

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

Ανάπτυξης



Ενότητα 5:

Theories come and theories go.

The frog remains.

(J. Rostand 1960)

Σύντομη ιστορία του *X. laevis*

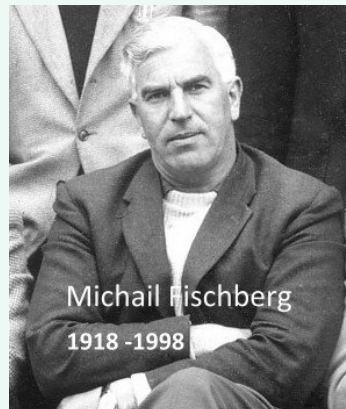
- Τη δεκαετία του **1930** ο Lancelot Hogben – έφερε τον *Xenopus* στο HB για τεστ εγκυμοσύνης «**Hogben test**»!! (hCG → ωοτοκία)
- Αργότερα ο Pieter Nieuwkoop στην Ολλανδία πραγματοποίησε εμβρυολογικές μελέτες στον *Xenopus laevis*.

Από τη δεκαετία του **1950** - Καθιέρωση στην εμβρυολογία!

- Μελέτες των Michail Fischberg και JB Gurdon - άνοιξαν τον δρόμο για την κλωνοποίηση και τη σύγχρονη αναγεννητική βιολογία.



Lancelot
Hogben



Michail
Fischberg

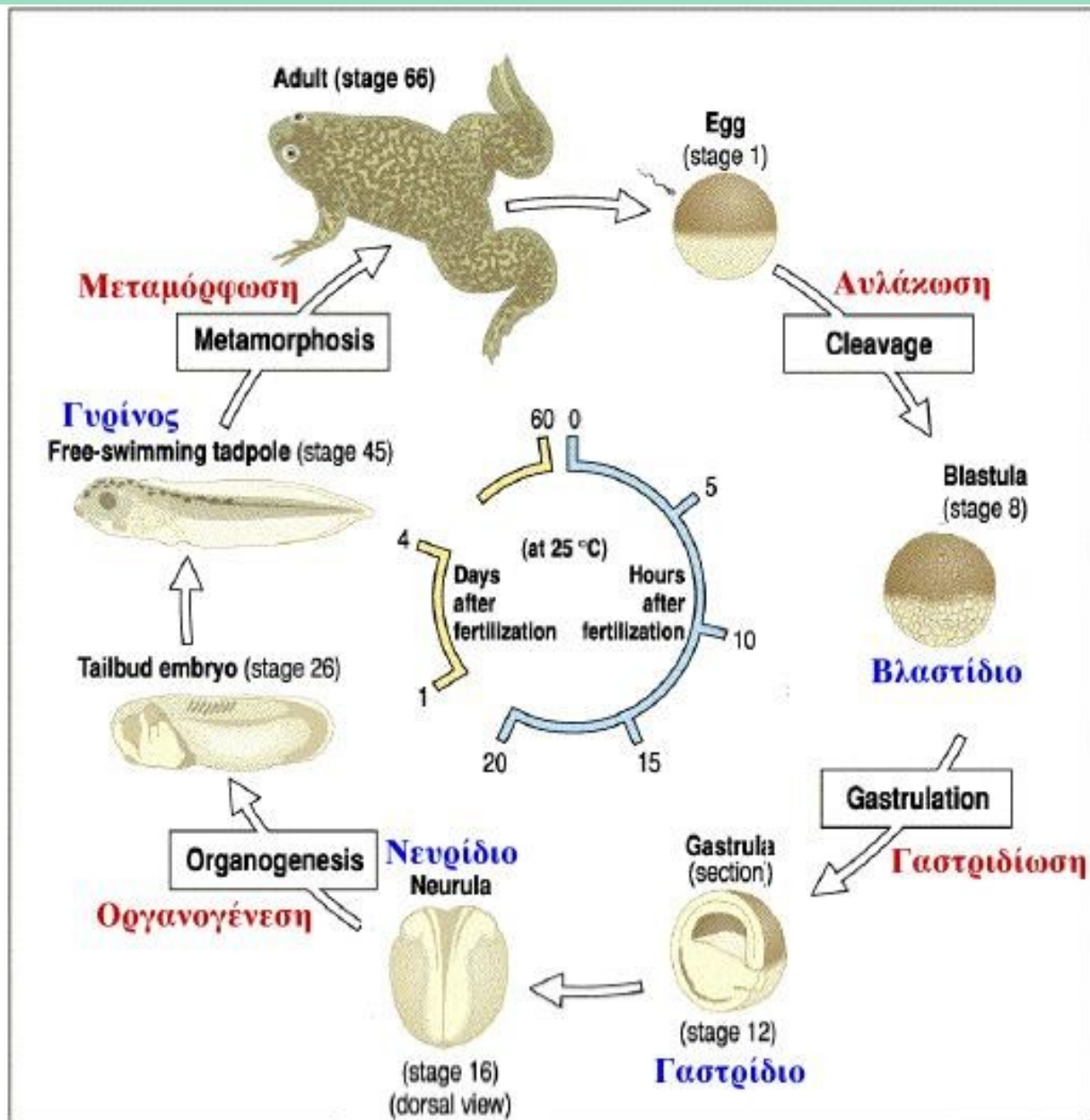
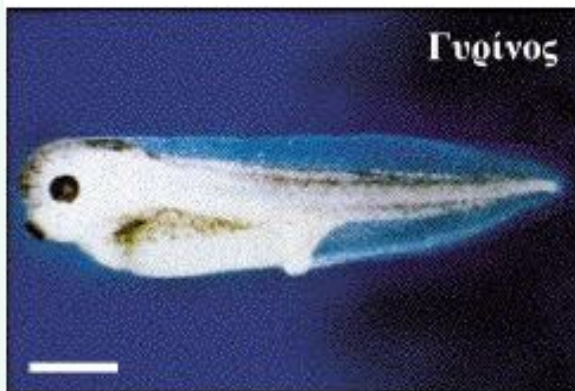
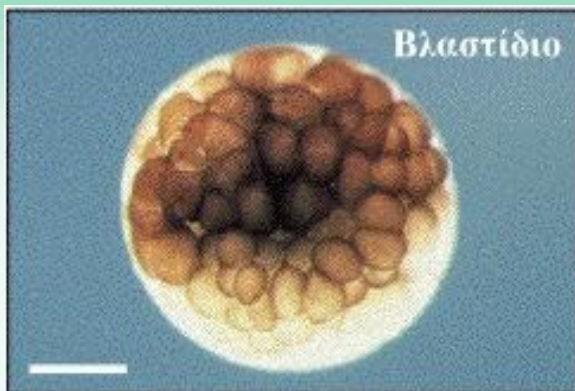


J B Gurdon

Xenopus laevis



Ο κύκλος ζωής του *Xenopus laevis*





Τα πλεονεκτήματα του *Xenopus laevis* ως πειραματικό υλικό.

- Διατηρείται εύκολα και οικονομικά στο εργαστήριο.
- Μπορούμε εύκολα να πάρουμε γαμέτες με κατάλληλους ορμονικούς χειρισμούς (ένεση hCG) οποιαδήποτε περίοδο του έτους.
- Τα ωάρια και τα έμβρυα είναι μεγάλα (περίπου 1 mm με 1,4 mm) γεγονός που επιτρέπει διάφορους πειραματικούς χειρισμούς.
- Γονιμοποίηση και εμβρυογένεση πραγματοποιείται έξω από το σώμα της μητέρας - παρατήρηση και επέμβαση σε κάθε στάδιο.
- Μεγάλος αριθμός εμβρύων (~ 1000).
- Είναι δυνατή η γονιμοποίηση *in vitro* έτσι μπορούμε να έχουμε έμβρυα για τα οποία γνωρίζουμε την ακριβή ώρα της γονιμοποίησης - συνήθως τα έμβρυα αυτά αναπτύσσονται συγχρονισμένα.
- Τα έμβρυα αναπτύσσονται γρήγορα και η καλλιέργειά τους είναι απλή.
- Επειδή το ωάριο έχει μεγάλες ποσότητες λεκίθου είναι εύκολο τα τμήματά του να καλλιεργηθούν *in vitro* για αρκετές ημέρες.
- Συντηρημένοι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί.
- Αλληλούχηση γονιδιώματος, 2016.

Χρήσιμο μοντέλο για....Ecotoxicology Studies

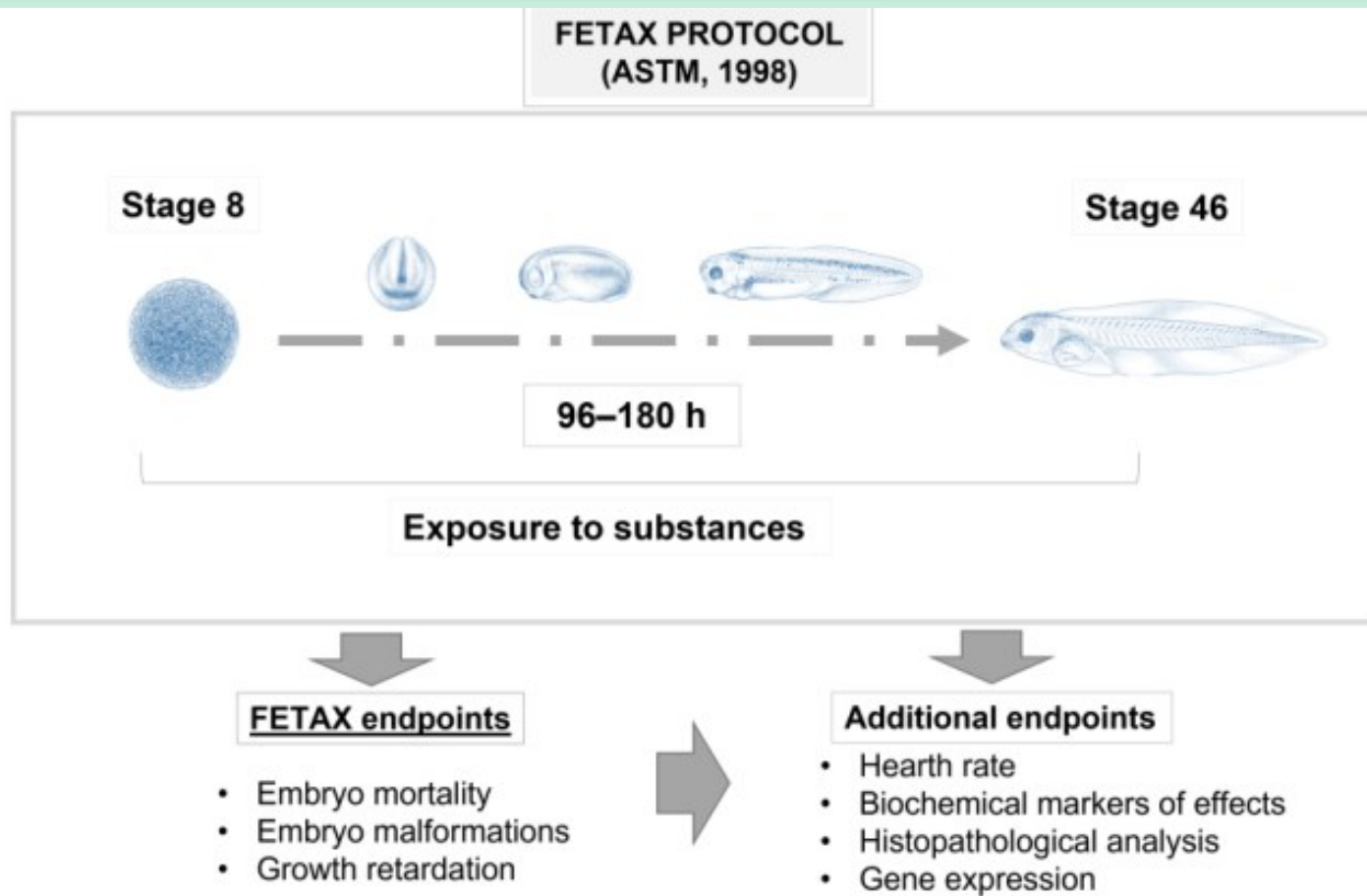


Figure 1. Scheme of Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus* (FETAX), employed to measure the activity of pollutants during embryo development.

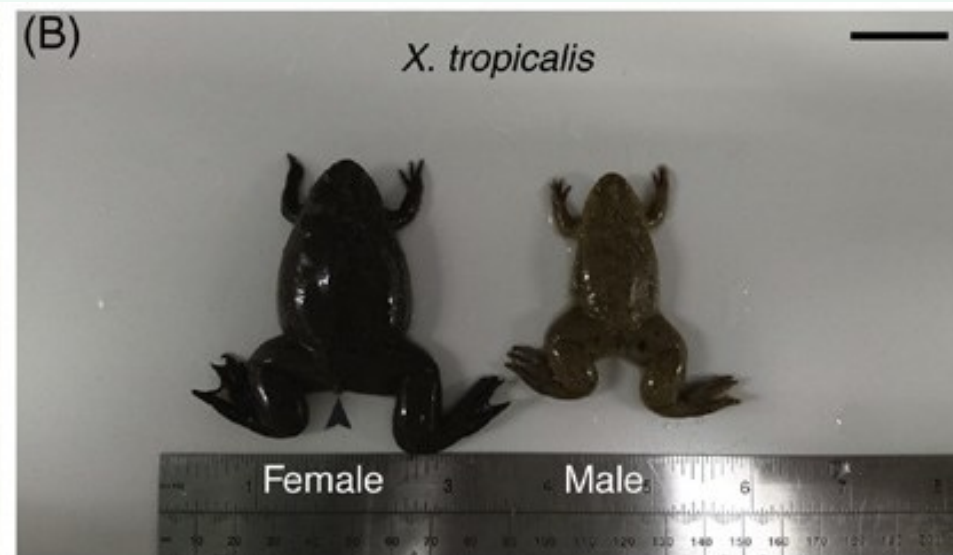
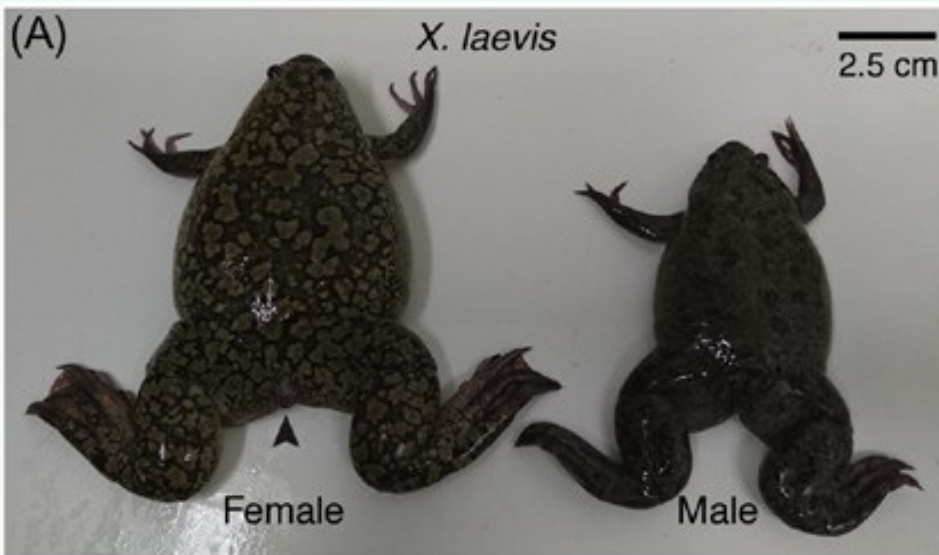
<https://doi.org/10.3390/biology12060890>

Nobody is perfect!

Μειονεκτήματα που παρουσιάζει ο *Xenopus laevis*

- Είναι τετραπλοειδής οργανισμός.
- Χρειάζονται 1 - 2 χρόνια για να φθάσει στην αναπαραγωγική ηλικία.

Δύσκολες οι γενετικές αναλύσεις



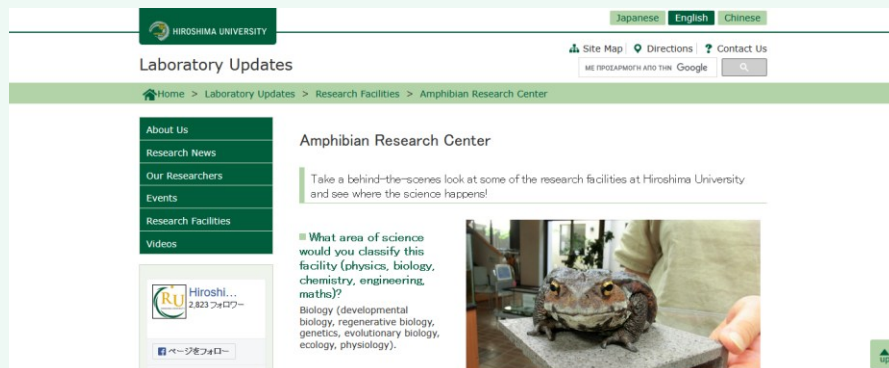
Απο το 2000 και μετά χρησιμοποιείται απο πολλά εργαστήρια ο *X. tropicalis* (2n).

Εργαστήρια-κέντρα που μελετούν τον *Xenopus*



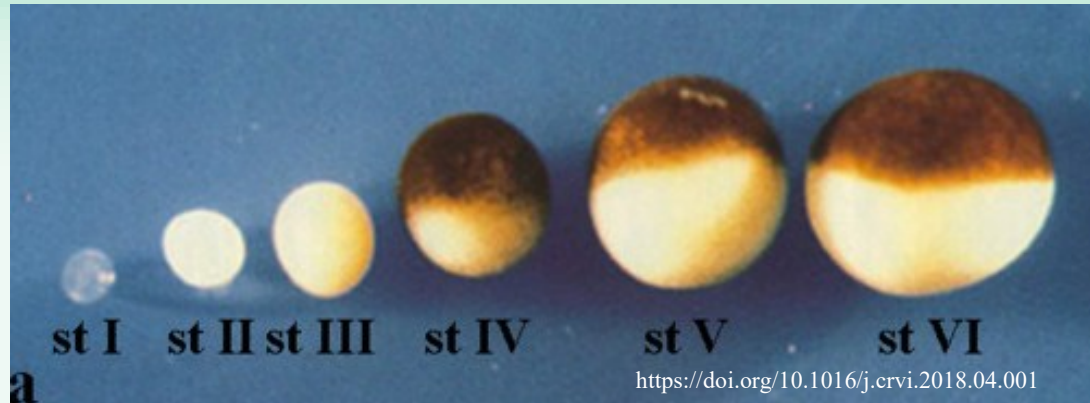
Ευρώπη: The EXRC is the world's largest *Xenopus* research facility. We receive and breed genetically-altered frogs, embryos and sperm, and distribute resources to over 150 research laboratories worldwide.

Αμερική: The University of Rochester is home to the world's most comprehensive resource specializing in the use of the amphibian *Xenopus laevis* for biomedical and immunological research

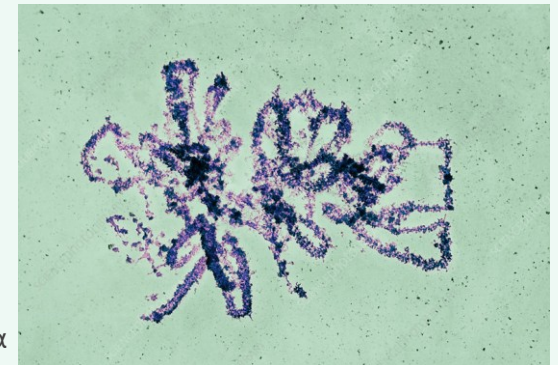


Ασία: Biology (developmental biology, regenerative biology, genetics, evolutionary biology, ecology, physiology).

Η ωογένεση στον *Xenopus*

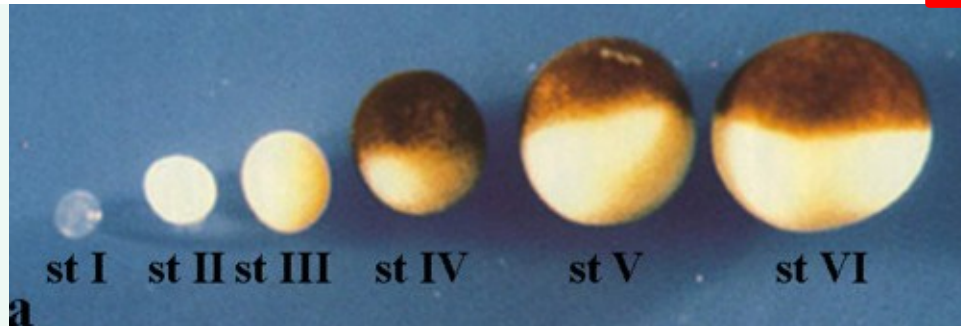
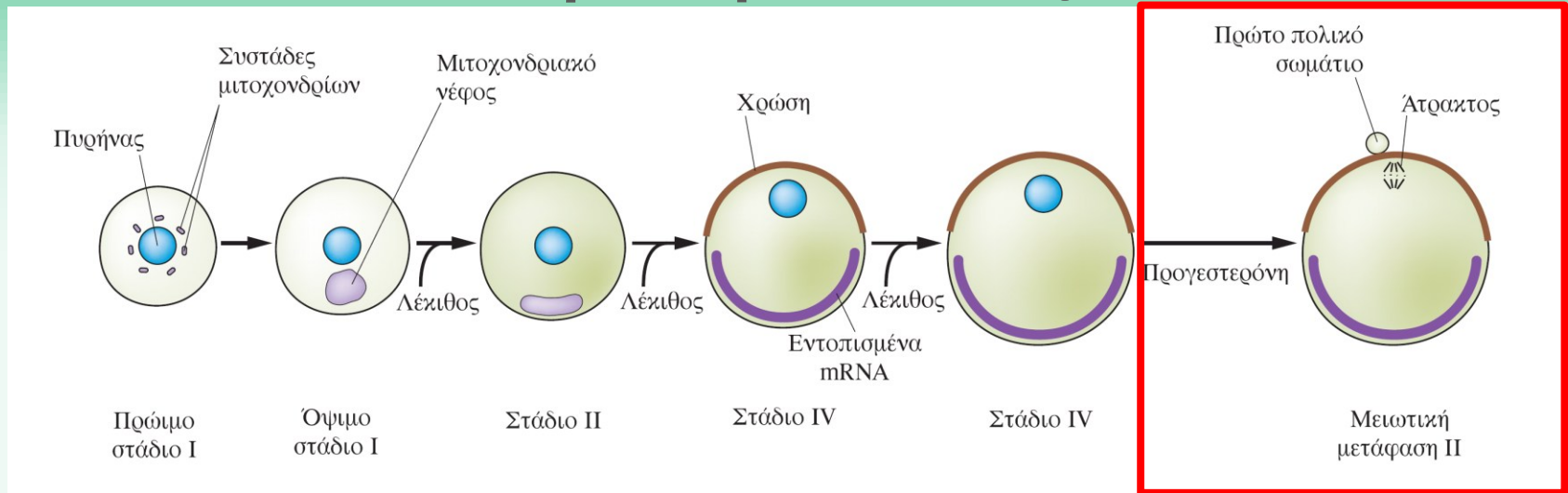


- Διαρκεί αρκετούς μήνες.
- Τα ωκύτταρα αυξάνονται προσλαμβάνοντας αποθέματα τροφής - απαραίτητα για την αναπτυξη του εμβρύου.
- Πολλαπλασιασμός rRNA και συσσώρευση tRNA – πρωτεϊνοσυνθεση στην πρώιμη ανάπτυξη.
- Απορρόφηση πρωτεϊνών λεκίθου (συνθ. συκώτι).
- Ψηκτροειδή χρωμοσώματα (μειωτική πρόφαση-ενεργά)



Ψηκτροειδή χρωμοσώματα

Η ωογένεση στον *Xenopus*



- Μιτοχονδριακό νέφος - γαμετικό πλάσμα } φυτικός πόλος <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.04.001>
- Εντοπισμένα mRNA (vegT, vg1).
- Πυρήνας – χρωστική → ζωικός πόλος

Άρα το ωκύτταρο αποκτά πολικότητα

Ο παράγοντας ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, M phase kinase)

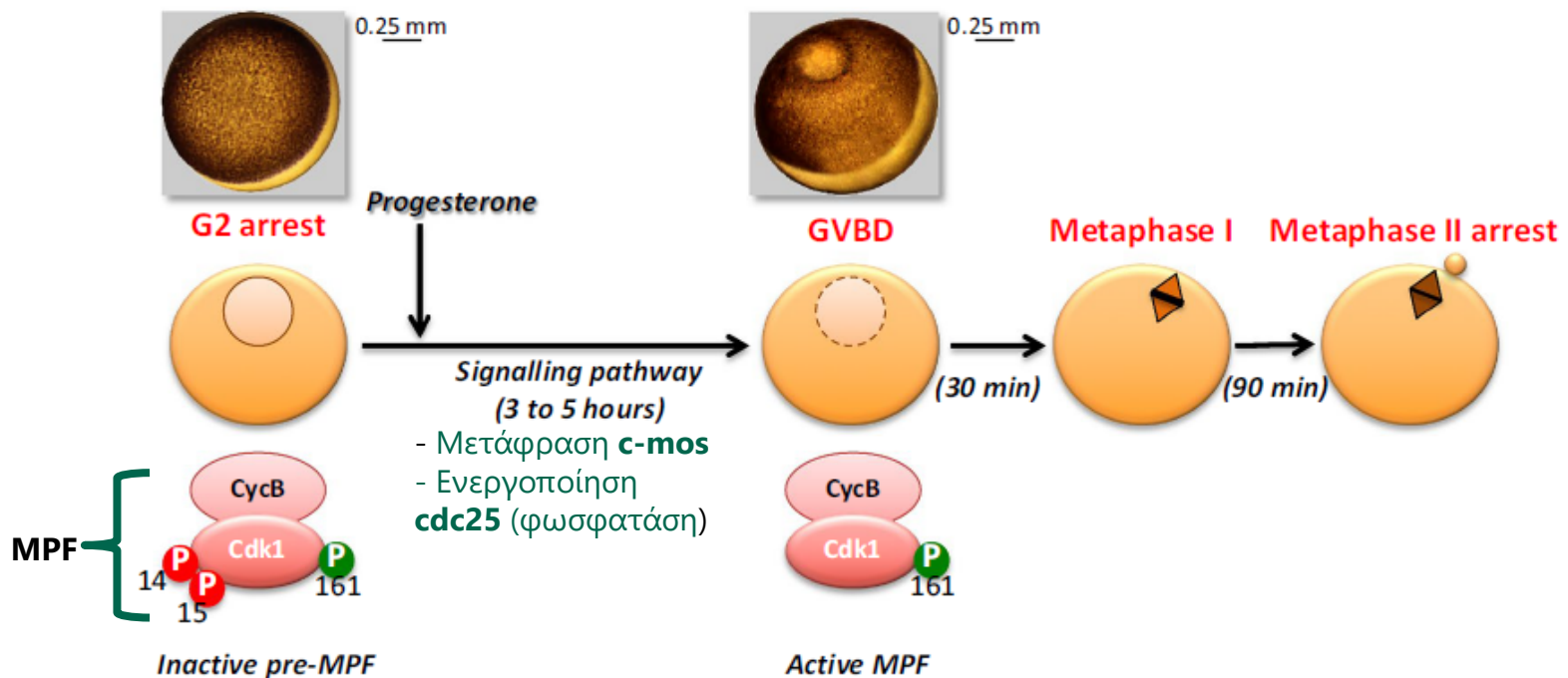
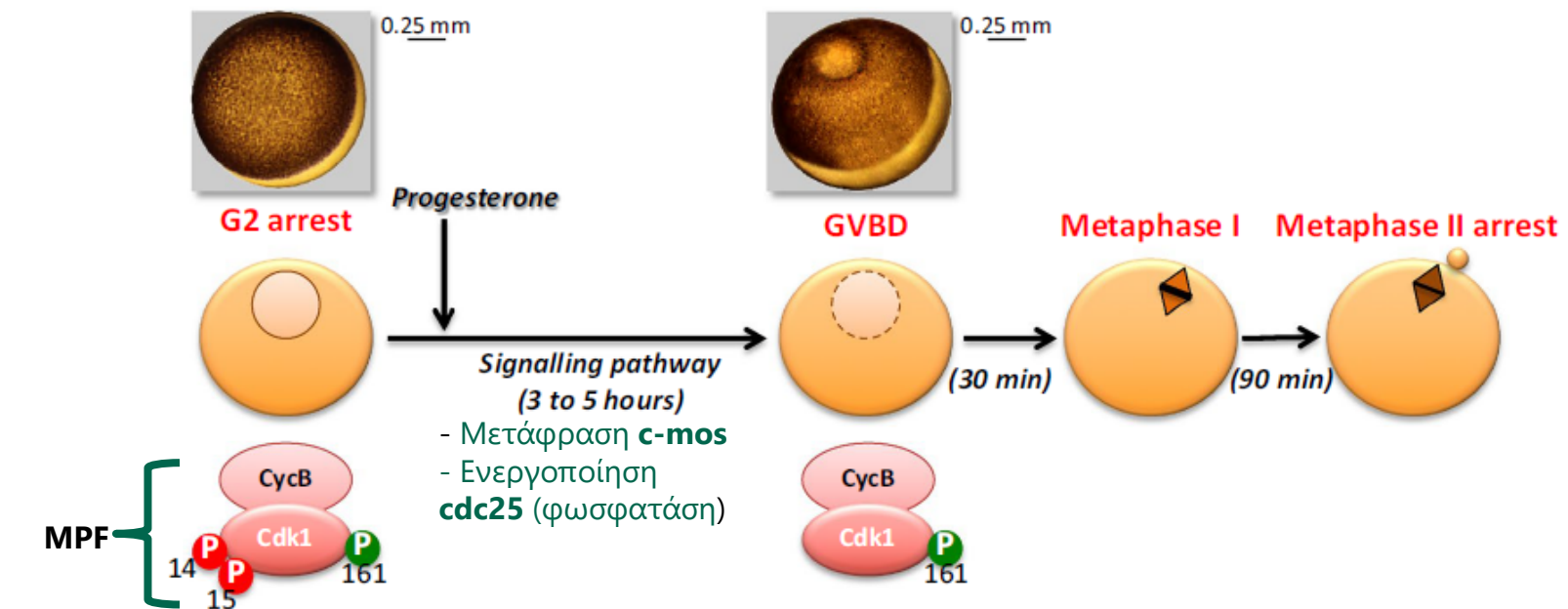


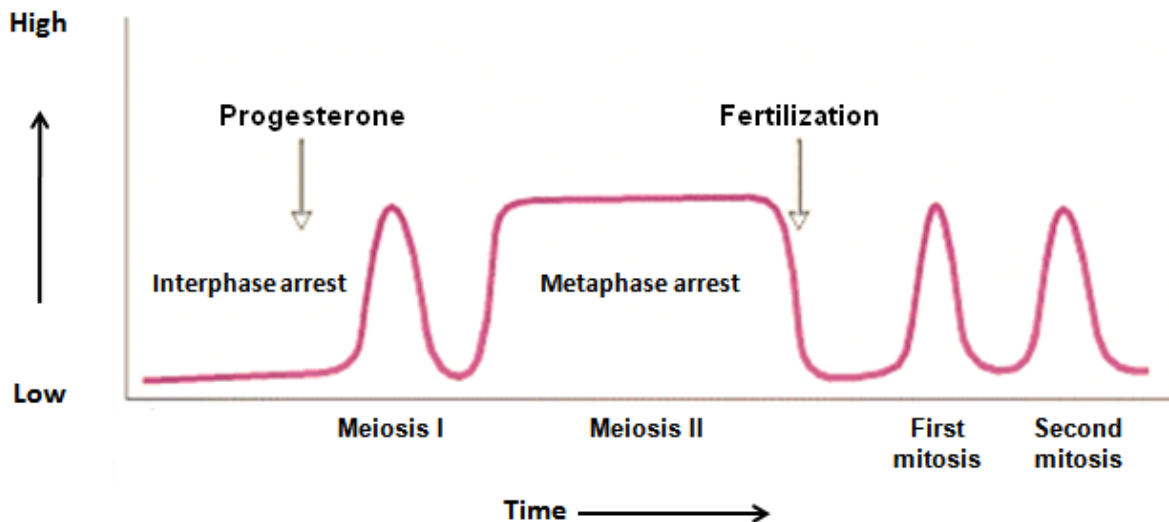
Fig. 2 Resumption of *Xenopus* oocyte meiosis. G2-arrested oocytes contain pre-MPF, i.e. inactive Cdk1-Cyclin B complexes in which Cdk1 is inhibited by T14 and Y15 phosphorylation. Progesterone initiates a signalling pathway that leads to T14-Y15 dephosphorylation of Cdk1. MPF promotes the breakdown of the nuclear envelope (GVBD for germinal vesicle breakdown, identified by a white spot at the pole of the brown hemisphere) and formation of the metaphase I spindle. After extrusion of the first polar body, the metaphase II spindle is organized and the oocyte arrests at this stage, until fertilization. Top: two pictures of *Xenopus* oocytes, G2 arrest (left) and GVBD (right)

Lemonnier et al. Cell Div (2020) 15:9
<https://doi.org/10.1186/s13008-020-00065-2>

Ο παράγοντας ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, M phase kinase)



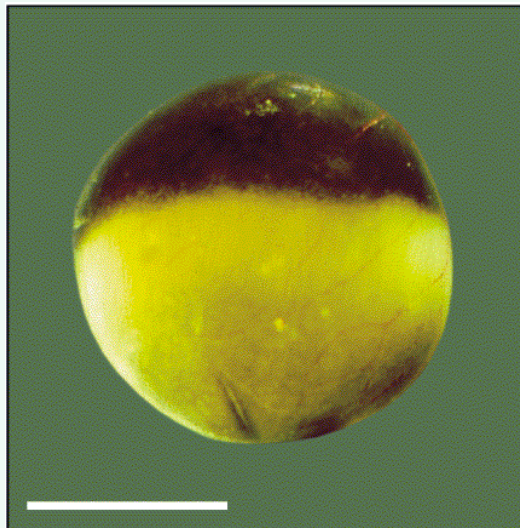
MPF activity



clin B complexes in which Cdk1 is 5 dephosphorylation of Cdk1. MPF white spot at the pole of the brown phase II spindle is organized and the oocyte
Lemonnier et al. Cell Div (2020) 15:9
<https://doi.org/10.1186/s13008-020-00065-2>

Ο παράγοντας ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, M phase kinase)

- Η γοναδοτροπίνη από την υπόφυση διεγείρει την παραγωγή προγεστερόνης.
- Η προγεστερόνη (ωοθυλακικά) ενεργοποιεί τη μετάφραση του c-mos → ενεργοποιεί τη φωσφατάση cdc25 → ενεργοποιεί τον παράγοντα ωρίμανσης MPF (M phase promoting factor).
- Ο MPF αποτελείται από δυο υπομονάδες : κυκλίνη B και την κινάση cdc2 (ή cdk1) που εξαρτάται από κυκλίνη (στόχοι ιστόνες, κυτταροπλασματική μυοσίνη, πυρηνικός φάκελλος κλπ)- ενεργοποίηση-1η διαίρεση.
- Στο τέλος της πρώτης μειωτικής διαίρεσης αναστέλλεται η αποικοδόμηση της κυκλίνης από το σύμπλοκο c-mos/cdk2 .
- Τα ωκύτταρα προωθούνται στον ωαγωγό περιβάλλονται από ένα παχύρρευστο υλικό και απελευθερώνονται (μετάφαση II).



Μη γονιμοποιημένο ωάριο *X. laevis*

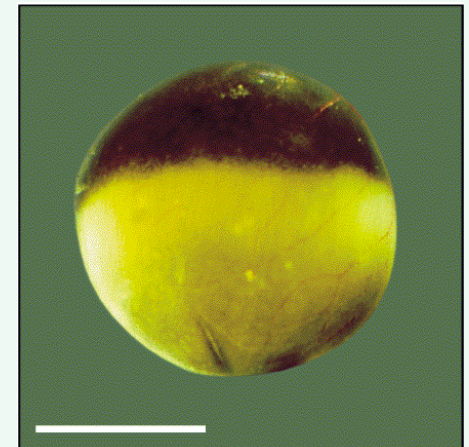
Ο παράγοντας ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, M phase kinase)

- Η γοναδοτροπίνη από την υπόφυση διεγείρει την παραγωγή προγεστερόνης.
- Η προγεστερόνη (ωοθυλακικά) ενεργοποιεί τη μετάφραση του c-mos -ενεργοποιεί τη φωσφατάση cdc25 - ενεργοποιεί τον παράγοντα ωρίμανσης MPF (M phase promoting factor).
- Ο MPF αποτελείται από κυκλίνη (cycB) και cdc2 (p34) - ενεργοποίηση-αποικοδόμηση της κυκλίνης
- Στο τέλος της τμήσης κυττάρου η κυκλίνη αποικοδομείται από το σύμπλοκο APC (anaphase promoting complex) - για παχύρρευστο υλικό
- Τα ωοκύτταρα απελευθερώνονται από τον ωοθηλάρχη και απελευθερώνονται

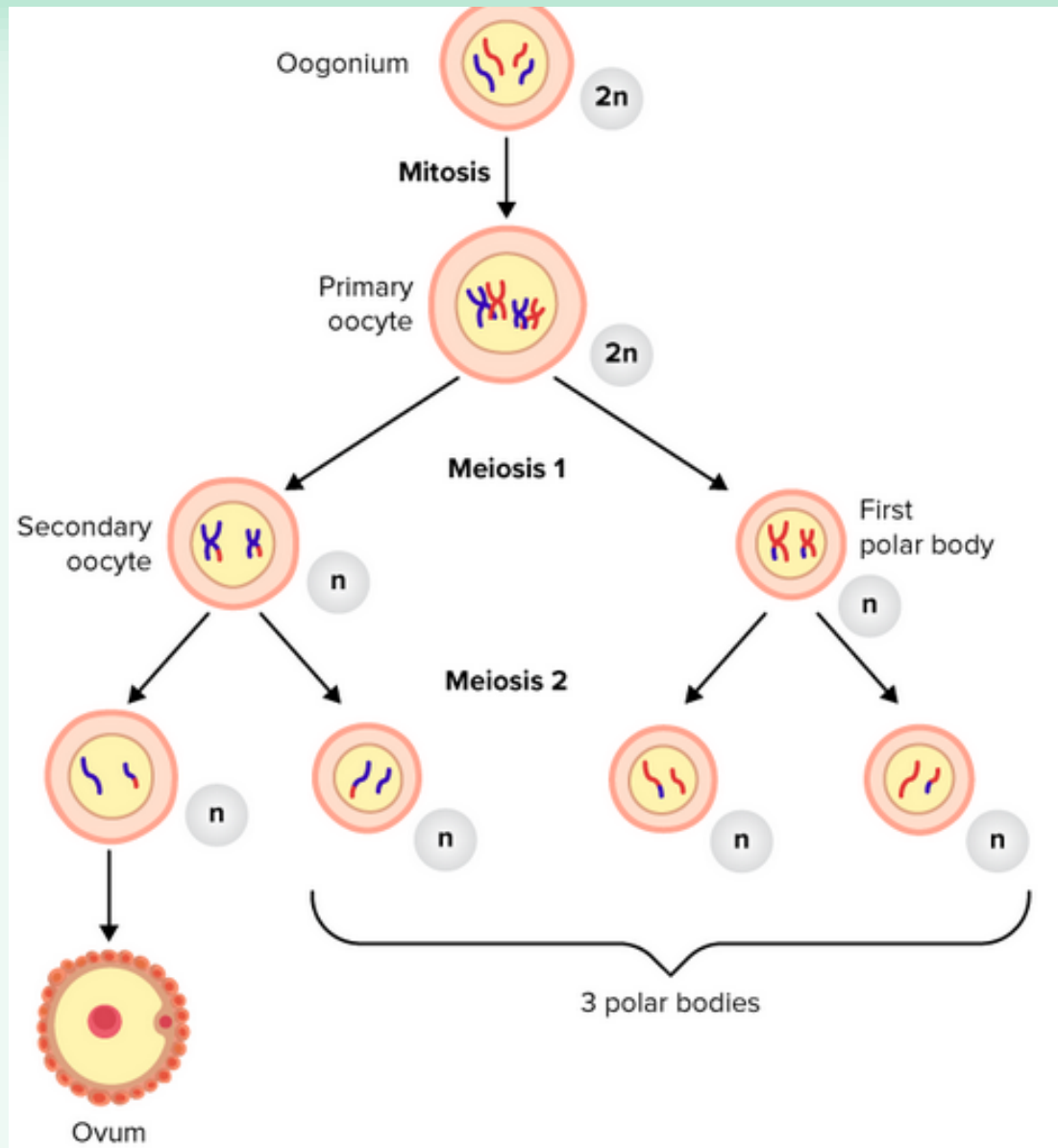


- Είσοδος Σπερματοζωαρίου - αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} οδηγεί στην αποικοδόμηση της κυκλίνης (όχι MPF) - το αυγό προχωρά στη δεύτερη διαίρεση - δεύτερο πολικό σωματίδιο.

Μή γονιμοποιημένο ωάριο *X. laevis*



Ωογένεση



Περιστροφή περιφερικού κυτταροπλάσματος

Είσοδος σπερματοζωαρίου σε οποιοδήποτε σημείο του ζωικού πόλου.

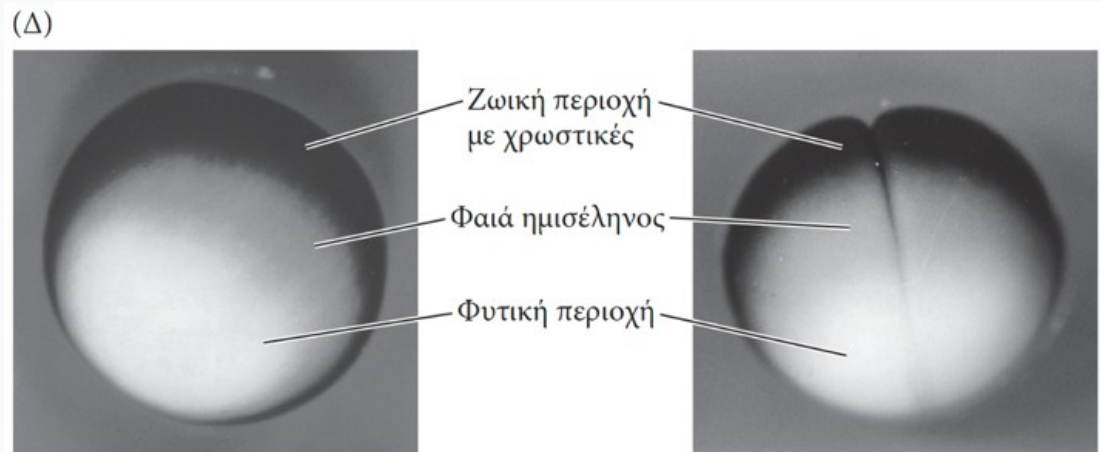
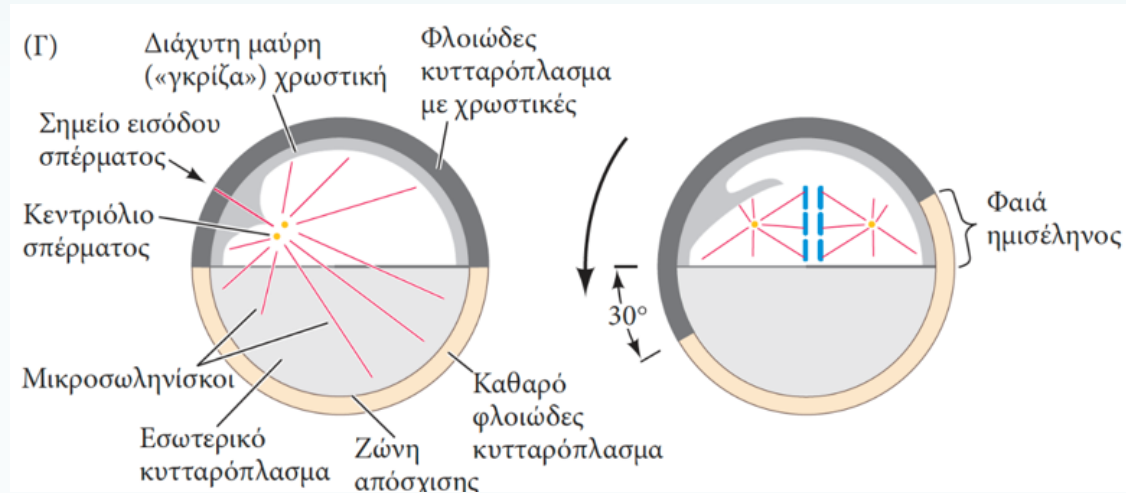
Αναδιοργάνωση κυτταροπλάσματος!

- Το περιφερειακό κυτταρόπλασμα περιστρέφεται 30° σε σχέση με το εσωτερικό κυτταρόπλασμα.
- Γκρίζα (φαιά) ημισέληνος (gray crescent) **180°** απέναντι από το σημείο εισόδου σπερματοζωαρίου – σημείο έναρξης της γαστριδίωσης.

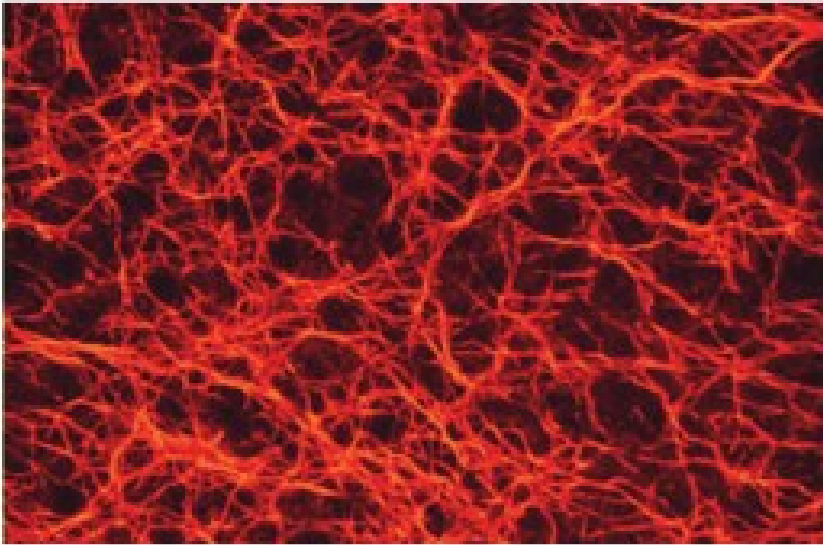
Σημείο εισόδου σπερματοζωαρίου - **κοιλιακή πλευρά.**

Γκρίζα (φαιά) ημισέληνος
– **ραχιαία πλευρά**

Ο *Xenopus* δεν έχει γκρίζα χρωστική η περιστροφή επιβεβαιώθηκε με σήμανση με ζωτικές χρωστικές.

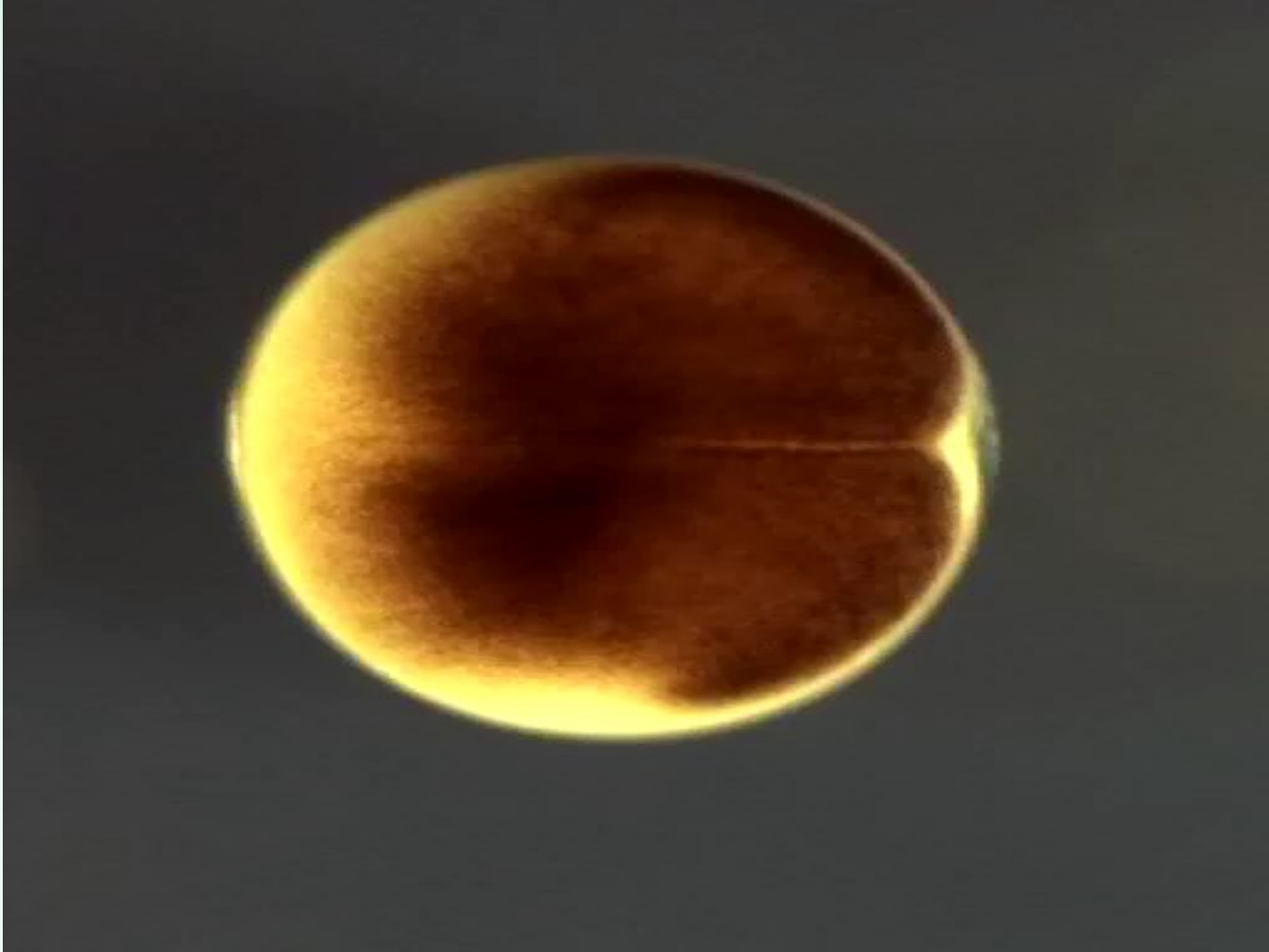


Περιστροφή περιφερικού κυτταροπλάσματος (μικροσωληνίσκοι)



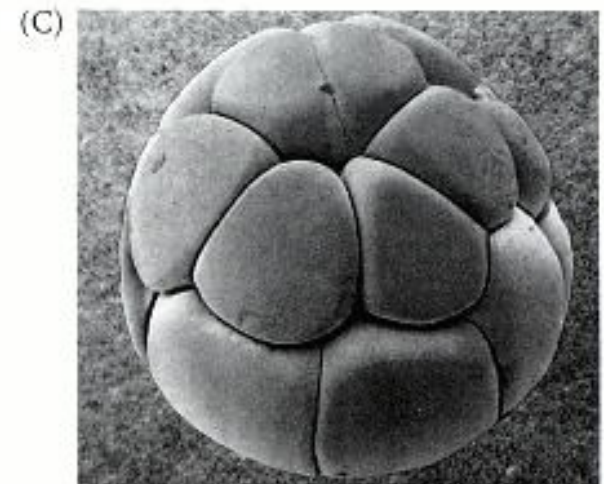
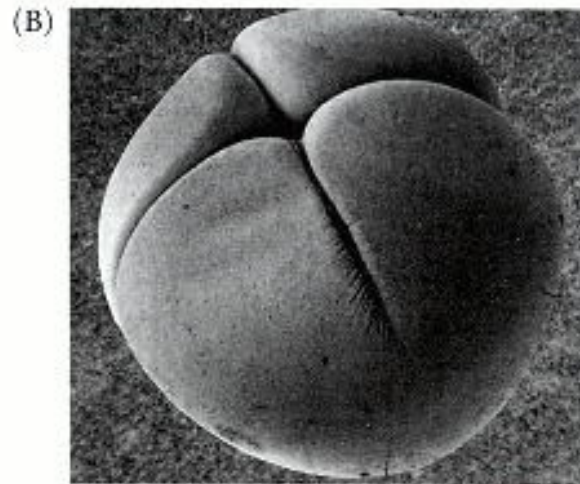
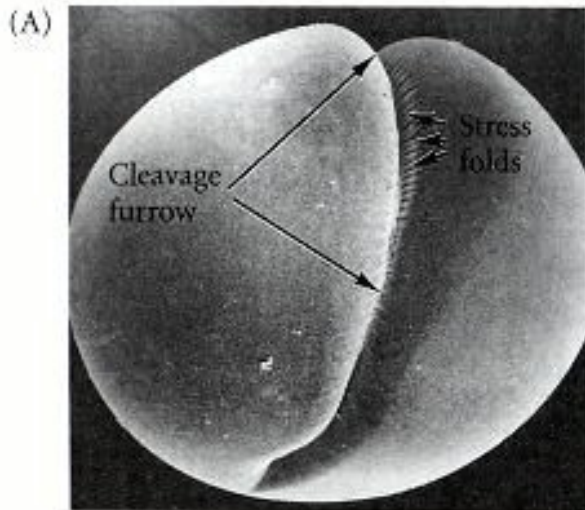
- Μικροσωληνίσκοι (μητρικοί και πατρικοί) παράλληλα τοποθετημένοι μεταξύ περιφερικού και κεντρικού κυτταροπλάσματος (εμφανίζονται μόνο στην περιστροφή) (δεξιά εικόνα).
- Καθοδήγηση από το κεντριόλιο του σπερματοζωαρίου προς το φυτικό πόλο-κατεύθυνση.
- Οι μικροσωληνίσκοι είναι «προσδεδεδεμένοι» στο περιφερειακό κυτταρόπλασμα μέσω μιας ΑΤΡασης που μοιάζει με την κινησίνη.

