

# Εμβρυολογία και Μοριακή Βιολογία Ανάπτυξης



**Ενότητα 2:**  
Από τις βασικές αρχές στη μεθοδολογία και τις  
τεχνικές

Μ. Γρηγορίου 2024

1

### Μεθοδολογία και τεχνικές

- ▶ Εμβρυολογία
- ▶ Γενετική Ανάπτυξης
- ▶ Μοριακή Βιολογία

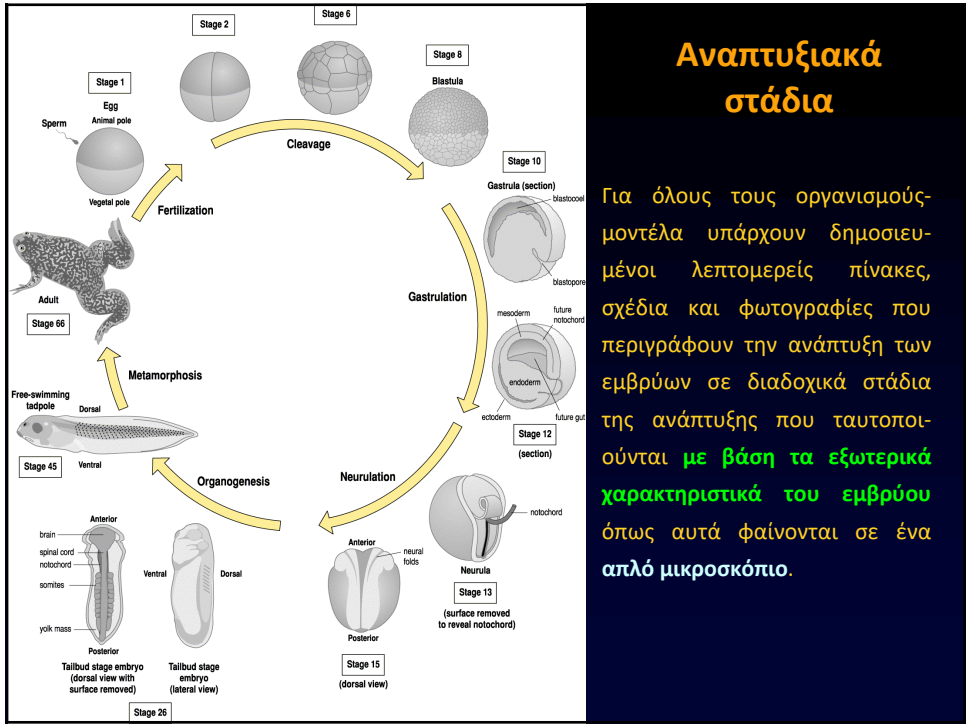
FB (E13.5)  
NT (E13.5)  
gut (E13.5)  
tRNA

Ihx6 →  
COX →

Normal hunchback knirps

A B  
C D

2

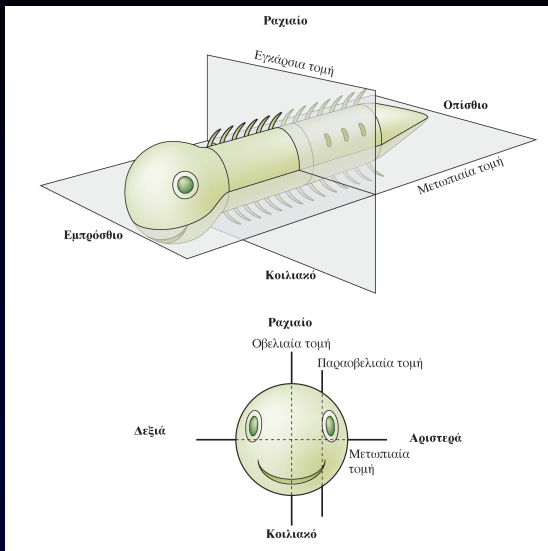


## Αναπτυξιακά στάδια

Για όλους τους οργανισμούς-μοντέλα υπάρχουν δημοσιευμένοι λεπτομερείς πίνακες, σχέδια και φωτογραφίες που περιγράφουν την ανάπτυξη των εμβρύων σε διαδοχικά στάδια της ανάπτυξης που ταυτοποιούνται με βάση τα εξωτερικά χαρακτηριστικά του εμβρύου όπως αυτά φαίνονται σε ένα απλό μικροσκόπιο.

3

## Περιγραφική/ Πειραματική Εμβρυολογία



Για την περιγραφή των εμβρύων και τον καθορισμό της θέσης διαφόρων δομών τους χρησιμοποιούμε ένα σύστημα τριών συντεταγμένων:

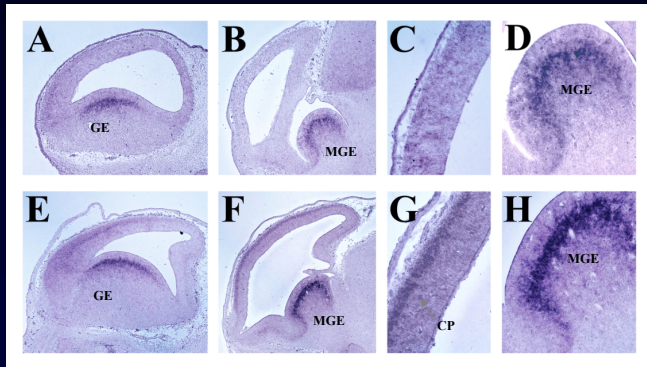
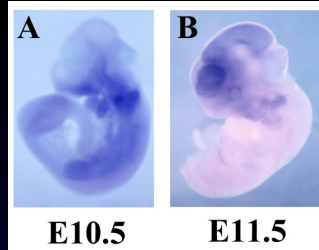
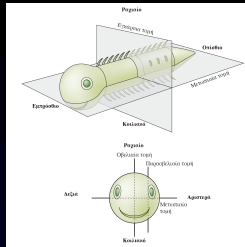
- ▶ εμπροσθοπίσθιος άξονας
- ▶ ραχιαίος- κοιλιακός άξονας
- ▶ δεξι- αριστερό \*

Οι τομές γίνονται σε ένα από τα τρία επίπεδα:

- ▶ εγκάρσιο,
- ▶ μετωπιαίο και
- ▶ οβελιαίο.

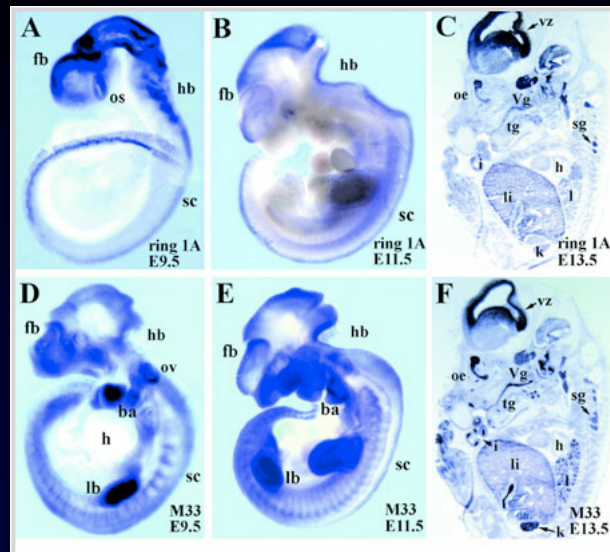
4

**Περιγραφική/ Πειραματική Εμβρυολογία**



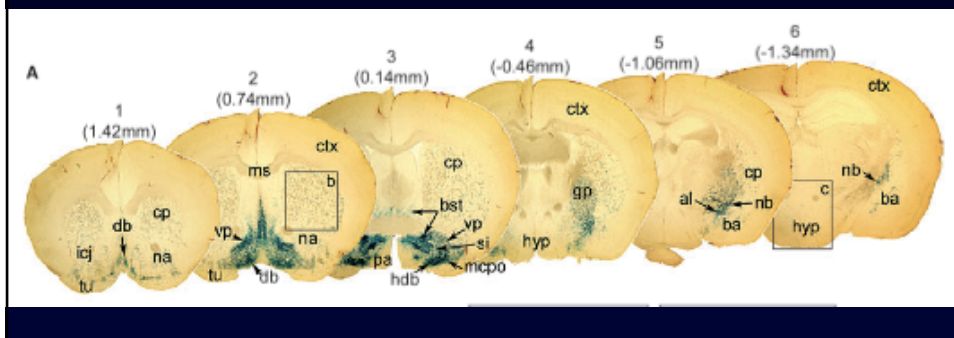
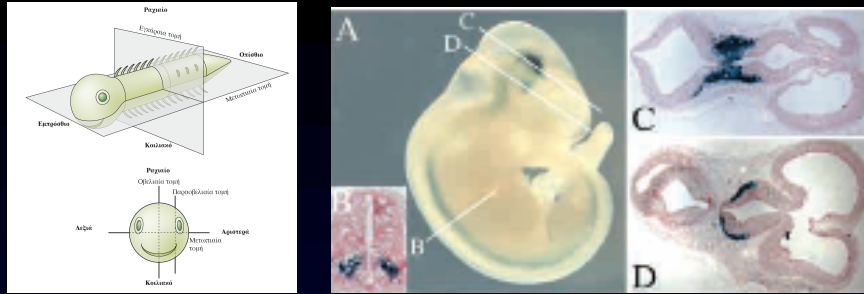
5

**Περιγραφική/ Πειραματική Εμβρυολογία**



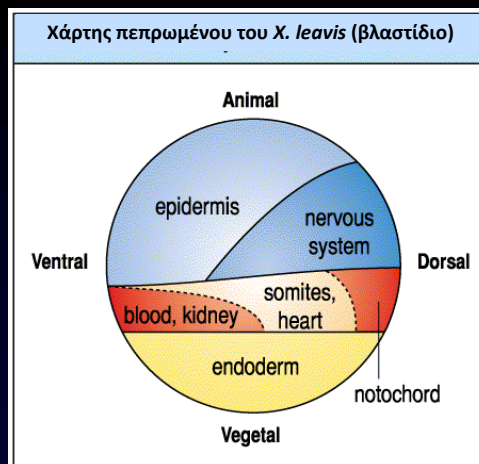
6

## Περιγραφική/ Πειραματική Εμβρυολογία



7

## Χάρτες πεπρωμένου (fate maps)



Οι χάρτες πεπρωμένου είναι διαγράμματα που παρουσιάζουν την αναπτυξιακή πορεία (δηλ. το πεπρωμένο) που πρόκειται να ακολουθήσουν τα κύτταρα του εμβρύου. Μας δείχνει δηλαδή το φυσιολογικό πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων του εμβρύου σε ένα συγκεκριμένο στάδιο.

8

## Μέθοδοι χαρτογράφησης εμβρύων

- ▶ Παρατήρηση ζωντανών εμβρύων (μόνο για διαφανή έμβρυα).
- ▶ Παρατήρηση εμβρύων στα οποία μερικά κύτταρα έχουν σημειωθεί:
  - με ζωτικές εξωκυττάρια χρωστικές (vital dyes) ή με φθορίζουσες ουσίες (fluorescent dyes).
  - με ζωτικές ενδοκυττάρια χρωστικές.
  - γενετικά (μεταλλάξεις ή μοριακές μέθοδοι)

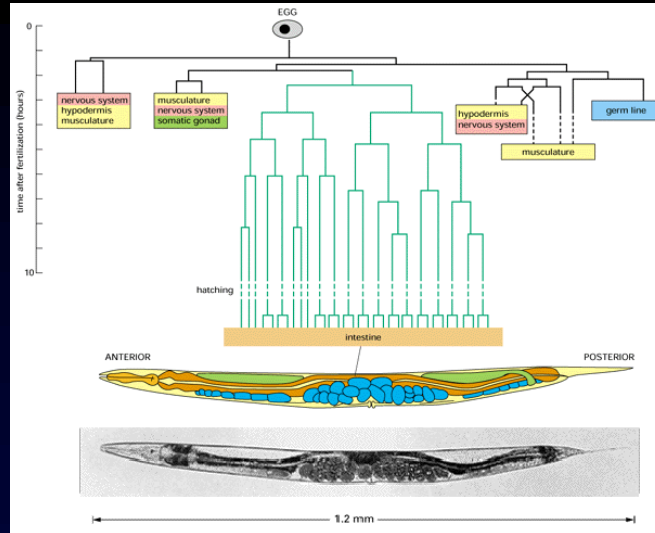
9

## Μέθοδοι χαρτογράφησης εμβρύων

Οι χάρτες πεπρωμένου θα είναι πιο ακριβείς στην περίπτωση ενός εμβρύου που ακολουθεί το ρυθμιστικό μοντέλο της ανάπτυξης ή ενός εμβρύου που ακολουθεί το μωσαϊκό μοντέλο της ανάπτυξης;

10

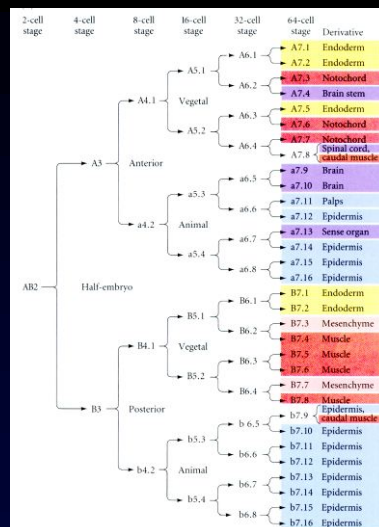
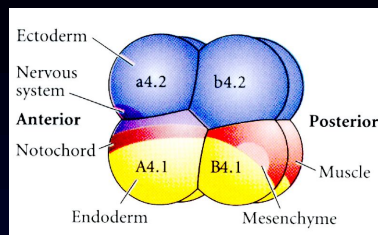
### Ο χάρτης πεπρωμένου του *C. elegans* J. E. Sulston et al. 1983



Η ακρίβεια ενός χάρτη πεπρωμένου εξαρτάται από το έμβryo - η τυχαία ανάμιξη κυττάρων μειώνει την ακρίβειά του (μωσαϊκό - ρυθμιστικό).

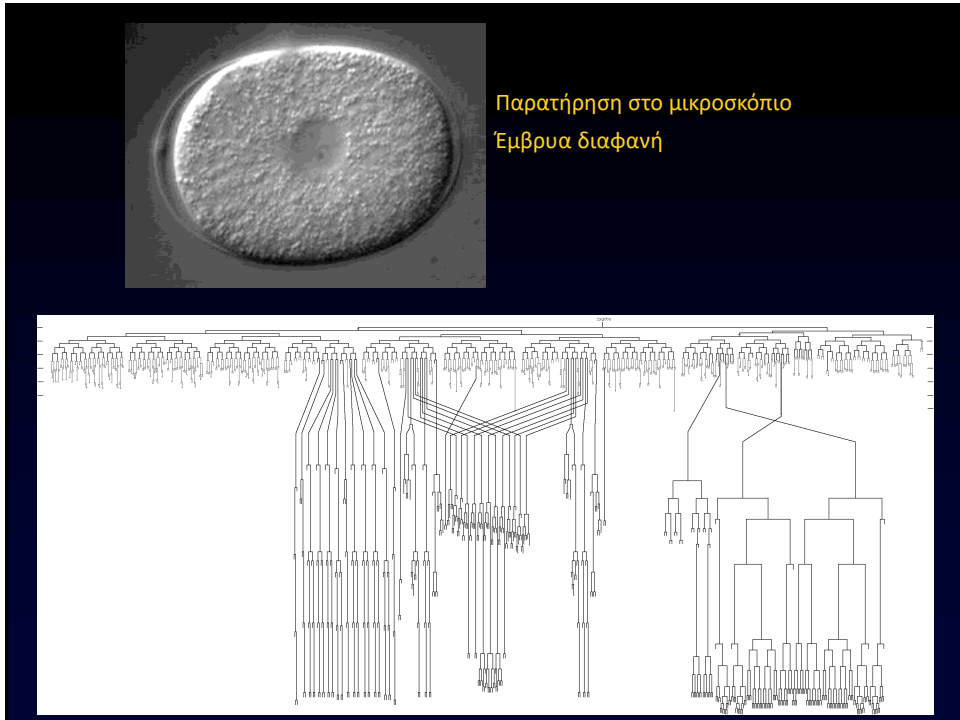
11

### Παρατήρηση ζωντανών εμβρύων: Ο χάρτης πεπρωμένου του ασκιδίου *Styela partita* (E. G. Conklin 1905)



Απλή παρατήρηση - ύπαρξη χρωστικών διευκολύνει την παρατήρηση

12



13

### Ο χάρτης πεπρωμένου του *C. elegans*.

**A**

ABa AB ABp EMS P1 P2 P3  
MS E

**B**

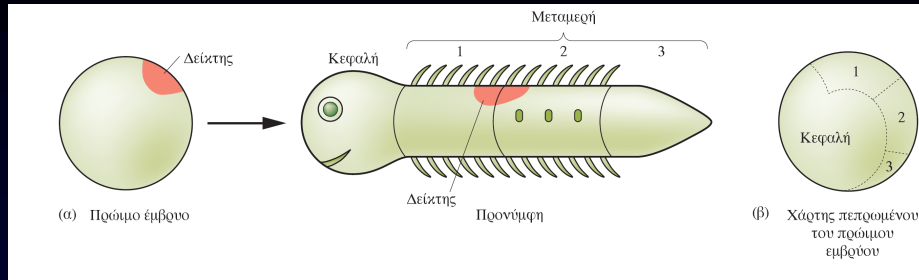
AB P1  
ABp  
ABa P2  
EMS

**C**

Πειράματα καταστροφής  
κυττάρων με λείζερ.

