

Εμβρυολογία

και

Μοριακή

Βιολογία

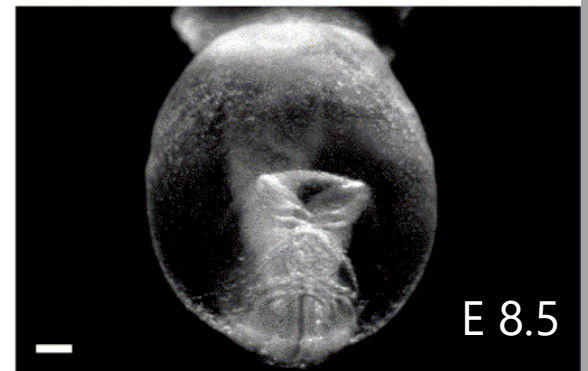
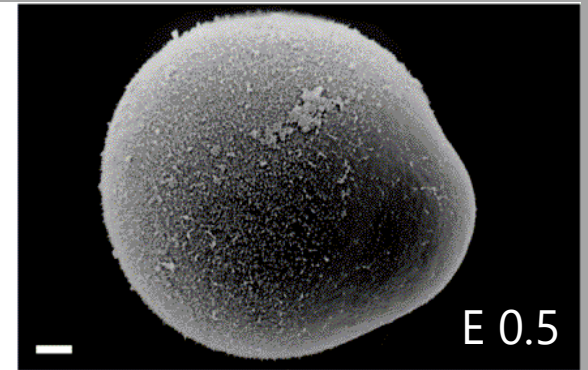
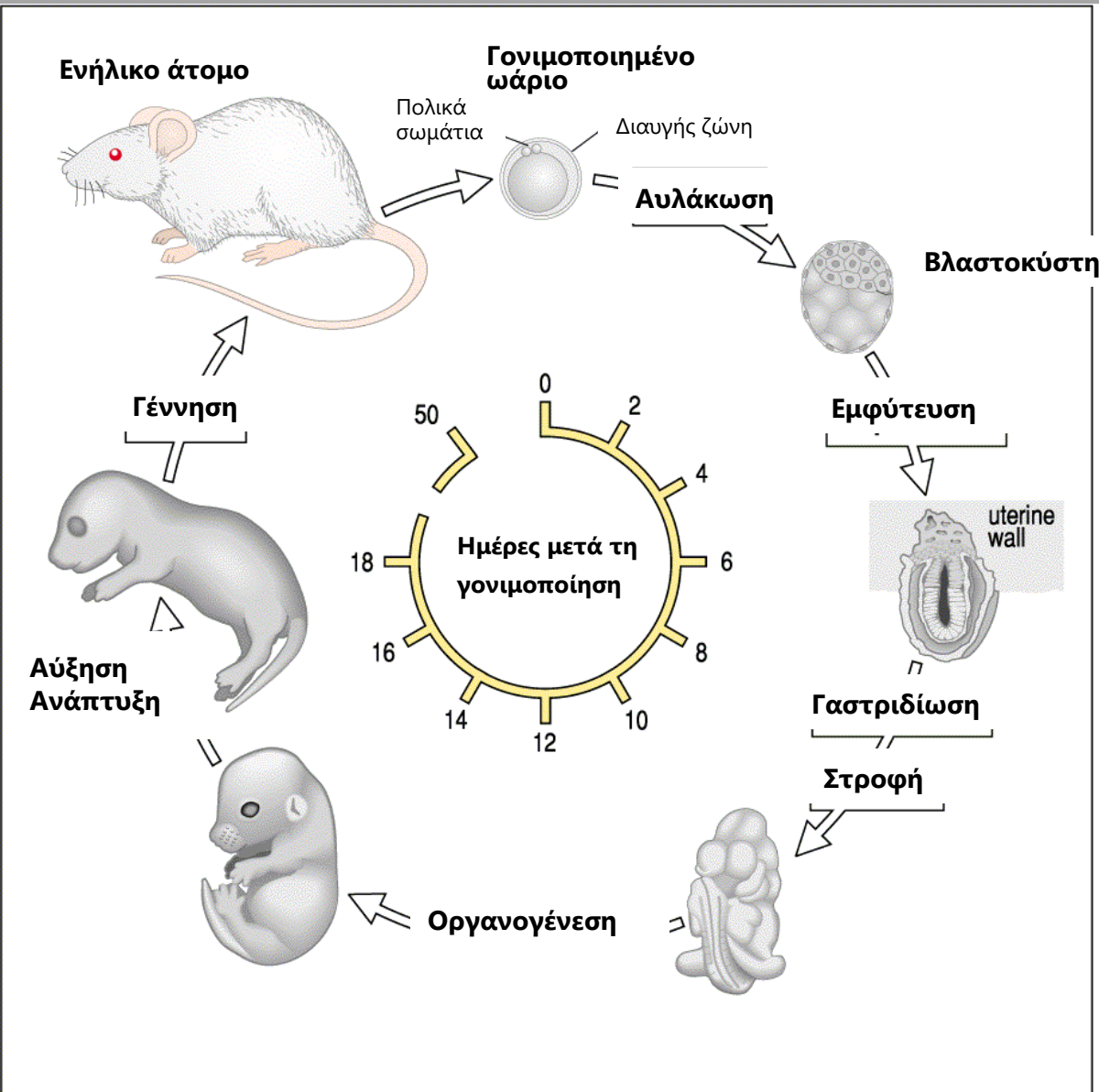
Ανάπτυξης



Ενότητα 7

Η πρώτη ανάπτυξη του ποντικού

Mus Musculus



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

Τα πλεονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

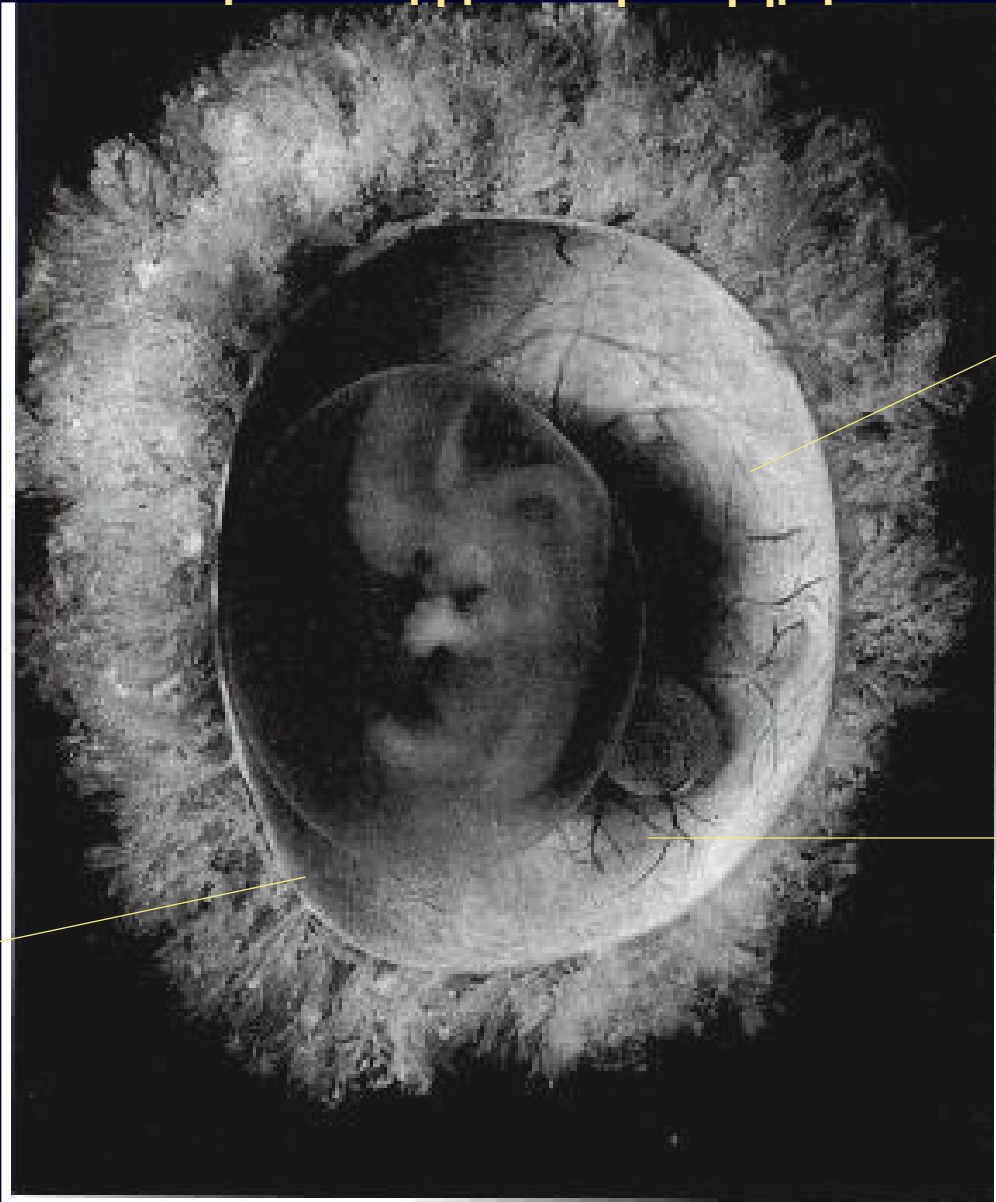
- Τα ζώα διατηρούνται σχετικά εύκολα στο εργαστήριο.
- Έχει σχετικά μικρό κύκλο ζωής (9 εβδομάδες).
- Καθώς μελετάται εντατικά επί δεκαετίες υπάρχει διαθέσιμη μια τεράστια ποικιλία μοριακών και μη τεχνικών.
- Είναι θηλαστικό.
- Αλληλούχηση γονιδιώματος, 2002
- («An unfortunate feature of genetic model organisms is that the easier they are to work with, the worse they are as models for the animal that most funding agencies find most interesting, namely ourselves.» Daniel St Johnston)

Τα μειονεκτήματα του *Mus musculus* ως πειραματικό υλικό.

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

Το έμβρυο των θηλαστικών

Ανθρώπινο έμβρυο στην 40η ημέρα

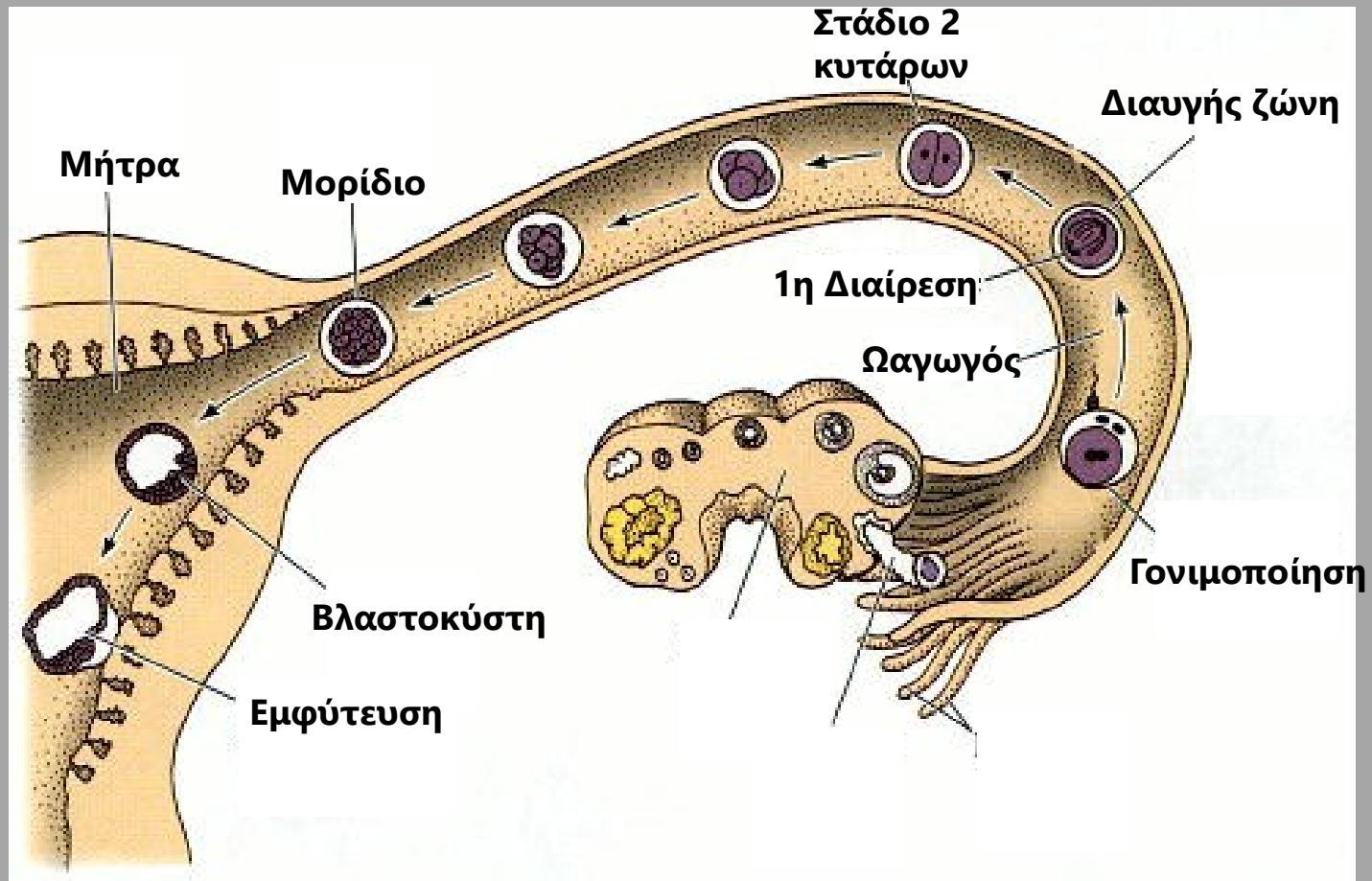


χόριο

λεκιθικός
σάκος

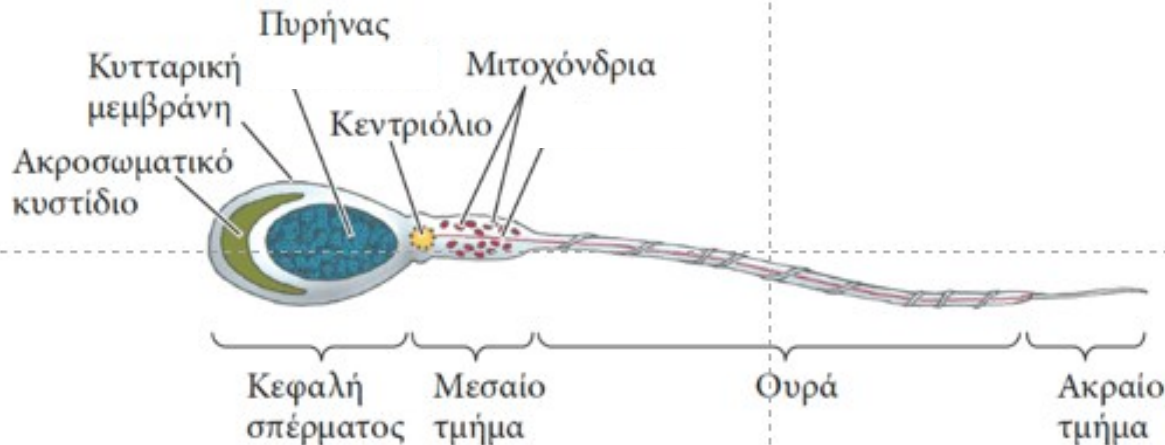
άμνιο

Γονιμοποίηση - Αυλάκωση



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

Δομή των γαμετών: α.σπερματοζωάρια



Ακρόσωμα και πυρήνας = κεφάλι σπερματοζωαρίου

Ακρόσωμα: αποτελείται από ένζυμα που πέπτουν πρωτεΐνες και σύμπλοκα σακχάρων.

Ουρά: αποτελείται από μικροσωληνίσκους (τουμπουλίνη).

Η δυνεΐνη (προσδένεται στους μικροσωληνίσκους), διασπά το ATP που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια και οδηγεί στην κίνηση του σπερματοζωαρίου.

Στα θηλαστικά δεν είναι ώριμα για γονιμοποίηση πριν βρεθούν στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού.

DAPI (Πυρήνας)
Μιτοχόνδρια
τουμπουλίνη

κεφαλή

αυχένας

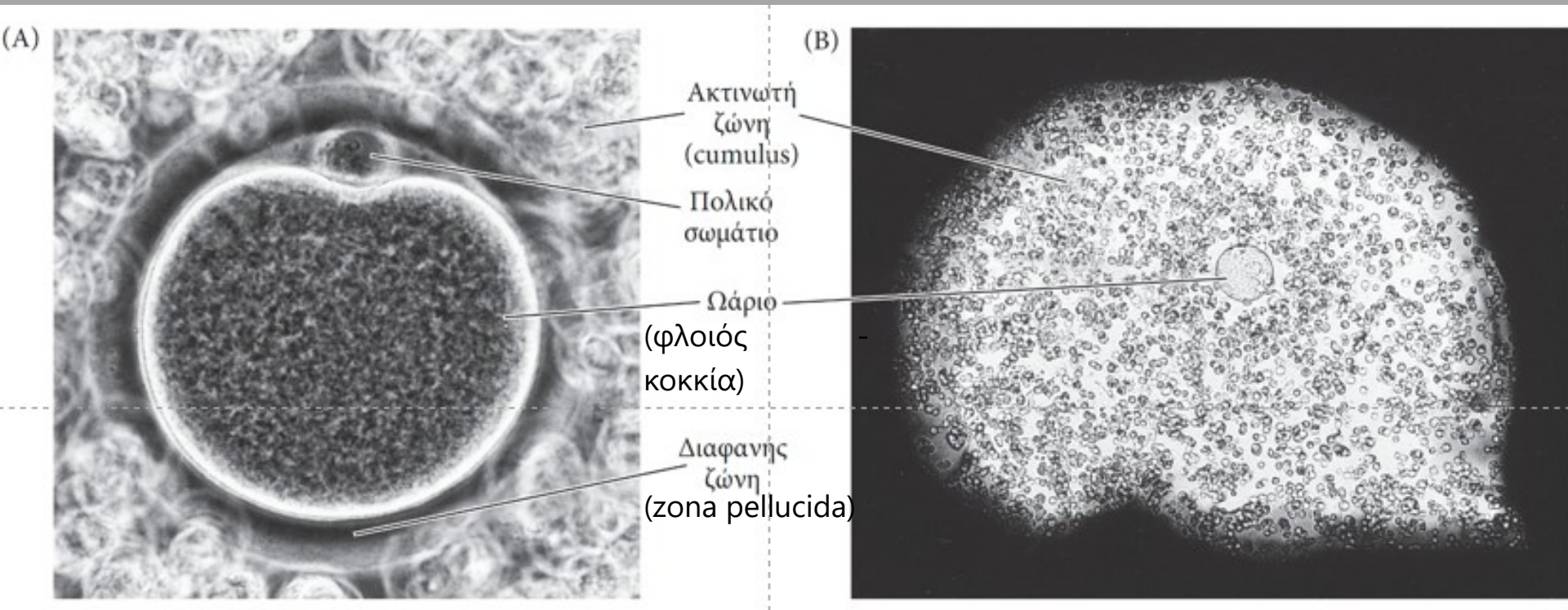
ουρά

bull

mouse

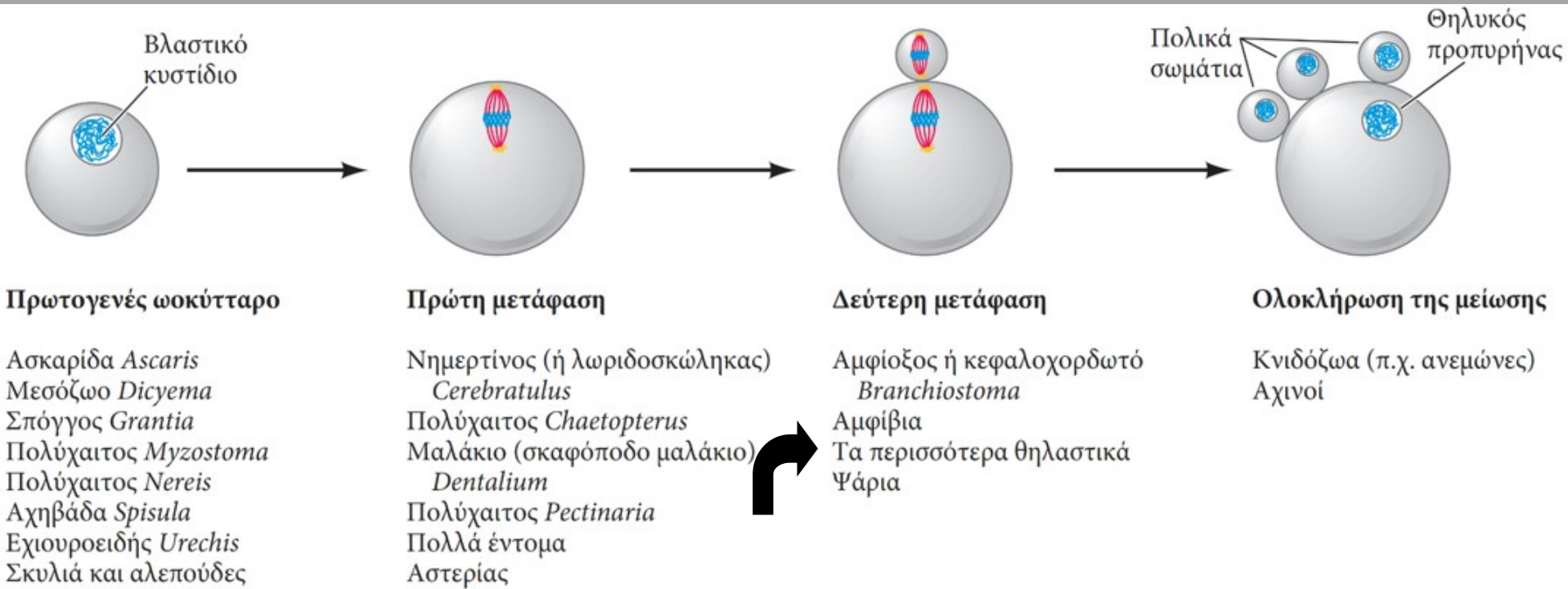
GFP (proscrosin promoter)- ακρόσωμα

Δομή των γαμετών: β.ωάρια



- **Ακτινωτή ζώνη ή ακτινωτός στέφανος (cumulus)** – ωοθηλακικά κύτταρα– προσφέρει ουσίες που θρέφουν το ωοκύτταρο με την απομάκρυνσή του απο την ωοθήκη.
- **Διαφανής ή διαυγής ζώνη (zona pellucida)** - διαφανής γλυκοπρωτεϊνική στοιβάδα – εκκρίνεται απο ωοθηλακικά κύτταρα.

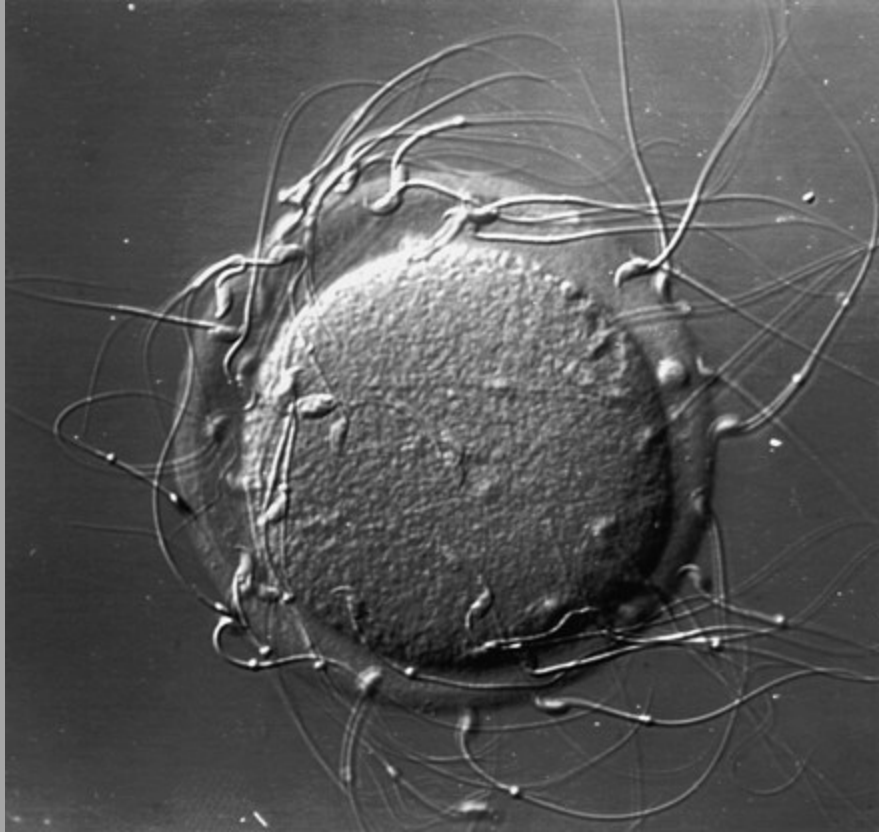
Δομή των γαμετών: β.ωάρια



Στάδια ωρίμανσης του ωαρίου τη στιγμή της εισόδου του σπερματοζωαρίου σε διαφορετικά ζωικά είδη.

Στα περισσότερα είδη, η είσοδος του σπερματοζωαρίου συμβαίνει πριν ο πυρήνας του ωαρίου ολοκληρώσει τη μείωση. Το βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle) είναι η ονομασία που δίνεται στον μεγάλο διπλοειδή πυρήνα του πρωτογενούς ωοκυττάρου. Τα πολικά σωματίδια είναι μη λειτουργικά κύτταρα που παράγονται μέσω της μείωσης.

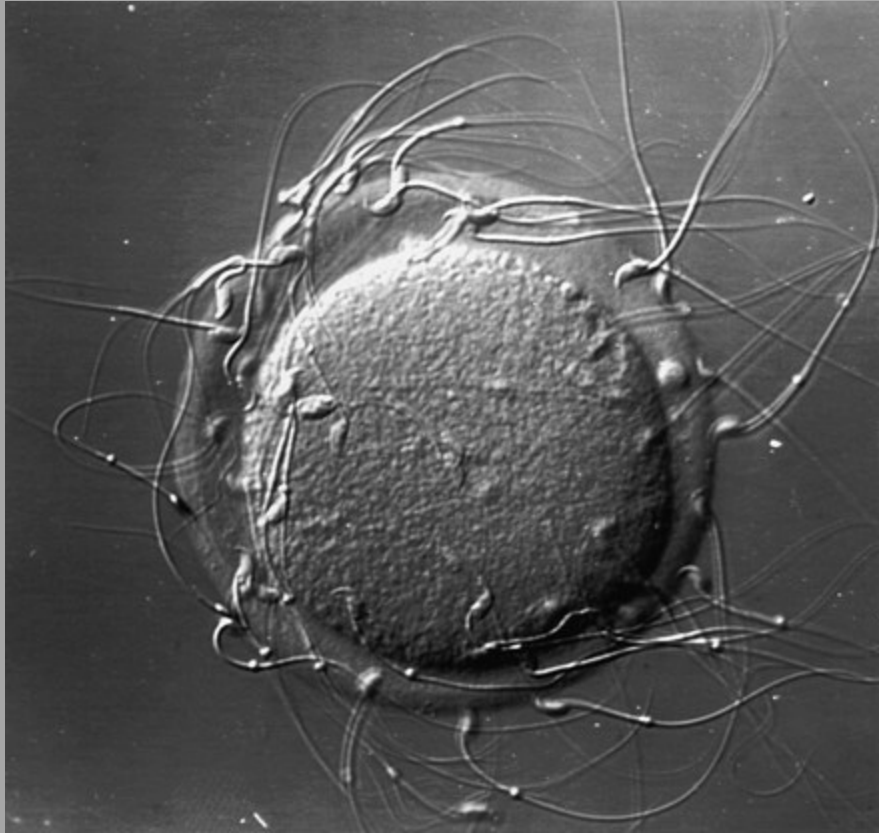
Γονιμοποίηση



Η γονιμοποίηση περιλαμβάνει τέσσερα γεγονότα:

- Επαφή/αναγνώριση ωαρίου - σπερματοζωαρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό το στάδιο εξασφαλίζει ότι οι γαμέτες ανήκουν στο ίδιο είδος.
- Ρύθμιση της εισόδου του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Παρεμπόδιση της πολυσπερμίας με ενεργό τρόπο.
- Σύντηξη των προπυρήνων.
- Ενεργοποίηση του μεταβολισμού του ωαρίου, ώστε να αρχίσει η ανάπτυξη.

Γονιμοποίηση

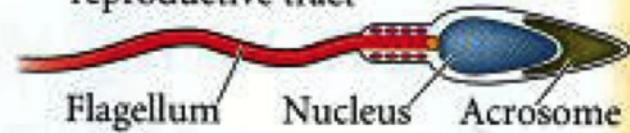


Η γονιμοποίηση περιλαμβάνει τέσσερα γεγονότα:

- Επαφή/αναγνώριση ωαρίου - σπερματοζωαρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό το στάδιο εξασφαλίζει ότι οι γαμέτες ανήκουν στο ίδιο είδος.
- Ρύθμιση της εισόδου του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Παρεμπόδιση της πολυσπερμίας με ενεργό τρόπο.
- Σύντηξη των προπυρήνων.
- Ενεργοποίηση του μεταβολισμού του ωαρίου, ώστε να αρχίσει η ανάπτυξη.

(B) MOUSE

(1) Sperm activated by female reproductive tract



(2) Sperm binds zona pellucida



(3) Acrosomal reaction



(4) Sperm lyses hole in zona



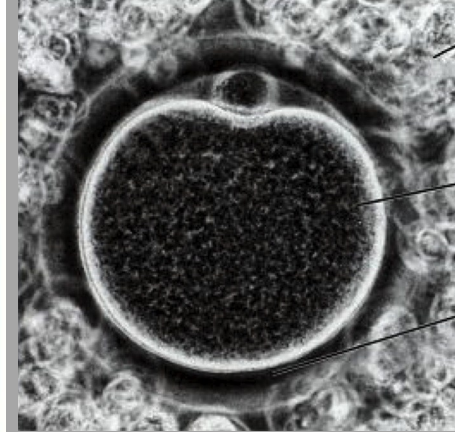
(5) Sperm and egg membranes fuse



← Cumulus layer (extracellular coat)

Zona pellucida (extracellular matrix)

Egg cell membrane



ακτινωτός
στέφανος
(cumulus)

διαυγής
ζώνη (zona
pellucida)

Τα πέντε στάδια αναγώρισης
του σπερματοζωαρίου απο
το αυγό.

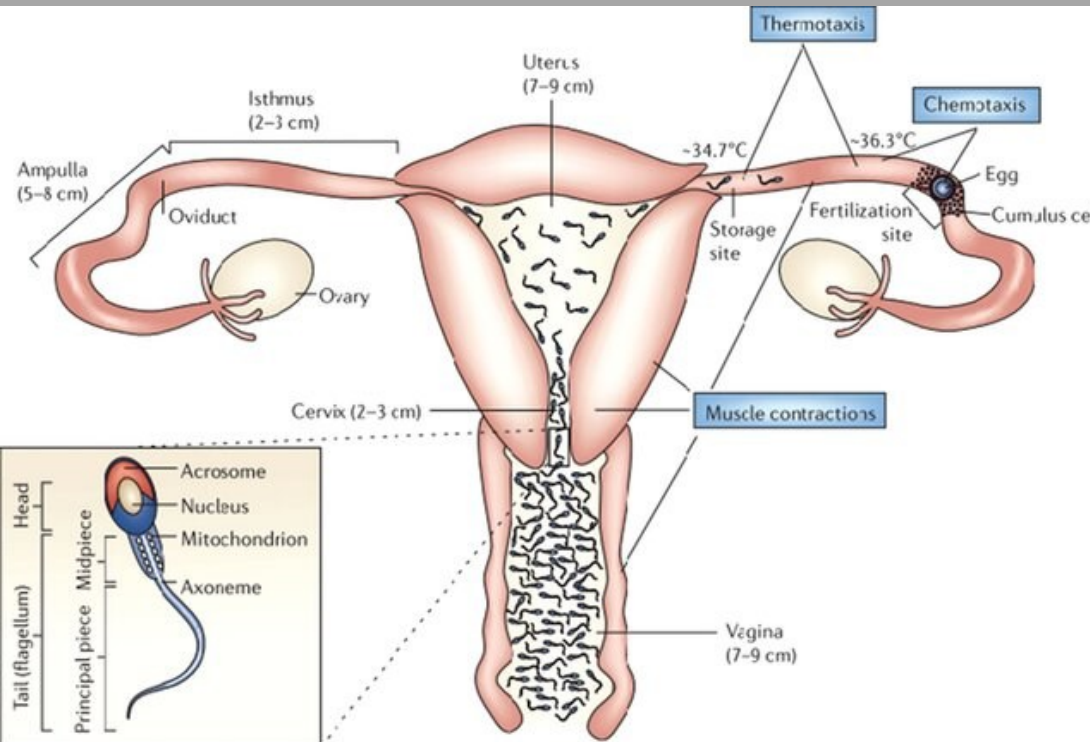
Ταξίδι στον ωαγωγό

- 280×10^6 σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση - 200 φτάνουν στον ωαγωγό (<1:1000 φτάνουν στο αυγό).

- 30' μετά τη σύζευξη εντοπίζονται σπερματοζωάρια στον ωαγωγό. Η μεταφορά εξασφαλίζεται από τη μυϊκή δραστηριότητα της μήτρας και από το υγρό που παράγεται από τον ωαγωγό και ρέει προς τη μήτρα (ρεοταξισμός).

- Τα σπερματοζωάρια είναι ανίκανα να γονιμοποιήσουν τα ωάρια (μπλοκάρονται στον ακτινωτό στέφανο) εκτός και αν παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού (ακόμη και 6 μέρες μετά – στον άνθρωπο).

Ενεργοποίηση



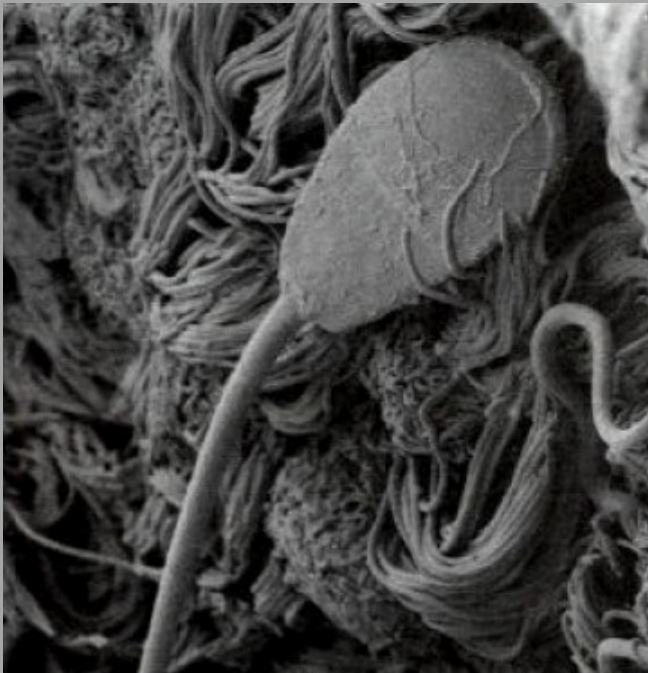
DOI: 10.1002/adbi.201900079

Τι συμβαίνει στο σπερματοζωάριο κατά την ενεργοποίησή του;

Ταξίδι στον ωαγωγό

1. Ενεργοποίηση

Στόχος: - αναγνώριση σημάτων που θα τα οδηγήσουν στο αυγό
- ακροσωμική αντίδραση
- συγχώνευση με τη μεμβράνη του ωαρίου



Σπερματοζωάριο προσδεμένο στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού.