Αυλάκωση στον *Xenopus laevis*



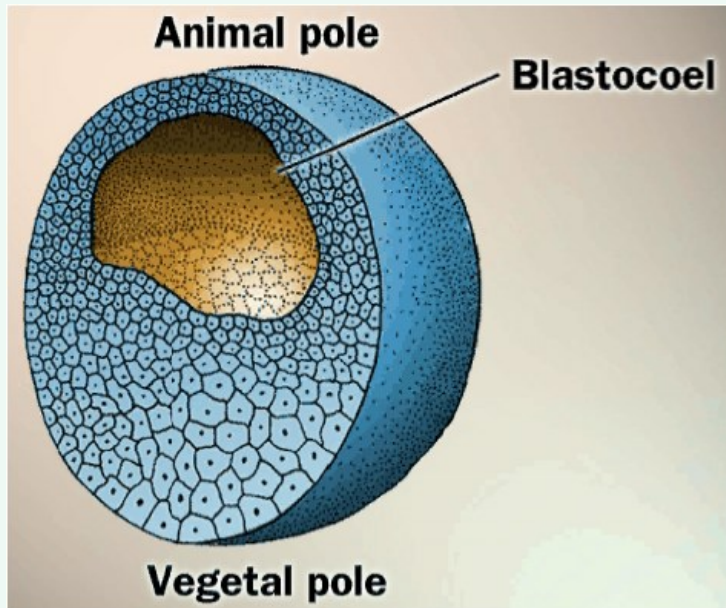
Αυλάκωση στον *Xenopus laevis*

- Ολοβλαστική αυλάκωση, γρήγορες διαιρέσεις
- Δυο πρώτες διαιρέσεις μεσημβρινές, τρίτη ισημερινή μετατοπισμένη.
- Πιο γρήγορες διαιρέσεις στο ζωϊκό ημισφαίριο (μικρομερή) πιο αργές στο φυτικό ημισφαίριο (μακρομερή).
- 14-64 κύτταρα το έμβρυο = μορίδιο (morula)
- Από την πρώτη διαίρεση αρχίζει ο σχηματισμός του βλαστόκοιλου - που καθίσταται εμφανές από τα 128 κύτταρα και μετά.





Βλαστίδιο (blastula)



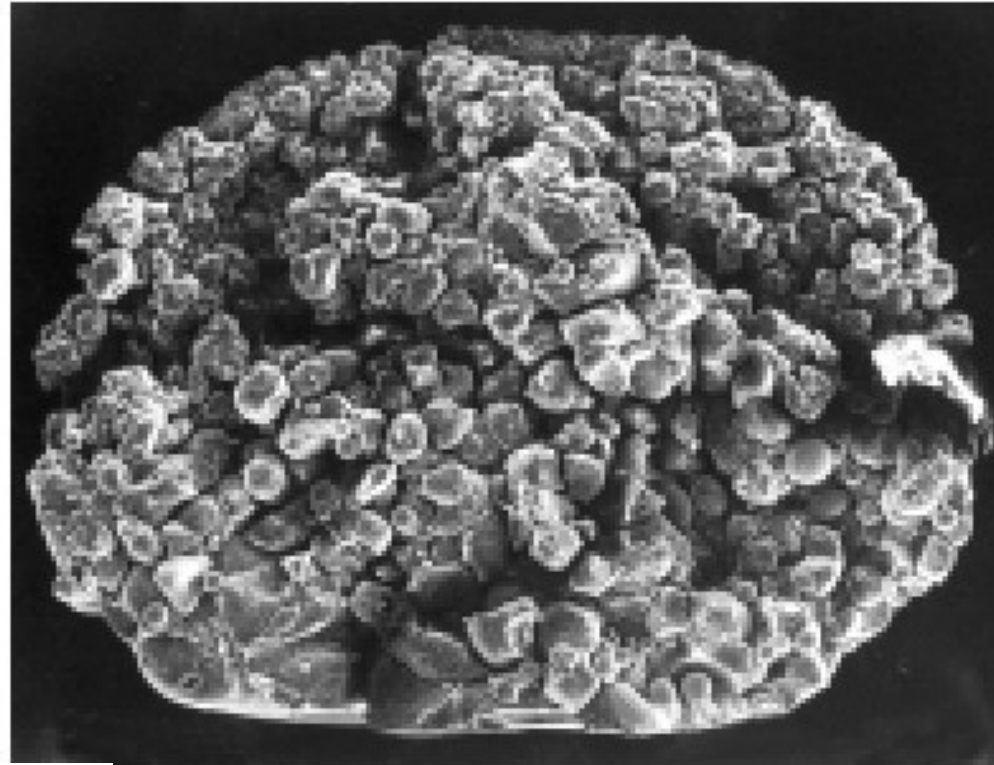
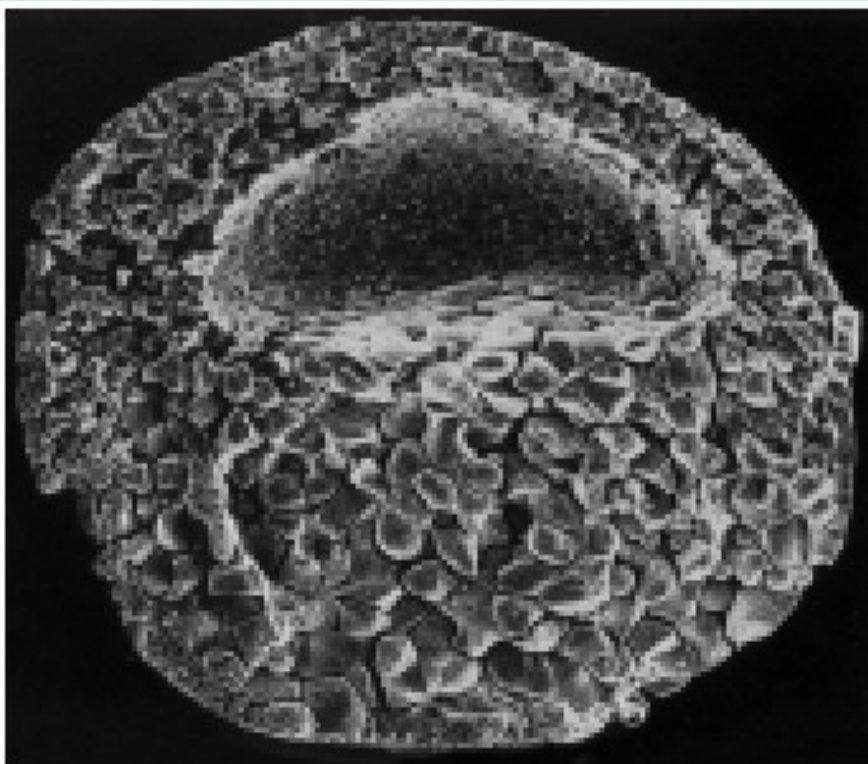
Βλαστίδιο (blastula): Στο τέλος της αυλάκωσης το έμβρυο έχει τη μορφή μιας σφαίρας που αποτελείται από λίγες χιλιάδες κύτταρα και φέρει στο εσωτερικό της το βλαστόκοιλο.

Ποιος θα μπορούσε να είναι ο ρόλος του βλαστόκοιλου;

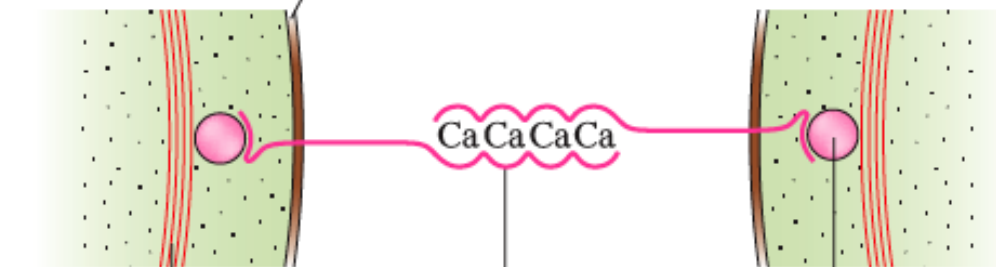
Βλαστόκοιλο (blastocoel): μια κοιλότητα γεμάτη υγρό που

- Εμποδίζει τα κύτταρα πάνω από αυτό να αλληλεπιδράσουν με αυτά κάτω από αυτό.
- Αλλάζοντας το σχήμα του διευκολύνει τη μετανάστευση των κυττάρων κατά τη γαστριδίωση.

Μόρια κυτταρικής συνάφειας και αυλάκωση



Κυτταρική μεμβράνη



Δέσμη μικροϊνιδίων
(α)

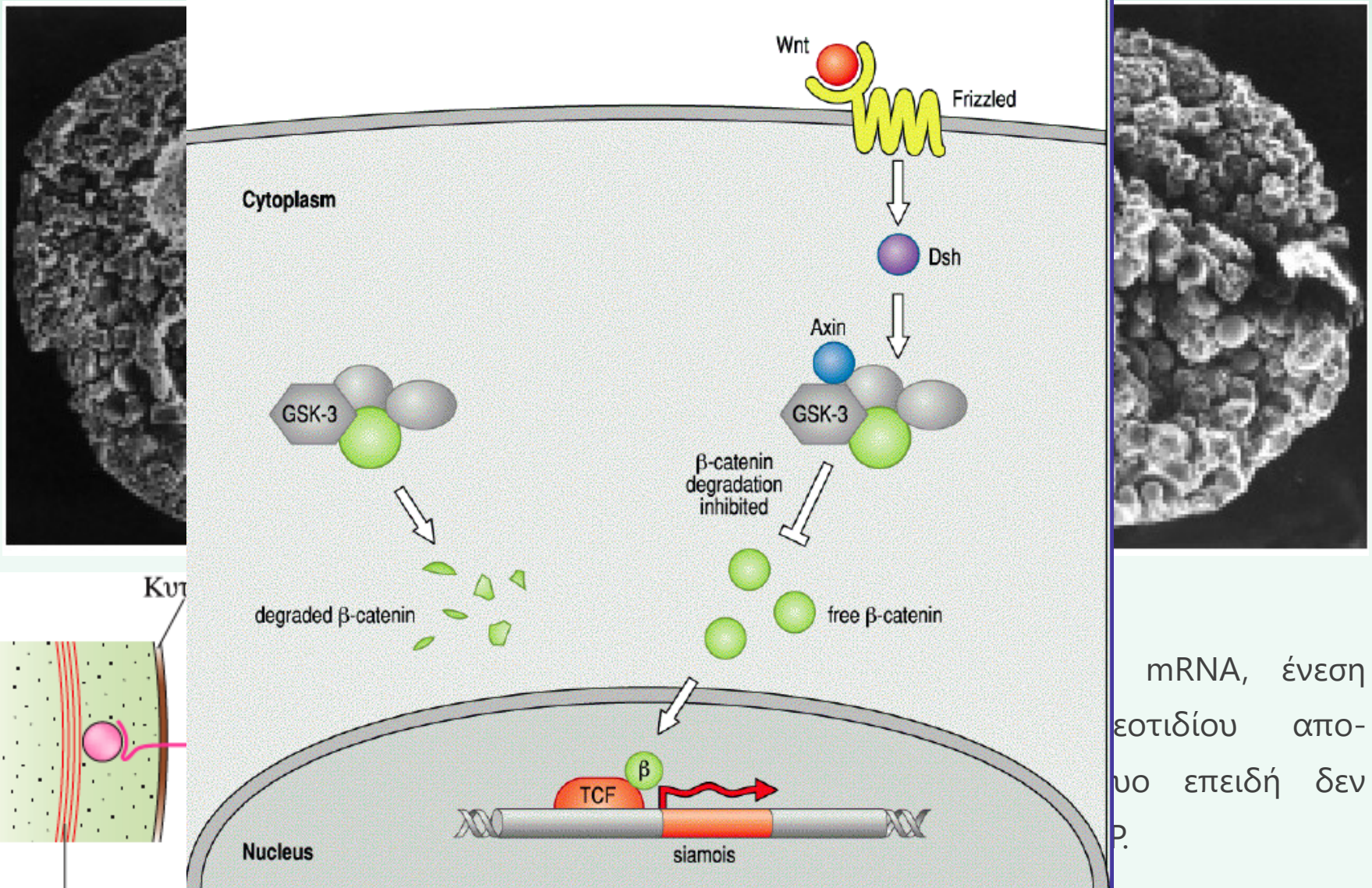
Καδερίνη

Κατενίνες

Καδερίνη EP (μόριο κυτταρικής συνάφειας):

μητρικό mRNA, ένεση antisense ολιγονουκλεοτιδίου αποδιοργανώνει το έμβρυο επειδή δεν συντίθεται η καδερίνη EP.

Μόρια κυτταρικής συνάφειας και αυλάκωση



mRNA, ένεση
εοτιδίου απο-
υο επειδή δεν
P.

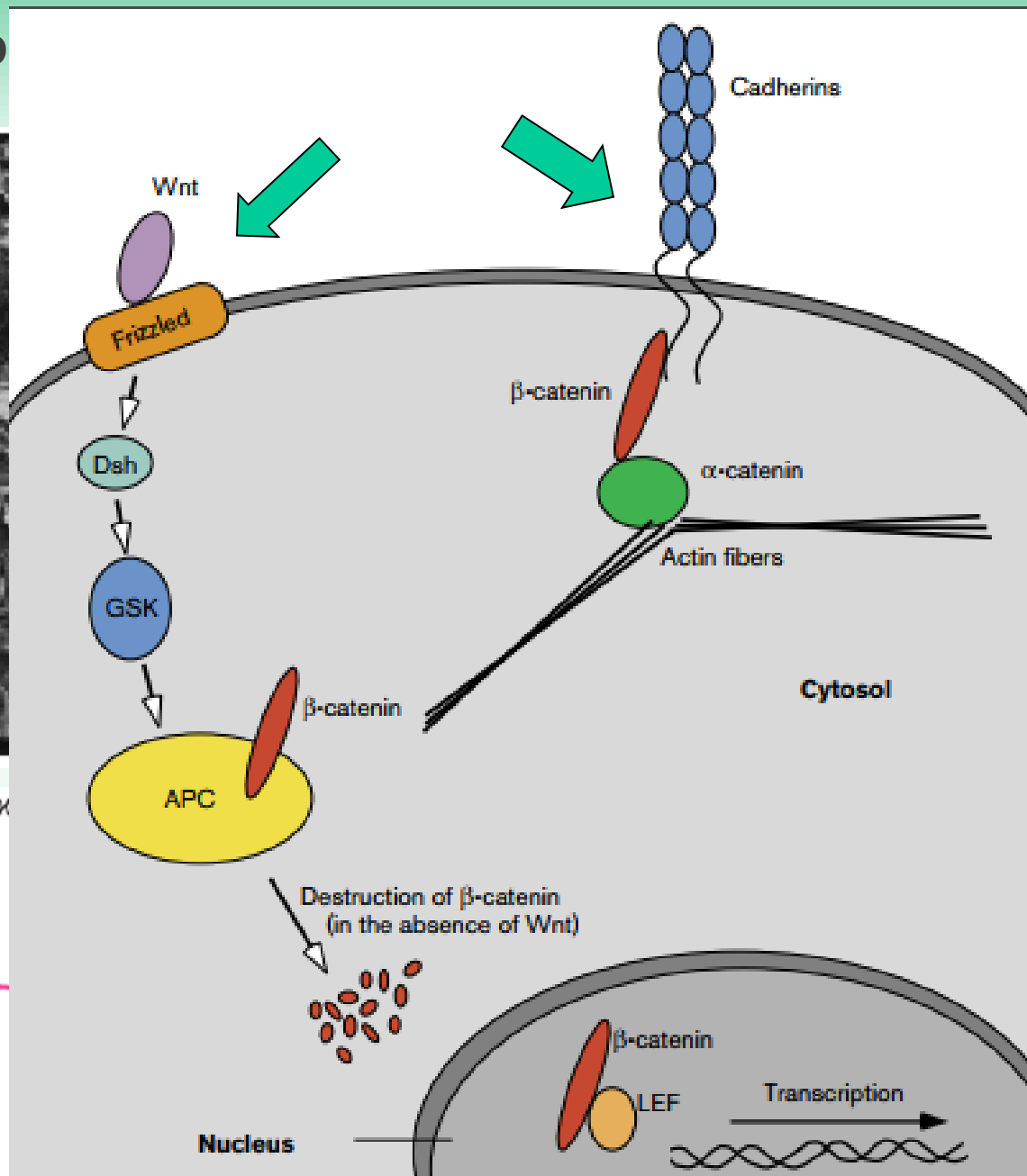
Δέσμη μικροϊνιδίων
(α)

Καδερίνη

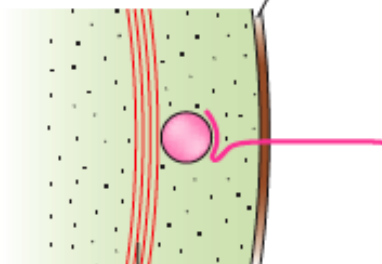
Κατενίνες

Μόρ

ση



Κυτταρική

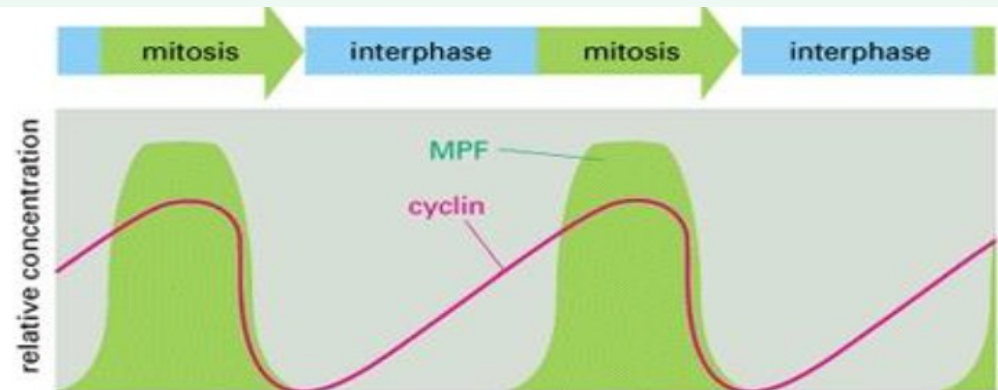
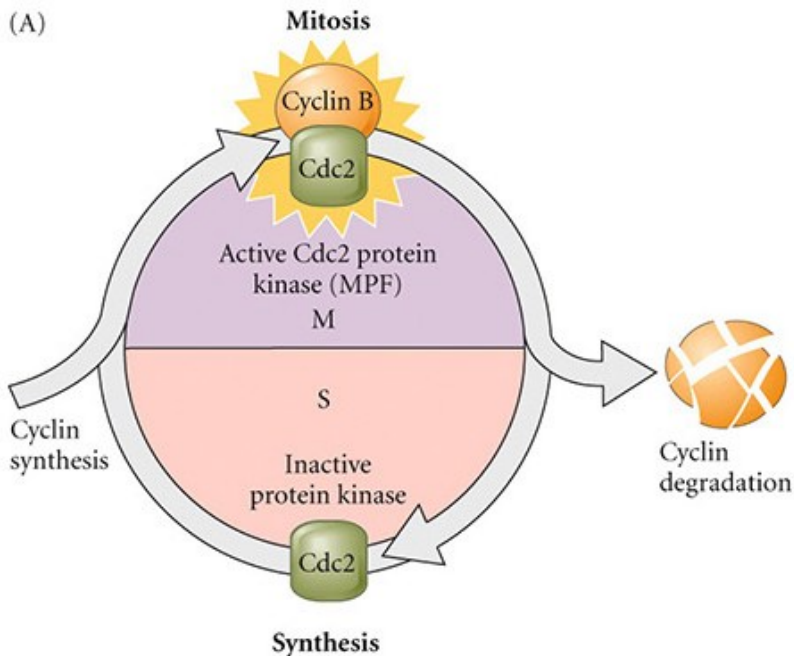
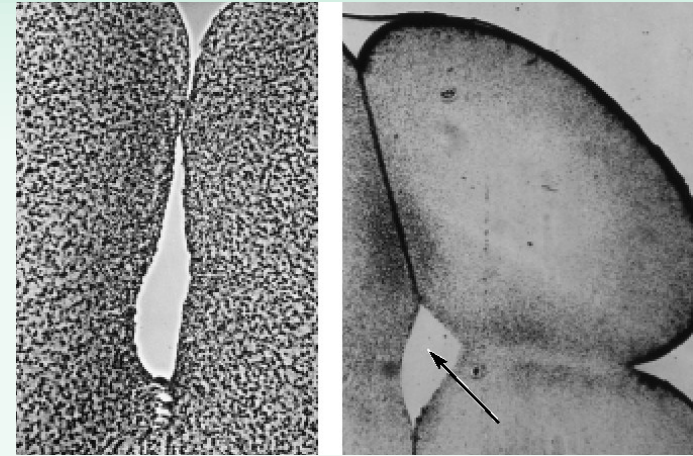


Δέσμη μικροϊνιδίων
(α)

ηRNA, ένεση
ιδίου απο-
επειδή δεν

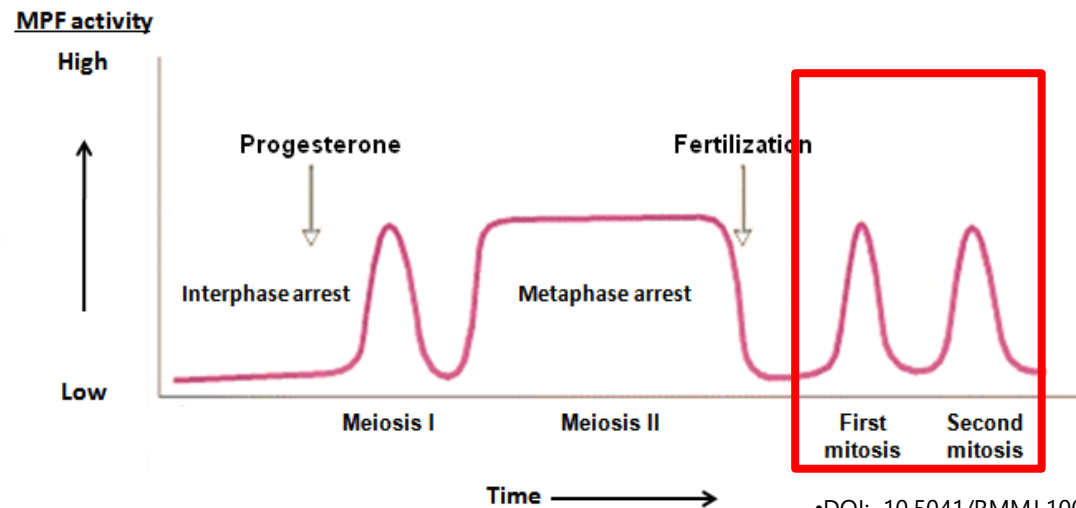
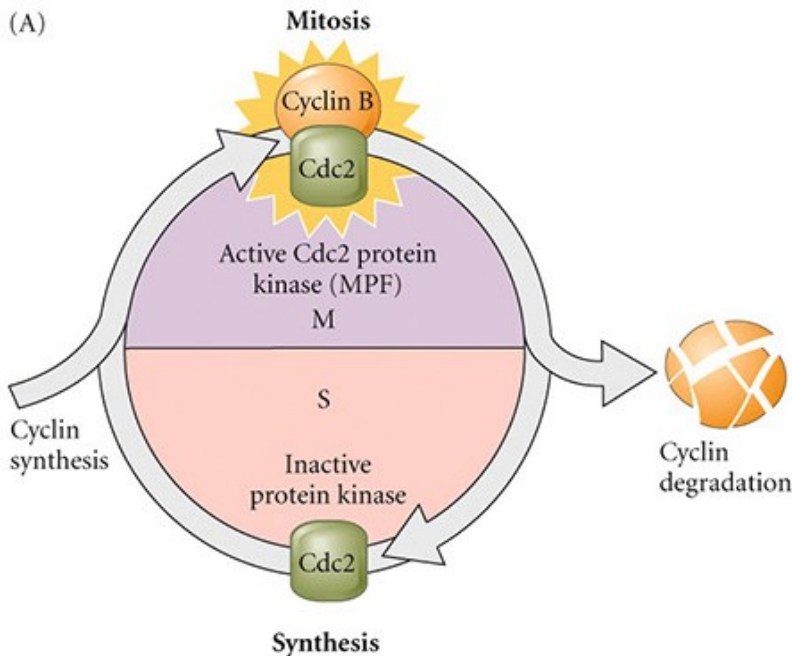
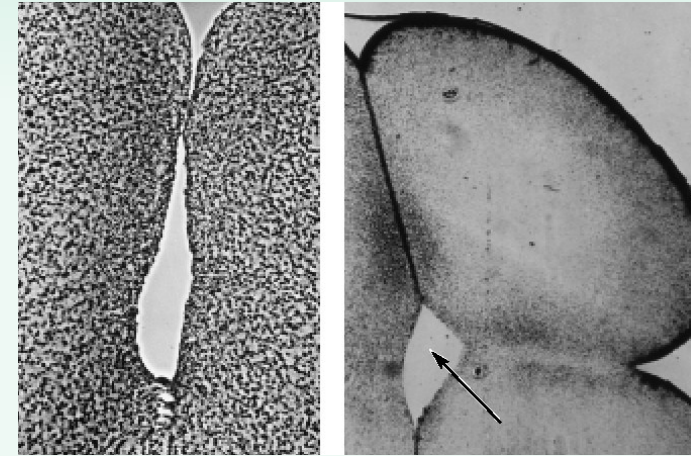
Αυλάκωση και MPF (Maturation Promoting Factor)

- Στις πρώτες διαιρέσεις δεν παρατηρείται αύξηση (όχι G). Εναλλαγή M και S φάσεων στις πρώτες 12 διαιρέσεις - συγχρονισμένες.
- Περιοδική σύνθεση, αποικοδόμηση κυκλίνης = περιοδική ενεργοποίηση MPF (Cyclin B + Cdc2).



Αυλάκωση και MPF (Maturation Promoting Factor)

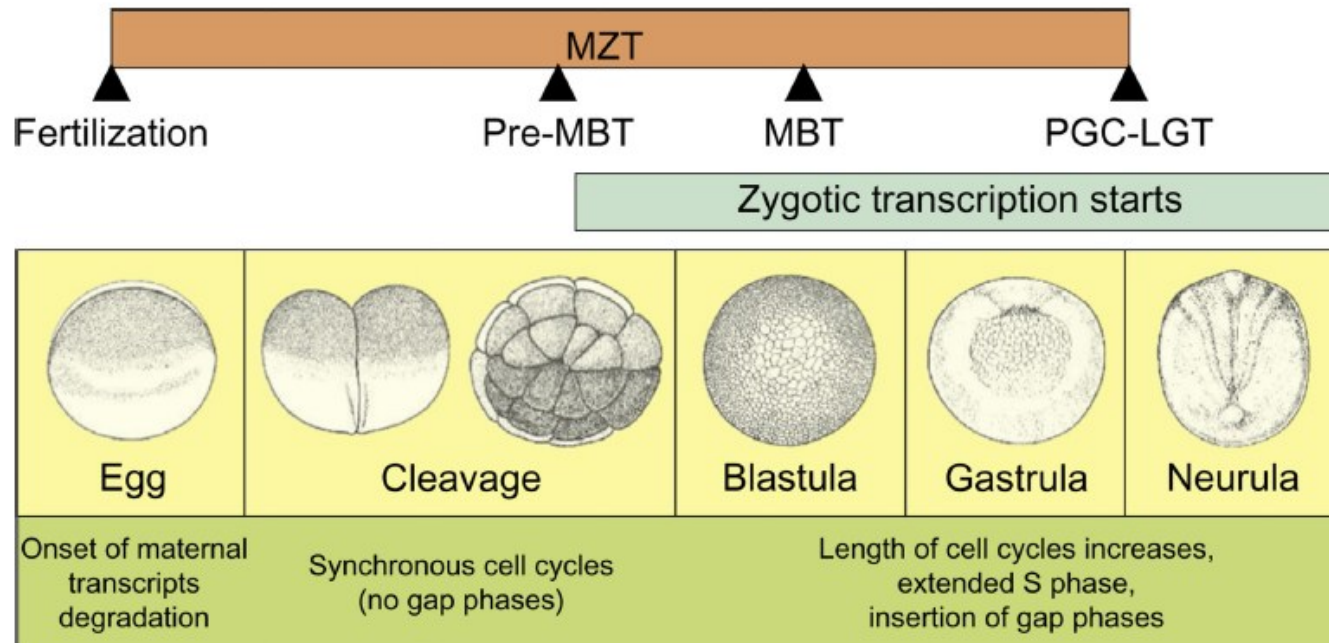
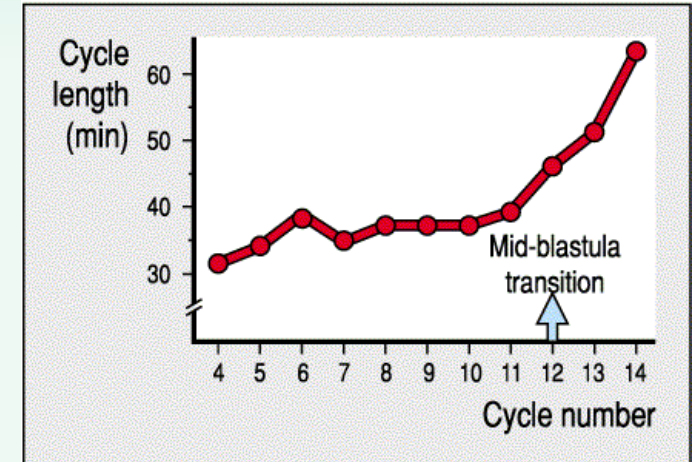
- Στις πρώτες διαιρέσεις δεν παρατηρείται αύξηση (όχι φάσεις G). Εναλλαγή M και S φάσεων στις πρώτες 12 διαιρέσεις - συγχρονισμένες.
- Περιοδική σύνθεση, αποικοδόμηση κυκλίνης = περιοδική ενεργοποίηση MPF (Cyclin B + Cdc2).



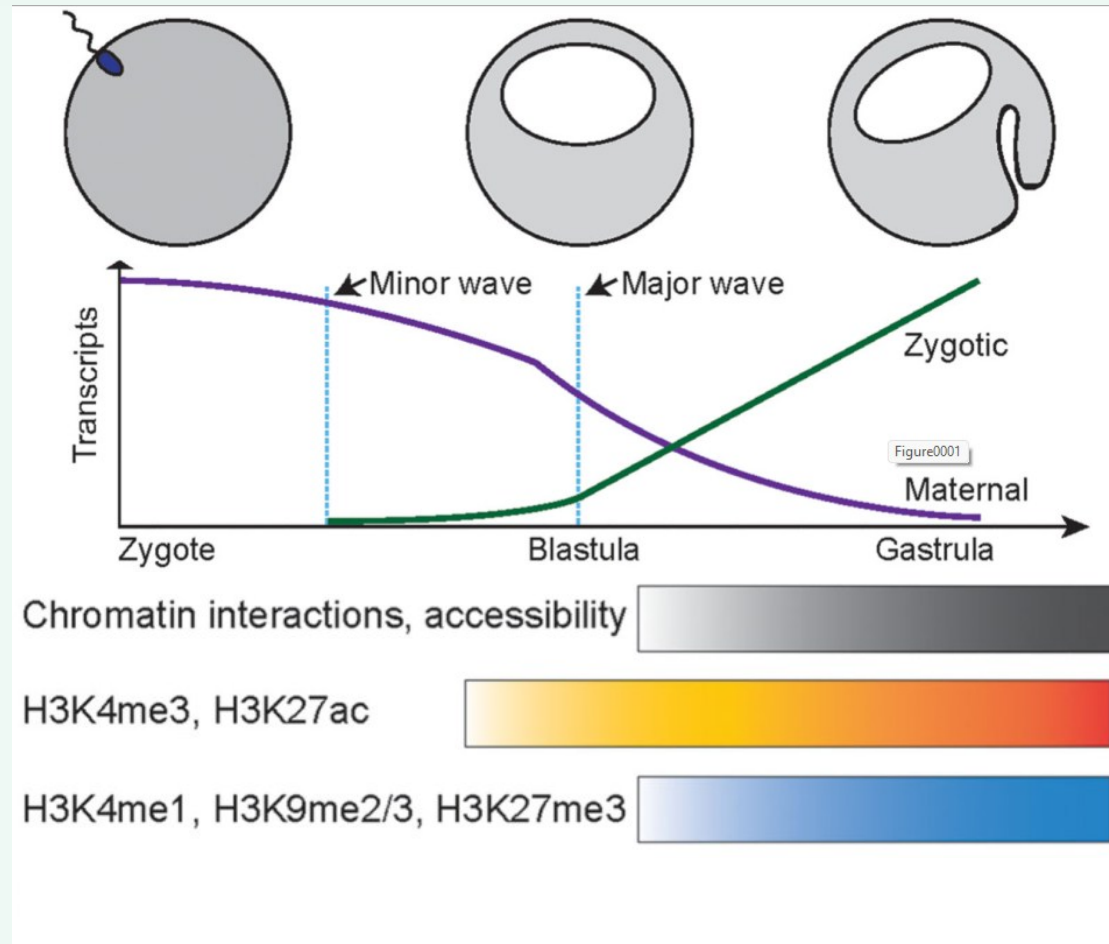
Μετάβαση μεσοβλαστιδίου – το έμβρυο παίρνει την τύχη... στα χέρια του...

Μητρικά μόρια- εξαντληση = μετάβαση μεσοβλαστιδίου (mid-blastula transition-MBT) στο τέλος της αυλάκωσης.

- Εναρξη της μεταγραφής του εμβρυϊκού γονιδιώματος.
- Στον *Xenopus* μετά τη 12η διαίρεση περίπου 4000 - 5000 κύτταρα.
- Προσθήκη G φάσεων- αύξηση διάρκειας κύκλου.
- Οι επόμενες διαιρέσεις δεν είναι σύγχρονες, κάθε κύτταρο διαφορετικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου.



Μετάβαση μεσοβλαστιδίου – Ενεργοποίηση ζυγωτικών γονιδίων – το έμβρυο παίρνει την τύχη... στα χέρια του ή έτσι νομίζει!



Dev Growth Differ. 2022
December ; 64(9): 508–516.
doi:10.1111/dgd.12813

Μετάβαση μεσοβλαστιδίου – Ενεργοποίηση ζυγωτικών γονιδίων – το έμβρυο παίρνει την τύχη... στα χέρια του ή έτσι νομίζει!

- Τροποποιήσεις στις ιστόνες της χρωματίνης.
- Μεταγραφικοί παράγοντες που εντοπίζονται ως μητρικά προϊόντα (πχ VegT) μεταφράζονται, προσδένονται στους διαθέσιμους πλέον υποκινητές και ενεργοποιούν τη μεταγραφή.
- Ιεραρχική οργάνωση των επιγενετικών τροποποιήσεων.
- Αρχικά σε υποκινητές – κοντινά στοιχεία - γονίδια υπό μητρικό έλεγχο.
- Αργότερα σε ενισχυτές – απομακρυσμένα στοιχεία – υπό ζυγωτικό έλεγχο.
- Περίοδος μετάβασης – ο μητρικός έλεγχος δεν σταματά απότομα αλλά μειώνεται (μέχρι το στάδιο της καταβολής ουράς).



**CLEAVAGE IN
THE AMPHIBIAN**

Γαστριδίωση στον *Xenopus*

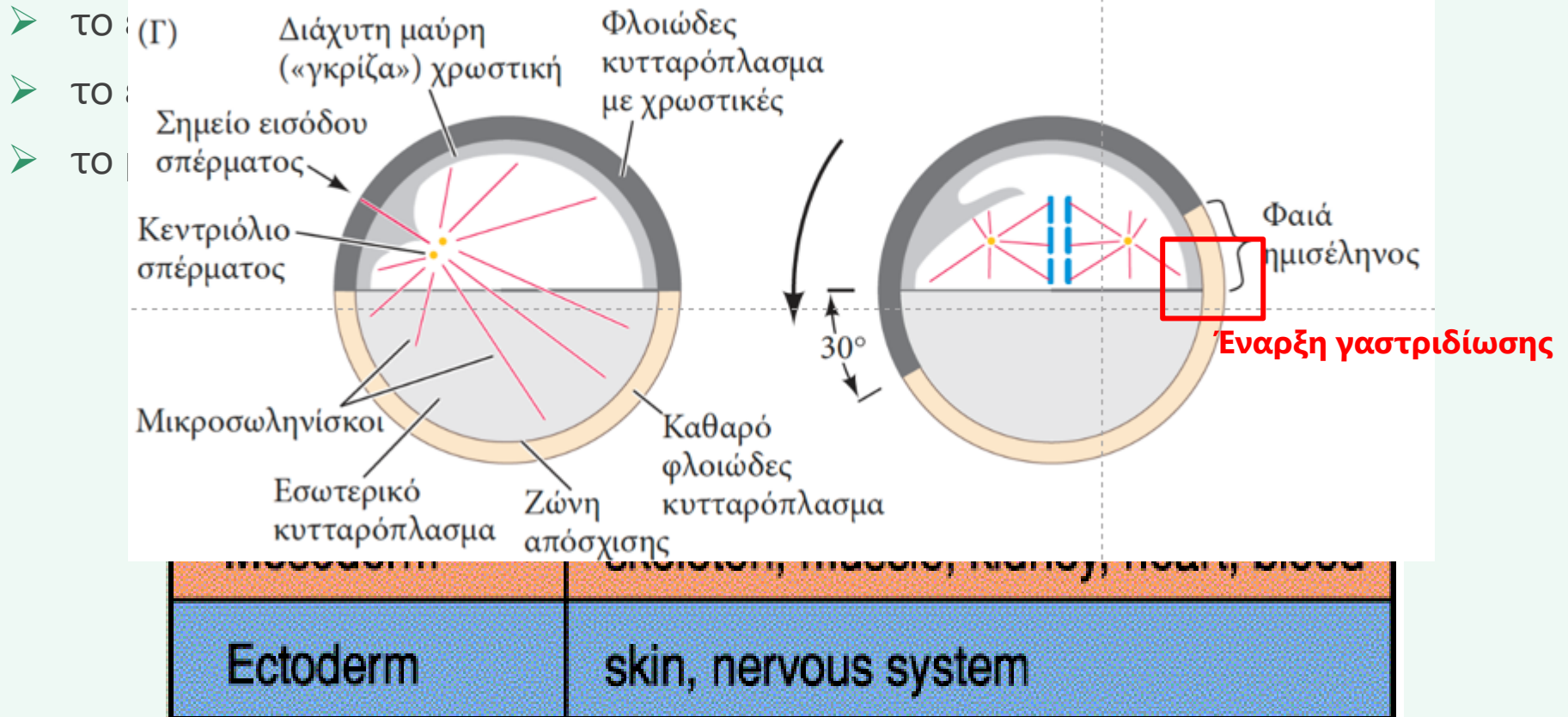
Γαστριδίωση (gastrulation): Η φάση κατά την οποία μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων μετακινούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματιστούν οι τρεις βλαστικές στιβάδες (germ layers):

- το **εξώδερμα** (ectoderm) -η εξωτερική στιβάδα.
- το **ενδόδερμα** (endoderm)- η εσωτερική στιβάδα
- το **μεσόδερμα** (mesoderm)- παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο άλλων.

Germ layers	Organs
Endoderm	gut, liver, lungs
Mesoderm	skeleton, muscle, kidney, heart, blood
Ectoderm	skin, nervous system

Γαστριδίωση στον *Xenopus*

Γαστριδίωση (gastrulation): Η φάση κατά την οποία μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων μετακινούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματιστούν οι τρεις βλαστικές στιβάδες (germ layers):

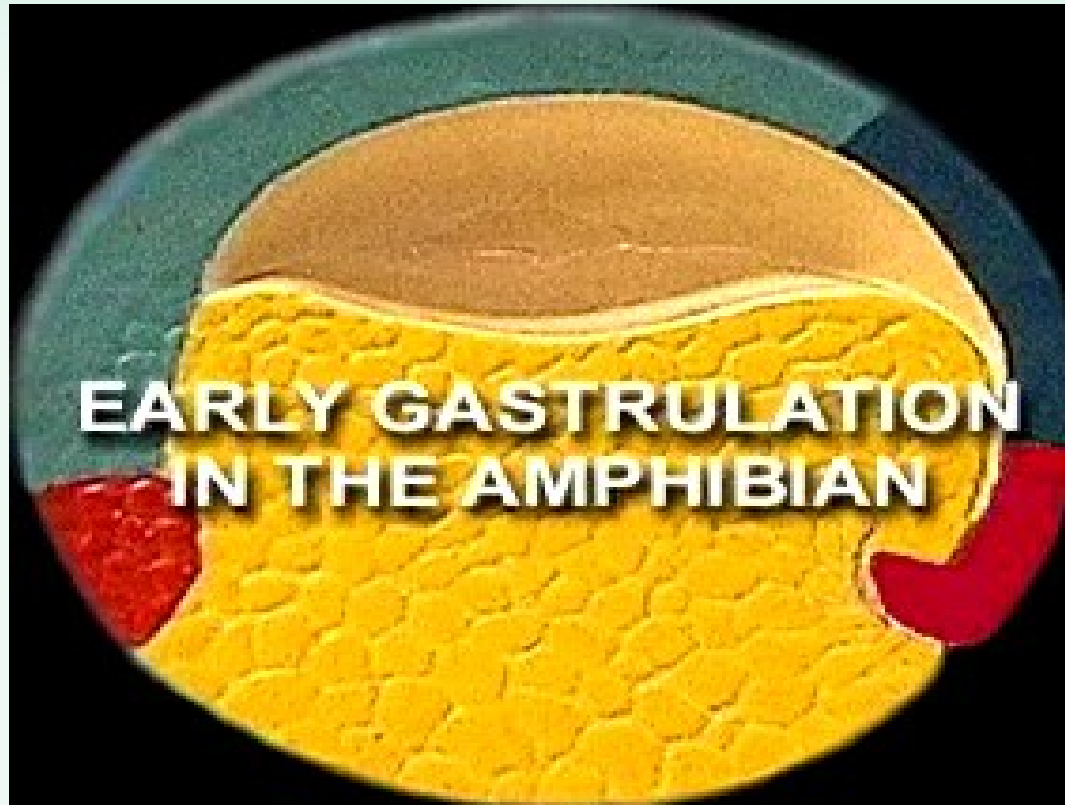


Γαστριδίωση στα αμφίβια

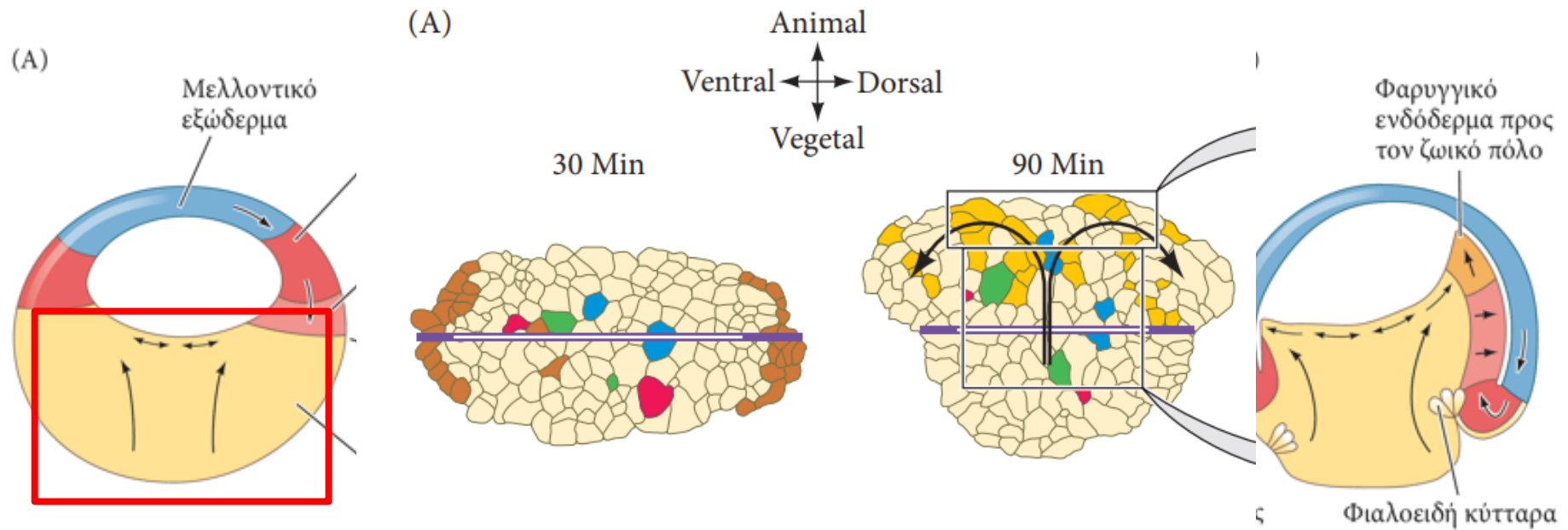


'It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life'. Lewis Wolpert

Γαστριδίωση στον Xenopus



Έναρξη της γαστριδίωσης - σχηματισμός βλαστοπόρου



(A) Λίγο πριν (2 ώρες) έχουν ξεκινήσει κινήσεις στο φυτικό ημισφαίριο (vegetal rotation) που ωθούν μια ομάδα κυττάρων (μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα) στο βλαστόκοιλο, σε επαφή με το εγκολπούμενο μεσόδερμα.

(B) Φιαλοειδή κύτταρα - δημιουργία ραχιαίου χείλους βλαστοπόρου - εγκόλπωση της οριακής ζώνης

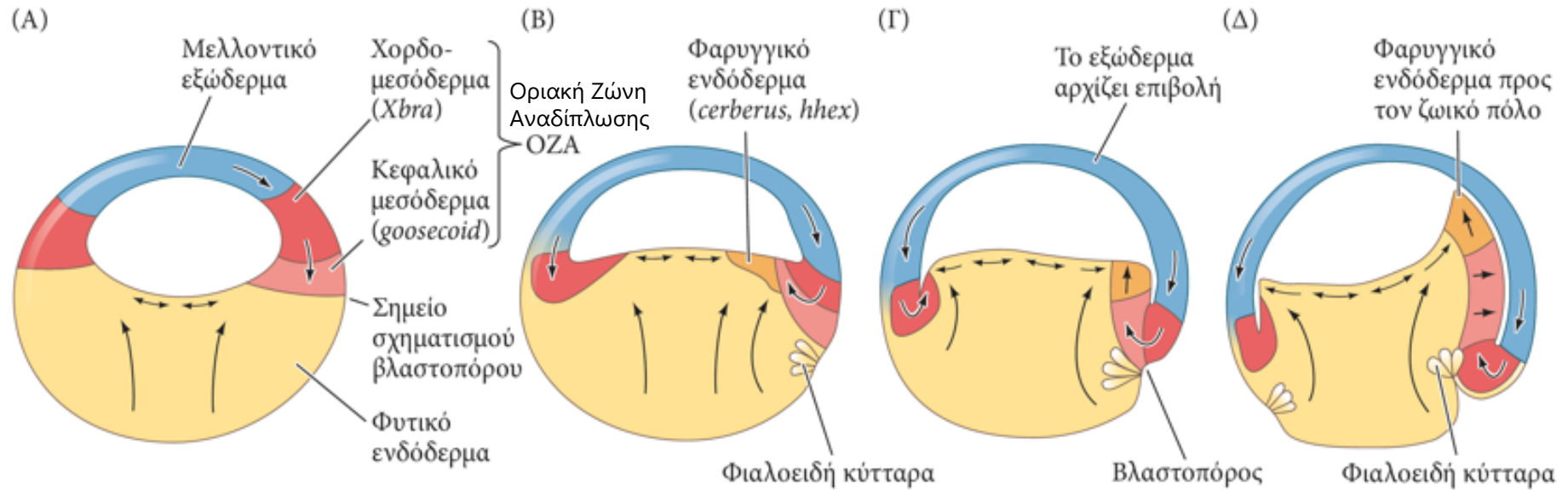
(Γ) Το μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα μετακινείται παρασύροντας στο εσωτερικό αρχικά το μεσόδερμα της κεφαλής και στη συνέχεια το χονδρομεσόδερμα (αναδίπλωση).

(Δ) Αντίστοιχα γεγονότα στη μελλοντικά κοιλιακή πλευρά.

(Ε) Επιμήκυνση ραχιαίου μεσοδέρματος (μέση γραμμή) μέσω συγκλισης επέκτασης.

(ΣΤ) Επιβολή του εξωδέρματος.

Έναρξη της γαστριδίωσης - σχηματισμός βλαστοπόρου



(Α) Λίγο πριν (2 ώρες) έχουν ξεκινήσει κινήσεις στο φυτικό ημισφαίριο (vegetal rotation) που ωθούν μια ομάδα κυττάρων (μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα) στο βλαστόκοιλο, σε επαφή με το εγκολπούμενο μεσόδερμα.