14

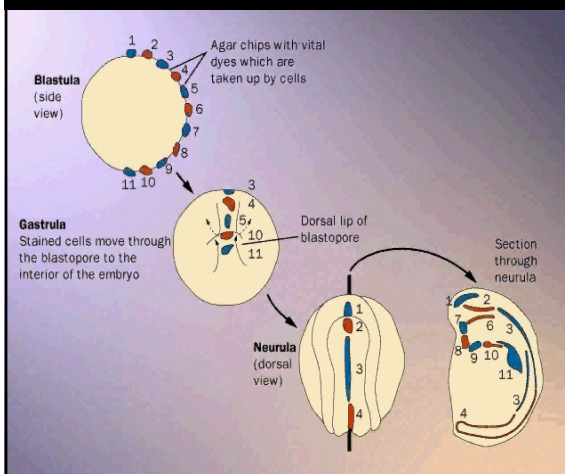
## Σχεδιασμός χάρτη πεπρωμένου



Στο πρώτο έμβryo σημαίνονται μεμονωμένα κύτταρα ή περιοχές και εξετάζεται, σε ένα μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο, η θέση και το σχήμα του σημασμένου τμήματος

15

## Σήμανση κυττάρων με ζωτικές χρωστικές (vital dyes)



Η παλαιότερη μέθοδος σήμανσης. Όταν τοποθετούνται στο έμβryo ένα μικρό ποσοστό τους ενσωματώνεται σε μερικά κύτταρα χωρίς να προκαλεί κανένα πρόβλημα (ζωτικές) Nile blue, Neutral Red. Τα κύτταρα αυτά μπο-ρούμε να τα παρακολου-θήσουμε στη συνέχεια.

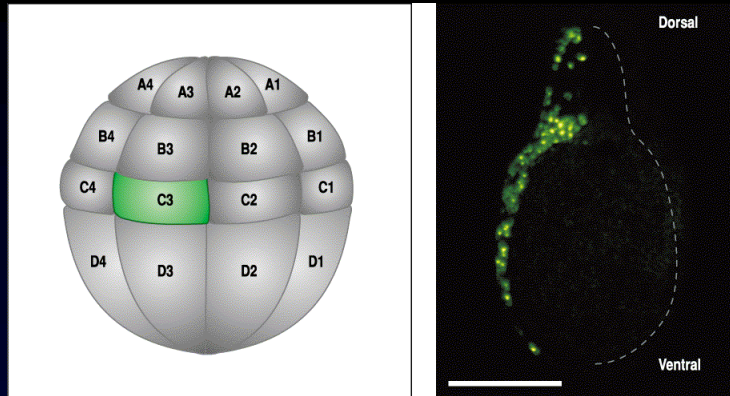
📖 φθινές, εύρηστες και γρήγορες.

👉 δύσκολο να σημάνει κανείς κύτταρα στο εσωτερικό, διαχέονται και εξασθενούν γρήγορα.

16



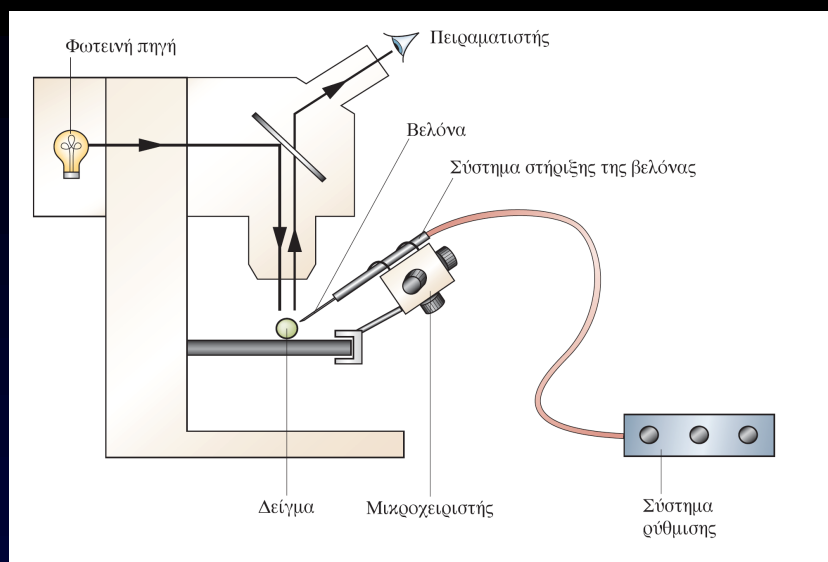
## Σήμανση κυττάρων με φθορίζουσες ζωτικές χρωστικές



- ▶ Dil και DiO.
- ▶ Εφαρμόζονται με μικροένεση.
- ▶ Είναι υδροφοβικές και ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη και σημαίνουν τα κύτταρα αυτά και τους απογόνους τους.

17

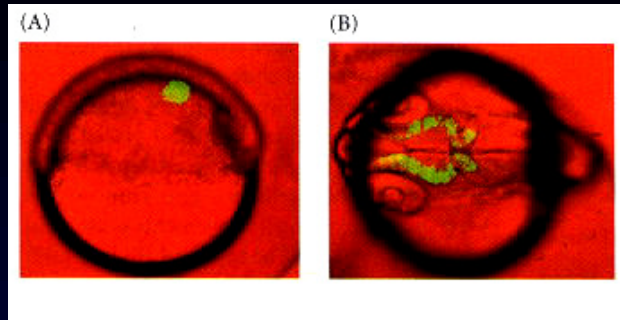
## Μικροενέσεις (microinjections)



Συνθηθισμένη διάταξη για μικροενέσεις σε έμβρυα.

18

## Σήμανση κυττάρων με ζωτικές ενδοκυττάριας χρωστικές



- ▶ Φθορίζουσες δεξτράνες (fluorescent dextrans).
- ▶ Εφαρμόζονται με μικροένεση.
- ▶ Μεγάλο MB (10.000)- παραμένουν στο κύτταρο που ενίονται και στους απογόνους του.

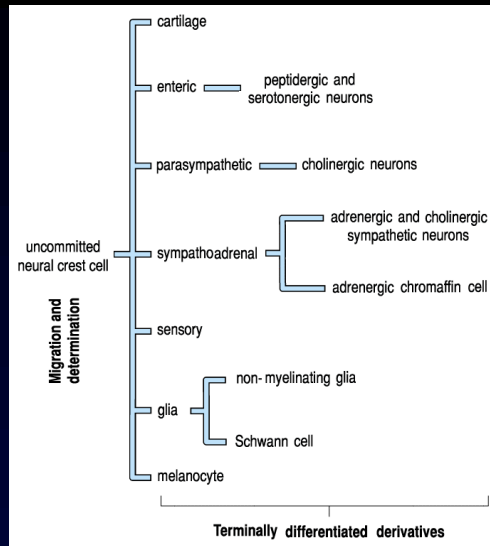
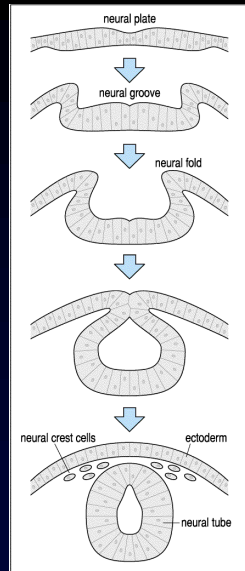
19

## Γενετική σήμανση κυττάρων

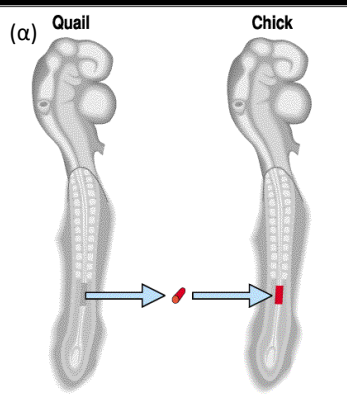


20

## Τα πειράματα της Nicole le Douarin



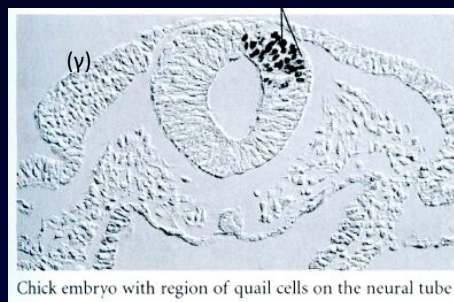
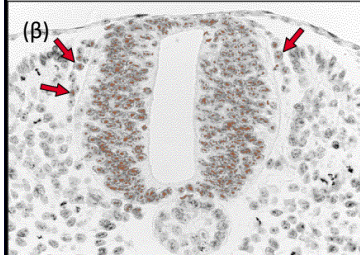
21



## Τα πειράματα της Nicole le Douarin

Μεταμόσχευση κυττάρων από το ορτύκι στο κοτόπουλο.

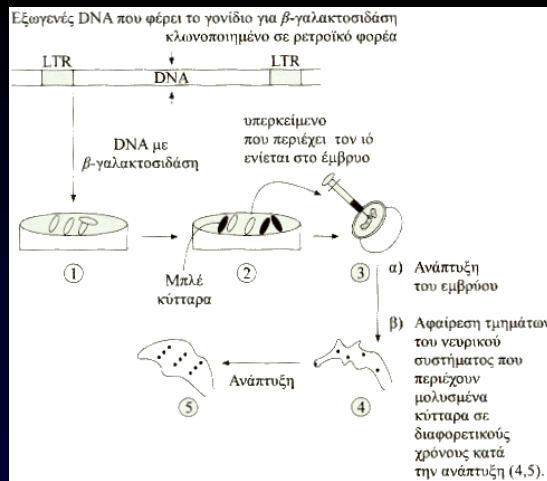
Τα κύτταρα του ορτυκιού εντοπίζονται είτε χάρη στον χαρακτηριστικό τους πυρηνίσκο (β) είτε με τη βοήθεια ειδικού αντισώματος (γ).



Chick embryo with region of quail cells on the neural tube

22

## Σήμανση κυττάρων με τη χρήση ρετροϊών

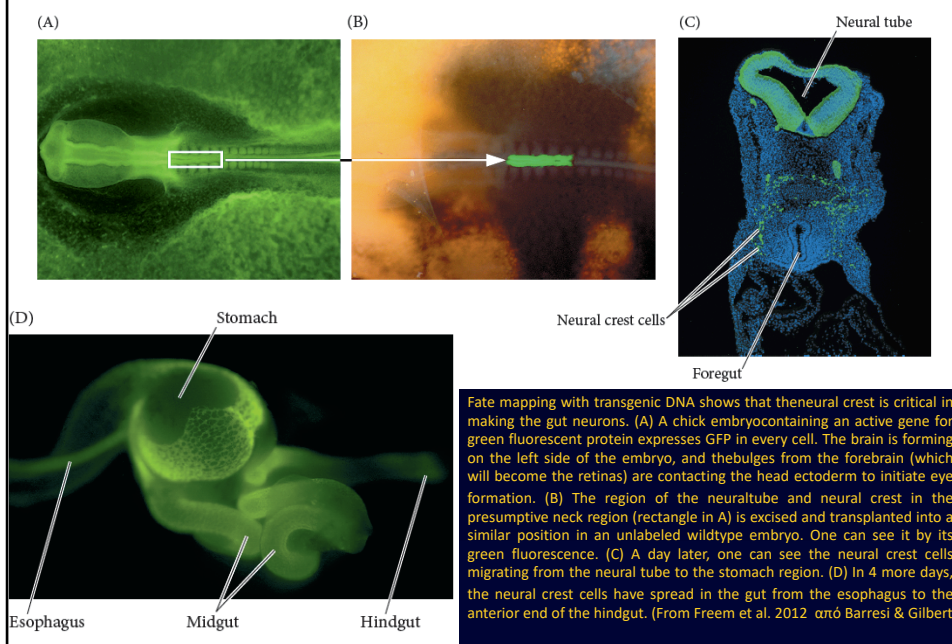


- ▶ Έχει χρησιμοποιηθεί στο κοτόπουλο.
- ▶ Μια περιοχή του εμβρύου μολύνεται με μια μικρή ποσότητα ενός ανασυνδυασμένου ρετροϊού από τον οποίο απουσιάζουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για το πακετάρισμα.
- ▶ Ο ανασυνδυασμένος ιός περιλαμβάνει κάποιο γονίδιο αναφοράς π.χ. *lacZ* ή *GFP*.

Με τη μέθοδο αυτή σημαίνονται όλα τα κύτταρα και οι απόγονοί τους χωρίς να υπάρχει εξασθένηση ή αραιώση του σήματος από γενιά σε γενιά όπως συμβαίνει με τις χρωστικές.