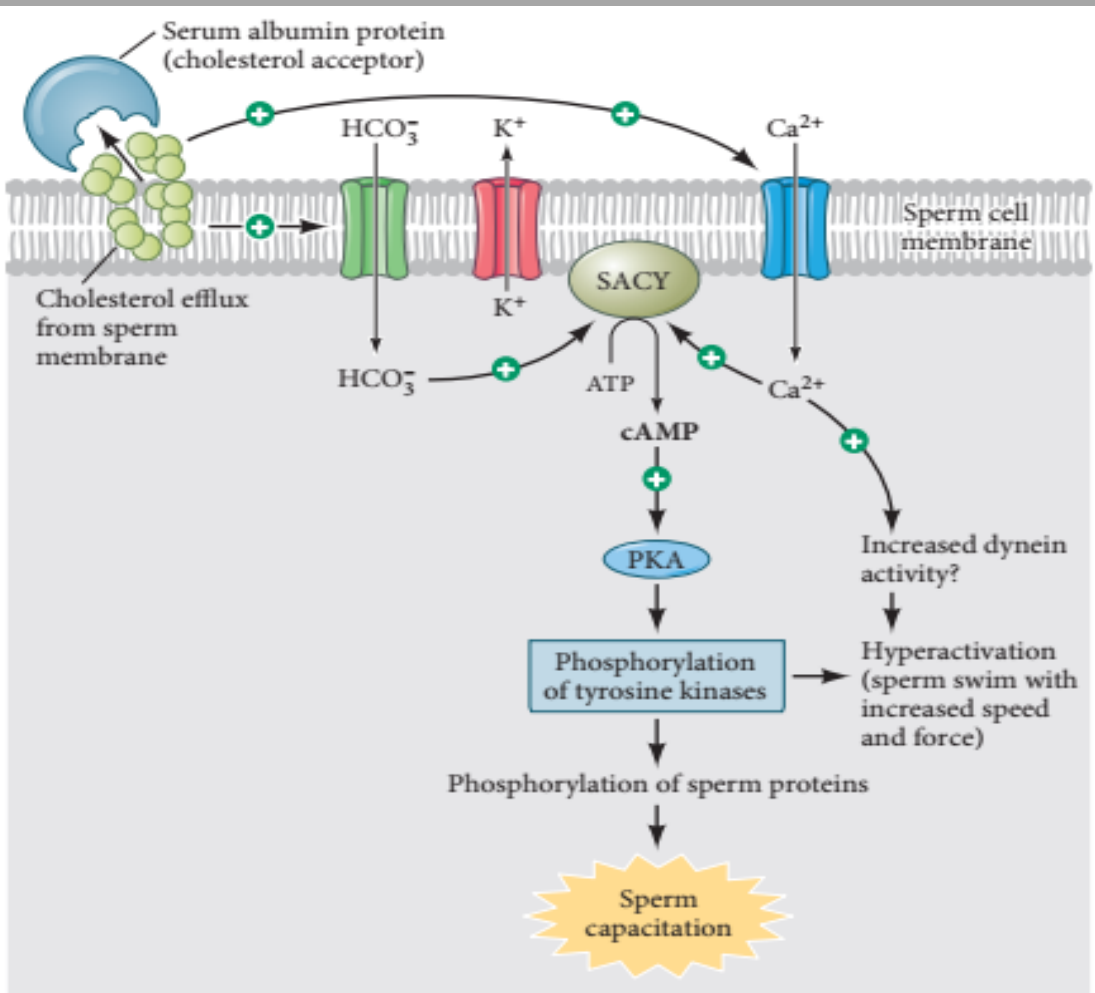
- Τα μη ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια προσδένονται ενεργά στις μεμβράνες των κυττάρων του ωαγωγού στον ισθμό.
- Η πρόσδεση είναι παροδική και αναιρείται από την ενεργοποίηση. Μόνο τα υπερ ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μπορούν με τις κινήσεις τους να αποκολληθούν.

Η πρόσδεση αυτή φαίνεται ότι:

- Αυξάνει τη διάρκεια ζωής του σπερματοζωαρίου (αύξηση της πιθανότητας γονιμοποίησης).
- Συμβάλλει στο φραγμό στην πολυσπερμία (αφαίρεση ισθμού οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας πολυσπερμίας).

1. Ενεργοποίηση

Αλλαγές στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων:

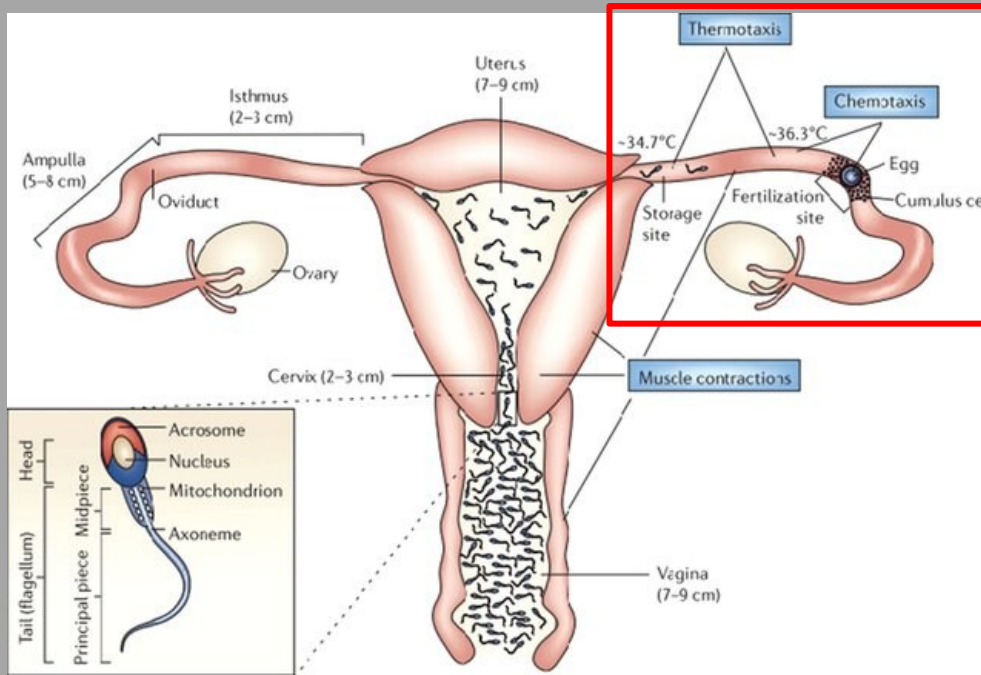


- Απομάκρυνση της χοληστερόλης από αλβουμίνες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.
- Αλλαγή στο δυναμικό μεμβράνης (έξοδος ιόντων καλίου - είσοδος διττανθρακικών και ιόντων ασβεστίου)
- Αύξηση αδενυλικής κυκλάσης cAMP - ενεργοποίηση κινάσης PKA.
- Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών - μετακίνησή τους στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.
- Η εισροή των ιόντων ασβεστίου οδηγεί σε αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων – αποδέσμευσή τους.

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

Ταξίδι στον ωαγωγό:

Τι οδηγεί το σπερματοζωάριο στο αυγό μετά την ενεργοποίηση;



A. Θερμοτακτισμός

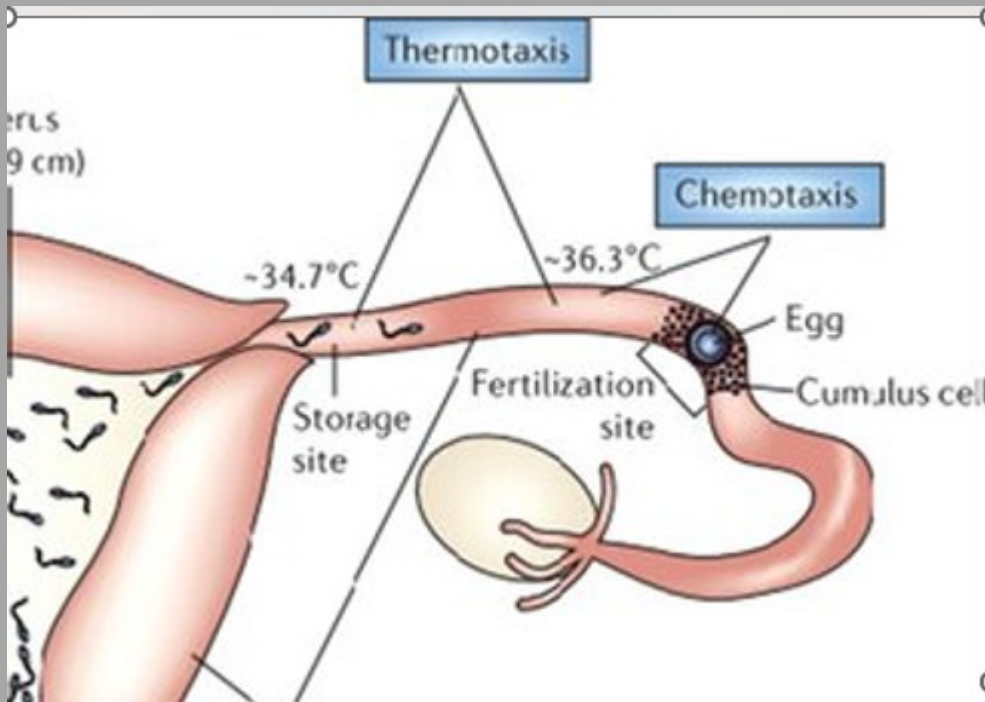
- Υπάρχει διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ισθμού και αυχένα 2 °C.
- Τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μετακινούνται προς θερμότερες περιοχές (μπορούν να ανιχνεύσουν διαφορές θερμοκρασίας ακόμα και 0,014 °C σε απόσταση 1 mm) .
- Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

B. Χημειοτακτισμός

- Προγεστερόνη - ένα από τα χημειοτακτικά μόρια που προσελκύουν τα σπερματοζωάρια (εκκρίνεται από τα ωοκύτταρα και τον ακτινωτό στέφανο).
- Τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μπορούν να ανιχνεύσουν και να ανταποκριθούν ακόμα και σε picomolar της ορμόνης.
- Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

Ταξίδι στον ωαγωγό:

Τι οδηγεί το σπερματοζωάριο στο αυγό μετά την ενεργοποίηση;



A. Θερμοτακτισμός

- Υπάρχει διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ισθμού και αυχένα 2 °C.
- Τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μετακινούνται προς θερμότερες περιοχές (μπορούν να ανιχνεύσουν διαφορές θερμοκρασίας ακόμα και 0,014 °C σε απόσταση 1 mm) .
- Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

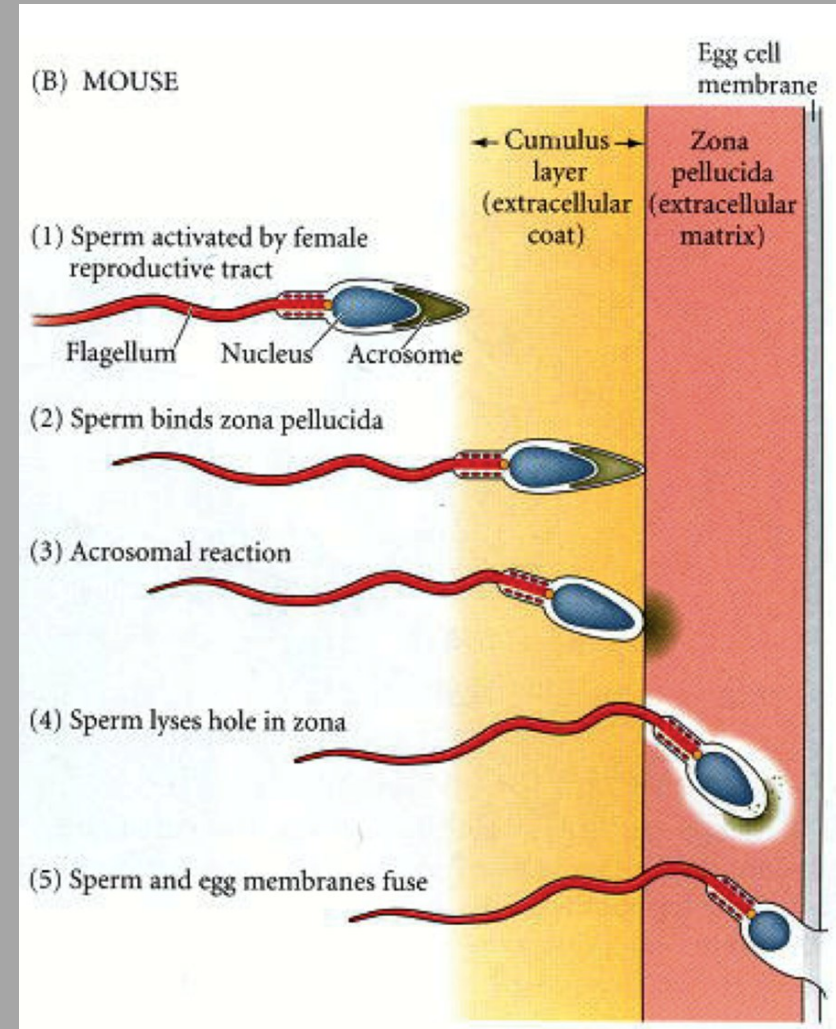
B. Χημειοτακτισμός

- Προγεστερόνη - ένα απο τα χημειοτακτικά μόρια που προσελκύουν τα σπερματοζωάρια (εκκρίνεται απο τα ωκύτταρα και τον ακτινωτό στέφανο).
- Τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μπορούν να ανιχνεύσουν και να ανταποκριθούν ακόμα και σε picomolar της ορμόνης.
- Μόνο ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια αποκρίνονται.

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

Πέρασμα από cumulus (ακτινωτός στέφανος)

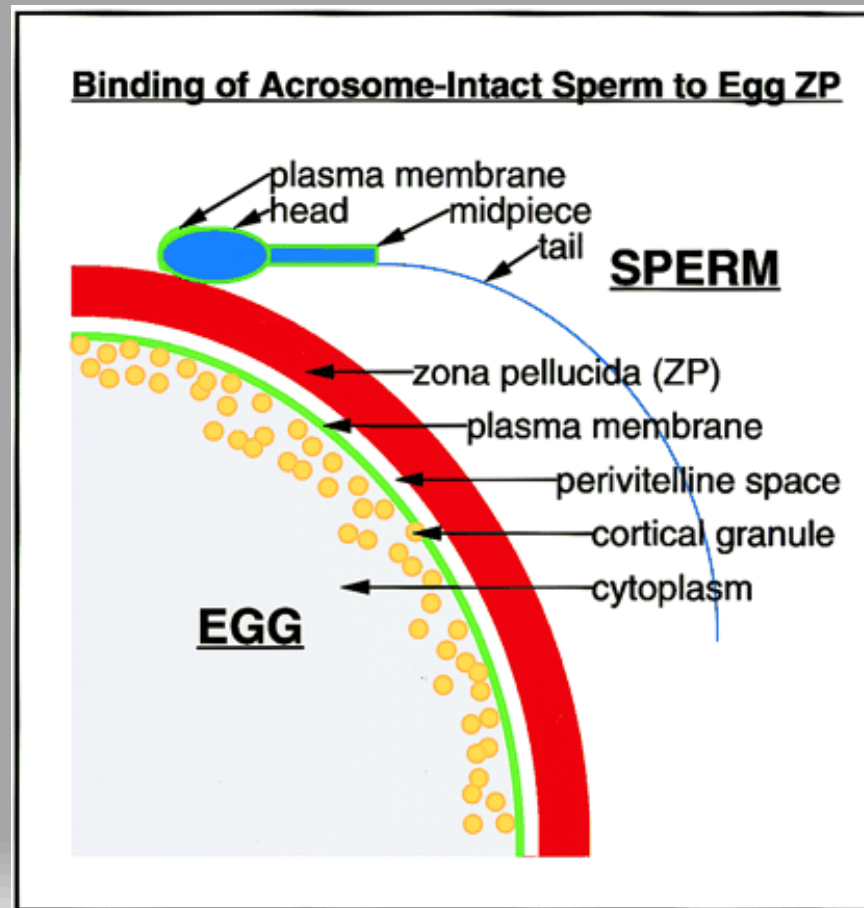
- Αυξημένη κινητικότητα σπερματοζωαριων (υπερενεργοποίηση)
- Έκφραση υαλουρονιδασών (αρκετά μέλη της οικογένειας) στην κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου – αποικοδόμηση εξωκυττάριας ουσίας του cumulus - δημιουργία “μονοπατιού” διαμέσου των κυττάρων του cumulus.



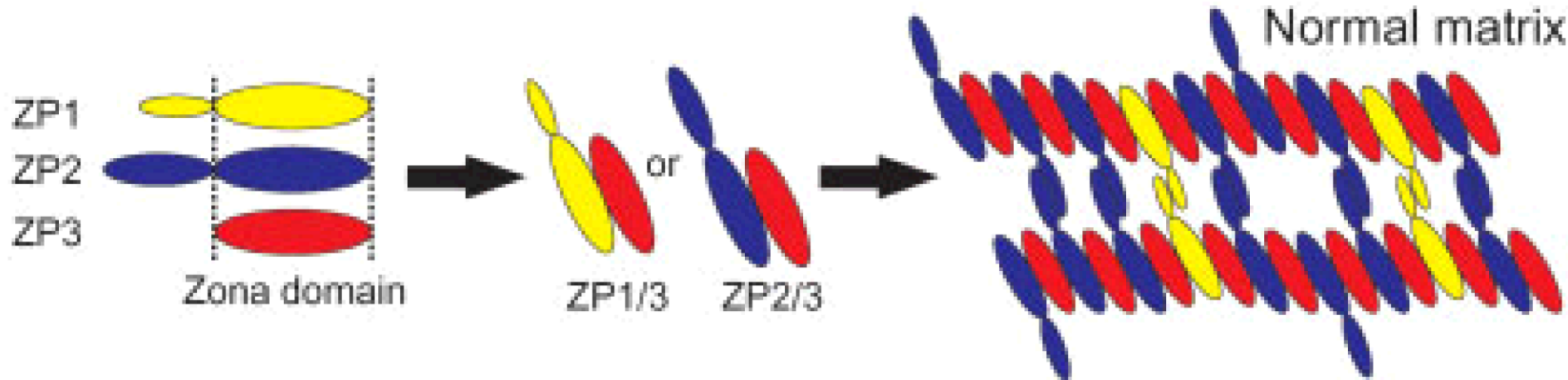
2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών

Η **διαυγής ζώνη (zona pellucida)** αποτελείται από από γλυκοπρωτεΐνες και ενέχεται:

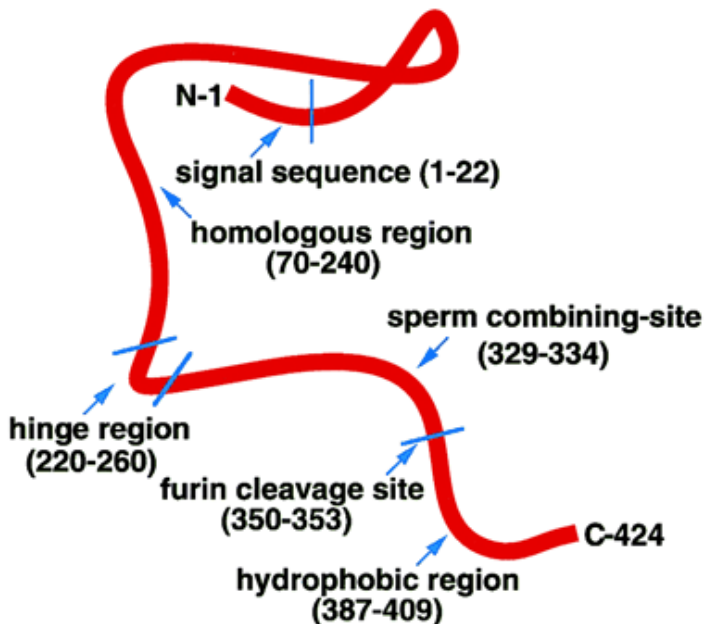
- στην ειδική πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και
- στην έναρξη της ακροσωμικής αντίδρασης



2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)

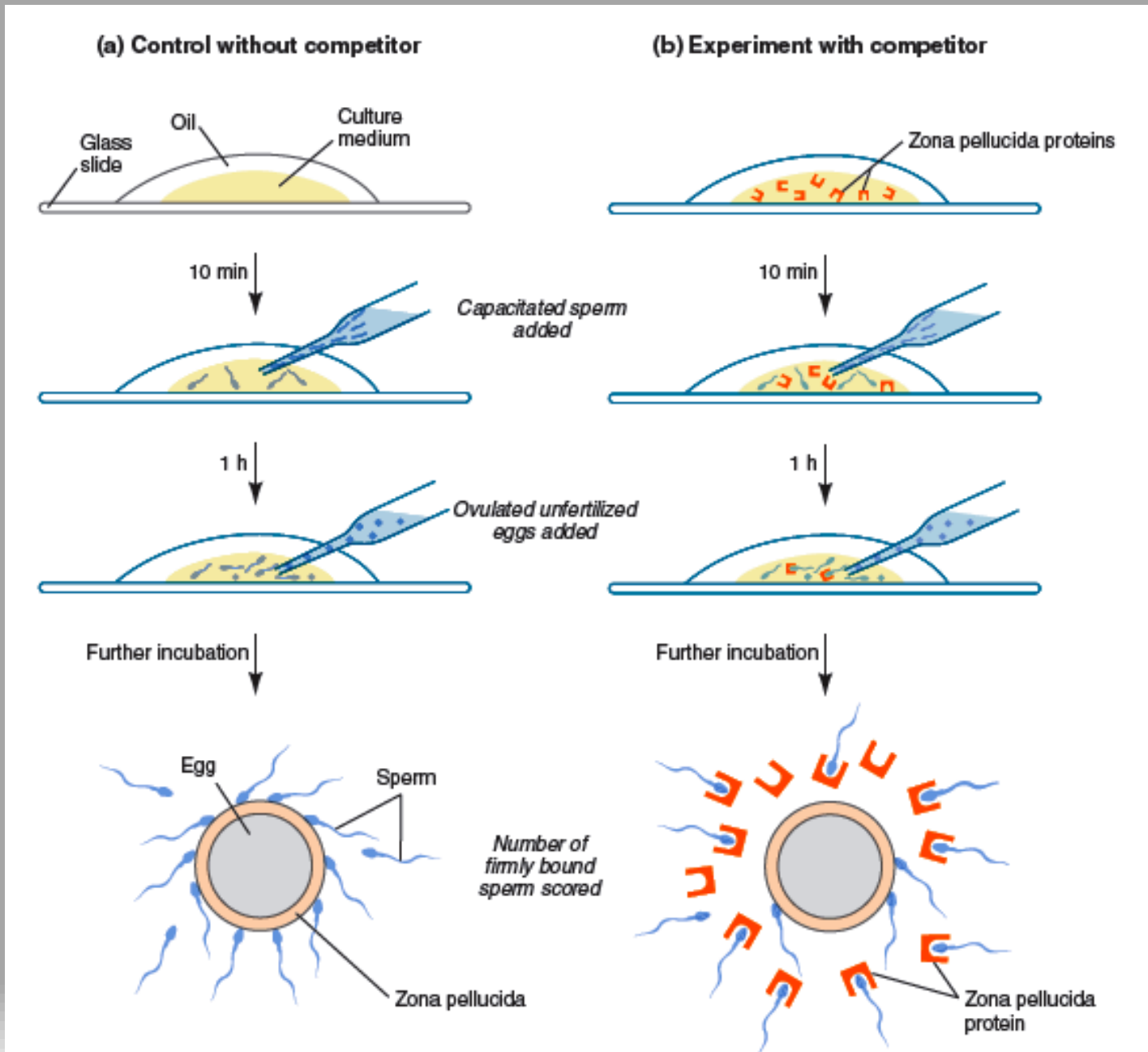


LANDMARKS OF THE mZP3 POLYPEPTIDE

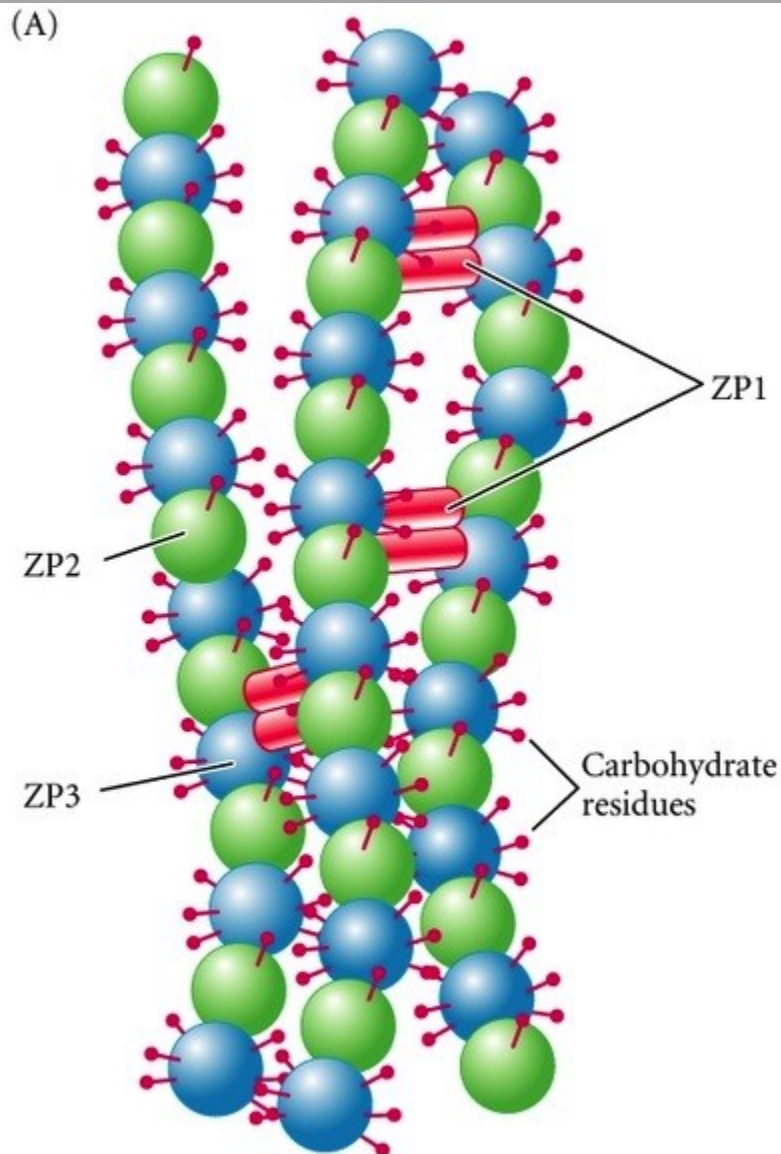


- Η **διαυγής ζώνη** αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες (στο ποντίκι) ZP1, ZP2 και ZP3. Κωδικοποιούνται από γονίδια που φαίνεται ότι ελέγχονται από παράγοντες bHLH.
- Η ZP3 είναι η πρωτεΐνη που ενέχεται στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.

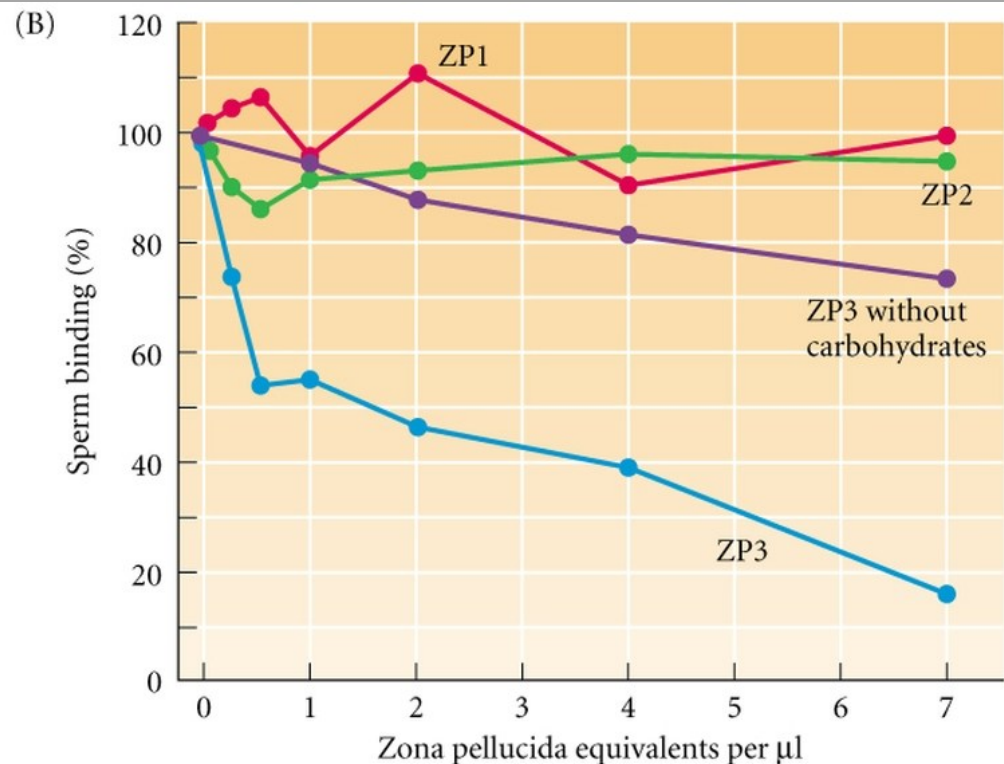
2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



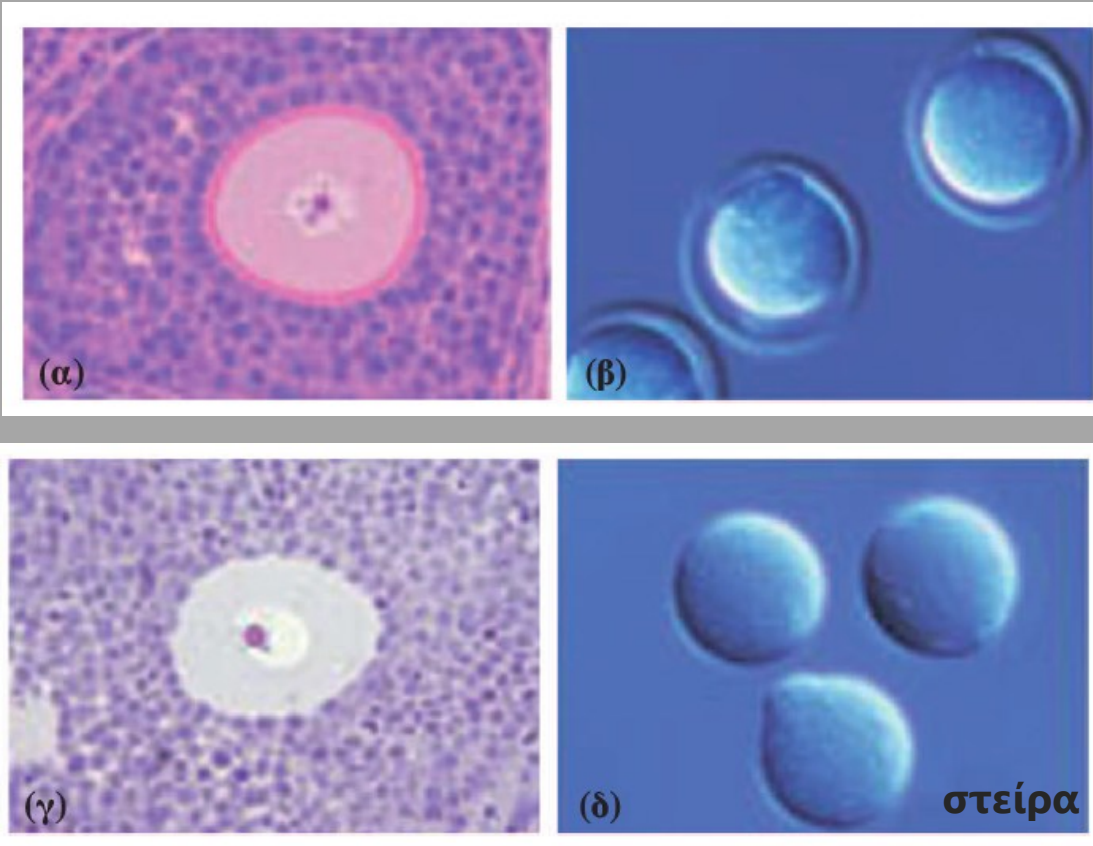
2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



Προεπώαση των σπερματοζωαρίων με καθαρή ZP3 εμποδίζει την πρόσδεση των σπερματοζωαρίων στα ωάρια. Τα κατάλοιπα των υδατανθράκων παίζουν και αυτά ρόλο στην αναγνώριση από το σπερματοζωάριο.



2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (ωοκύτταρο)



Τα ωάρια από θηλυκά άτομα στα οποία έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ZP3 στερούνται διαφανούς ζώνης:

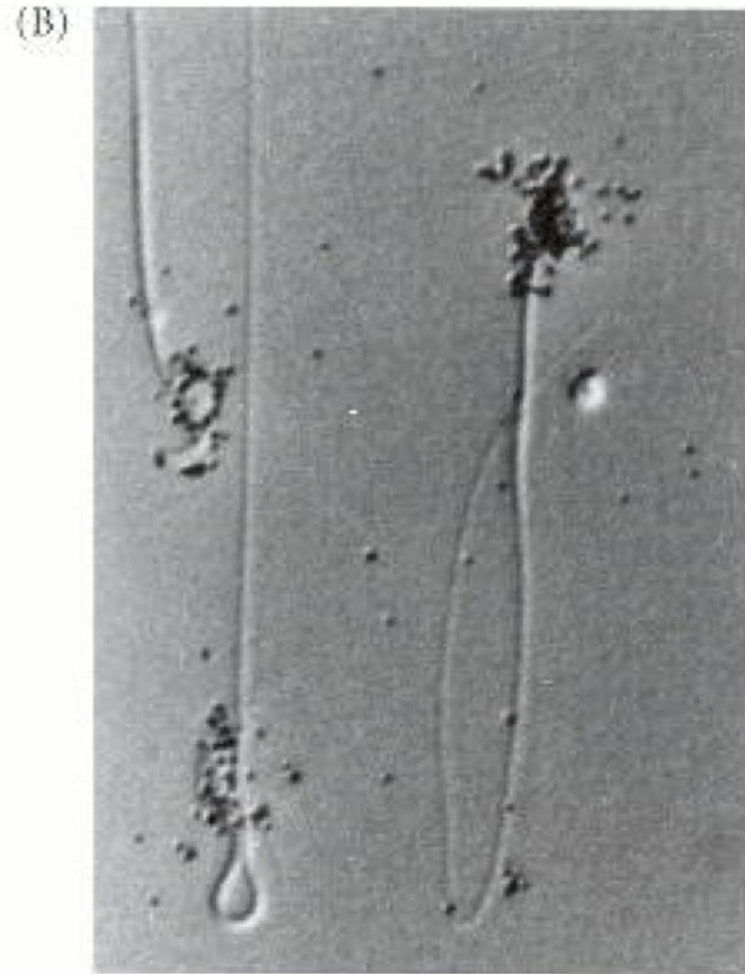
(α, β) φυσιολογικά ωάρια, (γ, δ) ωάρια από θηλυκά άτομα από τα οποία απουσιάζει η ZP3.

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

2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (σπερματοζωάριο)

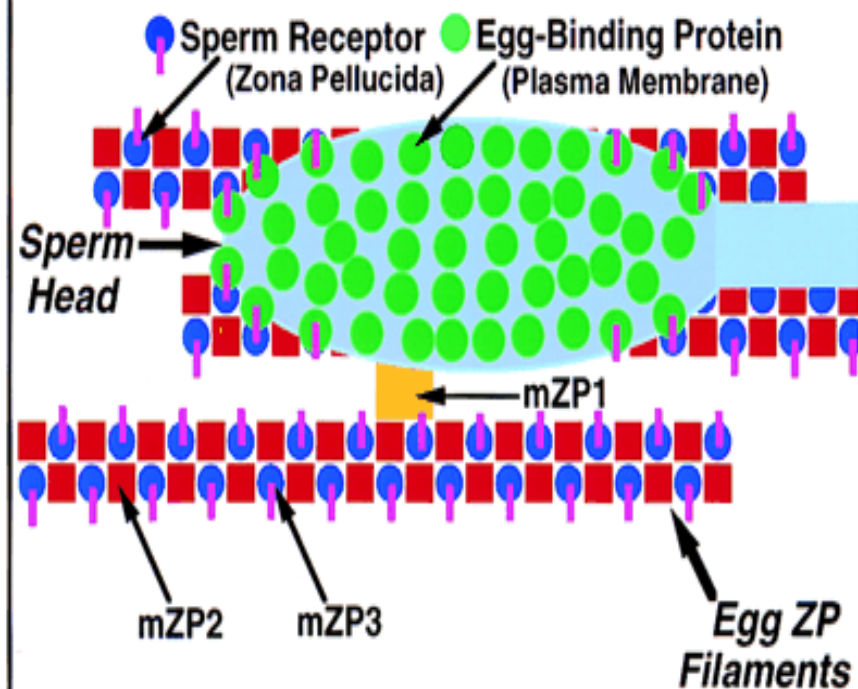


Στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου εντοπίζονται «υποδοχείς» για την ZP3



2. Αναγνώριση-πρόσδεση γαμετών (σπερματοζωάριο)

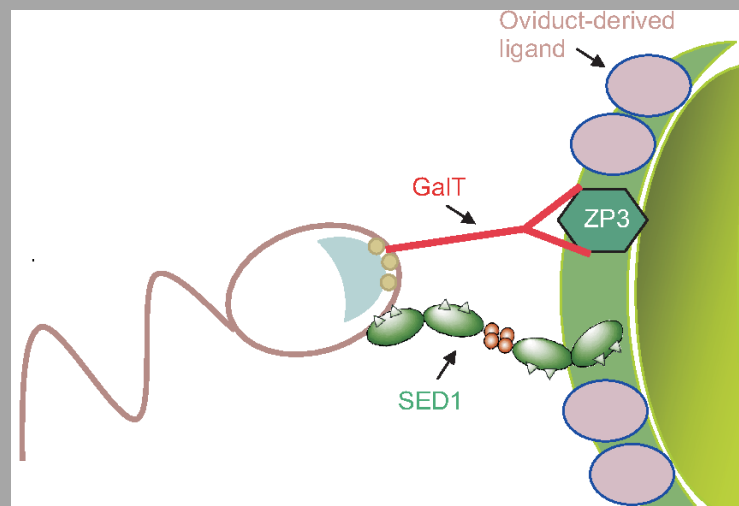
Binding of Sperm to Zona Pellucida Filaments



Απλοποιημένο μοντέλο

Η πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου που αναγνωρίζει τη ZP3 είναι μια επιφανειακή β -1,4-γαλακτοζυλο-τρανσφεράση (**GalT**) η οποία προσδένεται ισχυρά σε αυτή.