(Β) Φιαλοειδή κύτταρα - εγκόλπωση της οριακής ζώνης - δημιουργία ραχιαίου χείλους βλαστοπόρου

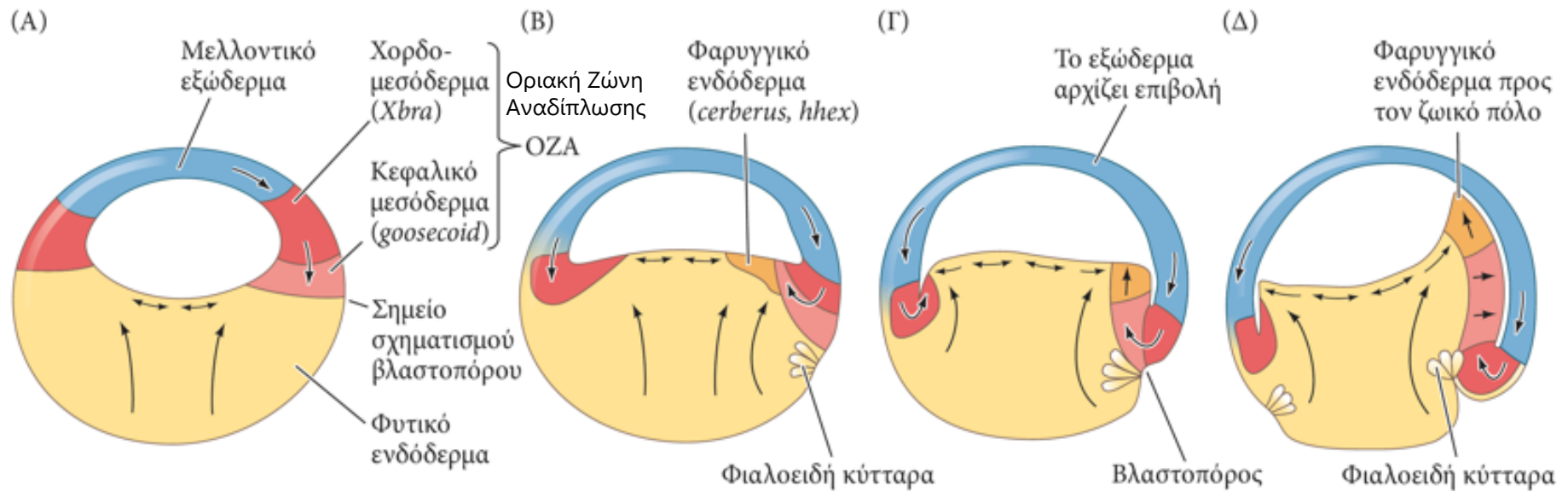
(Γ) Το μελλοντικό φαρυγγικό ενδόδερμα μετακινείται παρασύροντας στο εσωτερικό αρχικά το μεσόδερμα της κεφαλής και στη συνέχεια το χονδρομεσόδερμα (αναδίπλωση).

(Δ) Αντίστοιχα γεγονότα στη μελλοντικά κοιλιακή πλευρά.

(Ε) Επιμήκυνση ραχιαίου μεσοδέρματος (μέση γραμμή) μέσω συγκλίσης επέκτασης.

(ΣΤ) Επιβολή του εξωδέρματος.

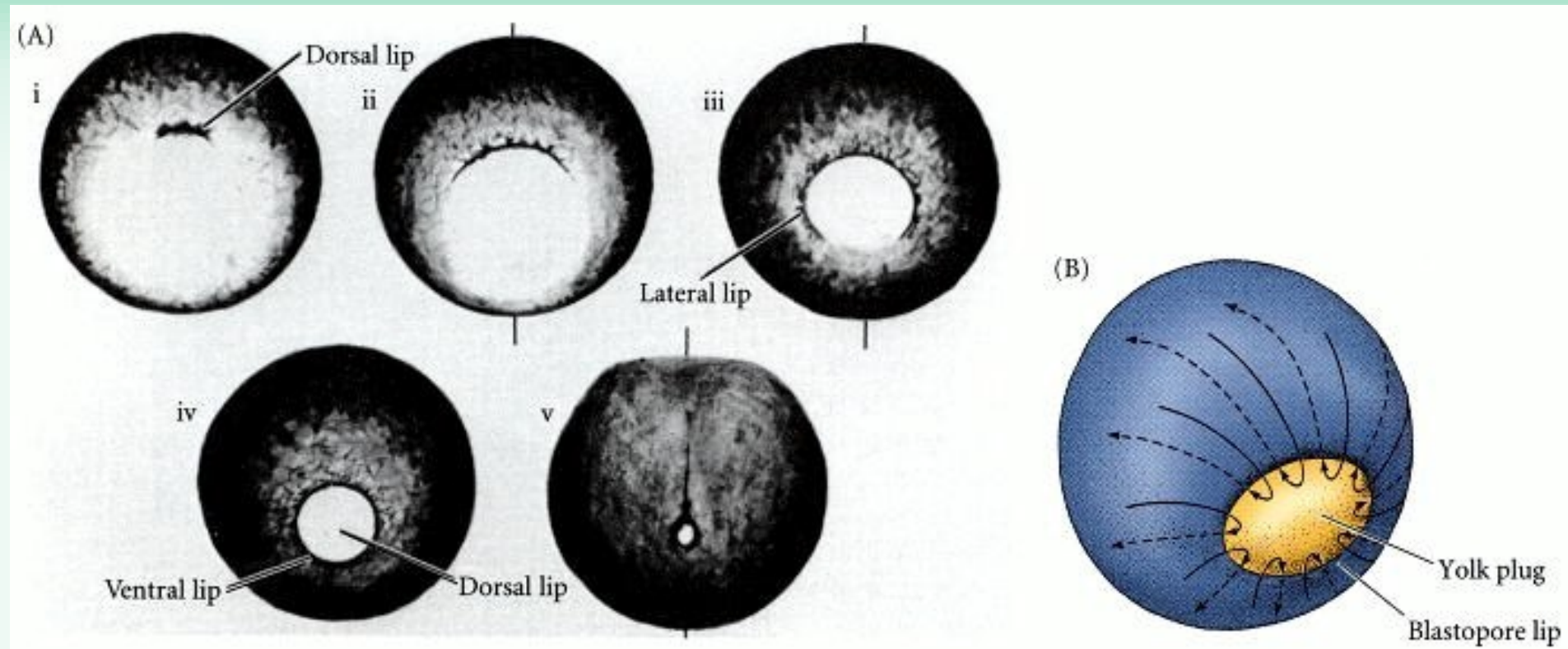
Γαστριδίωση



Η σειρά των κυττάρων που μπαίνουν στο εσωτερικό αντικατοπτρίζει και την οργάνωση του μεσοδέρματος κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα - Τα κύτταρα που συγκροτούν τον βλαστοπόρο αλλάζουν συνεχώς.

- Φαρυγγικό ενδόδερμα: μεταφέρεται εμπρόσθια – συμμετοχή στο σχηματισμό κεφαλής και καρδιάς.
- Μεσόδερμα κεφαλής (προχορδιαία πλάκα) – σχηματισμός κεφαλής - εκφράζει *goosecoid*.
- Χορδομεσόδερμα – σχηματισμός νωτοχορδής – εκφράζει *Xbra*

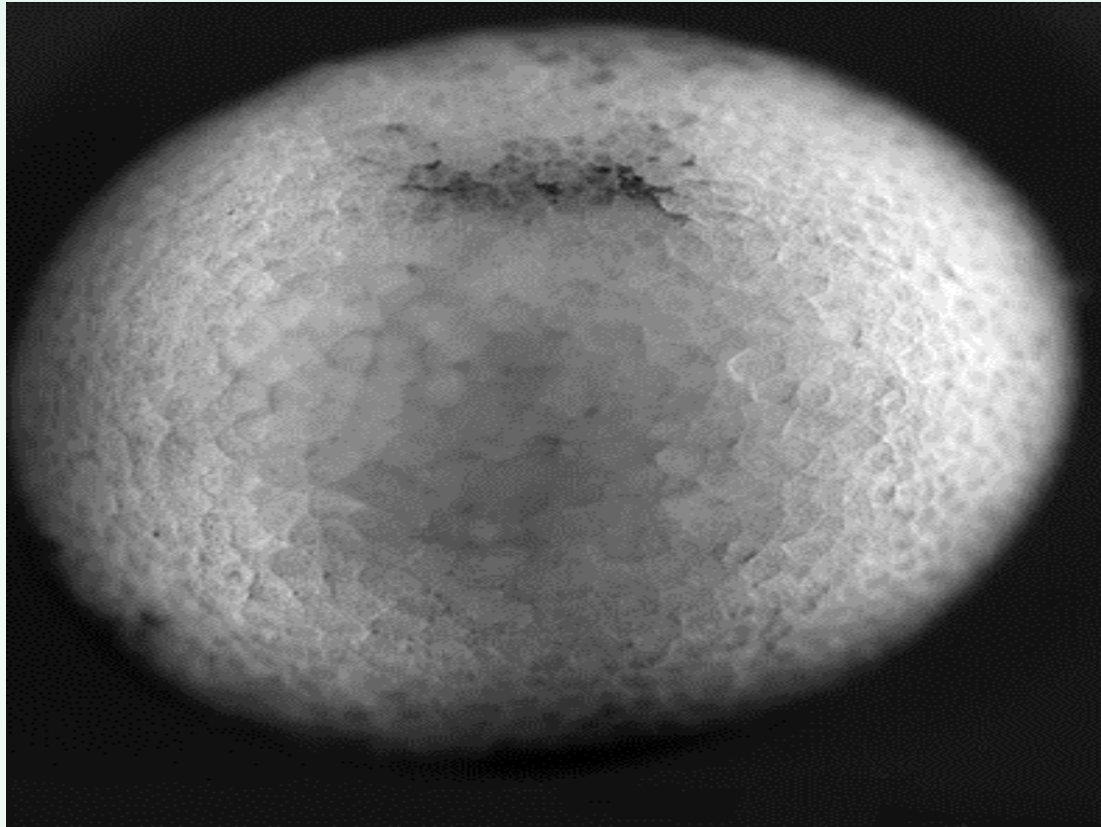
Γαστριδίωση



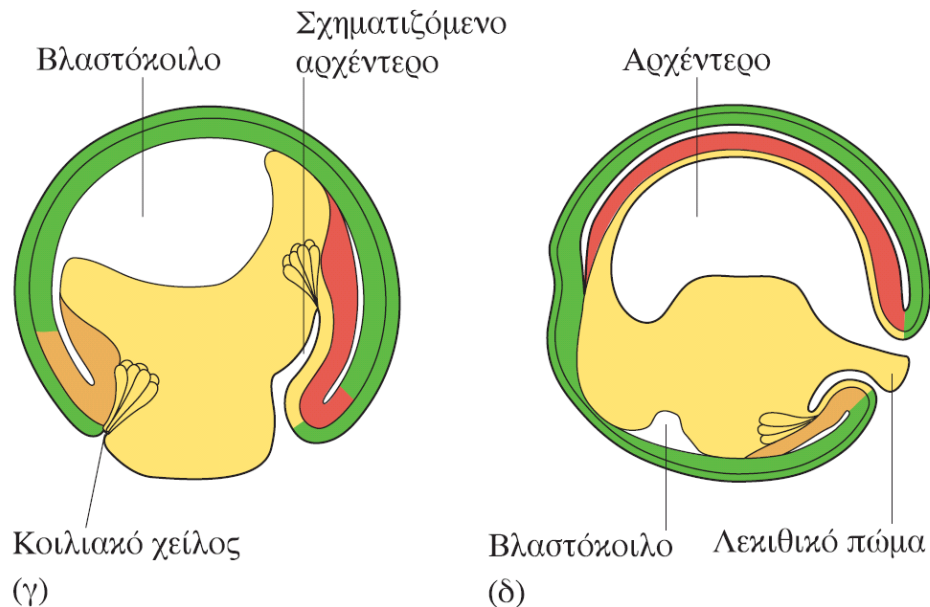
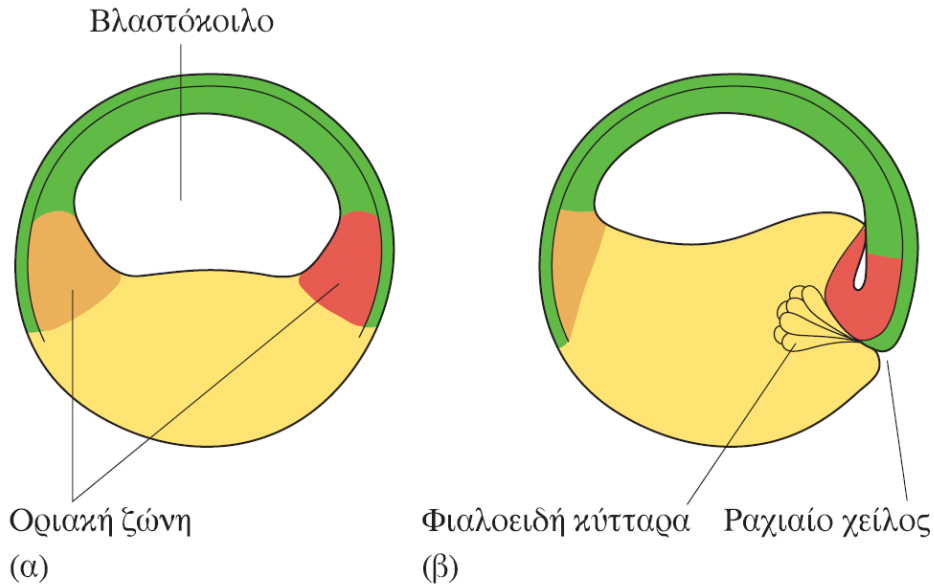
Τα κύτταρα που συγκροτούν τον βλαστοπόρο αλλάζουν συνεχώς.

- Επέκταση βλαστοπόρου, σχηματισμός τόξου και τελικά κύκλου.
- Τα τελευταία ενδοδερμικά κύτταρα που εισέρχονται = λεκιθικό πώμα (yolk plug) - πρωκτός

Γαστριδίωση



Γαστριδίωση



Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης το βλαστόκοιλο εκτοπίζεται και συρρικνώνεται μέχρι να εξαφανιστεί, ενώ παράλληλα εμφανίζεται και σταδιακά διευρύνεται η κοιλότητα του αρχεντέρου.

Αρχέντερο: Προκύπτει ο πεπτικός σωλήνας.

Γαστριδίωση

Επιβολή του εξωδέρματος: Μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων του εξωδέρματος από την αυλάκωση (στάδια 8-9) στη γαστριδίωση (10-11.5).

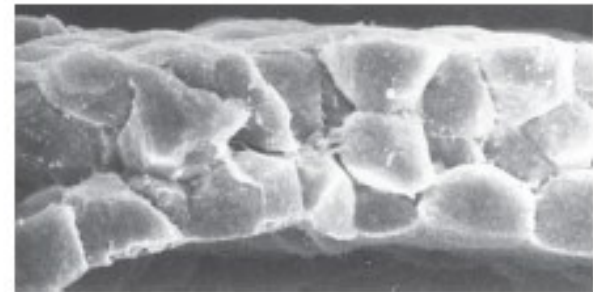
Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ενσωμάτωση



8



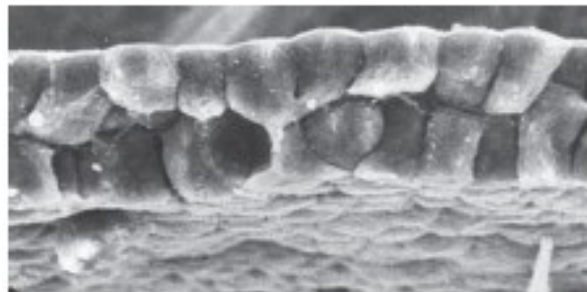
9



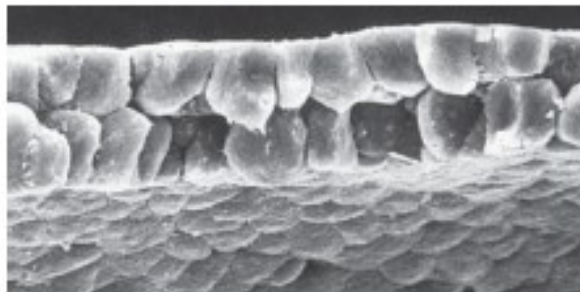
10

Stage

10.5



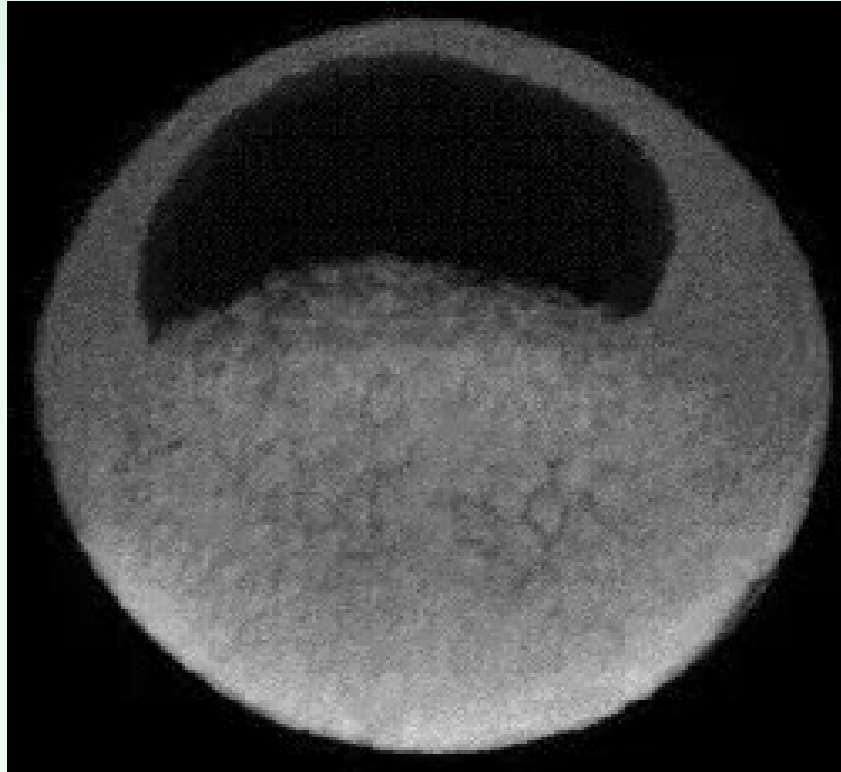
11



11.5

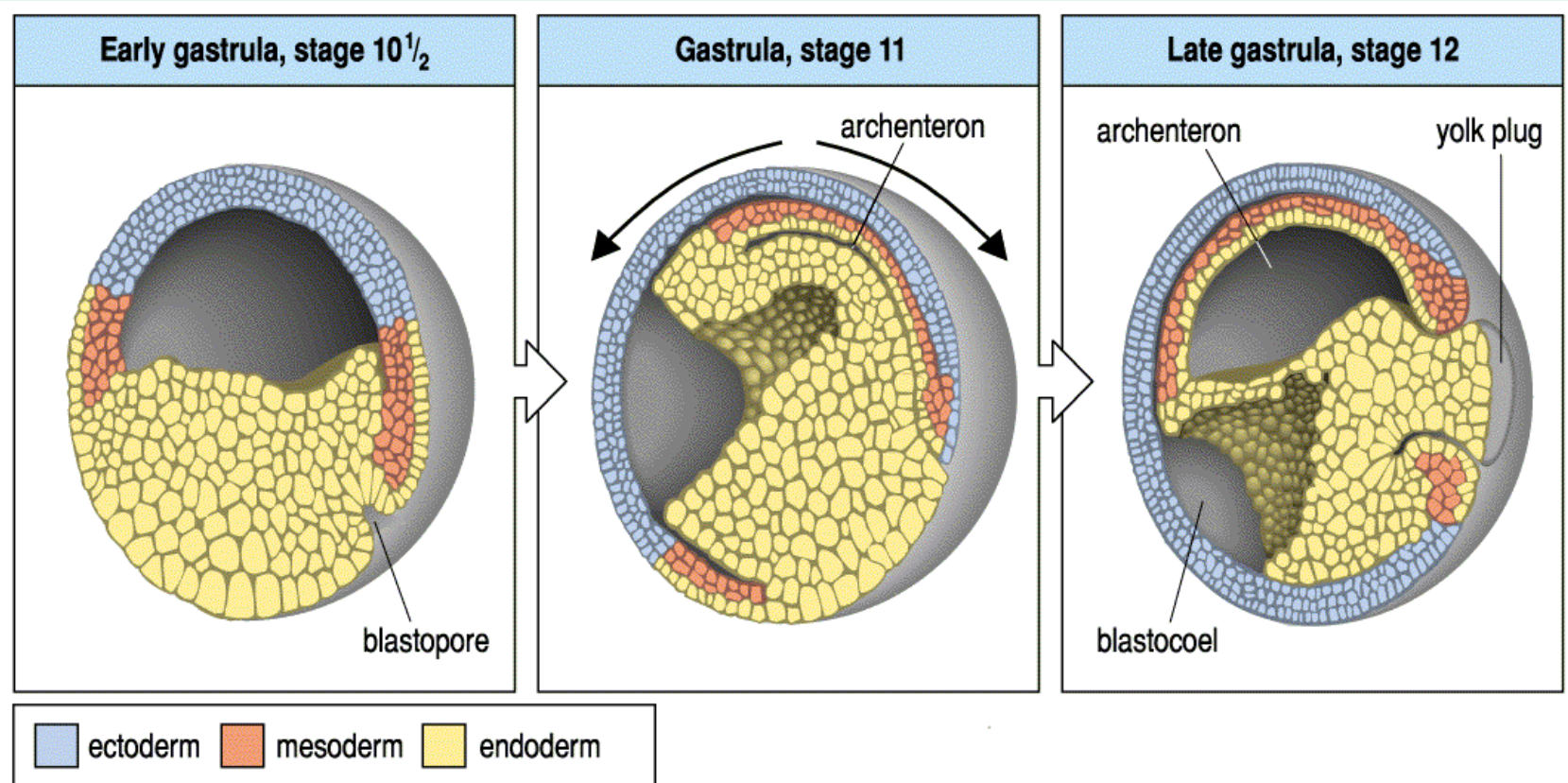


Γαστριδίωση στον Xenopus



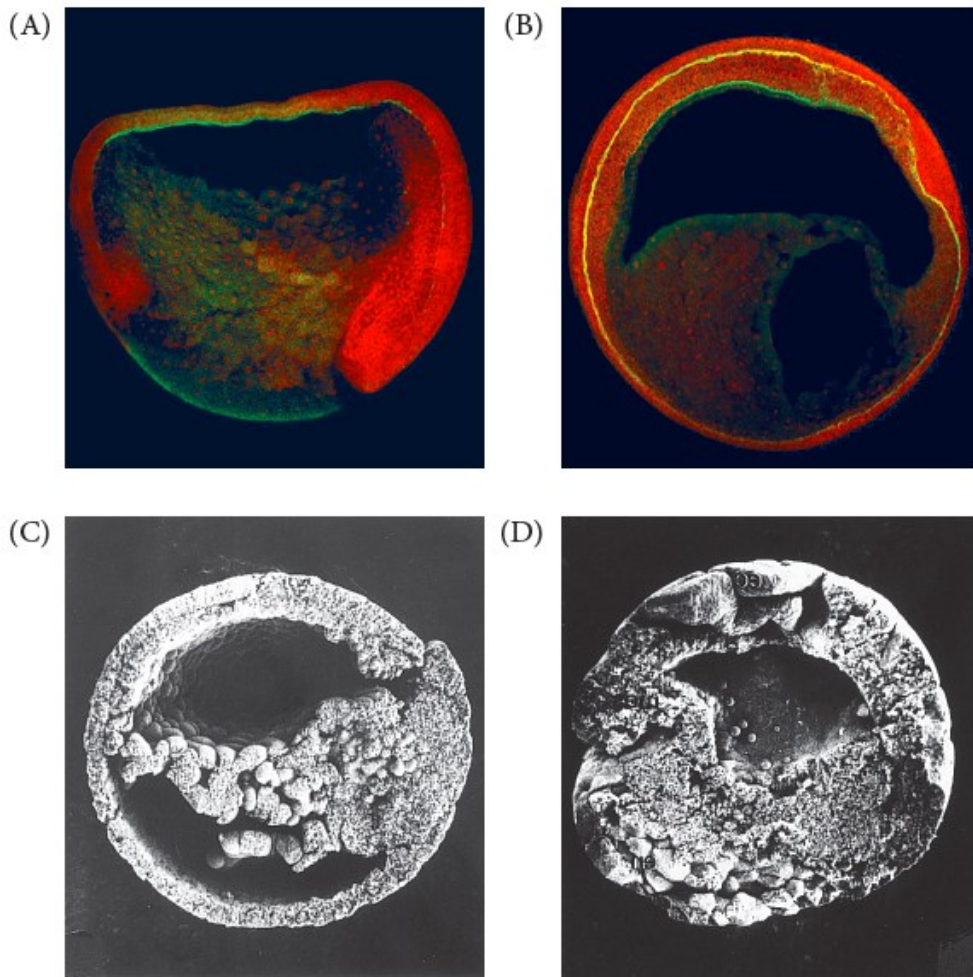
<https://www.xenbase.org/xenbase/static/anatomy/movies.jsp>

Γαστριδίωση



Ποιοι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί διεκπεραιώνουν τις μορφογενετικές κινήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη γαστριδίωση;

Γαστριδίωση



Ο ρόλος της **φιμπρονεκτίνης**

A,B: η έκφραση της φιμπρονεκτίνης (πλέγμα) σε μια μικρή στιβάδα (κίτρινο) στην αρχή και στο μέσον της γαστριδίωσης. Εμβρυϊκά κύτταρα με κόκκινο.

C: ένεση με απλό διάλυμα

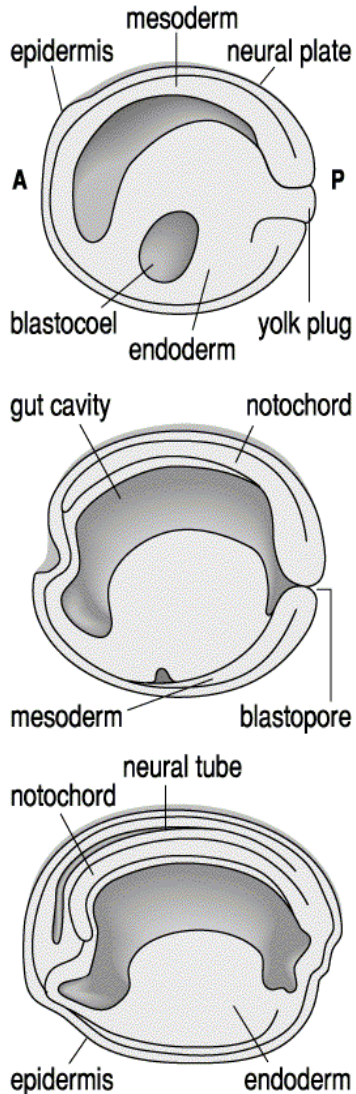
D: ένεση με πεπτίδιο ανταγωνιστή της φιμπρονεκτίνης (προσδένεται αντί για αυτή στα κύτταρα)

Τι παρατηρείτε?

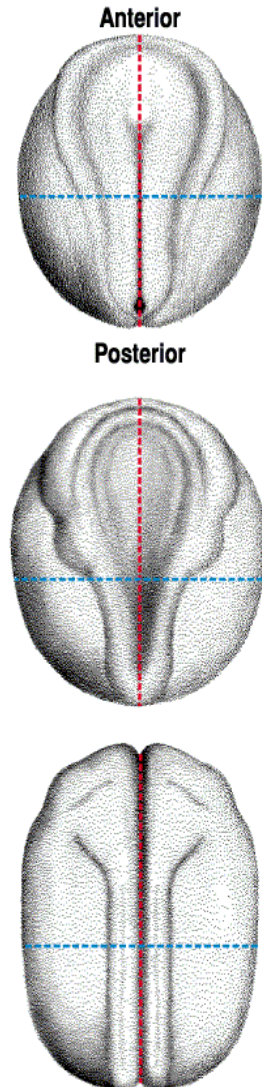
Η φιμπρονεκτίνη: - απαραίτητη για την μετανάστευση των κυτταρων του ζωικού πόλου προς τον φυτικό πόλο (επιβολή)
- θεωρείται ότι εκκρίνεται απο τα κύτταρα του εξωδέρματοος και με αυτην τα μεσοδερμικά κύτταρα βρίσκουν το δρόμο τους προς το εσωτερικό και τον ζωικό πολο.

Νευριδίωση

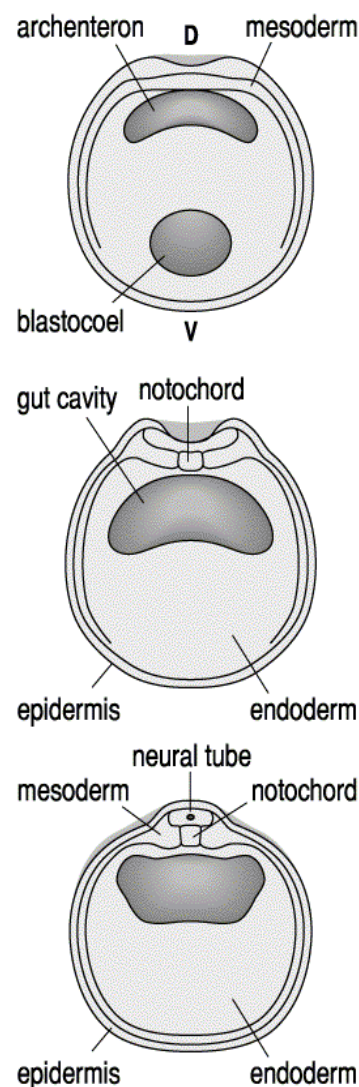
Sagittal section



Dorsal view of embryo



Transverse section



Η γαστριδίωση ολοκληρώνεται με το σχηματισμό της νωτοχορδής και την έναρξη της σωματογένεσης.

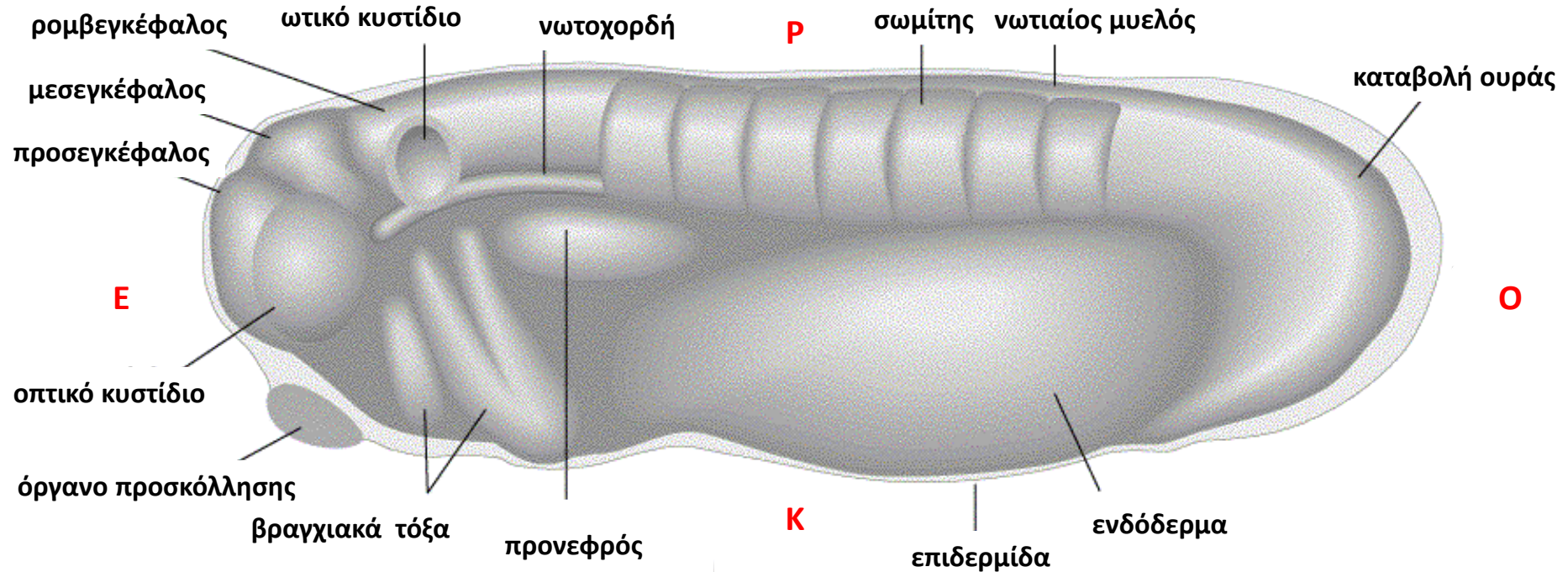
Η νευριδίωση ξεκινά με το σχηματισμό της **νευρικής πλάκας** και των νευρικών πτυχών.

Ακολουθεί ο σχηματισμός του **νευρικού σωλήνα** ο οποίος βυθίζεται κάτω από την επιδερμίδα και το έμβryo επιμηκύνεται.

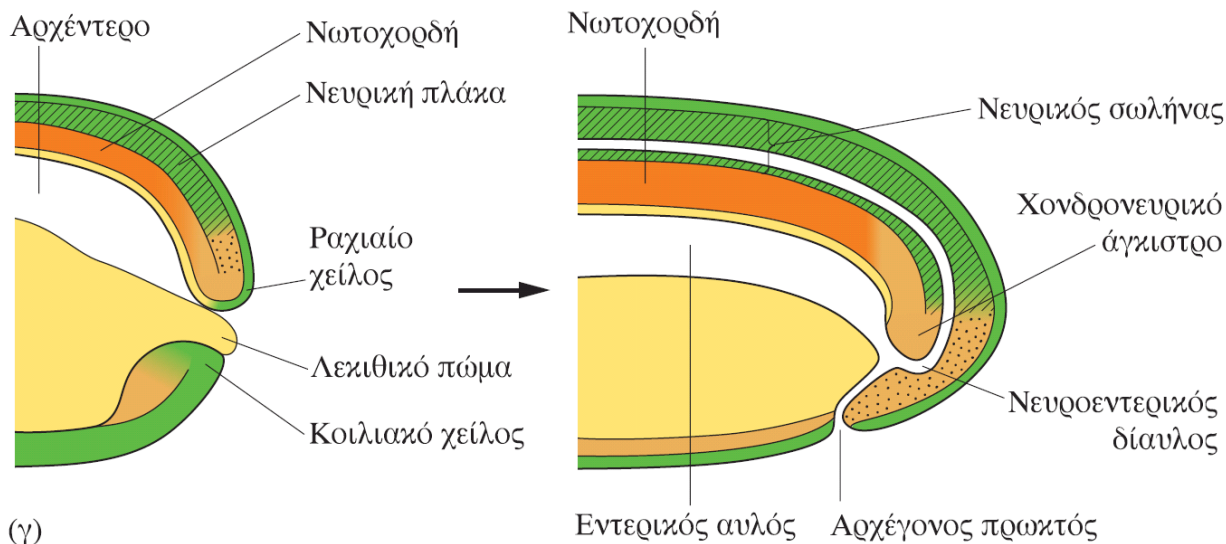
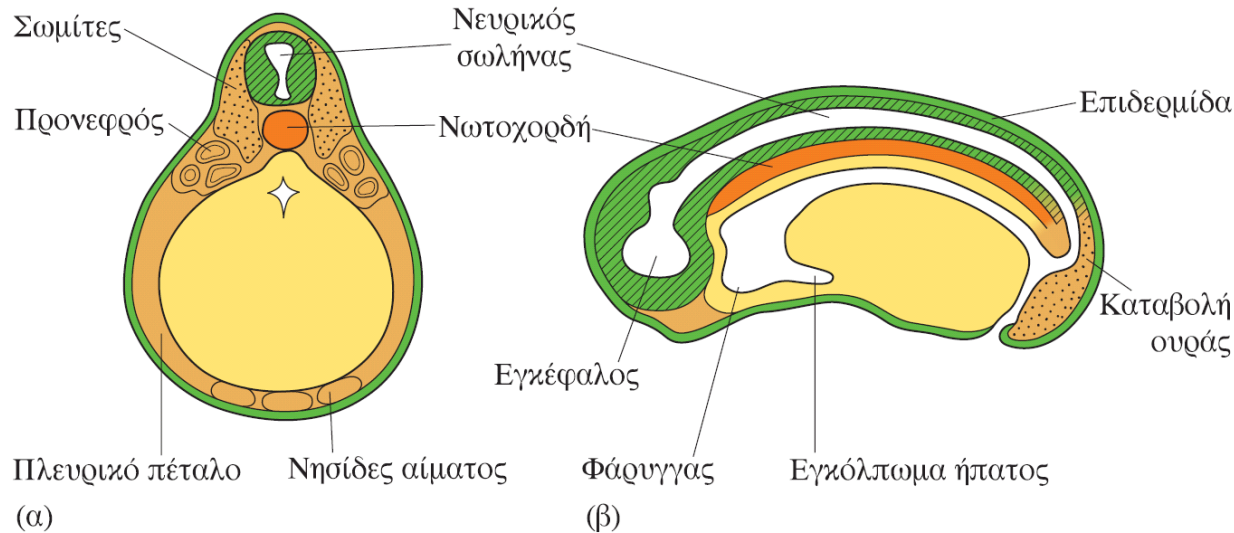
Στο τέλος του σταδίου αυτού καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των βασικών δομών του εμβρύου.

Δομές του εμβρύου του *Xenopus laevis* στο φυλοτυπικό στάδιο (καταβολής ουράς)

Έμβρυο *Xenopus* μετά από απομάκρυνση της επιδερμίδας (αριστερή πλευρά)

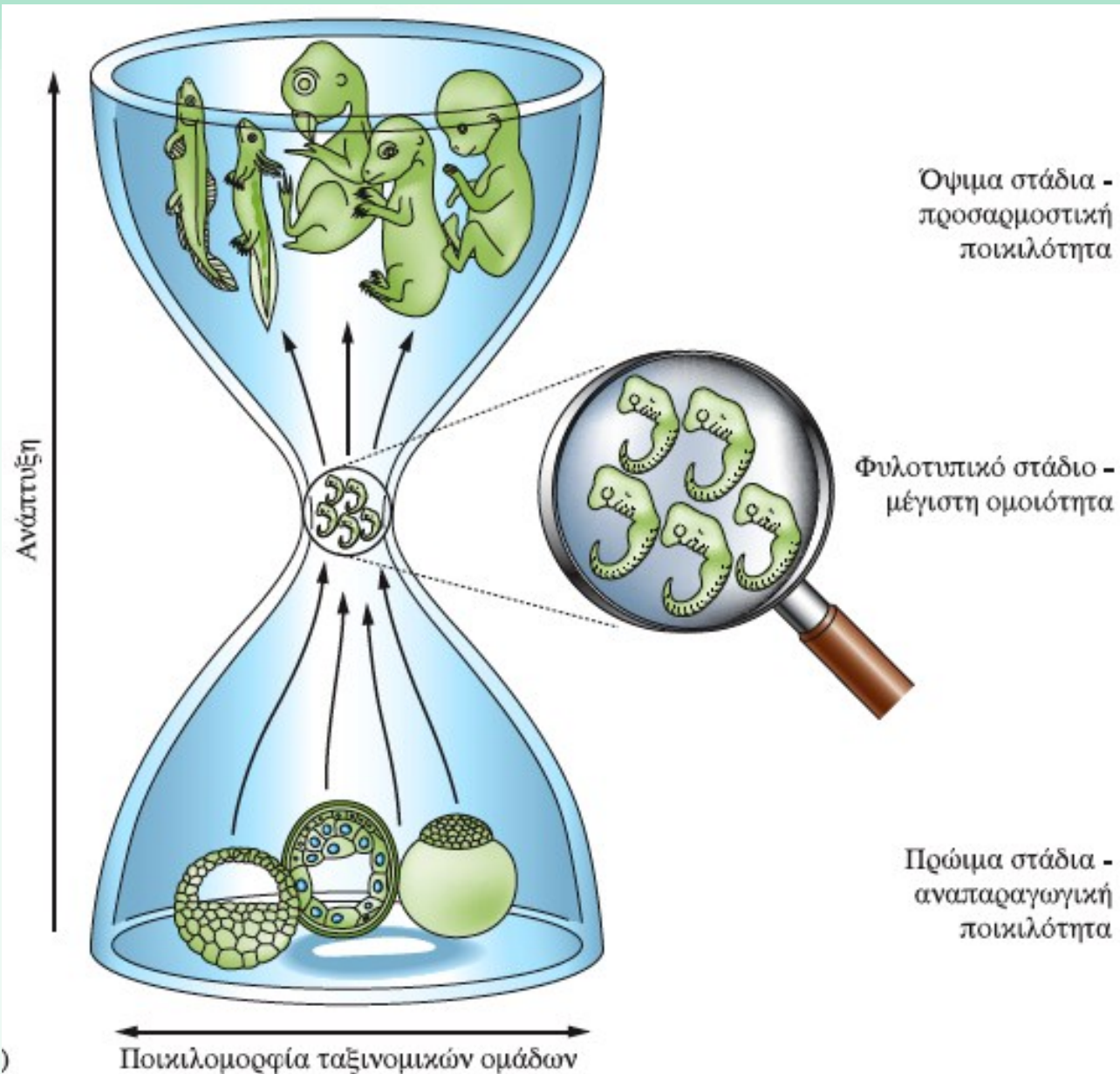


Δομές του εμβρύου του *Xenopus laevis* στο φυλοτυπικό στάδιο (καταβολής ουράς)



(α) Εγκάρσια τομή του κορμού,
(β) μέση τομή,
(γ) σχηματισμός της καταβολής ουράς με κλείσιμο της νευρικής πλάκας πάνω από τον εναπομείναντα βλαστοπόρο.

Το φυλοτυπικό στάδιο



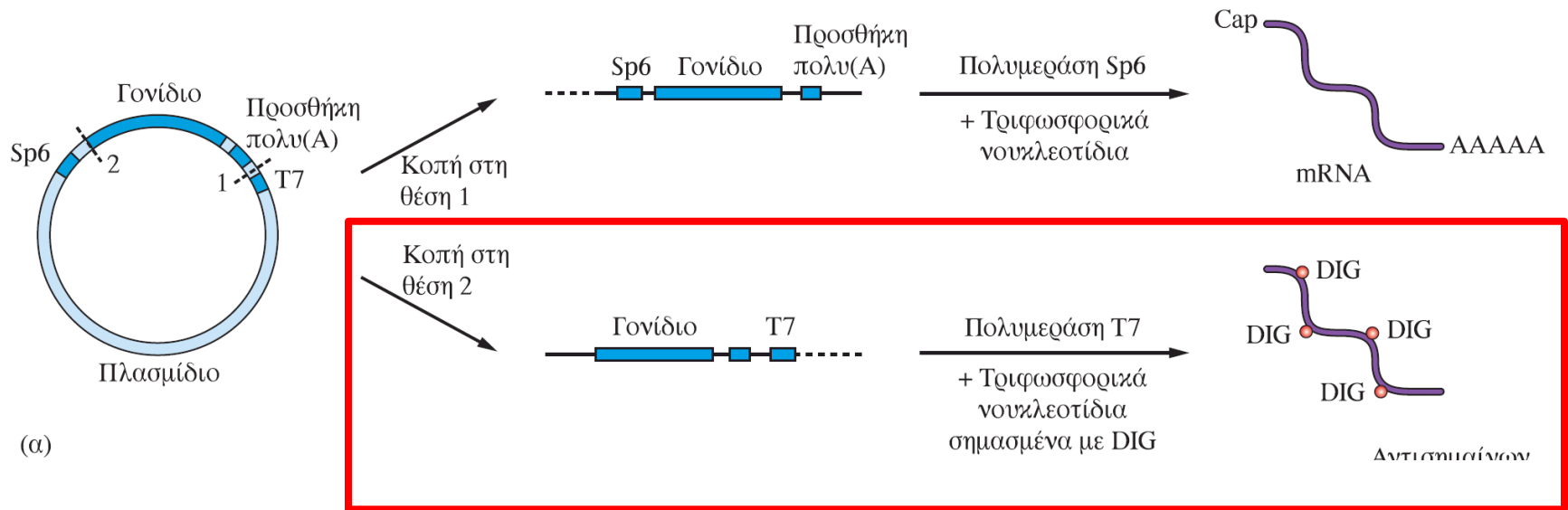
Πειραματικές μέθοδοι

Για την κατανόηση της λειτουργίας κάθε γονιδιακού προϊόντος που εμπλέκεται σε μια αναπτυξιακή διαδικασία.

Έκφραση
Ενεργότητα
Αναστολή

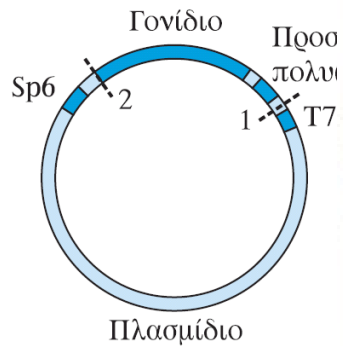
Find it, Move it, Loose it

Πειραματικές μέθοδοι

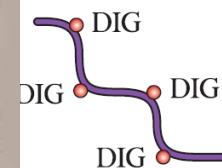
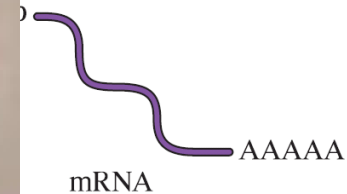
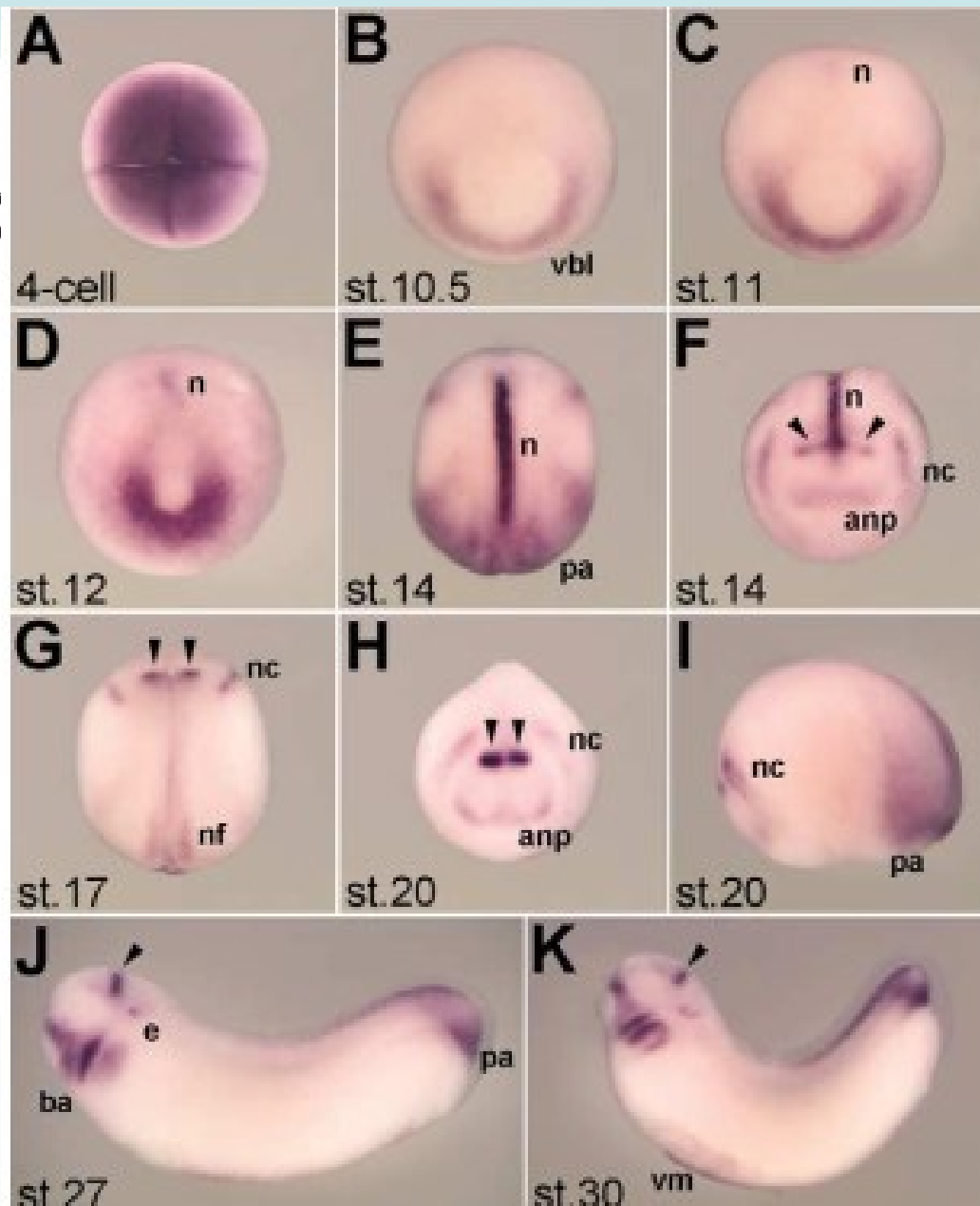


(α) Σύνθεση mRNA ή αντισημαίνοντος ιχνηθέτη υβριδοποίησης *in vitro*. Η πολυαδενυλιωμένη ουρά προστίθεται στο RNA *in vivo*.

Πειραματικές μέθοδοι

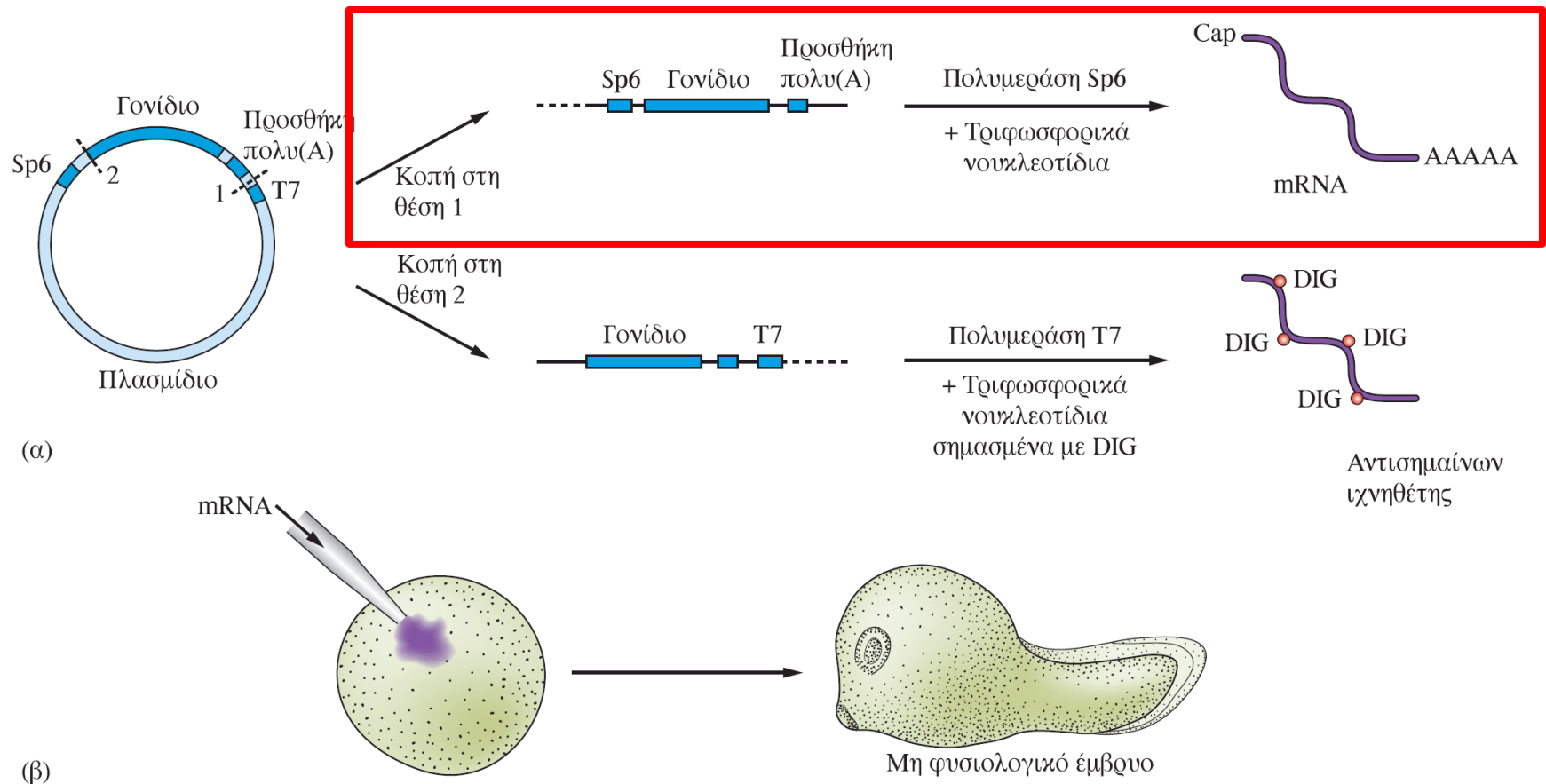


(α)



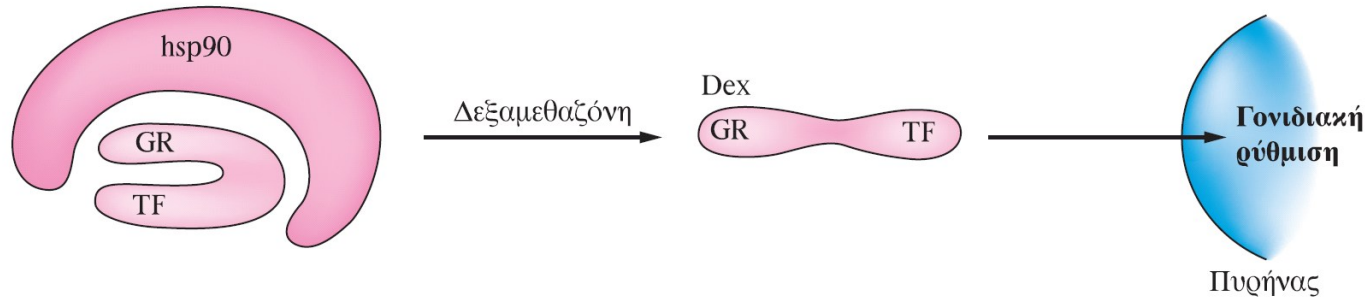
Αντισημαίνων
ιχνηθέτης

Πειραματικές μέθοδοι



(α) Σύνθεση mRNA ή αντισημαίνοντος ιχνηθέτη υβριδοποίησης *in vitro*. Η πολυαδενυλιωμένη ουρά προστίθεται στο RNA *in vivo*. (β) Ένεση συνθετικού mRNA σε ένα γονιμοποιημένο ωάριο (αλλά και ζυγωτό, βλαστομερίδιο).