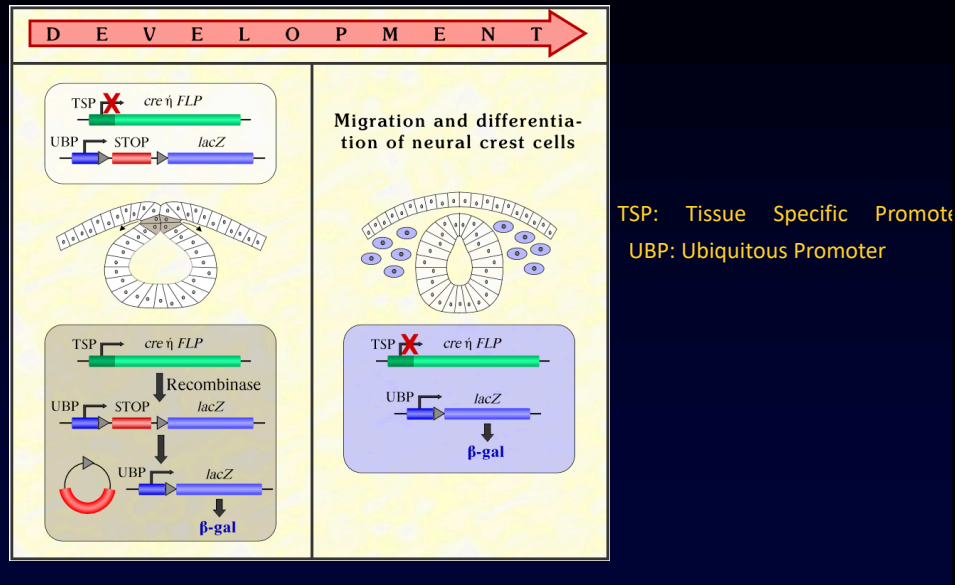
23

## Γενετική σήμανση σε συνδυασμό με μεταμόσχευση



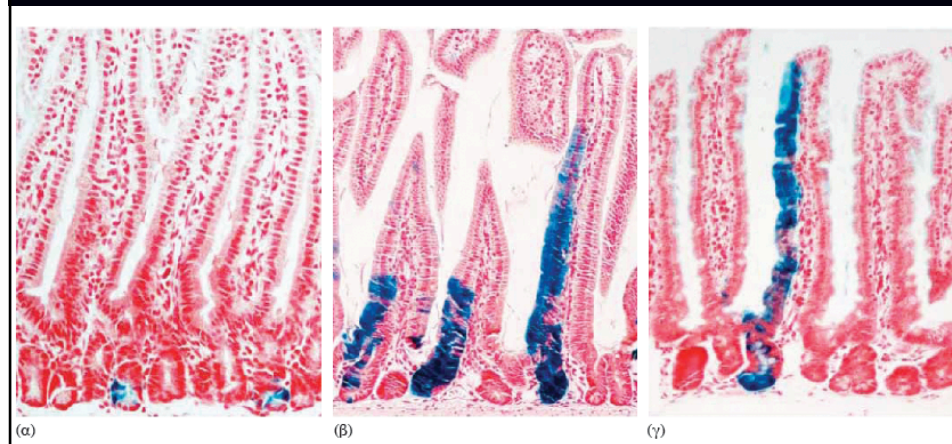
24

## Χαρτογράφηση πεπρωμένου των απογόνων κυττάρων που εκφράζουν ένα γονίδιο-μάρτυρα

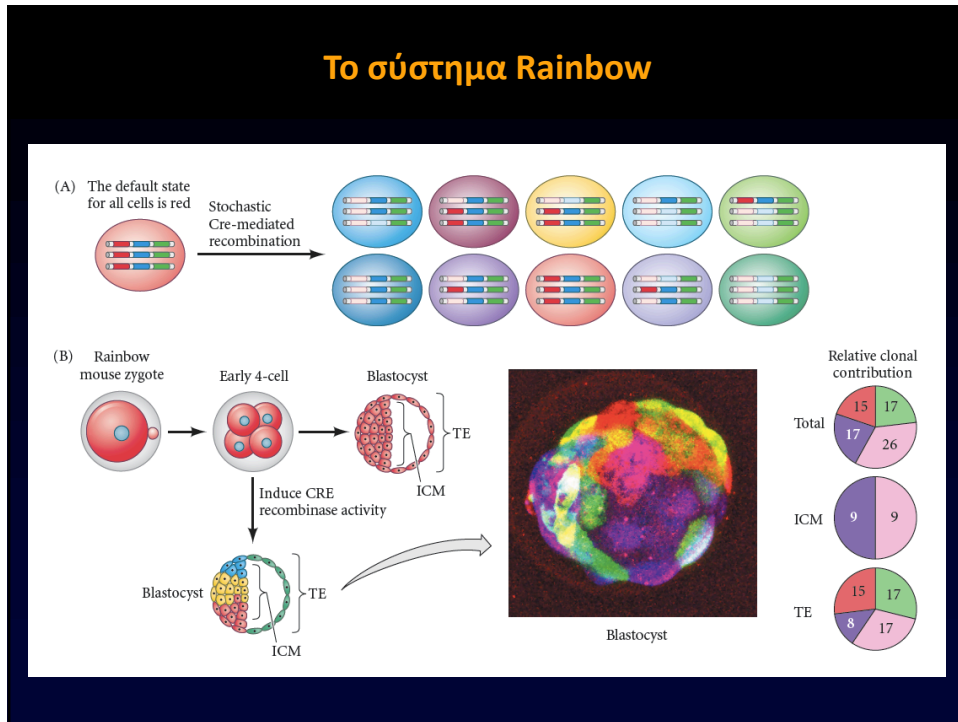


25

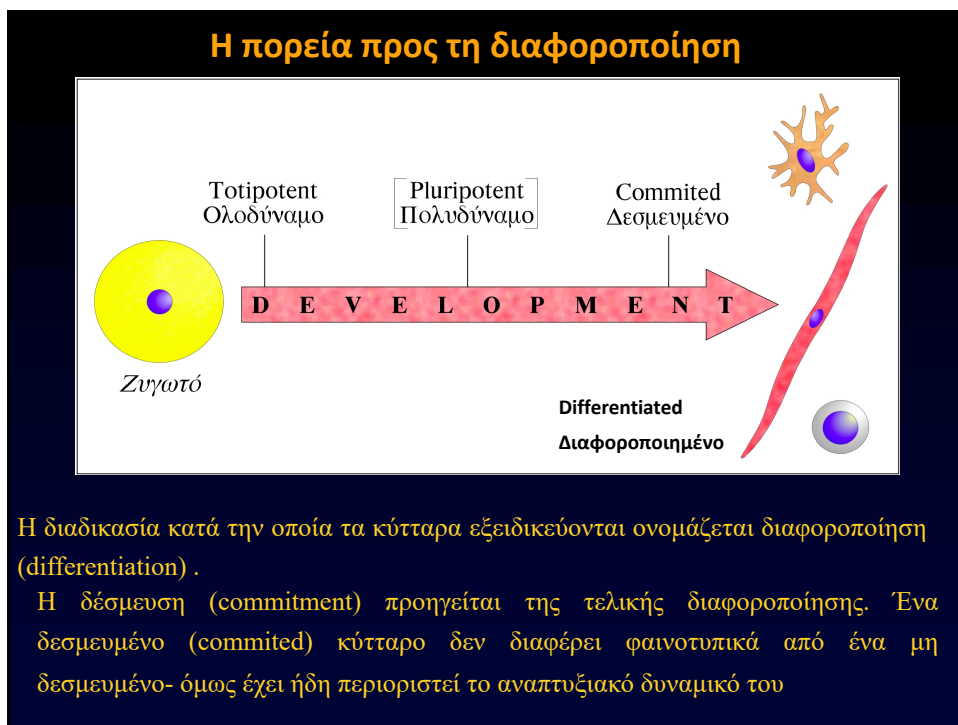
## Χαρτογράφηση πεπρωμένου των απογόνων κυττάρων που εκφράζουν ένα γονίδιο-μάρτυρα



26

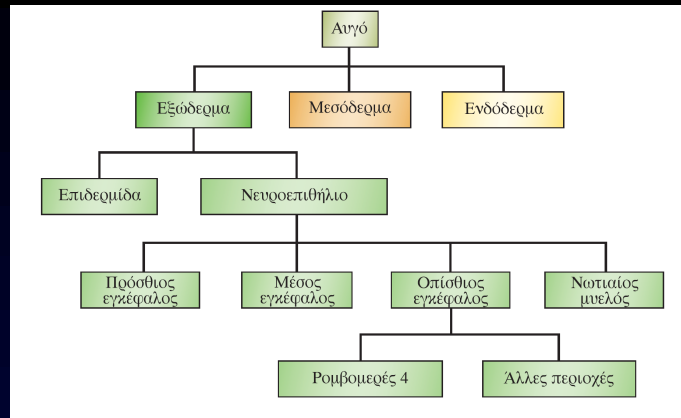


27



28

## Η πορεία προς τη διαφοροποίηση



Ιεραρχία τοπικής εξειδίκευσης κατά την ανάπτυξη. Τα κύτταρα που συγκροτούν το ρομβομερές 4 του οπίσθιου εγκεφάλου πρέπει προηγουμένως να έχουν «αποφασίσει» αρχικά ότι θα σχηματίσουν εξώδερμα, κατόπιν νευροεπιθήλιο, στη συνέχεια οπίσθιο εγκέφαλο και τελικά ρομβομερές 4.

29

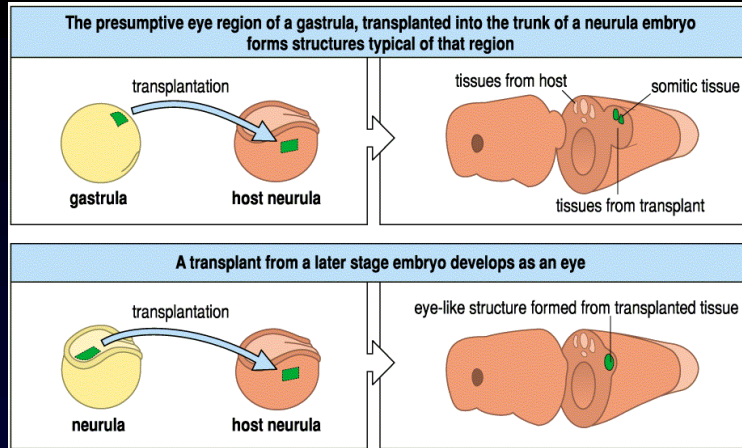
Η δέσμευση μπορεί να χωριστεί σε δυο στάδια:

Εξειδίκευση (Specification)

Προκαθορισμός (Determination)

30

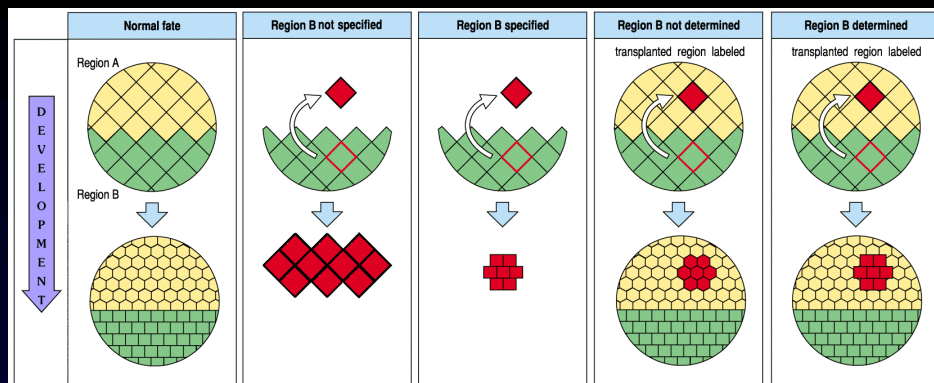
## Εξειδίκευση και Προκαθορισμός



Ένα κύτταρο ονομάζεται προκαθορισμένο ως προς κάποια πορεία διαφοροποίησης, όταν είναι δεδομένο πως θα ακολουθήσει την πορεία αυτή, ακόμα και αν μεταμοσχευθεί σε μια διαφορετική περιοχή του εμβρύου και επομένως εκτεθεί σε επαγωγικά ερεθίσματα που στρέφουν τα κύτταρα σε διαφορετικούς αναπτυξιακούς προορισμούς.

31

## Εξειδίκευση και Προκαθορισμός



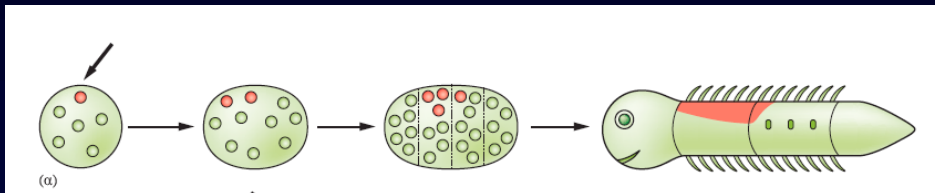
Ένα κύτταρο θεωρείται εξειδικευμένο για μία πορεία διαφοροποίησης, όταν σε περίπτωση που απομονωθεί από το υπόλοιπο έμβρυο και καλλιεργηθεί σε ένα απλό (ουδέτερο) θρεπτικό μέσο, ακολουθεί αυτή την πορεία διαφοροποίησης. Ένα εξειδικευμένο κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει διαφορετική αναπτυξιακή πορεία εάν εκτεθεί σε κατάλληλα επαγωγικά ερεθίσματα.

32



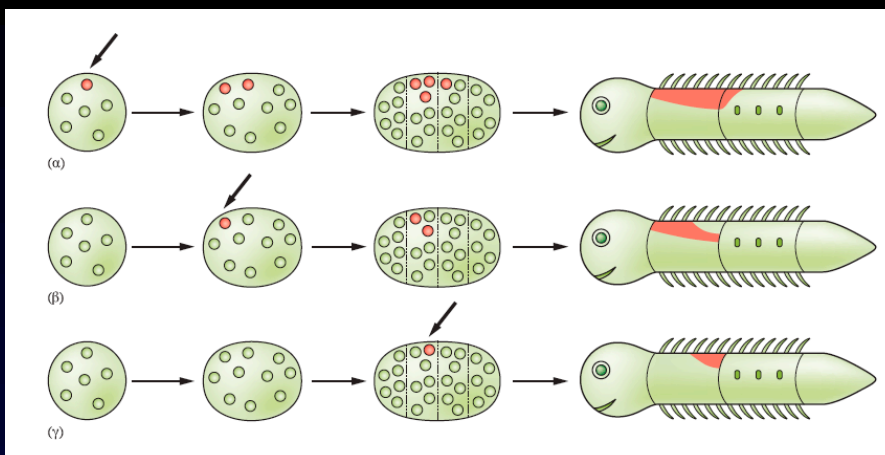
## Ανάλυση κυτταρικών κλώνων (clonal analysis)

- ▶ Ένας κυτταρικός κλώνος (cell clone) αποτελείται από τα επιζώντα κύτταρα-απογόνους ενός **ιδρυτικού** κυττάρου (founder). Για να εντοπίσει κανείς τους απογόνους ενός ιδρυτικού κυττάρου πρέπει αυτό να είναι σημειωμένο.
- ▶ Η σήμανση του κυττάρου συνήθως γίνεται με ένεση κάποιας φθορίζουσας ουσίας.
- ▶ Η ανάλυση κυτταρικών κλώνων είναι ένας τύπος χαρτογράφησης πεπρωμένου, όπου όμως **ιδανικά** σημαίνεται ένα κύτταρο και μελετάται το πεπρωμένο των απογόνων του σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια.



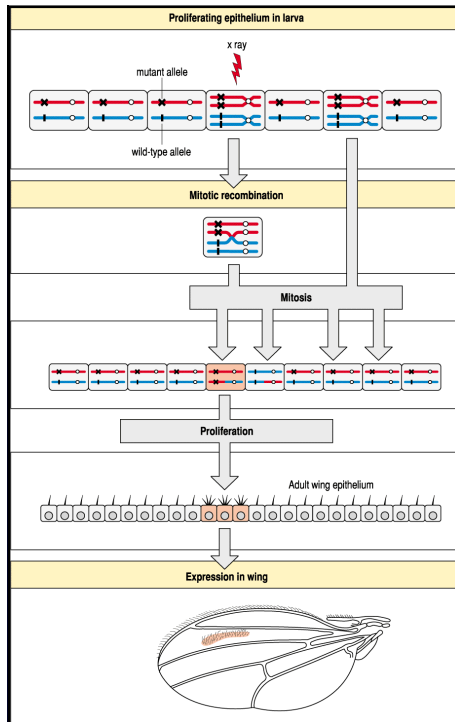
33

## Ανάλυση κυτταρικών κλώνων (clonal analysis)



Η ανάλυση κυτταρικών κλώνων χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να αποφασίσουμε αν ένα κύτταρο έχει ήδη δεσμευθεί όταν κάνουμε τη σήμανση- με τη μέθοδο αυτή ενώ μπορούμε να διαπιστώσουμε απουσία δέσμευσης ΔΕΝ μπορούμε να αποδείξουμε τη δέσμευση (η μέθοδος αποκαλύπτει πεπρωμένο όχι αναπτυξιακό δυναμικό).

