS-1 η MEX-3 είναι μια πρωτεΐνη που προσδέεται σε RNA (Draper et al. 1996). Με ανάλογο τρόπο οι σχεδόν όμοιες πρωτεΐνες πρόσδεσης σε RNA, MEX-5 και MEX-6 οι οποίες εκφράζονται στα εμπρόσθια βλαστομερίδια, καταστέλλουν τη μετάφραση μητρικών μνημάτων που εκφράζονται στη γενεαλογία P, όπως για παράδειγμα του *pie-1* (Schubert et al. 2000).

Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πρόσδεσης σε RNA POS-1, MEX-3 και MEX-5/6 εξαρτάται από τις πρωτεΐνες PAR αφού σε μεταλλάγματα *par* το πρότυπο έκφρασής τους μεταβάλλεται (Guo et al. 1995).

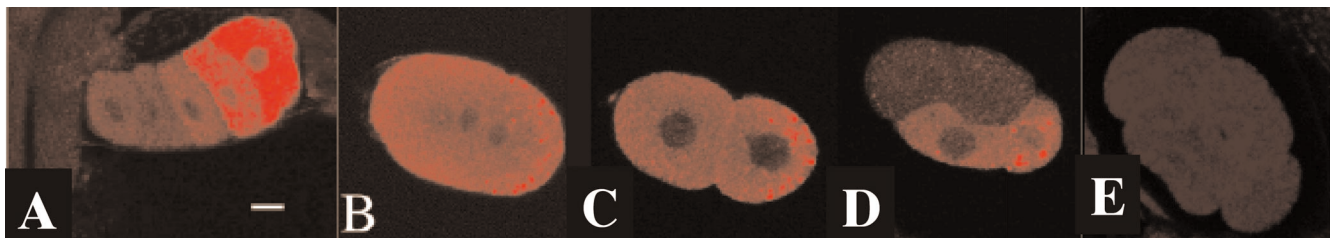
Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες πρόσδεσης σε RNA έχουν σαν αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική κατανομή ενός ή παραπάνω προϊόντων που ελέγχουν το πεπρωμένο ενός ή παραπάνω βλαστομεριδίων. Ωστόσο ο φαινότυπος των μεταλλαγμάτων αυτών δεν είναι τόσο βαρύς όσο αυτός των *par*, υποδεικνύοντας έτσι ότι θα πρέπει να υπάρχουν και άλλα γονίδια των οποίων τα προϊόντα τροποποιούν (ενισχύουν ή καταστέλλουν) τη δράση των POS-1, MEX-3 και MEX-5/6.

Ένα τέτοιο γονίδιο φαίνεται ότι είναι το *spn-4*. Το γονίδιο αυτό κλωνοποιήθηκε ανεξάρτητα από τρεις διαφορετικές ομάδες με βάση διαφορετικές ιδιότητές του: πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη MEX-3, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την POS-1 καθώς και κατά σάρωση με σκοπό την κλωνοποίηση γονιδίων που επηρεάζουν τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου (Gomes et al. 2001, Huang et al. 2002, Ogura et al. 2003).

Ο φαινότυπος των εμβρύων που προέρχονται από ομόζυγα μεταλλάγματα *spn-4* είναι πολύπλοκος. Στα έμβρυα αυτά παρατηρούνται προβλήματα στον προσανατολισμό της ατράκτου, απουσία εντέρου και τμήματος του μυϊκού ιστού του φάρυγγα, αύξηση του αριθμού των μυϊκών κυττάρων των τοιχωμάτων του σώματος καθώς και μεγάλος αριθμός γαμετικών κυττάρων. Τα περισσότερα από τα προβλήματα αυτά οφείλονται στη μη φυσιολογική κατανομή των SKN-1, PAL-1, PIE-1 αλλά και στην απουσία της GLP-1.

Η SPN-4 αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή της πρώιμης ανάπτυξης του *C. elegans*. Η SPN-4 κατανέμεται ομοιόμορφα πριν από τη γονιμοποίηση στο ωάριο, στη συνέχεια στο ζυγωτό καθώς και στα δύο βλαστομερίδια μετά την πρώτη αυλακωτική διαίρεση. Στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων όμως, η κατανομή της SPN-4 μεταβάλλεται: παρατηρούνται υψηλά επίπεδά της στα οπίσθια βλαστομερίδια και χαμηλά επίπεδά της στα εμπρόσθια βλαστομερίδια (Εικόνα 1.34).

Η SPN-4 είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης σε RNA η οποία χαρακτηρίζεται από ευρεία εξειδίκευση. Όπως προαναφέρθηκε σε