Πειραματικές μέθοδοι



GR: Glucocorticoid Receptor domain (υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών)

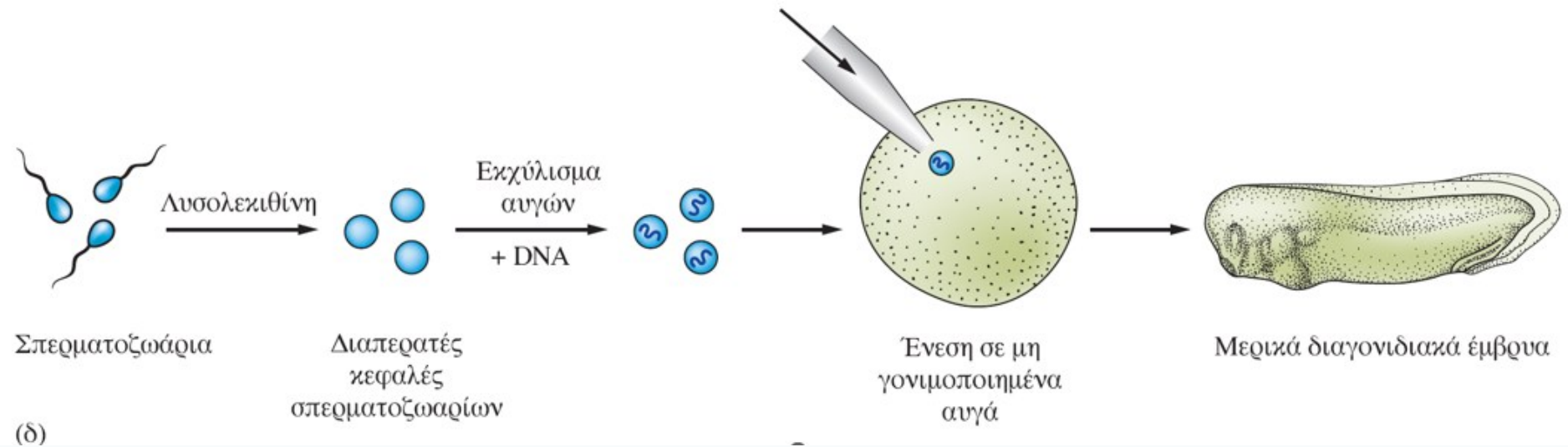
TF: ο υπο μελέτη ένας μεταγραφικός παράγοντας (**T**ranscription **F**actor)

hsp90: heat shock protein 90, πρωτεΐνη που κρατά το σύμπλοκο ανενεργό στο κυτταρόπλασμα με την προσδεση στον GR.

(γ) Ενεργοποίηση μιας υβριδικής πρωτεΐνης που φέρει τον υπό μελέτη μεταγραφικό παράγοντα (TF) σε σύντηξη με τμήμα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Η υβριδική πρωτεΐνη ενεργοποιείται με προσθήκη δεξαμεθαζόνης – **χρονικά ελεγχόμενη ενεργοποίηση** ενός γονιδίου στο έμβρυο.

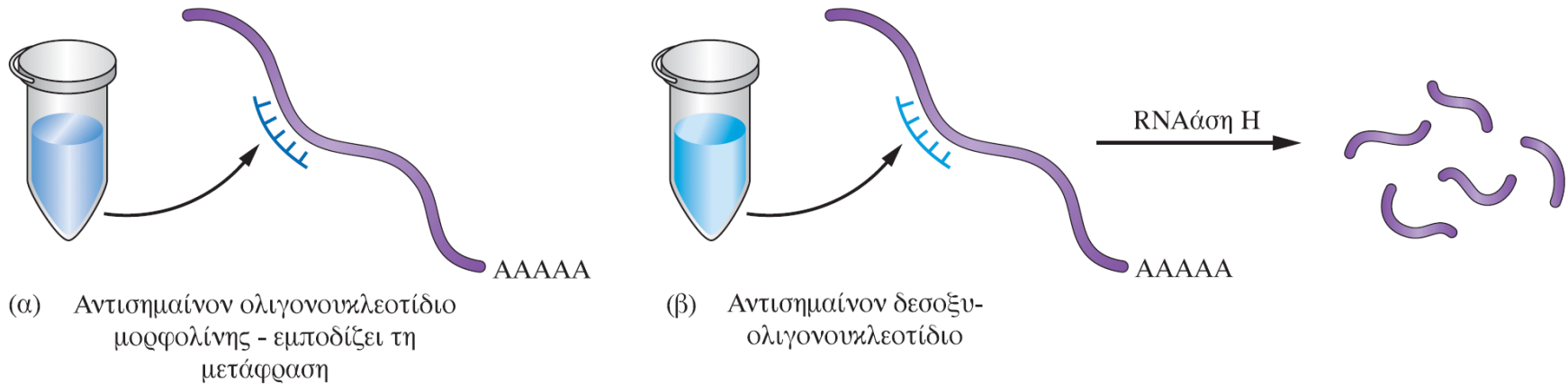
Πειραματικές μέθοδοι



Εισαγωγή γονιδίων για τη δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών- κυρίως για γρήγορη ανάλυση χωρίς την ανάγκη δημιουργίας διαγονιδιακών γενεών.

Πειραματικές μέθοδοι

Μέθοδοι ειδικής καταστολής της γονιδιακής ενεργότητας

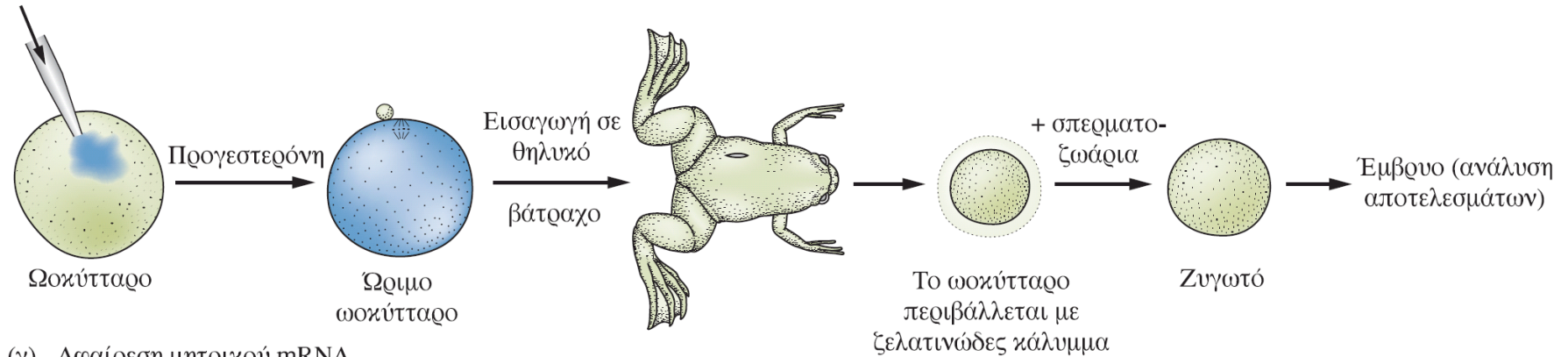


(α) Αντισημαίνοντα ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης – εμποδίζει τη μετάφραση χωρίς να καταστραφεί.

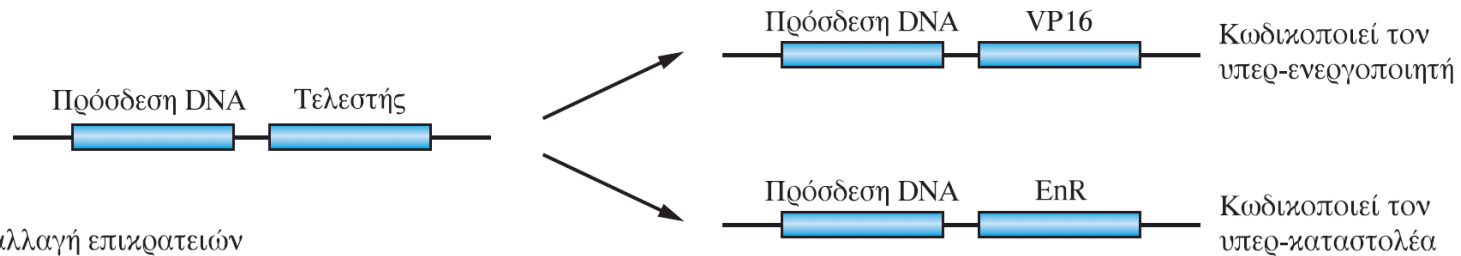
(β) Αντισημαίνοντα δεσοξυολιγονουκλεοτίδια – υπόστρωμα για Rnase H.

Πειραματικές μέθοδοι

Μέθοδοι ειδικής καταστολής της γονιδιακής ενεργότητας



(γ) Αφαίρεση μητρικού mRNA



(δ) Ανταλλαγή επικρατειών

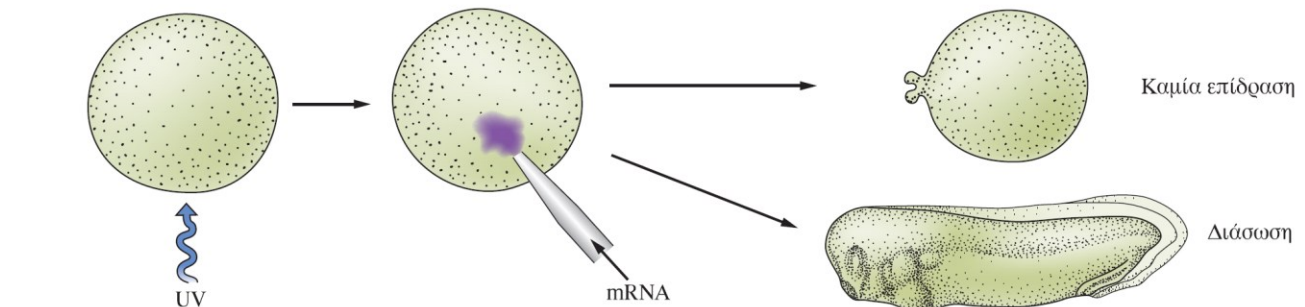
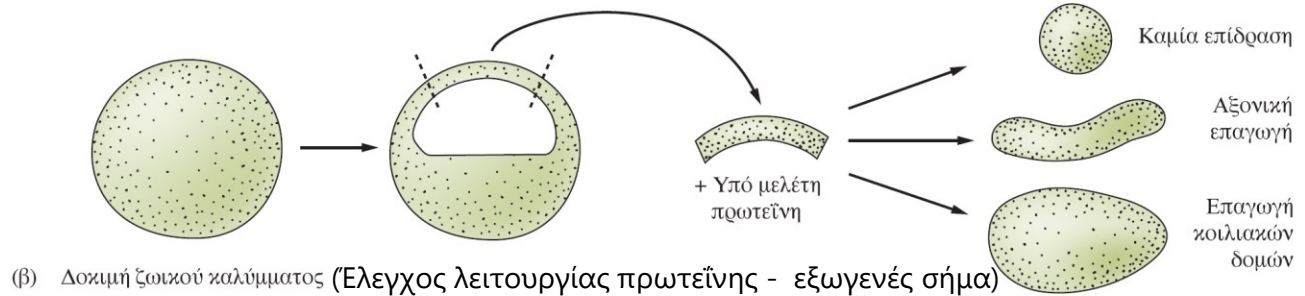
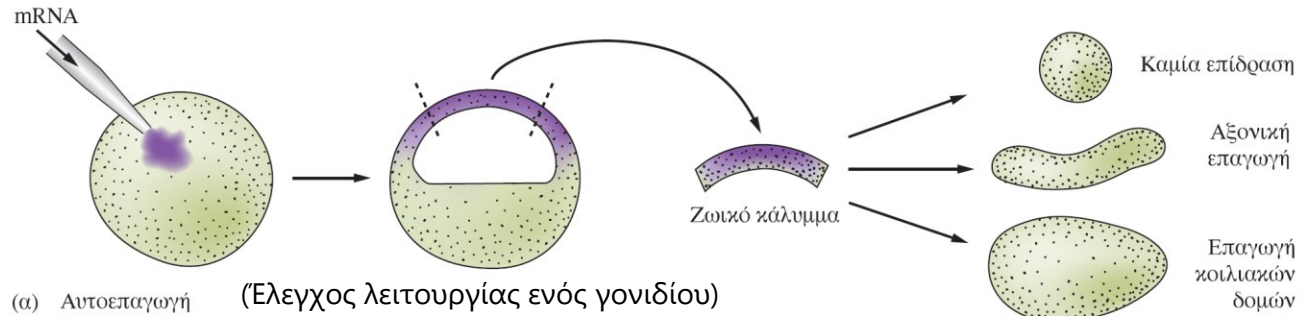
(γ) Αφαίρεση ενός συγκεκριμένου **μητρικού mRNA** από ωοκύτταρα και επακόλουθη γονιμοποίησή τους.

(δ) **Μεταγραφικοί παράγοντες** στους οποίους έχει γίνει ανταλλαγή επικρατειών.

Πειραματικές μέθοδοι

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται ζωικά καλύμματα και έμβρυα που έχουν ακτινοβοληθεί με UV.

Το ζωικό κάλυμα αν καλλιεργηθεί μόνο του δίνει επιδερμίδα.



(γ) Διάσωση εμβρύων που έχουν ακτινοβοληθεί με UV

Αυτόνομη εξειδίκευση και επαγωγικές αλληλεπιδράσεις κατά την ανάπτυξη του *X. laevis*

Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold



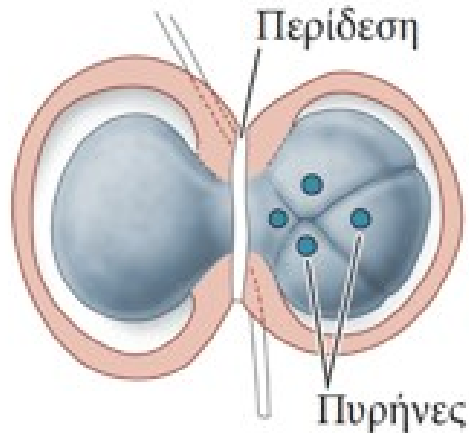
Hans Spemann (1868 – 1941)



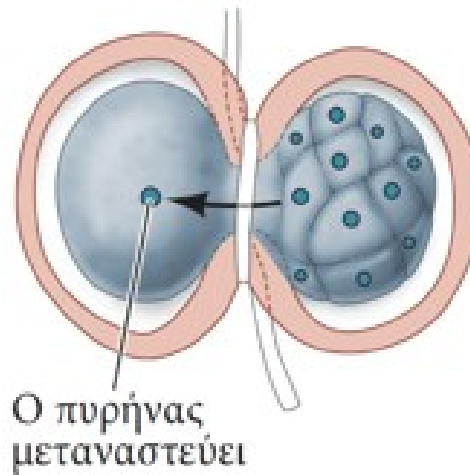
Hilde Mangold (1898 - 1924)

Spemann 1903

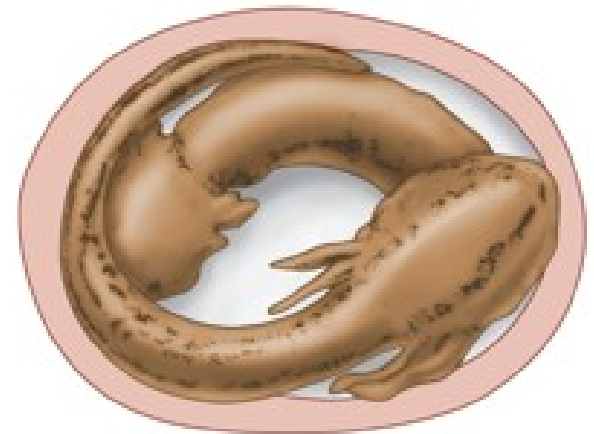
(Α) Στάδιο 8 κυττάρων



(Β) Στάδιο 16 κυττάρων



(Γ) Στάδιο 14 ημερών

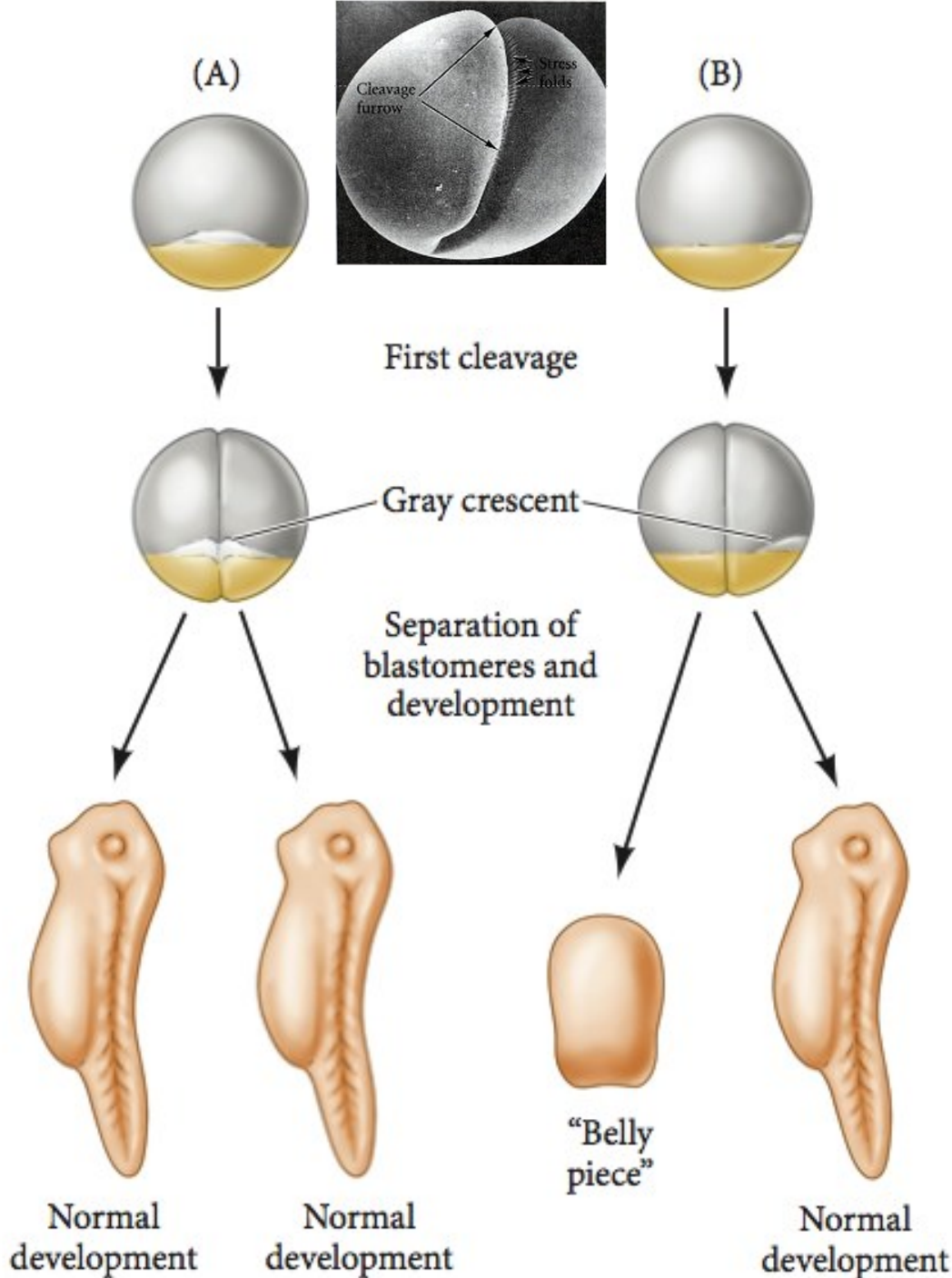


- Περίσφιξη μιας τρίχας στο επίπεδο της πρώτης διαίρεσης (μεσημβρινά) περιορίζει τον πυρήνα στο ένα βλαστομερίδιο (*Triturus taeniatus*).
- Περίπου στο στάδιο των 16 κυττάρων ένα κύτταρο μπορεί αν περάσει από τον περιορισμό → αρχίζει αυλάκωση και σε αυτή την πλευρά → δύο έμβρυα.

Άρα: οι πρώιμοι πυρήνες ήταν γενετικά ταυτόσημοι και κάθε κύτταρο ήταν ικανό να δώσει γένεση σε έναν ολόκληρο οργανισμό.

Spemann 1903 - 1918

Αλλά....



Αν η περίσφιξη γίνει μεσημβρινά
ΑΛΛΑ κάθετα στο επίπεδο της
πρώτης διαίρεσης (διαχωρισμός
μελλοντικά ραχιαίου – κοιλιακού)

ένα φυσιολογικό έμβρυο και ένα
άμορφο (χωρίς ραχιαίες δομές).

Τί συμπέρασμα βγάζετε?

Φαιά ημισέληνος.... απαραίτητη για
την ανάπτυξη του εμβρύου.

Spemann 1903 -1918

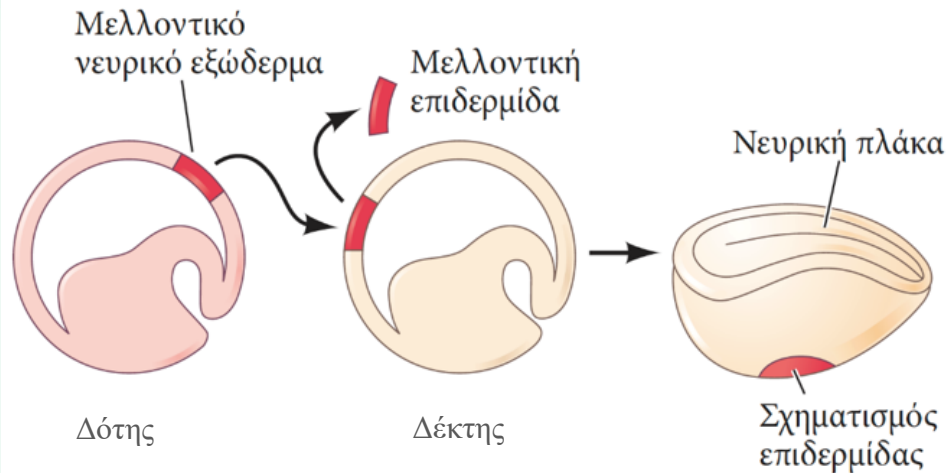
Παράλληλα τα δεδομένα χαρτών πεπρωμένου έδειχναν ότι από την περιοχή της φαιάς ημισελήνου ξεκινά η γαστριδίωση!

Περιοχή δότη	Περιοχή δέκτη	Διαφοροποίηση του ιστού του δότη
ΠΡΩΙΜΟ ΓΑΣΤΡΙΔΙΟ		
Μελλοντικοί νευρώνες	Μελλοντική επιδερμίδα	Επιδερμίδα
Μελλοντική επιδερμίδα	Μελλοντικοί νευρώνες	Νευρώνες
ΟΨΙΜΟ ΓΑΣΤΡΙΔΙΟ		
Μελλοντικοί νευρώνες	Μελλοντική επιδερμίδα	Νευρώνες
Μελλοντική επιδερμίδα	Μελλοντικοί νευρώνες	Επιδερμίδα

Πειράματα μεταμόσχευσης – τι συμπέρασμα βγάξετε?

Spemann 1903 -1918

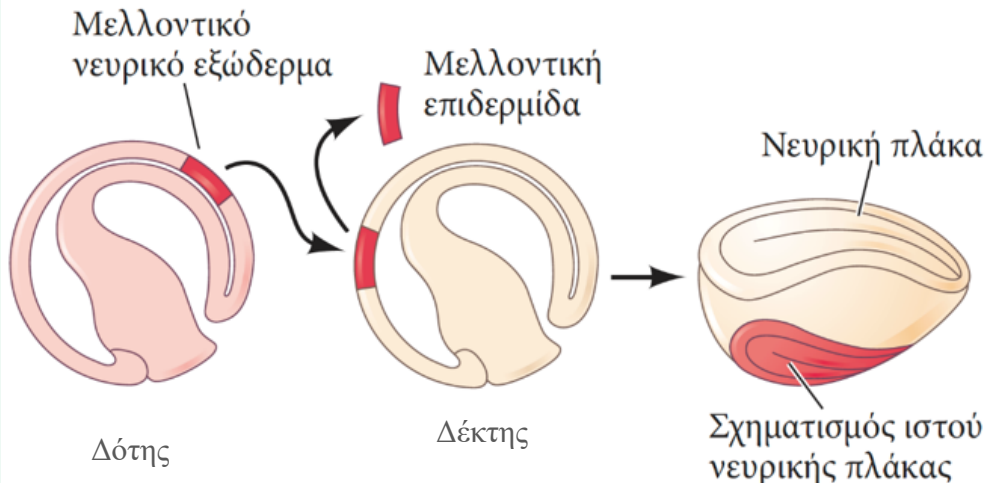
(A) Μεταμόσχευση σε πρώιμο γαστρίδιο



A) Τα κύτταρα του δότη είναι δεκτικά στα σήματα των κυτταρών του δέκτη στην περιοχή της μεταμόσχευσης – μεταβολή του πεπρωμένου τους αναλογα με τη θέση τους.

κατά συνθήκη εξειδίκευση

(B) Μεταμόσχευση σε όψιμο γαστρίδιο

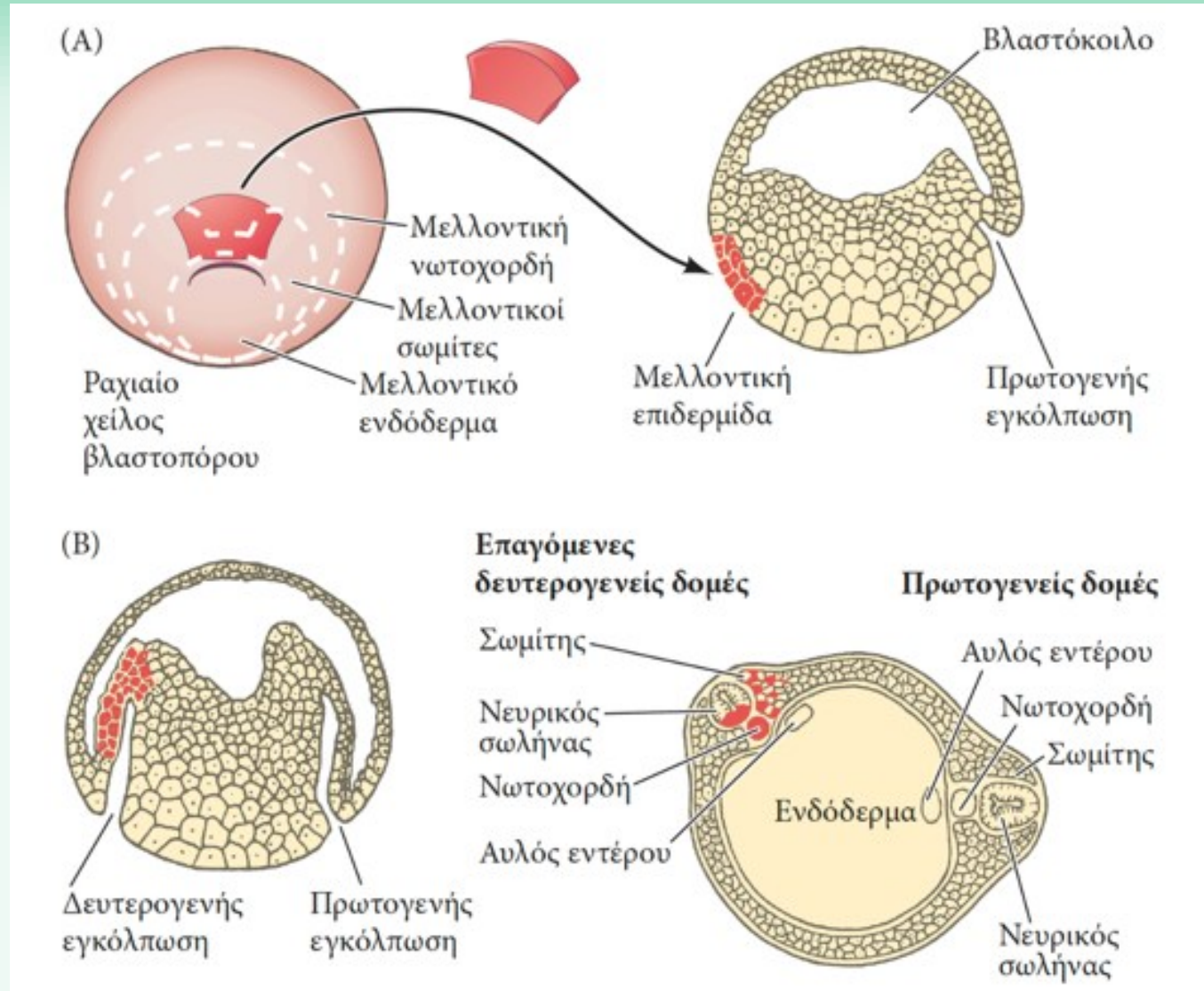


B) Προκαθορισμένα κύτταρα. Δεν είναι δεκτικά στα σήματα που λαμβάνουν από το περιβάλλον.

αυτόνομη εξειδίκευση

Τι κάνει τα κύτταρα να εξειδικευτούν;;

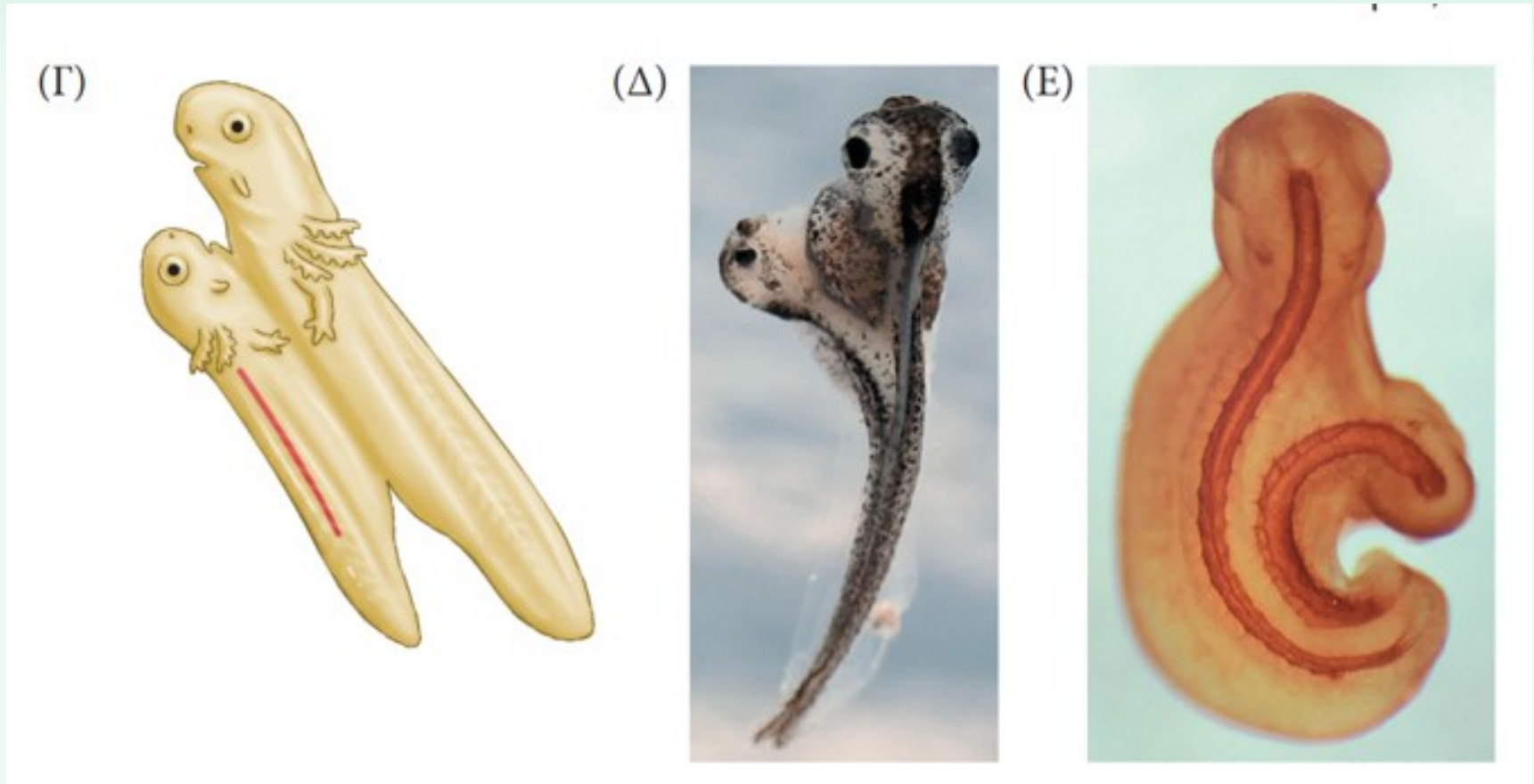
Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold



Triturus taeniatus και *T. cristatus*

Στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου ο μοναδικός ιστός που είναι προκαθορισμένος είναι το **ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου**.

Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold



Στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου ο μοναδικός ιστός που είναι προκαθορισμένος είναι το **ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου**.

Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold



*Besten Gruppen.
H. S.*

Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren

Von

H. Spemann und Hilde Mangold

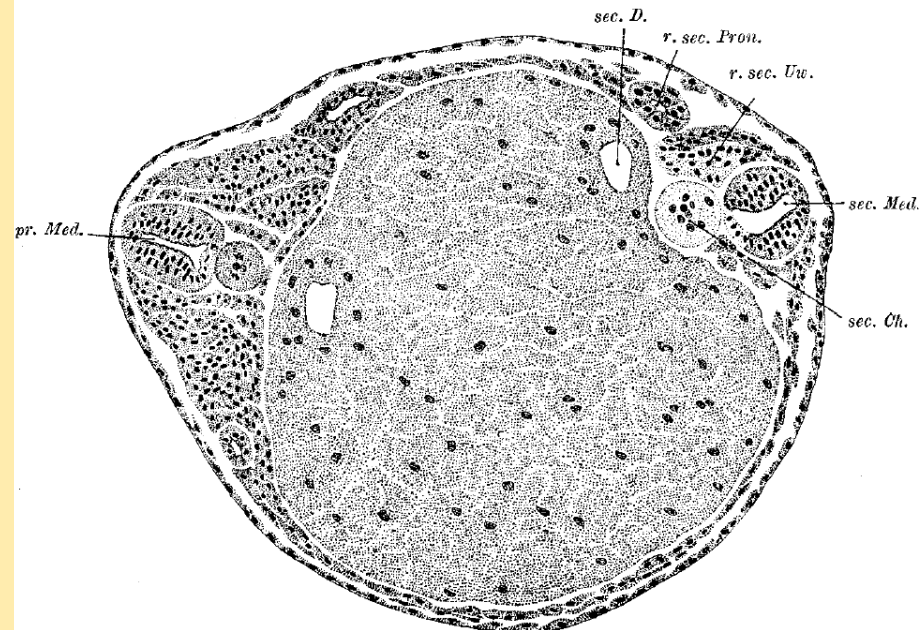
Mit 25 Textabbildungen

Sonderdruck aus
dem Archiv für
Mikroskopische Anatomie
und
Entwicklungsmechanik

Herausgegeben von
Wilhelm Roux
unter Mitwirkung von H. Braus und H. Spemann
100. Band 3./4. Heft

Berlin
Julius Springer
1924

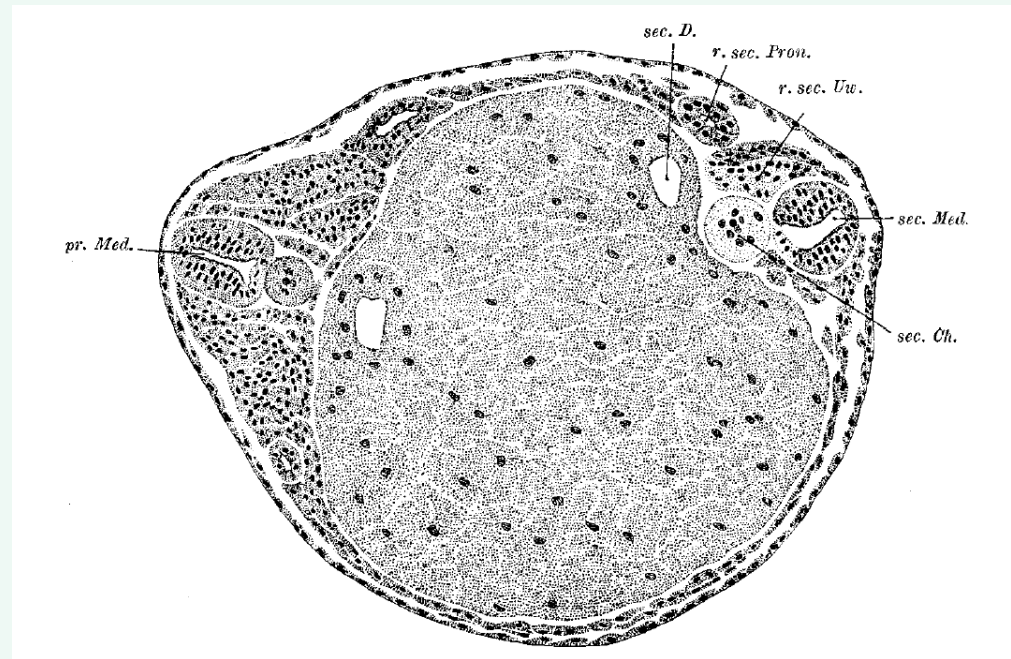
Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold (1924)



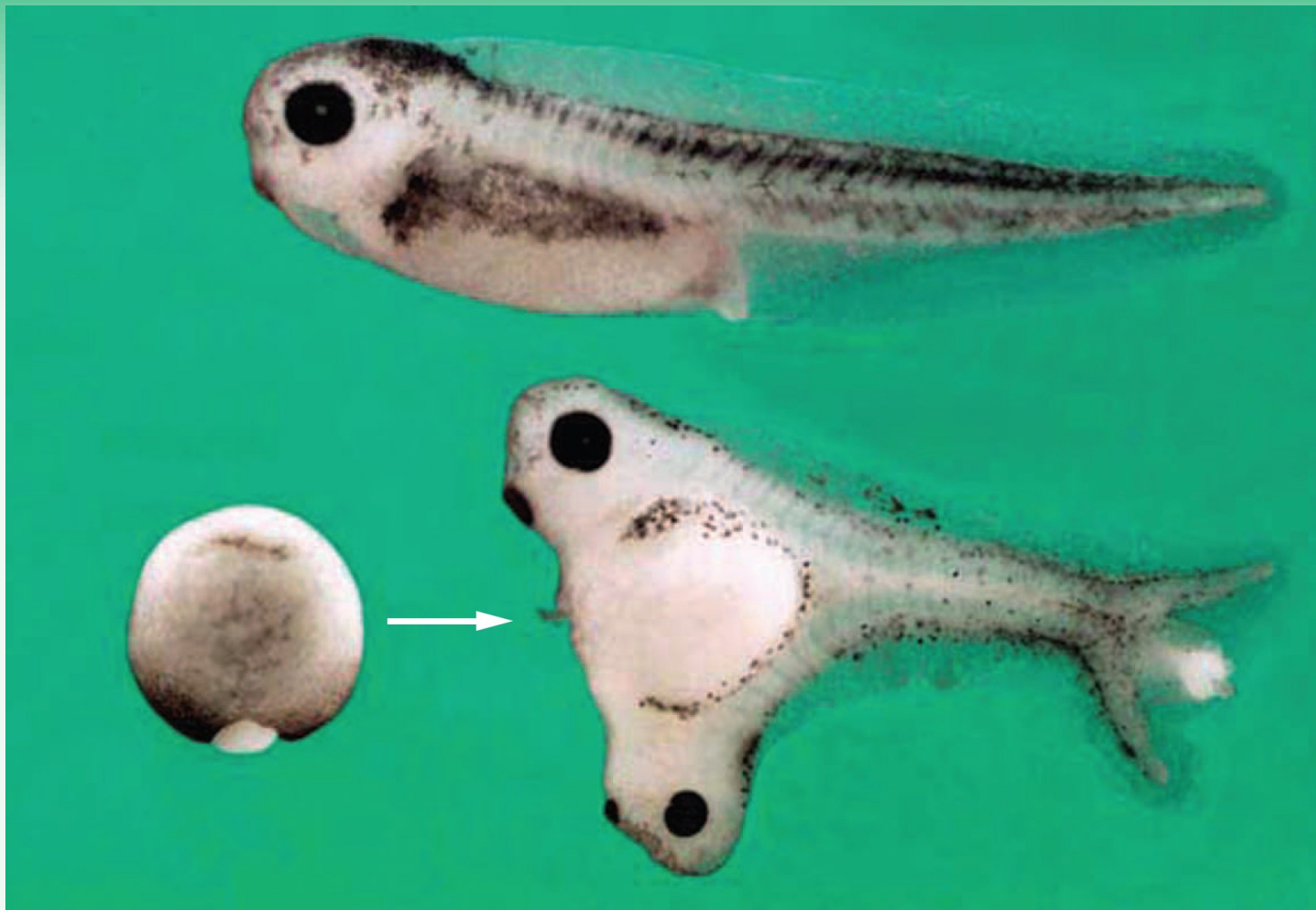
Τα πειράματα του H. Spemann και της H. Mangold

Ο Spemann ονόμασε το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου **οργανωτή (organizer)** γιατί:

- Επάγει τους κοιλιακούς ιστούς του **δέκτη** να αλλάξουν τύχη και να σχηματίσουν νευρικό σωλήνα και ραχιαίες μεσοδερματικές δομές.
- Οργανώνει ιστούς του δότη και του δέκτη ώστε να σχηματιστεί ένα δεύτερο έμβρυο.



Πρωτογενής εμβρυική επαγωγή

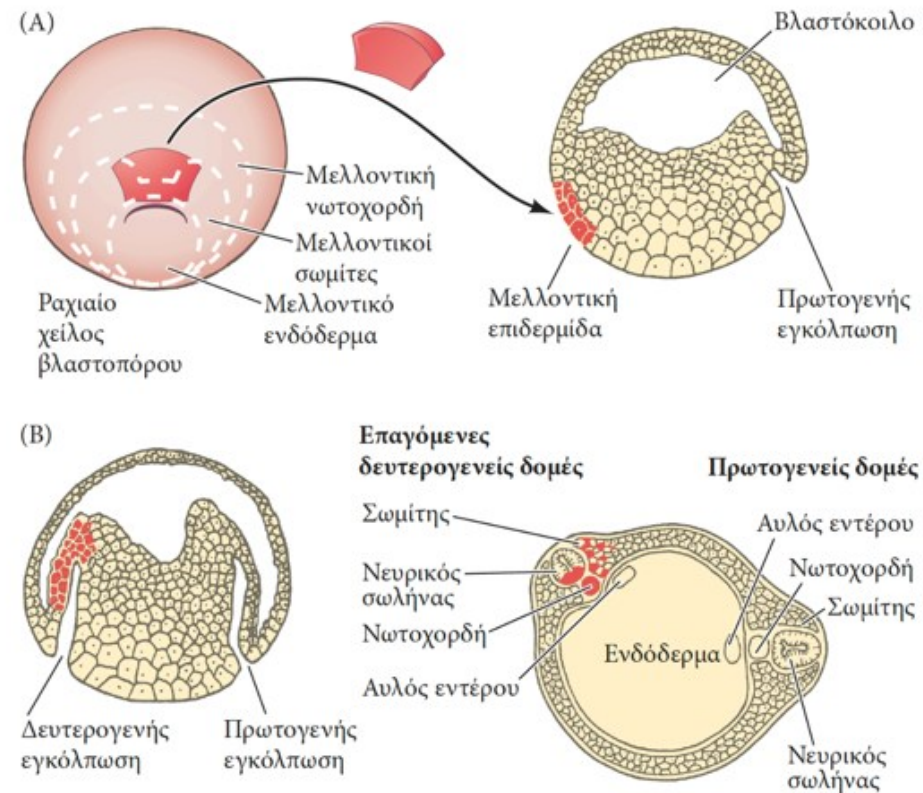


Επάνω: Φυσιολογικό έμβρυο ηλικίας 3 ημερών. Κάτω: Μεταμόσχευση οργανωτή – το μόσχευμα φαίνεται ως ένα λευκό τμήμα στην κοιλιακή πλευρά του γαστριδίου στην αριστερή πλευρά. Το έμβρυο που αναπτύσσεται φέρει διπλό άξονα (ηλικία 3 ημερών). Από τη δημοσίευση de Robertis & Kuroda (2004) *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 285-308, με άδεια από τον εκδοτικό οίκο Annual Reviews.

Ο οργανωτής και οι λειτουργίες του

Οι λειτουργίες του οργανωτή:

- Αυτοδιαφοροποίηση του ραχιαίου εξωδέρματος σε διάφορα παράγωγά του. Επαγωγή του νευρικού συστήματος από το εξώδερμα.
- Δίνει ραχιαίο χαρακτήρα στο περιβάλλον μεσόδερμα (δέκτη) που διαφορετικά θα παρέμενε κοιλιακό.
- Έναρξη των κινήσεων της γαστριδίωσης.
- Καθορισμός εμπροσθοπίσθιου άξονα.

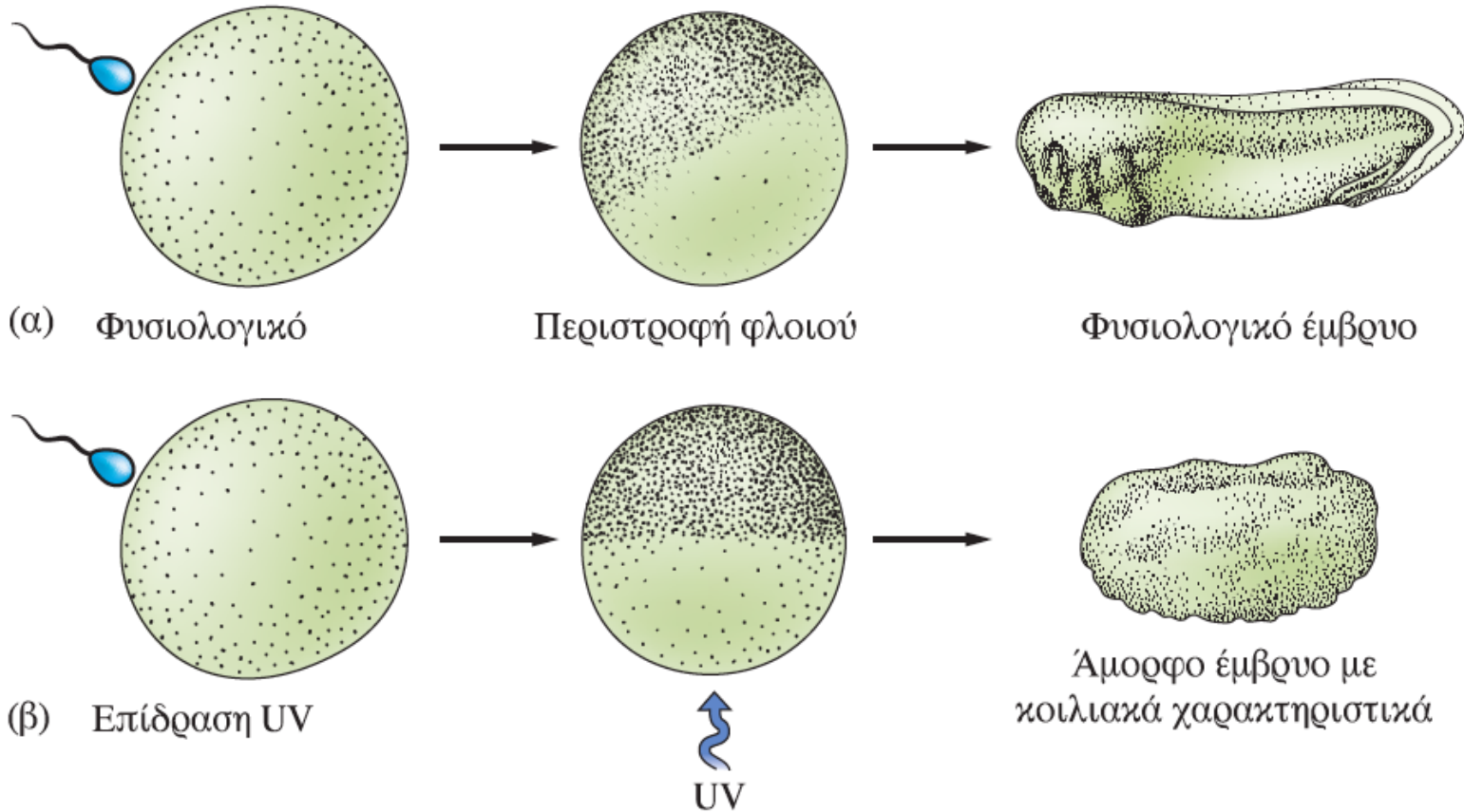


Καθορισμός ΕΟ και ΡΚ άξονα με στενά συνδεδεμένους μηχανισμούς

- Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του;
- Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του; Ποιοι παράγοντες εκκρίνονται από τον οργανωτή ώστε να οδηγήσουν στον σχηματισμό των αξόνων αλλά και της νευρικής πλάκας;

- **Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του;**
- Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του; Ποιοι παράγοντες εκκρίνονταν από τον οργανωτή ώστε να οδηγήσουν στον σχηματισμό των αξόνων αλλά και της νευρικής πλάκας;

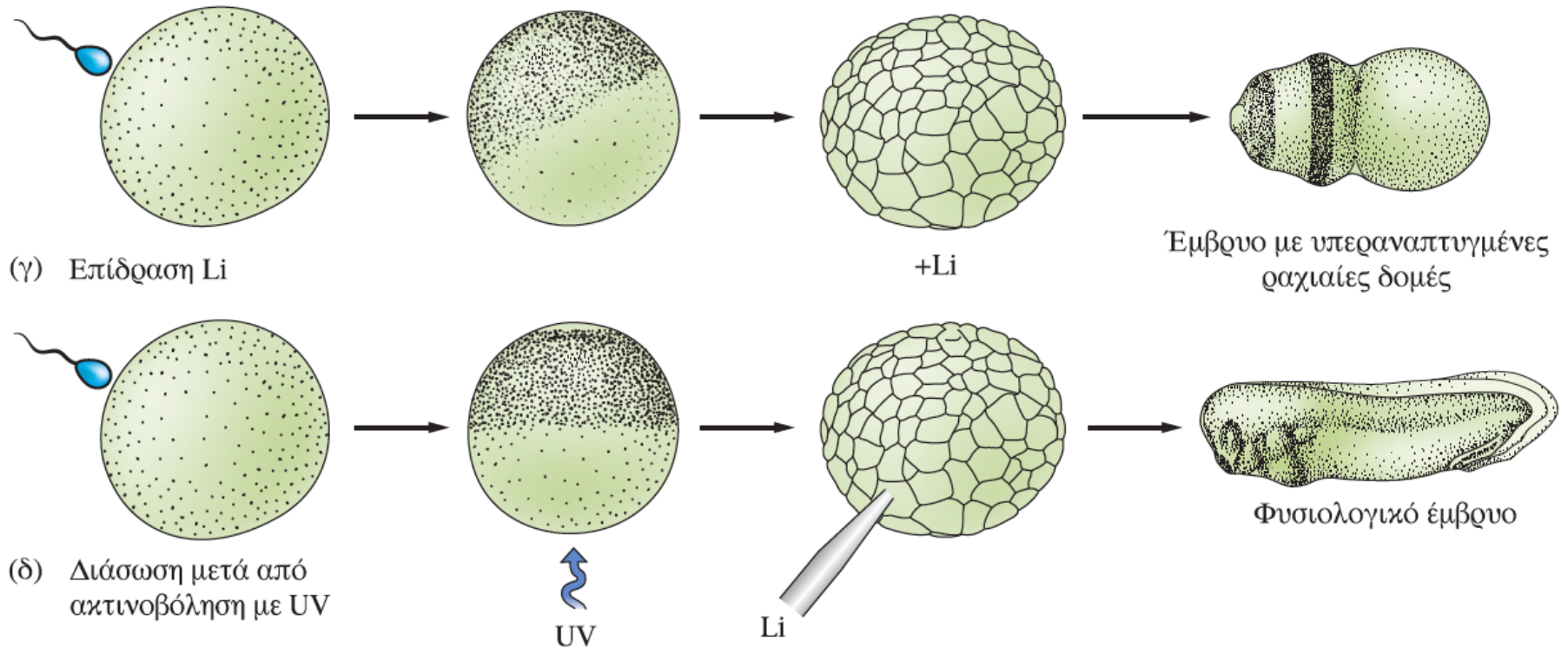
Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



α) Φυσιολογική ανάπτυξη.