34



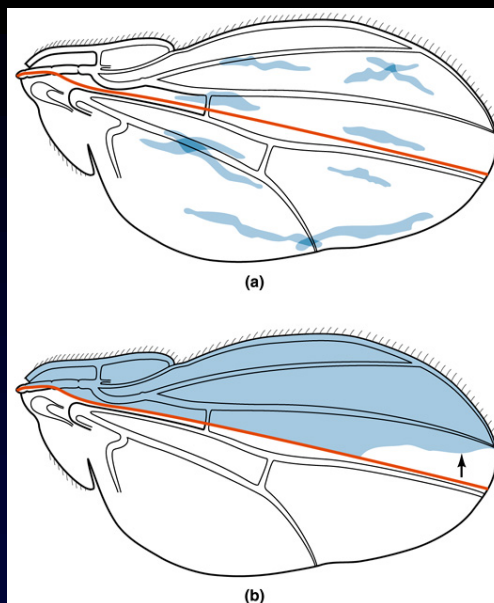
### Γενετικά μωσαϊκά στη *Drosophila* (genetic mosaics)

- ▶ Στη *Drosophila* μπορούμε με ακτίνες Χ να δημιουργήσουμε μέσω σωματικού ανασυνδυασμού κυτταρικούς κλώνους.
- ▶ Η μέθοδος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χαρτογράφηση επειδή: ακτινοβολούμε αρκετά μεγάλη περιοχή-έλεγχος πολλών εμβρύων.
- ▶ Η μέθοδος αυτή παρέχει πολλές πληροφορίες σε σχέση με την ανάμιξη/μετακίνηση κυττάρων αλλά και την οργάνωση-ρύθμιση της ανάπτυξης.

35

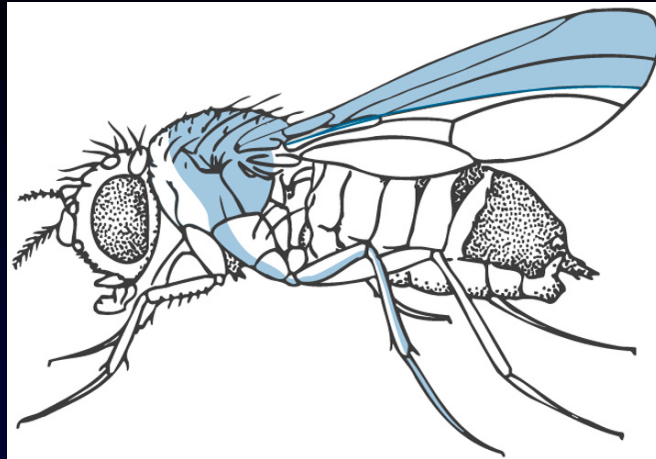
### Γενετικά μωσαϊκά στη *Drosophila* (genetic mosaics)

- ▶ Η ανάλυση κυτταρικών κλώνων επιδερμίδας της *Drosophila* έδειξε ότι παρόλο που πολλοί κλώνοι επικαλύπτονται, υπάρχει μια **διαχωριστική γραμμή**. Τα κύτταρα ενός κλώνου εντοπίζονται σε ένα από τα δύο τμήματα που ορίζει η διαχωριστική γραμμή.
- ▶ Εάν η ακτινοβολήση γίνει σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τα κύτταρα ενός κλώνου μπορεί να εντοπίζονται εκατέρωθεν της **διαχωριστικής γραμμής**. Καθένα από τα δύο αυτά τμήματα είναι ένα διαμέρισμα.



36

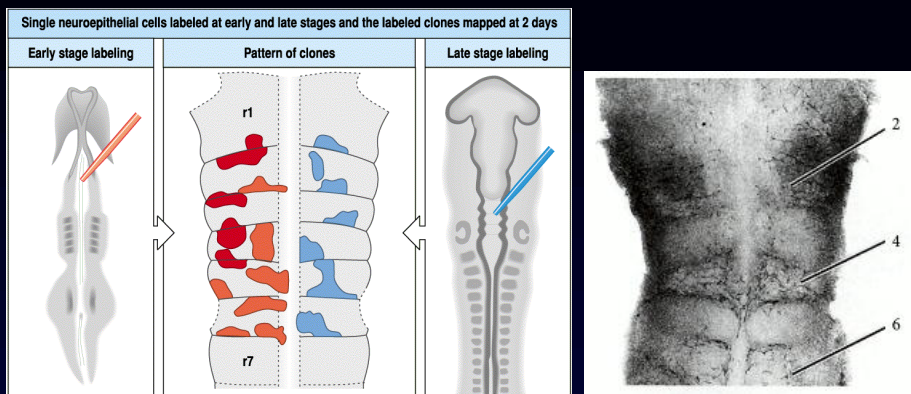
## Γενετικά μωσαϊκά στη *Drosophila* (genetic mosaics)



Στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος τα κύτταρα δεν έχουν ακόμα εξειδικευθεί κατά μήκος του ραχιαίου- κοιλιακού άξονα.

37

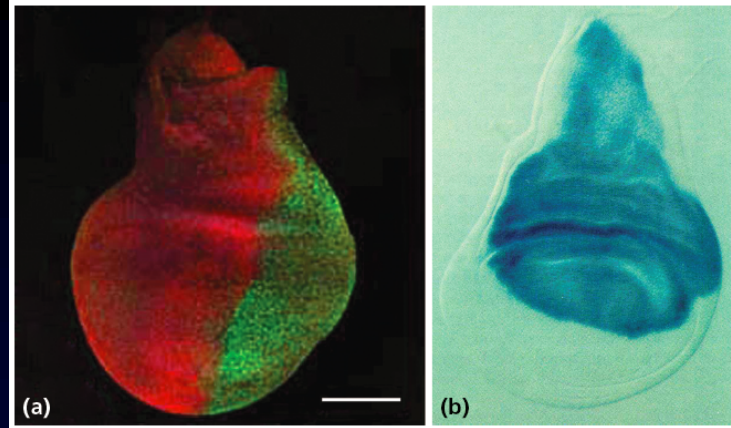
## Περιορισμός κυτταρικών κλώνων (clonal restriction) - η έννοια του διαμερίσματος (compartment)



Ο όρος διαμέρισμα αναφέρεται σε διακριτές περιοχές του εμβρύου που σχηματίζονται από τους απογόνους μιας μικρής ομάδας κυττάρων οι οποίοι περιορίζονται παντοτε μέσα στα όριά του (περιορισμός κυτταρικών κλώνων). Τα διαμερίσματα συμπεριφέρονται σε πολλές περιπτώσεις ως αναπτυξιακές μονάδες (developmental units).

38

### Περιορισμός κυτταρικών κλώνων (clonal restriction) - η έννοια του διαμερίσματος (compartment)



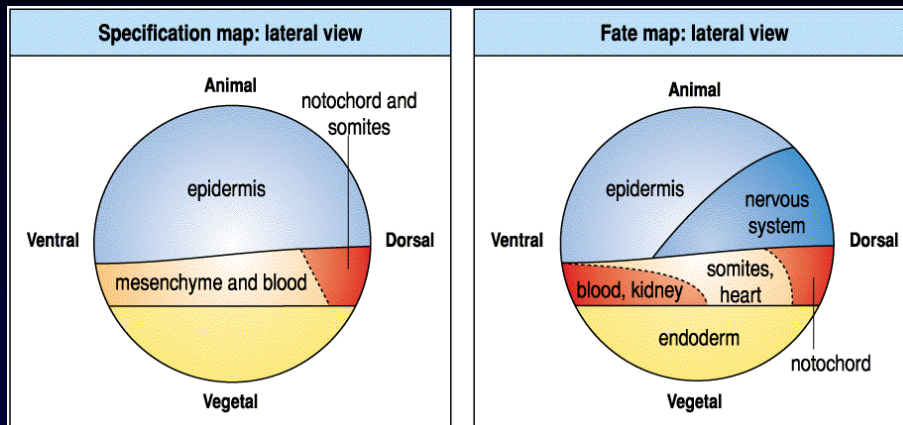
Τα διαμερίσματα (εμπρόσθιο, οπίσθιο, ραχιαίο και κοιλιακό) σε έναν δίσκο πτέρυγας του τρίτου προνυμφικού σταδίου. (α) Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της Engrailed (En, πράσινο) και της Cubitus interruptus (Ci, κόκκινο). Η Engrailed εντοπίζεται στο οπίσθιο διαμέρισμα και η Cubitus interruptus στο εμπρόσθιο. Κλίμακα 100 μm. (β) Η έκφραση του αρτεριού στο ραχιαίο διαμέρισμα, όπως αποκαλύπτεται με τη χρήση του γονιδίου αναφοράς lacZ.

Smith-Bolton et al. (2009) Developmental Cell 16, 797-809, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Elsevier. Κατά Bate and Martinez-Arias (eds) (1993) The Development of Drosophila melanogaster, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Cold Spring Harbor Laboratory Press.

39

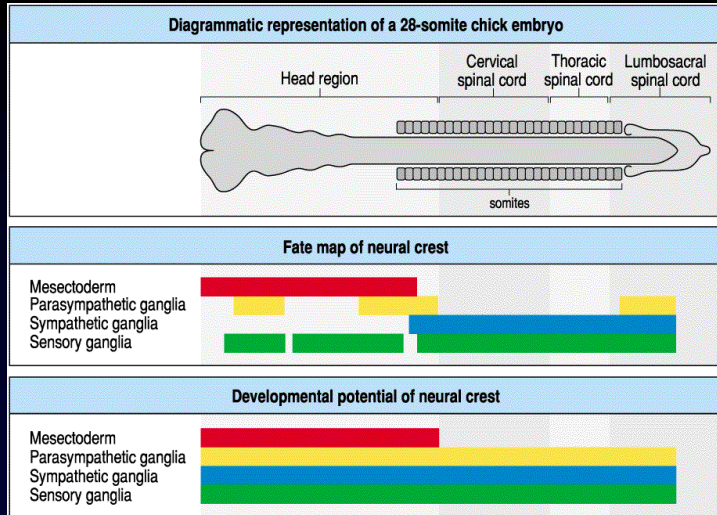
### Χάρτης εξειδίκευσης (specification map)

Ενας χάρτης ο οποίος μας δείχνει την αναπτυξιακή πορεία που θα ακολουθήσουν τα κύτταρα μιας περιοχής του εμβρύου, αν απομονωθούν και στη συνέχεια καλλιεργηθούν σε ένα απλό (ουδέτερο) θρεπτικό μέσο.



40

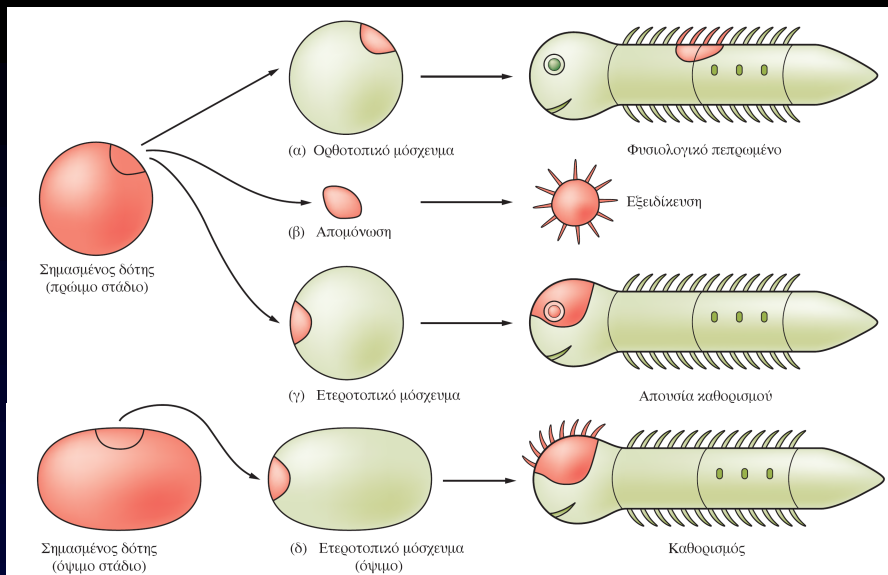
## Χάρτης πεπρωμένου και αναπτυξιακό δυναμικό



Οι αναπτυξιακές δυνατότητες μιας ομάδας κυττάρων δεν συμπίπτουν πάντοτε με το πεπρωμένο τους.

41

## Πειράματα μεταμόσχευσης

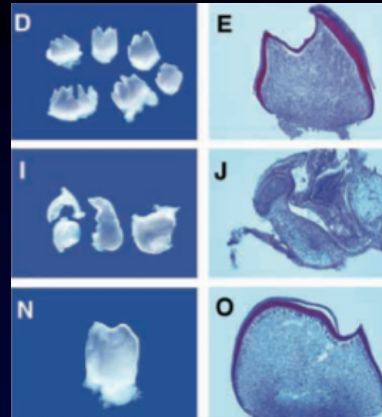
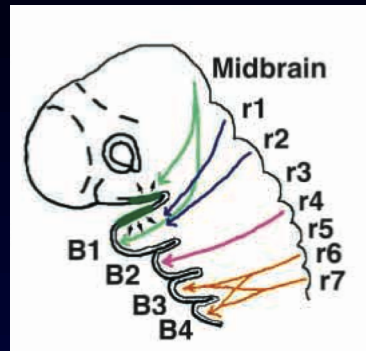


Χρησιμοποιούνται συχνά για τη μελέτη της πορείας της διαφοροποίησης των κυττάρων ενός εμβρύου. Συνήθως απαιτείται η σήμανση του μοσχεύματος.

42

### Πειράματα ανασυνδυασμού (recombination experiments)

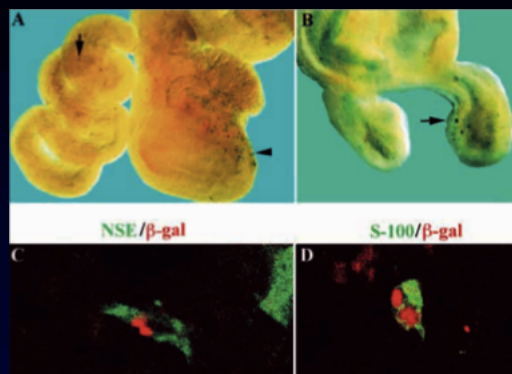
Πειράματα στα οποία συνδυάζονται τμήματα του ίδιου ή διαφορετικών εμβρύων.



Επαγωγή του σχηματισμού δοντιών *in vitro* στον ποντικό. Πειράματα ανασυνδυασμού επιθηλίου του πρώτου βραγχιακού τόξου με το υποκείμενο μεσέγγυμα. Απουσία του επιθηλίου δεν παρατηρείται σχηματισμός δοντιού.

43

### Πειράματα ανασυνδυασμού (recombination experiments)



Ένεση και καλλιέργεια γενετικά σημασμένων (*lacZ*) προδρόμων του εντερικού νευρικού συστήματος (E11.5) από αναπτυσσόμενο έμβryo ποντικού σε απομονωμένο έντερο εμβρύου ποντικού από το οποίο τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν (*ret-/ret-*). Τα κύτταρα που ενίονται πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε νευρώνες και γλοία. Οργανοτυπική καλλιέργεια.

44

## Γενετική της Ανάπτυξης Από τη μετάλλαξη στο γονίδιο Ορθόδρομη γενετική Ανάλυση

### Μεταλλαγές:

#### I. Αυθόρμητες

#### II. Επαγόμενες:

A. Με την επίδραση ακτινοβολίας  
(X-rays / Radiation mutagenesis).

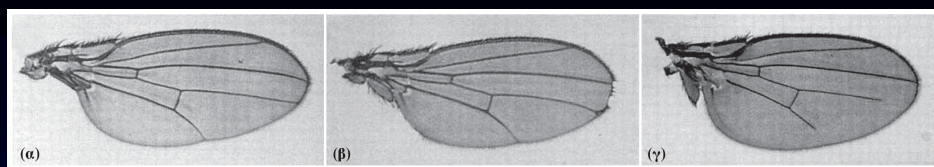
B. Με την επίδραση χημικών ενώσεων  
(EMS, ENU, CHL / Chemical mutagenesis.)

Γ. Με ενθέσεις τμημάτων DNA.  
(insertional mutagenesis.)