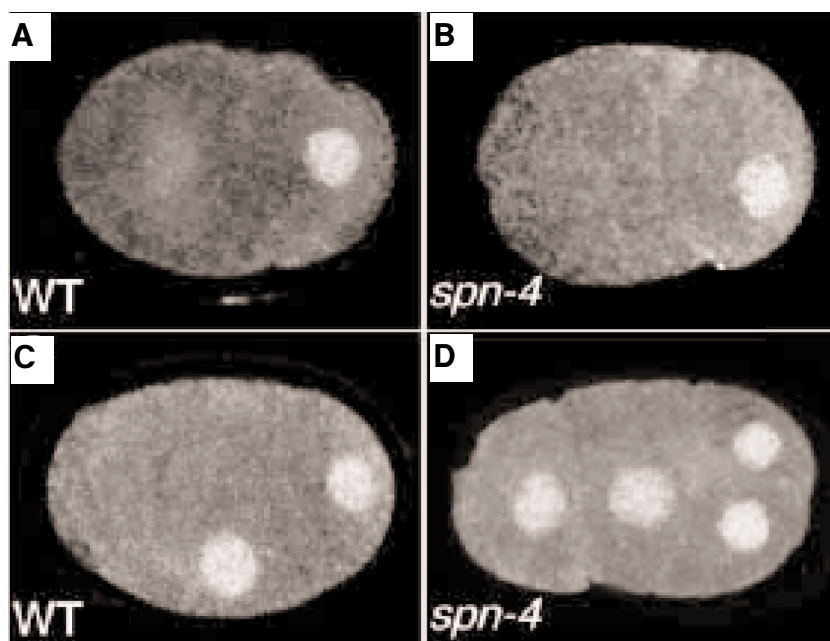


έμβρυα από μεταλλάγματα *spn-4*, η GLP-1 απουσιάζει. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η SPN-4 είναι απαραίτητη για τη μετάφραση του mRNA *glp-1*. Πράγματι η SPN-4 αναγνωρίζει *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία στην 3' UTR του mRNA *glp-1*, διαφορετικά από αυτά που αναγνωρίζει η POS-1. Επίσης η SPN-4 φαίνεται ότι ρυθμίζει και τα γονίδια *skn-1* και *pal-1* δεδομένου ότι η κατανομή τους επηρεάζεται σε μεταλλάγματα *spn-4* (η κατανομή της SKN-1 σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η SPN-4 φαίνεται στην **Εικόνα 1.35**).

Εκτός όμως από τη δυνατότητα πρόσδεσης σε μόρια mRNA η SPN-4 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι MEX-5/6, MEX-1 και POS-1 δημιουργώντας έτσι σε διαφορετικά βλαστομερίδια συμπλέγματα με διαφορετικά χαρακτηριστικά τα οποία ευθύνονται τελικά για την κατανομή των πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν, κατά την πρώιμη ανάπτυξη του νηματώδους, το πεπρωμένο. Οι μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένες αλληλεπιδράσεις καθώς και τα αποτελέσματα μιας σειράς γενετικών πειραμάτων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.36**.

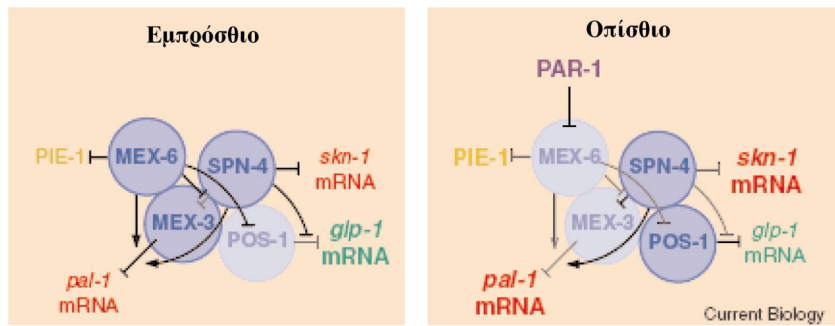
Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου εξασφαλίζεται η διαφορεική κατανομή των πρωτεϊνών στα βλαστομερίδια περιλαμβάνει την ειδική αποικοδόμηση. Για παράδειγμα μέχρι το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων το mRNA *pie-1* κατανέμεται ομοιόμορφα και μεταφράζεται (Reese et al. 2000). Ωστόσο κατά τις πρώτες αυλακωτικές διαίρεσεις (των P0, P1-3) η PIE-1 κατανέμεται στο βλαστικό κύτταρο (Εικ. 1.25, Mello et al. 1996, Tenenhaus et al. 1998). Η κατανομή αυτή επιτυγχάνεται τόσο με μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την ασύμμετρη κατανομή της στο βλαστικό κύτταρο κατά τη μίτωση όσο και σε μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την αποικοδόμησή της στο σωματικό απόγονο της διαίρεσης. Ο αρχικός εμπλουτισμός της

Εικόνα 1.34.: Η SPN-4 ανιχνεύεται στη γονάδα και το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα αντι-SPN-4. (A) Ωοκύτταρα από ενήλικο ζώο. (B) Έμβρυο ενός κυττάρου αμέσως πριν από τη διαίρεση. Η SPN-4 κατανέμεται ομοιόμορφα (C) Έμβρυο στο στάδιο των δύο κυττάρων. Η SPN-4 κατανέμεται ομοιόμορφα. (D) έμβρυο στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Η SPN-4 ανιχνεύεται μόνον στα οπίσθια βλαστομερίδια. (E) Έμβρυο από μετάλλαγμα *spn-4*. Η οράβδος που υποδεικνύει την κλίμακα είναι 10μΜ. Από Ogura, 2003.



Εικόνα 1.35.: Η κατανομή της SKN-1 στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων επηρεάζεται από την SPN-4. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα αντι- SKN-1. (A-B) Έμβρυα σταδίου δύο κυττάρων (A) έμβρυο άγριου τύπου (B) έμβρυο από το οποίο απουσιάζει η SPN-4. Δεν παρατηρείται διαφορά στην κατανομή της SKN-1 (C-D) Έμβρυα σταδίου τεσσάρων κυττάρων (C) έμβρυο άγριου τύπου- η SKN-1 κατανέμεται μόνο στα οπίσθια βλαστομερίδια (D) έμβρυο από το οποίο απουσιάζει η SPN-4 η SKN-1 κατανέμεται ομοιόμορφα και στα τέσσερα βλαστομερίδια. Από Gomes, 2001.