β) Υπερανάπτυξη κοιλιακών δομών μετά από ακτινοβολήση με UV (πριν την περιστροφή του κυτταροπλάσματος).

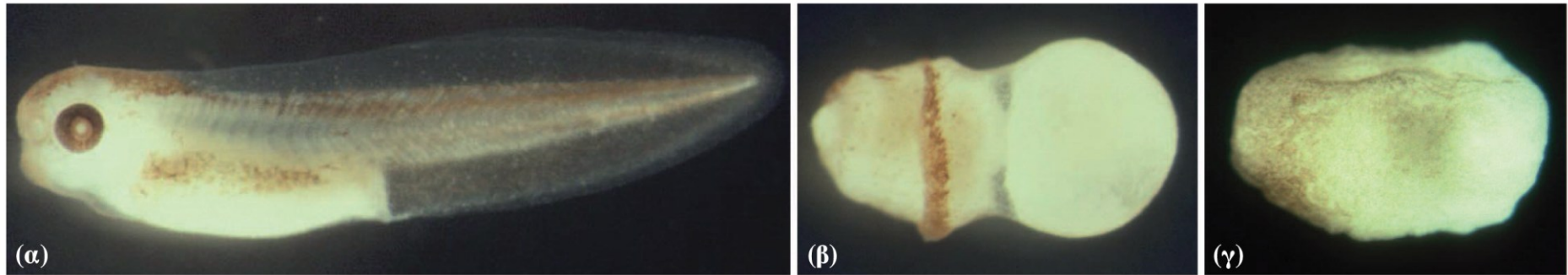
Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



γ) Σχηματισμός εμβρύου στο οποίο έχουν αναπτυχθεί υπερβολικά οι ραχιαίες δομές με επώαση σε διάλυμα λιθίου (μετα την περιστροφή κυτταροπλάσματος).

δ) Διάσωση εμβρύου που έχει ακτινοβοληθεί με UV με εντοπισμένη ένεση ιόντων λιθίου.

Πειράματα μελέτης της εξειδίκευσης του ραχιοκοιλιακού άξονα



Η επίδραση του λιθίου και της ακτινοβολίας UV στα έμβρυα του *Xenopus* κατά την τρίτη ημέρα της ανάπτυξης.

(α) Φυσιολογικό έμβρυο.

(β) Έμβρυο που επωάστηκε σε διάλυμα αλάτων λιθίου στο στάδιο του μοριδίου.

(γ) Έμβρυο που ακτινοβολήθηκε με UV πριν από την πρώτη αυλακωτική διαίρεση.

Εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα

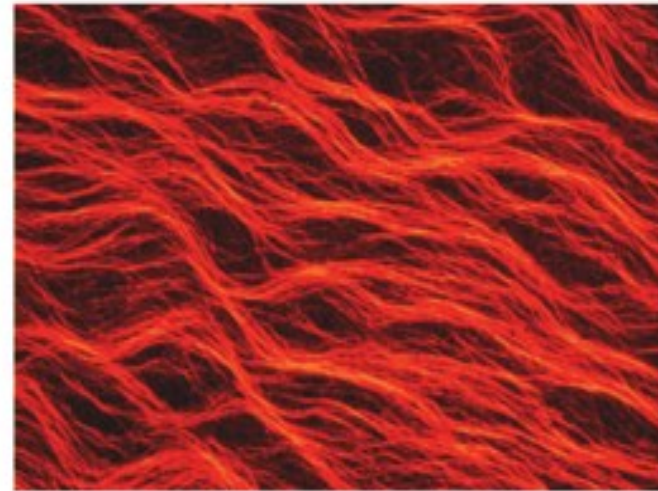
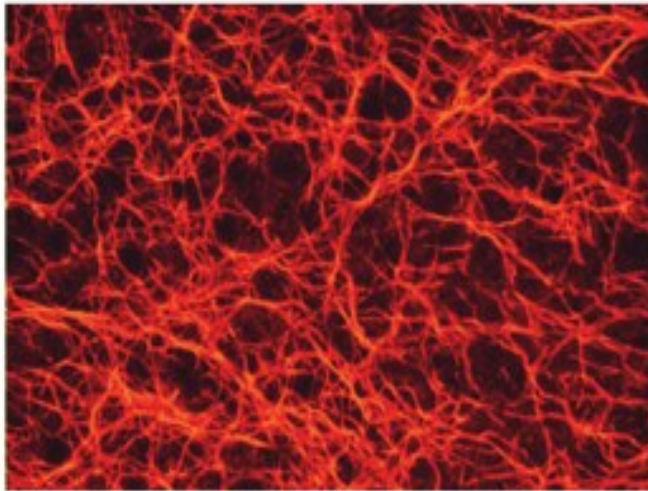
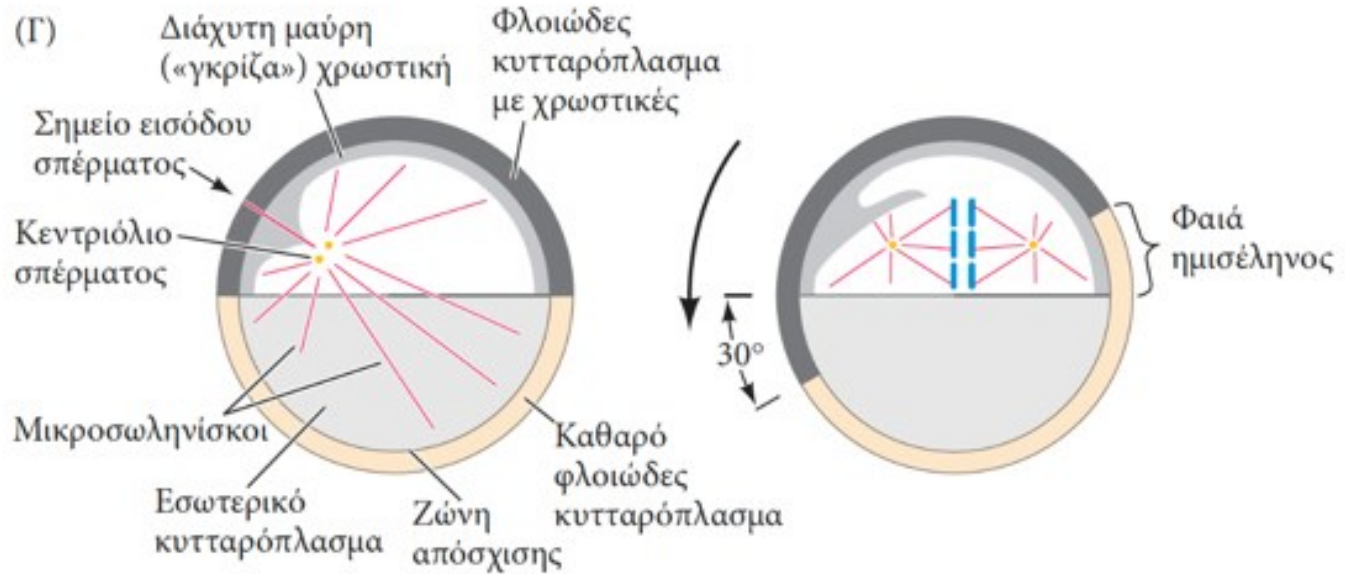
Η έκθεση σε UV ή κολχικίνη αναστέλλει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και κατ' επέκταση τη μετακίνηση του περιφερειακού κυτταροπλάσματος. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην επιτελείται η γαστριδίωση και το έμβρυο να αναπτύσσεται εντελώς ανώμαλα λαμβάνοντας τελικά τη μορφή μιας μάζας, η οποία στερείται ραχιαίων δομών (belly piece).



Η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος του ζυγωτού ενέχεται στην εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα

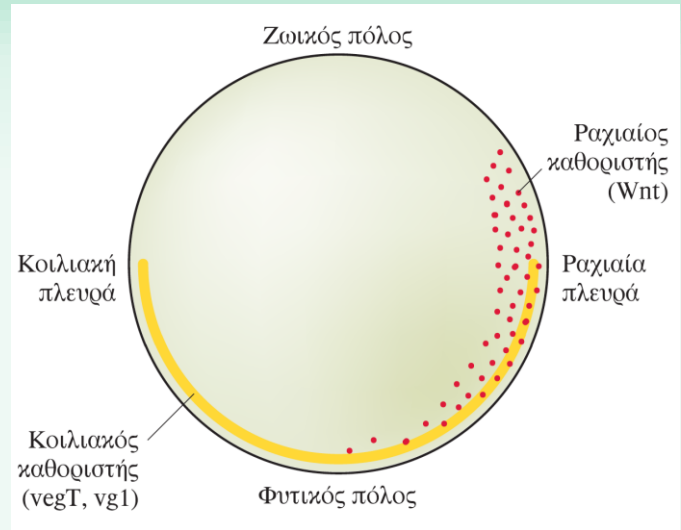
Εγκαθίδρυση ραχιοκοιλιακού άξονα

Μικροσωληνίσκοι

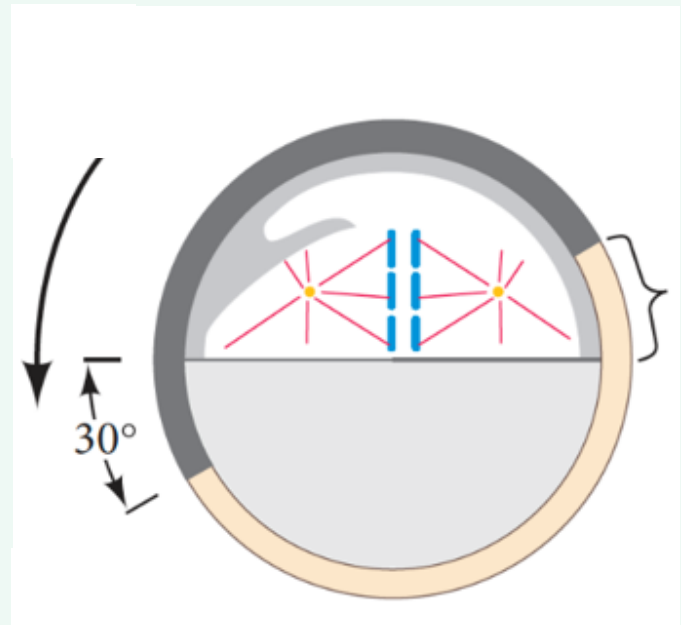


Συμπέρασματα

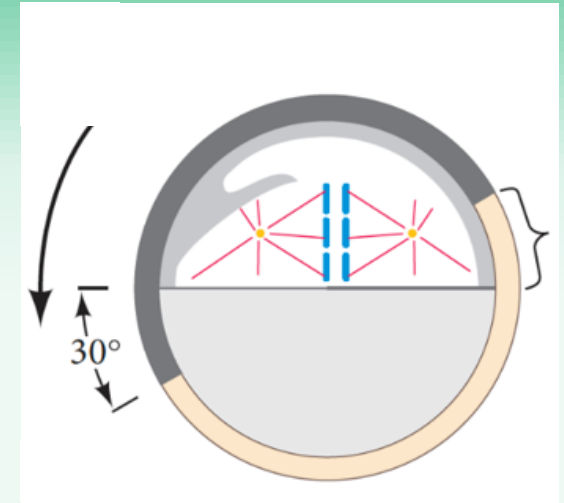
A) Στη φυτική και ραχιαία περιοχή του βλαστιδίου εντοπίζονται κάποιοι καθοριστές που είναι απαραίτητοι για τη γαστριδίωση, την ακόλουθη ανάπτυξη ραχιαίων δομών και τη διαφοροποίηση κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα.



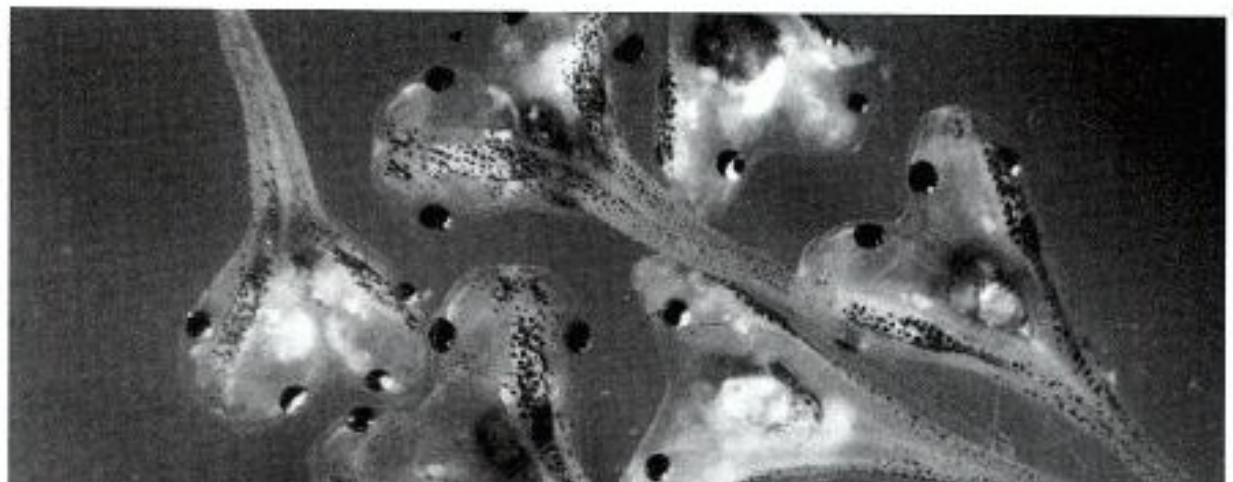
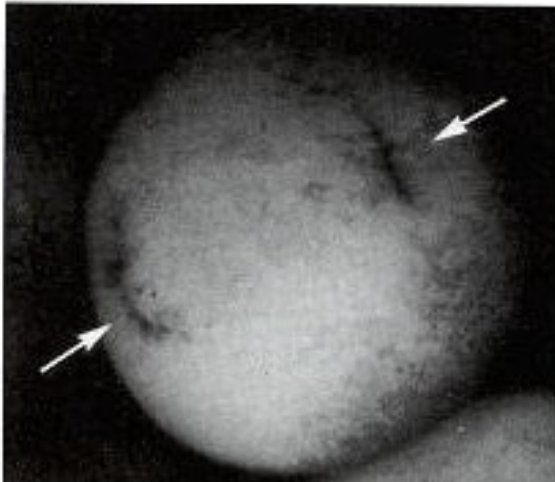
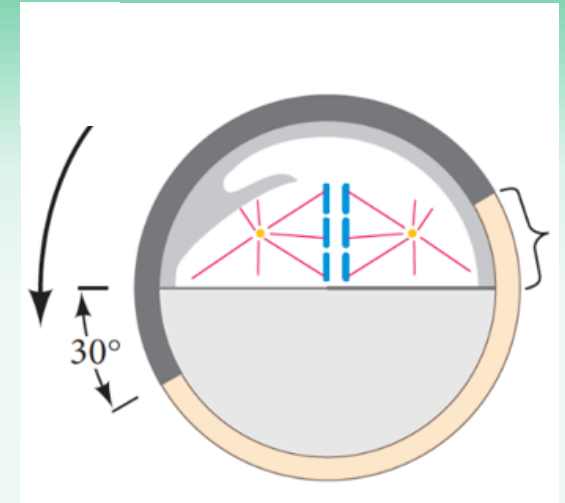
B) Για τον εντοπισμό ή / και τη δημιουργία των καθοριστών αυτών απαιτείται η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος σε σχέση με το εσωτερικό κυτταρόπλασμα.



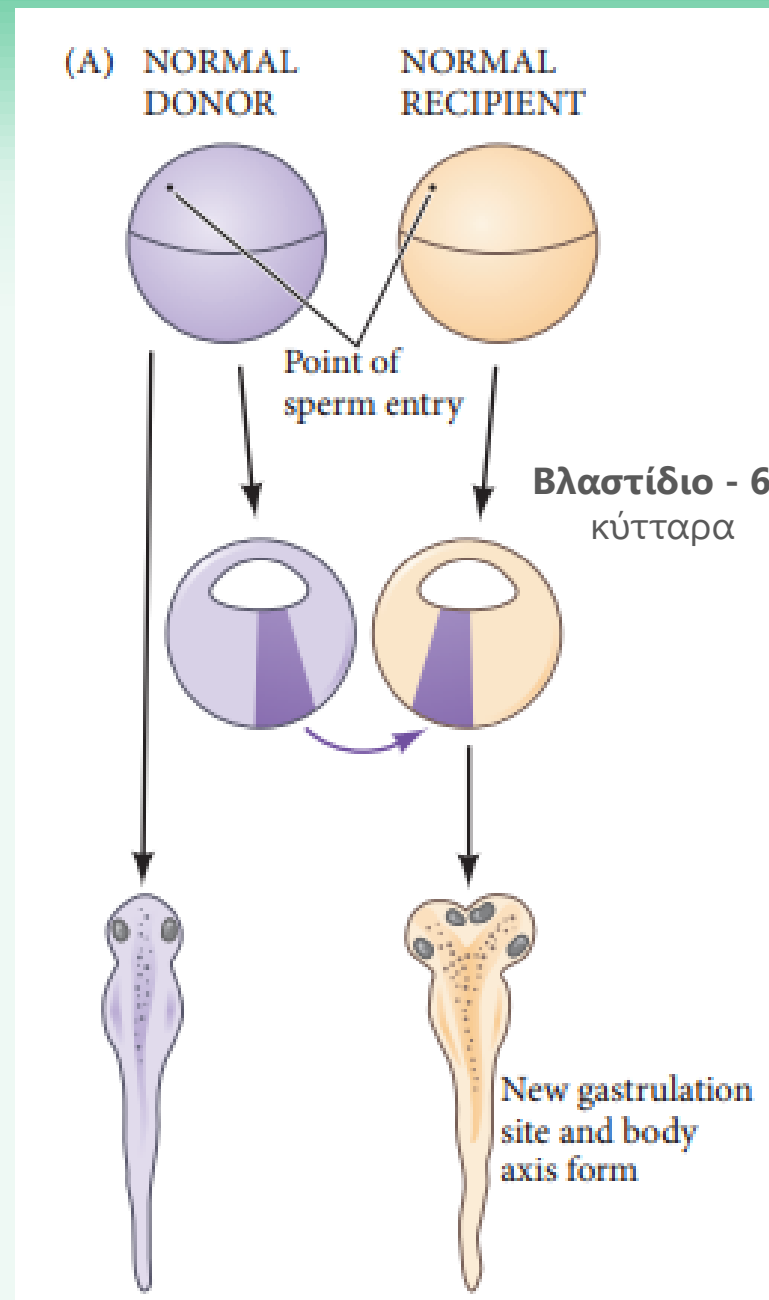
Τι θα γίνει αν μετά την περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος ακινητοποιήσουμε σε ζελατίνη τα γονιμοποιημένα ωάρια, με τη ραχιαία περιοχή προς τα πάνω και την κοιλιακή προς τα κάτω, και στη συνέχεια φυγοκεντρήσουμε ελαφρά;



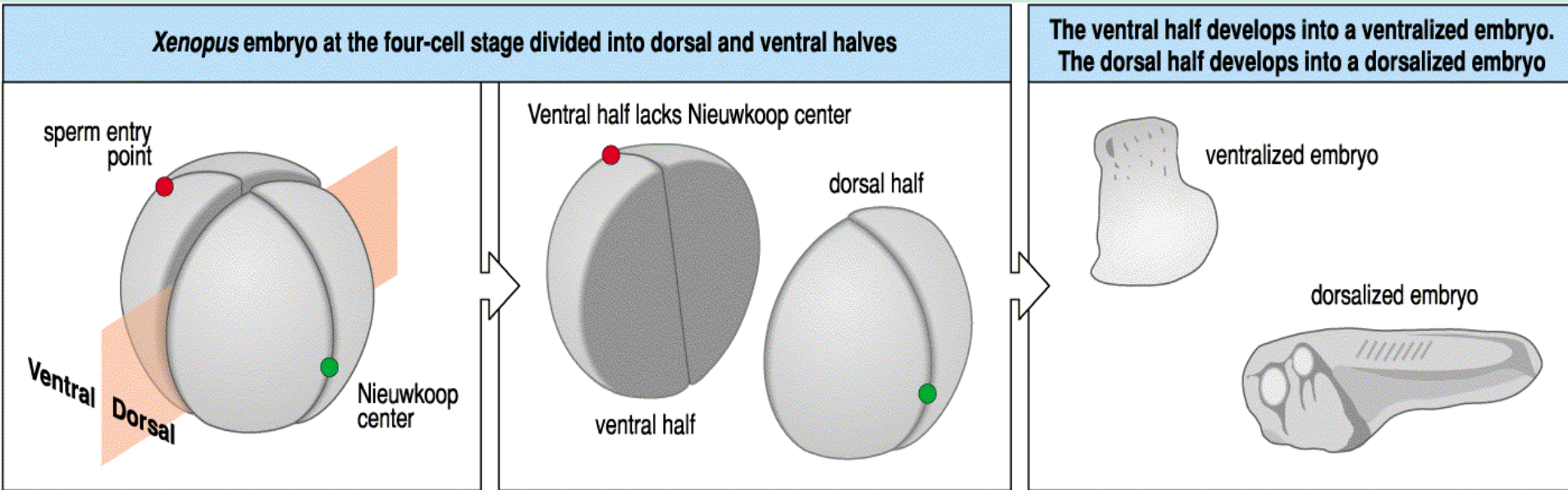
Τι θα γίνει αν μετά την περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος ακινητοποιήσουμε σε ζελατίνη τα γονιμοποιημένα ωάρια, με τη ραχιαία περιοχή προς τα πάνω και την κοιλιακή προς τα κάτω, και στη συνέχεια φυγοκεντρήσουμε ελαφρά;



Τα ραχαία βλαστομερίδια του φυτικού ημισφαιρίου έχουν την ιδιότητα να δίνουν δεύτερο άξονα!



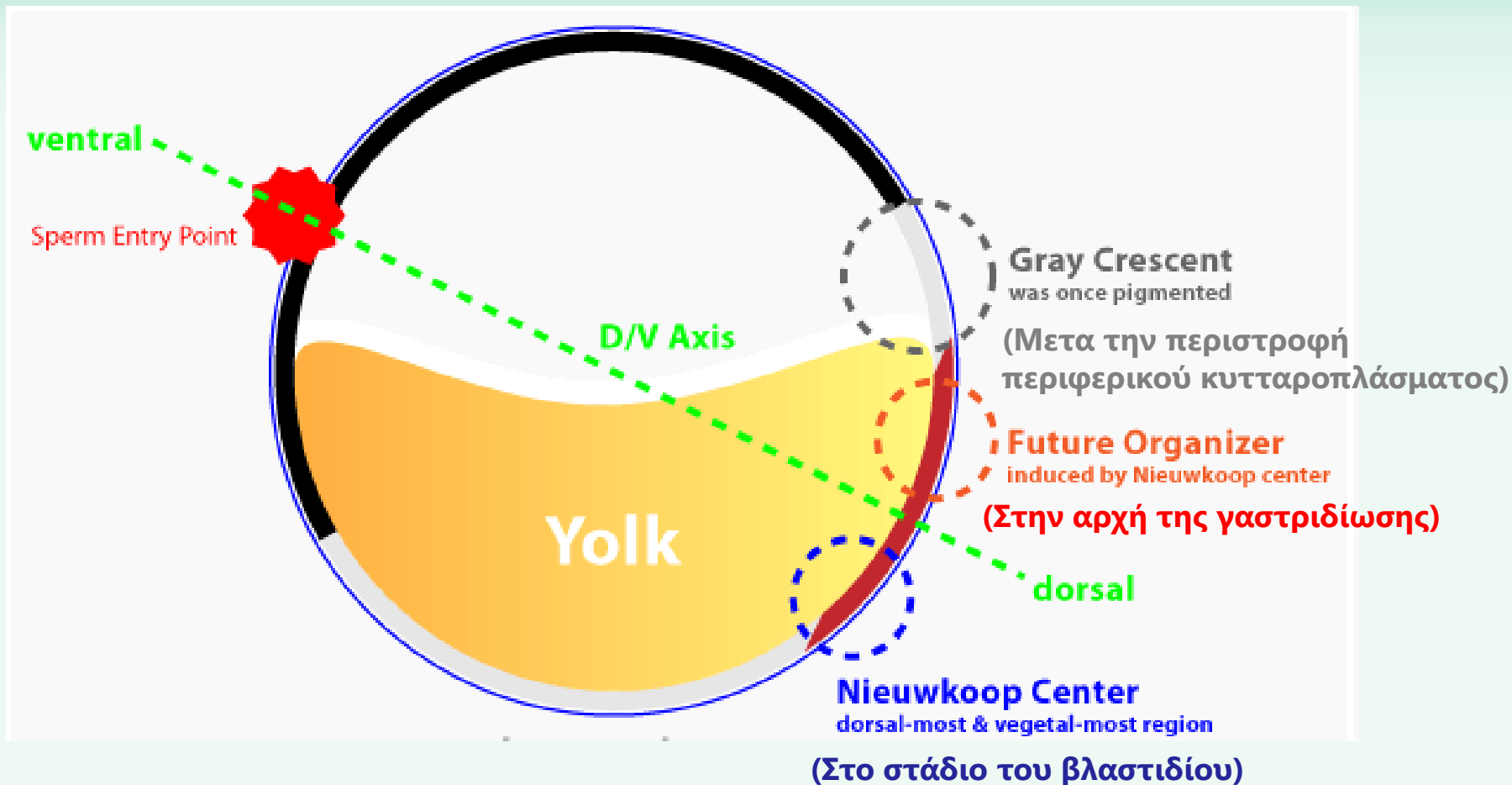
Κέντρο Nieuwkoop: Πείραμα διαχωρισμού...



- Η περιστροφή του περιφερειακού κυτταροπλάσματος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κέντρου σηματοδότησης (**Nieuwkoop center**) το οποίο εγκαθιδρύει τον ραχιοκοιλιακό άξονα.
- Το **κέντρο Nieuwkoop** εντοπίζεται απέναντι από το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου.

Ο καθορισμός του ραχιοκοιλιακού άξονα ξεκινά με την είσοδο του σπερματοζωαρίου

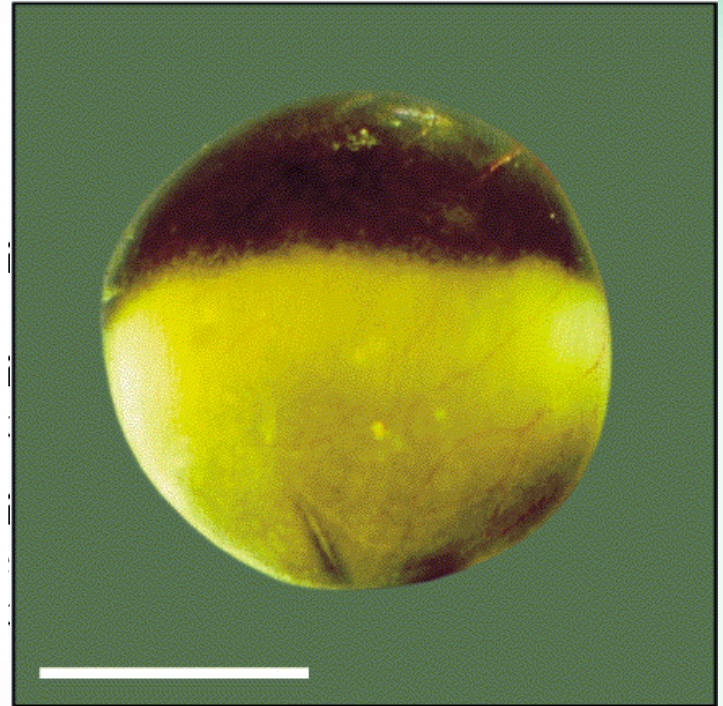
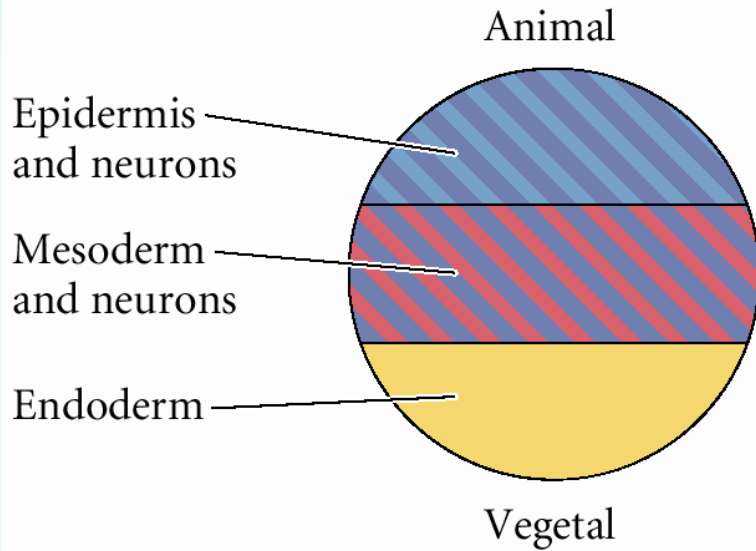
Το κέντρο Nieuwkoop



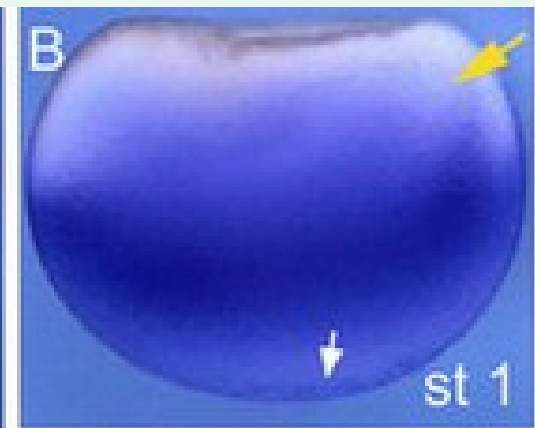
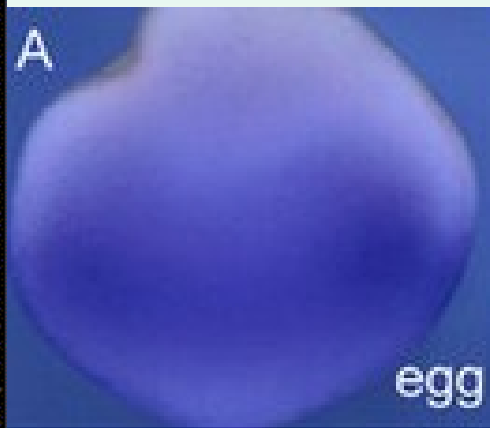
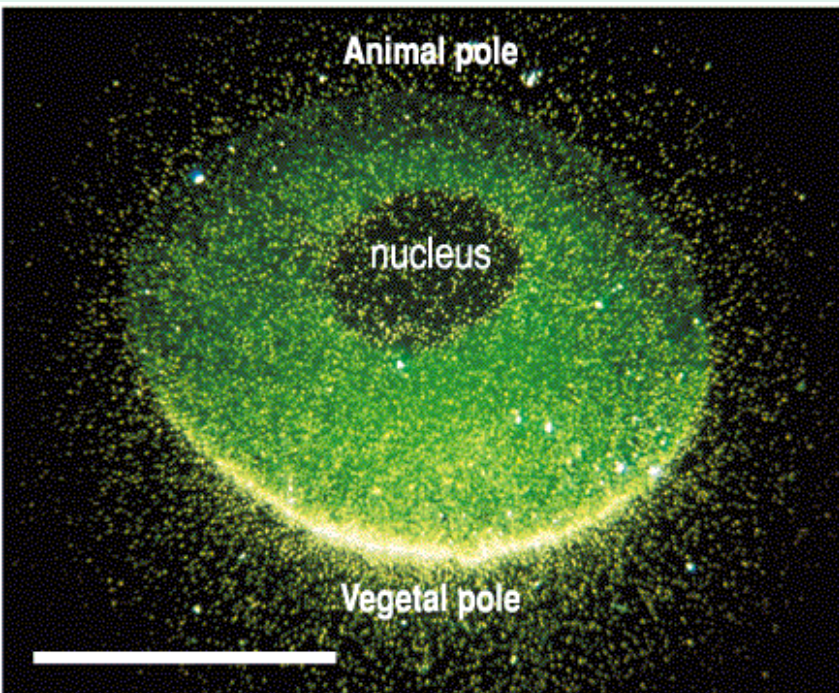
Το κέντρο Nieuwkoop επάγει τον σχηματισμό του μελλοντικού οργανωτή

Πώς;;

Ο χάρτης πεπρωμένου του *X. leavis*



- Το αγονιμοποίητο αυγό εμφανίζει ήδη ασυμμετρία κατά μήκος του άξονα ζωϊκού-φυτικού πόλου, οι βλαστικές στιβάδες μπορούν να χαρτογραφηθούν σ' αυτό.
- Μητρικά mRNA εντοπίζονται είτε ομοιόμορφα είτε εντοπισμένα .

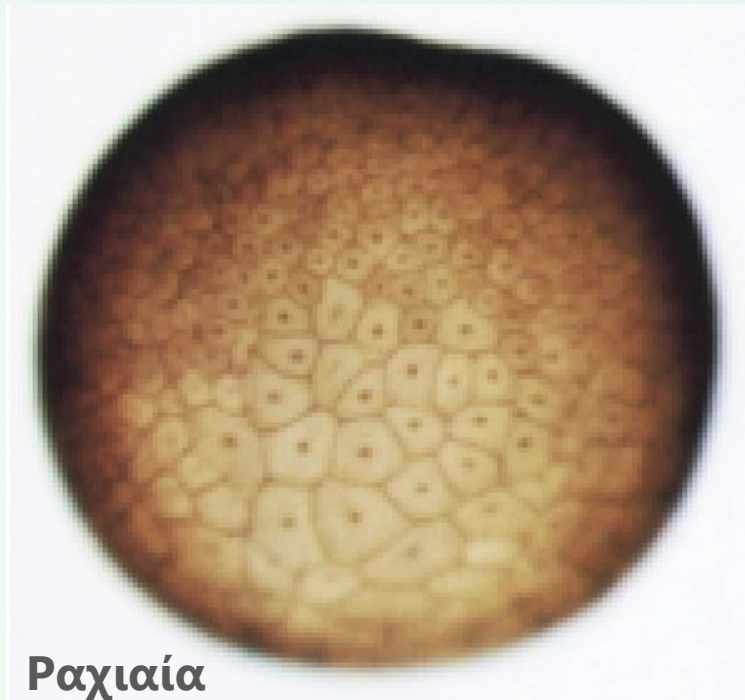


VegT

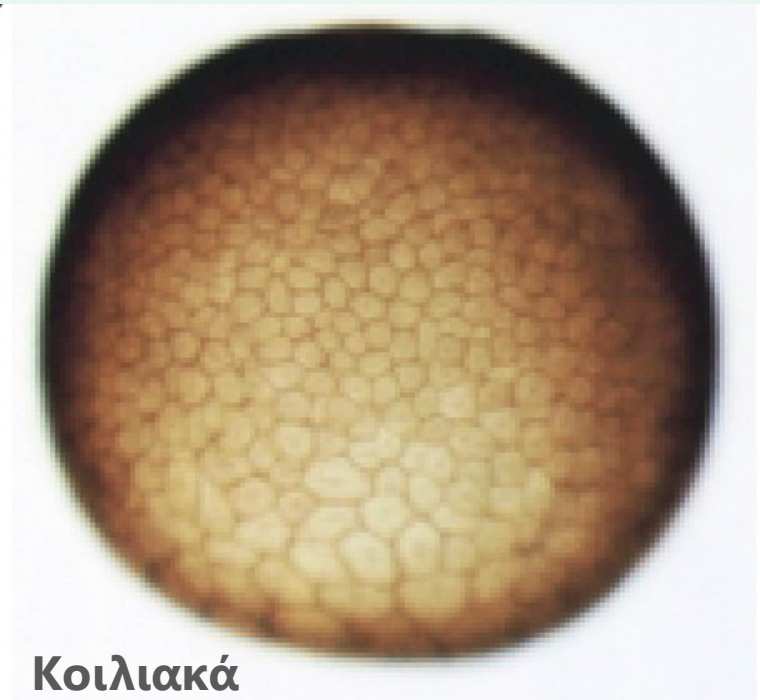
Τα μητρικά mRNAs των - VegT (μεταγραφικός παράγοντας
 - Vg1 (μέλος υπερικογένειας των TGF- β – εκκρινόμενα μόρια),
 - Xwnt-11
 εντοπίζονται στο φυτικό πόλο του εμβρύου.

Πώς σχηματίζεται το κέντρο Nieuwkoop;

β -catenin



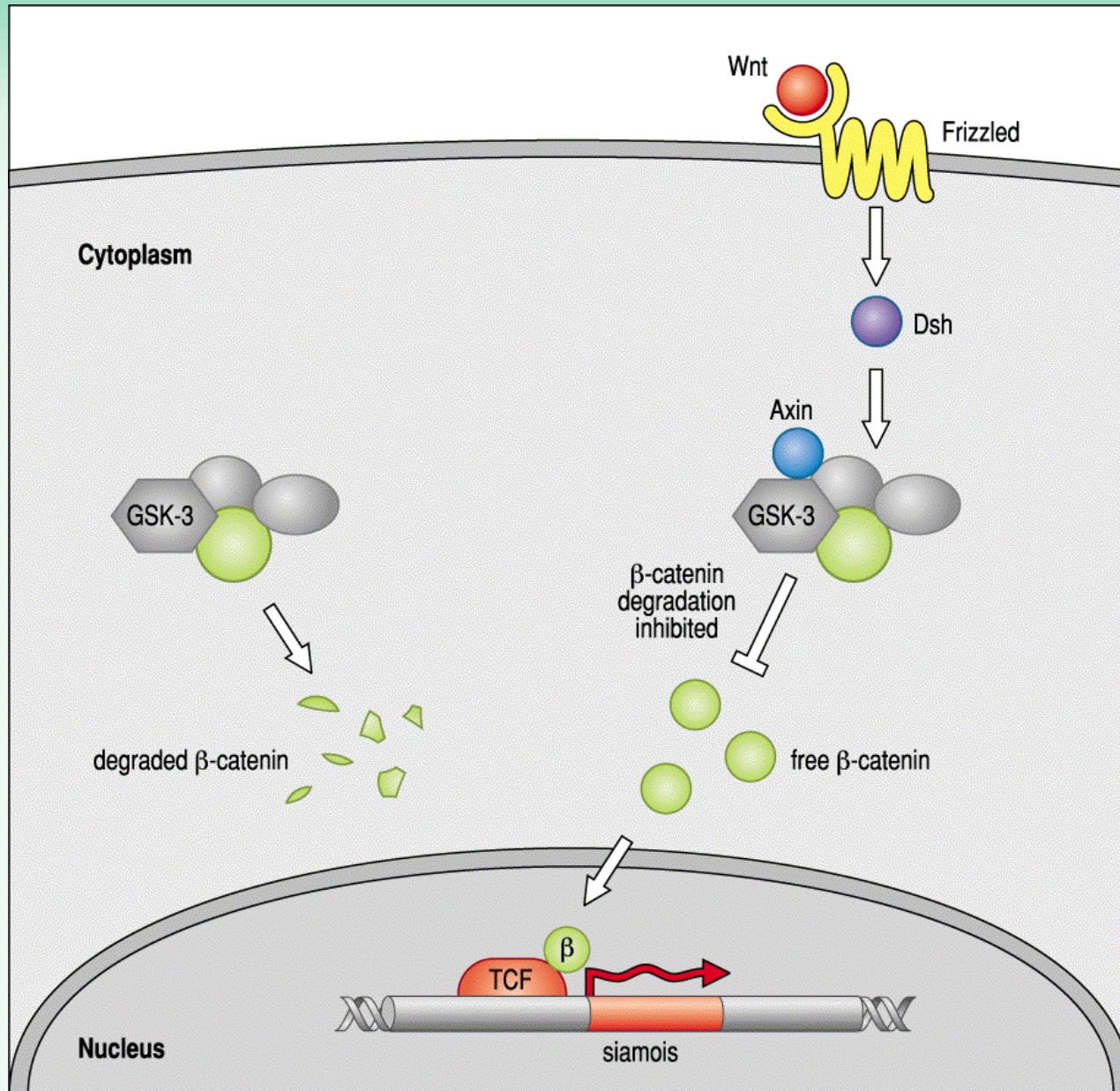
Ραχιαία



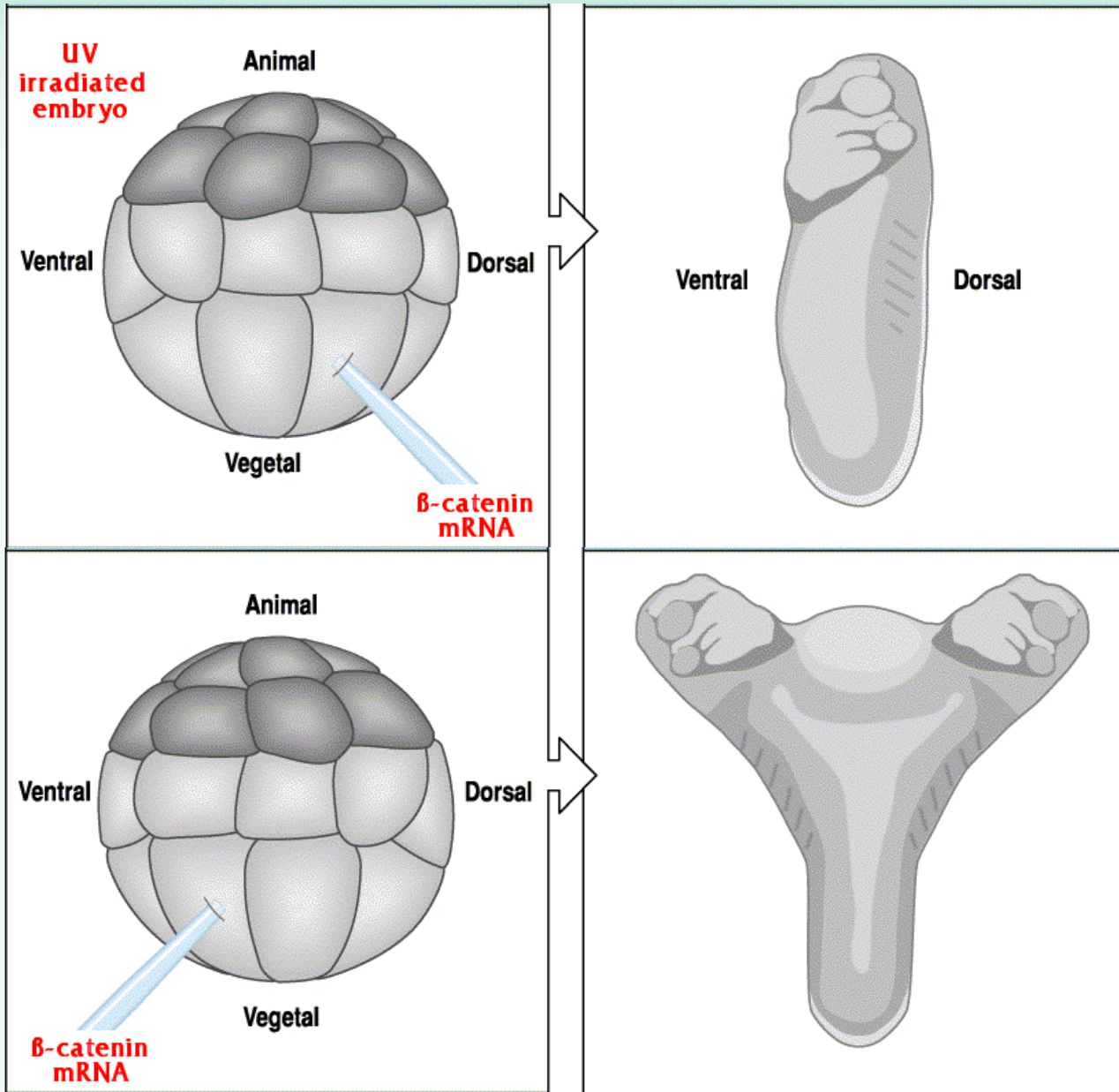
Κοιλιακά

Η **β -catenin** εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων μόνο στη ραχιαία πλευρά.

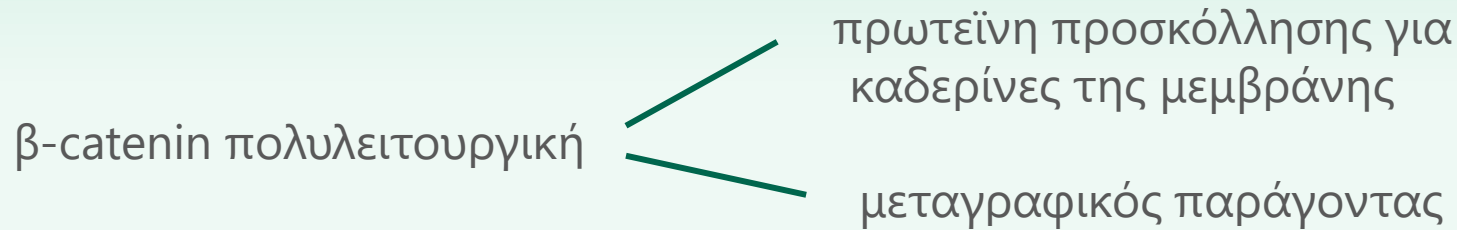
Το κανονικό μονοπάτι Wnt



Πώς σχηματίζεται το κέντρο Nieuwkoop; β-catenin

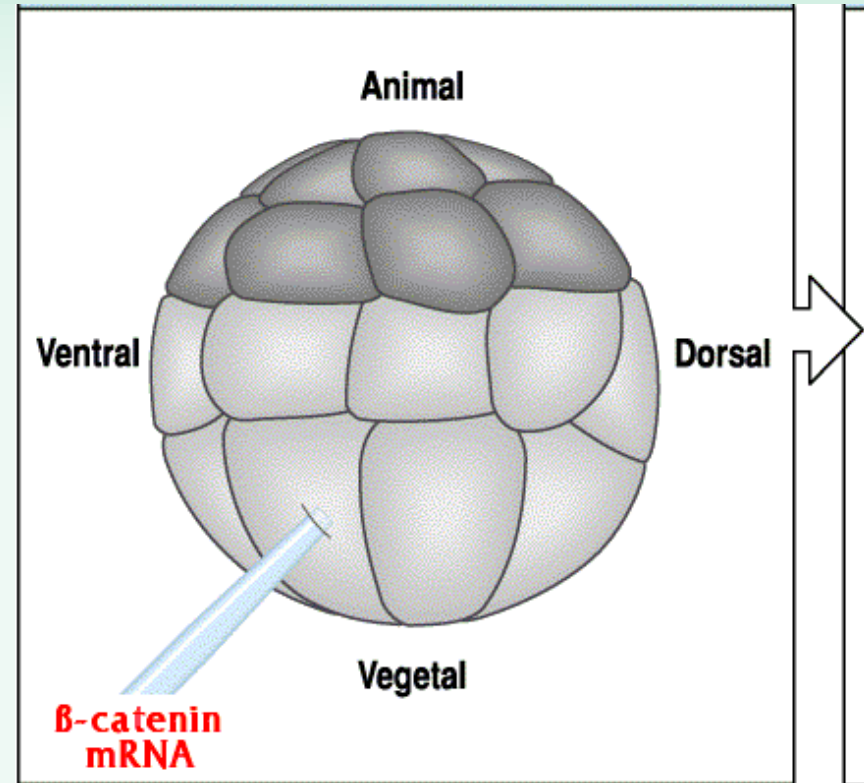
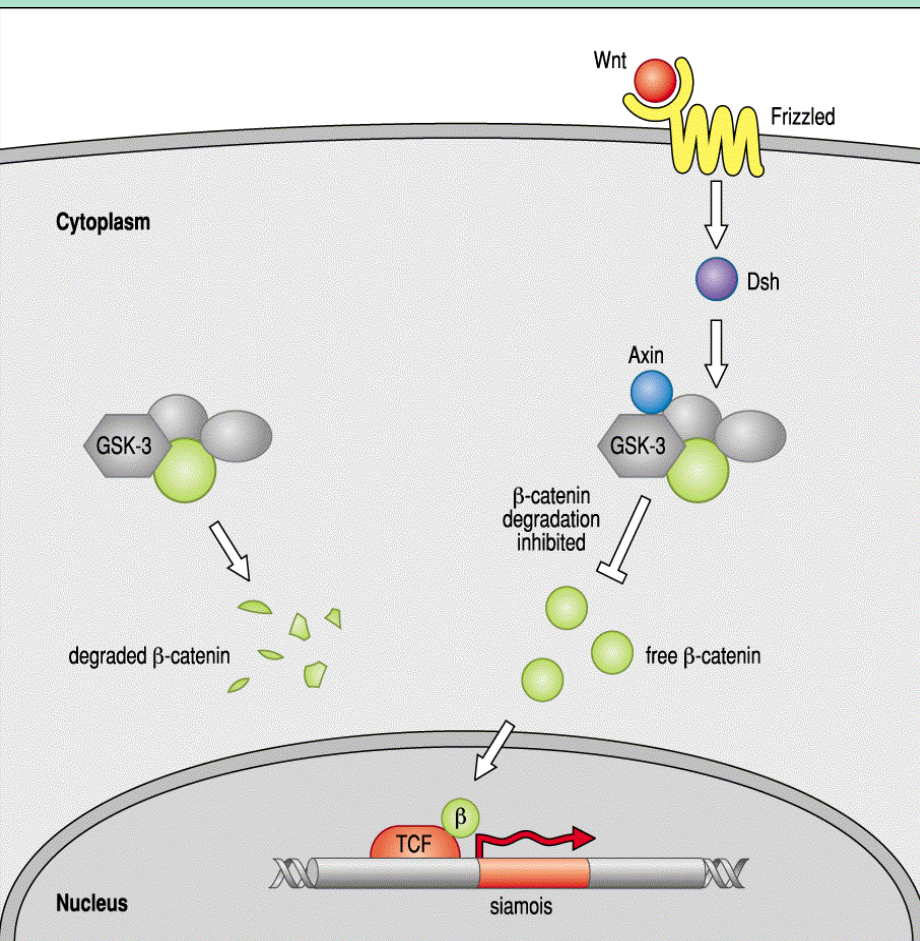


Ο ρόλος της β-catenin



- Κατανέμεται ασύμμετρα κατά τις κυτταροπλασματικές κινήσεις που ακολουθούν τη γονιμοποίηση.
- Μετατοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων μόνο στη ραχιαία πλευρά.
- Ένεση antisense ολιγονουκλεοτιδίων → έμβρυα που στερούνται ραχιαίων δομών.
- Ένεση mRNA της β-catenin στην κοιλιακή πλευρά → δευτερογενής άξονας.