- ▶ Μεταλλαξογένεση στη *Drosophila*
- ▶ Μεταλλαξογένεση στον *C.elegans*
- ▶ Μεταλλαξογένεση στο Zebrafish.
- ▶ Μεταλλαξογένεση στο ποντίκι.

45

### Διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικό φαινότυπο

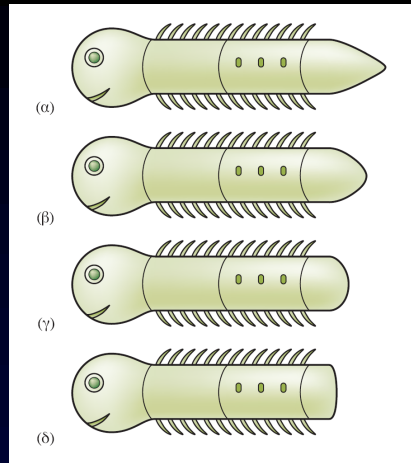


(α) Η πτέρυγα ενός ατόμου *Drosophila* άγριου τύπου. (β) Επικρατές απλο-ανεπαρκές μετάλλαγμα του γονιδίου *Notch* παρουσιάζει εγκοπές στην περι-φέρεια της πτέρυγας. (γ) Υπολειπόμενο αλληλόμορφο του γονιδίου *Notch* προκαλεί μείωση του μήκους των φλεβώσεων.

Από τη δημοσίευση Artavanis-Tsakonas *et al.* (1995) *Science* 268, 225-232, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο American Association for the Advancement of Science (AAAS).

46

## Αναπτυξιακά μεταλλάγματα

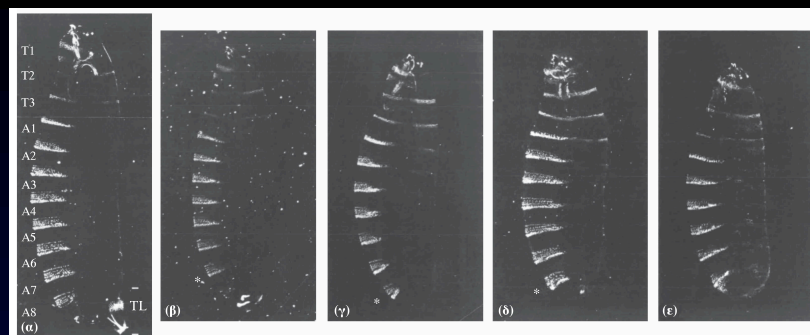


Φαινότυποι που προκύπτουν από μία αλληλομορφική σειρά μεταλλαγών ενός γονιδίου απαραίτητου για το σχηματισμό του οπίσθιου άκρου. (α) Άγριος τύπος. (β) Ελαφρά απώλεια λειτουργίας. (γ) Μέτρια απώλεια λειτουργίας. (δ) Εκμηδενιστικό μετάλλαγμα

47

47

## Παράδειγμα αλληλομορφικής σειράς στο γονίδιο *tailless* της *Drosophila*



Στις εικόνες παρουσιάζονται παρασκευάσματα δερματιδίων από ολόκληρα έμβρυα *Drosophila*. Το εμπρόσθιο άκρο είναι τοποθετημένο προς τα επάνω. (α) Άγριος τύπος. (β-ε) Αλληλόμορφα διευθετημένα κατά αυξανόμενο ποσό απώ-λειας λειτουργίας. Στα πιο ισχυρά μεταλλάγματα απουσιάζουν μεγαλύτερα τμήματα και από τα δύο άκρα του σώματος. Με αστερίσκο (\*) υποδεικνύεται το έβδομο κοιλιακό μεταμερές.

Από τη δημοσίευση Strecker *et al.* (1998) *Development* **102**, 721-734, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Company of Biologists Ltd.

48



## Μεταλλαξογένεση στο *M. musculus*

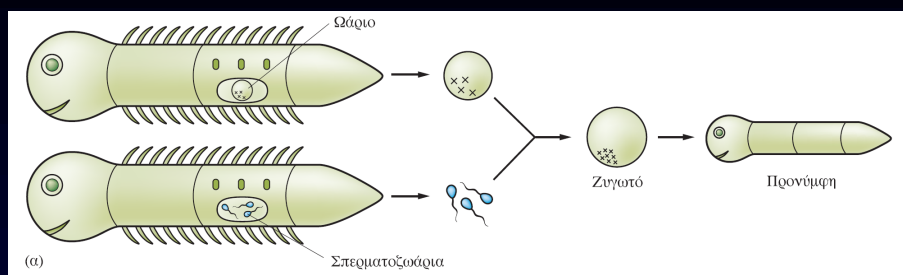
Table 1 | A comparison of mutagenesis strategies

Mutagenesis strategy (type)	Mutagenesis frequency	Type of mutation induced	Primary advantages	Primary disadvantages
Spontaneous	$5 \times 10^{-6}$ per locus	Point mutations, small deletions, chromosomal rearrangements, and insertions of endogenous retrovirus-like sequences.	Visible phenotypes; only requirement is observant mouse handlers.	Only visible phenotypes detected, at very low frequency.
X-ray	$13-50 \times 10^{-6}$ per locus	Chromosomal rearrangements: ranging from simple deletions, inversions and translocations, to complex rearrangements.	Rearrangements act as a molecular landmark for cloning.	Multiple genes affected, hard to dissect individual gene function.
Chlorambucil (chemical mutagen)	$127 \times 10^{-6}$ per locus	Chromosomal rearrangements, especially smaller deletions (100-500 kb) and translocations.	Same as X-ray, but higher mutagenesis frequency.	Multiple genes affected, hard to dissect individual gene function.
Ethylnitrosourea (chemical mutagen)	$150 \times 10^{-6}$ per locus	Primarily generates point mutations, occasionally very small deletions (20-50 bp).	Single-gene mutations, amenable to high throughput.	No molecular landmarks for cloning.
Transgene/retroviral (insertional mutagen)	5-10% of transgenic animals	Disrupts endogenous gene expression or coding sequence. Sometimes causes chromosomal rearrangements.	Provides a molecular landmark for cloning.	Labour-intensive, not applicable to high-throughput approaches.
Gene targeting (insertional mutagen)	Almost 100% of transgenic animals*	Generates insertions or deletions, as designed.	Can design type of mutation as required.	Requires knowledge of gene and its structure, labour-intensive, unpredictable phenotypes.
Trapping (insertional mutagen)	Almost 100% of transgenic animals*	Disrupts endogenous coding sequence.	Forward-genetic strategy, easy to clone mutated gene, reports endogenous gene-expression pattern.	Unpredictable phenotypes.

\*Requires pre-screening of embryonic stem cells *in vitro*.

49

## Αναπτυξιακά μεταλλάγματα

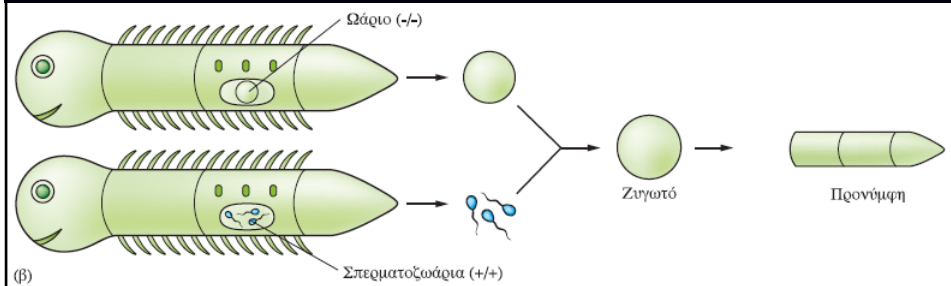


Γονίδια μητρικής επίδρασης. (α) Φυσιολογική ανάπτυξη: ένα γονίδιο μητρικής επίδρασης απαιτείται για την εντοπισμένη απόθεση ενός κυτταροπλασματικού καθοριστή της κεφαλής στο ωάριο.

50

50

## Γονίδια μητρικής επίδρασης (maternal effect)



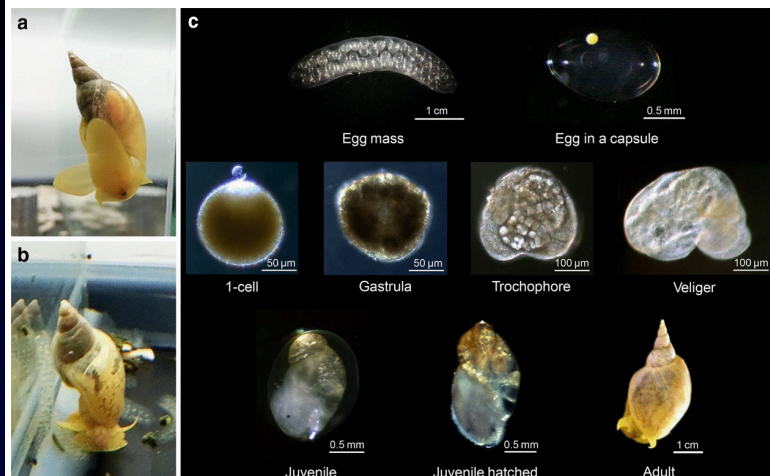
Γονίδια μητρικής επίδρασης. (β) Μεταλλαγή μητρικής επίδρασης: Όταν η μητέρα αδυνατεί λόγω μεταλλαγής να συνθέσει τον κυτταροπλασματικό καθοριστή, οι απόγονοί της στερούνται κεφαλής.

51

51

## *Lymnaea stagnalis*

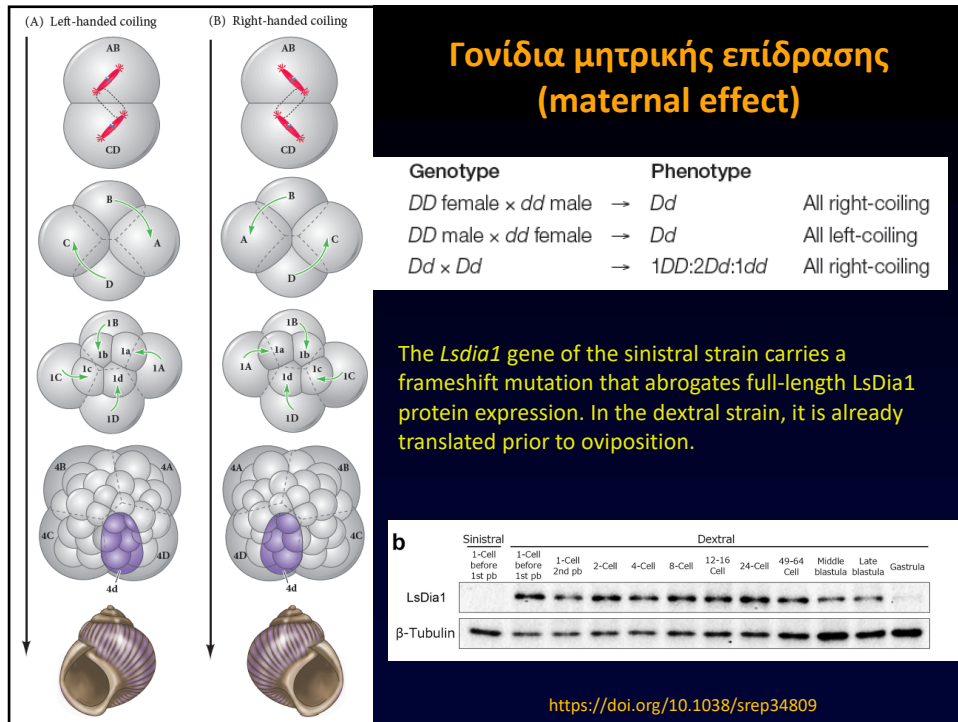
From: [The pond snail \*Lymnaea stagnalis\*](#)



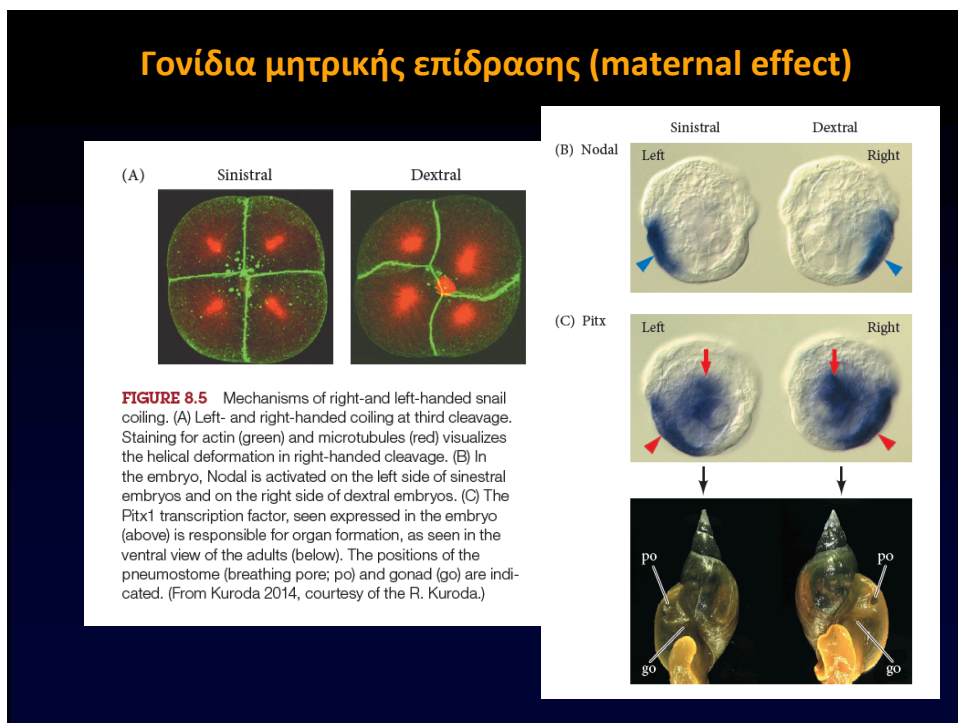
Adult snails and lifecycle. Sinistral (a) and dextral (b) snails reared in our group, and lifecycle showing images at the representative stages (c)

<https://doi.org/10.1186/s13227-020-00169-4>

52



53



54

## Γονίδια μητρικής επίδρασης (maternal effect)

Όταν μελετάμε γονίδια που δρουν μητρικά τότε τα αποτελέσματα που παίρνουμε μπορεί να μην ακολουθούν τις κλασικές μεντελικές αναλογίες.