Εικόνα 1.36.: Ένα μοντέλο που παρουσιάζει συνοπτικά τα δεδομένα που αφορούν στις αλληλεπιδράσεις (γενετικές ή φυσικές) που λαμβάνουν χώρα στο εμπρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του εμβρύου. Οι γενετικές αλληλεπιδράσεις υποδεικνύονται με γραμμές (θετικές = έντονες γραμμές, αρνητικές = λεπτές γραμμές). Οι πρωτεΐνες παρουσιάζονται ως κύκλοι. Κάθε κύκλος είναι χρωματισμένος ελαφρά ή έντονα ανάλογα με το κατά πόσον η πρωτεΐνη είναι παρούσα (έντονο χρώμα) ή όχι στο έμβryo του σταδίου των τεσσάρων κυττάρων. Κύκλοι που εφάπτονται υποδεικνύουν ότι υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν την ύπαρξη φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των αντίστοιχων μορίων. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι οι φυσικές αλληλεπιδράσεις που απεικονίζονται στο σχήμα λαμβάνουν χώρα ταυτοχρόνως. Με έντονα γράμματα υποδεικνύεται η έκφραση των παραγόντων που ενέχονται στην εξειδίκευση των βλαστομεριδίων. Από Labbe, 2002.



PIE-1 στο βλαστικό κύτταρο εξαρτάται από τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού. Αναστολείς του πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης έχουν ως αποτέλεσμα την συμμετρική κατανομή της PIE-1 (Reese et al. 2001). Εκτός όμως από τα ινίδια ακτίνης στην ασυμμετρική κατανομή συνεισφέρουν και μηχανισμοί πρωτεόλυσης που αποικοδομούν την PIE-1 μόνο στο σωματικό απόγονο της κάθε διαίρεσης. Η αλληλεπίδραση της PIE-1 με την πρωτεΐνη ZIF-1 έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της πρώτης μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει αρκετές άλλες πρωτεΐνες (De Renzo et al. 2003) (**Εικόνα 1.37**). Στα βλαστικά κύτταρα η αποικοδόμηση της PIE-1 μέσω ZIF-1 ελέγχεται αρνητικά από την PAR-1. Η ZIF-1 αλληλεπιδρά *in vitro* και με άλλες πρωτεΐνες όπως οι MEX-1, POS-1, και MEX-5 γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν και αυτές να αποτελούν στόχο ειδικής αποικοδόμησης (De Renzo et al. 2003).

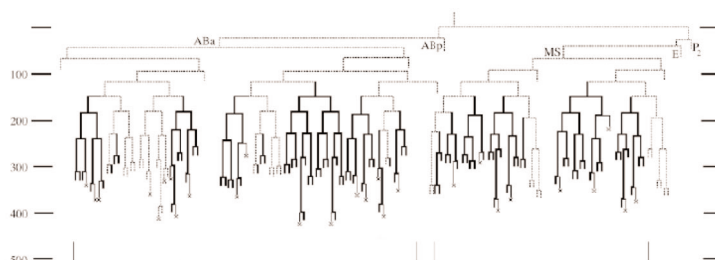


Εικόνα 1. 37.: Η ZIF-1 αλληλεπιδρά με την PIE-1 και επηρεάζει την κατανομή της. (A) Στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων η υβριδική πρωτεΐνη GFP::PIE-1ZFI εκφράζεται στα οπίσθια βλαστομερίδια (στην κατασκευή αυτή η το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της GFP έχει συγχωνευθεί με τμήμα του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της PIE-1 το οποίο έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με την ZIF-1 στο σύστημα δύο υβριδίων. Η έκφραση της κατασκευής αυτής βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του *pie-1*). (B) Στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων σε ένα έμβryo που στερείται της ZIF-1 η υβριδική πρωτεΐνη GFP::PIE-1ZFI κατανέμεται και στα τέσσερα βλαστομερίδια. Από De Renzo, 2003.

1.10. Η διαφοροποίηση του φάρυγγα: από τα γονίδια μητρικής επίδρασης στα ζογωτικά

Ο φάρυγγας του *C. elegans* αποτελείται από 80 κύτταρα που ανήκουν σε πέντε κυτταρικούς τύπους: νευρώνες, μυϊκά, οριακά, επιθηλιακά και αδενικά. Τα κύτταρα αυτά είναι απόγονοι είτε του ABa είτε του MS (**Εικόνα 1.38**). Ανεξάρτητα πάντως από τη γενεαλογία τους όλα τα κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε φαρυγγικά εκφράζουν από τα πρώιμα στάδια του σχηματισμού του οργάνου αυτού το ζυγωτικό γονίδιο *pha-4* το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας forkhead. Στα μεταλλάγματα *pha-4* δεν σχηματίζεται φάρυγγας (**Εικόνα 1.39**). Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν θερμοευαίσθητα μεταλλάγματα *pha-4*, έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό απαιτείται σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης του φάρυγγα. Επιπλέον εκτοπική έκφραση του *pha-4* αρκεί για να επανεξειδικεύσει τα κύτταρα που το εκφράζουν σε φαρυγγικά (Horner et al. 1998). Φαίνεται λοιπόν ότι το γονίδιο *pha-4*

Εικόνα 1. 38.: Η γενεαλογία των κυττάρων που συγκροτούν το φάρυγγα του *C.elegans*. Με έντονες γραμμές υποδεικνύονται οι γενεαλογίες από τις οποίες προκύπτουν αποκλειστικά κύτταρα του φάρυγγα. Με x υποδεικνύονται τα κύτταρα που ακολουθούν απόπτωση. Αριστερά σημειώνεται ο χρόνος. Από Kalb, 1998.



υποκινητών γονιδίων των οποίων ή έκφραση ξεκινά σε διαφορετικά στάδια, φάνηκε ότι η έναρξη της έκφρασης ρυθμίζεται από συγγένεια των στοιχείων TRTTKRY για τον PHA-4. Έτσι, γονίδια που φέρουν στον υποκινητή τους στοιχεία TRTTKRY με υψηλή συγγένεια για τον PHA-4 αρχίζουν να εκφράζονται σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης του φάρυγγα (**Εικόνα 1.40**). Μεταλλάξεις που μετατρέπουν ένα υψηλής συγγένειας στοιχείο TRTTKRY σε ένα στοιχείο χαμηλής συγγένειας, έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου που το φέρει κατά 2-3 ώρες (Gaudet and Mango, 2002).

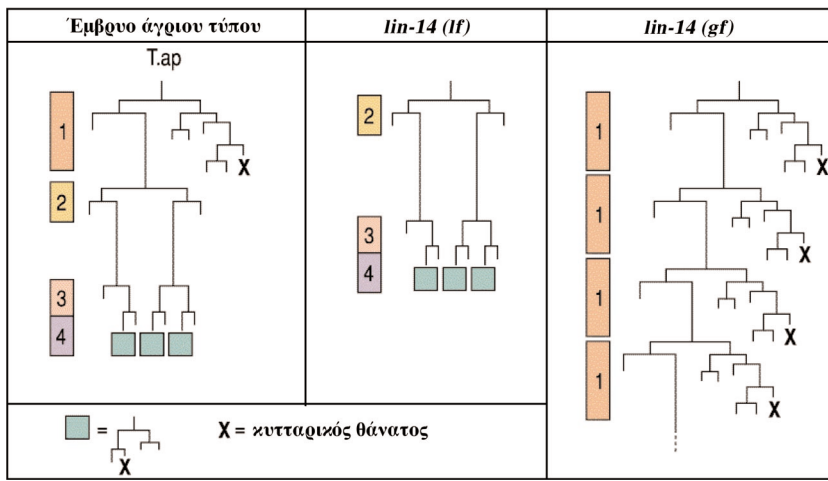
1.11. Ετεροχρονικά γονίδια

Μέχρι τώρα εστιαστήκαμε στους μηχανισμούς οι οποίοι ενέχονται στην στον σχηματισμό του προτύπου (του σχεδίου) του εμβρύου στο χώρο. Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούμε σε γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη χρονικά. Ο συγχρονισμός διαφόρων αναπτυξιακών γεγονότων είναι απαραίτητος προκειμένου να ολοκληρωθούν επιμέρους στάδια της ανάπτυξης όπως για παράδειγμα η γαστρίδιωση ή η έκδυση.

Επειδή στον *C. elegans* είναι γνωστή η κυτταρική γενεαλογία καθενός από τα κύτταρά του είναι δυνατόν να χαρακτηριστούν γονίδια τα οποία ελέγχουν το χρονική αλληλουχία (timing) διαφόρων γεγονότων. Κάθε κυτταρική διαίρεση του νηματώδους συμβαίνει σε καθορισμένο χρόνο και με καθορισμένο προσανατολισμό και αποτέλεσμα (συμμετρική ή όχι). Ο έλεγχος της ανάπτυξης στο χρόνο ελέγχεται γενετικά από μια ομάδα γονιδίων που ονομάζονται ετεροχρονικά γονίδια (heterochronic genes). Στα μεταλλάγματα των γονιδίων αυτών ορισμένα κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται σύμφωνα με πρότυπα που χαρακτηρίζουν διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης.

1.11.1. Τα γονίδια *lin-14* και *lin-4*

Το γονίδιο *lin-14* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της υποδερμίδας, των εντερικών κυττάρων και ορισμένων νευρώνων (Runkun et al. 1991). Κατά τη μετεμβρυϊκή ανάπτυξη στην κυτταρική γενεαλογία της υποδερμίδας το βλαστικό κύτταρο Tap διαιρείται σύμφωνα με το πρότυπο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.41**. Σε έμβρυα άγριου τύπου η LIN-14 συντίθεται στην προνύμφη πρώτου σταδίου (L1). Σε ομόζυγα μεταλλάγματα απώλειας ενεργότητας του *lin-14* χάνεται το πρότυπο των κυτταρικών διαιρέσεων του Tap που παρατηρείται στα πρώιμα στάδια της προνύμφης (Εικ. 1.41). Αντίθετα τα ομόζυγα μεταλλάγματα κέρδους λειτουργίας του *lin-14* χαρακτηρίζονται από καθυστέρηση της ανάπτυξης: στα μεταλλάγματα αυτά επαναλαμβάνεται το πρότυπο διαίρεσης της προνύμφης πρώτου σταδίου (Εικ.1.41). Τα απο-