Το μονοπάτι Wnt



Τι θα γίνει αν ενέσεις GSK3 ραχιαία? → Άμορφο έμβρυο με κοιλιακά χαρακτηριστικά

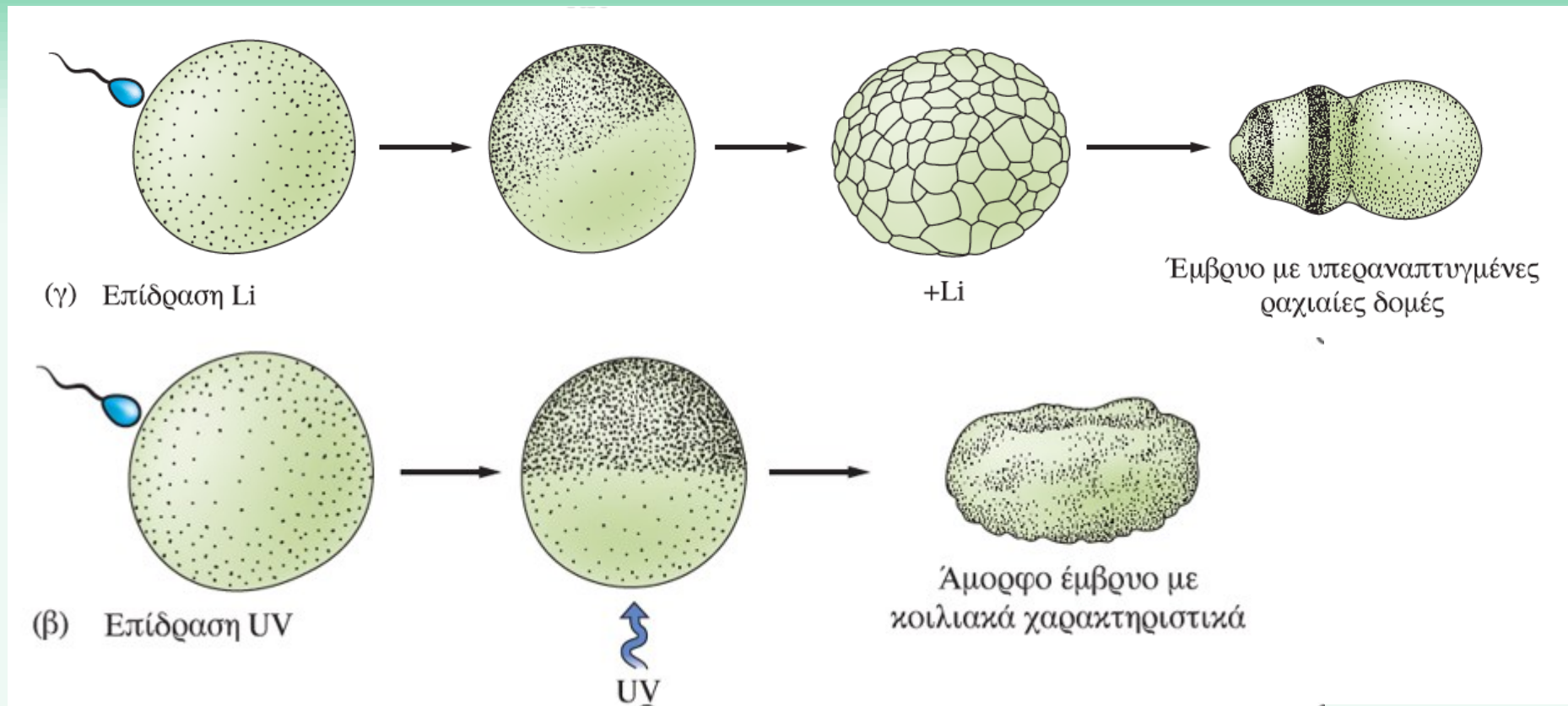
Τι θα γίνει αν αποσιωπήσεις τη GSK3 κοιλιακά? → Έμβρυο με υπερανεπτυγμένες ραχιαίες δομές

Ο ρόλος της GSK3



Ενεση στα δύο βλαστομερίδια μιας κυρίαρχης αρνητικής μετάλλαξης της GSK3 έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δεύτερου άξονα.

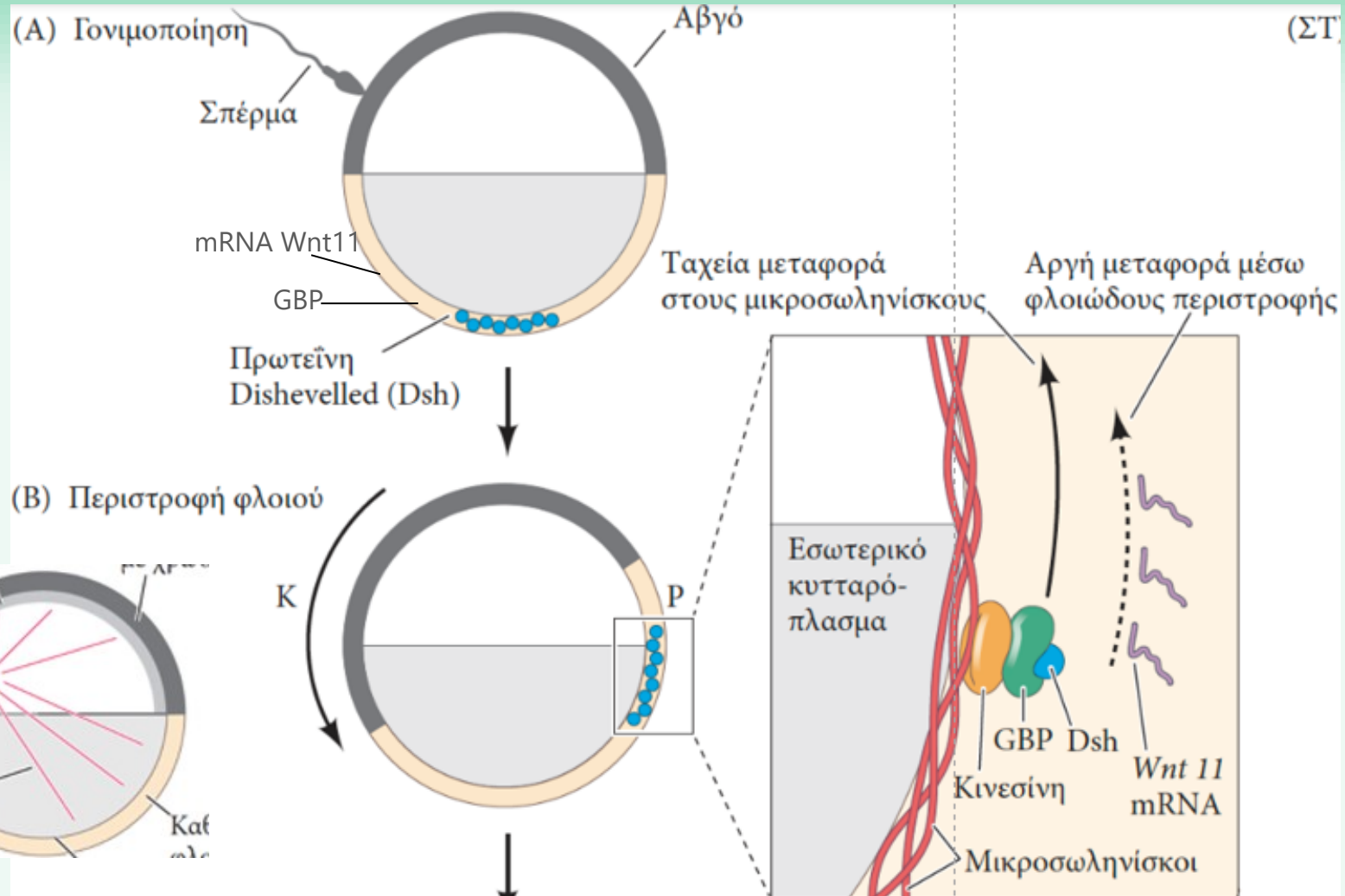
Η επεξεργασία με LiCl το οποίο καταστέλλει την GSK3, καταστέλλει το σχηματισμό κοιλιακών δομών.



Το LiCl καταστέλλει την GSK-3 - ραχιαίες δομές

Η ακτινοβολήση με UV εμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων - κοιλιακές δομές

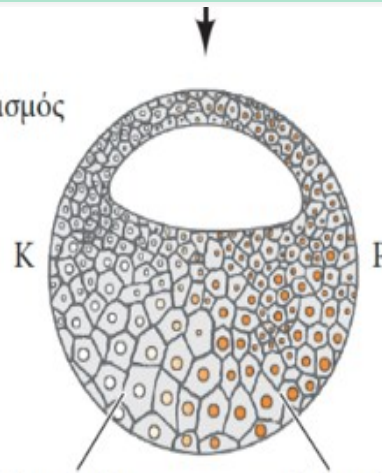
Πώς η β -catenin γίνεται ενεργή στη ραχιαία πλευρά του φυτικού πόλου;



Οι μικροσωληνίσκοι επιτρέπουν τη μετακίνηση των πρωτεϊνών **Disheveled (Dsh)**, **GBP (GSK-binding protein)** και **Wnt11** στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου. Η **Dsh** (παράγεται εκ νέου από τη Wnt11) αναστέλλει την **GSK3**, επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση και τη σταθεροποίηση της **β -κατενίνης** στη μελλοντική ραχιαία περιοχή του εμβρύου.

Πώς η β -catenin γίνεται ενεργή στη ραχιαία πλευρά του φυτικού πόλου;

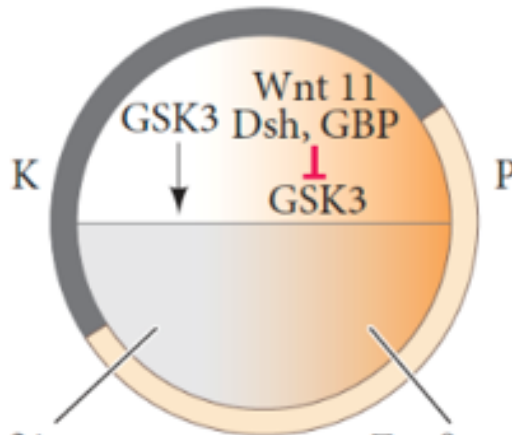
(Ε) Ραχιαίος εμπλουτισμός
 β -κατενίνης



Απουσία β -κατενίνης
στους κοιλιακούς πυρήνες

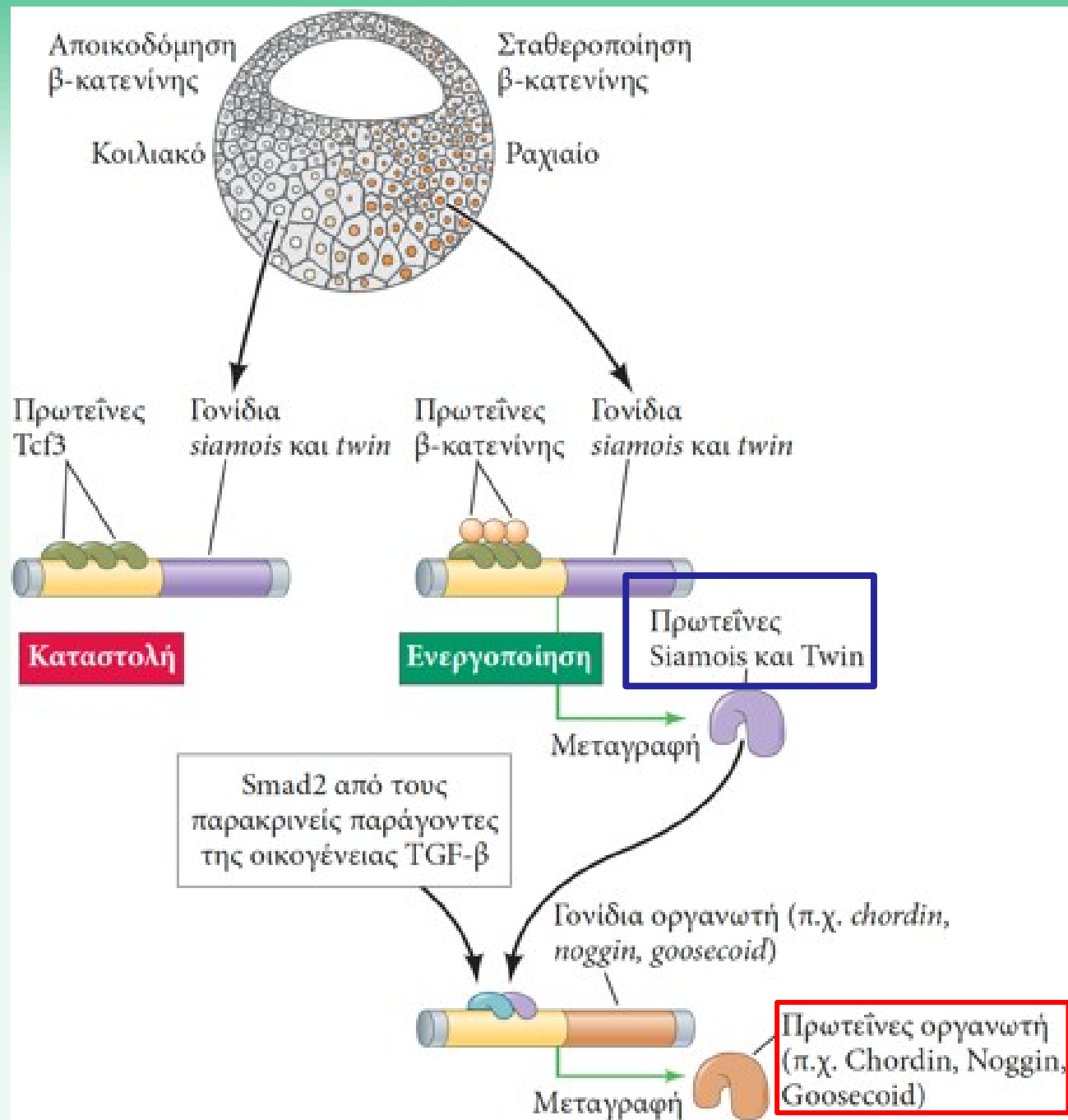
β -κατενίνη στους ραχιαίους πυρήνες

(Δ) Ραχιαία αναστολή
GSK3

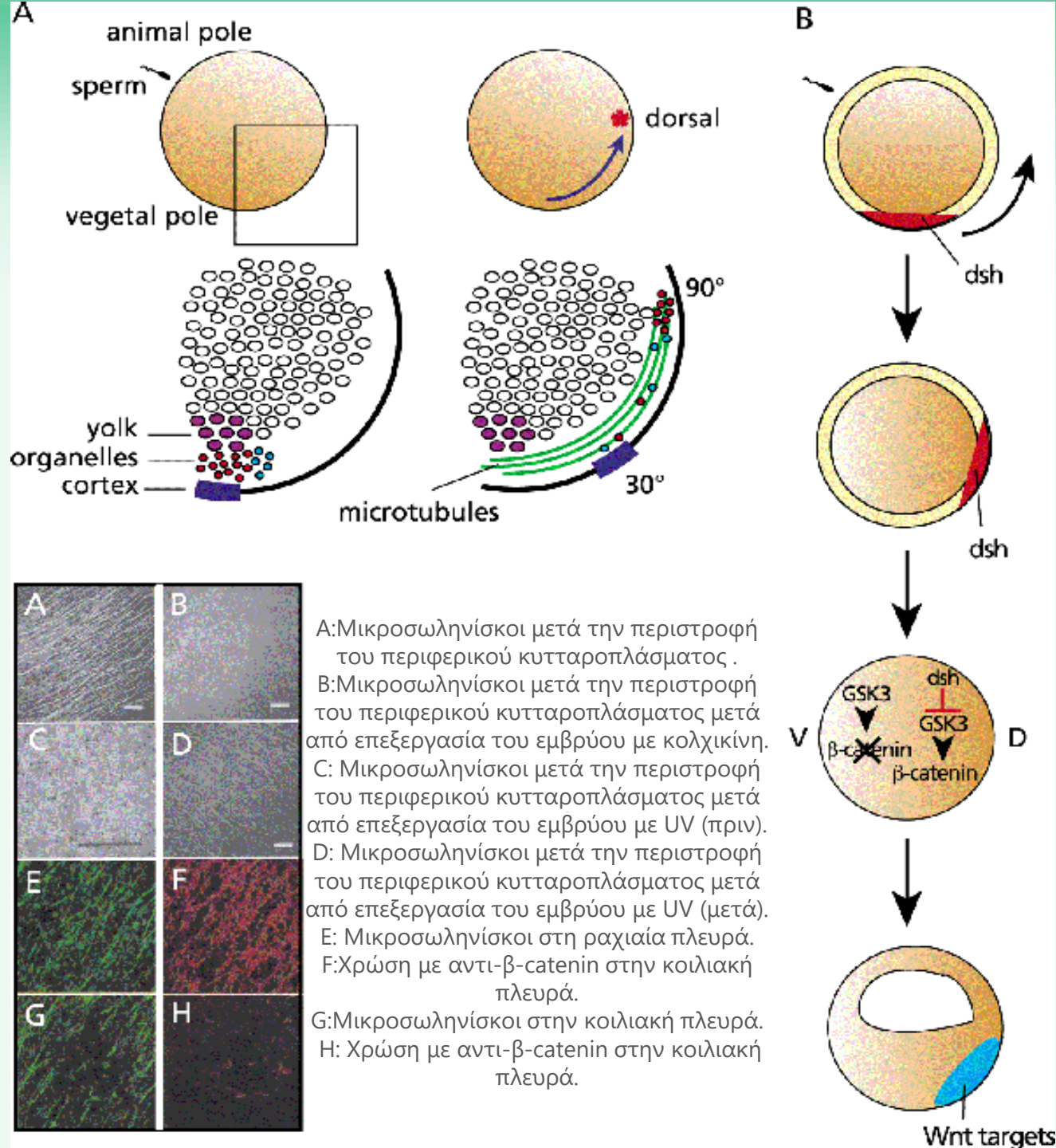


Αποικοδόμηση
 β -κατενίνης

Σταθεροποίηση
 β -κατενίνης



Απο το μονοπάτι
wnt στις πρωτεΐνες
του οργανωτή.

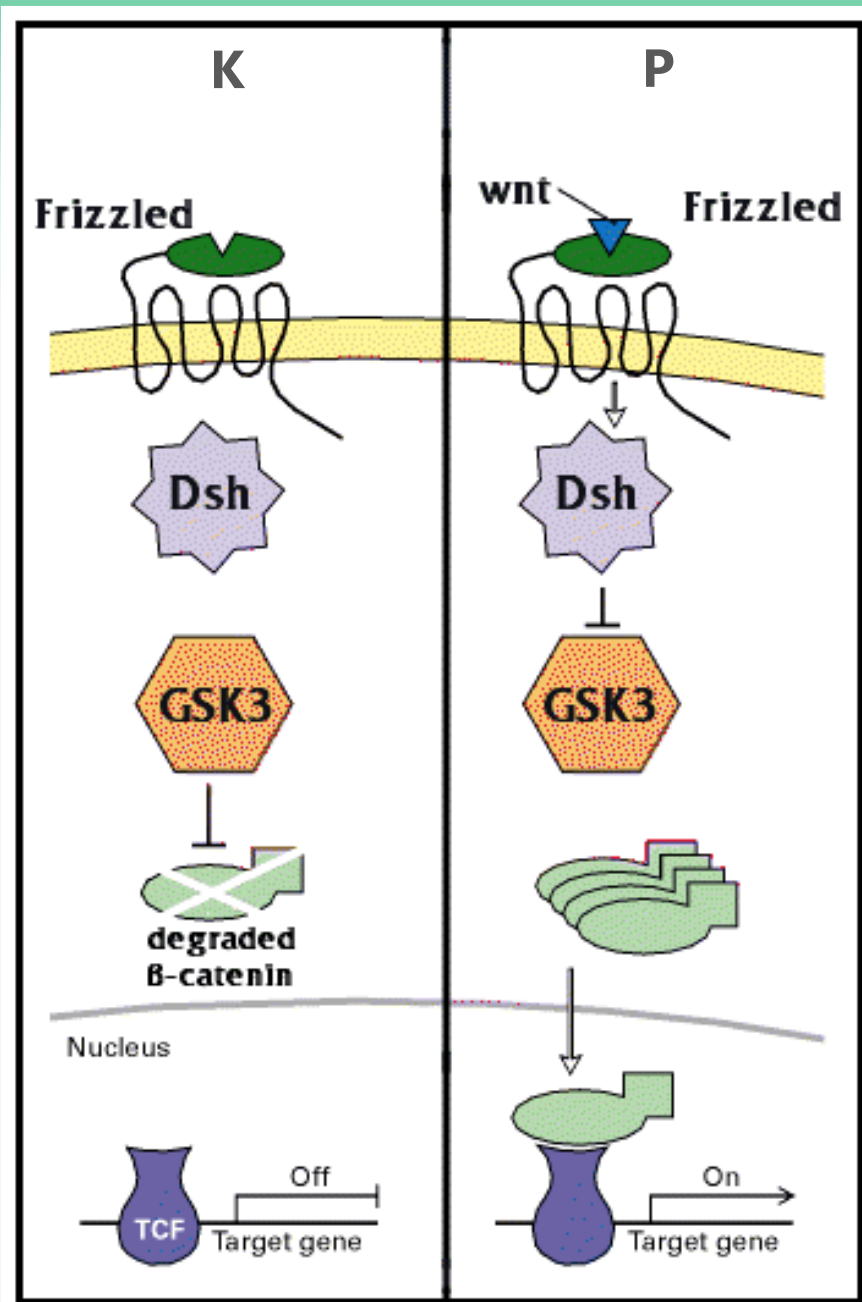


Συμπεράσματα:

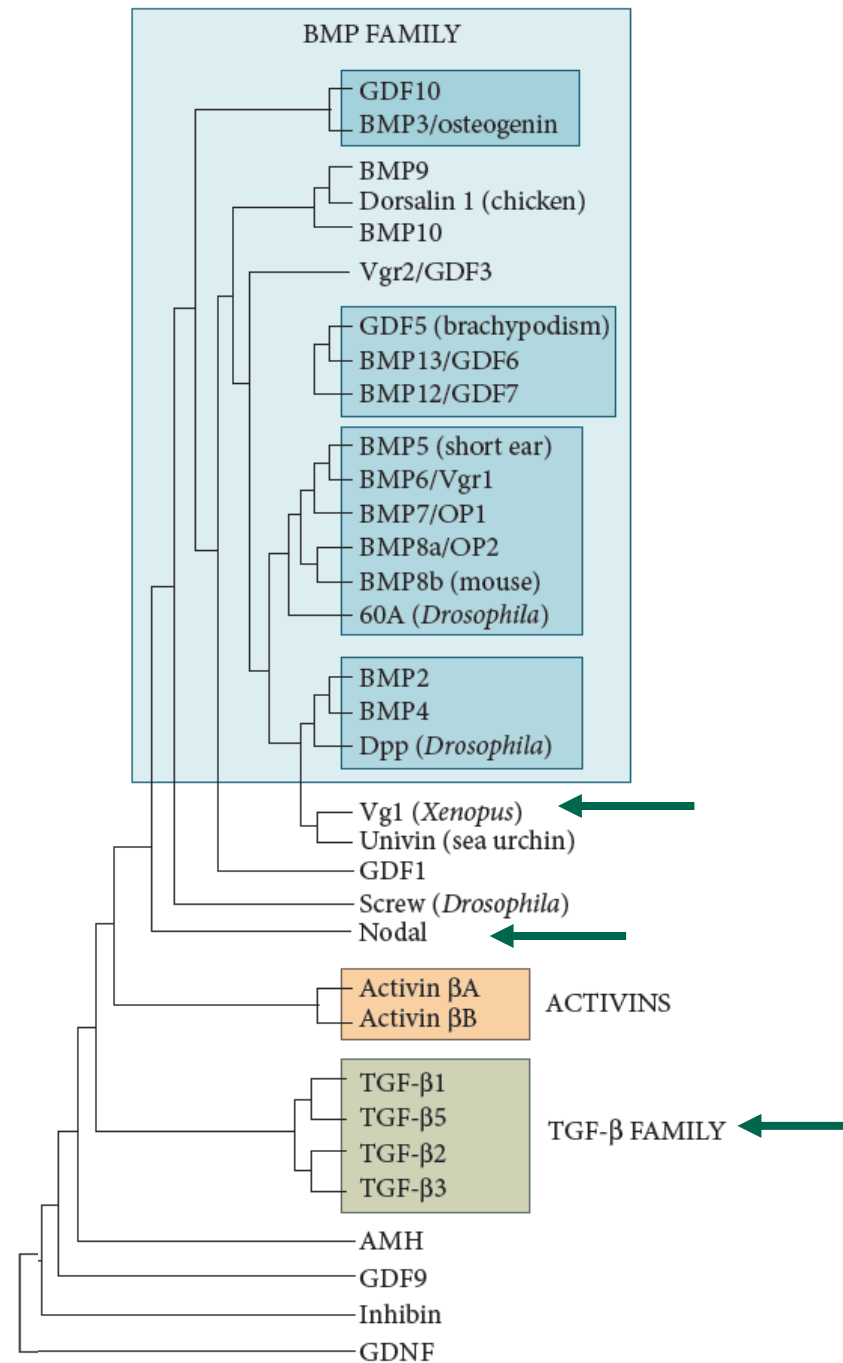
Απο το μονοπάτι wnt στις πρωτεΐνες του οργανωτή.

- Η **β -catenin** αρχικά απαντά σε ολόκληρο το έμβρυο (συντίθεται από μητρικό mRNA). Στη συνέχεια όμως εντοπίζεται στη ραχιαία περιοχή, γιατί στην κοιλιακή περιοχή απαντά ενεργή GSK3 η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση της β -catenin. Στη ραχιαία περιοχή η παρουσία του Dsh καταστέλλει την GSK3 σταθεροποιώντας έτσι τη β -catenin όπως και η παρουσία του wnt11. .

- Η **β -catenin** επάγει τη μεταγραφή γονιδίων (*siamois*, *twin*) τα προϊόντα των οποίων οδηγούν στην παραγωγή των πρωτεϊνών του οργανωτή.

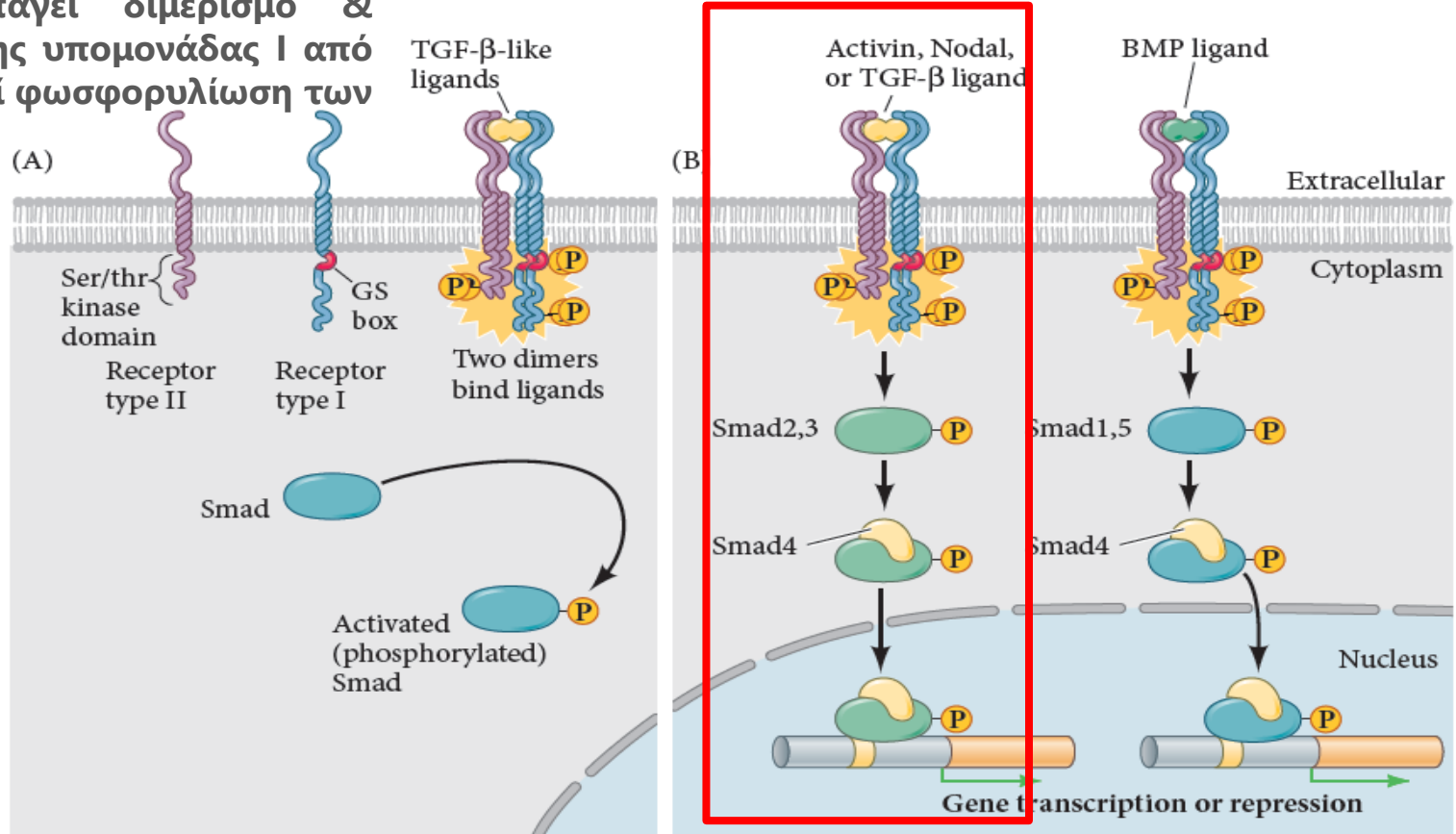
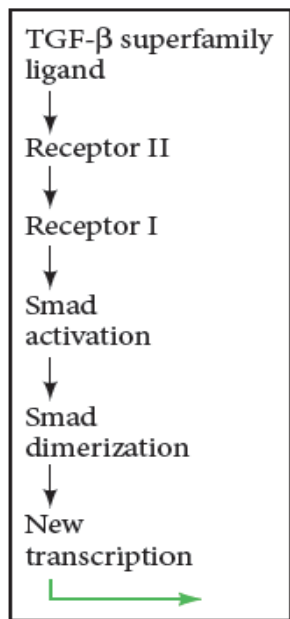


Υπεροικογένεια TGFβ

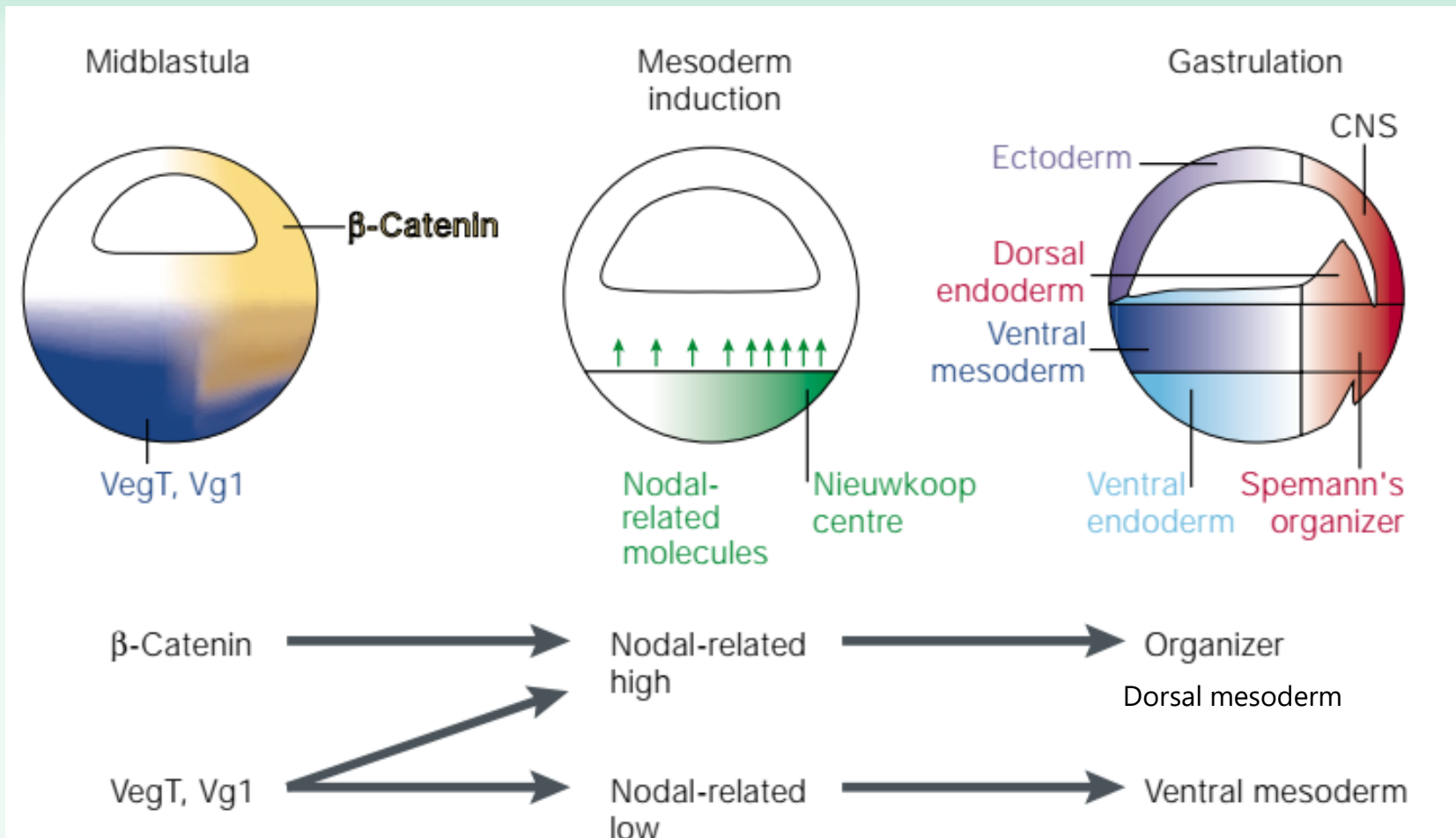


Υπεροικογένεια TGFβ (το δεύτερο σήμα)

Η πρόσδεση επάγει διμερισμό & φωσφορυλίωση της υπομονάδας I από τη II και ακολουθεί φωσφορυλίωση των SMAD

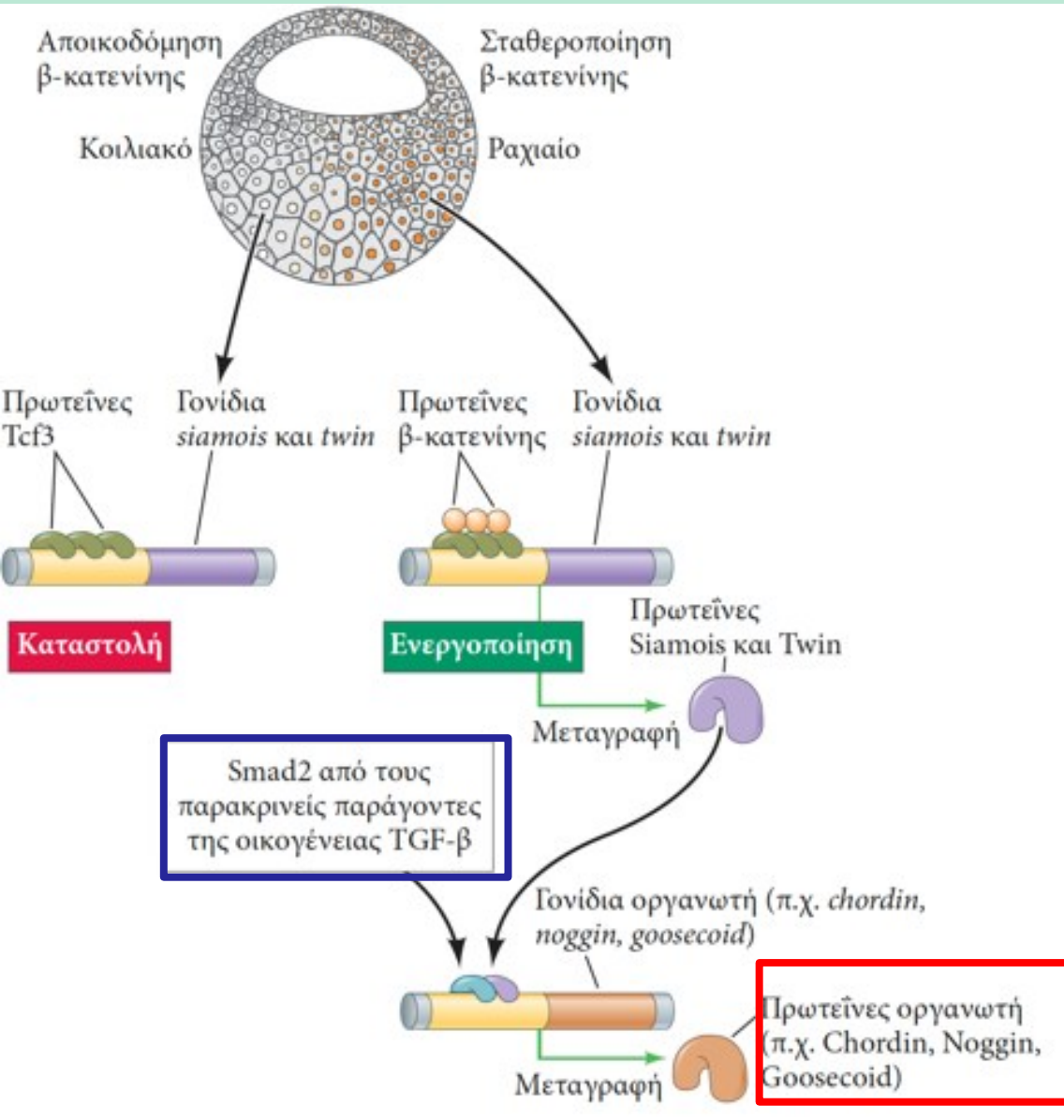


Σχηματισμός κέντρου Nieuwkoop και οργανωτή



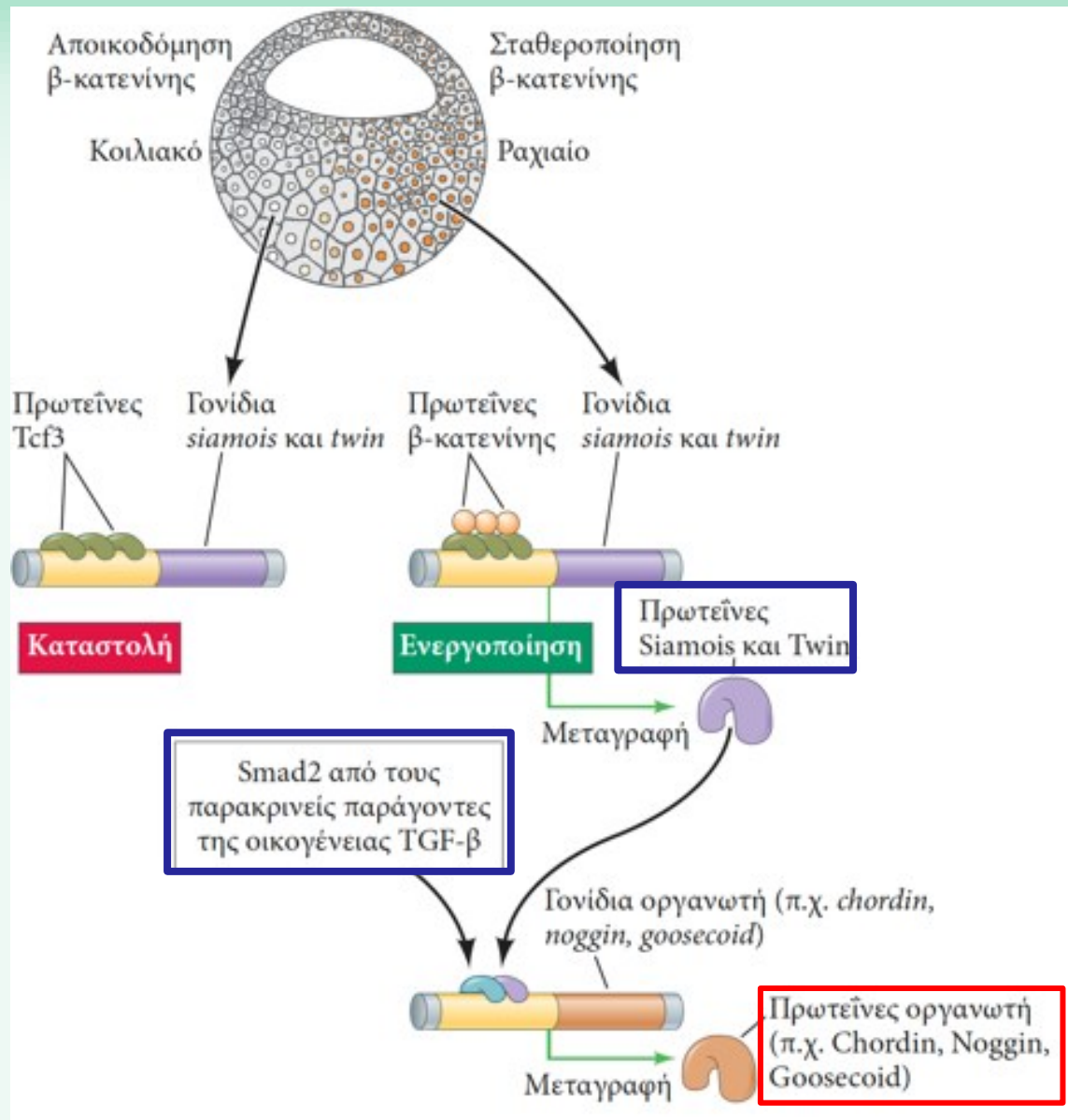
Nodal-related molecules (Xnr) = σηματοδοτικά μόρια του μονοπατιού Smad (βλέπε προηγούμενη διαφάνεια)

Υπεροικογένεια $TGF\beta$ – συμμετοχή στην παραγωγή πρωτεϊνών του οργανωτή



- Τα κύτταρα του φυτικού πόλου εκκρίνουν παράγοντες - μέλη της οικογένειας **$TGF\beta$** (π.χ. πρωτεΐνες Nodal, Vg1, activin κ.λπ.) το σήμα των οποίων ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα **Smad2**.
- Ο **Smad2** αλληλεπιδρά με τις Siamois και Twin.
- Αυτοί οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται για να ενεργοποιήσουν τα γονίδια του "οργανωτή", όπως τα **chordin, noggin** και **goosecoid**.

Σχηματισμός οργανωτή-Σύνοψη

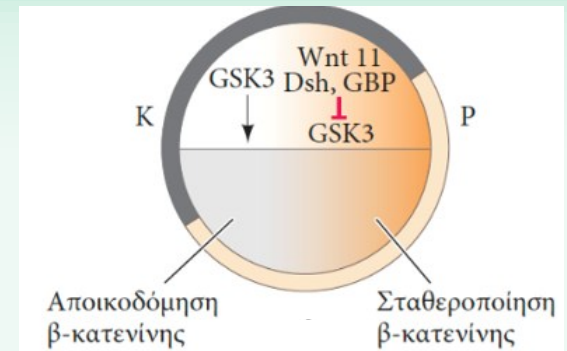


Σχηματισμός οργανωτή-Σύνοψη

1. Γονιμοποίηση - Περιστροφή κυτταροπλάσματος → Ραχιαία συσσώρευση β -catenin

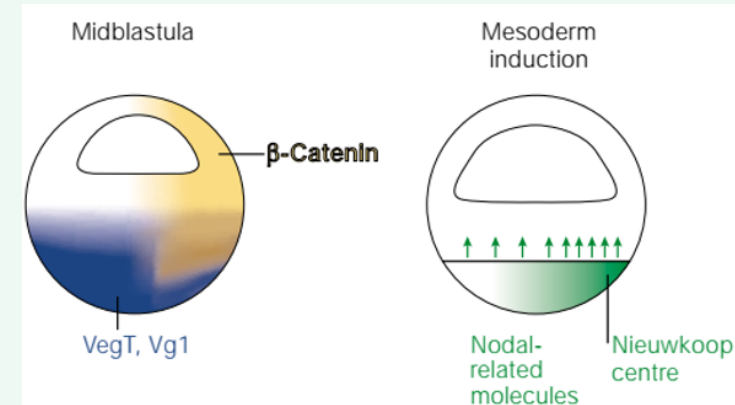
Μετά τη γονιμοποίηση, η μετατόπιση του φλοιού (cortical rotation) μεταφέρει **Wnt11** και **Dsh** στη μελλοντική ραχιαία πλευρά. (Μονοπάτι Wnt)

→ Σταθεροποίηση **β -catenin** ραχιαία και επαγωγή μεταγραφικών παραγόντων.



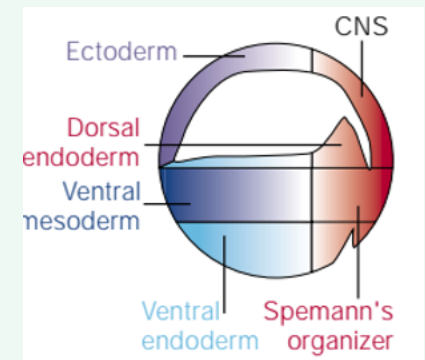
2. Απο τα κύτταρα του φυτικού πόλου εκκρίνονται παράγοντες - μέλη της οικογένειας TGF- β (π.χ. πρωτεΐνες Nodal, Vg1, activin κ.λπ.) το σήμα των οποίων ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Smad2. (Μονοπάτι Smad).

Η β -catenin βοηθά και στην παραγωγή των σημάτων τύπου Nodal. **Δημιουργία κέντρου Nieuwkoop.** (Στάδιο βλαστίδιου).

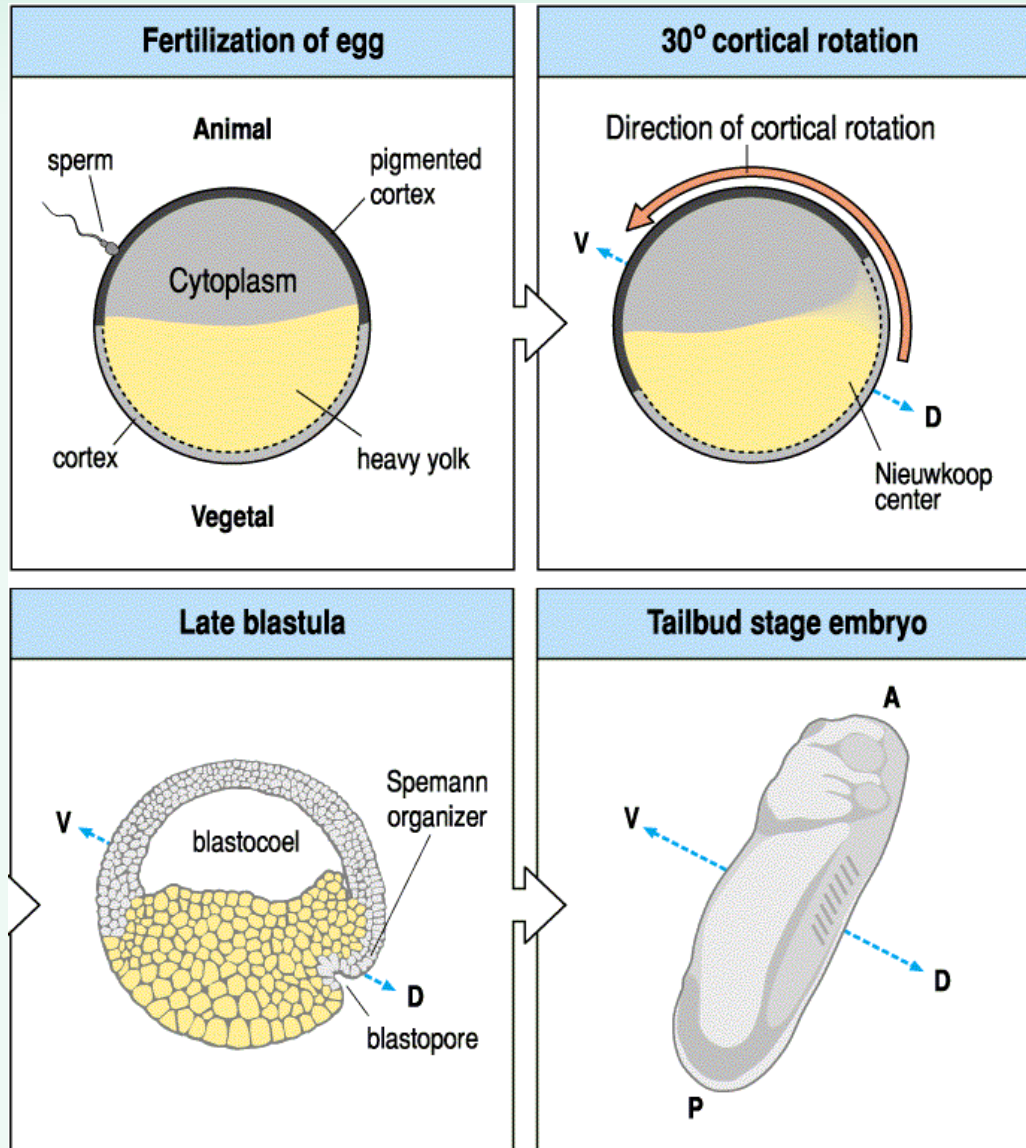


3. **Smad2** και μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την **β -catenin** (siamois και twin) συνεργάζονται για να ενεργοποιήσουν τα γονίδια του "οργανωτή", όπως τα chordin, noggin και goosecoid.

Δημιουργία οργανωτή (Αρχικό γαστρίδιο).



Ο οργανωτής και ο βλαστοπόρος σχηματίζονται πάνω από το κέντρο Nieuwkoop.