Η αλληλεπίδραση της ZP3 (ωάριο) με την GalT (πράσινο - σπερματοζωάριο) προκαλεί την ακροσωμική αντίδραση.



(B) MOUSE

(1) Sperm activated by female reproductive tract

Flagellum Nucleus Acrosome

(2) Sperm binds zona pellucida

(3) Acrosomal reaction

(4) Sperm lyses hole in zona

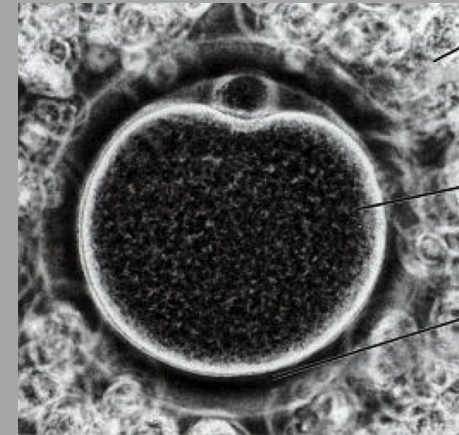
(5) Sperm and egg membranes fuse

← Cumulus layer (extracellular coat) →

Zona pellucida (extracellular matrix)

Egg cell membrane

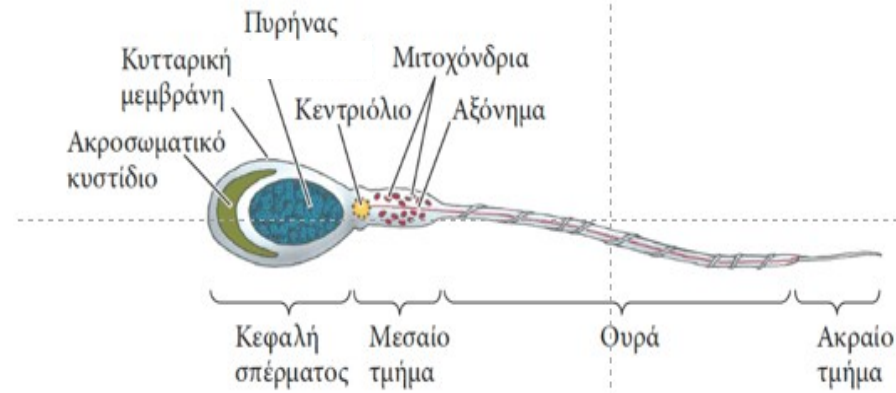
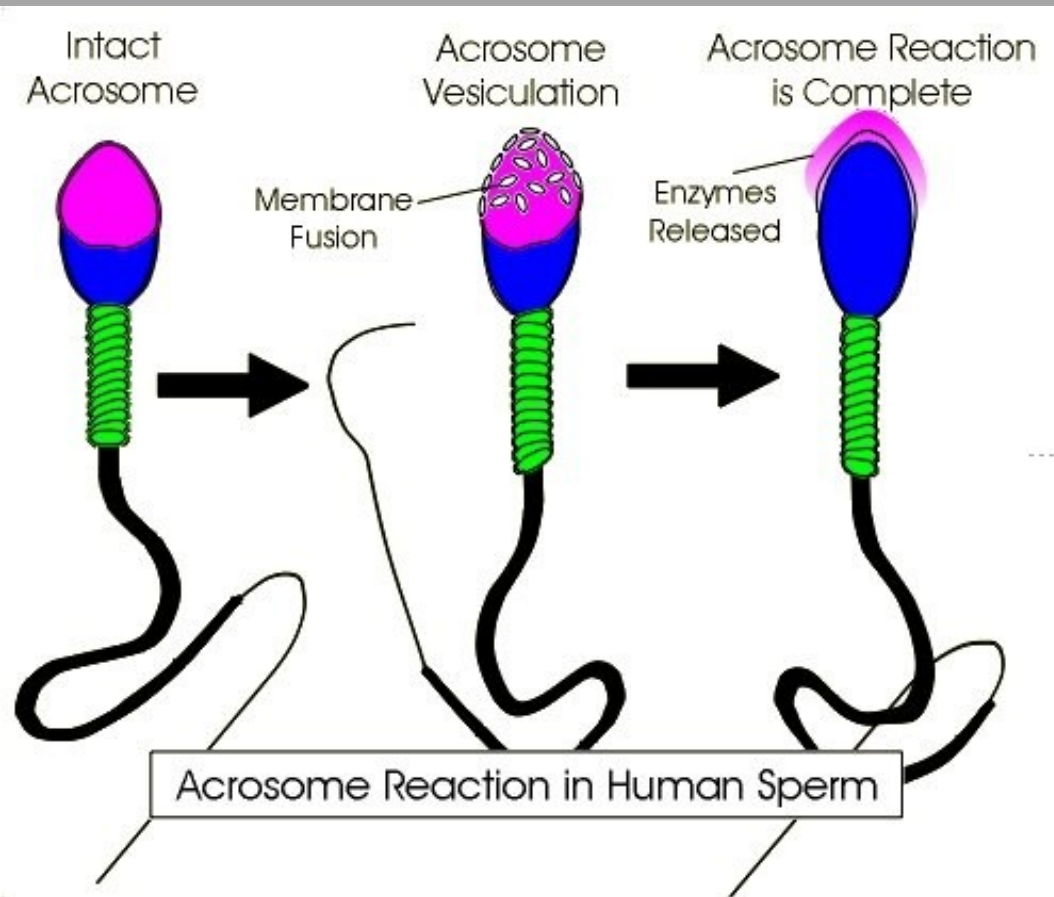
Στάδιο 3: Ακροσωμική αντίδραση



ακτινωτός
στέφανος
(cumulus)

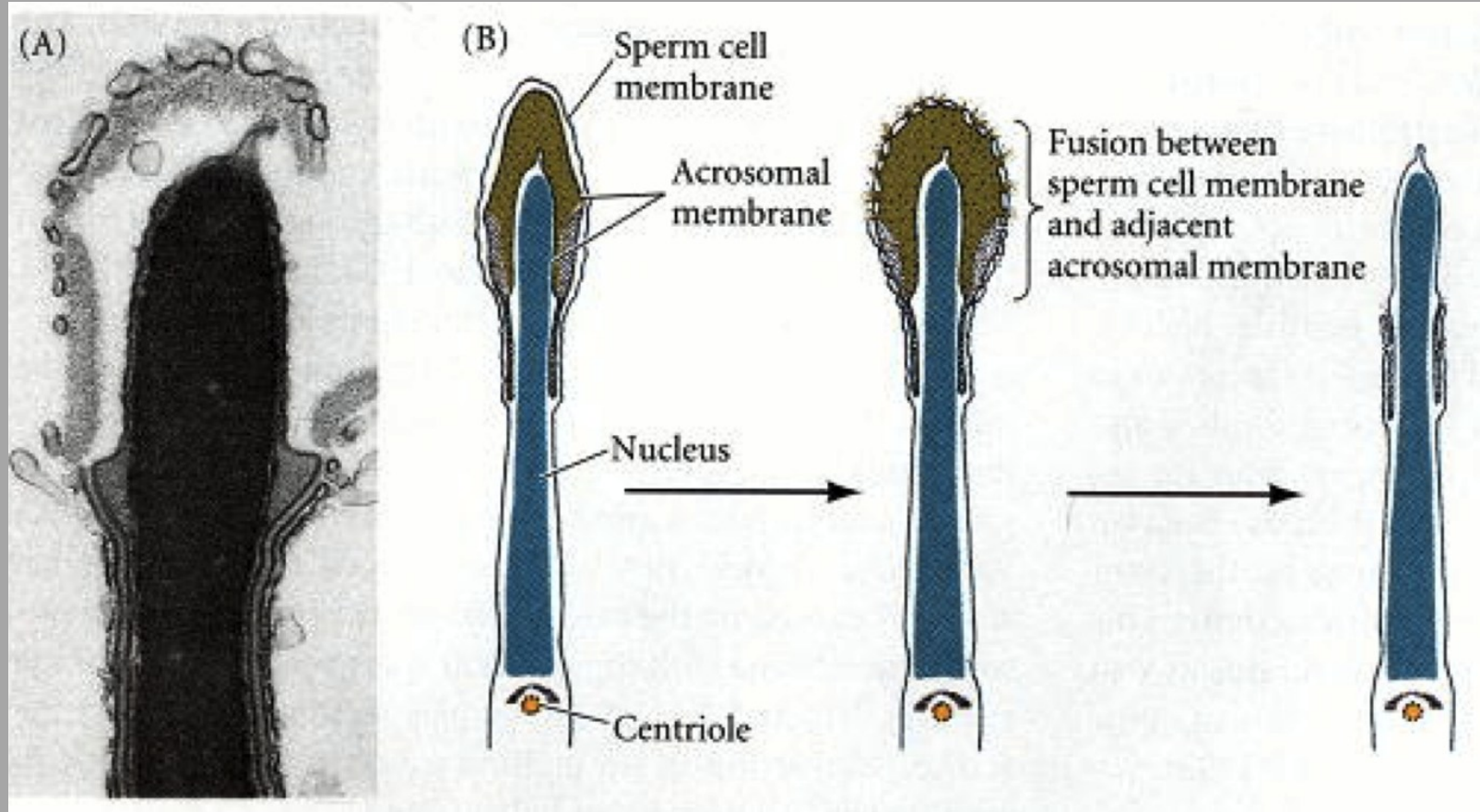
διαυγής
ζώνη (zona
pellucida)

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



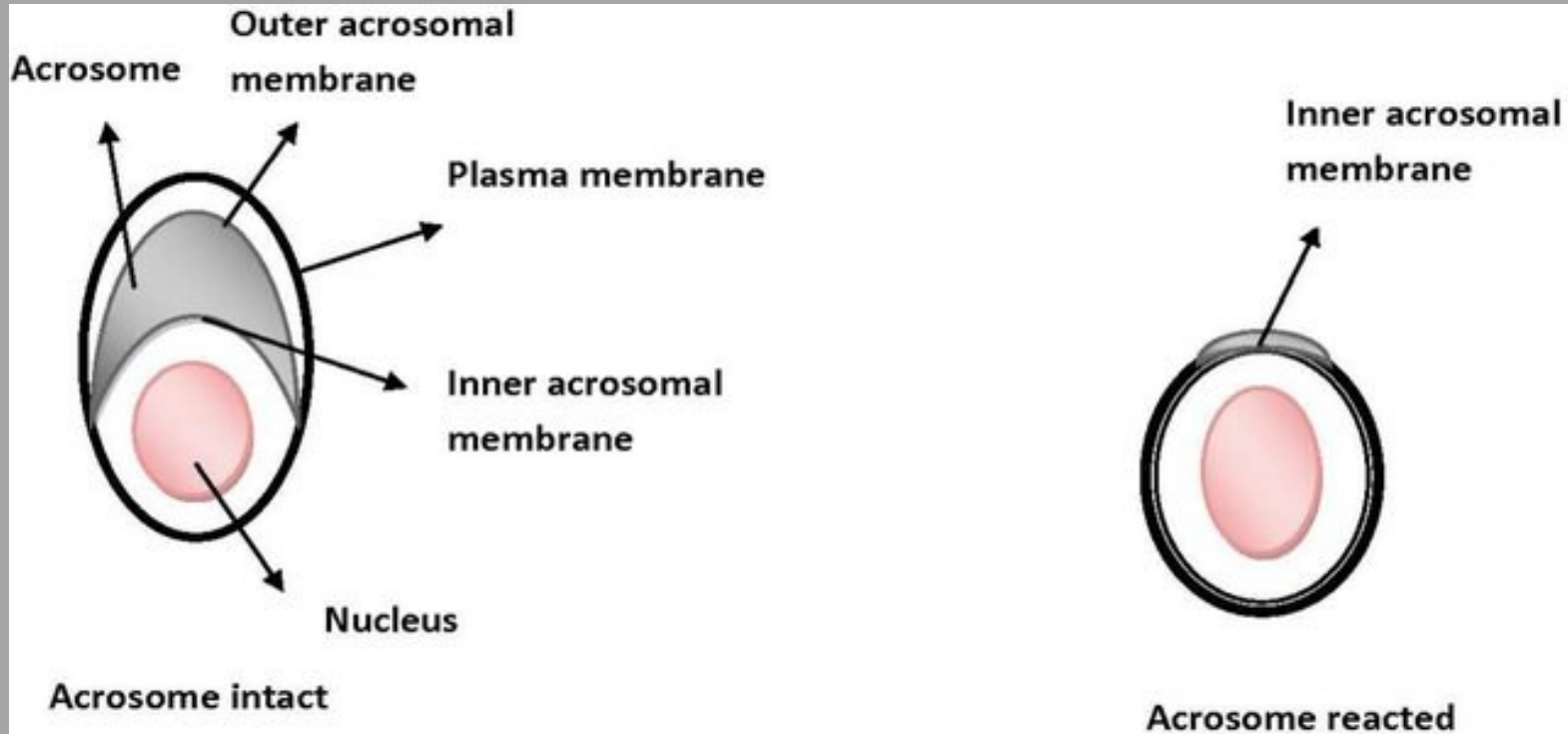
- Ακολουθεί την αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου.
- Σύντηξη της μεμβράνης του ακροσώματος με αυτή του σπερματοζωαρίου.
- Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων από το σπερματοζωάριο (ακροσίνη).

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



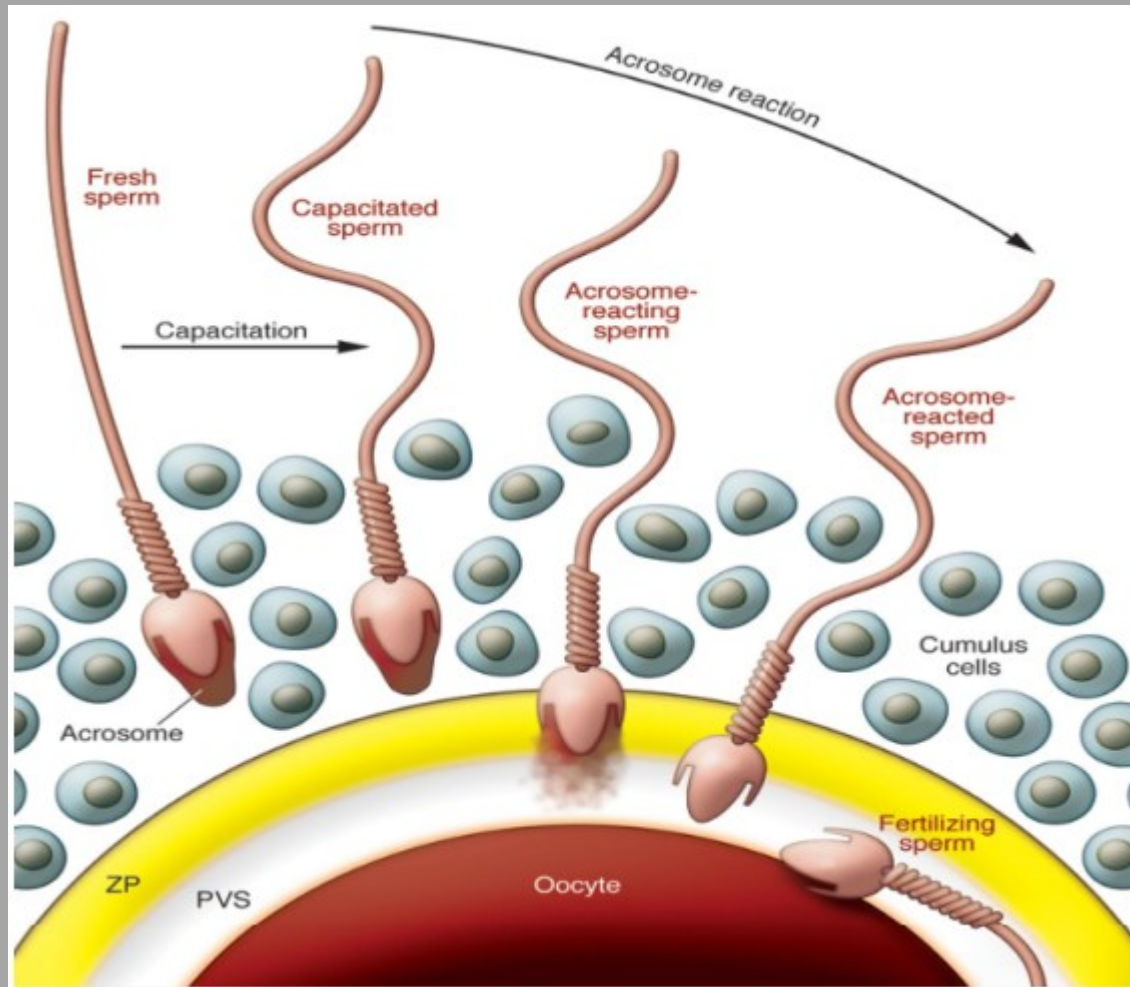
- Επάγεται από την αλληλεπίδραση της ZP3 με υποδοχείς της στη μεμβράνη του σπερματοζωαρίου.
- Ένας από αυτούς β-γαλακτοσουλτρανσφεράση I - ενεργοποιεί μέσω πρωτεϊνών G έναν καταρράκτη που έχει ως αποτέλεσμα το **άνοιγμα διαύλων Ca^{2+}** γεγονός που προκαλεί την εξωκυττάρωση των περιεχομένων του ακροσωματίου.
- Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (**πρωτεάση σερίνης ακροσίνη** - υδρόλυση διαφανούς ζώνης – μονοπάτι διέλευσης του σπερματοζωαρίου).

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



- Επάγεται από την αλληλεπίδραση της ZP3 με υποδοχείς της στη μεμβράνη του σπερματοζωαρίου.
- Ένας από αυτούς β-γαλακτοσυλτρανσφεράση I - ενεργοποιεί μέσω πρωτεϊνών G έναν καταρράκτη που έχει ως αποτέλεσμα το **άνοιγμα διαύλων Ca^{2+}** γεγονός που προκαλεί την εξωκυττάρωση των περιεχομένων του ακροσωματίου.
- Απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (**πρωτεάση σερίνης ακροσίνη** - υδρόλυση διαφανούς ζώνης – μονοπάτι διέλευσης του σπερματοζωαρίου).

3. Η ακροσωμική αντίδραση: απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



doi:10.7537/marsaaj091117.04.

(B) MOUSE

(1) Sperm activated by female reproductive tract

Flagellum Nucleus Acrosome

(2) Sperm binds zona pellucida

(3) Acrosomal reaction

(4) Sperm lyses hole in zona

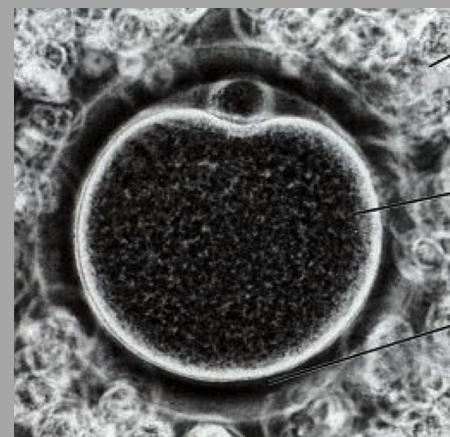
(5) Sperm and egg membranes fuse

← Cumulus layer (extracellular coat) →

Zona pellucida (extracellular matrix)

Egg cell membrane

Στάδιο 5: Σύντηξη γαμετών

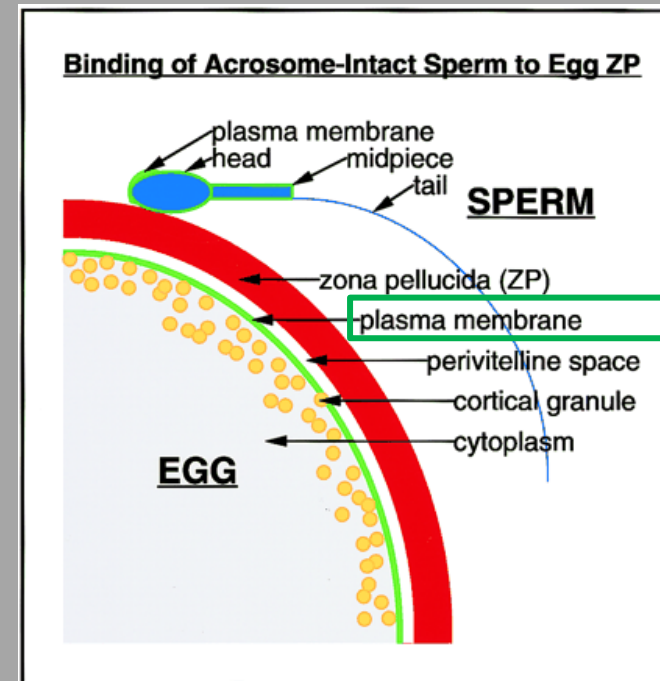


ακτινωτός
στέφανος
(cumulus)

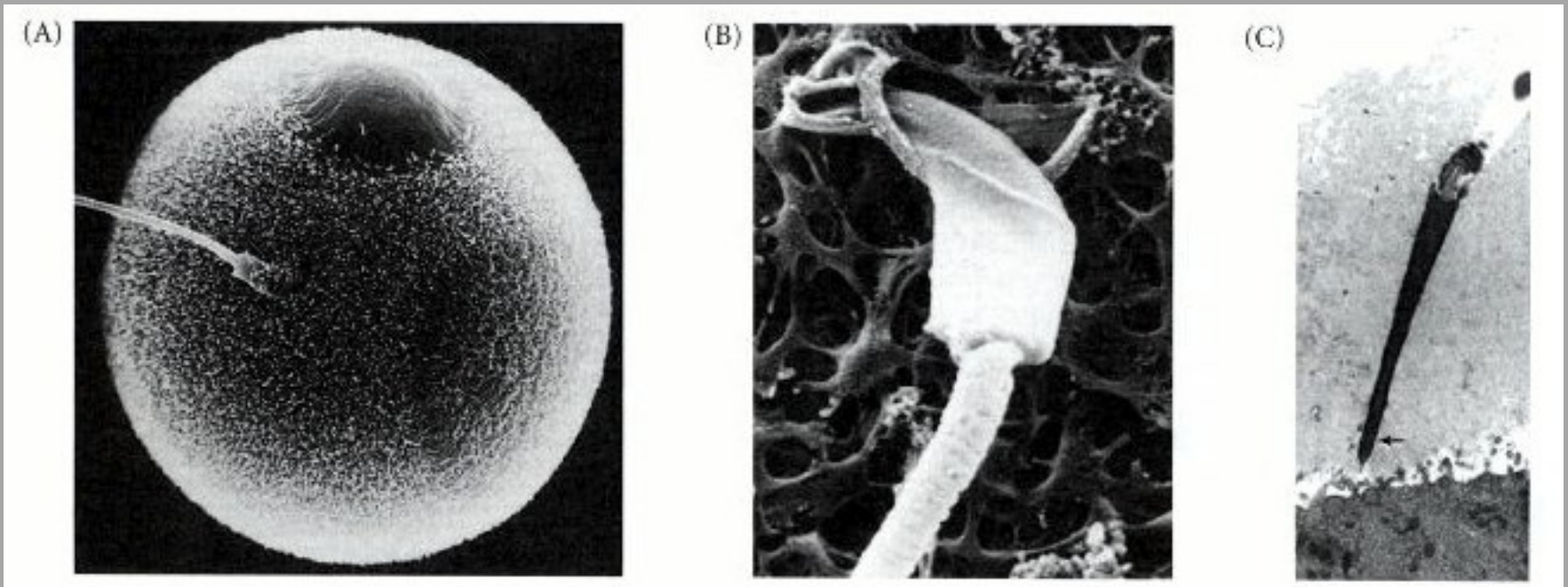
διαυγής
ζώνη (zona
pellucida)

5. Σύντηξη γαμετών

- Στο στάδιο μετά την ακροσωμική αντίδραση η αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου διεκπεραιώνεται από τις ADAM στις οποίες προσδένεται το ωάριο.
- Οι **ADAM** είναι πρωτεΐνες του σπερματοζωαρίου (A disintegrin and Metalloprotease domain) : φερτιλίνη α, φερτιλίνη β και κυριτεστίνη.
- Η επώαση σε πειράματα γονιμοποίησης *in vitro* σε θρεπτικό μέσο παρουσία πεπτιδίων φερτιλίνης β : παρεμπόδιση της πρόσδεσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο.
- Τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει η φερτιλίνη β ή η κυριτεστίνη εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα. Γιατί;
- Πιθανός στόχος των ADAM στην επιφάνεια του **ωαρίου** : η **ιντεγκρίνη α6**.
- Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της α6 παρεμποδίζουν την γονιμοποίηση *in vitro*.
- Ωστόσο τα knock out ιντεγκρίνης 6 έχουν φυσιολογική γονιμότητα. Γιατί;

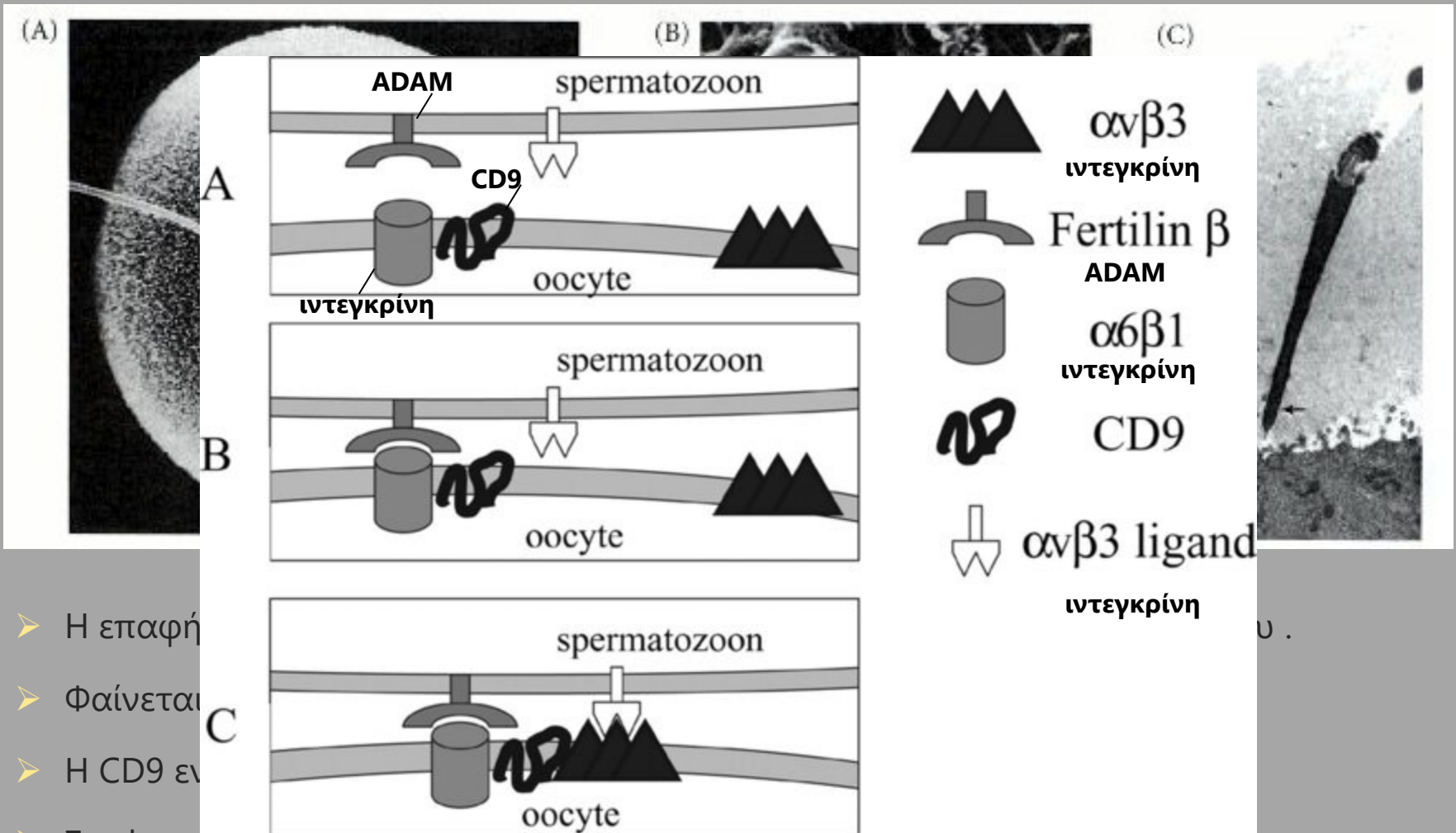


5. Σύντηξη γαμετών

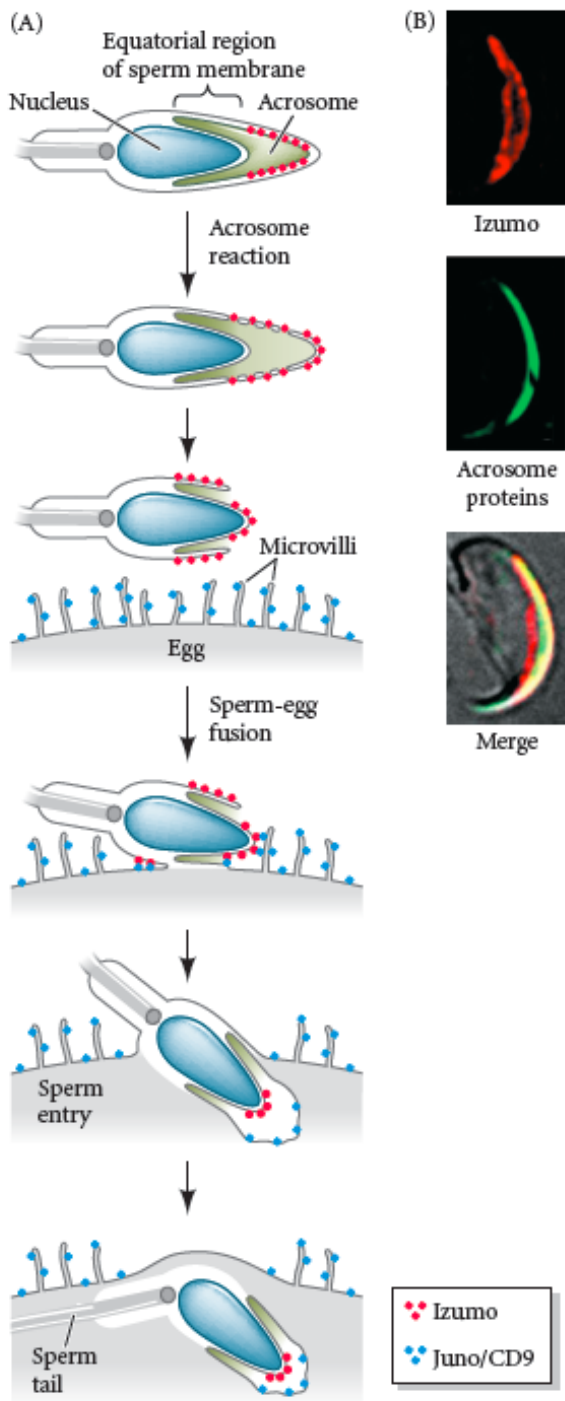


- Η επαφή ωαρίου-σπερματοζωαρίου γίνεται στο πλαϊό του σπερματοζωαρίου .
- Φαίνεται ότι ενέχεται μια πρωτεΐνη που συνδέεται με ιντεγκρίνες η CD9.
- **Η CD9 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ωαρίου.**
- Στο knock-out του CD9 τα θηλυκά είναι στείρα- αποτυχία στη σύντηξη.
- Μπορεί να γίνει διάσωση με ένεση mRNA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

5. Σύντηξη γαμετών



- Η επαφή
- Φαίνεται
- Η CD9 εν
- Στο knock-out του CD9 τα θηλυκά είναι στείρα- αποτυχία στη σύντηξη.
- Μπορεί να γίνει διάσωση με ένεση mRNA του CD9.



5. Σύντηξη γαμετών

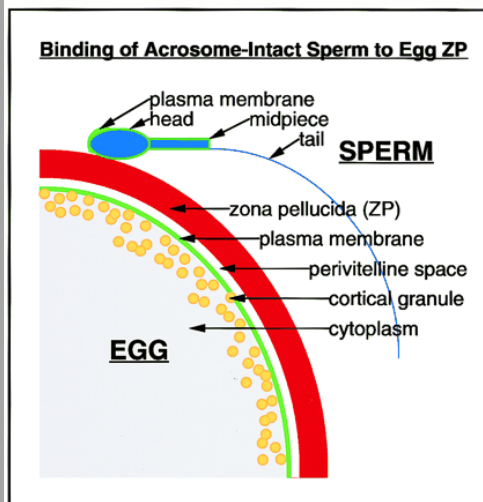
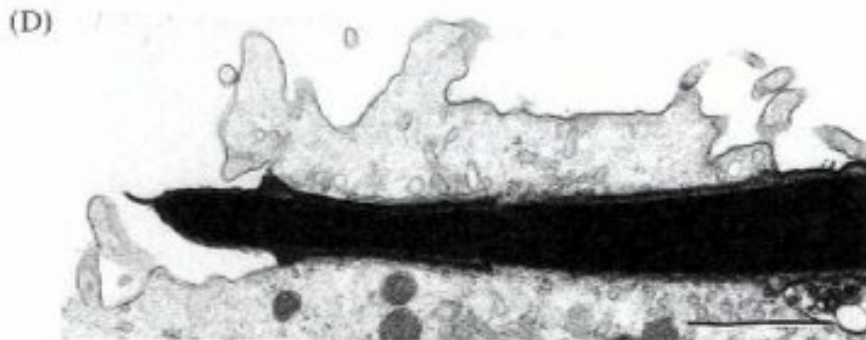
Izumo: πρωτεΐνη σπερματοζωαρίων. Αρχικά βρίσκεται στη μεμβράνη του ακροσώματος αλλά εκτίθεται στην εξωτερική μεμβράνη μετά την ακροσωμική αντίδραση.

- Κατά τη σύντηξη περιορίζεται στην περιοχή επαφής των γαμετών.
- Knock out του γονιδίου *Izumo* - τα σπερματοζώαρια περνούν τη διαφανή ζώνη αλλά δεν ολοκληρώνουν τη σύντηξη.

Juno: στην επιφάνεια του ωαρίου.

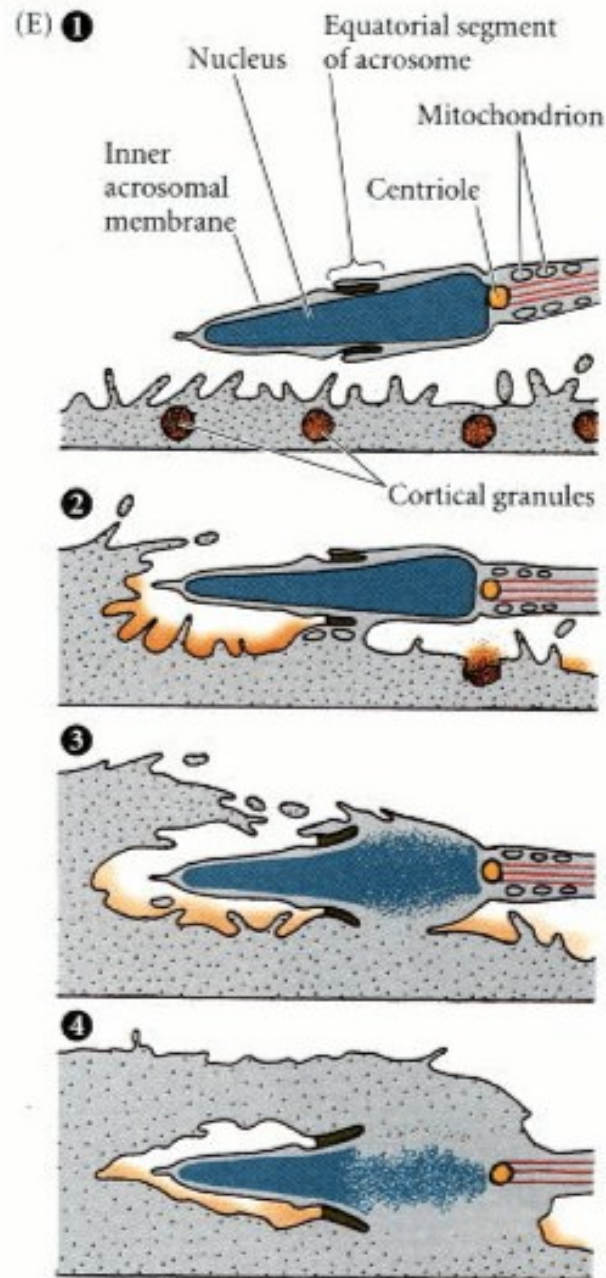
- Η CD9 στρατολογείται στη μεμβράνη του ωοκυττάρου από την Juno.
- Η Juno αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη του σπερματοζωαρίου την Izumo (με επικράτειες ανοσοσφαιρίνης).
- Knock out του γονιδίου *Juno* ούτε πρόσδεση του σπερματοζωαρίου και ούτε σύντηξη γαμετών.