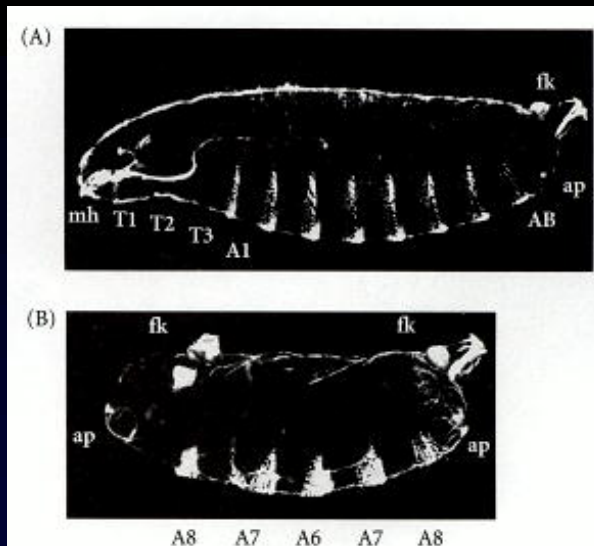
-/- x +/+ : προβλήματα στην ανάπτυξη όλων των εμβρύων παρόλο που ο γονότυπός τους είναι +/-

+/+ x -/- : όλοι οι απόγονοι wt

+/- x +/- : όλοι οι απόγονοι wt (εκτός και αν το γονίδιο έχει και ζυγωτικό ρόλο οπότε το 25% των εμβρύων μεταλλαγμένα \*)

55

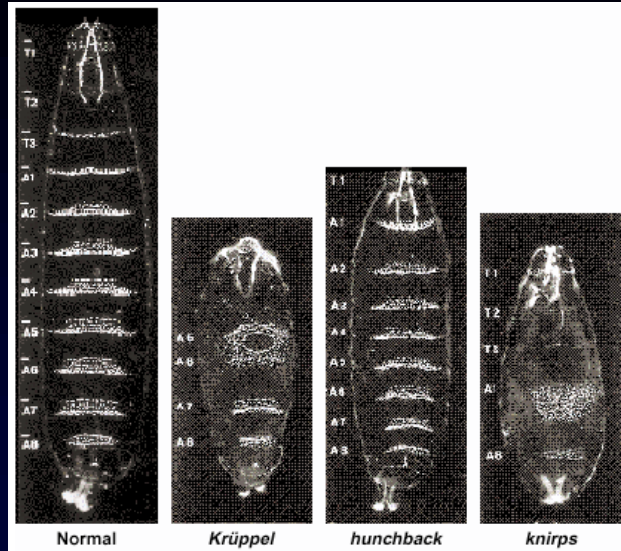
## Μεταλλάξεις μητρικής επίδρασης



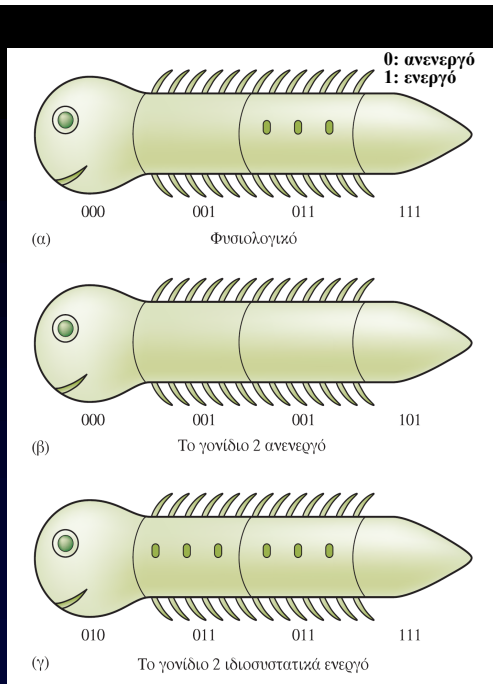
Ο μητρικός έλεγχος της ανάπτυξης σταματά συνήθως με την έναρξη της μεταγραφής στο έμβρυο κατά την αυλάκωση.

56

**Christiane Nüsslein-Volhard & Eric Wieschaus (1980)**



57



**Ομοιωτικές μεταλλάξεις**

↗ Αν εξ' αιτίας μιας μετάλλαξης το γονίδιο 2 δεν είναι ενεργό, τότε έχουμε διπλασιασμό του πρώτου μεταμερούς- το τρίτο;

↗ Αν εξ' αιτίας μιας μετάλλαξης το γονίδιο 2 είναι πάντοτε ενεργό, τότε έχουμε διπλασιασμό του δεύτερου μεταμερούς.

Ομοίωση: το φαινόμενο κατά το οποίο μια δομή μετασχηματίζεται σε μια άλλη ομόλογή της. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν ομοίωση λέγονται ομοιωτικές.

58

## Ομοιωτικές μεταλλάξεις



59

## Ομοιωτικές μεταλλάξεις

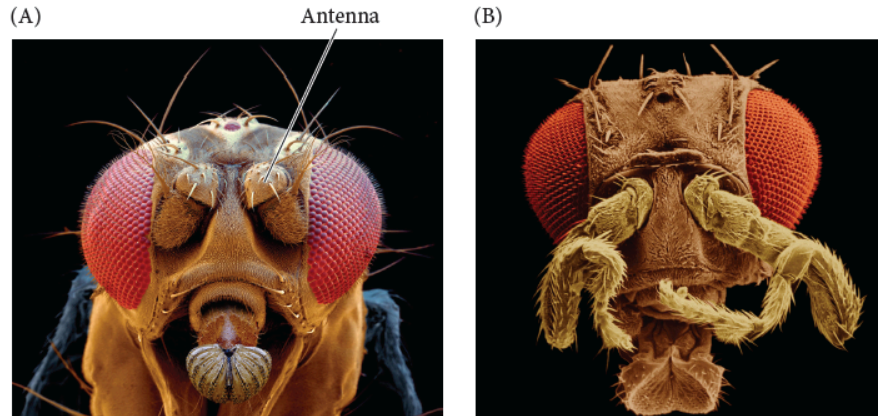


The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1995

Edward B. Lewis , Christiane Nüsslein-Volhard and Eric Wieschaus

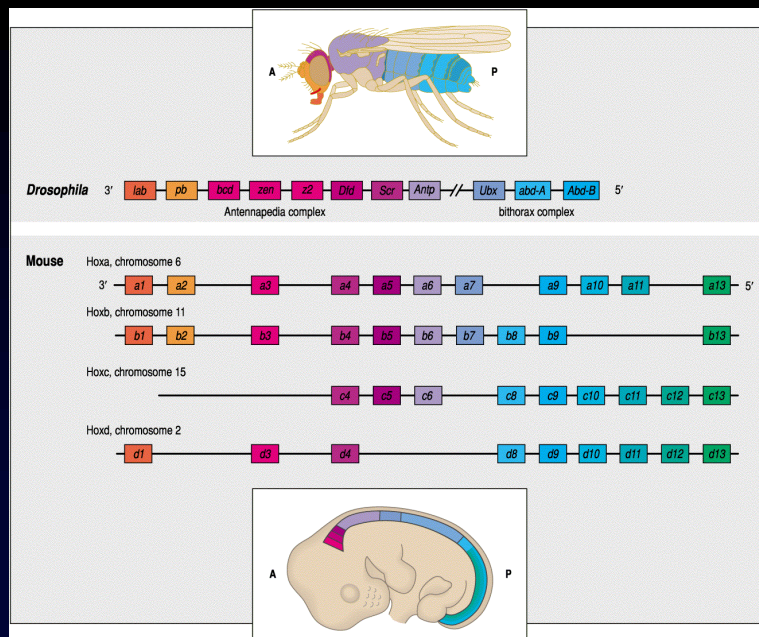
60

## Ομοιωτικές μεταλλάξεις



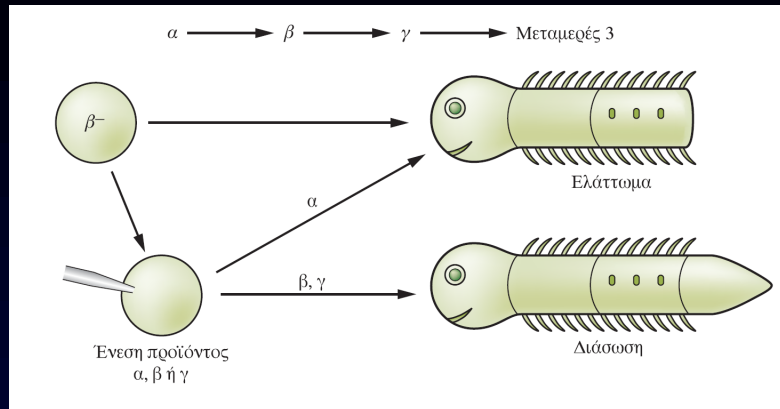
61

## Τα γονίδια Hox



62

## Γενετικά μονοπάτια



Χαρακτηρισμός ενός γενετικού μονοπατιού με πειράματα διάσωσης. Τα  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  αποτελούν μια ομάδα γονιδίων που το ένα ενεργοποιεί το άλλο σε ένα γραμμικό μονοπάτι και απαιτούνται για το σχηματισμό του μεταμερούς 3. Εάν τα προϊόντα  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ενεθούν σε έμβρυα που φέρουν μεταλλαγή στο γονίδιο  $\beta$ , τότε μόνο τα  $\beta$  και  $\gamma$  θα διασώσουν τα έμβρυα  $\beta^-$ , τα οποία θα έχουν πλέον φαινότυπο άγριου τύπου.

63

63

## Γενετικά μωσαϊκά (genetic mosaics)



- ▶ *Drosophila* με μεταμόσχευση πολικών κυττάρων ή σωματικό ανασυνδυασμό
- ▶ *C. elegans* αυτόματα (απώλεια χρωμοσωμικών τμημάτων)
- ▶ Zebrafish, *Xenopus* μεταμόσχευση κυττάρων
- ▶ Στα θηλαστικά ο όρος γίμαιοις (ένωση δυο εμβρύων) (μωσαϊκοί ονομάζονται οργανισμοί με διαφορετικούς γονότυπους που όμως απαντούν στη φύση)

64

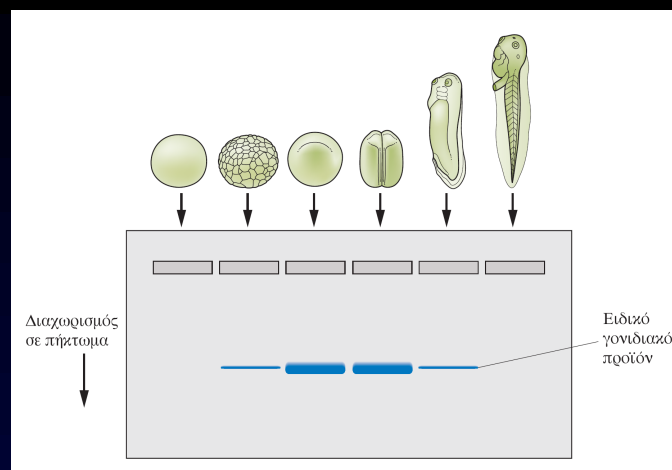


## Μοριακή Βιολογία

- Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης κατά την ανάπτυξη (χωρικά και χρονικά) - ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.
  - ▶ Βιοχημικές μέθοδοι (Ανάλυση Northern, προστασία από RNAση, RT-PCR, Ανάλυση Western, Ανοσοκατακρήμνιση, Μικροσυστοιχίες, RNAseq, scRNAseq)
  - ▶ Υβριδοποίηση *in situ* (για RNA)
  - ▶ Ανοσοϊστοχημεία (για πρωτεΐνη)
  - ▶ Διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές, διαγονιδιακά ζώα.
  
- Εύρεση του ρόλου ενός γονιδίου.
  - ▶ Διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές, διαγονιδιακά ζώα.
  - ▶ Στόχευση γονιδίου
  - ▶ Antisense RNA
  - ▶ Παρεμπόδιση RNA (RNA interference)
  - ▶ Δημιουργία κυρίαρχων αρνητικών μεταλλάξεων.
  - ▶ Χρήση αδρανοποιητικών αντισωμάτων.

65

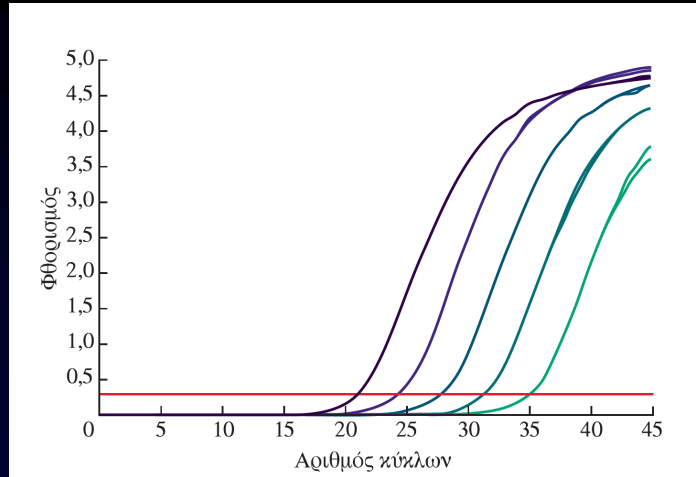
## Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με βιοχημικές μεθόδους



Ανίχνευση ενός γονιδιακού προϊόντος σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης. Το προϊόν, που μπορεί να είναι είτε ένα ειδικό mRNA είτε μια πρωτεΐνη, έχει απομονωθεί από έμβρυα διαφορετικών σταδίων και στη συνέχεια έχει διαχωριστεί σε κατάλληλο πήκτωμα.

66

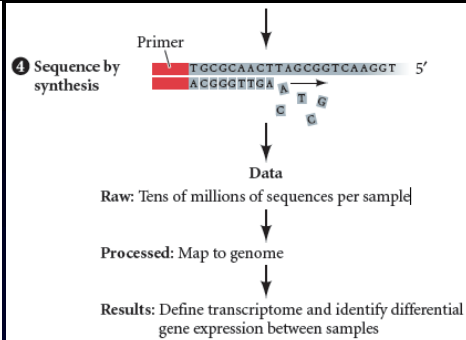
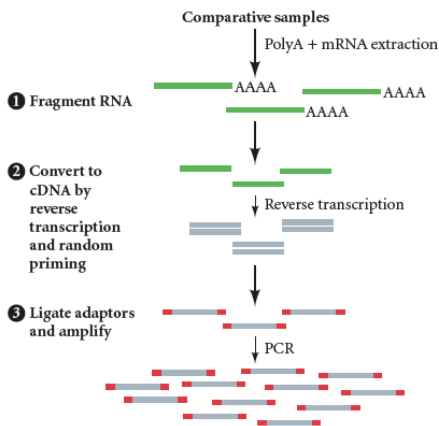
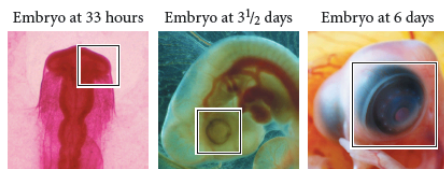
## Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με βιοχημικές μεθόδους



Το όργανο λαμβάνει μετρήσεις και υπολογίζει τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται προκειμένου η συγκέντρωση του DNA να ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι (κόκκινη γραμμή).

67

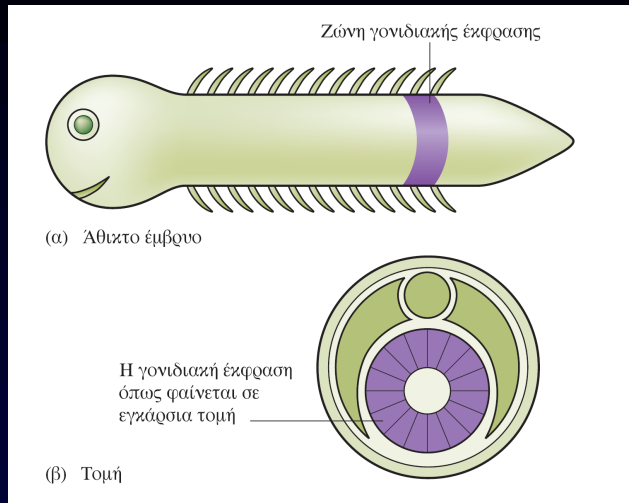
## RNA seq



68

68

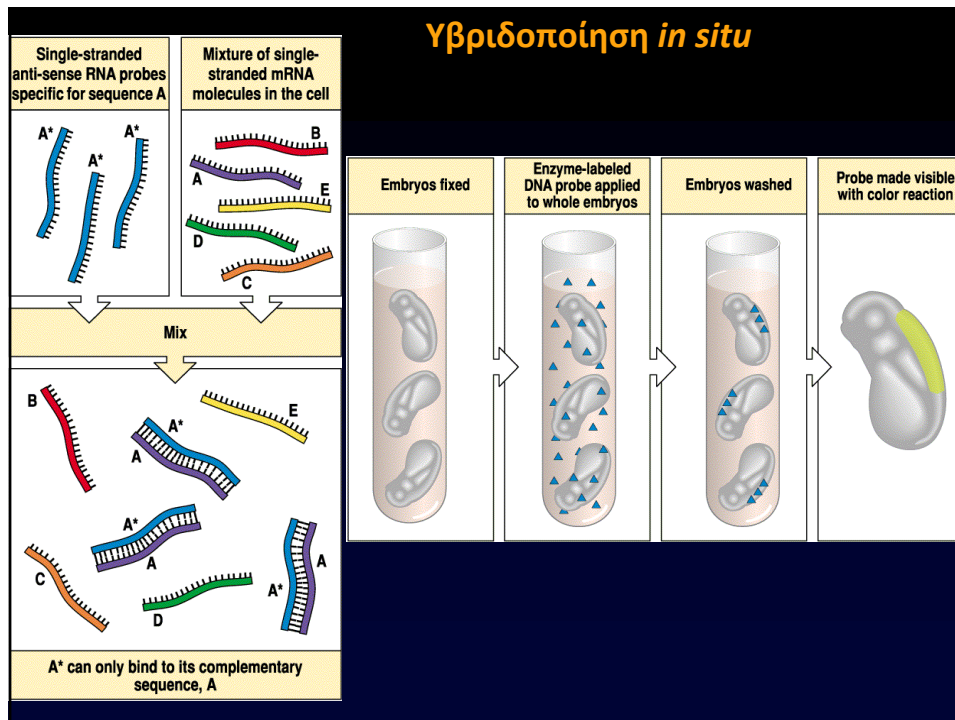
## Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με μεθόδους *in situ*



Εντοπισμός της έκφρασης ενός γονιδίου με τεχνικές *in situ* που ανιχνεύουν είτε το mRNA είτε την πρωτεΐνη. (α) Άθικτο δείγμα. (β) Τομή.

69

## Υβριδοποίηση *in situ*



70

### Υβριδοποίηση *in situ*

Η υβριδοποίηση *in situ* μπορεί να γίνει σε απομονωμένα όργανα και σε απομονωμένα τμήματα εμβρύων. Σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξης όπου τα έμβρυα δεν είναι δυνατόν να γίνουν διαπερατά η ISH γίνεται σε τομές (Στερέωση του εμβρύου ή κατάψυξη, τομές, ιχνηθέτης εκπλύσεις κ.λ.π. στις τομές που είναι στερεωμένες πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες).

E13.5

71

### Υβριδοποίηση *in situ*

Embryos fixed	Embryos embedded in wax and sectioned for autoradiography	Sections placed on microscope slides and exposed to radioisotope-labeled probe	Slide is dipped in photographic emulsion in a darkroom	Emulsion is developed. Slide is examined under a microscope
				 Grains in the emulsion mark the sites of exposure to the radioactive label

► Ο ιχνηθέτης μπορεί να σημανθεί και με **ραδιενεργά** νουκλεοτίδια οπότε μετά την υβριδοποίηση ακολουθεί αυροραδιογραφία.

F

Fgf-8

G

Lhx-7

72

## Ανοσοϊστοχημεία

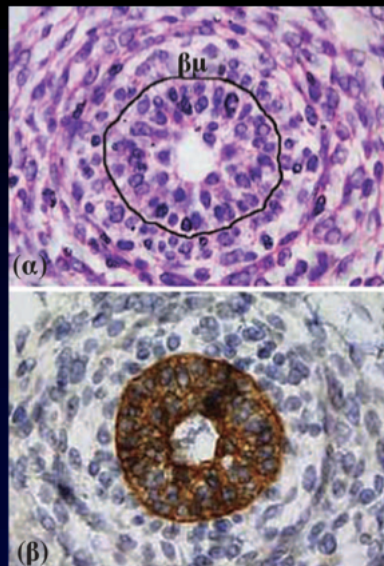
Μας επιτρέπει να μελετήσουμε την κατανομή της πρωτεΐνης-συμπληρώνει την υβριδοποίηση *in situ*. (δεν είναι απαραίτητο όπου υπάρχει mRNA να υπάρχει και πρωτεΐνη)

Προϋπόθεση: η ύπαρξη αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.

- ▶ Τα έμβρυα συλλέγονται, στερεώνονται και γίνονται διαπερατά σε μεγαλομόρια με τη βοήθεια απορρυπαντικού.
- ▶ Ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα.
- ▶ Απομάκρυνση του αντισώματος, εκπλύσεις.
- ▶ Προσθήκη αντισώματος αντι-IgG που φθορίζει ή στο οποίο είναι συνδεδεμένο ένα ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση), εκπλύσεις.
- ▶ Προσθήκη υποστρώματος (στη δεύτερη περίπτωση) της αλκαλικής φωσφατάσης-σχηματισμός έγχρωμου, αδιάλυτου ιζήματος.
- ▶ Παρατήρηση των εμβρύων-φωτογράφιση και αν κριθεί απαραίτητο τομές.

73

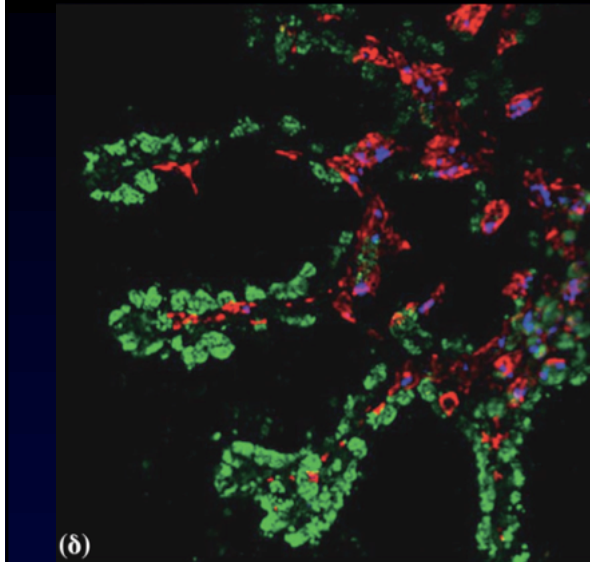
## Ανοσοϊστοχημεία



(α) Τομή του οισοφάγου ενός εμβρύου ποντικού κατά τη 13,5 ημέρα της κύησης μετά από χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Η θέση της βασικής μεμβράνης υποδεικνύεται με βμ. (β) Τομή ενός εμβρύου ποντικού κατά την E13,5 ημέρα της κύησης μετά από χρώση με αντίσωμα έναντι της κυτταροκερατίνης 8 (καφέ χρώμα) και αιματοξυλίνη (πυρηνική χρώση)

74

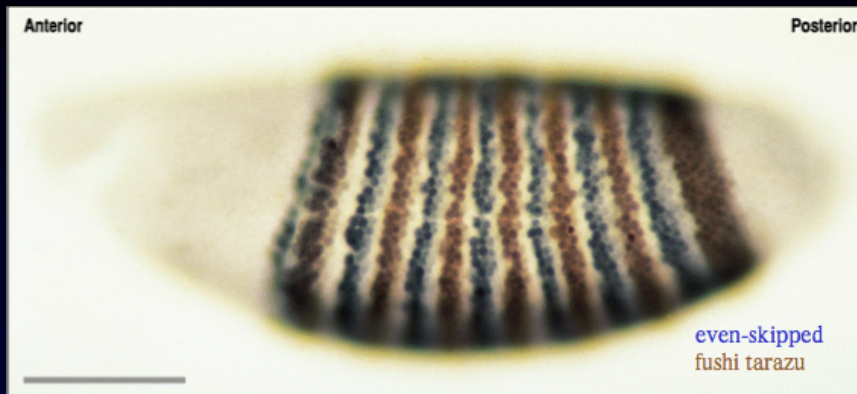
## Ανοσοϊστοχημεία



Τριπλή ανοσοχρώση με φθορίζοντα αντι-σώματα σε οργανοτυπική καλλιέργεια παγκρέατος εμβρύου ποντικού. Ανίχνευση της αμυλάσης (πράσινο χρώμα), της ινσουλίνης (κόκκινο χρώμα) και του γλυκογόνου (μπλε χρώμα).

75

## Ανοσοϊστοχημεία



Όπως και η υβριδοποίηση *in situ* σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξης γίνεται σε τομές.

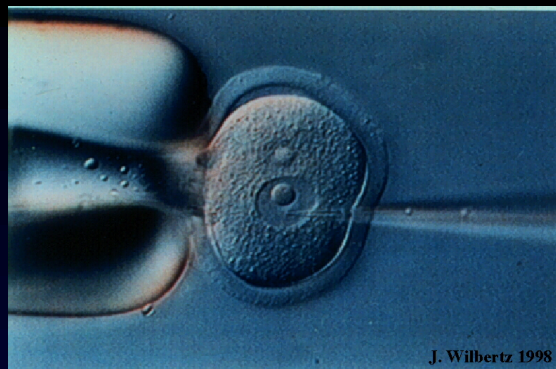
76

## Μοριακή Βιολογία

- Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης κατά την ανάπτυξη (χωρικά και χρονικά)-  
ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.
  - ▶ Βιοχημικές μέθοδοι (Ανάλυση Northern, προστασία από RNAση, RT-PCR, Ανάλυση Western, Ανοσοκατακρήμνιση)
  - ▶ Υβριδοποίηση *in situ* (για RNA)
  - ▶ Ανοσοϊστοχημεία (για πρωτεΐνη)
  - ▶ Διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές και ζώα
- Εύρεση του ρόλου ενός γονιδίου.
  - ▶ Διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές, διαγονιδιακά ζώα.
  - ▶ Στόχευση γονιδίου.
  - ▶ Antisense RNA
  - ▶ RNAi
  - ▶ Δημιουργία κυρίαρχων αρνητικών (dominant negative) μορίων.
  - ▶ Χρήση αδρανοποιητικών αντισωμάτων (neutralizing antibodies)

77

## Διαγονιδιακά ζώα



Παλαιότερες προσεγγίσεις....

- ▶ Με τη βοήθεια μεταθετών στοιχείων (*Drosophila*, *C. elegans*)
- ▶ Με ενσωμάτωση DNA στο σπέρμα □ *Xenopus*.
- ▶ Με τη βοήθεια ρετροϊών στο κοτόπουλο.
- ▶ Με μικροένεση DNA στον προπυρήνα στον ποντικό.

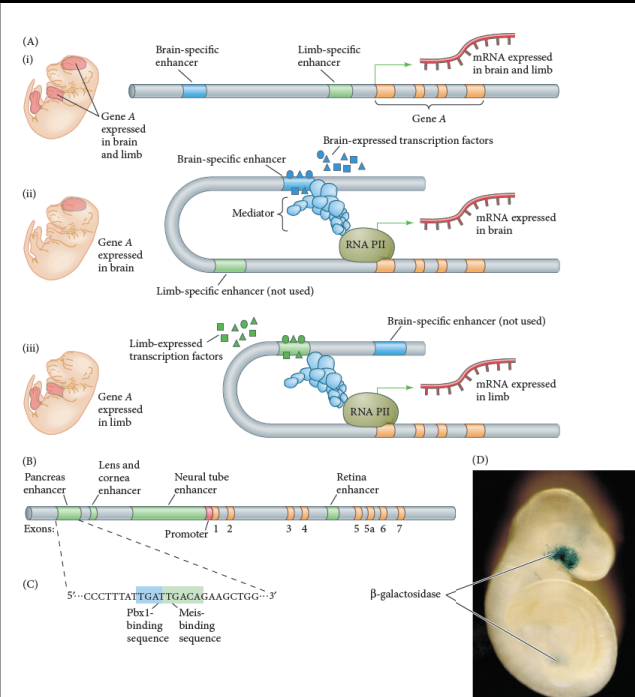
78

**Διαγονιδιακά ζώα μια νέα εποχή!**



**Crispr/Cas9  
Ευκολία και ευελιξία**

79



(A) (i) Gene A expressed in brain and limb

(ii) Gene A expressed in brain

(iii) Gene A expressed in limb

(B) Pancreas enhancer, Lens and cornea enhancer, Neural tube enhancer, Retina enhancer

(C) 5'-CCCTTATTTGATGGACAGAAAGTGG-3'

(D) β-galactosidase

**Μεταγραφική  
ρύθμιση  
Ανατομία  
ρυθμιστικών  
στοιχείων**

► Οι *cis*-ρυθμιστικές περιοχές αποτελούνται από στοιχεία ενεργά σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ( modular organization)

80



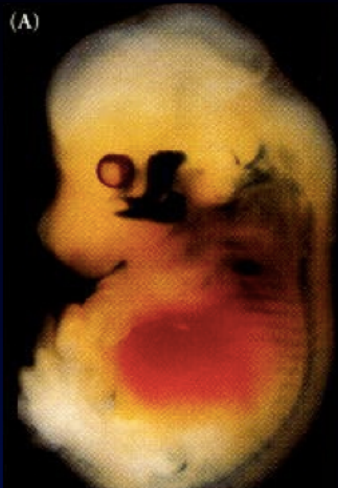
## Μεταγραφική ρύθμιση

TABLE 3.1 Some major transcription factor families and subfamilies

Family	Representative transcription factors	Some functions
Homeodomain:		
Hox	Hoxa1, Hoxb2, etc.	Axis formation
POU	Pit1, Unc-86, Oct-2	Pituitary development; neural fate
Lim	Lim1, Forkhead	Head development
Pax	Pax1, 2, 3, 6, etc.	Neural specification; eye development
Basic helix-loop-helix (bHLH)	MyoD, MITF, daughterless	Muscle and nerve specification; <i>Drosophila</i> sex determination; pigmentation
Basic leucine zipper (bZip)	C/EBP, AP1, MITF	Liver differentiation; fat cell specification
Zinc-finger:		
Standard	WT1, Krüppel, Engrailed	Kidney, gonad, and macrophage development; <i>Drosophila</i> segmentation
Nuclear hormone receptors	Glucocorticoid receptor, estrogen receptor, testosterone receptor, retinoic acid receptors	Secondary sex determination; craniofacial development; limb development
Sry-Sox	Sry, SoxD, Sox2	Bend DNA; mammalian primary sex determination; ectoderm differentiation

81

## Διαγονιδιακοί ποντικοί



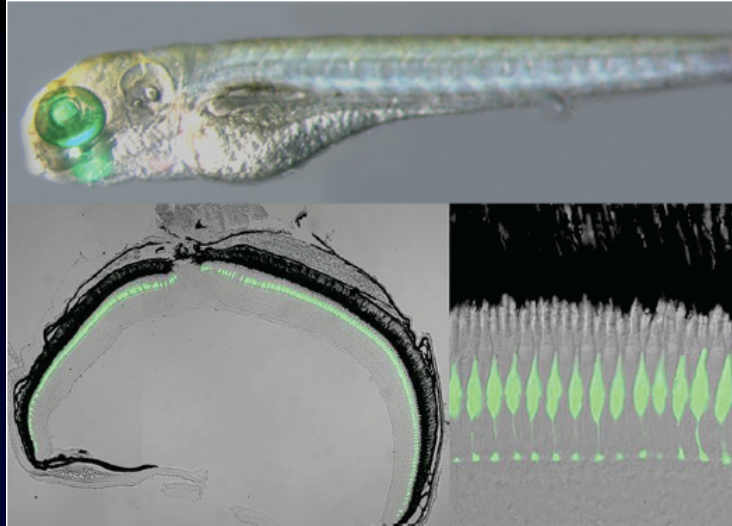
► Παροδική ή μόνιμη (συλλογή εμβρύων ή γέννηση, μελέτη διαφόρων διαγονιδιακών ζώων - επιλογή των κατάλληλων, διασταυρώσεις.

► Μελέτη έκφρασης, εκτοπική έκφραση, υπερέκφραση, ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, μελέτη αλληλεπίδρασης γονιδίων.

Ο ενισχυτής του γονιδίου *Myf-5* κατευθύνει την ιστοειδική έκφραση της β-γαλακτοζιδάσης

82

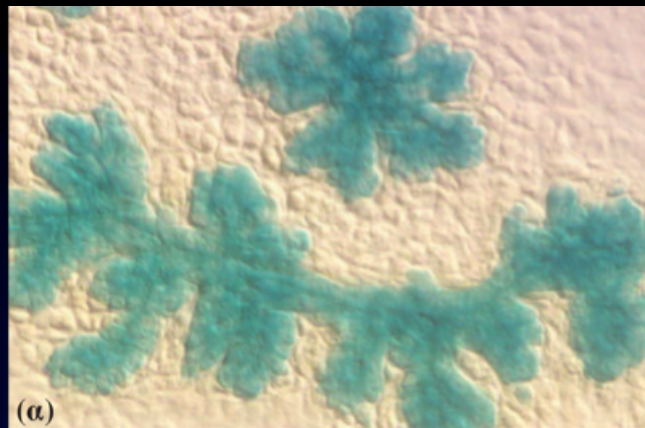
### Διαγονιδιακά ζώα



Έκφραση της GFP σε σύντηξη με ένα γονίδιο που εκφράζεται αποκλειστικά στον αμφιβληστροειδή (Baressi & Gilbert).

83

### Γονίδια αναφοράς



Ανίχνευση μετά από χρώση με X-Gal. (α) Οργανοτυπική καλλιέργεια παγκρέατος από έμβρυο ποντικού, όπως στην Εικ. 5.11δ. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση η οργανοτυπική καλλιέργεια έχει γίνει μετά από ανασυνδυασμό του επιθηλίου από το στέλεχος ποντικού ROSA26 που εκφράζει σε όλους τους ιστούς τη β-γαλακτοζιδάση από το βακτήριο *E. coli* με το μεσέγγυμα από ένα έμβρυο ποντικού άγριου τύπου. Μόνο το επιθήλιο βάφεται

84

### Γονίδια αναφοράς



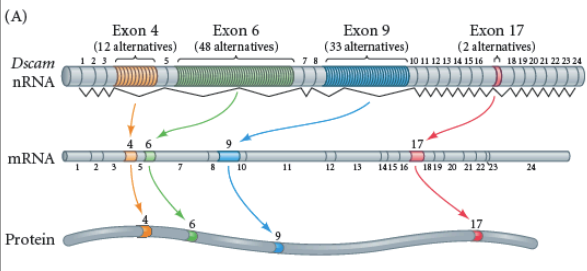
**(β)**

Ανίχνευση μετά από χρώση με X-Gal. (β) Εντερικές κρύπτες από το στέλεχος H253 του ποντικού. Το συγκεκριμένο διαγονιδιακό στέλεχος φέρει το γονίδιο *lacZ* στο χρωμόσωμα X. Στα ενήλικα θηλυκά άτομα παρατηρείται αδρανοποίηση του διαγονιδίου στο 50% των κυττάρων, με αποτέλεσμα οι ιστοί να αποκτούν εμφάνιση μω-σαϊκού, όπως παρατηρείται εδώ.

85

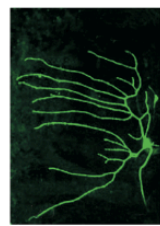
### Ρύθμιση - εναλλακτικό μάτισμα

**(A)**

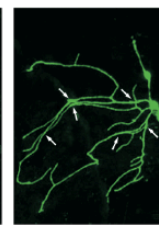


**(B)**

*Dscam1*<sup>wild type</sup>

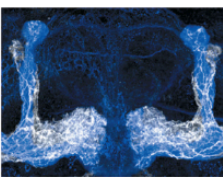


*Dscam1*<sup>null</sup>

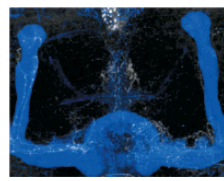


**(C)**

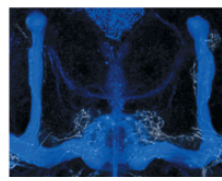
Exon 4.1



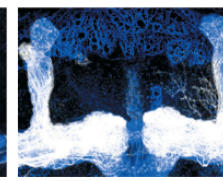
Exon 4.2



Exon 4.9



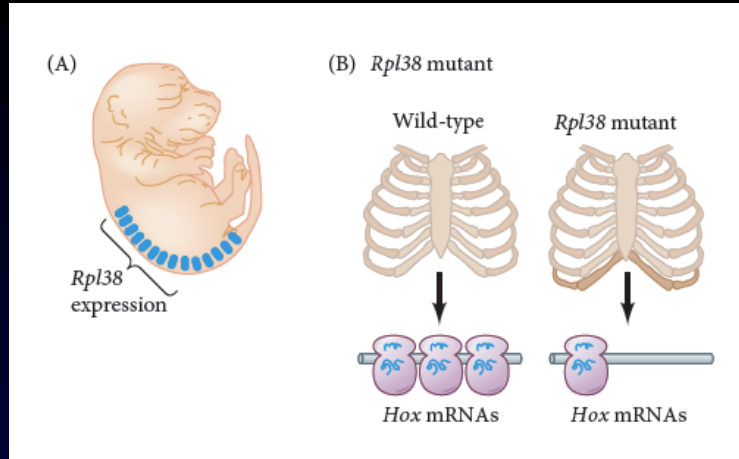
Exon 4.12



Το *Dscam* στη *Drosophila* – περίπου 38,016 πρωτεΐνες!

86

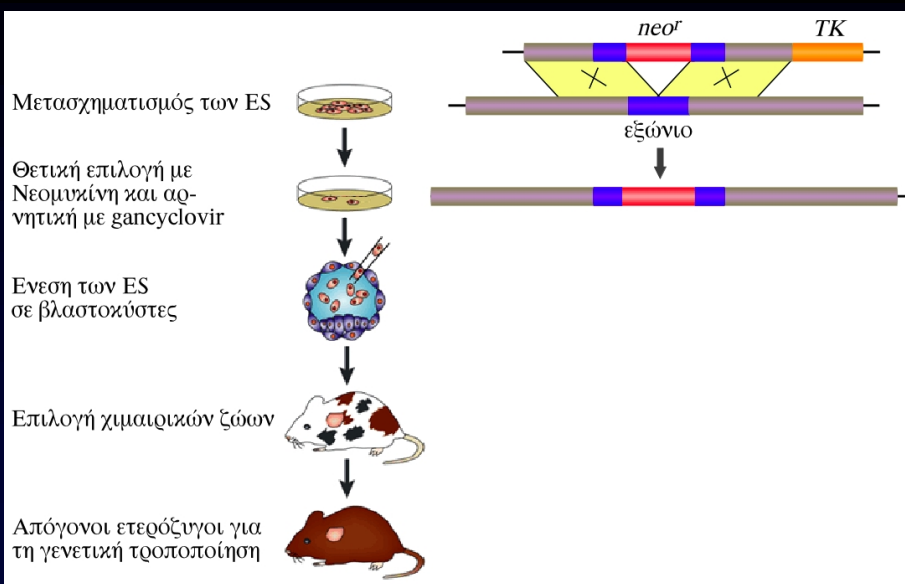
## Ρύθμιση - μετάφραση



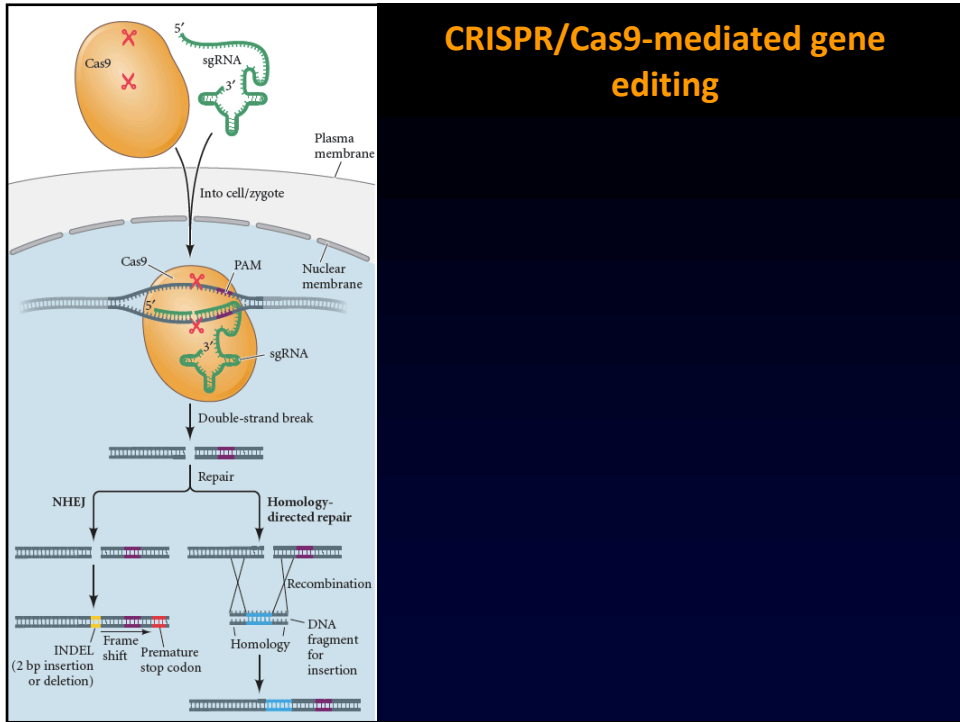
Η *Rpl38* είναι μια ριβοσωμική πρωτεΐνη (Gilbert & Barresi, Kondrashov et al. 2011)

87

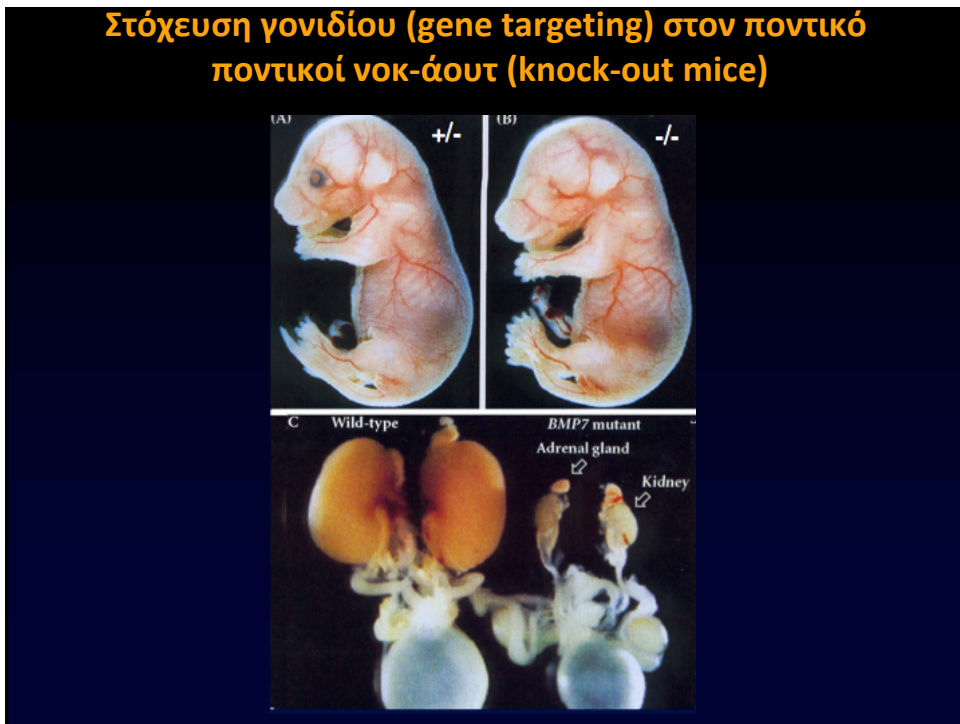
## Στόχευση γονιδίου (gene targeting) στον ποντικό ποντικοί νοκ-άουτ (knock-out mice)



88

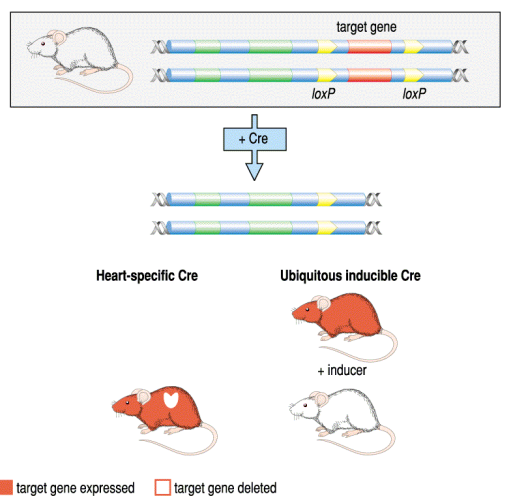


89



90

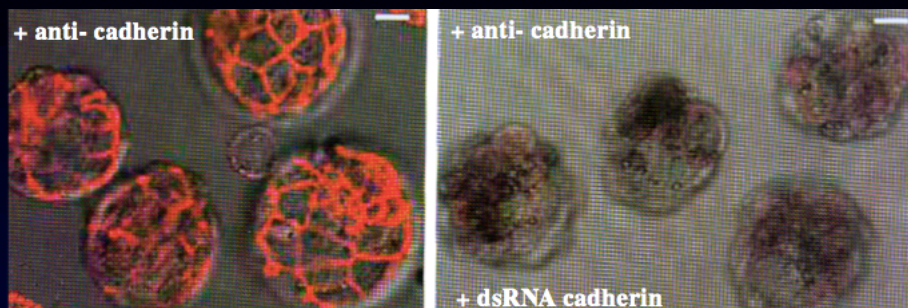
## Στόχευση γονιδίου (gene targeting) στον ποντικό ποντικοί νοκ-άουτ (knock-out mice)



Πολλά νοκ-άουτ σε γονίδια που εκφράζονται σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης είναι εμβρυϊκά θνησιγόνα. Σε αυτές τις περιπτώσεις για να μελετήσουμε το ρόλο τους σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια χρειάζεται να φτιάξουμε ποντικούς στους οποίους η αδρανοποίηση του γονιδίου να γίνεται σε συγκεκριμένο ιστό/όργανο ή να είναι επαγωγίμη.

91

## Παρεμπόδιση RNA (RNA interference)



- ▶ Εισαγωγή δίκλωνου RNA ομόλογου με το γονίδιο που μελετάται έχει σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του mRNA αυτού.
- ▶ Χρησιμοποιείται σε όλους τους οργανισμούς-μοντέλα.

92

### Παρεμπόδιση RNA (RNA interference)

(α) Άτομο *C. elegans* στο οποίο έχει χορηγηθεί RNAi έναντι ενός γονιδίου του οποίου η ενεργότητα απαιτείται για την έκδυση. (β) Πτέρυγα από άτομο *Drosophila* στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί έκφραση RNAi έναντι του γονιδίου *wingless* (καθοδη-γούμενη από την *engrailed-Gal4*). (γ) Άτομο πλανάριο σκώληκα στο οποίο έχει χορηγηθεί RNAi έναντι του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη.

Από τη δημοσίευση Boutros & Ahringer (2008) Nature Reviews Genetics 9, 554-566.

(α) Άτομο *C. elegans* στο οποίο έχει χορηγηθεί RNAi έναντι ενός γονιδίου του οποίου η ενεργότητα απαιτείται για την έκδυση. (β) Πτέρυγα από άτομο *Drosophila* στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί έκφραση RNAi έναντι του γονιδίου *wingless* (καθοδη-γούμενη από την *engrailed-Gal4*). (γ) Άτομο πλανάριο σκώληκα στο οποίο έχει χορηγηθεί RNAi έναντι του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-κατενίνη.

Από τη δημοσίευση Boutros & Ahringer (2008) Nature Reviews Genetics 9, 554-566.

93

### Δημιουργία κυρίαρχων αρνητικών μεταλλάξεων

Συνηθέστερα σε οργανισμούς στους οποίους δεν είναι δυνατή η στόχευση γονιδίου (*Xenopus*, κοτόπουλο).

**Mutation gives rise to defective receptor protein**

DNA → mutation → DNA → transcription → mRNA → translation → Type II (active receptor subunit) and Type II (truncated receptor subunit). The truncated subunit lacks the kinase domain.

**No signal from mutant receptor even when mutant subunit is dimerized with a normal subunit**

bound ligand → Signal (No signal when mutant is present)

**mRNA encoding mutant receptor injected into both cells of a two-cell embryo**

Result: No mesoderm or axial structures

94