➤ **Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του;**

Απάντηση:

Μέσω επαγωγικών σημάτων που δέχεται από το Κέντρο Nieuwkoop, το οποίο βρίσκεται στη ραχιαία φυτική περιοχή του εμβρύου.

Συμμετέχουν τα μονοπάτια Wnt (β-catenin) και Smad (οικογένεια TGFβ).

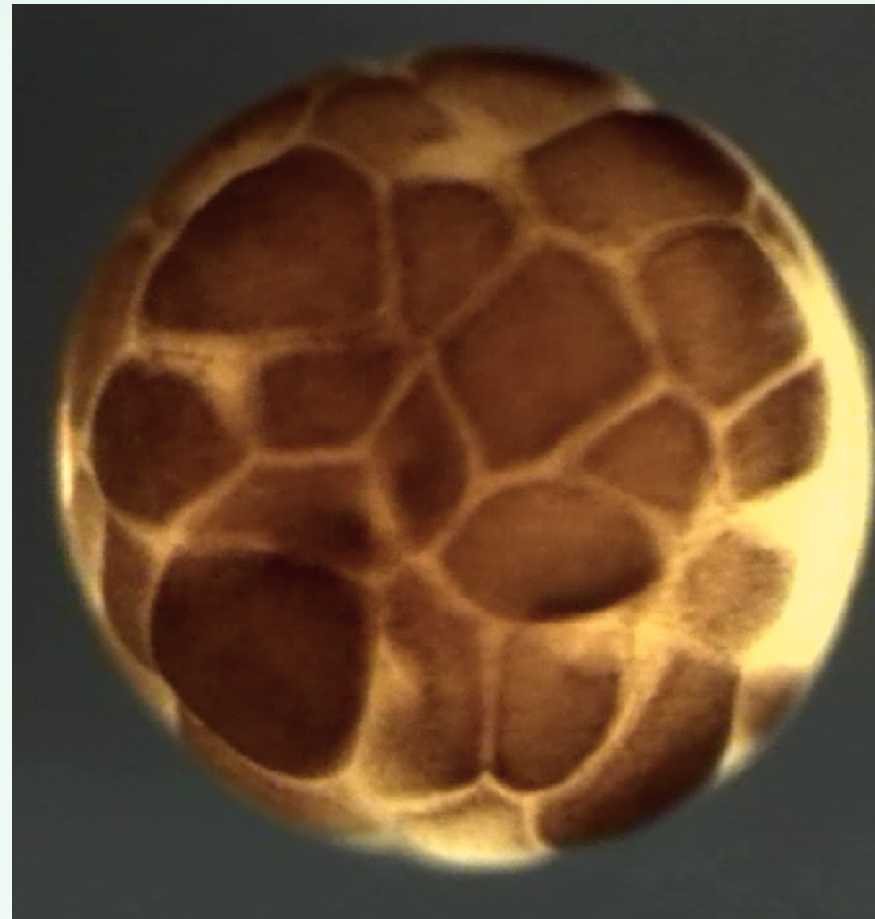
Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων

Εκφυτεύματα από έμβρυο σε πρώιμο στάδιο της αυλάκωσης:

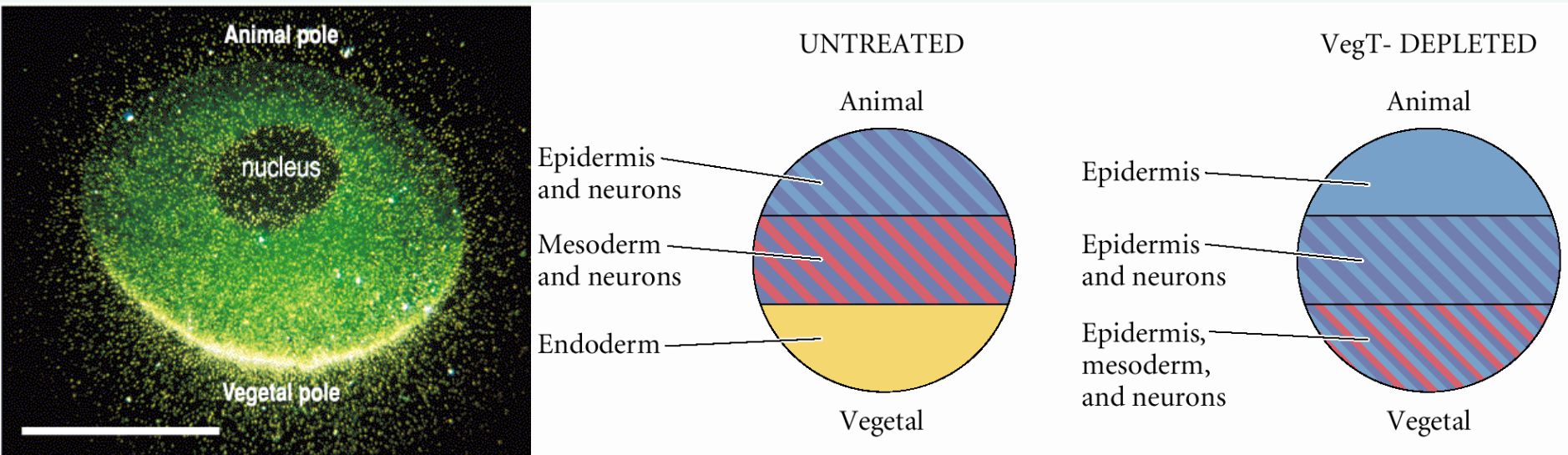
- Από ζωϊκό ημισφαίριο ➔ επιδερμίδα
- Από φυτικό ημισφαίριο ➔ παράγωγα ενδοδέρματος (VegT).

Επομένως εξώδερμα και ενδόδερμα εξειδικεύονται μέσω κυτταροπλασματικών καθοριστών.

Η εξειδίκευση του μεσοδέρματος γίνεται με επαγωγή.



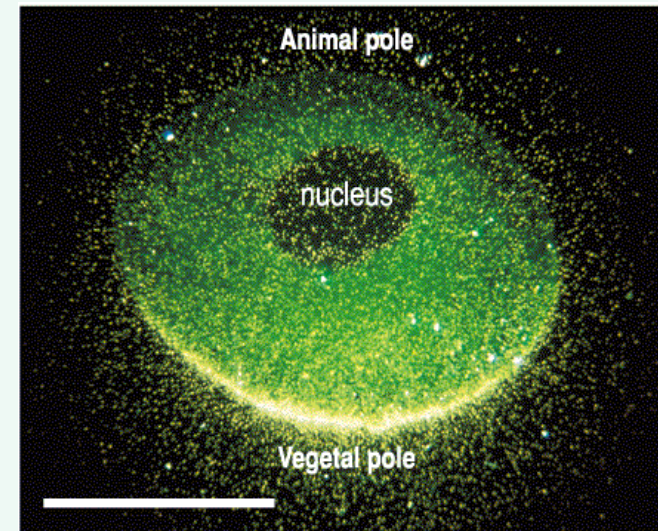
Τα μητρικά mRNAs του μεταγραφικού παράγοντα VegT, του μέλους της υπερικογένειας των παραγόντων TGF- β , Vg1, εντοπίζονται στο φυτικό πόλο του εμβρύου.



Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων (Ενδόδερμα)

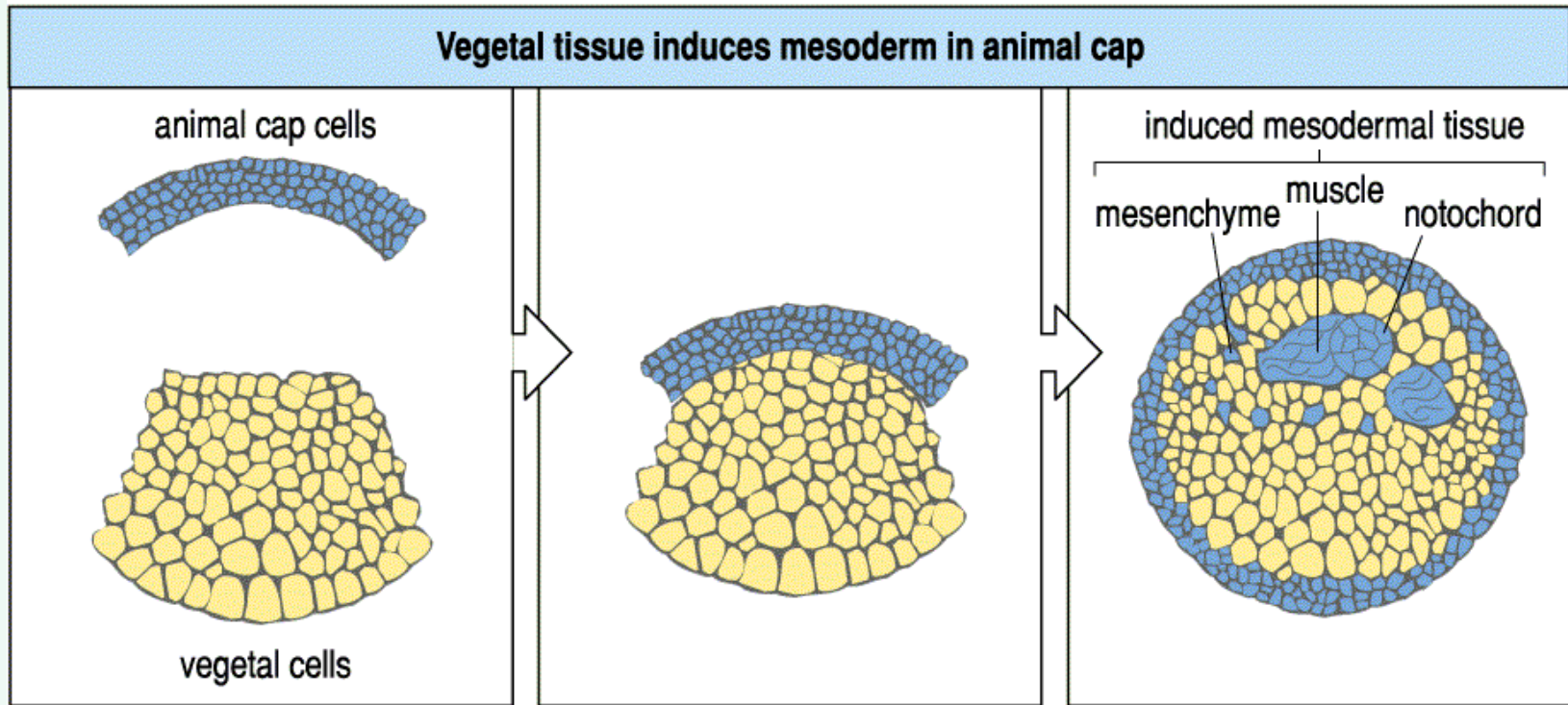
Το **VegT** είναι ο καθοριστής του ενδοδέρματος:

1. το mRNA του εντοπίζεται στο μελλοντικό ενδόδερμα.
2. Η ένεση του mRNA του VegT σε άλλη περιοχή του εμβρύου έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενδοδερμικών δεικτών.
3. Αδρανοποίηση στα ωκύτταρα= έμβρυα που στερούνται ενδοδέρματος.
4. Ο καθορισμός του ενδοδέρματος επιτυγχάνεται μέσω της δράσης μεταγραφικών παραγόντων που άμεσα ή έμμεσα επάγονται από τον VegT (mixer, sox17a, gata 4 κ.α).



Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων (Μεσόδερμα)

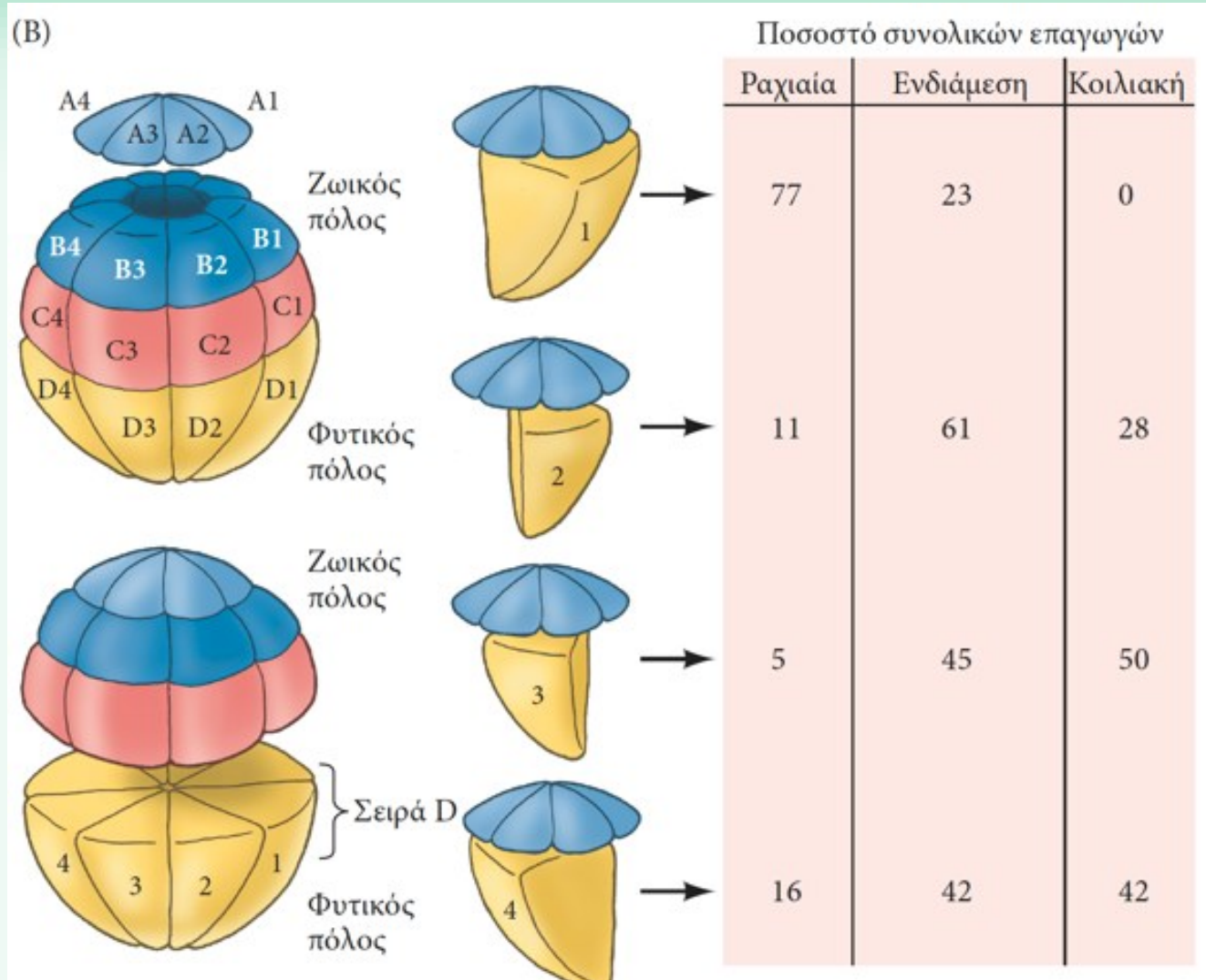
Τα ενδοδερμικά κύτταρα παράγουν ένα (ή παραπάνω) σήματα τα οποία επάγουν το σχηματισμό μεσοδερματικών κυττάρων από τα κύτταρα του ζωικού πόλου.



Animal cap assay: συγκαλλιέργεια ζωικού πόλου με τμήμα του φυτικού ημισφαιρίου για 3 ημέρες ➔ μεσόδερμα.

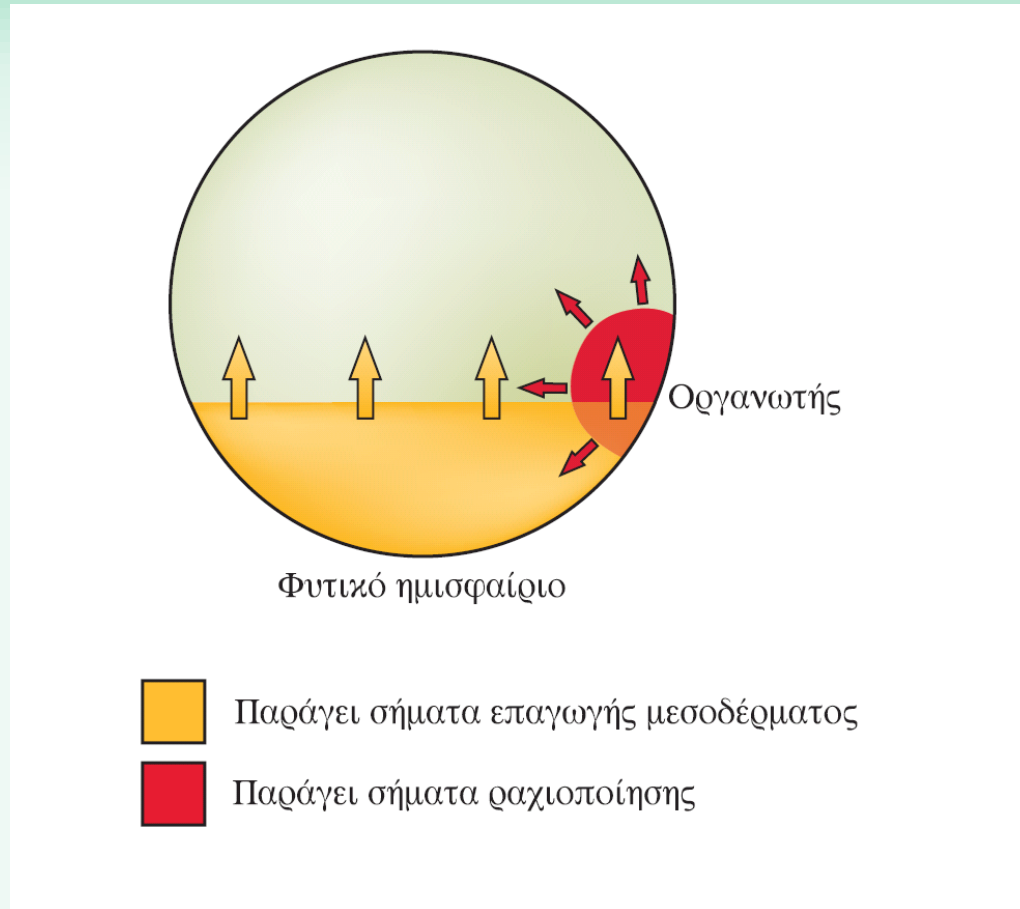
Πώς μπορούμε να αποδείξουμε ότι τα μεσοδερματικά κύτταρα προέρχονται από κύτταρα του ζωικού πόλου;

Σχηματισμός των τριών βλαστικών στιβάδων (Μεσόδερμα)



Πρώιμη αυλάκωση - τοπική εξειδίκευση. Ανάλογα με το φυτικό βλαστομερίδιο προκύπτει ραχιαίο ή κοιλιακό μεσόδερμα. Τα ραχιαία βλαστομερίδια του φυτικού ημισφαιρίου (1 και 2) δίνουν ραχιαίο μεσόδερμα!

Επαγωγή μεσοδέρματος



Στο πρώιμο έμβρυο απαντώνται δύο σηματοδοτικά κέντρα που δρουν στην επαγωγή του μεσοδέρματος.

1. Στο φυτικό ημισφαίριο παράγεται ένα σήμα που επάγει το μεσόδερμα (κίτρινα βέλη),
2. Ο οργανωτής παράγει ένα σήμα ραχιοποίησης (κόκκινα βέλη).

Ποιά μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

Τα μόρια που ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος είναι διαχυτές πρωτεΐνες.

Συνήθως ο έλεγχος περιλαμβάνει: δοκιμή του υποψήφιου μορίου σε animal caps ή ένεση του mRNA του στο ζωικό πόλο. Αυτές οι δοκιμασίες δεν συνιστούν απόδειξη - χρειάζονται επιπλέον κριτήρια.

Κριτήρια:

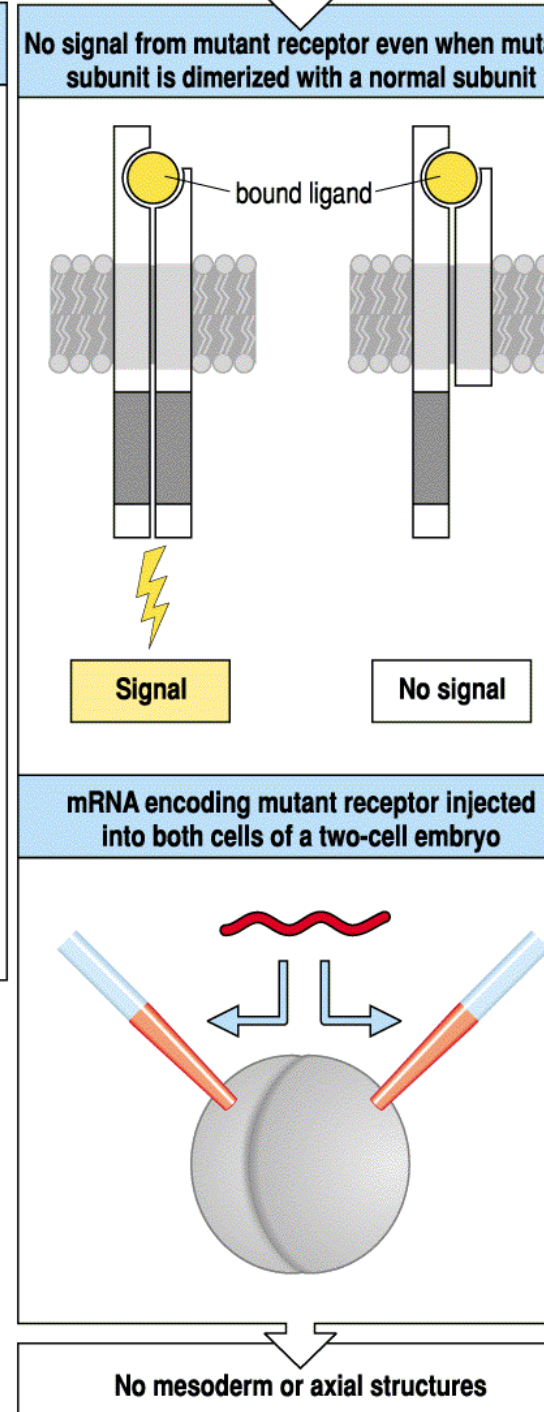
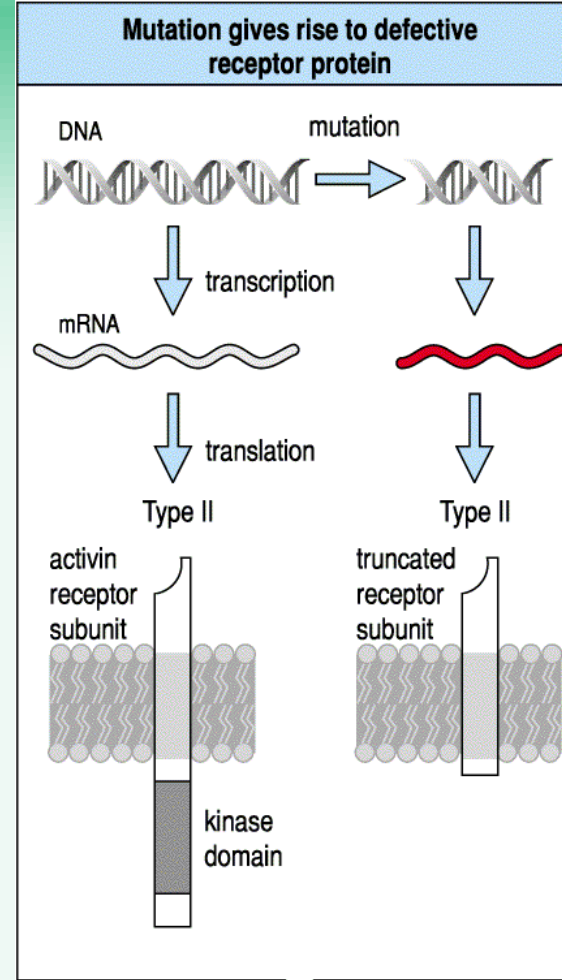
- Παρουσία της πρωτεΐνης στο κατάλληλο στάδιο.
- Παρουσία της πρωτεΐνης στον κατάλληλο ιστό.
- Απόκριση των κυττάρων του ιστού-δέκτη.
- Αναίρεση της απόκρισης από παράγοντες που αναστέλλουν το υποψήφιο σήμα.

Πώς επάγεται το μεσόδερμα;

TGF- β υπεροικογένεια

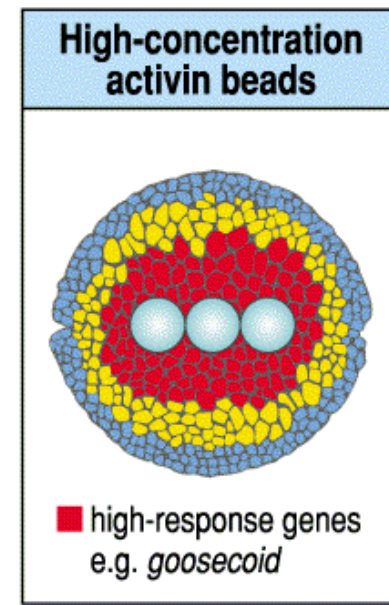
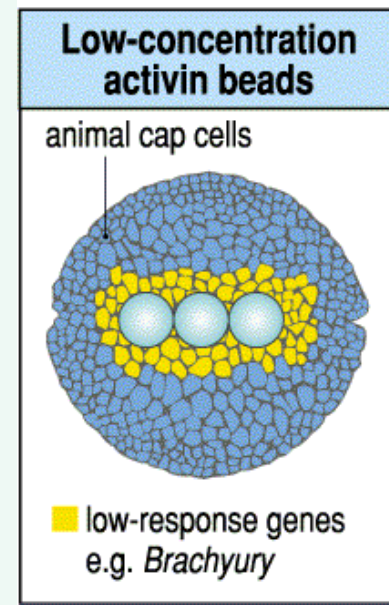
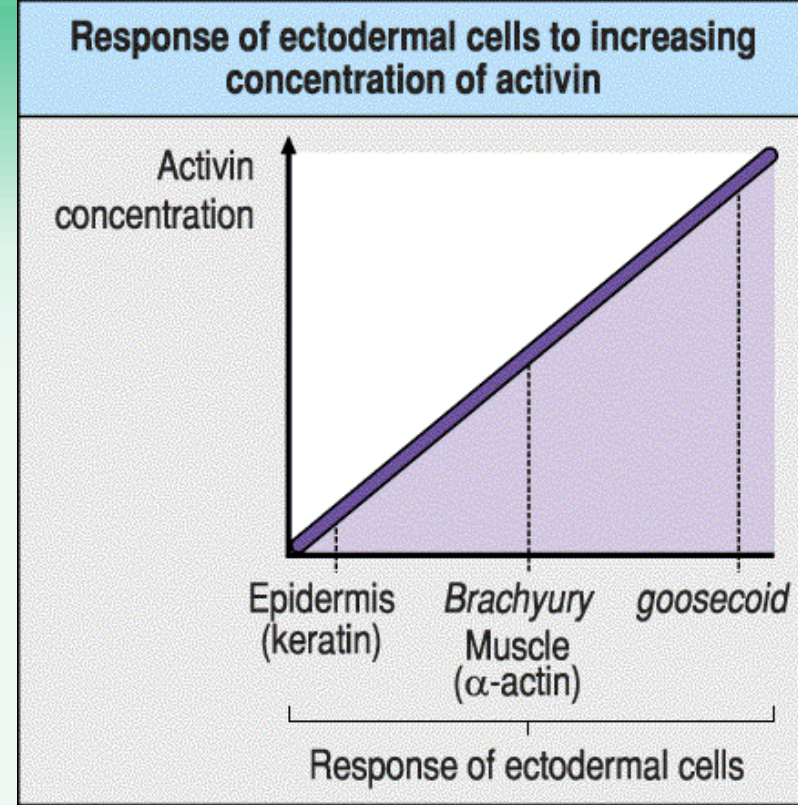
Έκφραση κυρίαρχων αρνητικών μεταλλάξεων των υποδοχέων της οικογένειας του TGF- β αναστέλλει την επαγωγή του μεσοδέρματος.

Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η υπερέκφραση αναστολέων του μονοπατιού.



Ποια μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

Η ακτιβίνη είναι το πρώτο διαχυτό μόριο που διαπιστώθηκε ότι μπορεί να επάγει το μεσόδερμα-μορφογόνο.



Ποια μόρια ενέχονται στην επαγωγή του μεσοδέρματος;

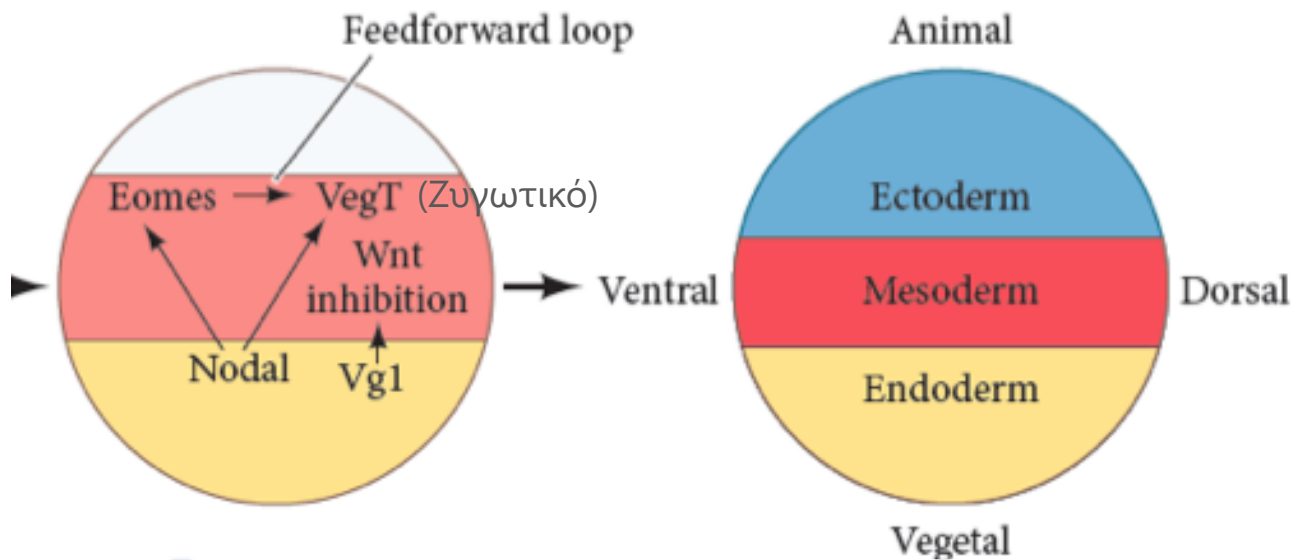
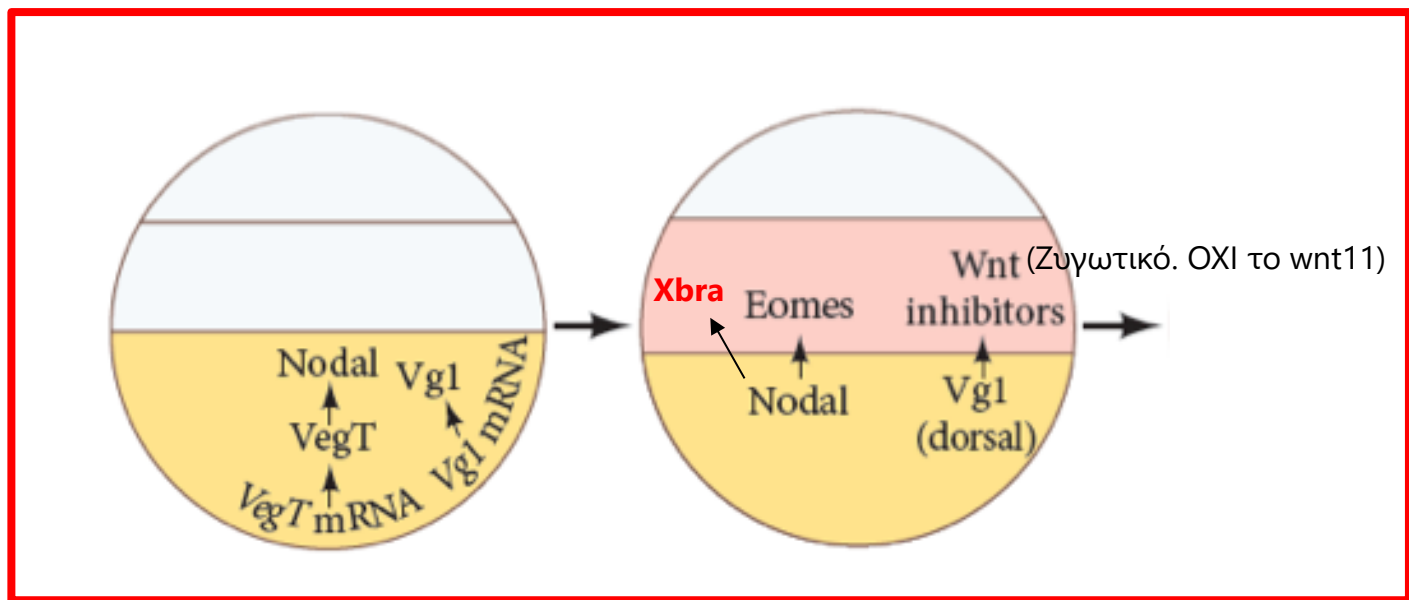
Μόρια της οικογένειας του TGF- β (της ομάδας nodal) που εκκρίνονται από τα κύτταρα του φυτικού ημισφαίριου:

- Vg1 (μητρικό mRNA)
- Derrière
- Xnrs (Nodal related genes)

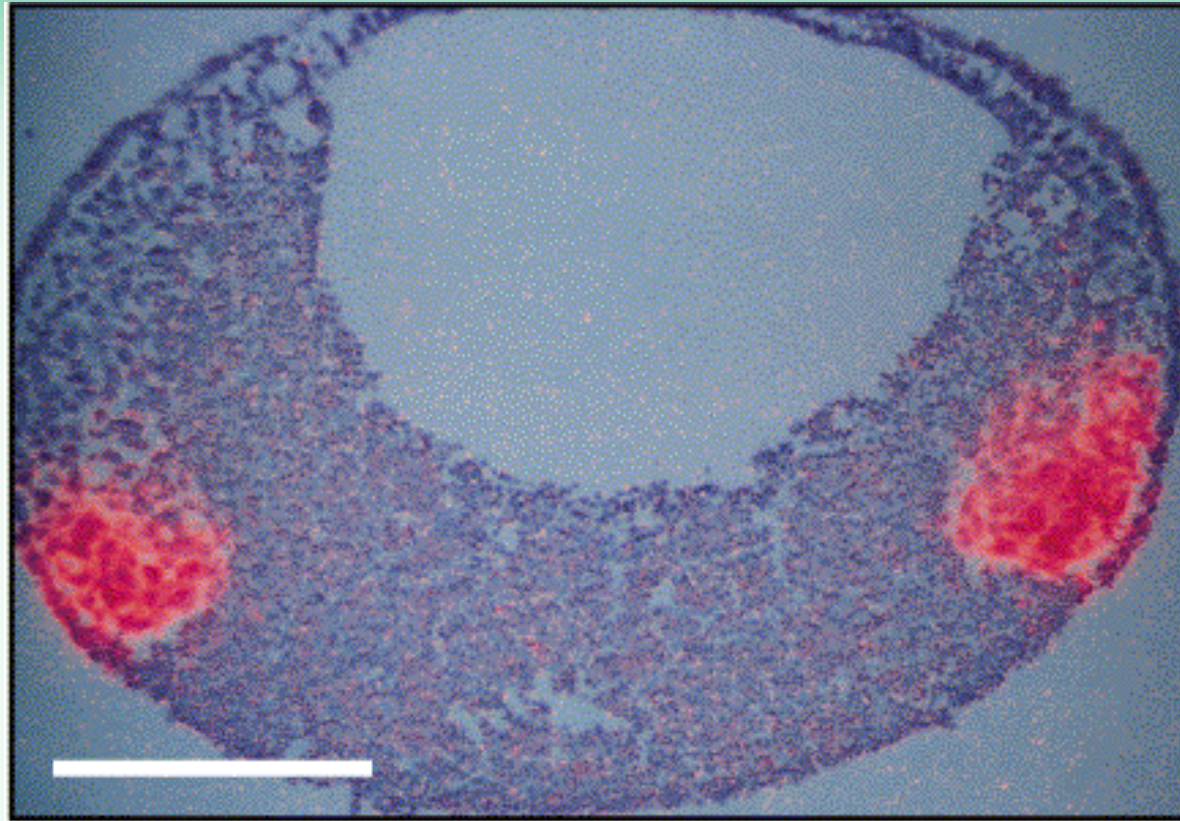
Τα μόρια αυτά εκφράζονται στο φυτικό ημισφαίριο (ορισμένα και στον οργανωτή) και η έκφρασή τους επάγεται από το VegT είτε άμεσα είτε έμμεσα.

Η σηματοδότηση μέσω αυτών οδηγεί στην επαγωγή μεσοδερμικών γονιδίων όπως το *brachyury*.

Επαγωγή μεσοδέρματος

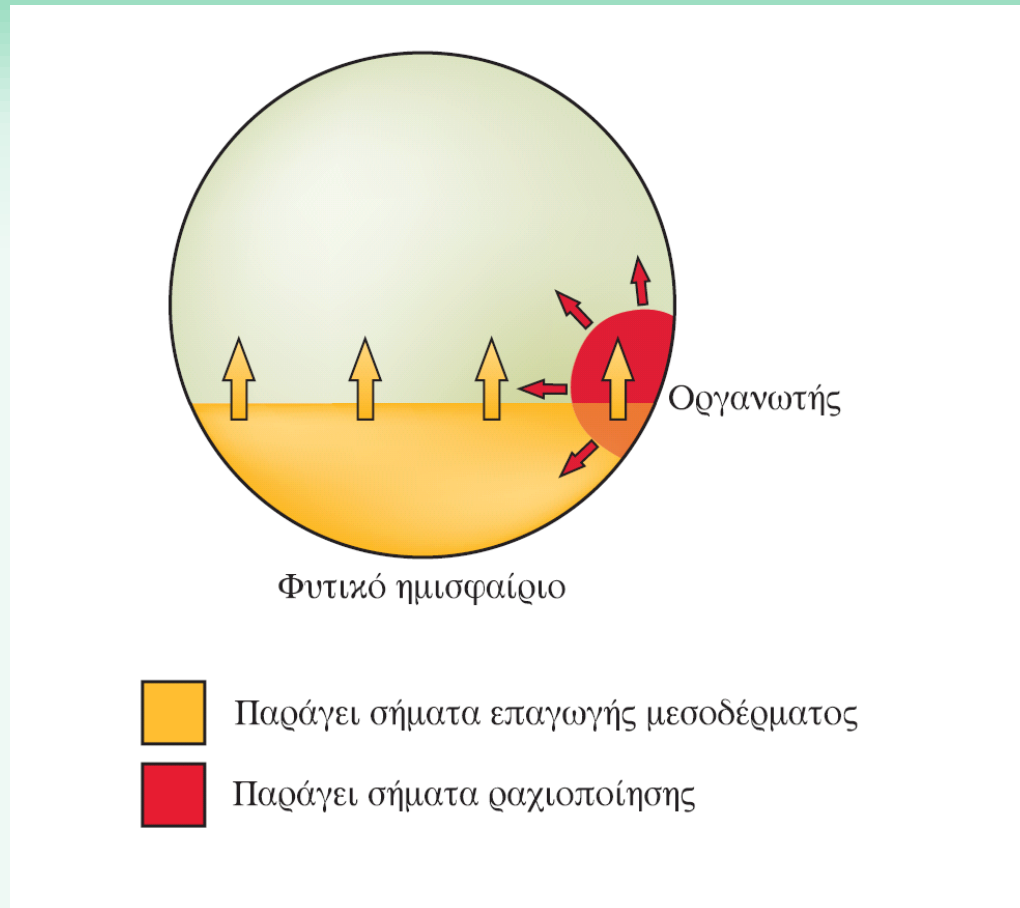


Το γονίδιο *Xbra* (*Brachyury*)



- Αρχικά εκφράζεται στο μελλοντικό μεσόδερμα, μετά περιορίζεται στο οπίσθιο μεσόδερμα και τη νωτοχορδή.
- Η έκφρασή του επάγεται κατά την επεξεργασία των animal caps με μέλη της οικογένειας TGF-β.
- Παρεμπόδιση της έκφρασης του *Xbra* αναστέλλει τη γαστριδίωση μάλλον επειδή η *Xbra* ενεργοποιεί το *Xwnt-11*.

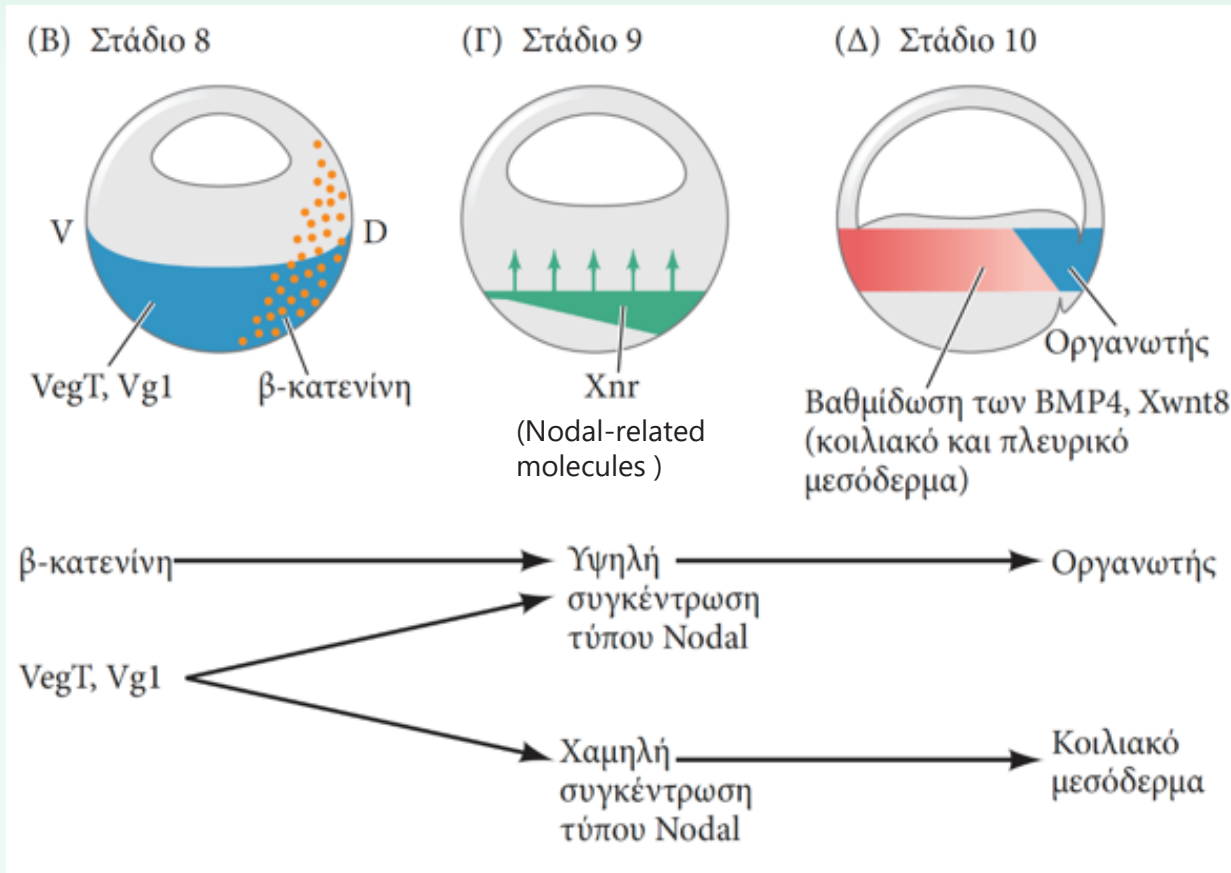
Επαγωγή μεσοδέρματος



Στο πρώιμο έμβρυο απαντώνται δύο σηματοδοτικά κέντρα που δρουν στην επαγωγή του μεσοδέρματος.

1. Στο φυτικό ημισφαίριο παράγεται ένα σήμα που επάγει το μεσόδερμα (κίτρινα βέλη) - nodal,
2. Ο οργανωτής παράγει ένα σήμα ραχιοποίησης (κόκκινα βέλη) – δηλαδή παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εξειδίκευση και την οργάνωση του μεσοδέρματος κατά μήκος των αξόνων.

Μοντέλο για επαγωγή μεσοδέρματος και σχηματισμό οργανωτή



Model for mesoderm induction and organizer formation by the interaction of β -catenin and TGF- β proteins. (B) At late blastula stages, Vg1 and VegT are found in the vegetal hemisphere; β -catenin is located in the dorsal region. (C) β -Catenin acts synergistically with Vg1 and VegT to activate **the *Xenopus* nodal-related (Xnr) genes**. This creates a gradient of Xnr proteins across the endoderm, highest in the dorsal region. (D) The mesoderm is specified by the Xnr gradient. Mesodermal regions with little or no Xnr have high levels of BMP4 and Xwnt8; they become ventral mesoderm. Those having intermediate concentrations of Xnr become lateral mesoderm. Where there is a high concentration of Xnr, goosecoid and other dorsal mesodermal genes are activated and the mesodermal tissue becomes the organizer. (Gilbert 11th ed D. Melton; B–D after Agius et al. 2000.)

Το μεσόδερμα καθορίζεται από τη διαβάθμιση Xnr.

Ο οργανωτής καθορίζεται από τη συνύπαρξη Xnr και β -catenin.

➤ Με ποιο τρόπο αποκτά ο οργανωτής τις ιδιότητές του;

➤ **Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του; Ποιοι παράγοντες εκκρίνονται από τον οργανωτή ώστε να οδηγήσουν στον σχηματισμό των αξόνων αλλά και της νευρικής πλάκας;**

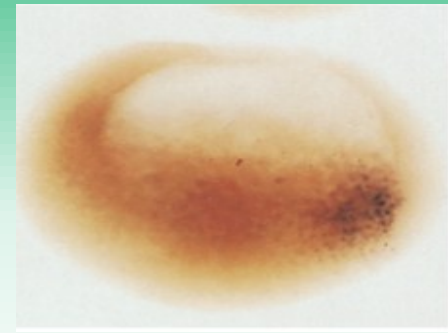
Το μεσόδερμα παράγει παράγοντες που ευθύνονται για την εξειδίκευσή του

Η επαγωγή του μεσοδέρματος ακολουθείται από το σχηματισμό προτύπου κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα.

Ο **οργανωτής** εκφράζει πρωτεΐνες που ευθύνονται για την εξειδίκευση του ραχιαίου μεσοδέρματος και δρουν παρεμποδίζοντας ένα σήμα από το κοιλιακό μεσόδερμα.

- **noggin**
- **chordin**
- Frizbee
- Dicckopf

Το γονίδιο *noggin*



Κλωνοποιήθηκε με βάση την ικανότητά του να σώζει έμβρυα που έχουν ακτινοβοληθεί με UV.

- Επάγει ραχιαία τύχη σε μεσοδερμικά κύτταρα που διαφορετικά θα παρέμεναν κοιλιακά.
- Αλληλεπιδρά με τον **BMP2** και τον **BMP4** και παρεμποδίζει την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους.
- Επάγει το σχηματισμό του νευρικού ιστού.



Πειράματα διάσωσης εμβρύων που έχουν ακτινοβοληθεί με UV. Πάνω : μάρτυρας. Η ποσότητα που ενίεται (mRNA) αυξάνεται από πάνω προς τα κάτω.