Η αντίδραση του φλοιού

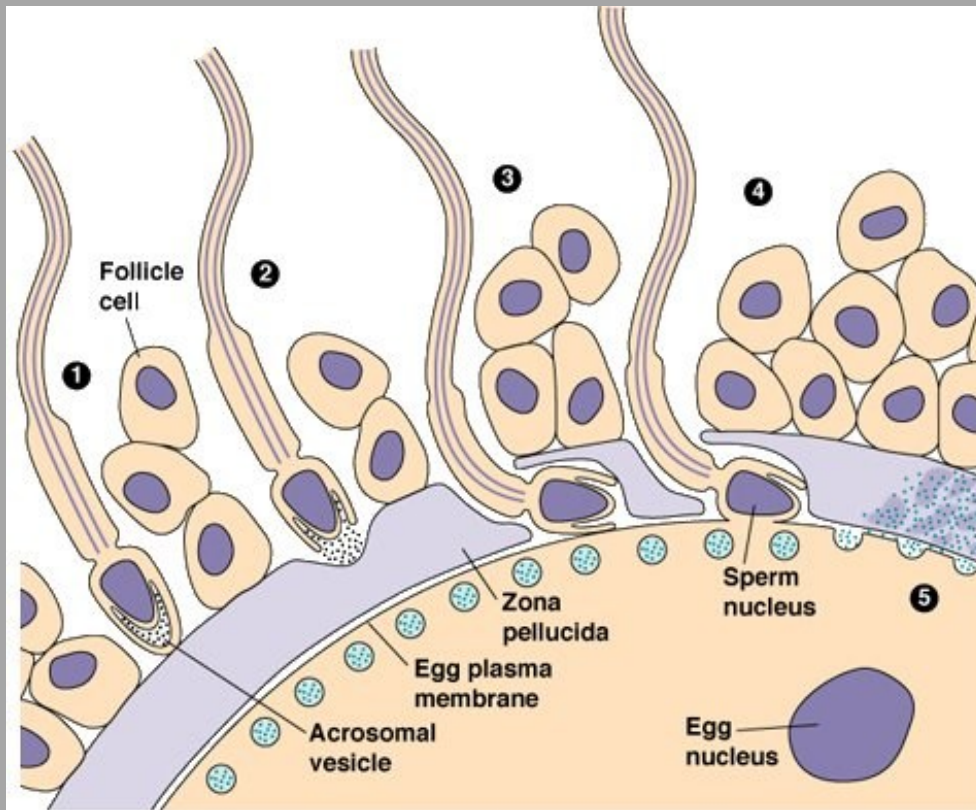


Στο φλοιό του ωοκυττάρου εντοπίζονται κυστίδια που περιέχουν τα φλοιϊκά κοκκία.

Κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου τα φλοιϊκά κυστίδια συντήκονται με τη μεμβρανή του ωοκυττάρου και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους.



Η αντίδραση του φλοιού

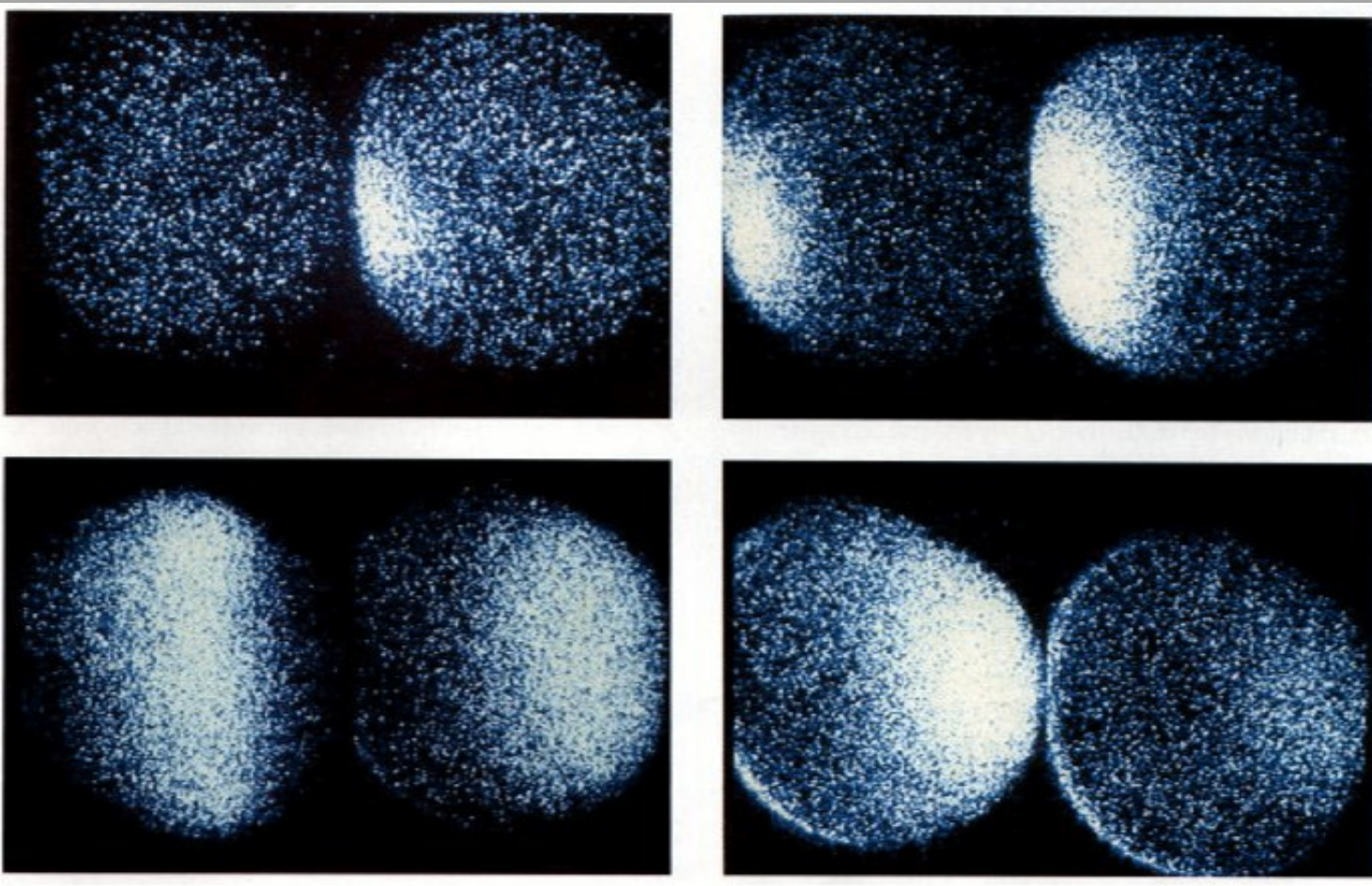


Τα φλοιϊκά κυστίδια περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες που τροποποιούν τη διαυγή ζώνη.

- N-ακετυλογλυκοσαμινιδάση αποκόπτει κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης από ZP3.
 - Πρωτεάσες που αποικοδομούν τη ZP2.
 - Αναστολείς της ακροσίνης
 - Οι ίδιοι μηχανισμοί που ενέχονται στην ακροσωμική αντίδραση φαίνεται ότι εμπλέκονται και στην αντίδραση του φλοιού.
- } Εξουδετερώνονται οι θέσεις πρόσδεσης στη ZP.

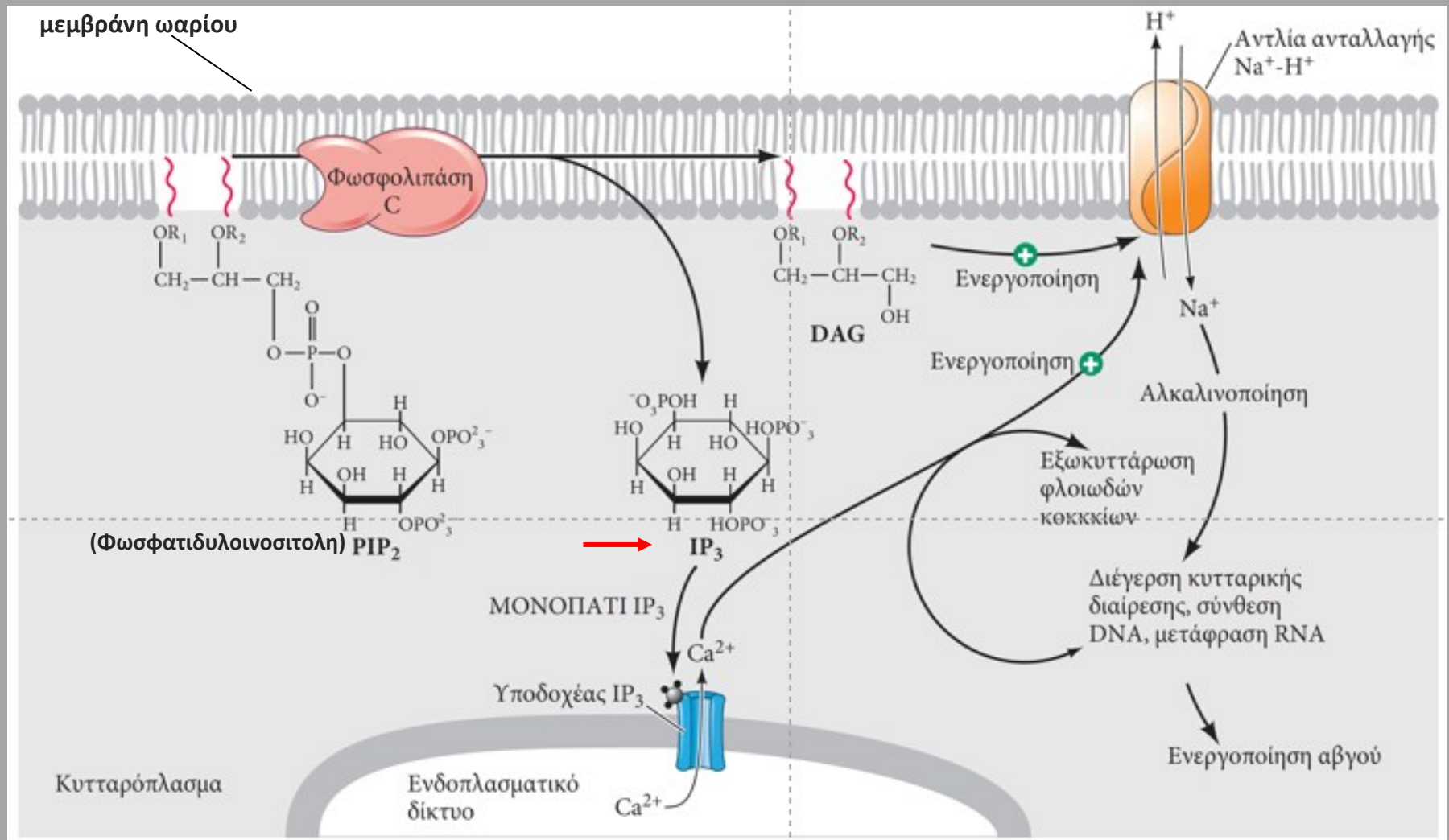
Φράγμα στην πολυσπερμία.

Απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca^{2+}



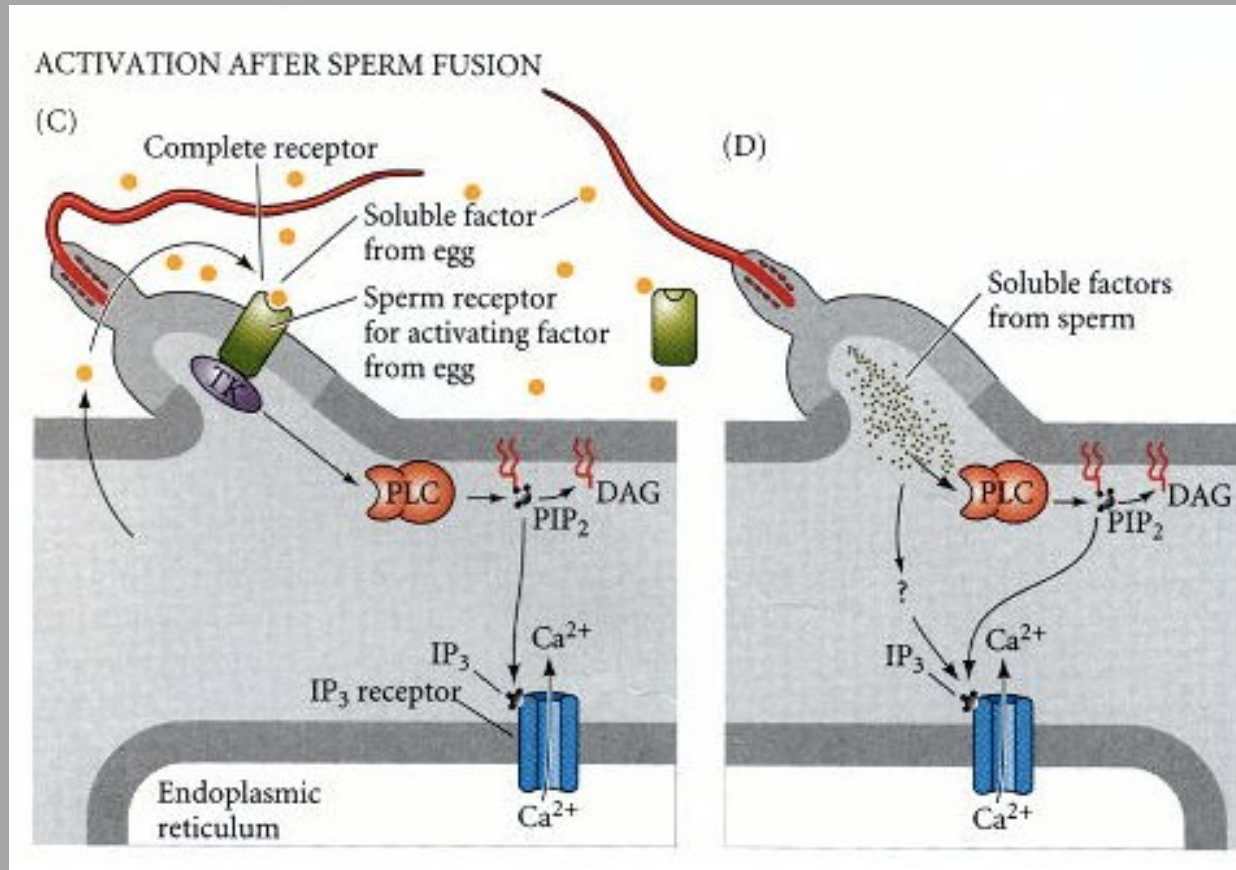
Η αντίδραση του φλοιού ξεκινά με την απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca^{2+} .

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



- Το IP₃ ενέχεται στην απελευθέρωση Ca²⁺ (παρεμποδίζοντας τον υποδοχέα του αναστέλλεται η απελευθέρωση του Ca²⁺).
- Το IP₃ παράγεται από τη διάσπαση PIP₂ μετά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC).

Τι ενεργοποιεί τη φωσfolιπάση C;

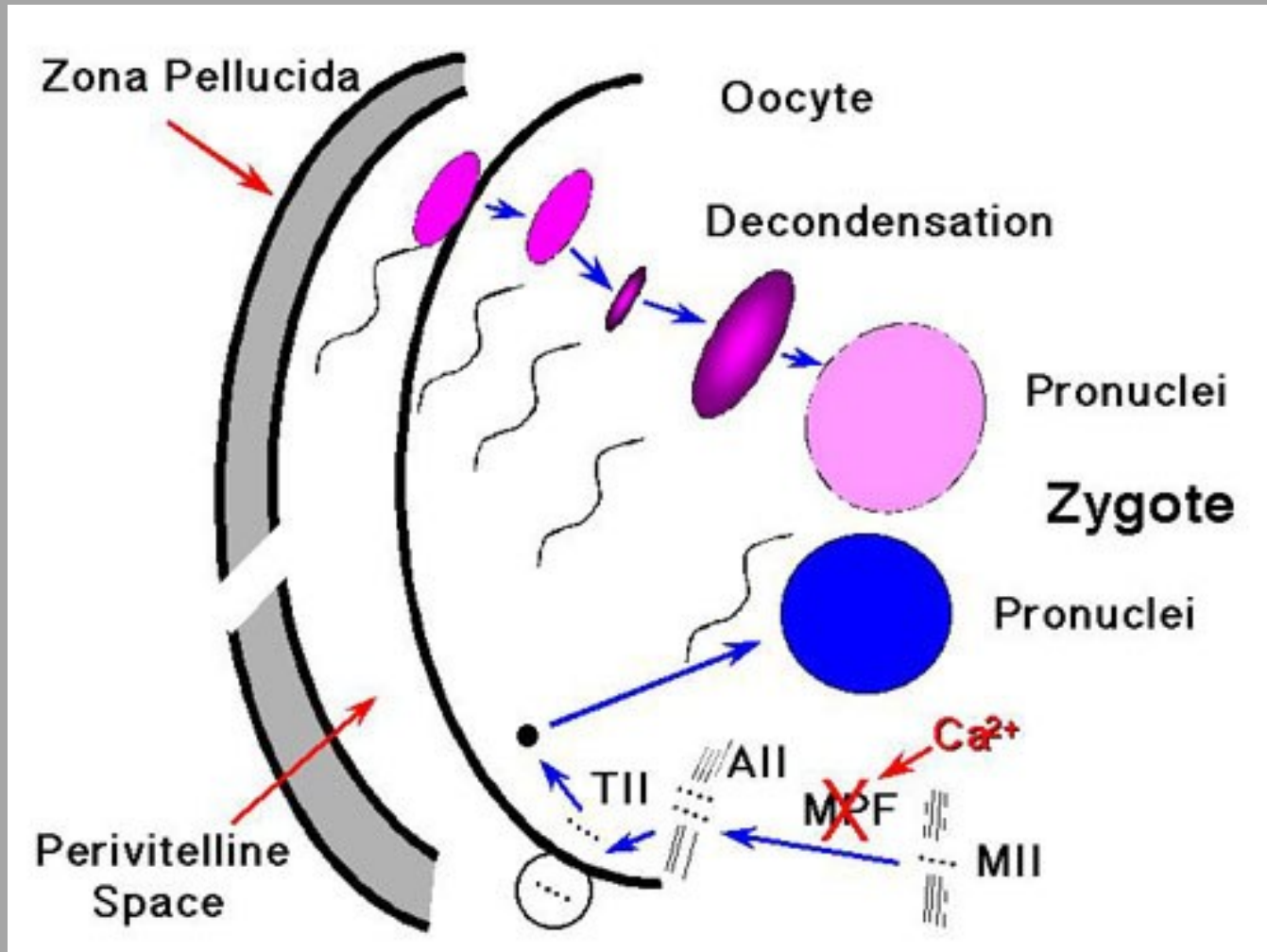


- Υπάρχουν αρκετές φωσfolιπάσες.
- Υπάρχουν πολλά πιθανά μονοπάτια ενεργοποίησής τους.
- Υπάρχουν διαφορές από είδος σε είδος.
- Στα θηλαστικά φαίνεται ότι η απελευθέρωση του Ca²⁺ επιτυγχάνεται μέσω του ελαχιστου κυτταροπλάσματος που περιβάλλει τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου: δύο τρόποι.

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

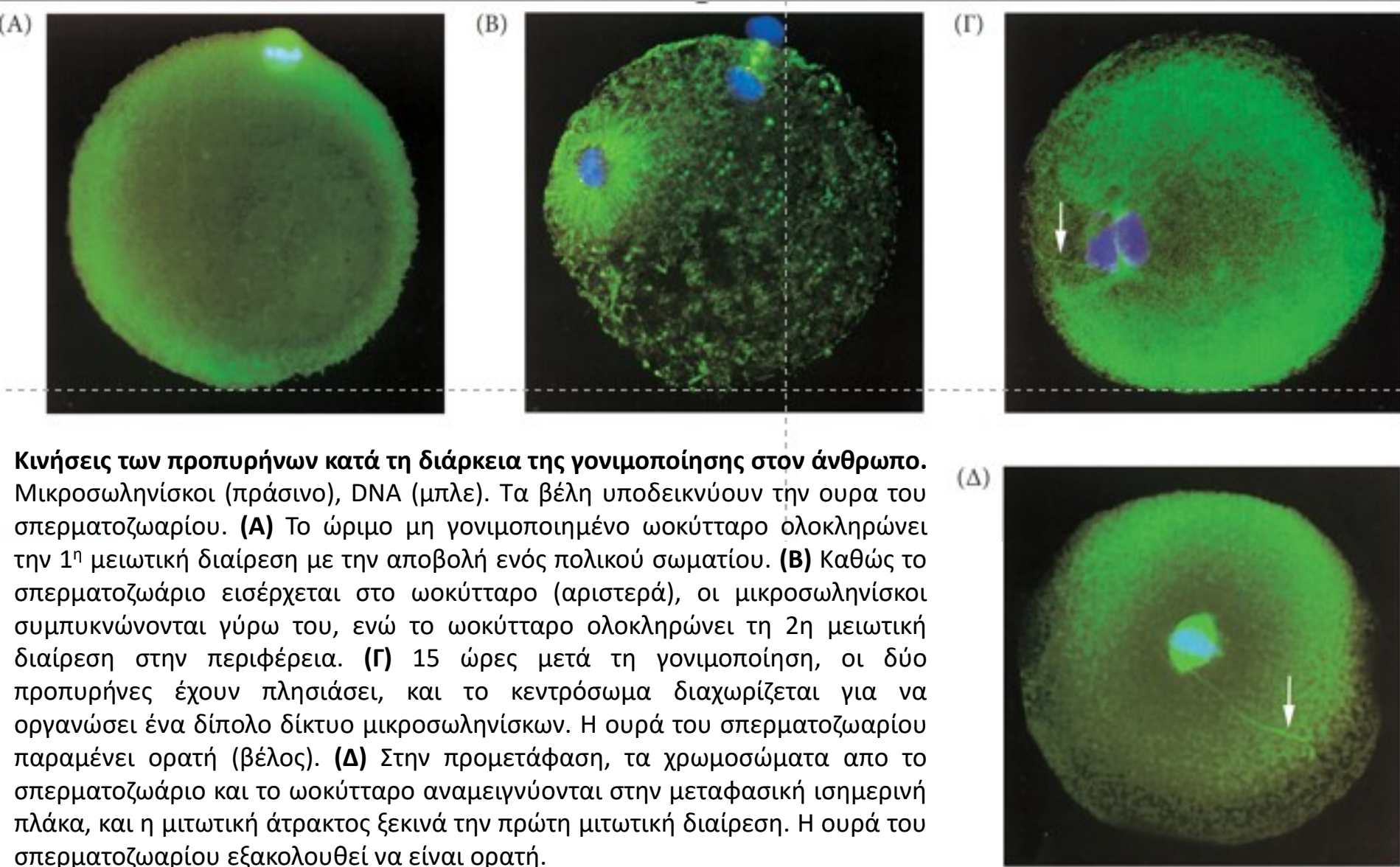
β) ύπαρξη ειδικής φωσfolιπάσης στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου (PLCζ)?

Μετανάστευση προπυρήνων



- Το Ca^{2+} που απελευθερώνεται ευθύνεται και για την επανέναρξη της μείωσης, και την έναρξη της σύνθεσης DNA (πρωτεόλυση κυκλινών κ.λ.π)
- Η σύνθεση DNA γίνεται ανεξάρτητα σε κάθε πυρήνα (σπερματοζωαρίο-ωοκύτταρο). Δεν υπάρχει σύντηξη πυρήνων.

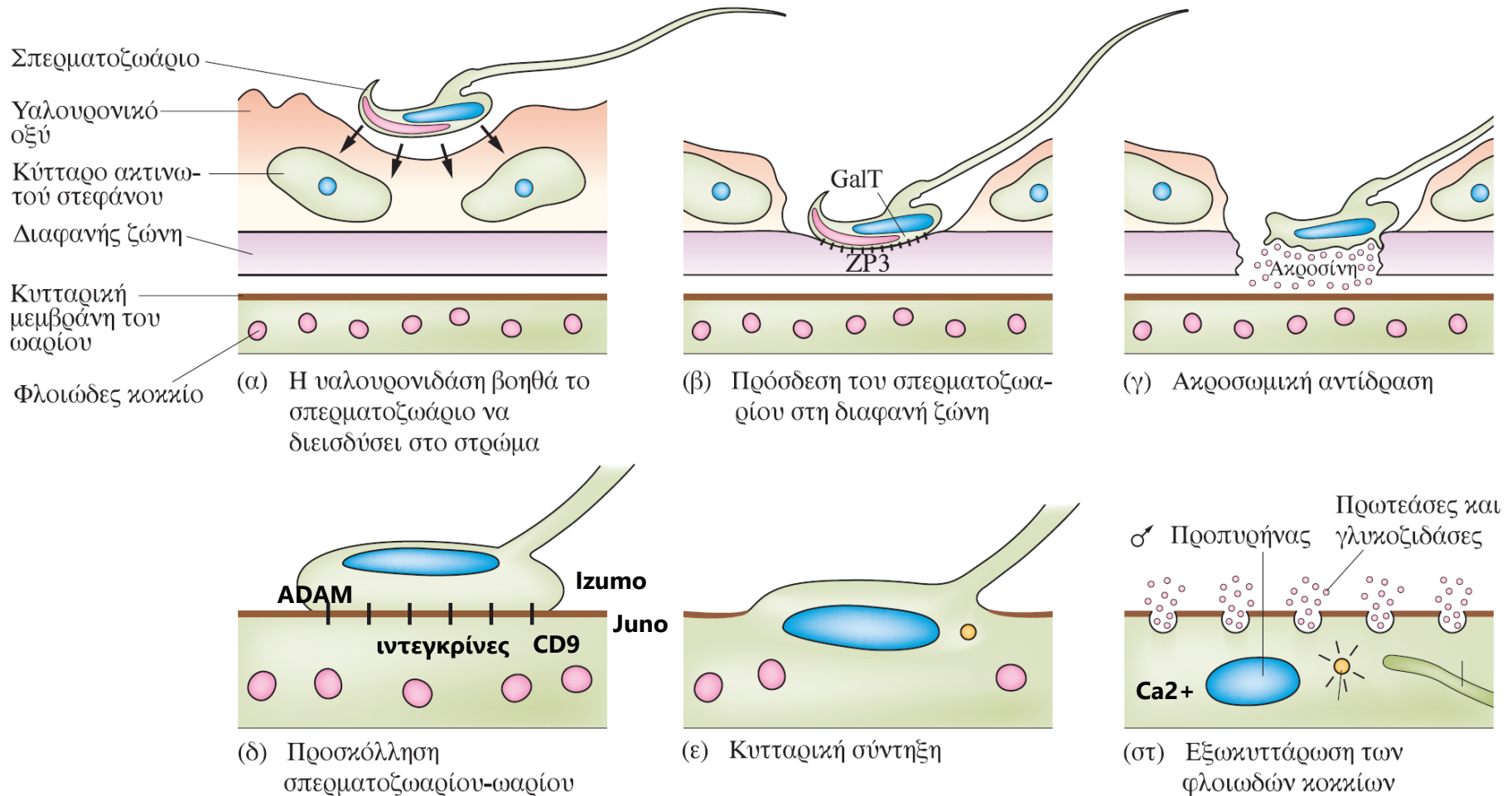
Μετανάστευση προπυρήνων



Κινήσεις των προπυρήνων κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης στον άνθρωπο. Μικροσωληνίσκοι (πράσινο), DNA (μπλε). Τα βέλη υποδεικνύουν την ουρά του σπερματοζωαρίου. **(Α)** Το ώριμο μη γονιμοποιημένο ωκύτταρο ολοκληρώνει την 1^η μειωτική διαίρεση με την αποβολή ενός πολικού σωματίου. **(Β)** Καθώς το σπερματοζωάριο εισέρχεται στο ωκύτταρο (αριστερά), οι μικροσωληνίσκοι συμπυκνώνονται γύρω του, ενώ το ωκύτταρο ολοκληρώνει τη 2^η μειωτική διαίρεση στην περιφέρεια. **(Γ)** 15 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οι δύο προπυρήνες έχουν πλησιάσει, και το κεντρόσωμα διαχωρίζεται για να οργανώσει ένα δίπολο δίκτυο μικροσωληνίσκων. Η ουρά του σπερματοζωαρίου παραμένει ορατή (βέλος). **(Δ)** Στην προμετάφαση, τα χρωμοσώματα απο το σπερματοζωάριο και το ωκύτταρο αναμειγνύονται στην μεταφασική ισημερινή πλάκα, και η μιτωτική άτρακτος ξεκινά την πρώτη μιτωτική διαίρεση. Η ουρά του σπερματοζωαρίου εξακολουθεί να είναι ορατή.

(Από Simerly et al. 1995, με την ευγενική παραχώρηση του G. Schatten.)

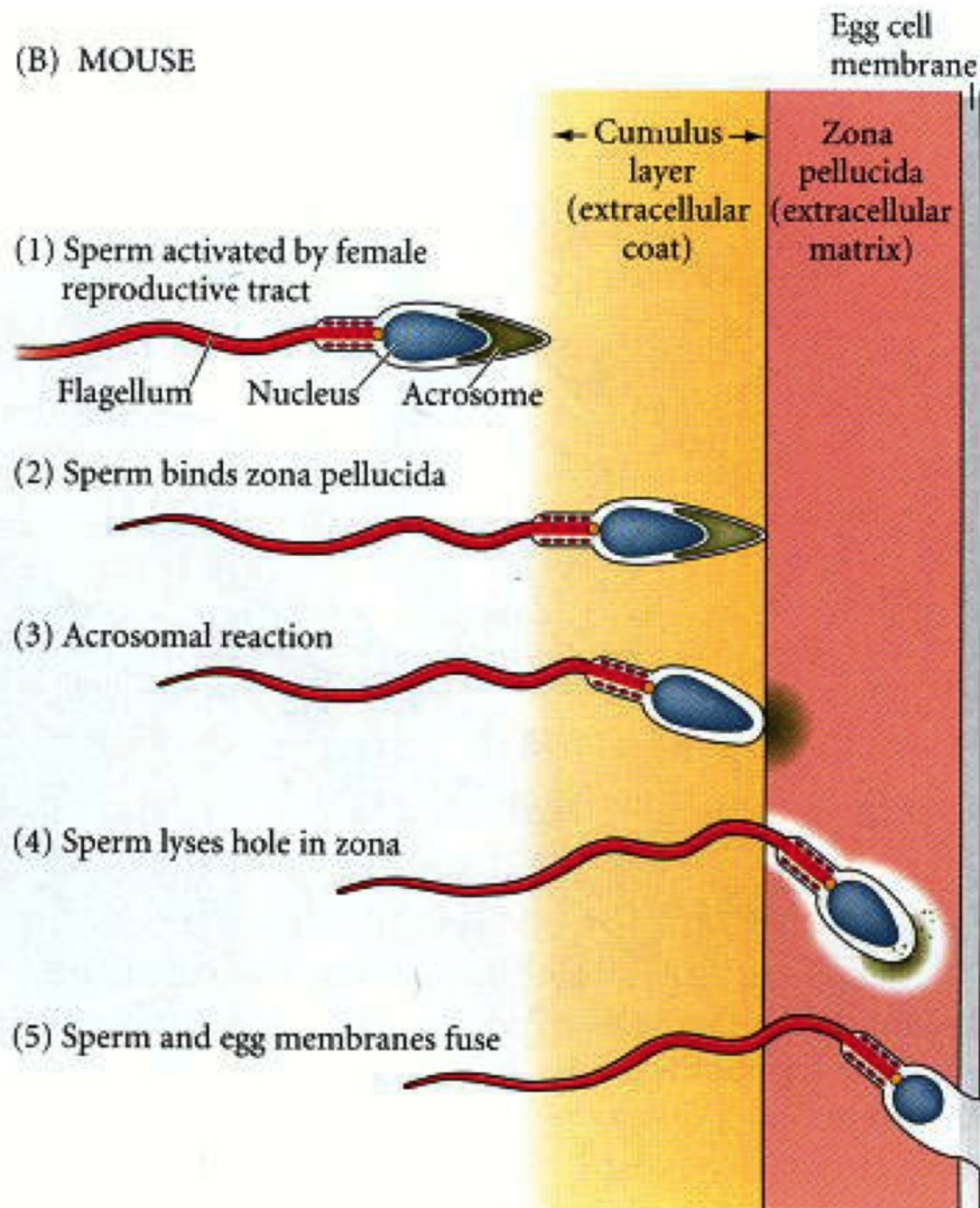
Η γονιμοποίηση στα θηλαστικά



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

Σύνοψη

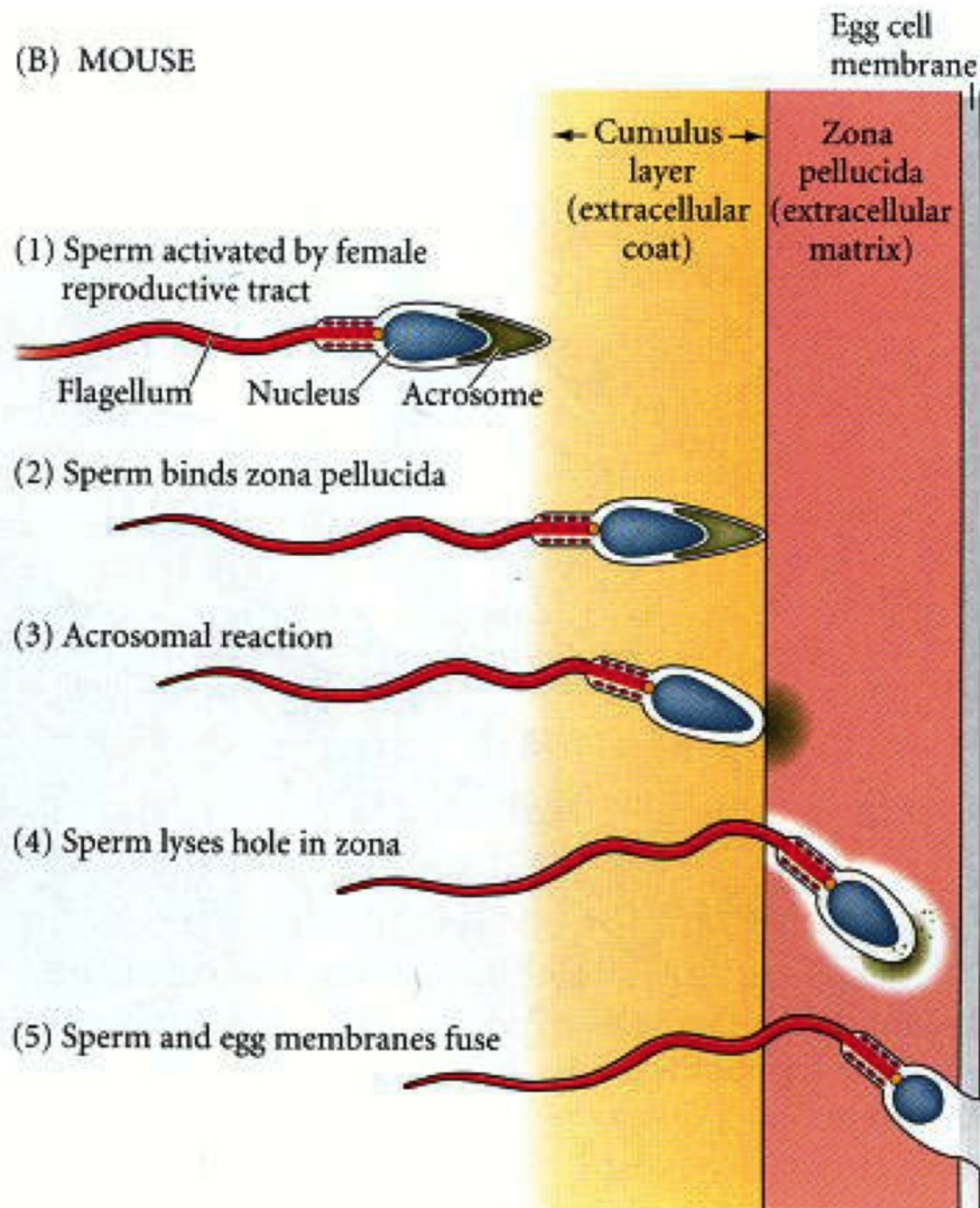
(B) MOUSE



- Απομάκρυνση της χοληστερόλης απο τις αλβουμίνες του ωαρίου, αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης, μετακίνηση πρωτεϊνών στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.
- Έκφραση υαλουρονιδασών (απο το σπερματοζωάριο) – πέρασμα απο ακτινωτό στέφανο.
- Αναγνώριση του σπερματοζωαρίου (GalT) απο την ZP3 της διάφανης ζώνης.
- Ακροσωμική αντιδραση - απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (ακροσίνη) – διέλευση απο τη διάφανη ζώνη.
- Αναγνώριση ωαρίου – σπερματοζωαρίου (συμμετοχή ADAM, ιντεγκρίνες, CD9, izumo, juno) .

Σύνοψη

(B) MOUSE



➤ Επαγωγή μονοπατιού PIP2 - Απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca^{2+} το οποίο οδηγεί σε:

– φράγμα στην πολυσπερμία (με την απελευθέρωση των πρωτεϊνών των φλοιϊκών κοκκίων του ωαρίου) και
– ολοκλήρωση της μείωσης από το ωοκύτταρο (ενεργοποίηση).

➤ Μετανάστευση προπυρήνων.

Pathway 2

Acrosome-intact sperm

Binding

Egg-ZP3

Acrosome reaction

Acrosome-reacted sperm

Binding

Egg-ZP2

Pathway 1

Acrosome-reacted sperm

Movement through zona pellucida

Cell membrane fusion
Fertilization

Cortical granule reaction

Inactivation of ZP2, ZP3
Prevention of further sperm binding

Για γενική γνώση....

Μελέτες έχουν δείξει πως υπάρχουν 2 πιθανά μονοπάτια για την αναγνώριση του σπερματοζωαρίου από την διαυγή ζώνη (zona pellucida).

Τα σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί την ακροσμική αντίδραση προσδένονται απευθείας στην πρωτεΐνη ZP2 της ζώνης (pathway 1) και αρχίζουν να δημιουργούν μια διαδρομή προς το ωοκύτταρο.

Τα σπερματοζωάρια με άθικτο το ακρόσωμα προσδένονται στη ZP3 (pathway 2): υφίστανται την ακροσμική αντίδραση επάνω στη διαυγή ζώνη (ZP3) και στη συνέχεια προσδένονται στη ZP2.

Όταν ένα σπερματοζωάριο φτάσει στο ωοκύτταρο και συγχωνευτεί με αυτό, τα φλοιώδη κοκκία απελευθερώνουν πρωτεΐνες που διασπούν τμήματα των ZP2 και ZP3, καθιστώντας τις μη λειτουργικές. Αυτό εμποδίζει την είσοδο επιπλέον σπερματοζωαρίων.



Well 02

0.4 h

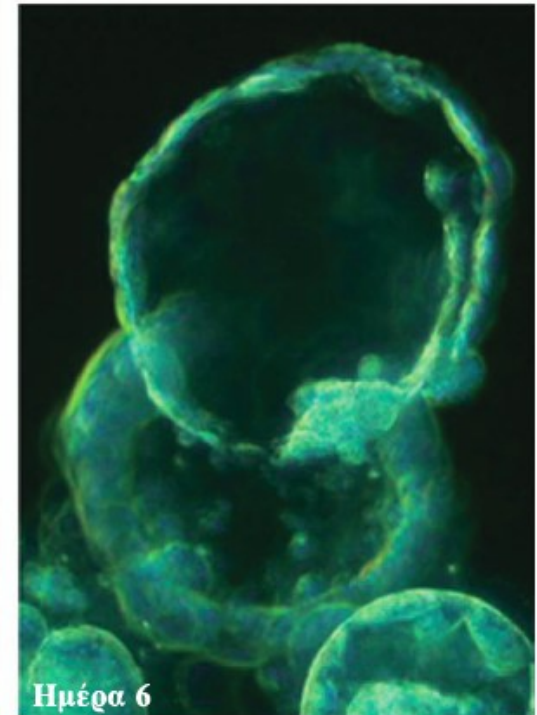
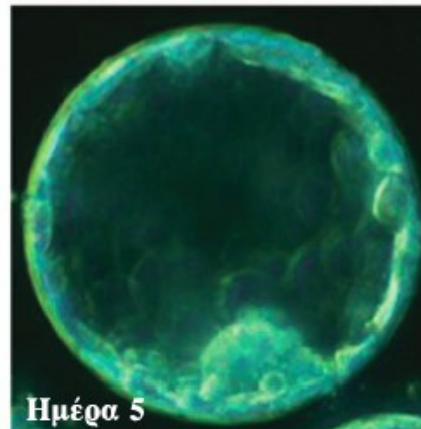
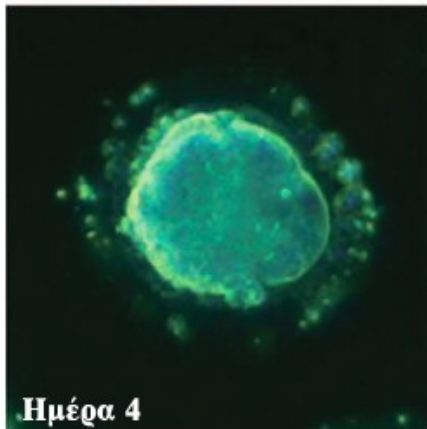
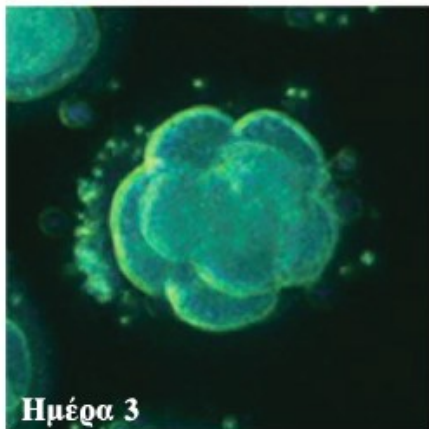
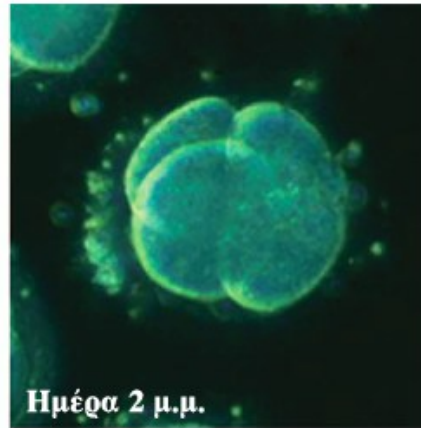
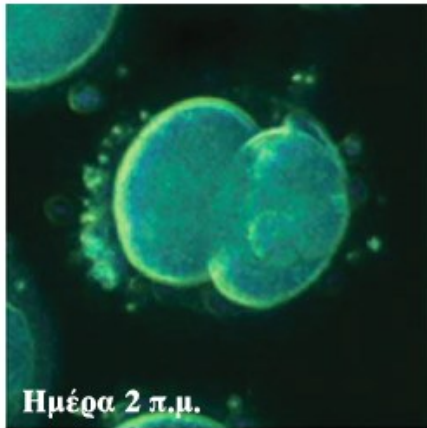
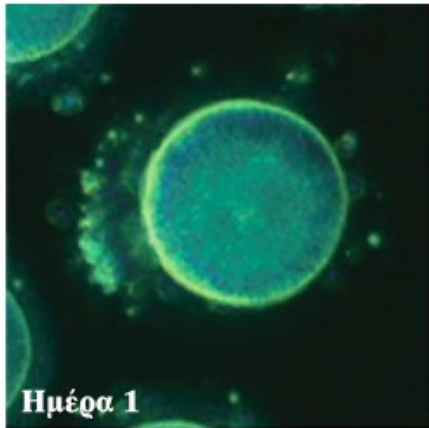
Τι είναι η αυλάκωση;

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



Αυλάκωση σε ένα ανθρώπινο έμβρυο

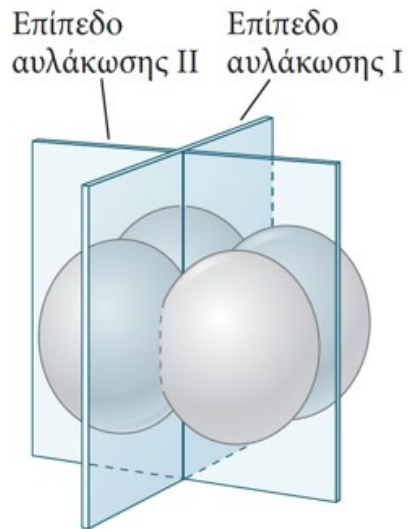
Τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπου



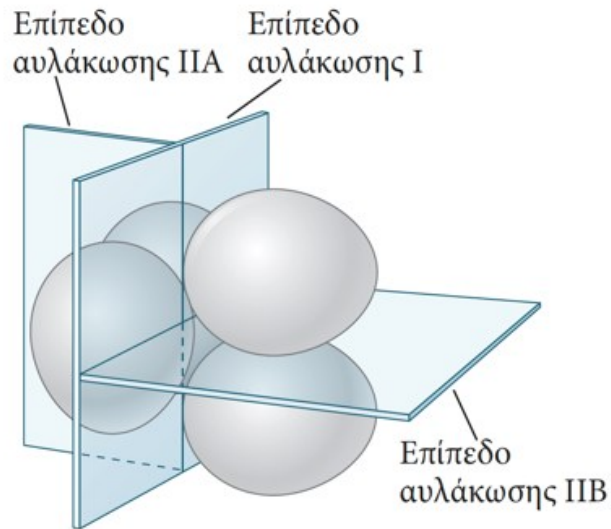
Γονιμοποιημένο ωάριο, στάδιο 2 κυττάρων, στάδιο 4 κυττάρων, στάδιο 8 κυττάρων, συμπαγές μορίδιο, βλαστοκύστη, εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη.

Περιστροφική αυλάκωση

(Α) Εχινόδερμα
και αμφίβια



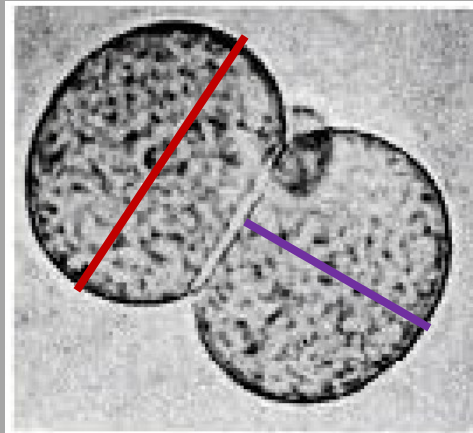
(Β) Θηλαστικά



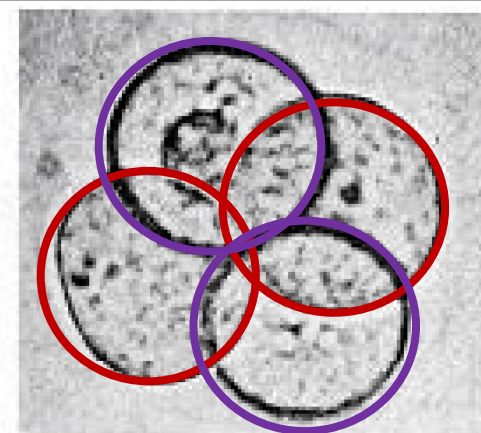
Πρώτο αυλακωτικό επίπεδο (I)
μεσημβρινό.

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

Δεξιά: Οι δύο πρώτες διαιρέσεις σε
ένα έμβρυο ποντικού.

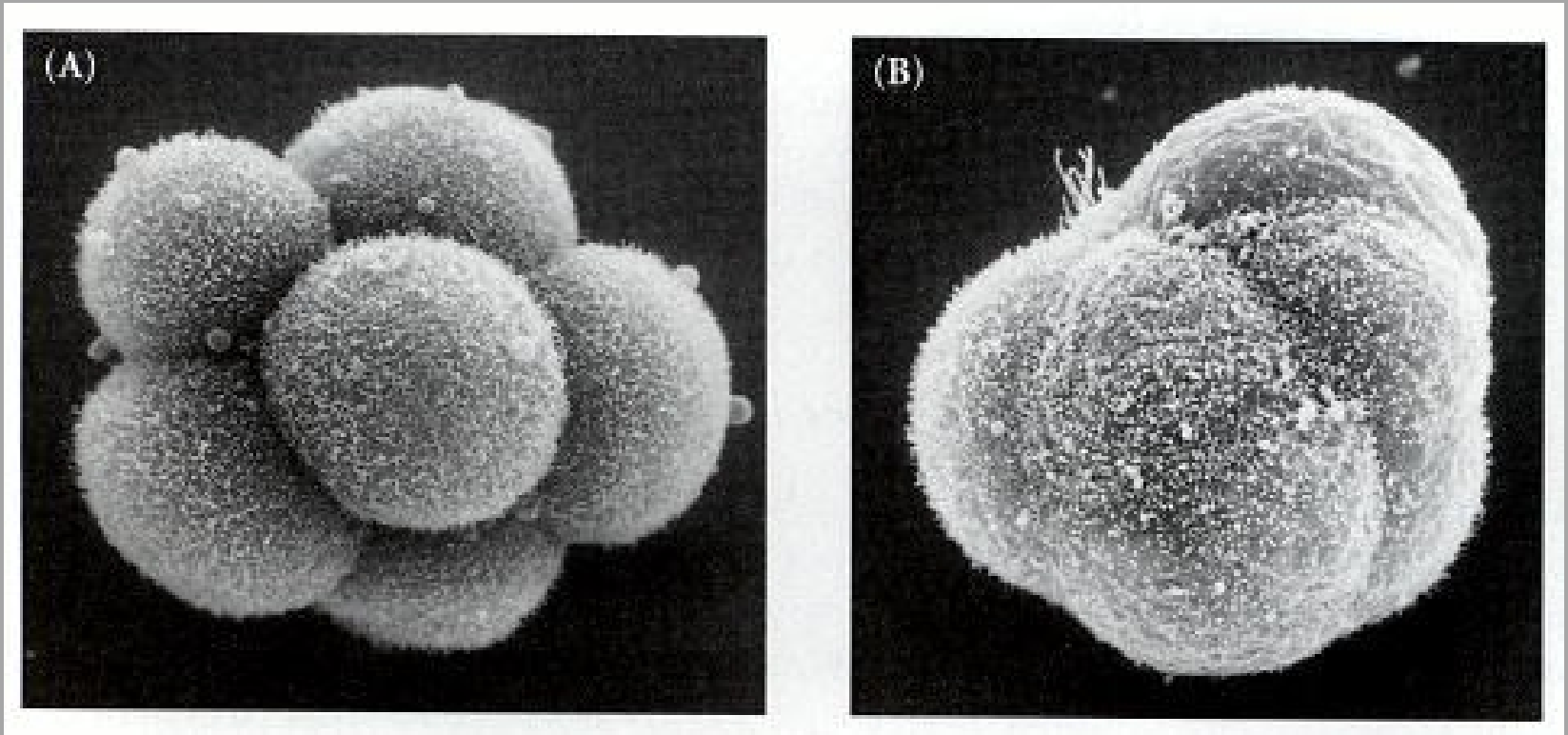


Στάδιο 2 κυτ.



Στάδιο 4 κυτ.

Σύμπτυξη (Πύκνωση)

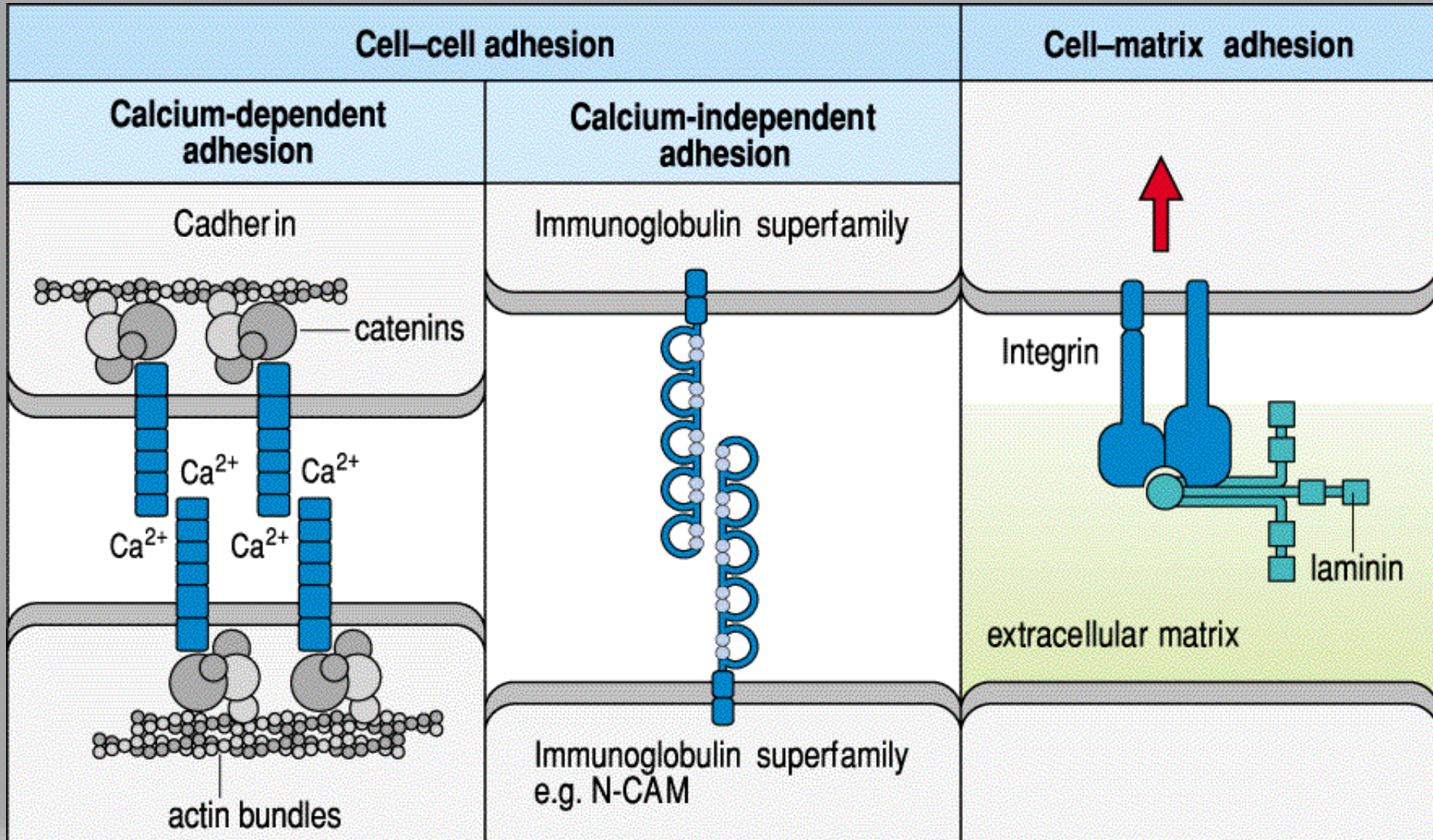


Μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων τα κύτταρα βρίσκονται σε ασθενή σύνδεση - φτιάχνοντας ένα χαλαρό συσσωμάτωμα.

(A). Μετά από την τρίτη κυτταρική διαίρεση όμως, τα κύτταρα σχηματίζουν μια συμπαγή δομή αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής τους.

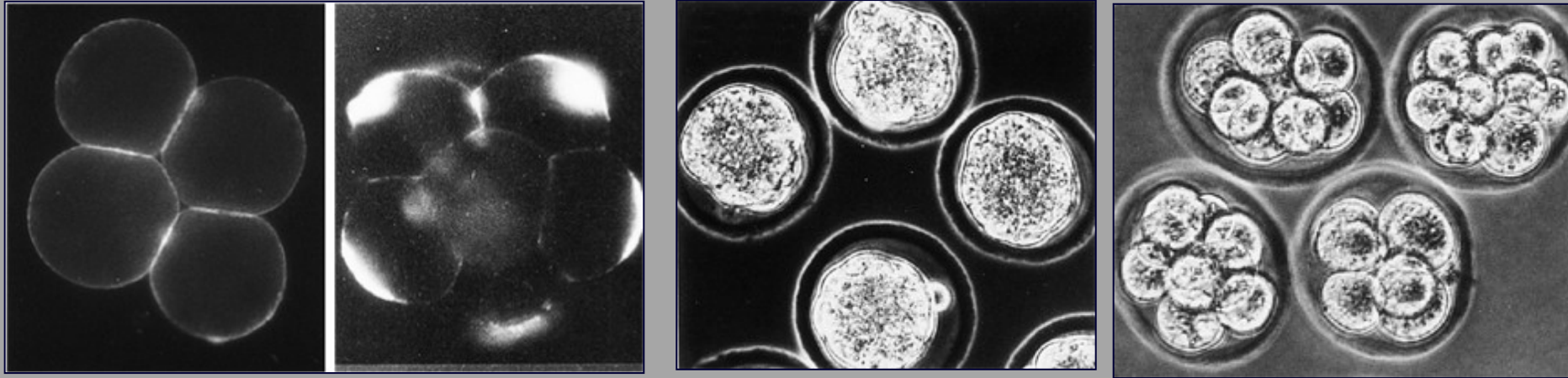
(B). Μετά την σύμπτυξη τα κύτταρα φέρουν στην εξωτερική επιφάνεια μικρολάχνες ενώ η εσωτερική τους επιφάνεια είναι λεία.

Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)



Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπληξη;

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



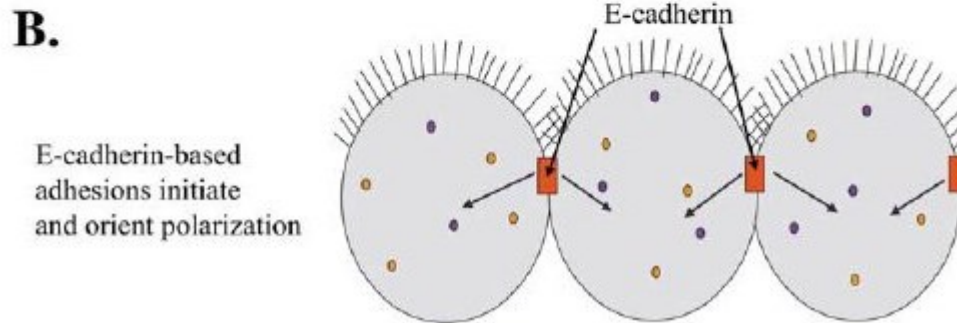
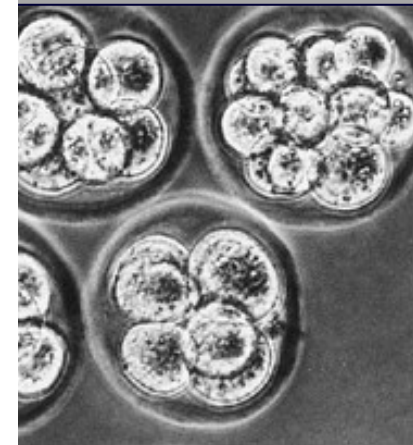
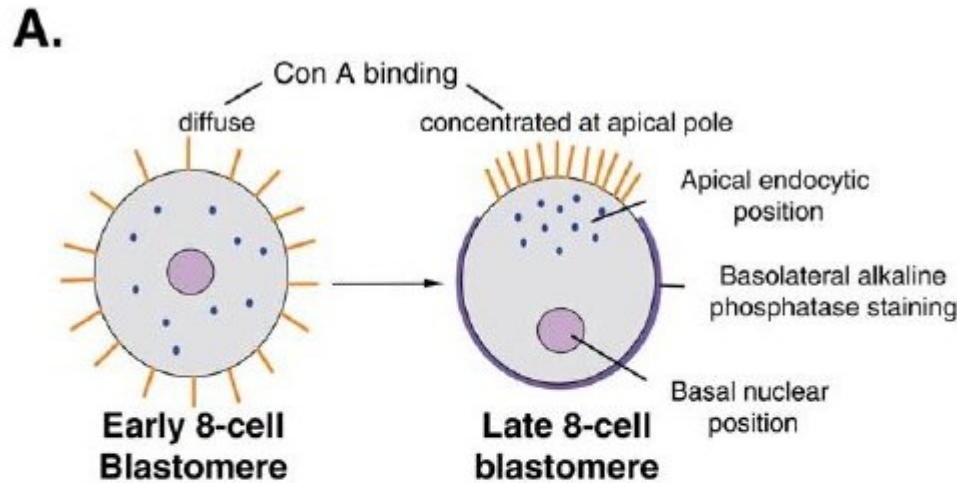
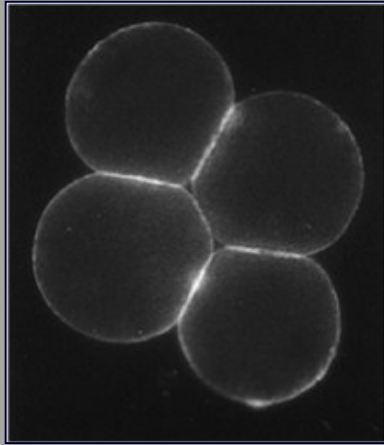
1: Πόλωση μεμβρανικών συστατικών σε βλαστομερίδια ποντικού (A) Ομοιογενής κατανομή- σήμανση με φθορίζουσα κονκαβαλίνη A (ορίζει την περιοχή σχηματισμού δεσμών), στο στάδιο των 4 κυτ. (B) Ετερογενής πολωμένη κατανομή στο στάδιο των 8 κυτ.

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

- Μόρια κυτταρικής συνάφειας π.χ. καδερίνη E.
- Δημιουργία tight junctions μεταξύ των εξωτερικών βλαστομεριδίων.
- Μεταβολές στον κυτταροσκελετό π.χ. σχηματισμός μικρολαχνών (βοηθούν στη δημιουργία των tight junctions).
- Στα εσωτερικά βλαστομερίδια δημιουργούνται gap junctions.

Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπτυξη;

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



1: Πόλωση μεμβρανικών
κονκαβαλίνη A (ορίζει την
στο στάδιο των 8 κυτ.

2: Αναστολή της πυκνωσ
(B) Πολλαπλασιασμός τω

ημανση με φθορίζουσα
ς πολωμένη κατανομή

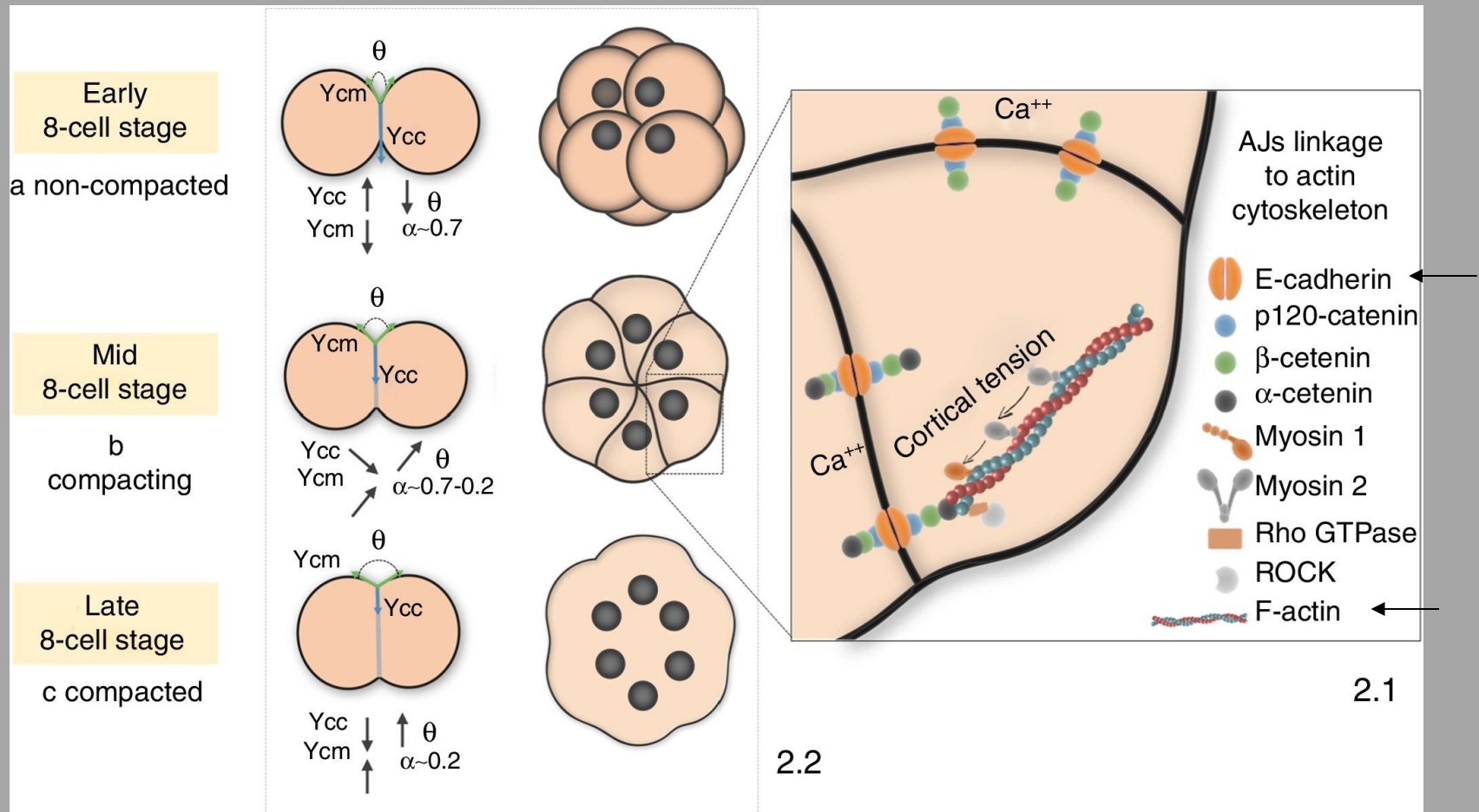
νωση απουσία αντιορού.
ης καντερίνης E.

➤ **Μόρια κυτταρική**

➤ **Δημιουργία tight junctions** μεταξύ των εξωτερικών βλαστομερισίων.

➤ Μεταβολές στον κυτταροσκελετό π.χ. σχηματισμός μικρολαχνών (βοηθούν στη δημιουργία των tight junctions).

Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η σύμπτυξη;

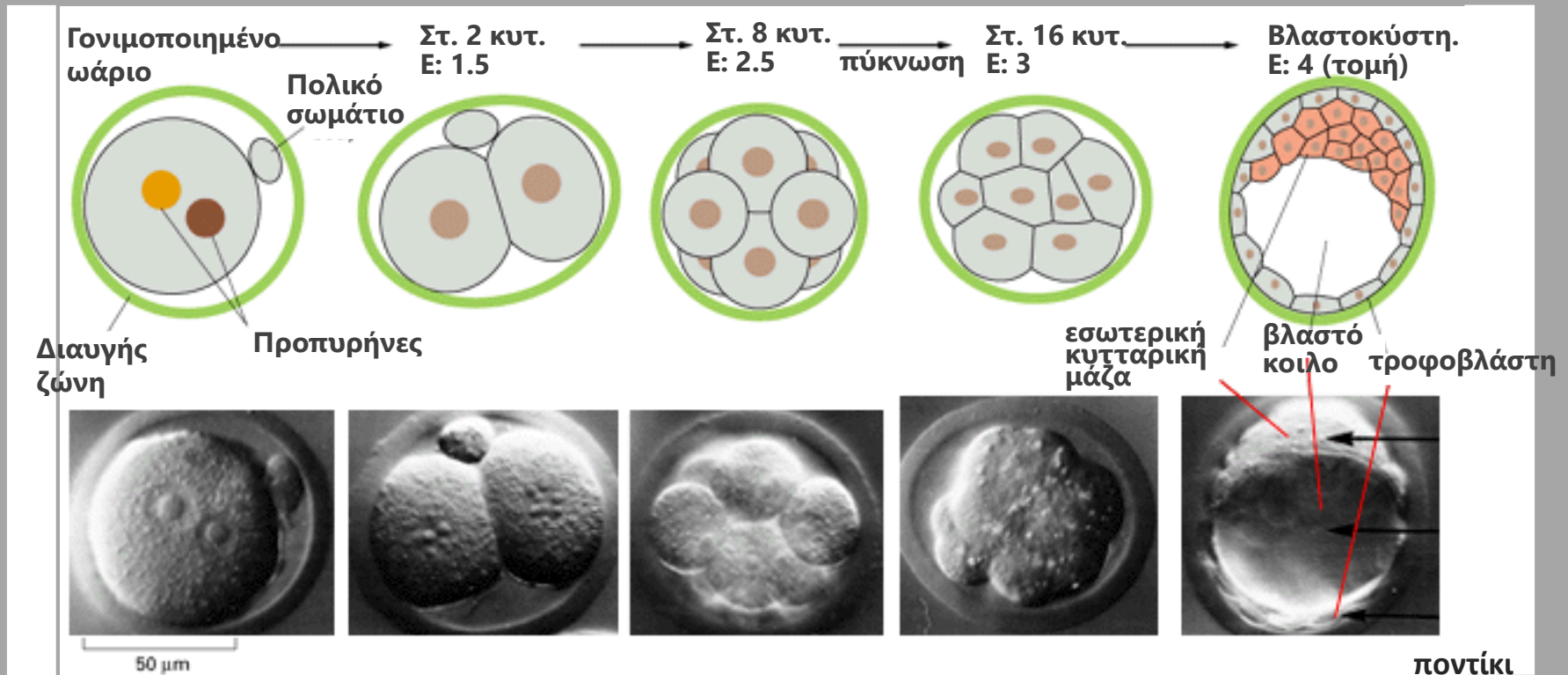


DOI: [10.1016/j.medre.2020.01.001](https://doi.org/10.1016/j.medre.2020.01.001)

Χαρακτηριστικά της αυλάκωσης στα θηλαστικά

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

Σχηματισμός μοριδίου και βλαστοκύστης



- **Μορίδιο (morula)**: 16 κύτταρα (αποτελείται από 1-2 εσωτερικά κύτταρα που περιβάλλονται από τα υπόλοιπα).
- **Βλαστοκύστη (blastocyst)**: 32 κύτταρα σε δύο ομάδες : την *εσωτερική κυτταρική μάζα* (inner cell mass) και την τροφοβλάστη (tropho-blast) που την περιβάλλει, και αντλεί υγρό έτσι ώστε να σχηματιστεί μια κοιλότητα (βλαστόκοιλο-blastocoel) στο εσωτερικό. Η αυλάκωση ολοκληρώνεται με μια ακόμη διαίρεση και ακολουθεί η εμφύτευση της βλαστοκύστης στη μήτρα.

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

1. Τροφοβλάστη

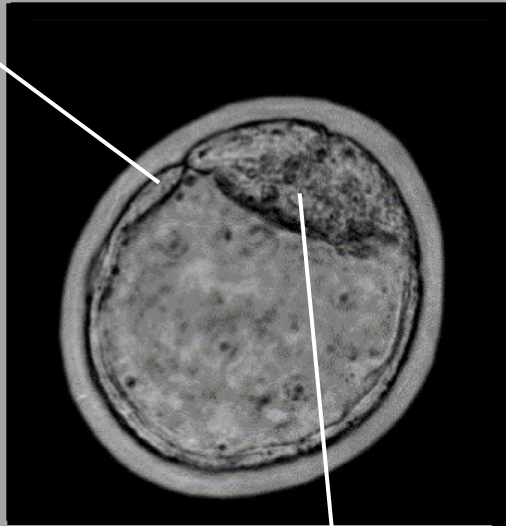


χόριο :

α. Θρέψη

β. Παραγωγή ορμονών

γ. Παραγωγή ουσιών που αναστέλλουν την απόρριψη του εμβρύου από τη μητέρα.



2. Εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ)

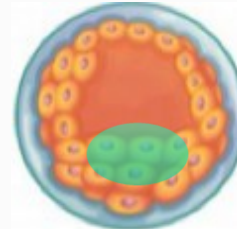
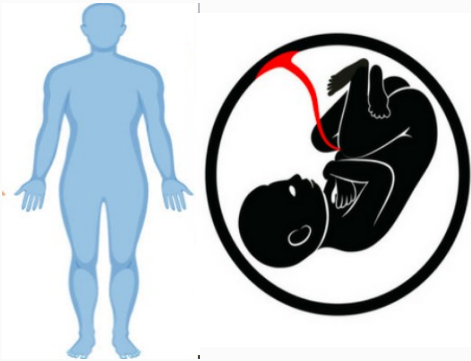


α. έμβρυο (τελικά το ζώο)

β. εξωεμβρυϊκές δομές

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

Βλαστοκύτταρα: τύποι



Όλους τους κυτταρικούς
τύπους του σώματος

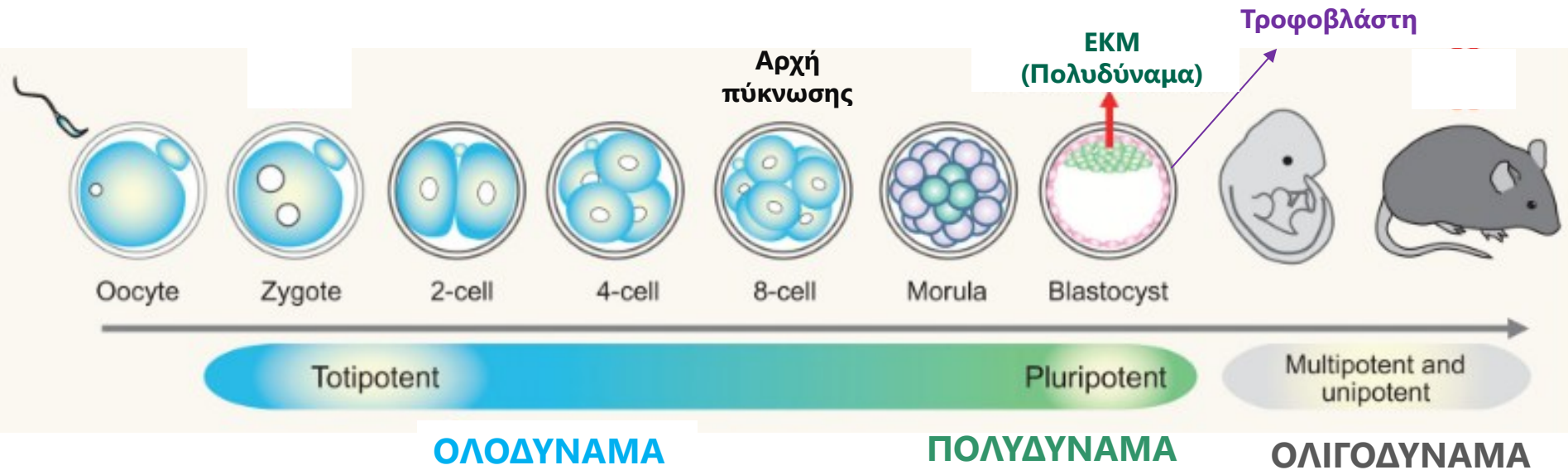


Απόγονοί τους
διαφοροποιούνται σε
μερικούς
κυτταρικούς τύπους
του σώματος
ΟΛΙΓΟΔΥΝΑΜΑ

Απόγονοί τους
διαφοροποιούνται σε
πολλούς
κυτταρικούς τύπους
του σώματος
ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ

Απόγονοί τους
διαφοροποιούνται σε
όλους τους
κυτταρικούς τύπους
ΟΛΟΔΥΝΑΜΑ

Δυναμικό βλαστοκυττάρων κατά την ανάπτυξη

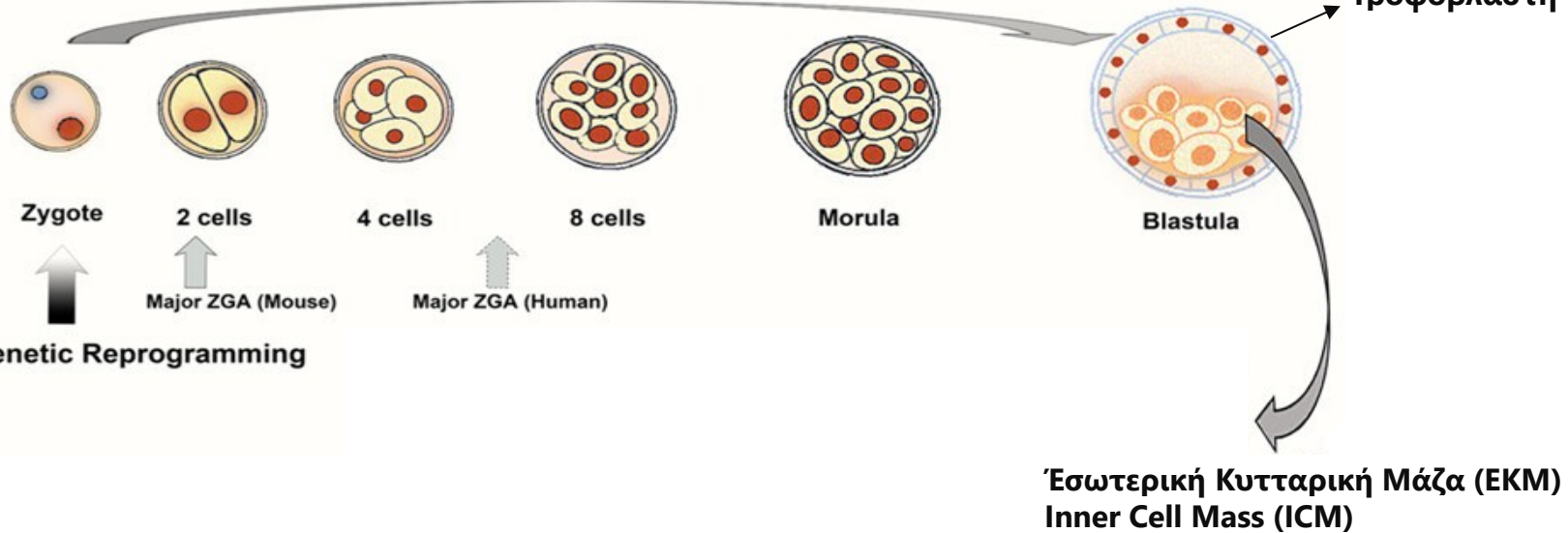


doi: 10.1093/nsr/nwv009

Totipotency

Pluripotency

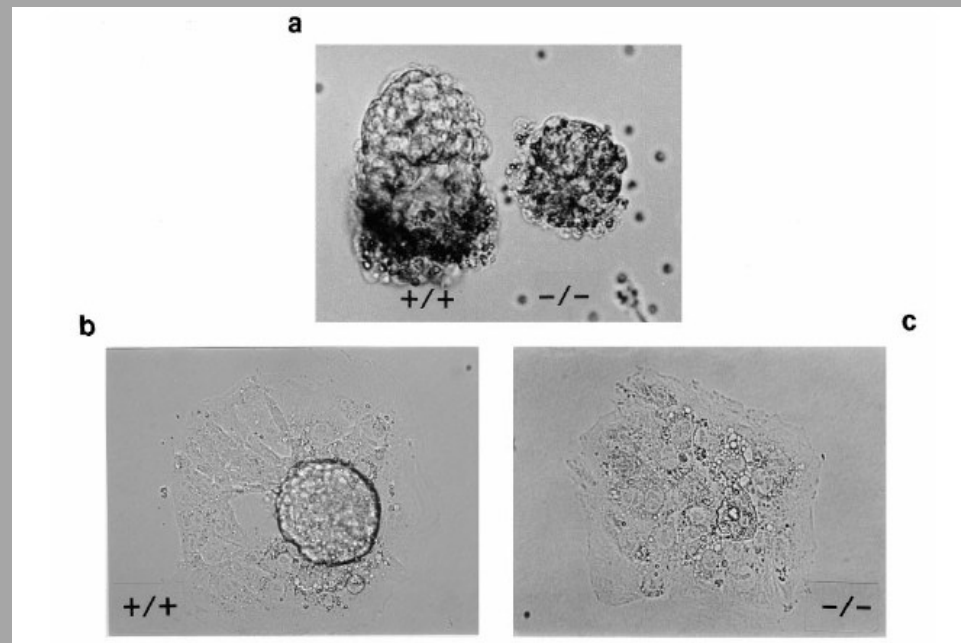
Preimplantation development



Τροφοβλάστη ή ICM;

Η πρώτη απόφαση που πρέπει να παρθεί απο τα κύτταρα κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών.

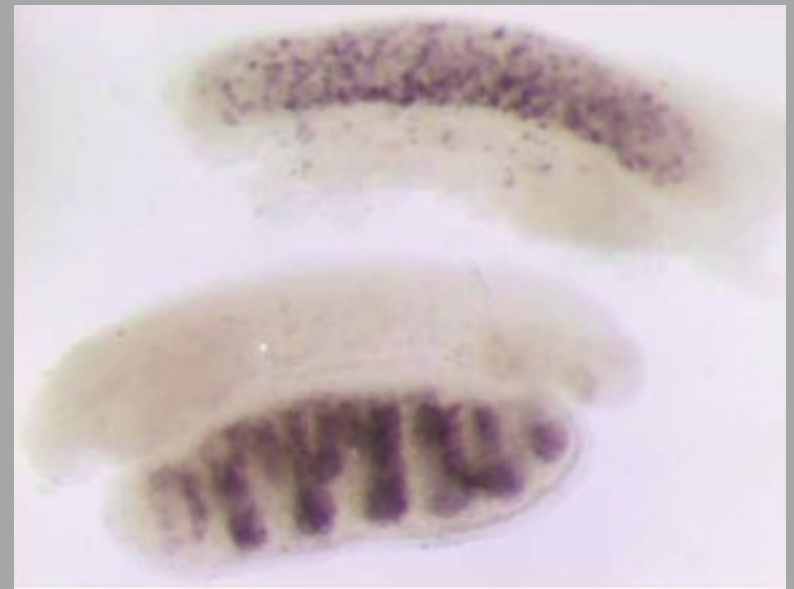
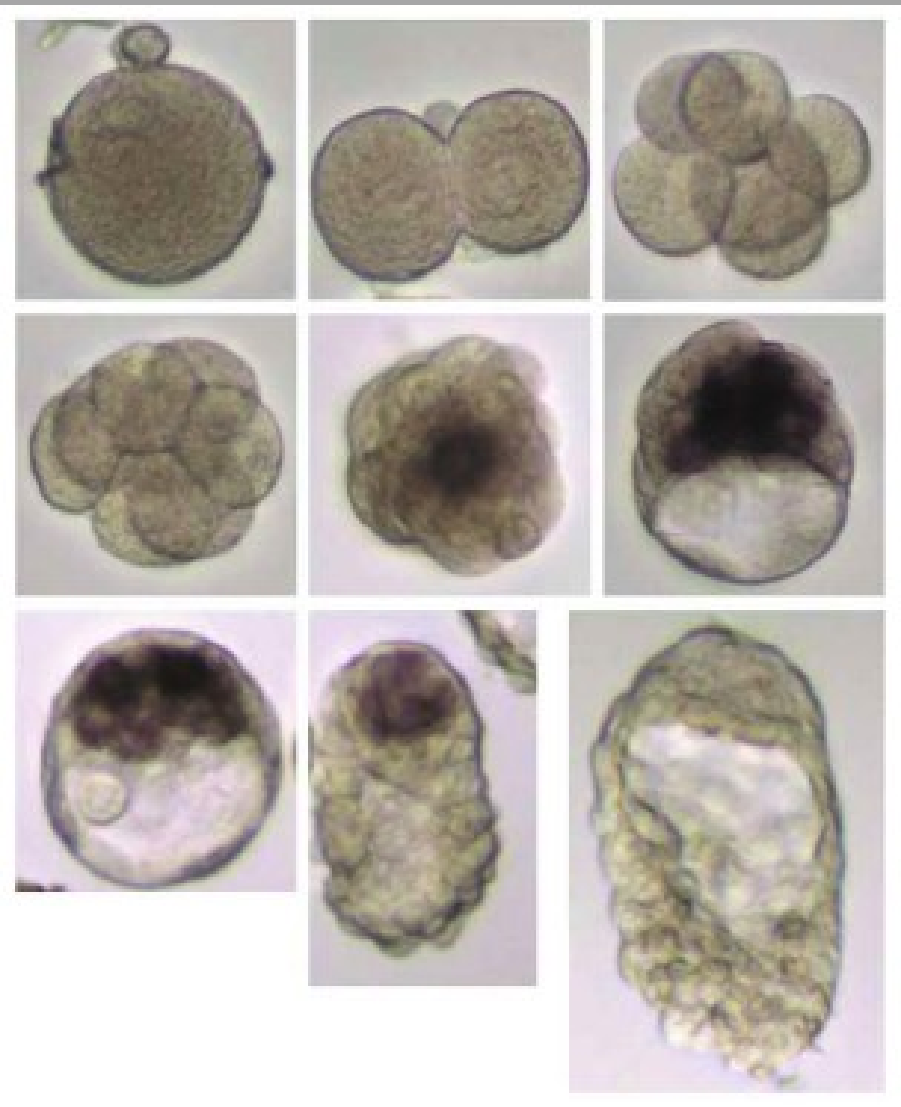
Oct-4

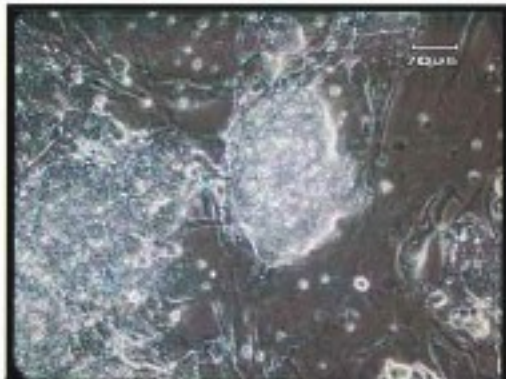
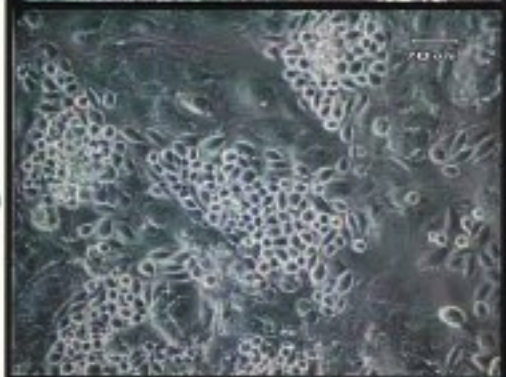
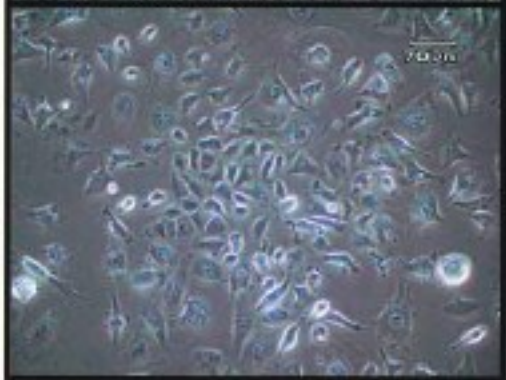
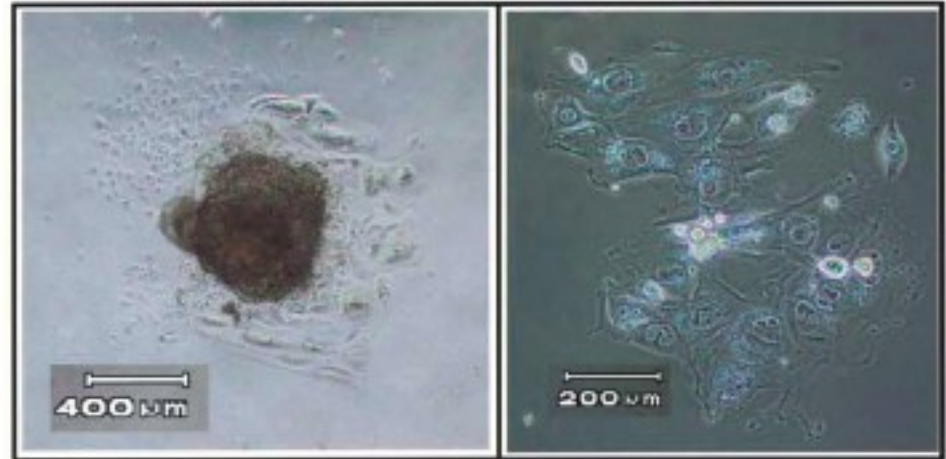
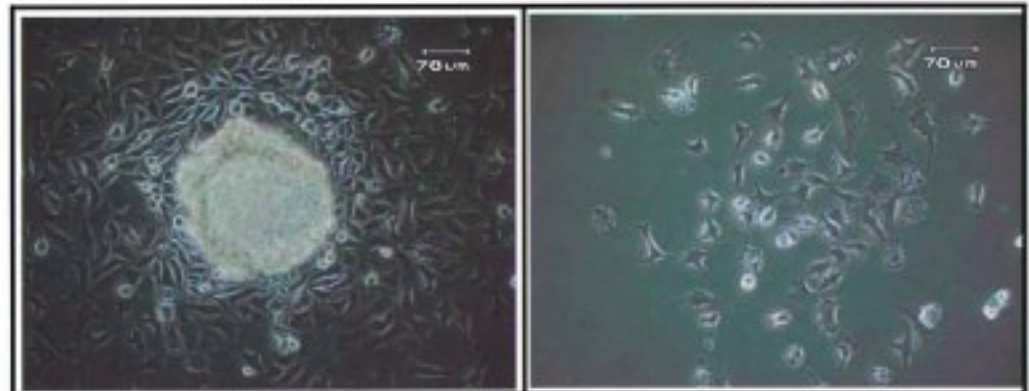


- Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 εκφράζεται στην **EKM** και στη γεννητική ακρολοφία.
- Είναι γνωστοί κάποιοι στόχοι του, καθώς και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτόν.
- Έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η Oct-4 πεθαίνουν E 5.
- Αλλαγές στα επίπεδα του Oct-4 έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των κυττάρων της EKM .
- Παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας.

Nanog

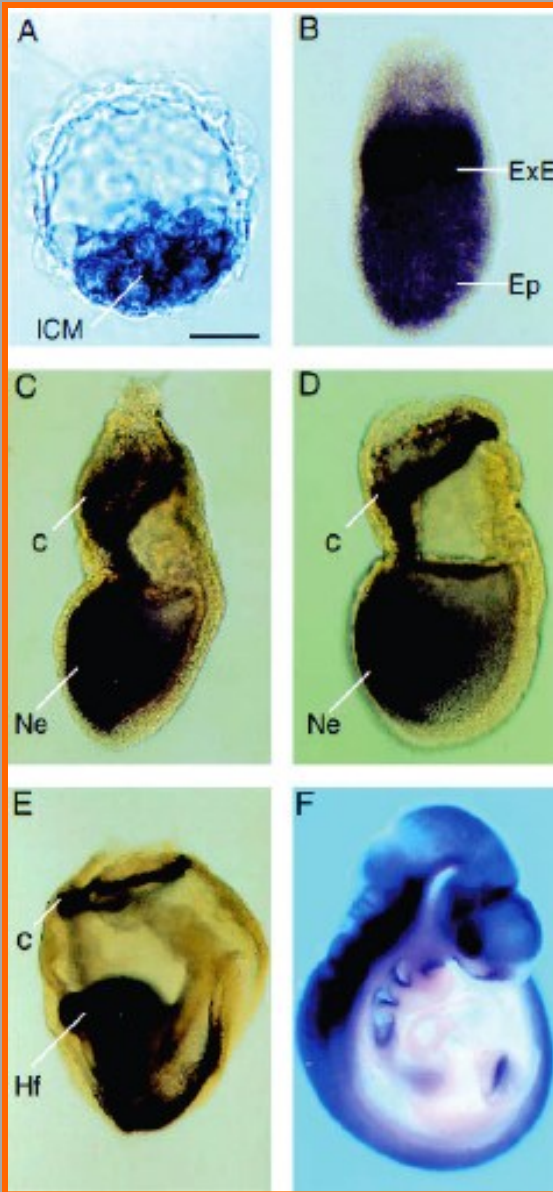
- Μεταγραφικός παράγοντας που φέρει ομοιοεπικράτεια.
- Η έκφραση της nanog περιορίζεται σε **EKM** και εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα (embryonic germ cells).
- Παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας.



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

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

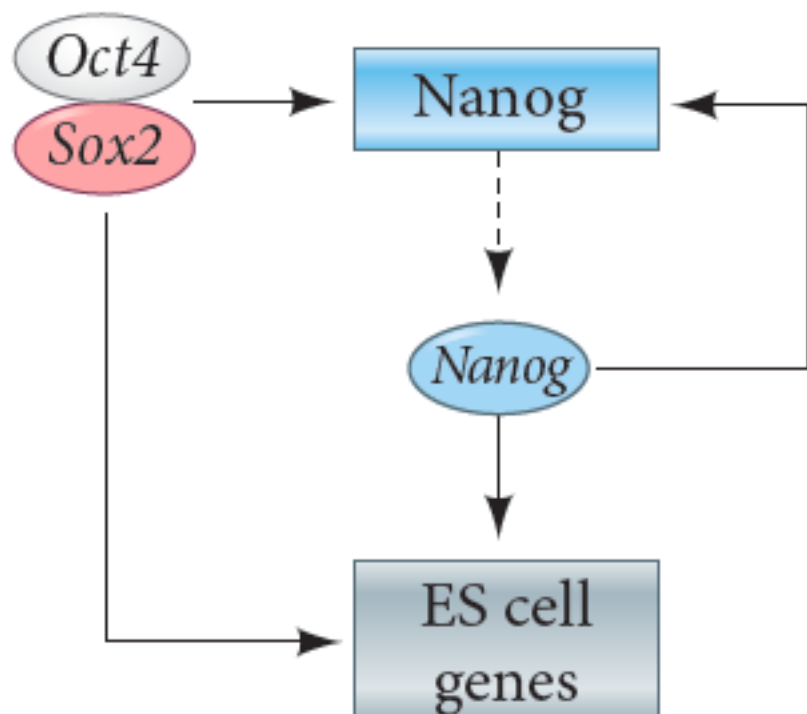
Sox-2



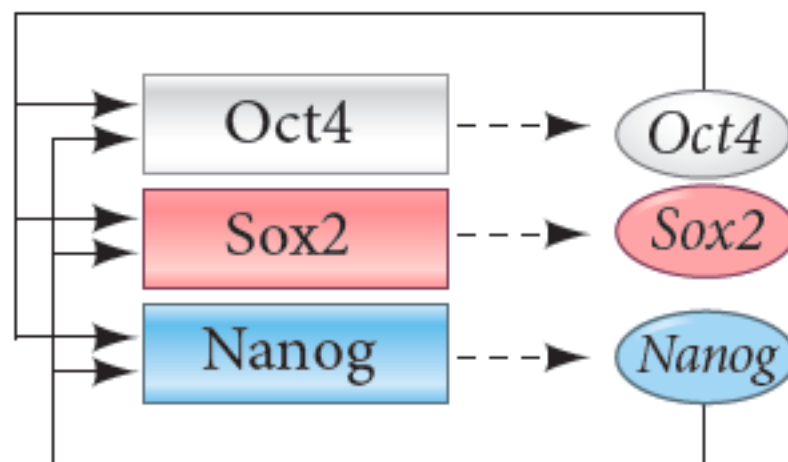
- Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας SRY (φέρει HMG box).
- Εκφράζεται στην **EKM** (όχι αποκλειστικά)
- Εκφράζεται και στο ΝΣ
- Αλληλεπιδρά με τον Oct4.
- Στα ΚΟ τα έμβρυα πεθαίνουν κατά την E6.5.
- Επειδή εκφράζεται και στα ωκύτταρα πιθανόν το μητρικό προϊόν επιτρέπει την επιβίωση ως την E 6.5.
- Παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας.

Παράγοντες πολυδυναμίας (ρύθμιση της έκφρασής τους)

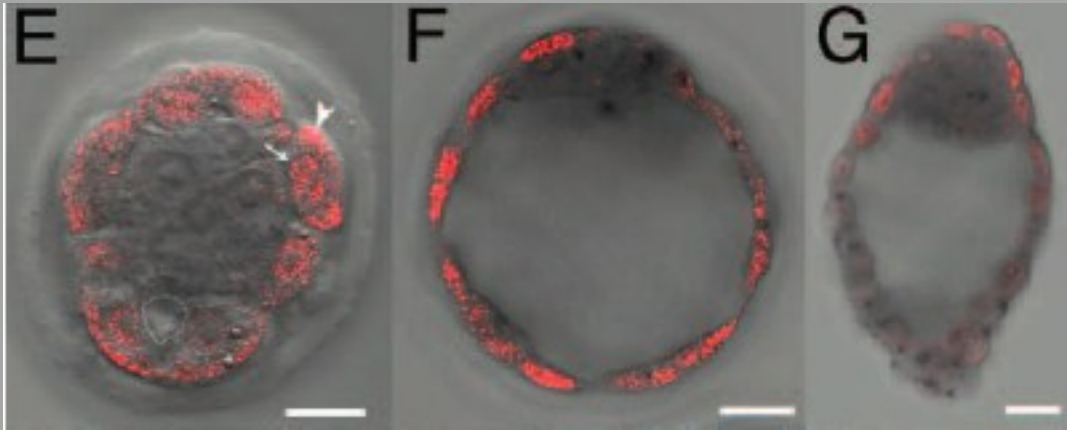
(A)



(B)

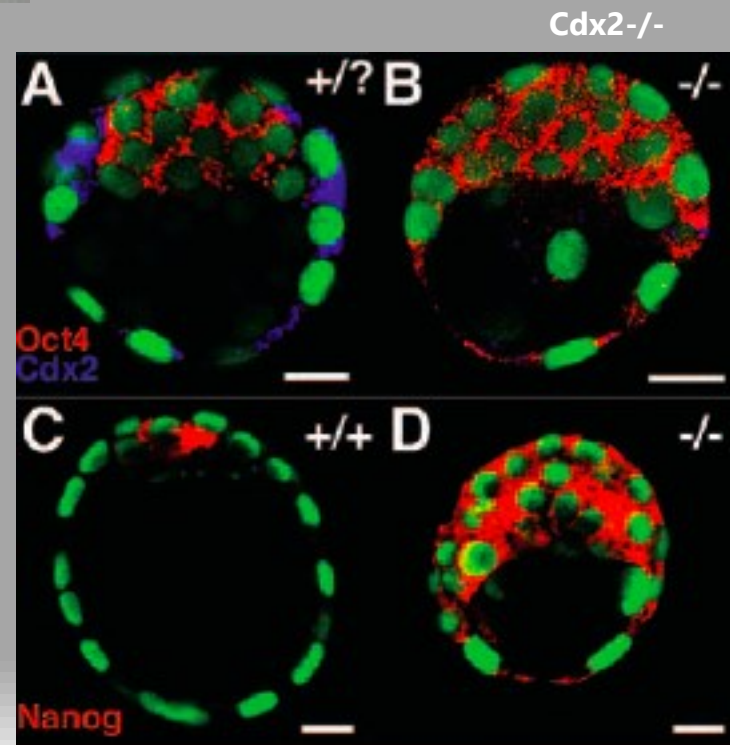


Το γονίδιο Cdx2

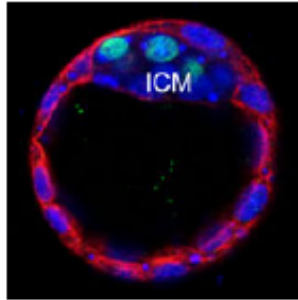


- Ομόλογο του caudal
- Φέρει ομοιοεπικράτεια
- Εκφράζεται στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος (TE)

- Καταστέλλει την έκφραση των Oct4 και nanog στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος.
- Ο Oct4 καταστέλλει την έκφραση του cdx2 στην ΕΚΜ.
- Οι Oct4 και cdx2 ρυθμίζουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα eomesodermin που ενέχεται στη διαφοροποίηση του TE.



Το γονίδιο Cdx2



Mice develop without maternal Cdx2

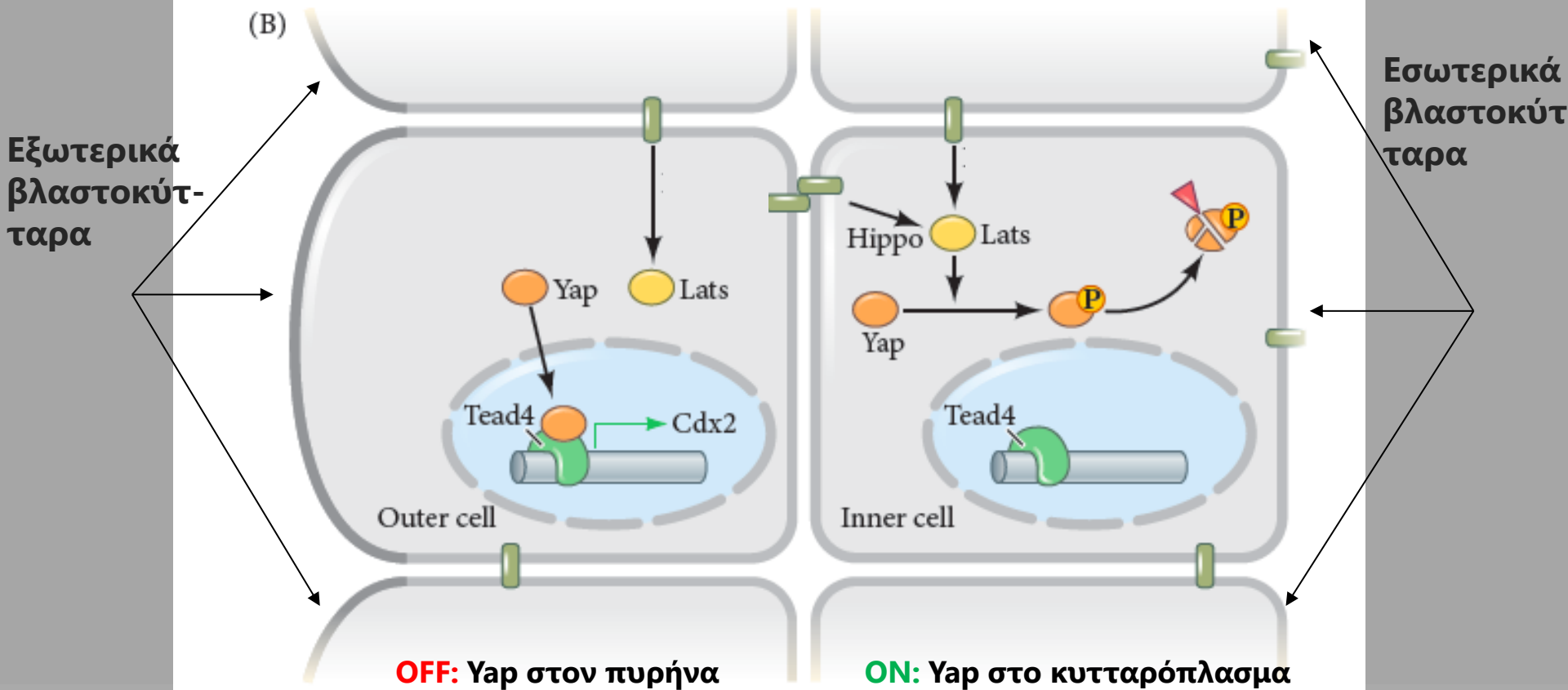
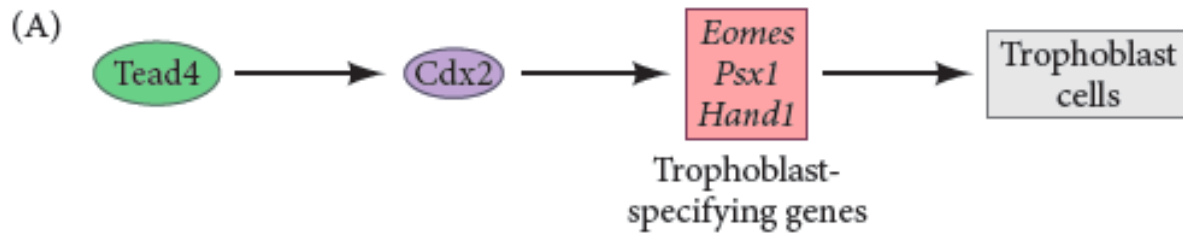
Maternal genes, which are transcribed in the female germline during oogenesis, play variable roles in embryonic patterning. In frog embryos, for example, differentially localised maternal factors regulate early cell fate decisions. By contrast, the contribution of maternal factors to mammalian embryo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

ρα του
)

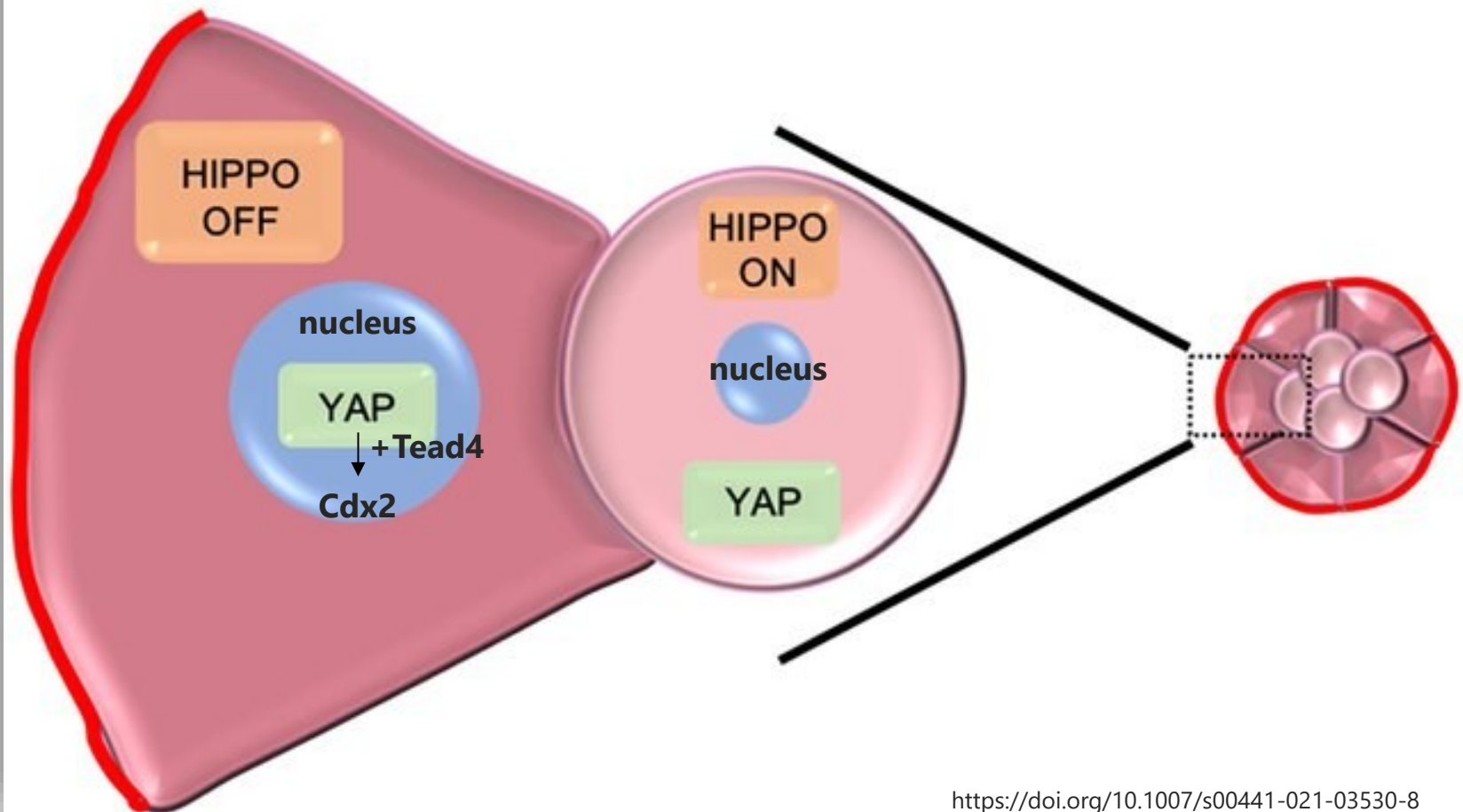


- Καταστέλλει την ...
στα κύτταρα του
- Ο Oct4 καταστέλλει ...
στην EKM.
- Οι Oct4 και cdx2 ...
μεταγραφικού πο ...
ενέχεται στη διαφύλαξη του ...