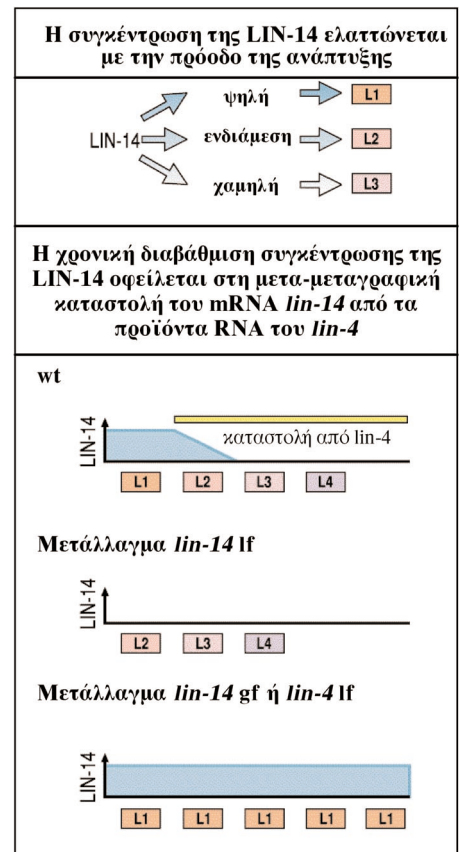


τελέσματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν αν υποθέταμε ότι κατ' αναλογία με τις διαβαθμίσεις συγκέντρωσης στο χώρο υπάρχουν και διαβαθμίσεις συγκέντρωσης στο χρόνο (temporal gradient). Στην περίπτωση αυτή διαφορετικές συγκεντρώσεις ενός μορίου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επάγουν διαφορετικό πεπρωμένο. Κάτι τέτοιο συμβαίνει στην περίπτωση της LIN-14: η συγκέντρωσή της στον πυρήνα ελαττώνεται προϊούσης της ανάπτυξης: η συγκέντρωση της LIN-14 στο στάδιο L2 είναι 25X μικρότερη από την συγκέντρωση που ανιχνεύεται κατά την εκκόλαψη της προνύμφης πρώτου σταδίου.

Με ποιο τρόπο ρυθμίζεται η συγκέντρωση της LIN-14; Δύο από τις μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας του *lin-14* εντοπίζονται στην 3' UTR. Στα ομόζυγα μεταλλάγματα που φέρουν τις μεταλλάξεις αυτές η συγκέντρωση της LIN-14 δεν ελαττώνεται με την πρόοδο της ανάπτυξης. Επομένως η 3' UTR του γονιδίου *lin-14* φέρει αλληλουχίες που ευθύνονται για την χρονική διαβάθμιση συγκέντρωσης του προϊόντος του. Οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από δύο μικρά RNA προϊόντα του γονιδίου *lin-4*. Το γονίδιο *lin-4* κωδικοποιεί μόνο δύο μικρά RNA μήκους 22 και 61 νουκλεοτιδίων τα οποία είναι συμπληρωματικά με αλληλουχίες που απαντούν σε πολλαπλά αντίτυπα στην 3' UTR του *lin-14* (Lee et al 1993, Wightman et al. 1993). Το ζευγάρι ανάμεσα στα μικρά RNA *lin-4* και την 3' UTR του *lin-14* οδηγεί στο σχηματισμό δευτεροταγών δομών που παρεμποδίζουν τη μετάφραση του mRNA *lin-14* (Ha et al.1996, Olson and Ambros 1999). Η μεταγραφή του *lin-4* ξεκινά στο στάδιο L2. Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι η χρονική διαβάθμιση συγκέντρωσης του *lin-14* οφείλεται στην καταστολή της μετάφρασης του mRNA *lin-14*. Στο στάδιο L1 η συγκέντρωση της LIN-14 είναι υψηλή. Καθώς το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται αρχίζει η μεταγραφή του *lin-4* γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της LIN-14 (**Εικόνα 1.42**). Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται από τη μελέτη μεταλλαγμάτων του *lin-4*: τα μεταλλάγματα απώλειας λειτουργίας του γονιδίου αυτού έχουν τον ίδιο φαινότυπο (επανάληψη του προτύπου διαίρεσης L1) με αυτόν των μεταλλαγμάτων κέρδους λειτουργίας του *lin-14* (Εικ. 1. 42).

Εικόνα 1.41.: Πρότυπα διαίρεσης του T.ap σε έμβρυα άγριου τύπου και σε έμβρυα που φέρουν ετεροχρονικές μεταλλάξεις. Τα μεταλλάγματα απώλειας λειτουργίας του *lin-14* (μεσαίο τμήμα) εμφανίζουν προβλήματα στο χρονοισμό (timing) των κυτταρικών διαιρέσεων: οι κυτταρικές διαιρέσεις που λαμβάνουν χώρα στην προνύμφη πρώτου σταδίου απουσιάζουν. Τα μεταλλάγματα κέρδους λειτουργίας του *lin-14* (δεξί τμήμα) εμφανίζουν προβλήματα στο χρονοισμό (timing) των κυτταρικών διαιρέσεων: στα άτομα αυτά επαναλαμβάνεται το πρότυπο των διαιρέσεων της προνύμφης πρώτου σταδίου. Από το βιβλίο *Principles of Development*.

Εικόνα 1.42.: Ένα πιθανό μοντέλο που εξηγεί τον χρονικό έλεγχο του προτύπου των διαιρέσεων του T.ap. Από το βιβλίο *Principles of Development*.



Βιβλία

Analysis of Biological Development. Kalthoff K. Mac Graw Hill
2nd Edition, 2001.

Developmental Biology. Gilbert S. Sinauer Associates 7th
Edition, 2003.

Embryology Gilbert S.(Editor) Sinauer Associates, 2004.

Essential Developmental Biology. Slack J.Blackwell Science,
2001.

Molecular Principles of Animal Development. Martinez-Ariaz
A., Stewart A. Oxford University Press, 2002.

Principles of Development. Wolpert L., Beddington P., Jessel
T., Lawrence P., Meyerowitz E., Smith J. Oxford University
Press 2nd Edition, 2002.

Principles of Developmental Biology. Wilt F., Hake S. Norton &
Company, 2004.

Άρθρα

Amiri A., Keiper D., Kawasaki I., Fan Y, Kohara Y., Rhoads R.,
and Strome S.

An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is
required for spermatogenesis in *C. elegans*.

Development 2001 128, 3899-3912.

Ahringer J.

Maternal control of a zygotic patterning gene in *Caenorhabditis
elegans*

Development 1997 124, 3865-3869.

Ao W., Gaudet J., Kent W. Muttumu S., Mango S.

Environmentally Induced Foregut Remodeling by PHA-4/FoxA
and DAF-12/NHR.

Science, 305 1743-1746.

Bei Y, Hogan J, Berkowitz LA, Soto M, Rocheleau CE, Pang
KM, Collins J, Mello CC.

SRC-1 and Wnt signaling act together to specify endoderm and
to control cleavage orientation in early *C. elegans* embryos.

Dev Cell. 2002 3, 113-25.

Blackwell TK, Bowerman B, Priess JR, Weintraub H.
Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP
and homeodomain elements.
Science. 1994 266, 621-8.

Bowerman B, Eaton BA, Priess JR.
skn-1, a maternally expressed gene required to specify the fate
of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo.
Cell 1992 Mar 20;68(6):1061-75.

Bowerman B, Draper BW, Mello CC, Priess JR.
The maternal gene skn-1 encodes a protein that is distributed
unequally in early *C. elegans* embryos.
Cell 1993 74, 443-52.

Boyd L., GuoS., Levitan D., Stinchcomb D.T. and Kemphues K.
PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association
of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos
Development 1996 122, 3075-3084.

Browning H. and Strome S.
A sperm-supplied factor required for embryogenesis in *C.*
elegans.
Development 1996 122, 391-404.

Cai Y, Yu F, Lin S, Chia W, Yang X.
Apical complex genes control mitotic spindle geometry and
relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pl
asymmetric divisions.
Cell 2003 112, 51-62.

Colombo K, Grill S., Kimple R., Willard F.S., Siderovski D., P.,
and Gönczy P.
Translation of Polarity Cues into Asymmetric Spindle
Positioning in *Caenorhabditis elegans* Embryos
Science 2003 300, 1957-1961.

Cuenca A., Schetter A., Aceto D., Kemphues K. and Seydoux
G.
Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct
establishment and maintenance phases.
Development 130, 1255-1265.

Dantoni J.C. Quintin S., Lakatos L., Labouesse M., and Tora
L.
TBP-like Factor Is Required for Embryonic RNA Polymerase II
Transcription in *C. elegans*.
Molecular Cell 2000 6, 715-722.

DeRenzo C., Reese K., & Geraldine Seydoux

Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation.

Nature 2003 424, 685-689.

Draper B., Mello C, Bowerman B., Hardin J. and Priess J.
MEX-3 Is a KH Domain Protein That Regulates Blastomere Identity in Early *C. elegans* Embryos.

Cell 1996 87, 205-216.

Drewes G, Ebneth A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E.
MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption.

Cell. 1997 89, 297-308.

Doe CQ, Bowerman B.

Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote.

Curr Opin Cell Biol. 200113, 68-75.

Evans TC, Crittenden SL, Kodoyianni V, Kimble J.

Translational control of maternal glp-1 mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo.

Cell 1994 77, 183-94.

Gaudet J. and Mango S.E.

Regulation of Organogenesis by the *Caenorhabditis elegans* FoxA Protein PHA-4

Science 295 821-825.

Grill SW, Gonczy P, Stelzer EH, Hyman AA.

Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo.

Nature. 2001 409,630-3.

Guo S, Kemphues KJ.

A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*.

Nature. 1996 382, 455-8.

Guo S, Kemphues KJ.

Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo.

Curr Opin Genet Dev. 1996 6, 408-15. Review.

Guo S. and Kemphues K.

par-1 a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed.

Cell 1995 61, 611-620.

Goldstein B.

Induction of gut in *Caenorhabditis elegans* embryos.
Nature 1992 357, 255-7.

Goldstein B.
Establishment of gut fate in the E lineage of *C. elegans*: the roles of lineage dependent mechanisms and cell interactions.
Development. 1993 118, 1267-77.

Goldstein B., Hird S. and White J.
Cell polarity in early *C. elegans* development.
Development 1993 Supplement, 279-287.

Goldstein B. and Hird S.
Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*.
Development 1996 122, 1467-1474.

Gomes J., Encalada S., Swan K., Shelton C., Carter J. C. and Bowerman B.
The maternal gene *spn-4* encodes a predicted RRM protein required for mitotic spindle orientation and cell fate patterning in early *C. elegans* embryos.
Development 2001 128, 4301-4314.

Gotta M, Ahringer J.
Axis determination in *C. elegans*: initiating and transducing polarity.
Curr Opin Genet Dev. 2001 11, 367-73. Review.

Gruidl ME, Smith PA, Kuznicki KA, McCrone JS, Kirchner J, Roussell DL, Strome S, Bennett KL.
Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 93,13837-42.

Ha I, Wightman B, Ruvkun G.
A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* *lin-14* temporal gradient formation.
Genes Dev. 1996 10, 3041-50.

Han M.
Gut Reaction to Wnt Signaling in Worms.
Cell 90, 581-584.

Hill DP, Strome S.
Brief cytochalasin-induced disruption of microfilaments during a critical interval in 1-cell *C. elegans* embryos alters the partitioning of developmental instructions to the 2-cell embryo.
Development. 1990 108, 159-72.

Hill DP, Shakes DC, Ward S, Strome S.

A sperm-supplied product essential for initiation of normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* is encoded by the paternal-effect embryonic-lethal gene, *spe-11*.
Dev Biol. 1989 136, 154-66.

Hird SN, White JG.
Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*.
J Cell Biol. 1993 Jun;121(6):1343-55.

Hird S.
Cortical actin movements during the first cell cycle of the *Caenorhabditis elegans* embryo.
J Cell Sci. 1996 109, 525-33.

Huang N., Mootz D., Walhout A., Vidal M. and Hunter C.
MEX-3 interacting proteins link cell polarity to asymmetric gene expression in *Caenorhabditis elegans*.
Development 2002 129, 747-759.

Hung T.-J. and Kemphues K.
PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos.
Development 1999 126, 127-135.

Hunter C. and Kenyon C.
Spatial and Temporal Controls Target *pal-1* Blastomere-Specification Activity to a Single Blastomere Lineage in *C. elegans* Embryos.
Cell 1996 87, 217-226.

Horner M., Quintin S., Domeier M.-E., Kimble J. Labouesse M. and Mango S.E.
pha-4, an HNF-3 homolog, specifies pharyngeal organ identity in *Caenorhabditis elegans*.
Genes & Development 1998 12, 1947-1952.

Kalb J., Lau K., Goszczynski B., Fukushige T., Moons D., Okkema P. and McGhee J.
pha-4 is a fork head/HNF-3a,b,g homolog that functions in organogenesis of the *C. elegans* pharynx.
Development 1998 125, 2171-2180.

Kawasaki I, Shim YH, Kirchner J, Kaminker J, Wood WB, Strome S.
PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*.
Cell 1998 94, 635-45.

Kemphues K.
PARsing Embryonic Polarity

Cell 2000 101, 345-348.

Kuwabara P.

The multifaceted *C. elegans* major sperm protein: an ephrin signaling antagonist in oocyte maturation.
Genes & Development 2003 17:155-161.

Labbé J.-C. and Goldstein B.

Embryonic Development: on Cell Fate Specification
Current Biology 2002 12, 396-398.

Labbe J. , Maddox P., Salmon E., and Goldstein B.

PAR Proteins Regulate Microtubule Dynamics at the Cell Cortex in *C. elegans*.
Current Biology 2003 13, 707-714.

Lambert J. D.& Nagy L.

Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages.
Nature 2002 420, 682-686.

Lee J.-Y. and Goldstein B.

Mechanisms of cell positioning during *C. elegans* gastrulation.
Development 2003 130, 307-320.

Lee R., Feinbaum R., and Ambros V.

The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*.
Cell 1993 75, 843-854.

Levitan DJ, Boyd L, Mello CC, Kemphues KJ, Stinchcomb DT.
par-2, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding

motifs.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 91, 6108-12.

Lin R., Thompson S., and Priess J.

pop-1 Encodes an HMG Box Protein Required for the Specification of a Mesoderm Precursor in Early *C. elegans* Embryos.
Cell 1995 83, 599-609.

Lorson MA, Horvitz HR, van den Heuvel S.

LIN-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*.
J Cell Biol. 2000 Jan 10;148(1):73-86.

Lyczak R, Gomes J.-E., and Bowerman B. R

Heads or Tails: Cell Polarity and Axis Formation in the Early *Caenorhabditis elegans* Embryo.

Developmental Cell 2002 3, 157-166.

Maduro M., Meneghini M., Bowerman B., Broitman-Maduro G. and Rothman J.

Restriction of Mesendoderm to a Single Blastomere by the Combined Action of SKN-1 and a GSK-3b Homolog Is Mediated by MED-1 and -2 in *C. elegans*
Molecular Cell 2001 7, 475-485.

Maduro M. and Rothman J.

Making Worm Guts: The Gene Regulatory Network of the *Caenorhabditis elegans* Endoderm.
Developmental Biology 2002 246, 68-85.

Mango S., Lambie E. and Kimble J.

The pha-4 gene is required to generate the pharyngeal primordium of *Caenorhabditis elegans*.
Development 1994 120, 3019-3031.

Mello CC, Draper BW, Krause M, Weintraub H, Priess JR.

The pie-1 and mex-1 genes and maternal control of blastomere identity in early *C. elegans* embryos.
Cell 1992 70, 163-76.

Mello CC, Draper BW, Priess JR.

The maternal genes apx-1 and glp-1 and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo.
Cell 1994 77, 95-106

Mello CC, Schubert C, Draper B, Zhang W, Lobel R, Priess JR.

The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos.
Nature. 1996 382, 710-2

Meneghini M., Ishitani T., Clayton Carter J., Hisamoto N., Ninomiya-Tsuji J., Thorpe C., Hamill D., Matsumoto K. & Bowerman B.

MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*.
Nature 1999 399, 793-797.

Miller KG, Rand JB.

A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*.
Genetics. 2000 Dec;156(4):1649-60.

Morton DG, Roos JM, Kemphues KJ.

par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis.

Genetics. 1992 130, 771-90.

Morton DG, Shakes DC, Nugent S, Dichoso D, Wang W,
Golden A, Kempthues KJ.

The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. Dev Biol. 2002 241, 47-58.

Moskowitz IP, Gendreau SB, Rothman JH.

Combinatorial specification of blastomere identity by glp-1-dependent cellular interactions in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Development 1994 120, 3325-38.

O'Connell KF.

The centrosome of the early *C. elegans* embryo: inheritance, assembly, replication, and developmental roles.

Curr Top Dev Biol. 2000 49, 365-84.

Ogura K., Kishimoto N., Mitani S., Gengyo-Ando K. and Kohara K.

Translational control of maternal glp-1 mRNA by POS-1 and its interacting protein SPN-4 in *Caenorhabditis elegans*.

Development 2003 130, 2495-2503.

Olsen PH, Ambros V.

The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.

Dev Biol. 1999 216, 671-80.