Το γονίδιο *chordin*



(A) ISH, τέλος αυλάκωσης



(B) ISH, πρώιμη γαστριδίωση

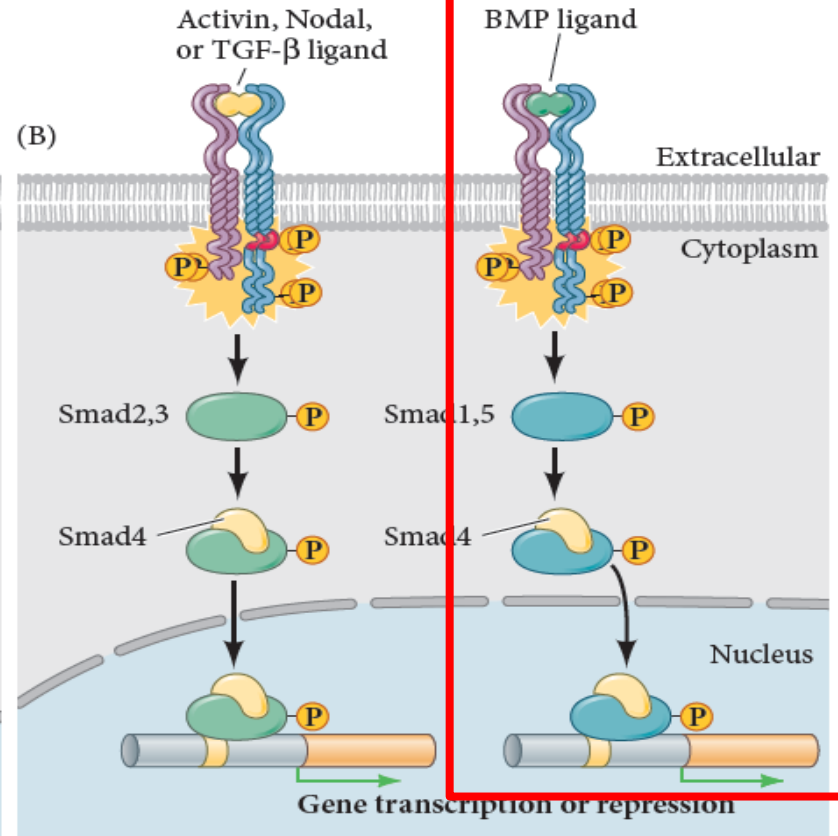
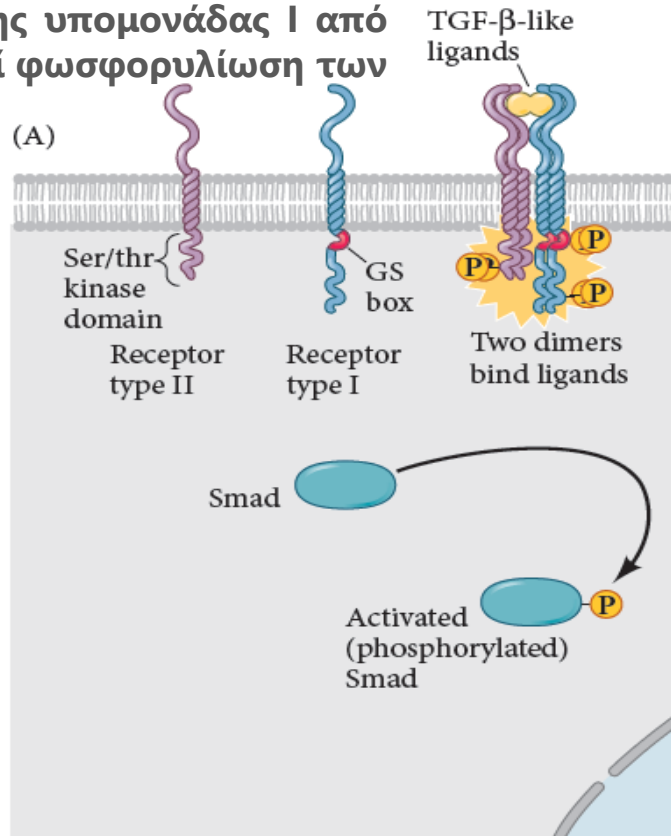
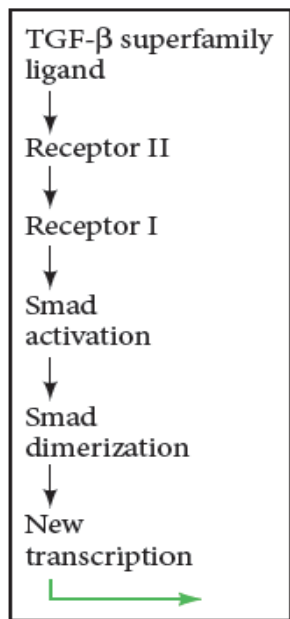


(C) ISH, όψιμη γαστριδίωση

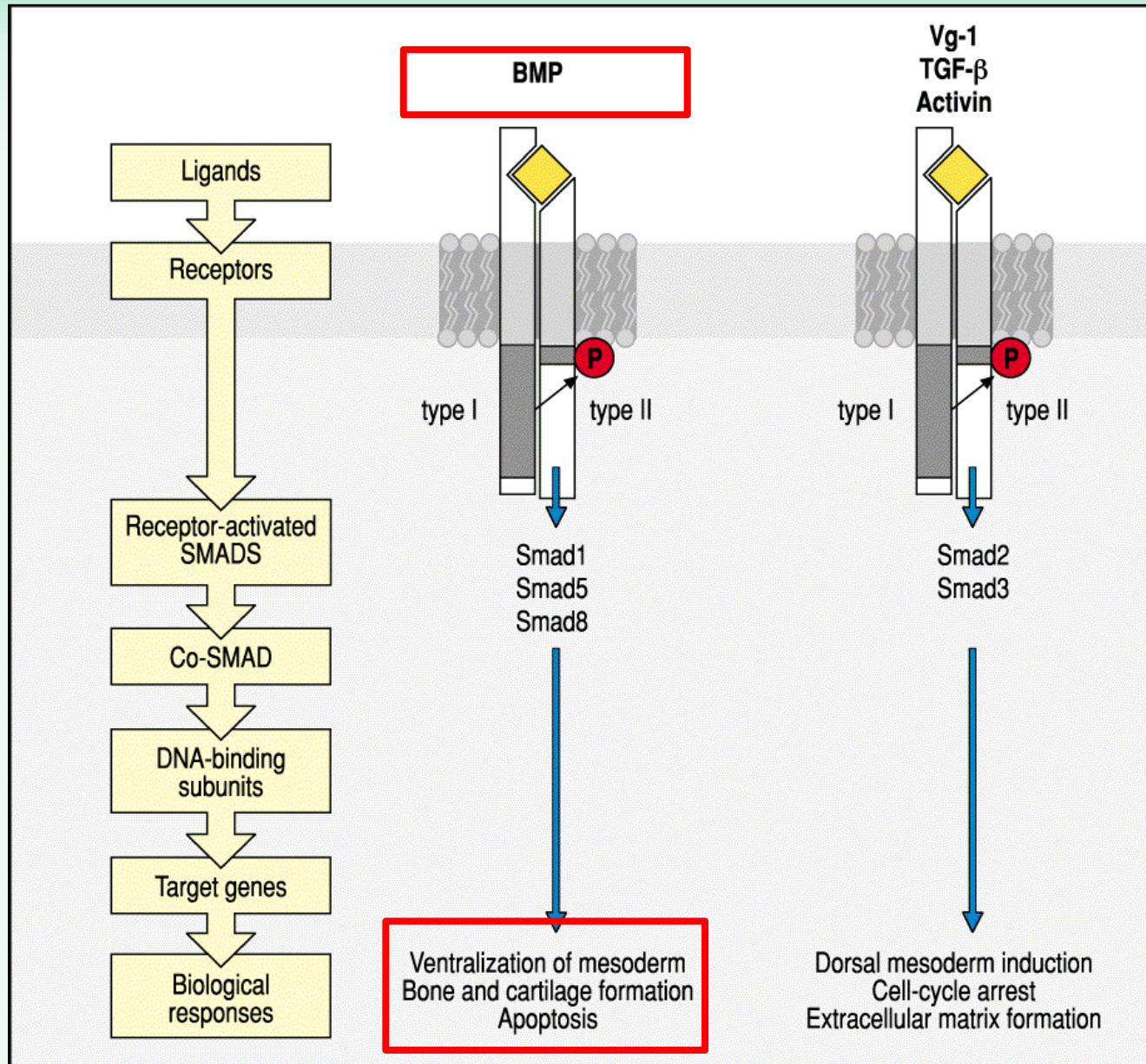
- Κλωνοποιήθηκε από subtraction library (έμβρυα στα οποία απουσιάζουν κοιλιακές δομές/έμβρυα από τα οποία απουσιάζουν οι ραχιαίες δομές). Οι κλώνοι που προέκυψαν δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό δεύτερου άξονα.
- Αλληλεπιδρά με τον **BMP2** και τον **BMP4** και παρεμποδίζει την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους.
- Επάγει το σχηματισμό του Νευρικού Συστήματος.

Υπεροικογένεια TGFβ (BMP ligands)

Η πρόσδεση επάγει διμερισμό & φωσφορυλίωση της υπομονάδας I από τη II και ακολουθεί φωσφορυλίωση των SMAD



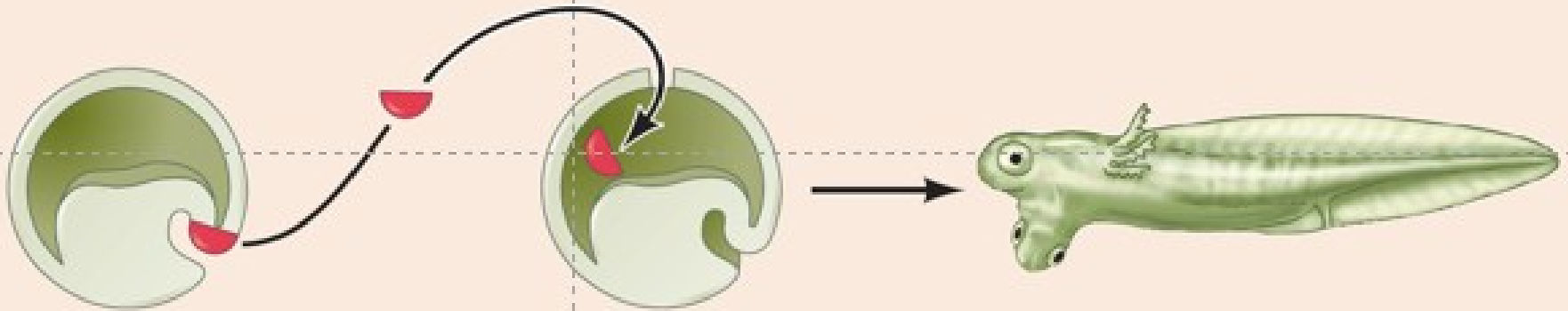
Το μονοπάτι της οικογένειας παραγόντων TGF- β



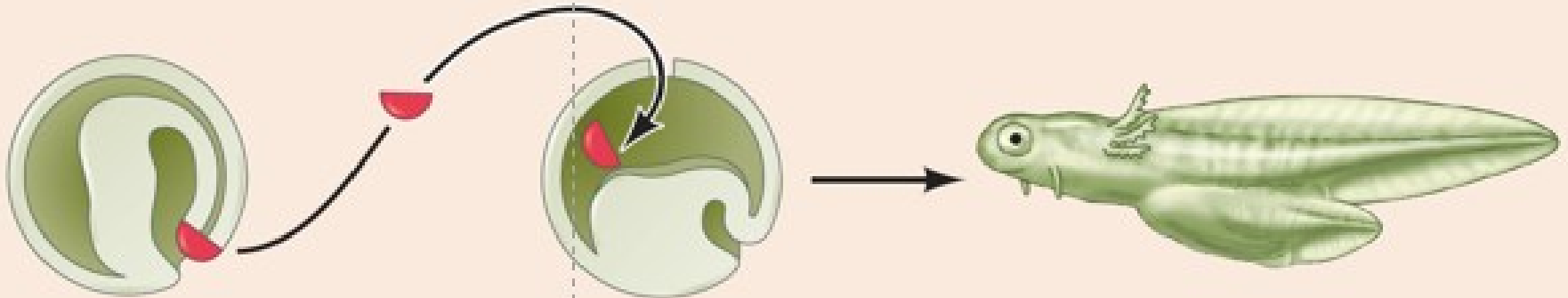
Τοπική και χρονική εξειδίκευση της επαγωγής (ΕΟ άξονας)

ΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ

(Ε) Μεταμόσχευση ραχιαίου χείλους από νεαρό γαστρίδιο



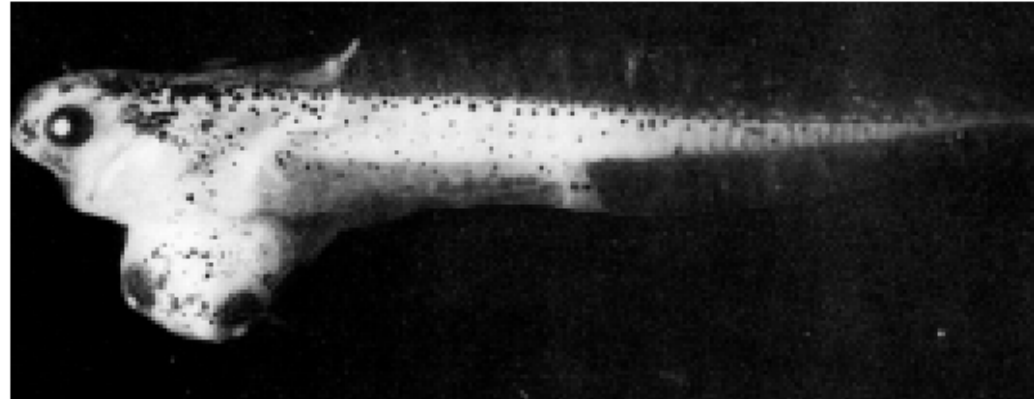
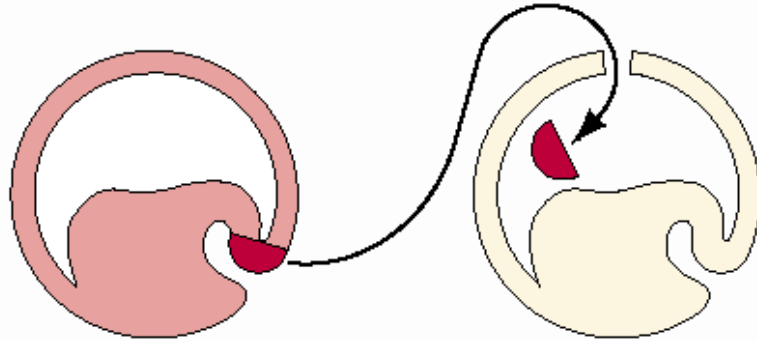
(ΣΤ) Μεταμόσχευση ραχιαίου χείλους από προχωρημένο γαστρίδιο



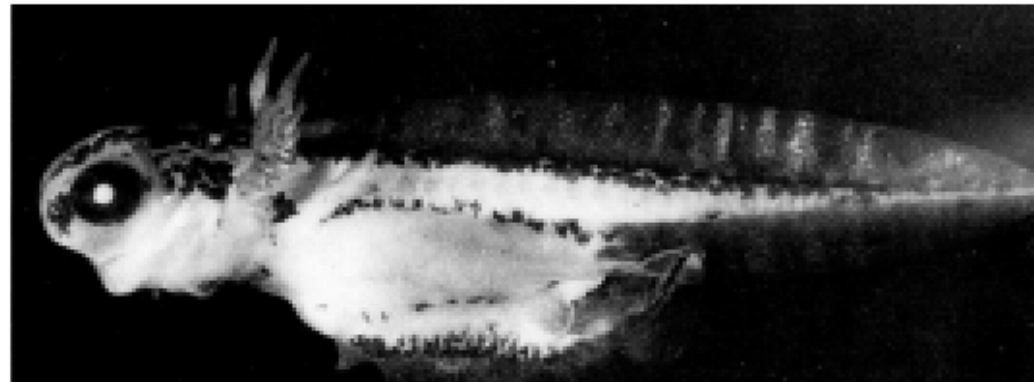
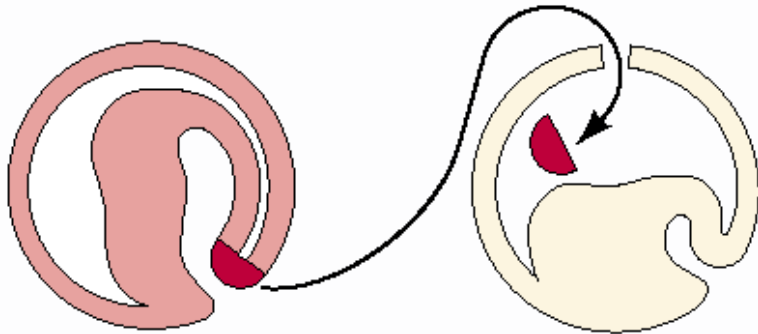
Καθώς προχωράει η γαστριδίωση το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου επάγει δομές με ολοένα και πιο οπίσθιο χαρακτήρα.

Τοπική και χρονική εξειδίκευση της επαγωγής (ΕΟ άξονας)

(A) Transplantation of young gastrula dorsal lip



(B) Transplantation of advanced gastrula dorsal lip



Καθώς προχωράει η γαστριδίωση το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου επάγει δομές με ολοένα και πιο οπίσθιο χαρακτήρα.

Το μεσόδερμα παράγει παράγοντες που ευθύνονται για την εξειδίκευσή του

Η επαγωγή του μεσοδέρματος ακολουθείται από το σχηματισμό προτύπου κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα.

Ο **οργανωτής** εκφράζει πρωτεΐνες που ευθύνονται για την εξειδίκευση του ραχιαίου μεσοδέρματος και δρουν παρεμποδίζοντας ένα σήμα από το κοιλιακό μεσόδερμα.

- noggin
- chordin
- **Frizbee**
- **Dicckopf**

Επειδή τα μονοπάτια BMP και Wnt ενέχονται και στον καθορισμό του εμπροσθοπίσθιου άξονα...

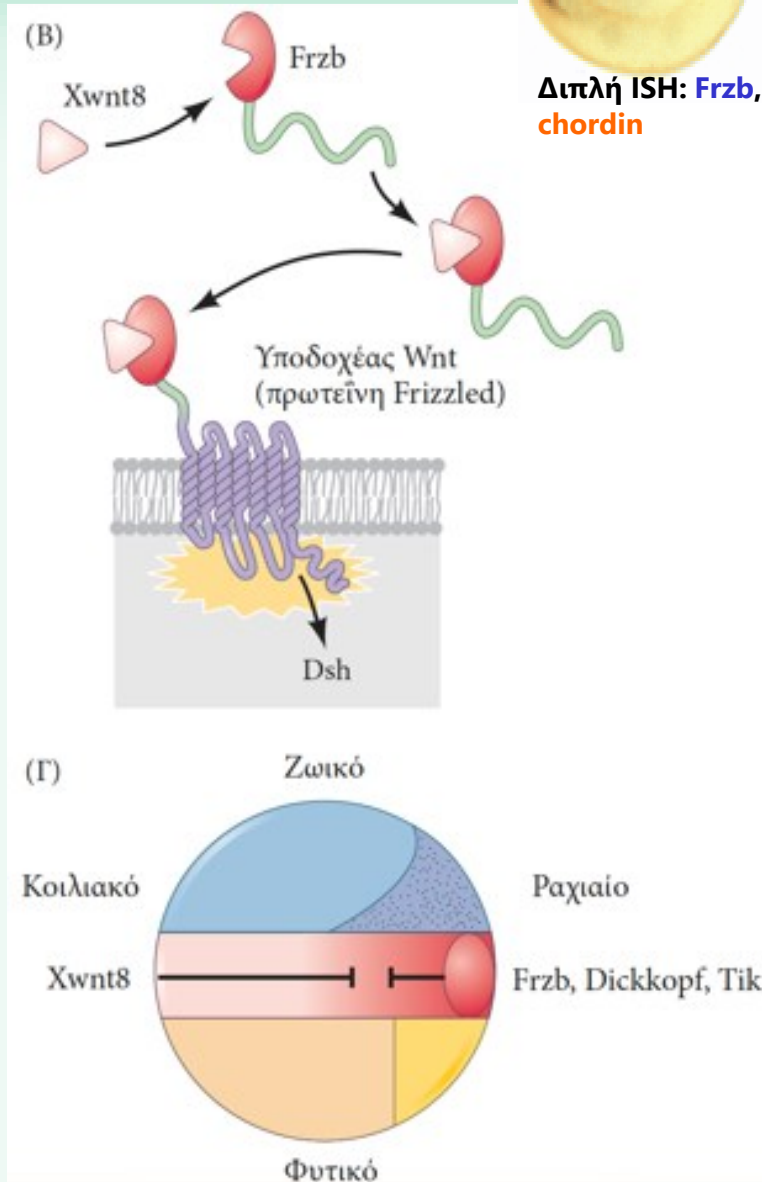
- Cerberus
- Goosecoid
- Αλλά και **Frizbee, Dicckopf**

Τα γονίδια *Frzb* και *Dickkopf*

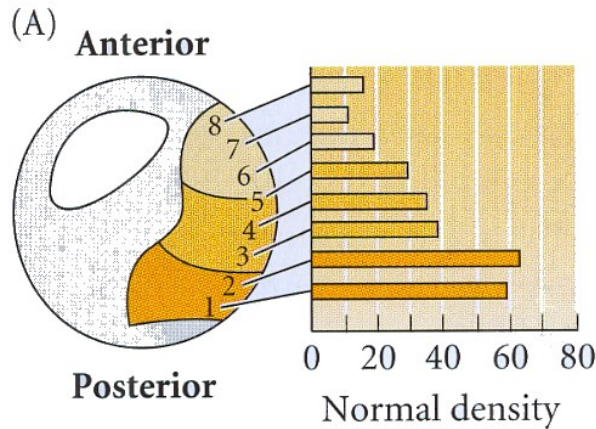


- Παράγονται από το ενδομεσόδερμα κατά την αναδίπλωση του και αναστέλλουν το μονοπάτι Wnt που είναι υπεύθυνο για να δώσει οπίσθια και κοιλιακή μοίρα στα κύτταρα (Xwnt8 - ζυγωτικό).
- Η **Frzb** είναι μικρή διαλυτή πρωτεΐνη που ομοιάζει στην περιοχή πρόσδεσης του Frizzled.
- Η **Dickkopf** αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του Wnt.
- Υπερέκφραση **Frzb** → έμβρυα στερούνται κοιλιακών οπίσθιων δομών και γίνονται «όλα κεφάλια».
- Ένεση αντισωμάτων έναντι του **Dickkopf** → έμβρυα που στερούνται τμήματα εγκεφάλου

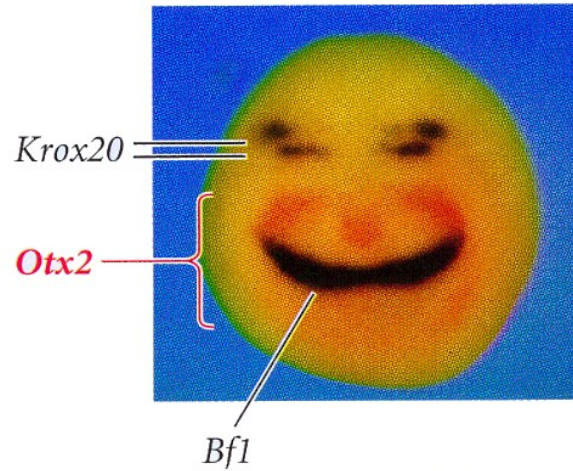
Παρεμποδίζουν τη σηματοδότηση μέσω Wnt (Xwnt8) ώστε να σχηματιστούν εμπρόσθιες δομές (κεφαλή).



Το μονοπάτι Wnt και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



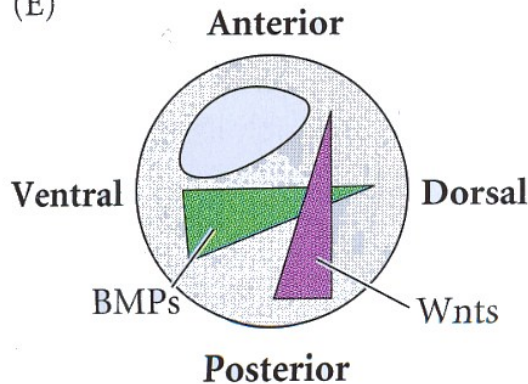
(B) Control



(C) *Xwnt8* (υπερέκφραση)



(E)



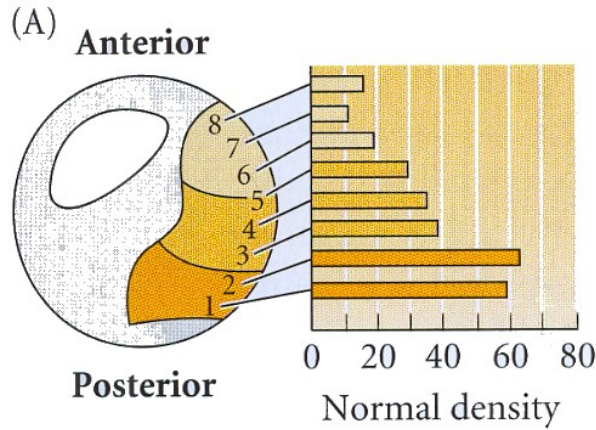
(D) *Xfrzb1* (υπερέκφραση)



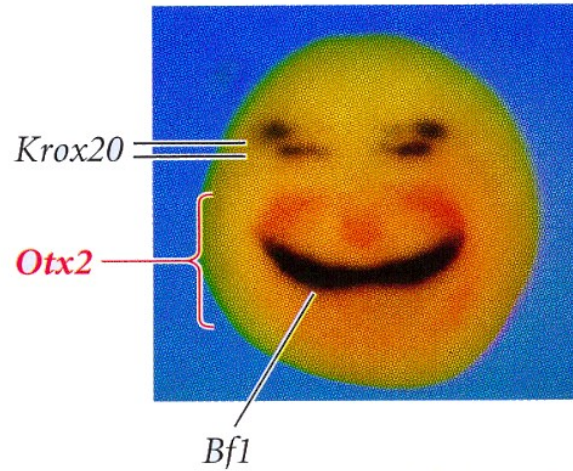
Bf1: προσεγκέφαλος
Otx2: προσεγκέφαλος
Krox20: ρομβεγκέφαλος (οπίσθιος)

- Κλίση της β -catenin κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα (A).
- Μεταβάλλοντας την σηματοδότηση μέσω Wnt (ένεση *Xwnt-8* ή *Xfrzb*) μεταβάλλεται ο χαρακτήρας των περιοχών που επάγονται. (C,D)

Το μονοπάτι Wnt και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



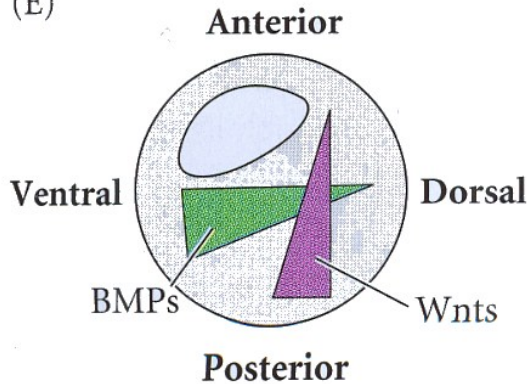
(B) Control



(C) *Xwnt8* (υπερέκφραση)



(E)



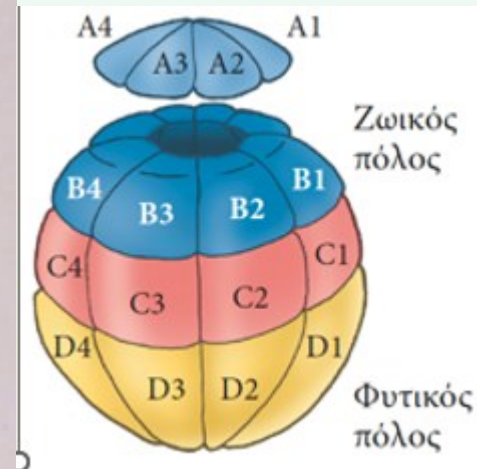
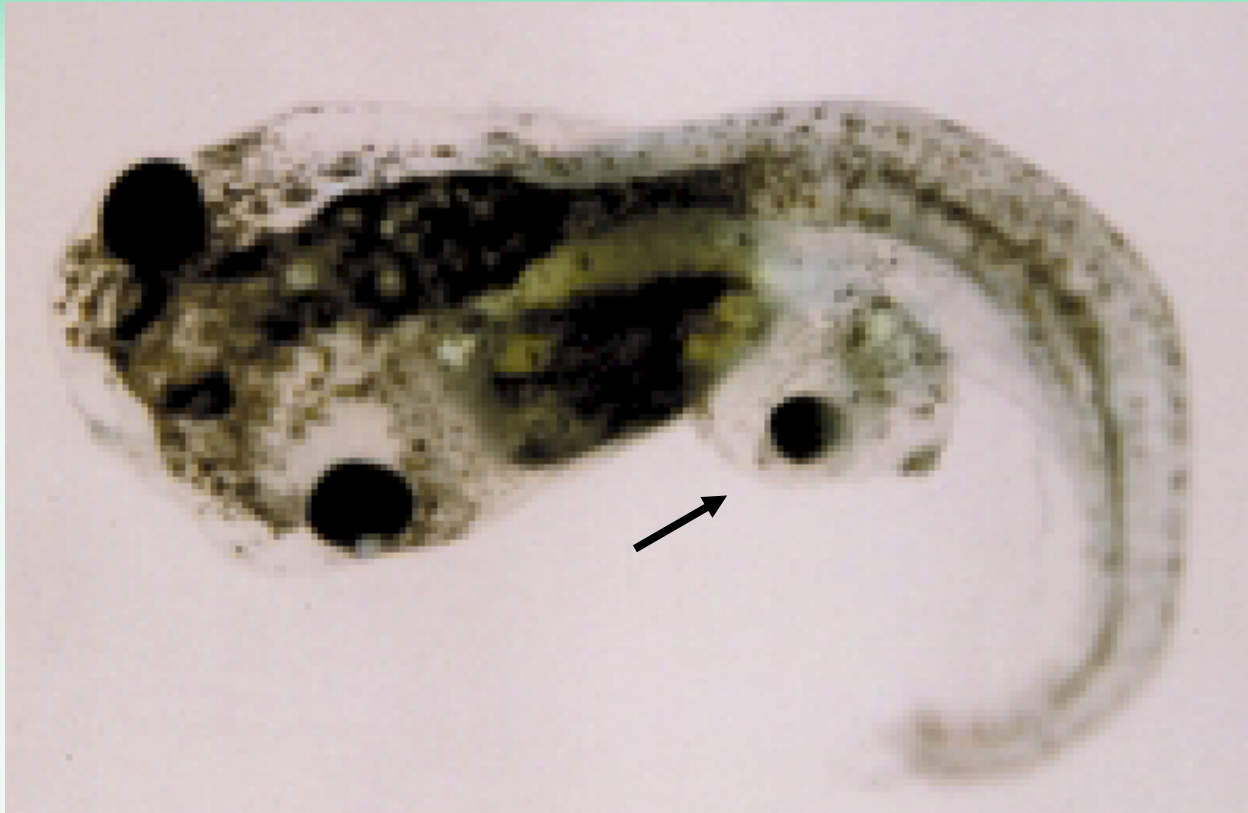
(D) *Xfrzb1* (υπερέκφραση)



Bf1: προσεγκέφαλος
Otx2: προσεγκέφαλος
Krox20: ρομβεγκέφαλος (οπίσθιος)

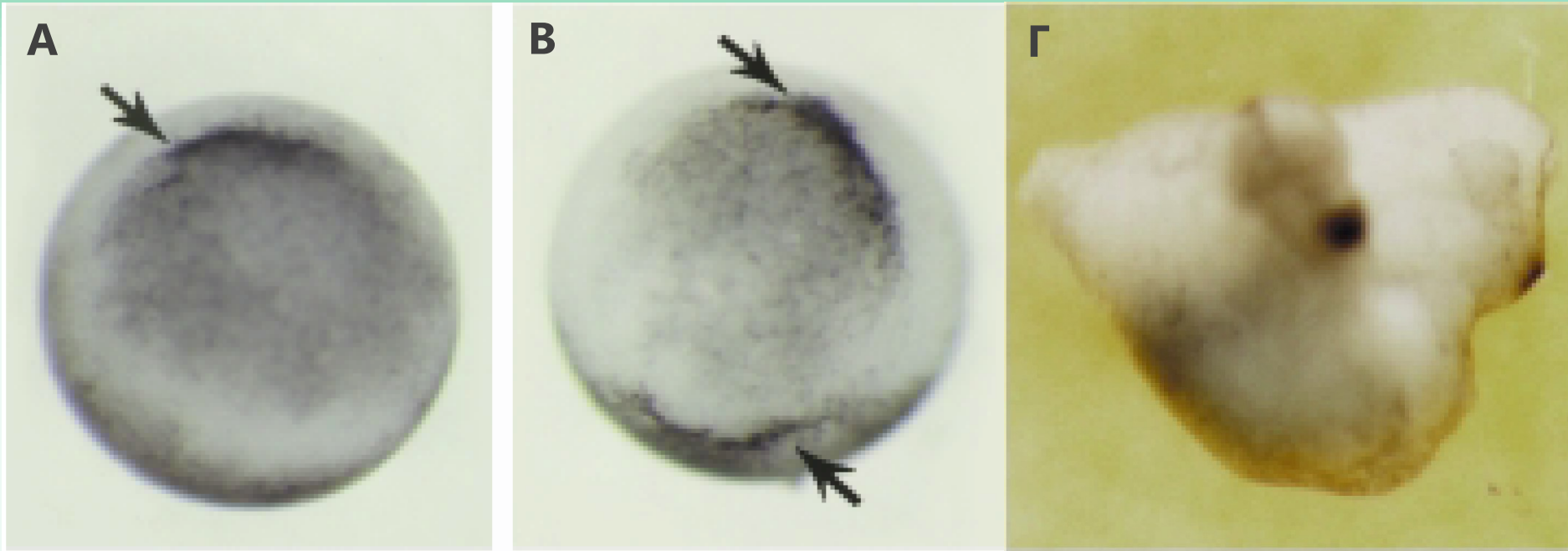
- Ενίσχυση μονοπατιού wnt – ενίσχυση οπίσθιου χαρακτήρα (C).
- Υπερέκφραση *frzb1* – καταστολή του wnt - ενίσχυση εμπρόσθιου χαρακτήρα (D).

Το γονίδιο *Cerberus*



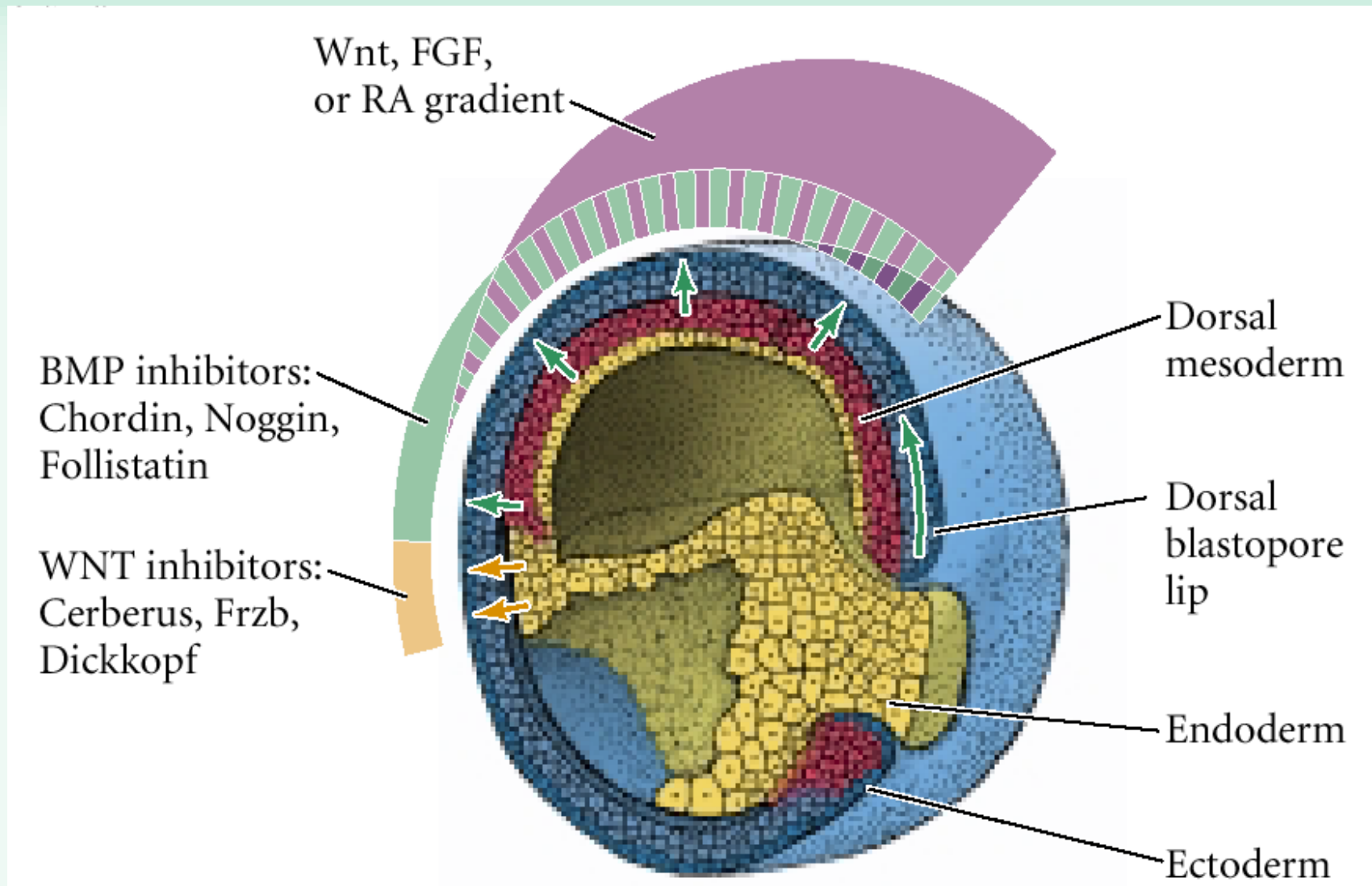
- Η *Cerberus* είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που προσδένεται στους παράγοντες BMP, *Xnrs*, *Xwnt-8* παρεμποδίζοντας τη δράση τους (Πολυαναστολέας).
- Επάγει το σχηματισμό ακραία εμπρόσθιων δομών.
- Ένεση στο D4 mRNA του *Cerberus* οδηγεί σε εκτοπο σχηματισμό της κεφαλής (πάνω). Στο σχηματισμό του έκτοπου κεφαλιού συμμετέχουν απόγονοι του βλαστομερίδιου που ενίεται αλλά και άλλα κύτταρα.

Το γονίδιο *goosecoid*

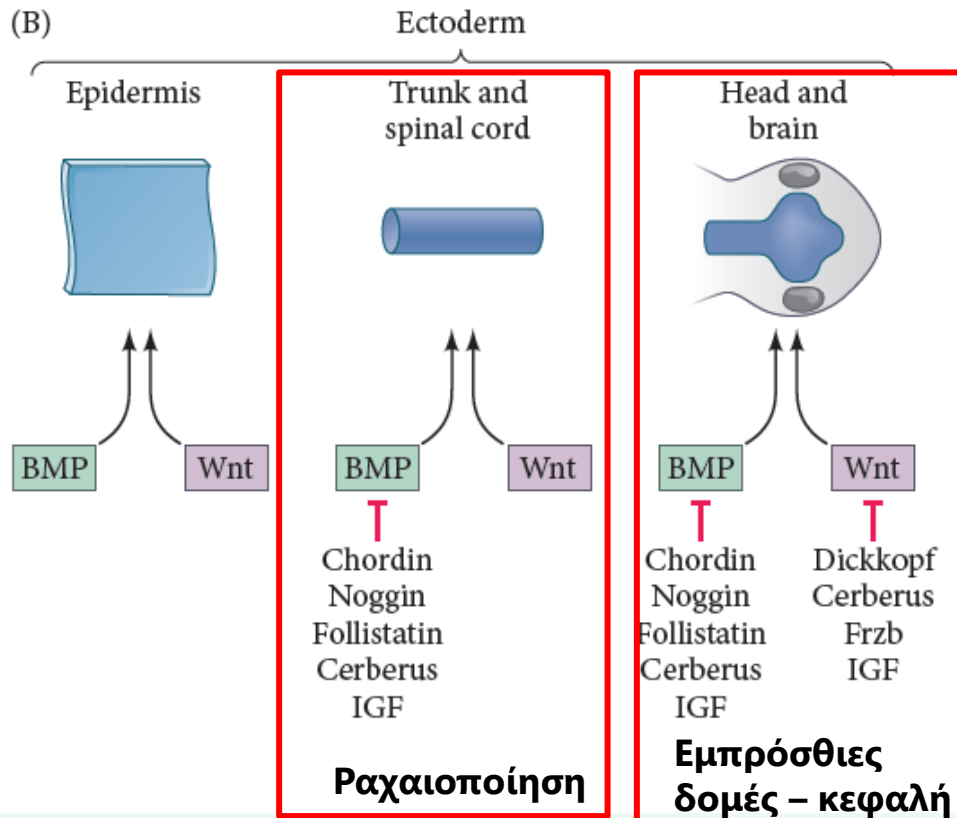
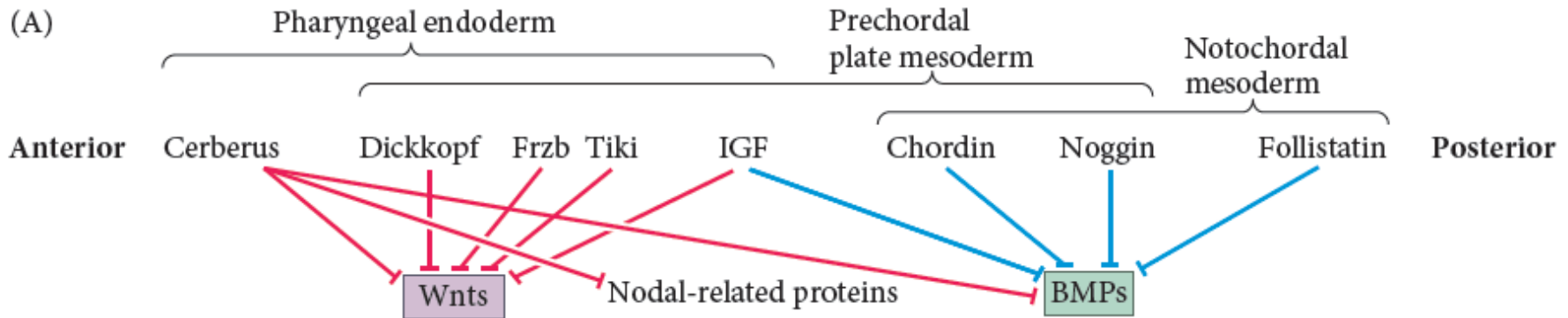


- Μεταγραφικός παράγοντας (homeodomain) με ομολογία με το *gooseberry* και το *bicoid* της *Drosophila*.
- Ενεργοποιεί τις μεταναστευτικές ικανότητες των κυττάρων του ραχιαίου χείλους του βλαστοπόρου.
- Καθορίζει αυτόνομα την τύχη των κυττάρων που το εκφράζουν.
- Εντοπίζεται στο εμπρόσθιο τμήμα του οργανωτή - Ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που χαρακτηρίζουν το εμπρόσθιο τμήμα, όπως ο *Otx-2*.

Εμπροσθοπίσθιος άξονας και σηματοδότηση



Igf αλλά και τα γονίδια Hox!!!!

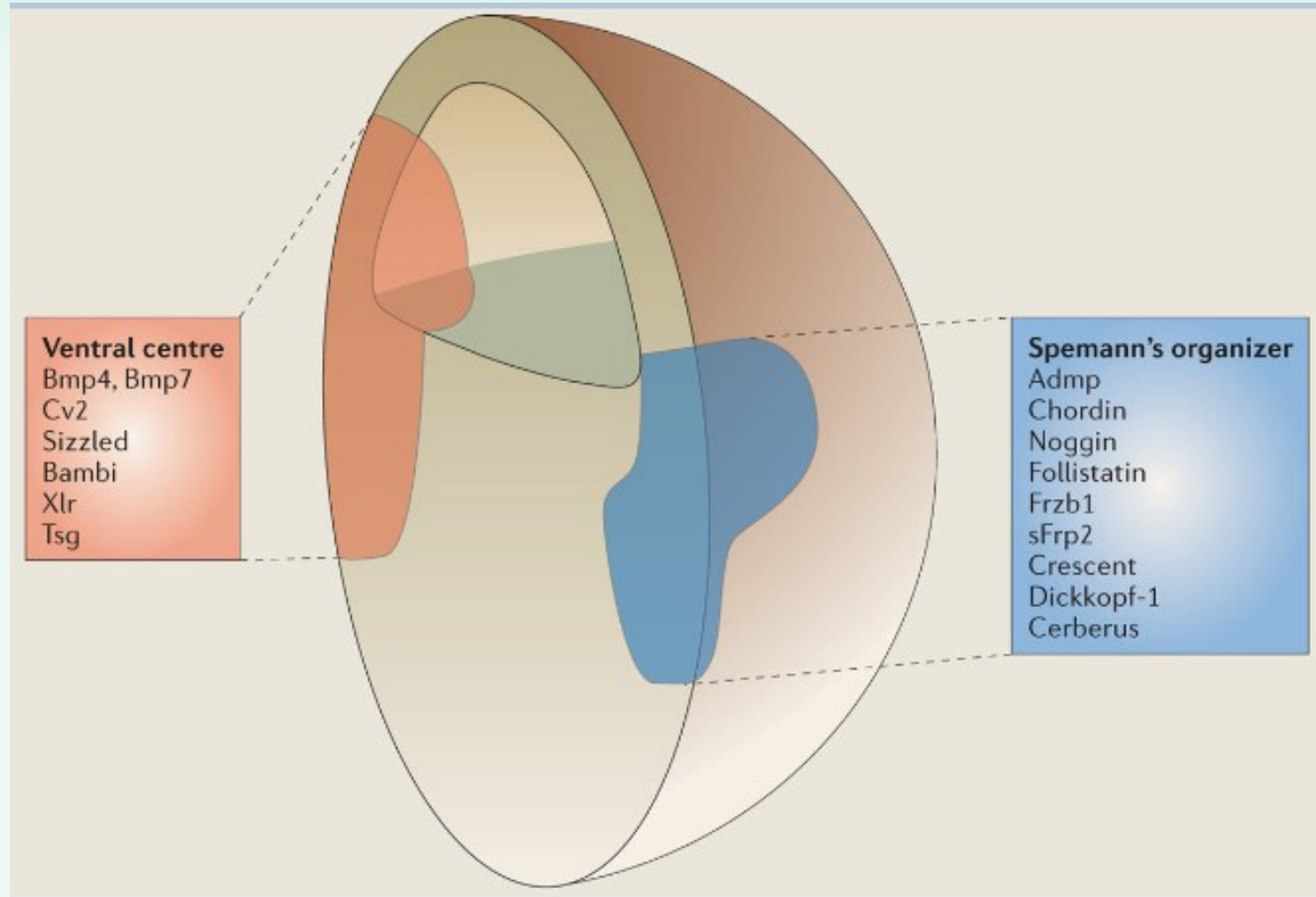


Paracrine factor antagonists from the organizer are able to block specific paracrine factors to distinguish head from tail.

(A) The pharyngeal endoderm that underlies the head secretes Dickkopf, Frzb, and Cerberus. Dickkopf and Frzb block Wnt proteins; Cerberus blocks Wnts, Nodal-related proteins, and BMPs. The prechordal plate secretes the Wnt blockers Dickkopf and Frzb, as well as BMP blockers Chordin and Noggin. The notochord contains the BMP blockers Chordin, Noggin, and Follistatin but does not secrete Wnt blockers. Insulin-like growth factor (IGF) from the head endomesoderm probably acts at the junction of the notochord and prechordal mesoderm.

(B) Summary of paracrine antagonist function in the ectoderm. Brain formation requires inhibiting both the Wnt and BMP pathways. Spinal cord neurons are produced when Wnt functions without the presence of BMPs. Epidermis is formed when both the Wnt and BMP pathways are operating. Gilbert + Barressi 2017

Σύνοψη



Ο οργανωτής και οι λειτουργίες του

- Οι λειτουργίες του οργανωτή:
- Αυτοδιαφοροποίηση του ραχιαίου εξωδέρματος σε διάφορα παράγωγά του.
- Δίνει ραχιαίο χαρακτήρα στο περιβάλλον μεσόδερμα που διαφορετικά θα παρέμενε κοιλιακό.
- Επαγωγή του νευρικού συστήματος από το εξώδερμα.
- Έναρξη των κινήσεων της γαστριδίωσης.
- Καθορισμός εμπροσθοπίσθιου άξονα.

- Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του; Ποιοι παράγοντες εκκρίνονται από τον οργανωτή ώστε να οδηγήσουν στον σχηματισμό των αξόνων αλλά και της νευρικής πλάκας;

Απάντηση:

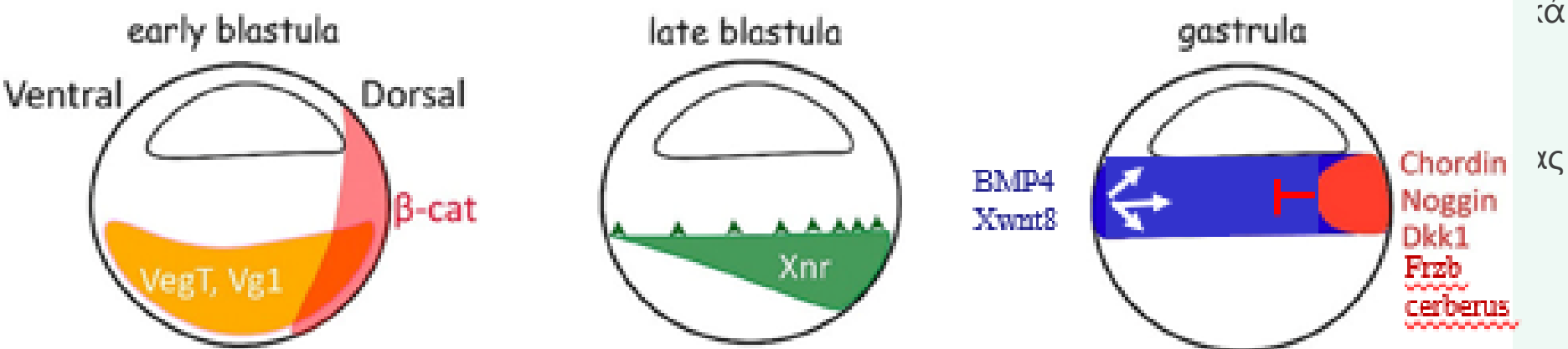
Παράγοντες που εκφράζονται στον οργανωτή και οι λειτουργίες τους:

- noggin
 - Chordin
- } Παρεμπόδιση BMP2 και BMP4 - Επαγωγή ραχιαίας τύχης σε μεσοδερμικά κύτταρα.
- Frizbee
 - Dkkopf
- } Παρεμπόδιση Xwnt8 (μονοπάτι Wnt) - Επαγωγή ραχιαίας και εμπρόσθιας τύχης σε μεσοδερμικά κύτταρα.
- Cerberus → Παρεμπόδιση Xwnt8 και BMPs - Επαγωγή ακραίας εμπρόσθιας τύχης σε μεσοδερμικά κύτταρα (κεφαλή).
 - Goosecoid → Ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που χαρακτηρίζουν το εμπρόσθιο τμήμα.
 - κα

- Με ποιο τρόπο επιτυγχάνει ο οργανωτής τις λειτουργίες του; Ποιοι παράγοντες εκκρίνονται από τον οργανωτή ώστε να οδηγήσουν στον σχηματισμό των αξόνων αλλά και της νευρικής πλάκας;

Απάντηση:

Παράγοντες που εκφράζονται στον οργανωτή και οι λειτουργίες τους:

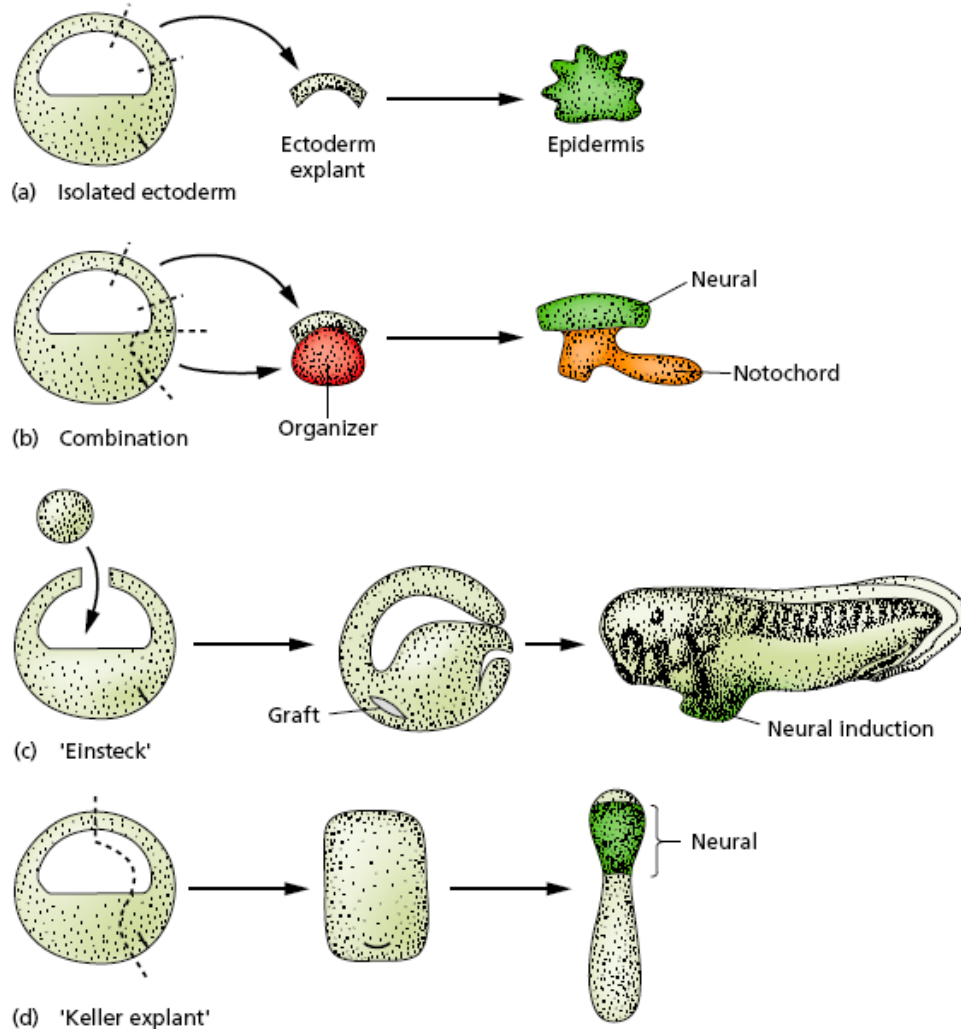


<https://doi.org/10.1002/bies.202300179>

- Goosecoid → Ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που χαρακτηρίζουν το εμπρόσθιο τμήμα.
- κα

Το εξώδερμα

Στο ζωϊκό ημισφαίριο μια σειρά πρωτεϊνών όπως η ectodermin (RING ubiquitin ligase) καταστέλλουν το σχηματισμό μεσοδέρματος δρώντας στις Smad.



Η επαγωγή του νευρικού ιστού προϋποθέτει καταστολή του μονοπατιού BMP .

(του χρόνου να' μαστε καλά!!!!!!)

ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ