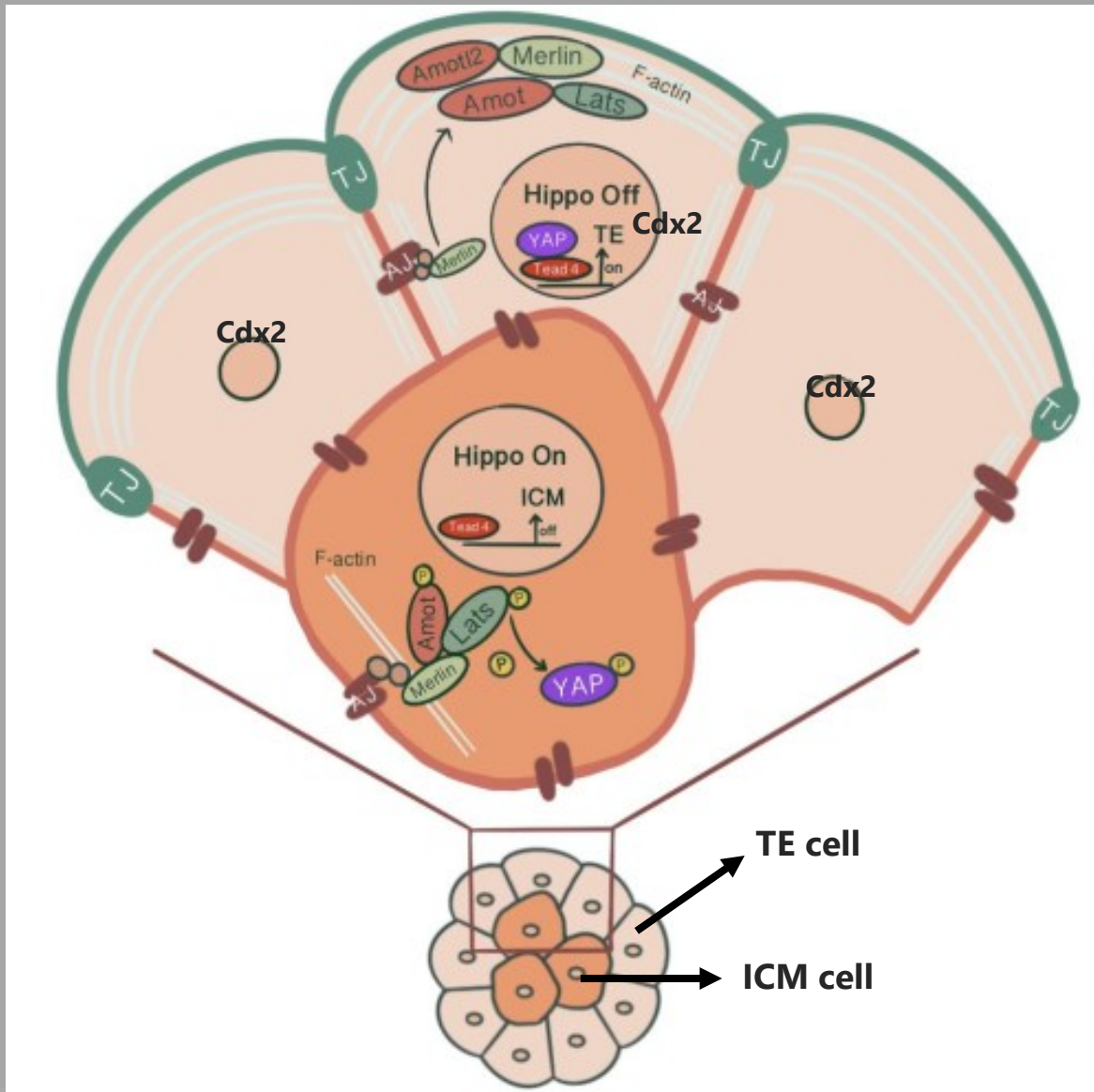
Τι επάγει το Cdx2;



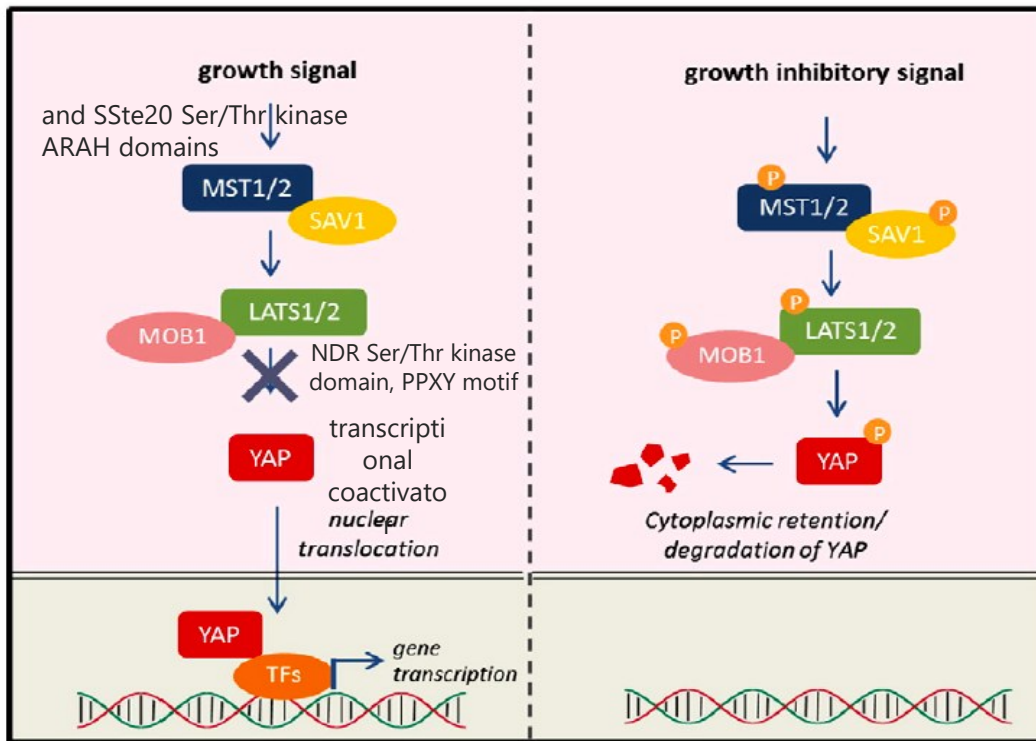
Τι επάγει το Cdx2;



Το μονοπάτι Hippo

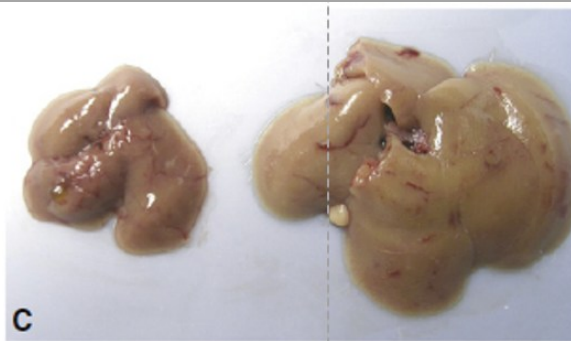
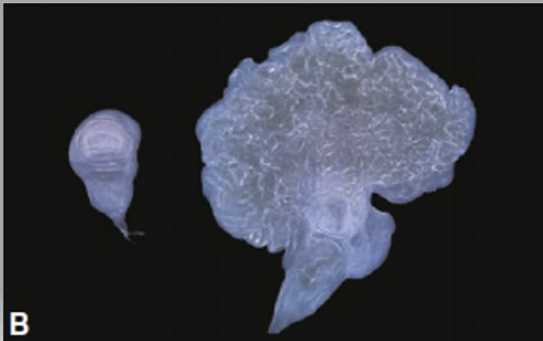


Το μονοπάτι Hippo (θηλαστικά)



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

Υπερέκφραση YAP

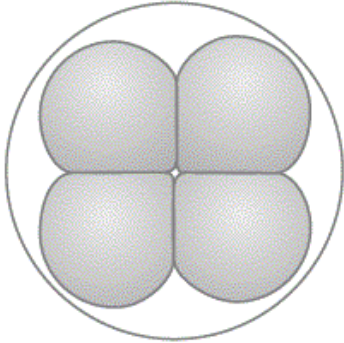


- Αριστερα – *D. melanogaster* δίσκος ενήλικου
- Δεξιά- ποντικός ήπαρ

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

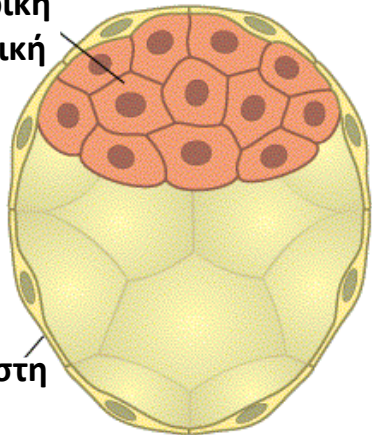
Φυσιολογικό έμβρυο

Έμβρυο 4 κυτ.

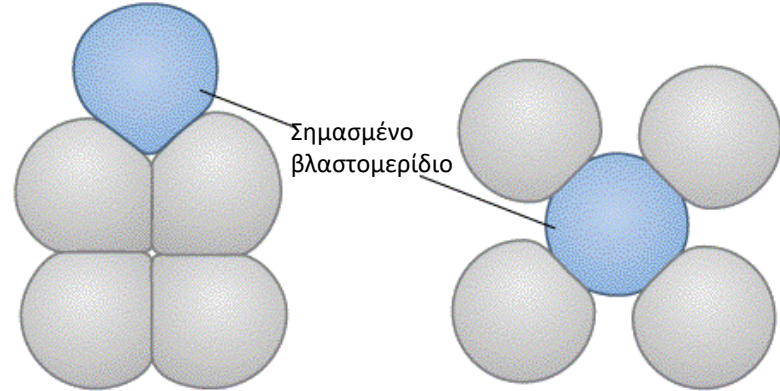


Εσωτερική
Κυτταρική
μάζα.

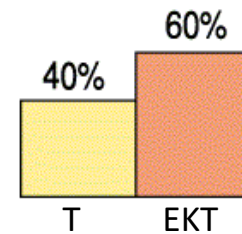
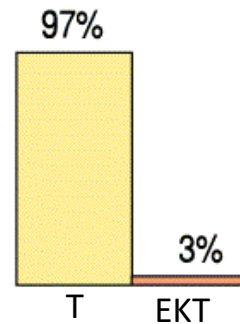
Τροφοβλάστη



Έμβρυα στα οποία μεταμοσχεύεται ένα βλαστομερίδιο.

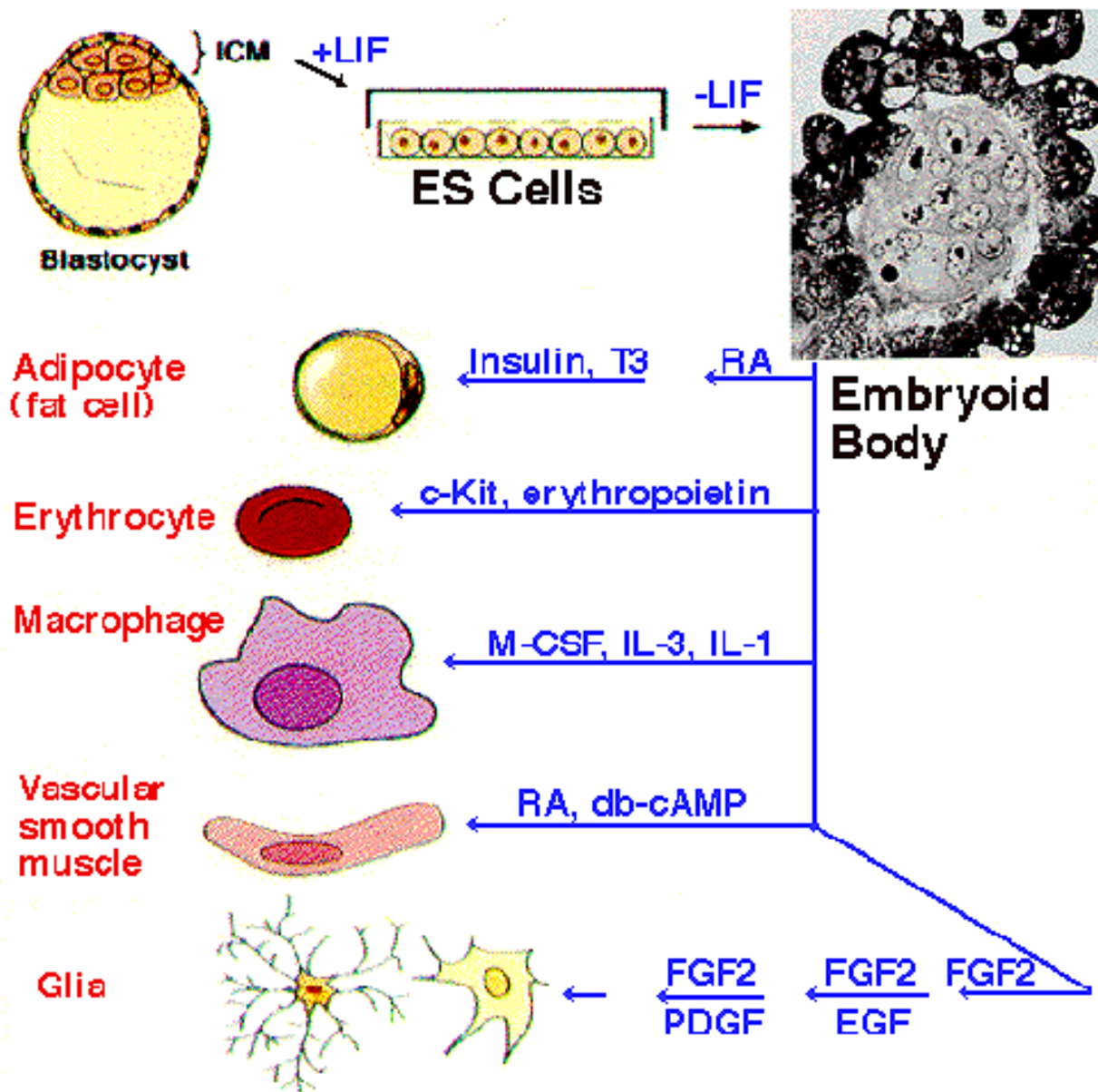


Η τύχη (fate) των σημεισμένων κυττάρων



Η θέση του στο έμβρυο μετά τη σύμπτυξη.

Διαφοροποίηση των ES *in vitro*

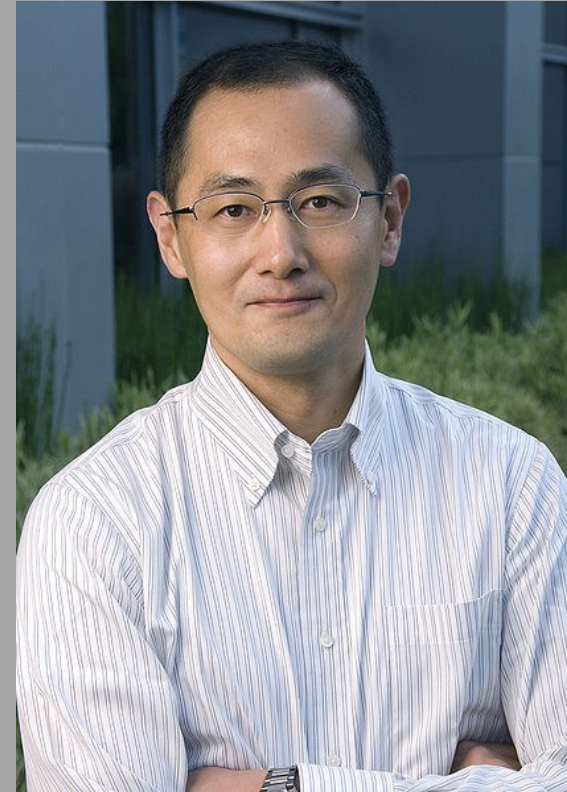


2012 Nobel Prize in Medicine



J. Gurdon

**Department of Zoology, University of
Cambridge**



S. Yamanaka

**Institute of Cardiovascular Disease, San
Francisco**

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

Τα βλαστοκύτταρα στη θεραπεία ασθενειών

The Washington Post

FDA OKs 1st Embryonic Stem Cell Trial

By Steven Reinberg

HealthDay Reporter

Friday, January 23, 2009; 12:00 AM

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

iPSCs

Parkinson's Disease¹⁾

Macular degeneration²⁾

Retinitis pigmentosa³⁾

Corneal disorder⁴⁾

Heart failure⁵⁾

Spinal cord injury⁶⁾

Platelet transfusion⁷⁾

Graft versus host disease⁸⁾

Cartilage defect⁹⁾

Cancer immunotherapy¹⁰⁾



ESCs

Parkinson's Disease¹¹⁾

Macular degeneration¹²⁾

Retinitis pigmentosa¹³⁾

Amyotrophic
lateral sclerosis¹⁴⁾

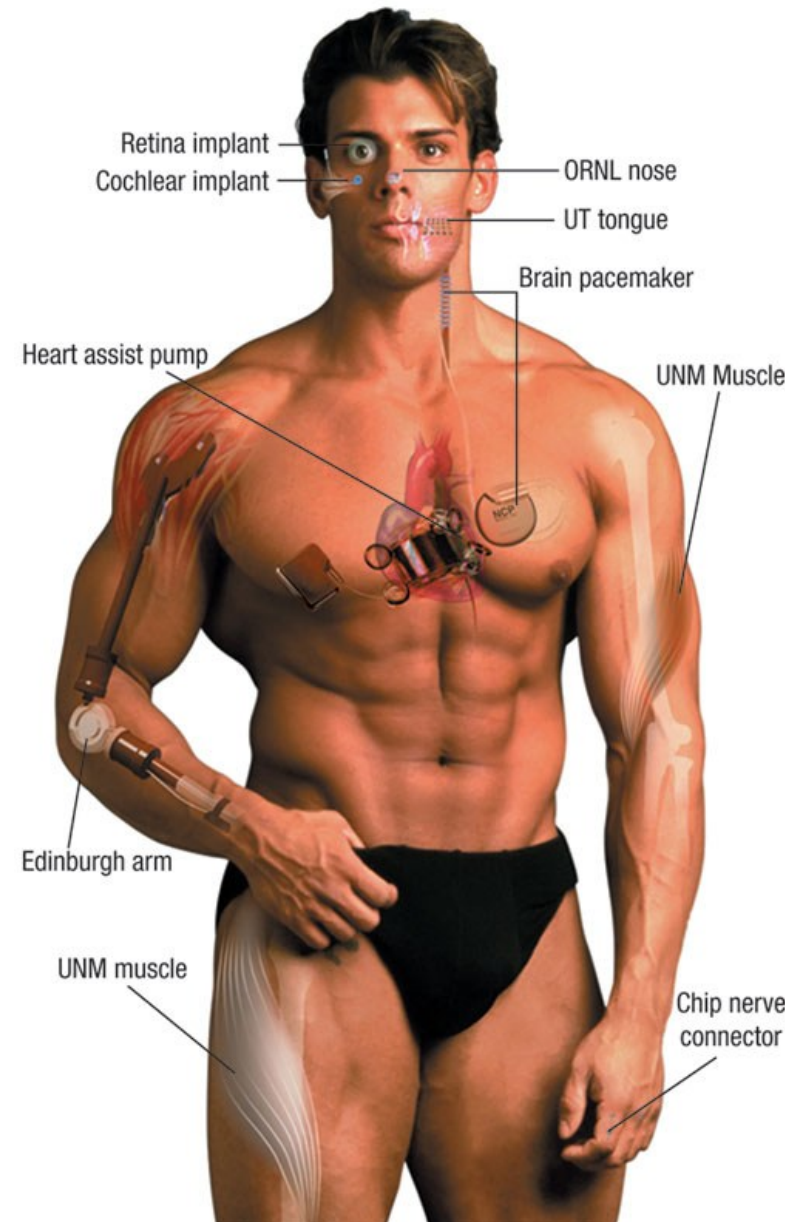
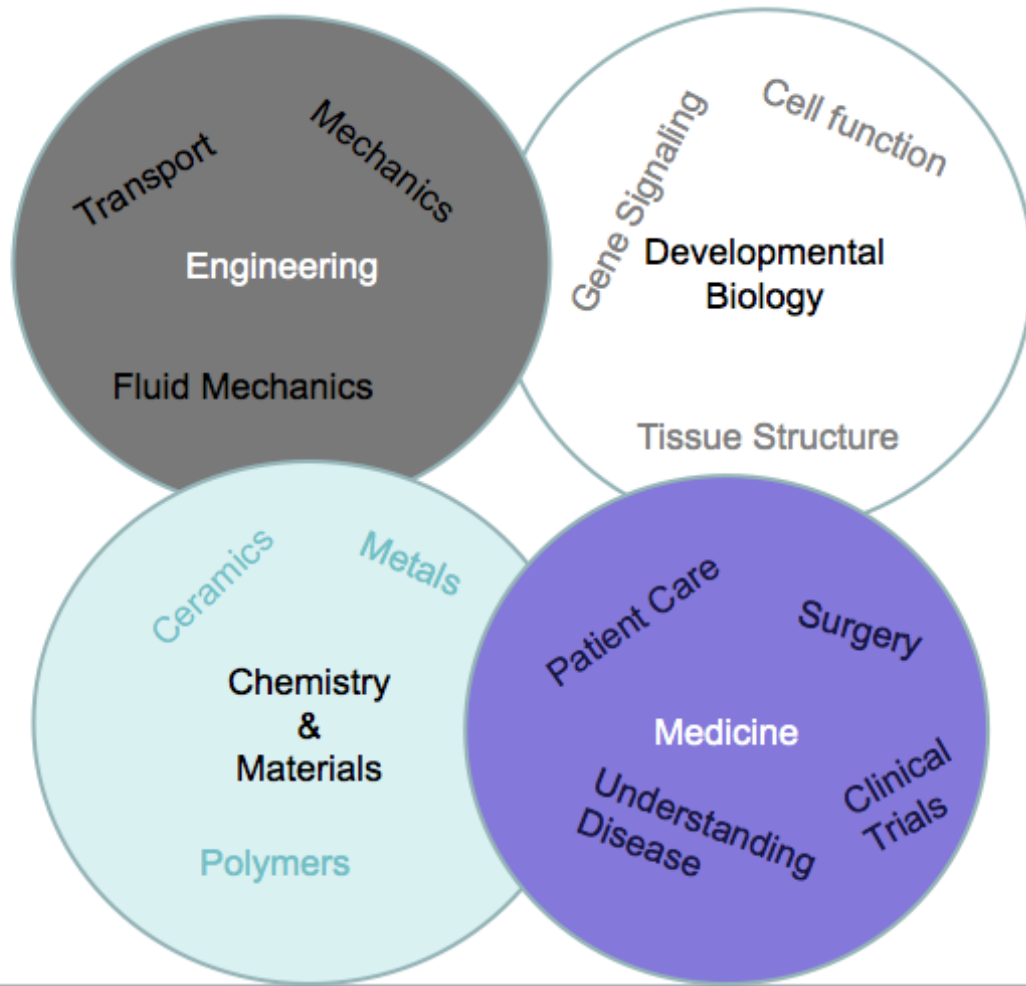
Spinal cord injury¹⁵⁾

Type I Diabetes¹⁶⁾

Citrullinemia type 1¹⁷⁾

Intrauterine Adhesions¹⁸⁾

Αναγέννηση: Μηχανική Ιστών



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

Box 2. A history of ART

1785. Conception by artificial insemination in dogs by Lazzaro Spallanzani (University of Pavia, Italy) (Spallanzani, 1785).

1900s. Artificial insemination techniques for use in horses, cattle and sheep developed by Ilya Ivanov (State Veterinary Institute, Russia).

1940s. Techniques to freeze and store animal spermatozoa developed by Chris Polge (University of Cambridge, UK).

1934. IVF of rabbit oocytes followed by transfer into the fallopian tubes by George Pincus and Ernst Enzmann (Harvard University, USA).

1954. First characterization of human pre-implantation embryos (at the 2-cell and later stages) by Arthur Hertig and John Rock (Free Hospital for Women in Brookline, USA).

1957. Development of superovulation in mice using gonadotrophins by Robert Edwards and Ruth Fowler (University of Cambridge, UK).

1959. In vitro fertilized rabbit oocytes capable of proceeding to live birth were demonstrated by Min Chueh Chang (Worcester Foundation, USA).

1969. Early stages of IVF of human eggs by Robert Edwards and colleagues (University of Cambridge, UK).

1970. Successful culture of human cleavage stage embryos by Robert Edwards and colleagues (University of Cambridge, UK).

1972. Cryopreservation techniques for the long-term storage of pre-implantation mammalian embryos by David Whittingham (Oak Ridge National Laboratory, USA).

1978. Birth of the first child conceived via IVF reported by Robert Edwards and Patrick Steptoe (Oldham General Hospital and Bourn Hall Clinic).

1992. Development and successful use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to assist with infertility by Gianpiero Palermo, Paul Devroey and Andre Van Steirteghem (Vrije Universiteit Brussel, Belgium).

1998. Development of serum-free culture methods for human blastocysts in vitro by David Gardner and colleagues (University of Oxford, UK).

Assisted Reproduction Techniques

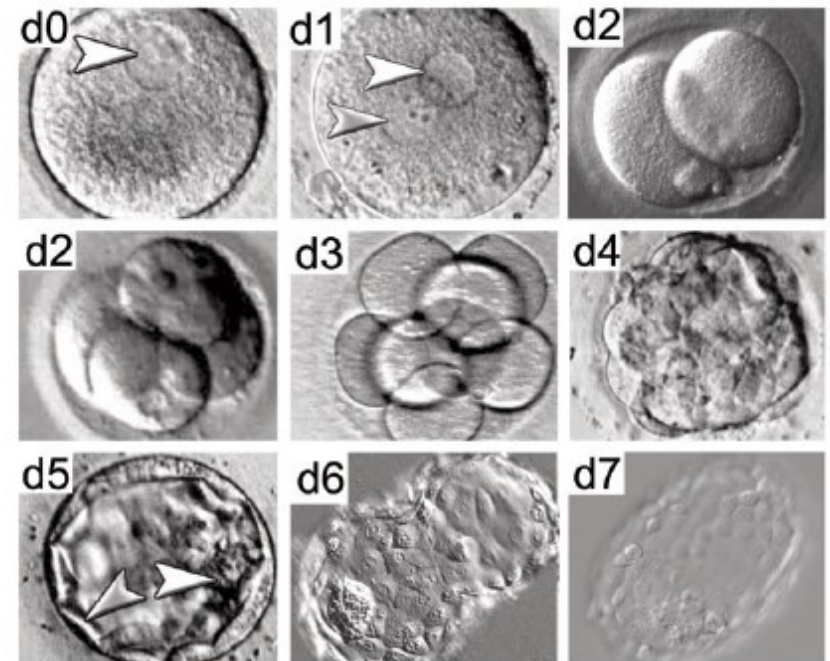
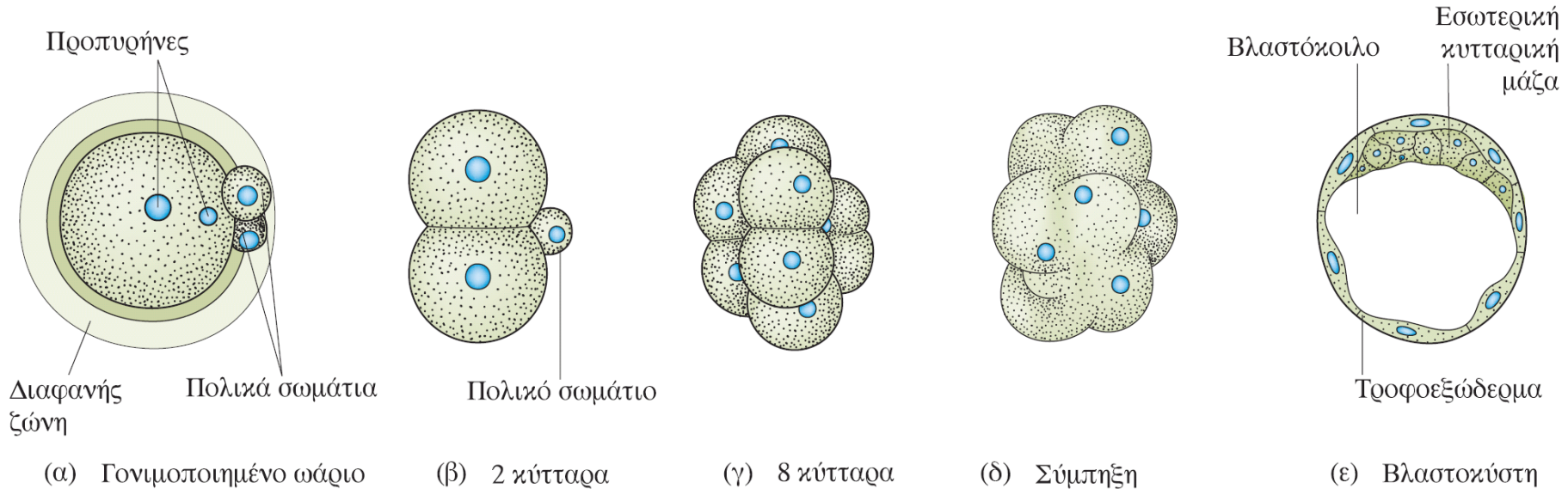


Fig. 1. Stages of human pre-implantation embryo development. Phase-contrast images of human embryo development from day (d) 0 to day 7. Following fertilization, embryos undergo a series of mitotic cell divisions. Arrowheads in d0 and d1 indicate pronuclei. On or around day 4, the embryo compacts, resulting in the formation of a morula that consists of cells (or blastomeres) in a compact cluster contained within the zona pellucida (the glycoprotein layer that surrounds the embryo). The blastocyst, which forms on day 5, is a fluid-filled structure composed of an inner cell mass (white arrowhead) and trophectoderm (gray arrowhead). On day 6, the blastocyst 'hatches' from the zona pellucida and it is ready to implant into the uterine wall on day 7.

Πρώιμη ανάπτυξη

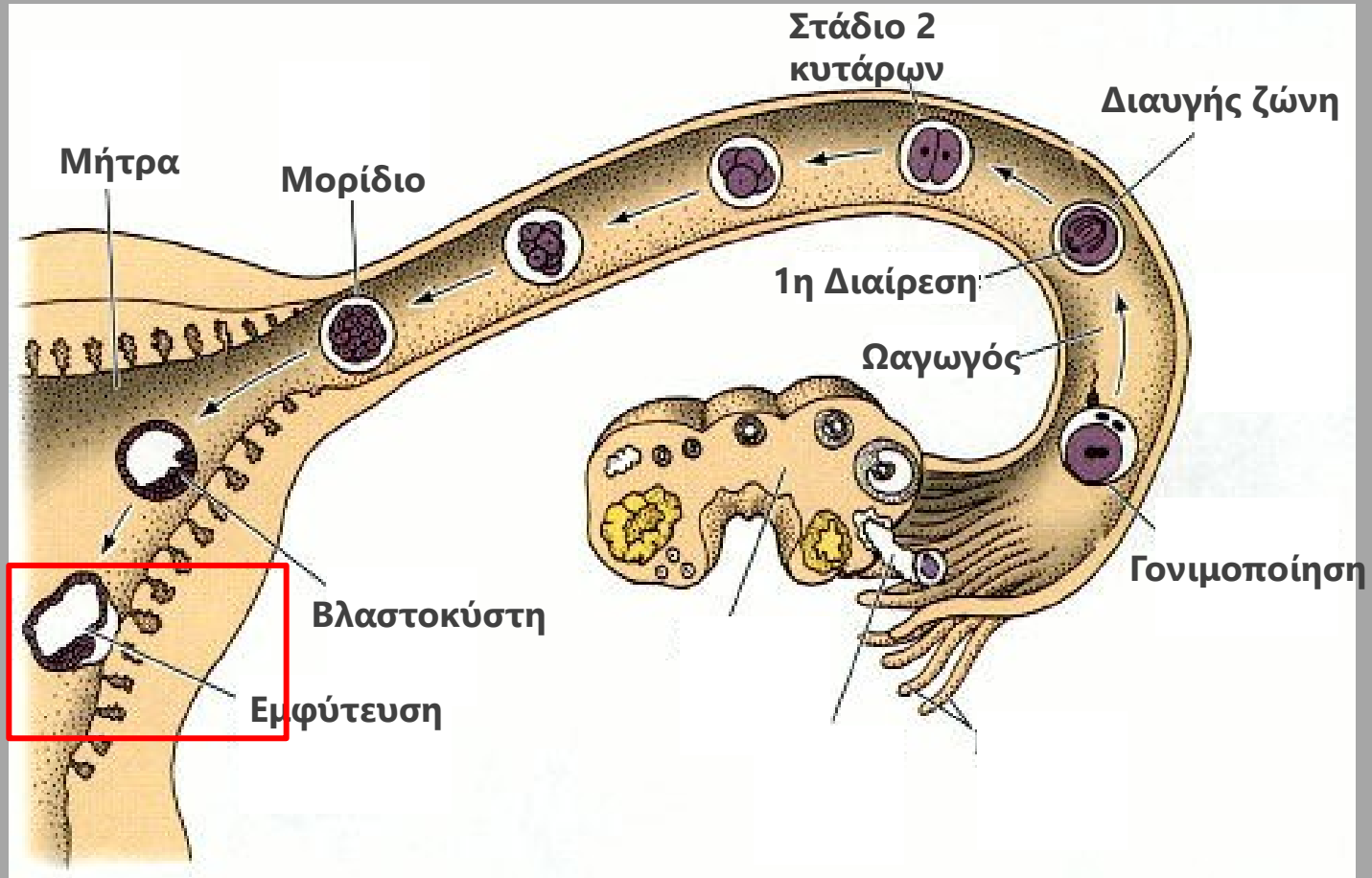


Προεμφυτευτική ανάπτυξη. Στα στάδια (β) έως (ε) έχει παραλειφθεί η διαφανής ζώνη.



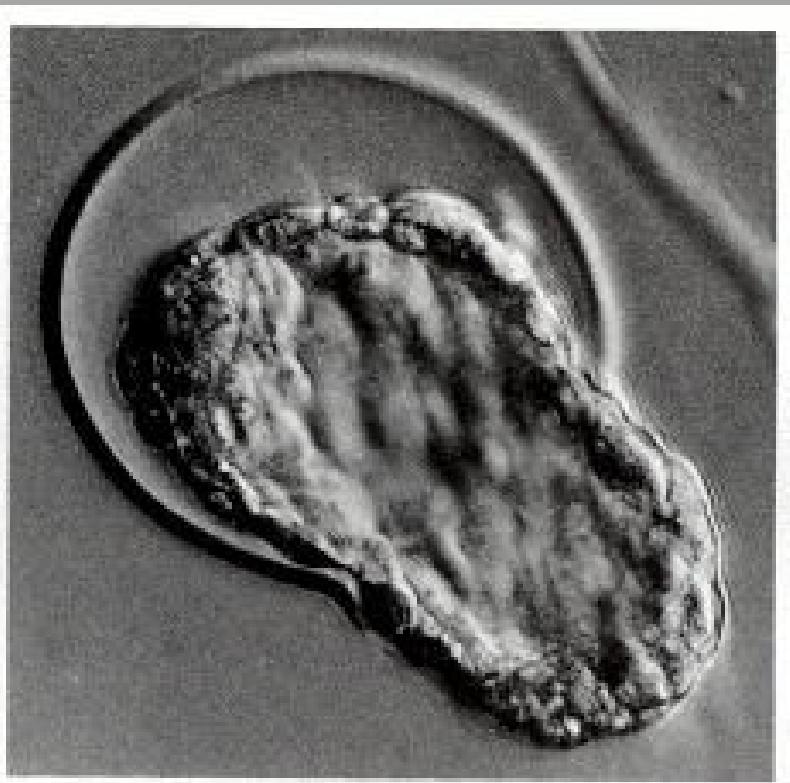
Δανόη
G. Klimt
1907

Γονιμοποίηση - Αυλάκωση



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

Έξοδος από τη διαφανή ζώνη



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

α. Στην αναγνώριση ωαρίου σπερματοζωαρίου.

β. Προστατεύει από την πολυσπερμία.

γ. Εμποδίζει την προσκόλληση του εμβρύου στα τοιχώματα του ωαγωγού.

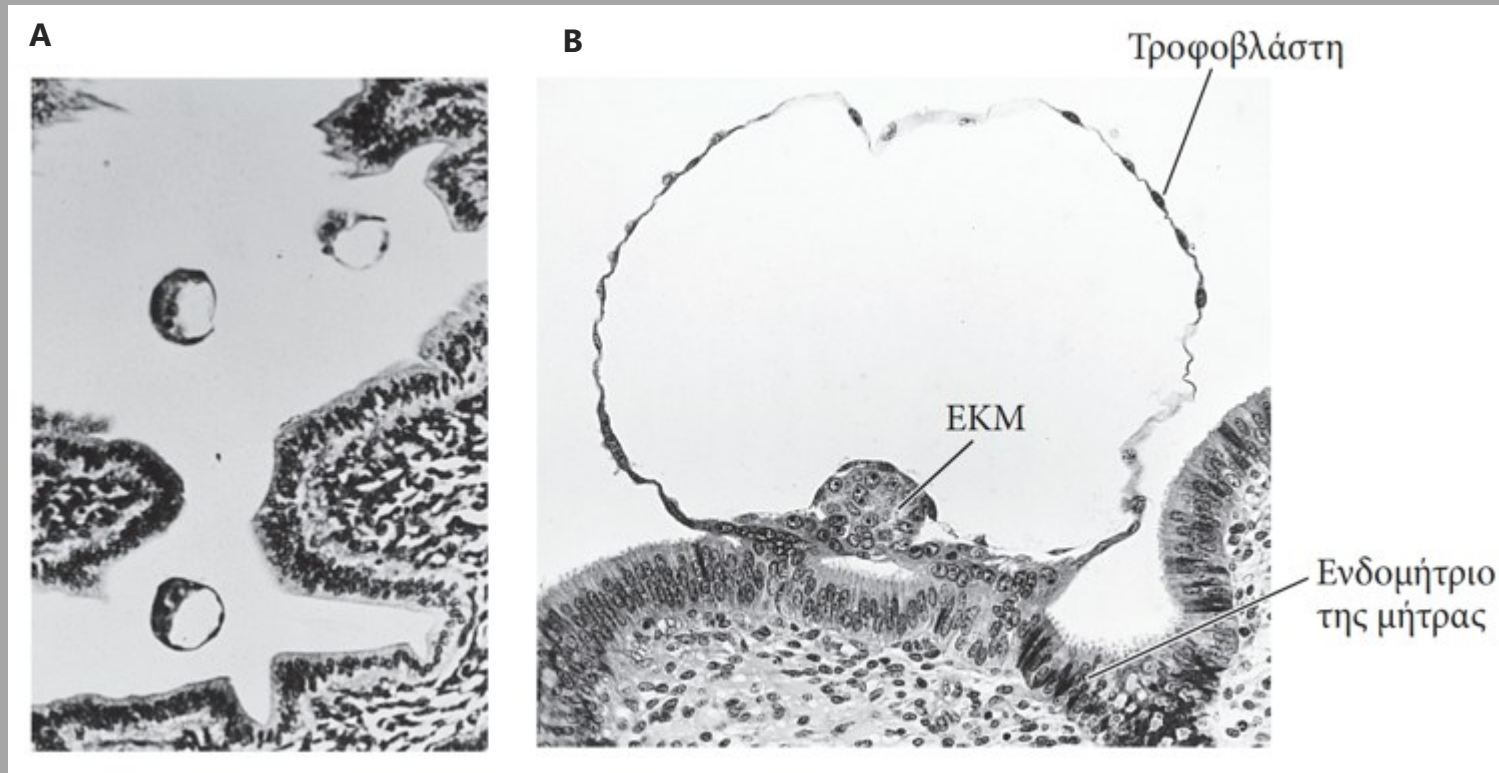
➤ Καθώς το έμβρυο φθάνει στη μήτρα, η διαφανής ζώνη αποβάλλεται κατά τη διαδικασία της **εκκόλαψης (hatching)**. Η βλαστοκύστη περνά μέσα από μια τρύπα που ανοίγεται στη διαφανή ζώνη από την στρυψίνη, ένα ένζυμο που παράγουν τα κύτταρα της τροφοβλάστης.