Priess JR, Thomson JN.

Cellular interactions in early *C. elegans* embryos.

Cell. 1987 48, 241-50.

Putzke A. and Rothman J.

Gastrulation: PARTaking of the Bottle

Current Biology 2003 13, R223-R225.

Rappleye CA, Tagawa A, Lyczak R, Bowerman B, Aroian RV.

The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation.

Dev Cell. 2002 2, 195-20

Reese K., Dunn M., Waddle J. and Seydoux G.

Asymmetric Segregation of PIE-1 in *C. elegans* Is Mediated by Two Complementary Mechanisms that Act through Separate PIE-1 Protein Domains.

Molecular Cell 2000 6, 445-455.

Rocheleau C., Downs W., Lin R., Wittmann C., Bei Y., Cha Y.-H., Ali M., Priess J. and Mello C.
Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. elegans* Embryos.
Cell 1997 90, 707-716.

Rocheleau C. Yasuda Y., Shin T., Lin Y., Sawa H., Okano H. Priess J. Davis R., and Mello C.
WRM-1 Activates the LIT-1 Protein Kinase to Transduce Anterior/Posterior Polarity Signals in *C. elegans*.
Cell 1999 97, 717-726.

Rose L. and Kemphues K.
The let-99 gene is required for proper spindle orientation during cleavage of the *C. elegans* embryo
Development 1998 125, 1337-1346.

Rose LS, Lamb ML, Hird SN, Kemphues KJ.
Pseudocleavage is dispensable for polarity and development in *C. elegans* embryos.
Dev Biol. 1995 Apr;168(2):479-89.

Ruvkun G, Wightman B, Burglin T, Arasu P.
Dominant gain-of-function mutations that lead to misregulation of the *C. elegans* heterochronic gene lin-14, and the evolutionary implications of dominant mutations in pattern-formation genes.
Development Suppl. 1991;1:47-54.

Sadler P. and Shakes D.
Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo
Development 2000 127, 355-366.

Schlesinger A., Shelton C., Maloof J., Meneghini M. and Bowerman B.
Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo.
Genes & Development 1999 13, 2028-2038.

Schubert C., Lin R., de Vries C., Plasterk R. and Priess J.
MEX-5 and MEX-6 Function to Establish Soma/Germline Asymmetry in Early *C. elegans* Embryos.
Molecular Cell 2000 5, 671-682.

Seydoux G, Mello CC, Pettitt J, Wood WB, Priess JR, Fire A.
Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*.
Nature. 1996 382, 713-6.

Shin T.H., Yasuda J., Rocheleau C., Lin R., Soto M., Bei Y., Davis R., and C. Mello.
MOM-4, a MAP Kinase Kinase Kinase-Related Protein, Activates WRM-1/LIT-1 Kinase to Transduce Anterior/Posterior Polarity Signals in *C. elegans*.
Molecular Cell 1999 4, 275-280.

Shulman JM, Benton R, St Johnston D.
The Drosophila homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole.
Cell. 2000 12101(4), 377-88.

Siegfried K. and Kimble J.
POP-1 controls axis formation during early gonadogenesis in *C. elegans*
Development 2002 129, 443-453.

Smith P., Leung-Tsou M., Montgomery A., Osborn A., Kuznicki E., Gressman-Coberly L., Mutapcic L. and Bennet K.
The GLH proteins *C. elegans* P granule components associate with CSN-5 and KGB-1 proteins necessary for fertility and with ZYX-1 a predicted cytoskeletal protein.
Developmental Biology 2002 251, 333-347.

Strome S. and Wood W. Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos.
Cell 1983 35, 15-25.

Sun T.-Q., Lu B., Feng J.-J., Reinhard C., Jan Y.-N., Fant W and Williams L.
PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling.
Nature Cell Biology 2001 3, 632-636.

Tabara H., Hill R., Mello C., Priess J. R. and Kohara Y.
pos-1 encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C. elegans*.
Development 1999 126, 1-11.

Tabuse Y., Izumi Y., Piano F., Kemphues K., Miwa J. and Ohno S.
Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*.
Development 1998 125, 3607-3614.

Tenenhaus C, Schubert C, Seydoux G.
Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of *Caenorhabditis elegans*.
Dev Biol. 1998 200, 212-24.

- Thummel C.
Molecular Mechanisms of Developmental Timing in *C. elegans*
and *Drosophila*
Developmental Cell 2001 1, 453-465.
- Thorpe C., Schlesinger A., Clayton Carter E.C. and Bowerman B.
Wnt Signaling Polarizes an Early *C. elegans* Blastomere to Distinguish Endoderm from Mesoderm
Cell 1997 90, 695-705.
- Tsou M.F., Hayashi A., DeBella L., McGrath M. and S. Rose L.
LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in *C. elegans* embryos.
Development 2002 129, 4469-4481.
- Tsou M.F., Hayashi A. and Rose L.
LET-99 opposes Gα/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling.
Development 2003 130, 5717-5730.
- Wallenfang M. & Seydoux G.
Polarization of the anterior- axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process
Nature 2000 408, 89-92.
- Wang L., Eckmann R., Kadyk L., Wickens M. & Kimble J.
A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*
Nature 2002 312-315.
- Watts J., Morton D., Bestman J. and Kemphues K.
The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry
Development 2000 127, 1467-1475.
- Watts J, Etemad-Moghadam B., Guo S., Boyd L., Draper B., Mello C., Priess J. and Kemphues K.
par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3.
Development 1996 122, 3133-3140.
- Wightman B., Ha I. and Ruvkun G.
Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene lin-14 by lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*.
Cell 1993 75, 855-862.