Recording of Pre-Implantation Mous



Εμφύτευση

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



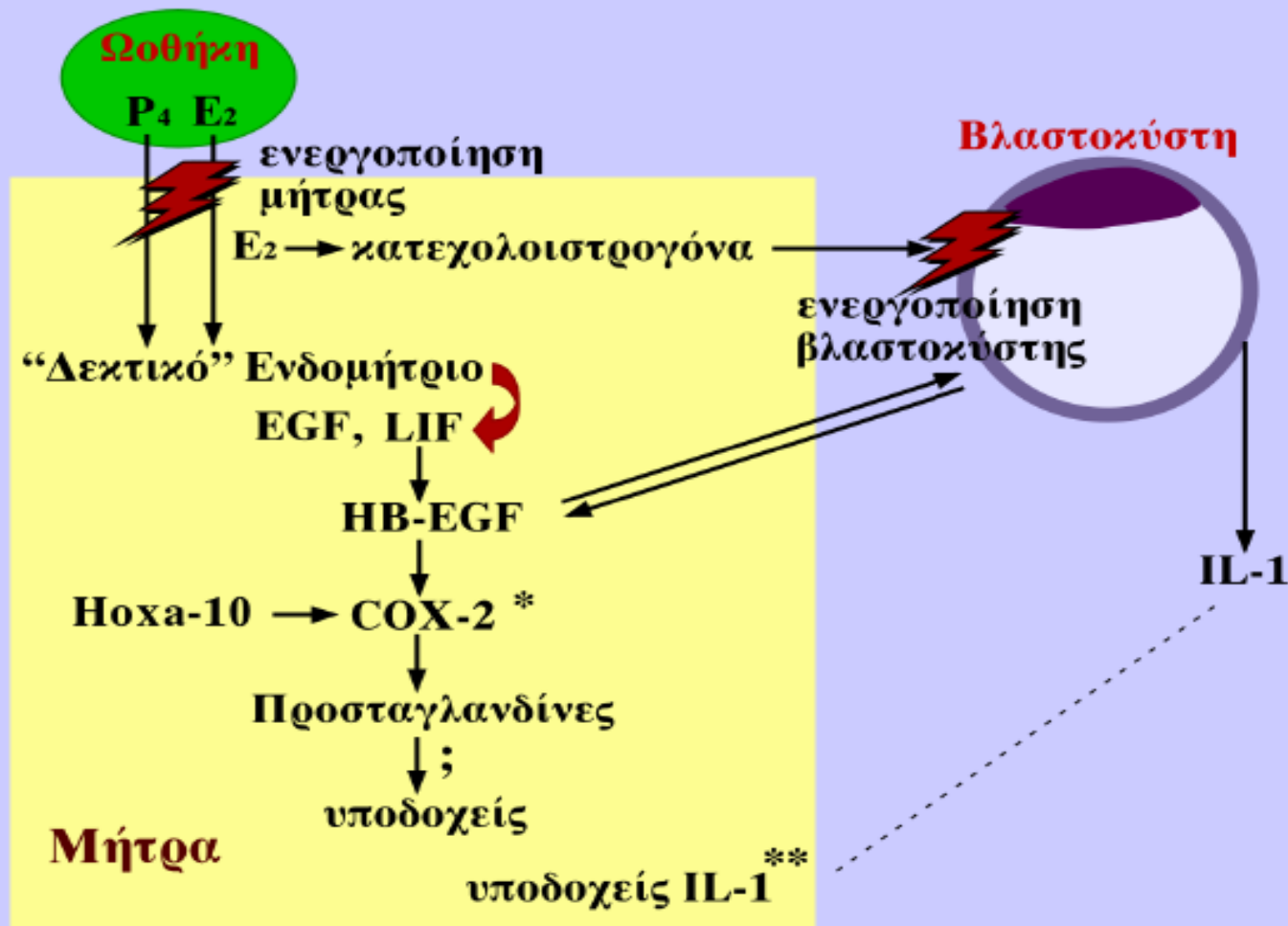
(A) Βλαστοκύστεις ποντικού που εισέρχονται στη μήτρα.
(B) Εμφύτευση βλαστοκύστης πιθήκου rhesus.

Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;



Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

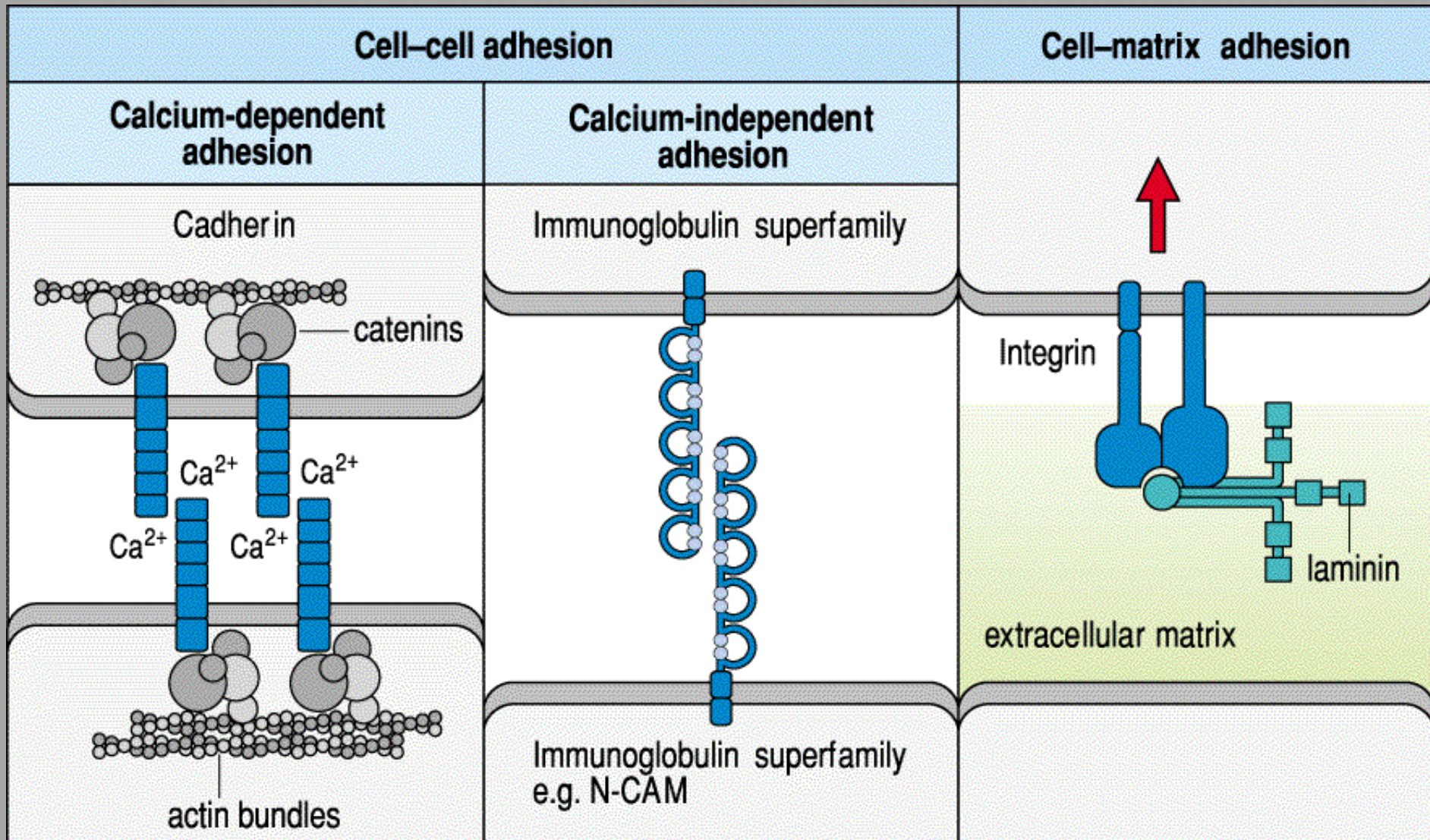
Α. Ο ρόλος της προγεστερόνης και των οιστρογόνων



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

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

Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell adhesion molecules)



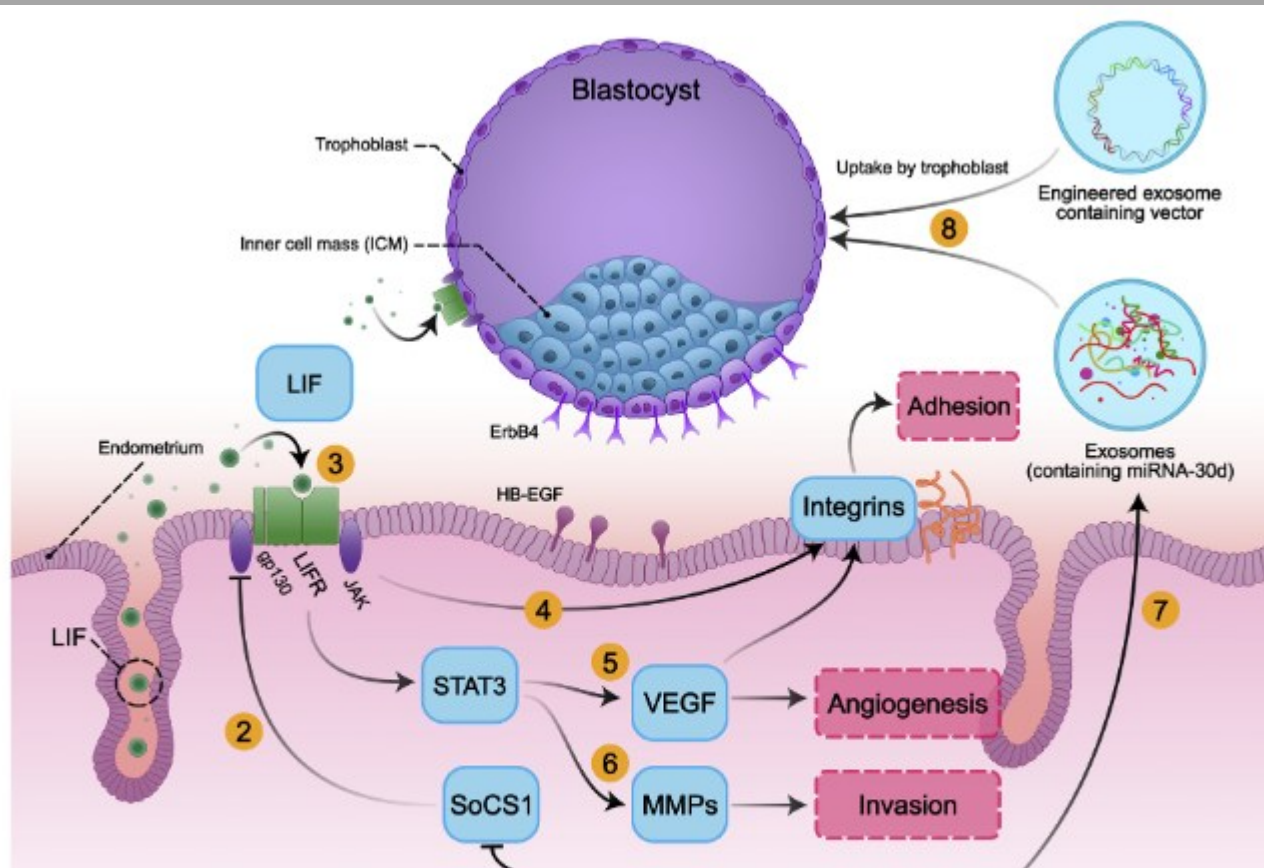
Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

B. Μόρια κυτταρικής συνάφειας

- Το ενδομήτριο και αυτό έχει προετοιμαστεί από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη και αποτελείται από λαμινίνη, κολλαγόνο, καδερίνες κα., δηλαδή μόρια κυτταρικής συνάφειας για να κρατήσουν το έμβρυο.
- Η βλαστοκύστη (τροφοβλάστη) προσφέρει κι αυτή μόρια κυτταρικής συνάφειας (ιντεγκρίνες).
- Προσκόλληση με τη βοήθεια ιντεγκρινών και καδερινών. Ο HB-EGF που παράγεται από το ενδομήτριο προσδένεται στους υποδοχείς και σε πρωτεϊνογλυκάνες που υπάρχουν στη βλαστοκύστη. Έτσι επιτυγχάνεται η αρχική πρόσδεση.
- Επαφή μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεϊνογλυκάνες - υποδοχείς τους.
- Η βλαστοκύστη αρχίζει να εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας. Αυτό επιτυγχάνεται:
 - α) Με την παραγωγή πρωτεασών από την τροφοβλάστη που διασπούν το ενδομήτριο. β) Με την έκφραση διαφορετικών ιντεγκρινών. γ) Με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τροφοβλάστη και δ) Με την αγγειογένεση που ξεκινά στο σημείο που γίνεται η εμφύτευση.



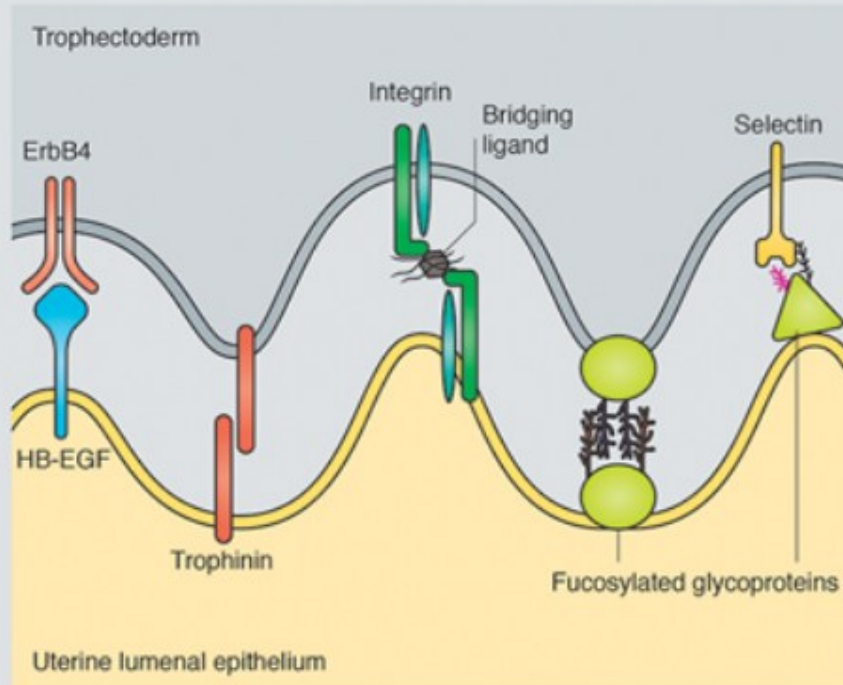
Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;



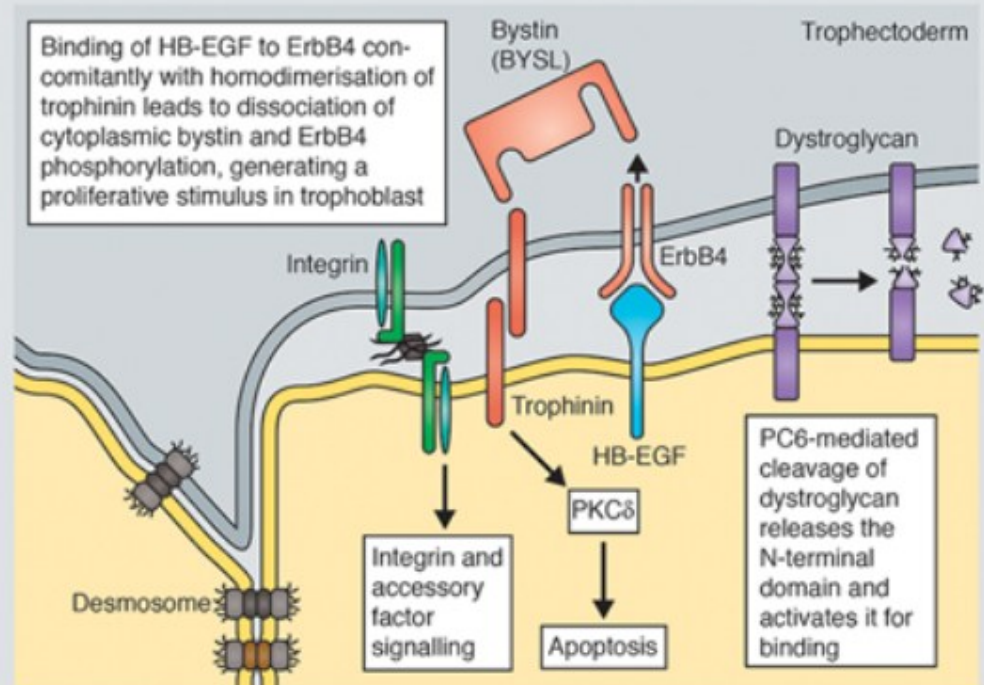
Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

Attachment mechanisms

Mouse attachment mechanisms



Human attachment and signalling



Πώς επιτυγχάνεται η εμφύτευση;

EMBRYOGLUE®

Implantation promoting medium for
increased take-home baby rate



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

4 May 2016

Marta N. Shahbazi^{1,5}, Agnieszka Jedrusik^{1,5}, Sanna Vuoristo^{1,5}, Gaelle Recher^{1,6}, Anna Hupalowska¹, Virginia Bolton², Norah M. E. Fogarty³, Alison Campbell⁴, Liani G. Devito², Dusko Ilic², Yakoub Khalaf², Kathy K. Niakan³, Simon Fishel⁴ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,7}

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

Alessia Deglincerti^{1*}, Gist F. Croft^{1*}, Lauren N. Pietila¹, Magdalena Zernicka-Goetz², Eric D. Siggia³ & Ali H. Brivanlou¹

Human embryos grown in lab for longest time ever

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

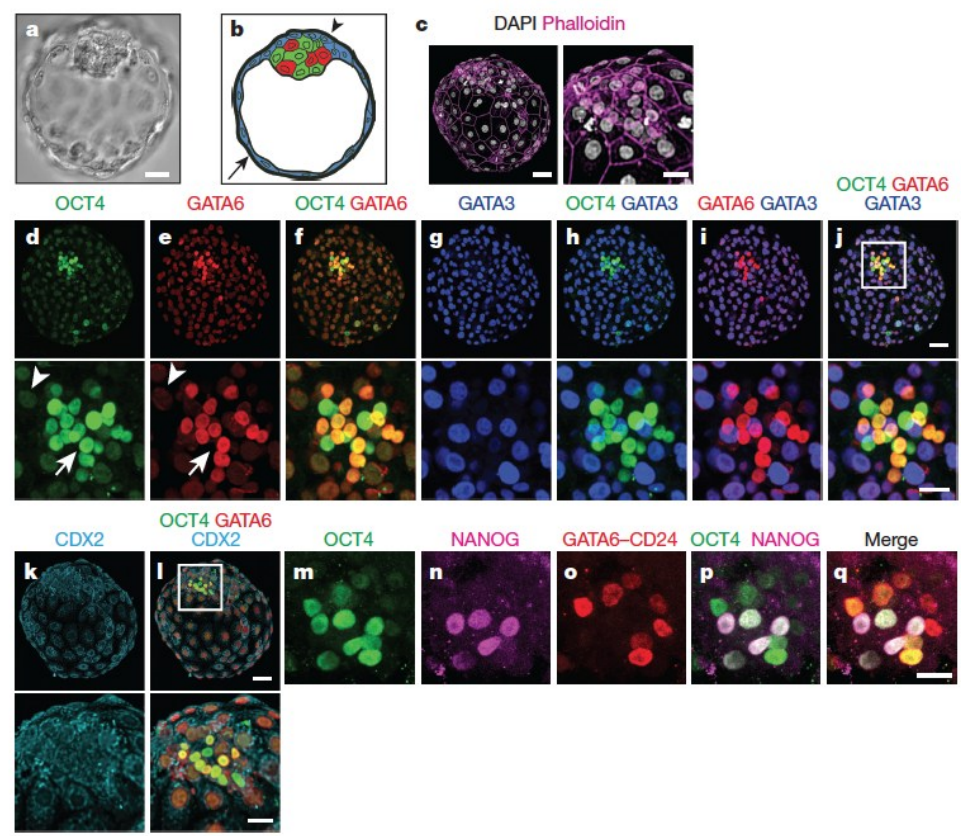
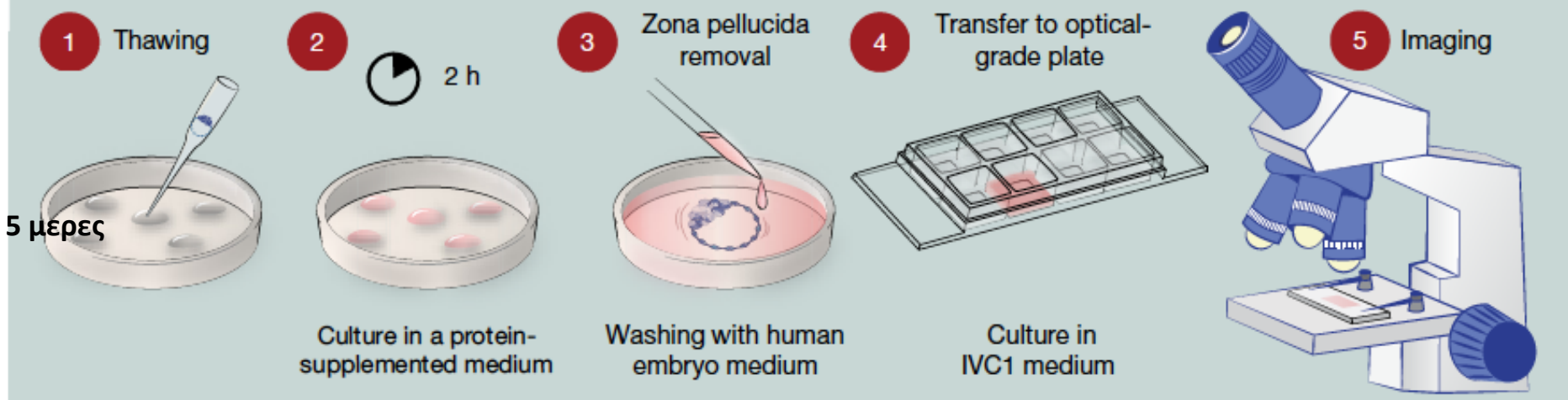
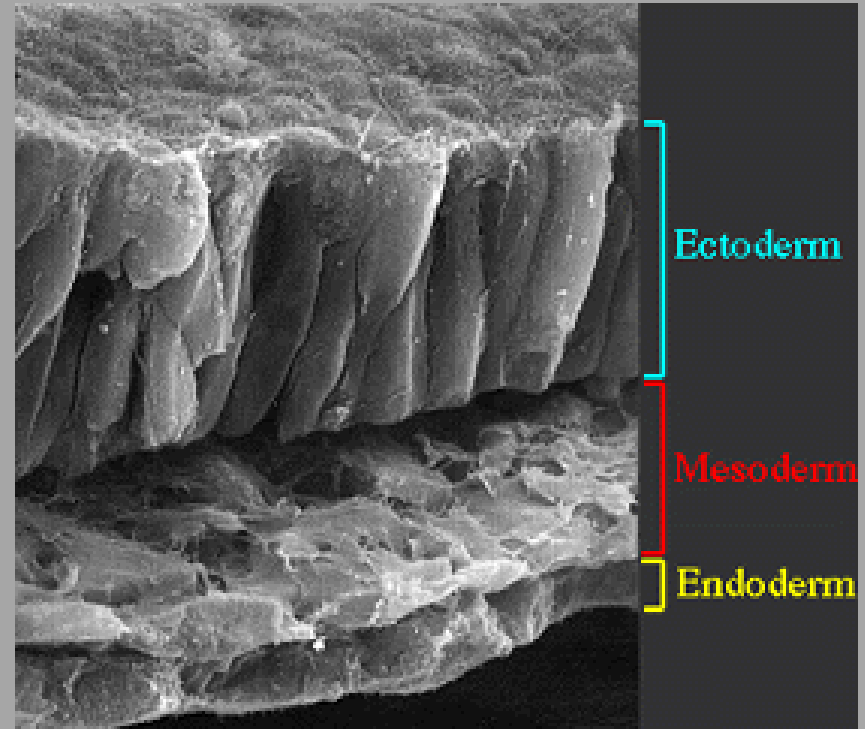


Figure 1 | D.p.f. 6 human blastocyst embryos display human-specific transcriptional profiles. a, DIC image of a d.p.f. 6 human blastocyst; scale bar, 100 μm. b, Cartoon of a d.p.f. 6 embryo with salt-and-pepper distribution of OCT4 (green) and OCT4/GATA6 (red) ICM cells, and GATA3 (blue); mural (arrow)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

Τι είναι η γαστριδίωση;

- Η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται τα τρία βλαστικά δέρματα: **εξώδερμα**, **μεσόδερμα** και **ενδόδερμα**.
- Η διαδικασία με την οποία οργανώνεται το βασικό πλάνο του σώματος.
- Η γαστριδίωση χαρακτηρίζεται από μια σειρά προκαθορισμένων κυτταρικών ανακατατάξεων (μεταναστεύσεις).
- Η γαστριδίωση των θηλαστικών μοιάζει αρκετά με αυτή των πτηνών.

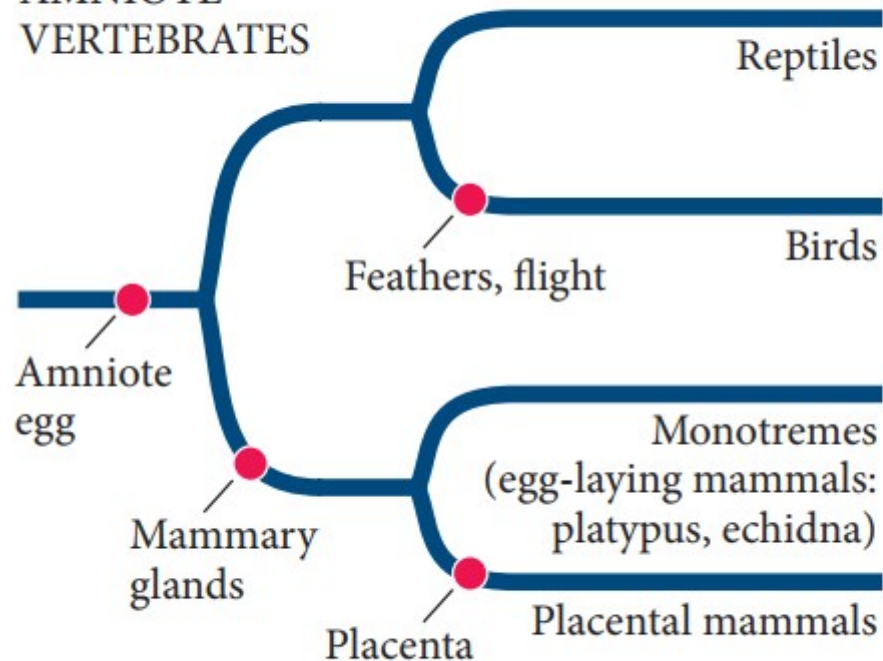


"It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life".

Lewis Wolpert

(A)

AMNIOTE
VERTEBRATES



Gallus gallus



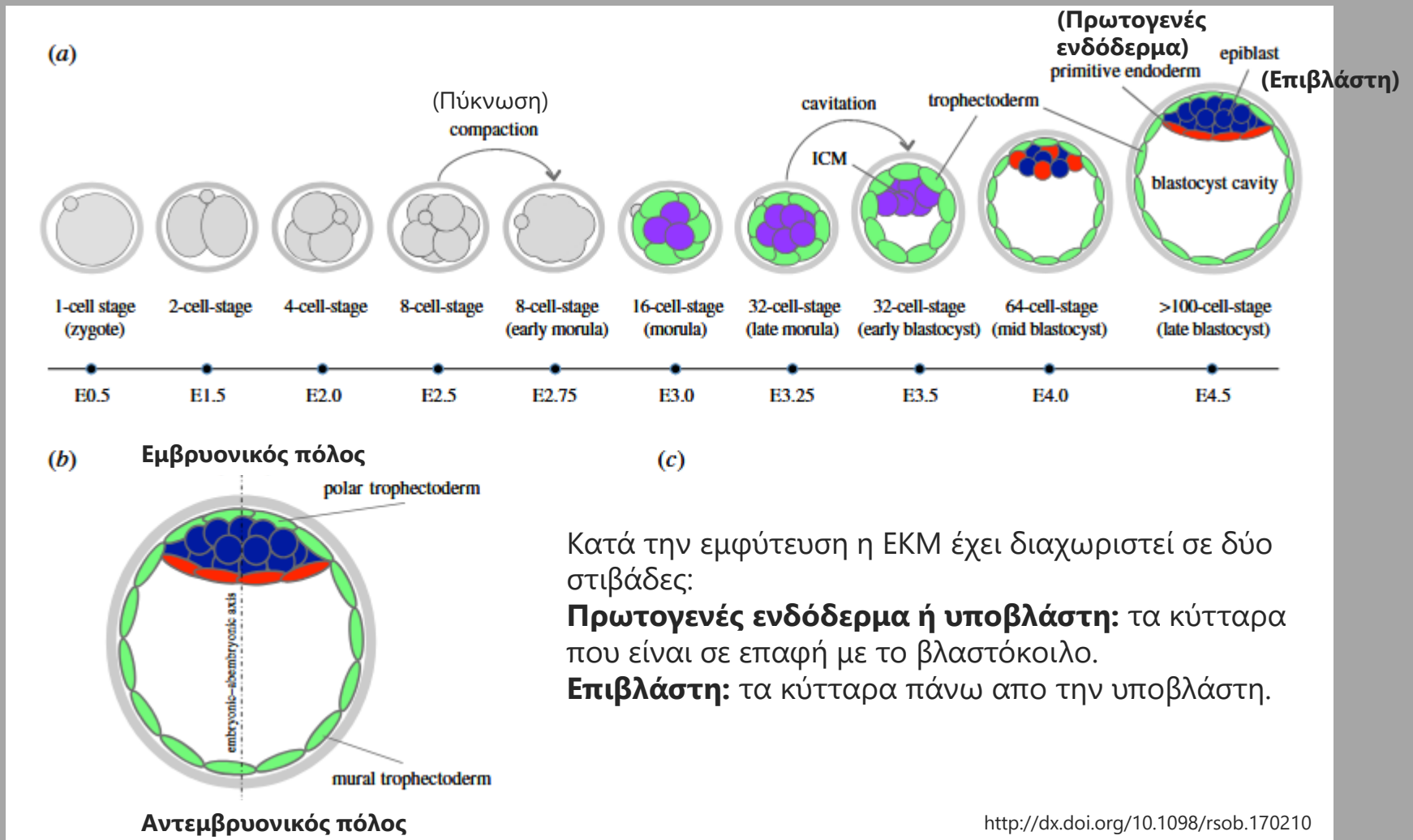
David McIntyre



© Antagair/stock

Mus musculus

Ανάπτυξη εμβρύου ποντικού μέχρι λίγο πριν την εμφύτευση

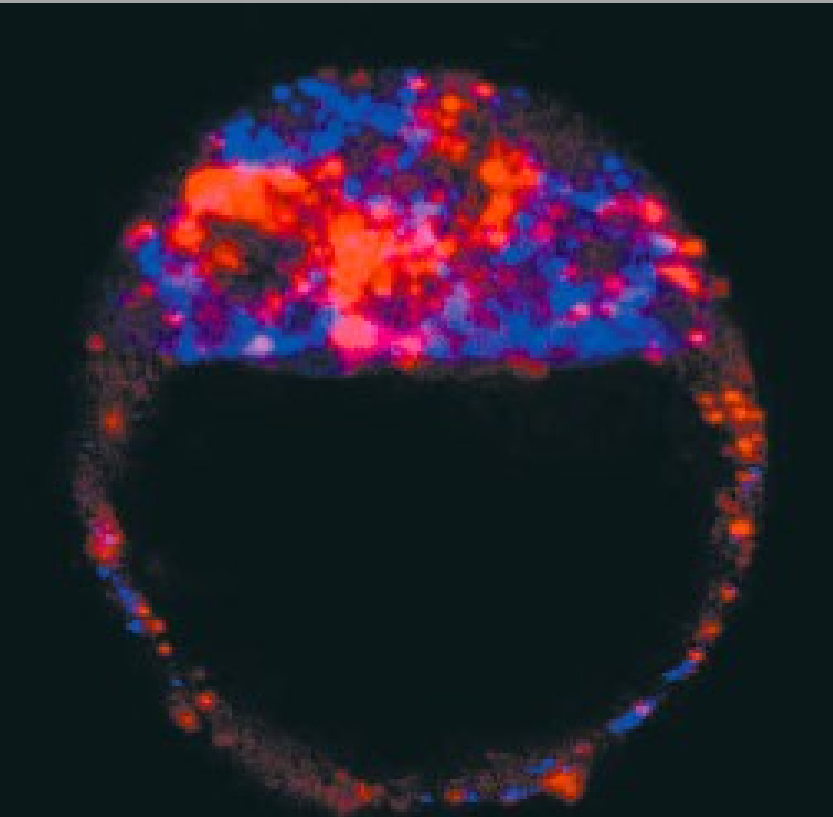


b) Δημιουργούνται δύο πόλοι.

- **Εμβρυονικός πόλος:** εκεί που βρίσκονται τα κύτταρα από τα οποία θα προκύψει το έμβρυο
- **Αντεμβρυονικός πόλος:** απέναντι από τον εμβρυονικό πόλο.

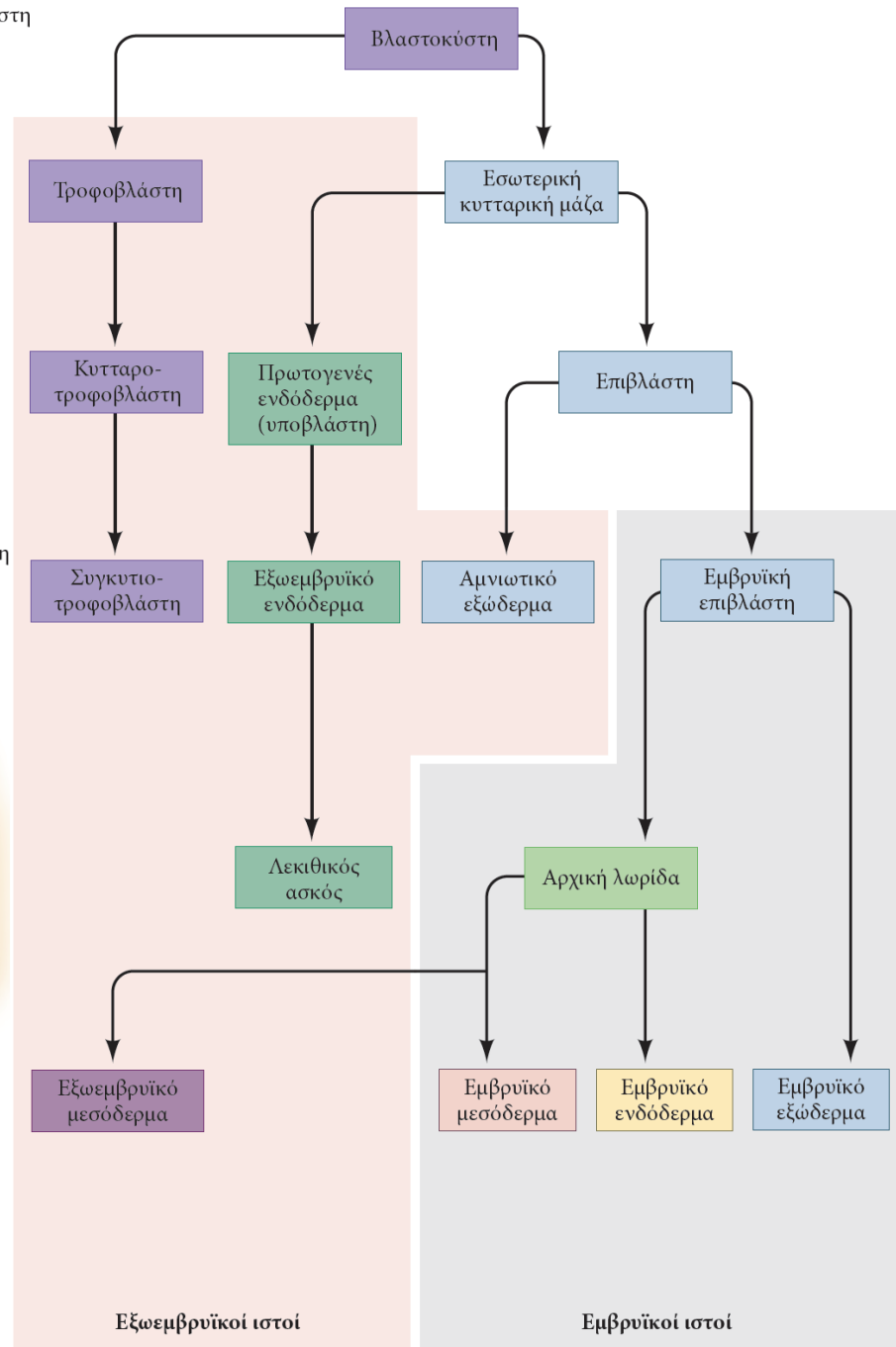
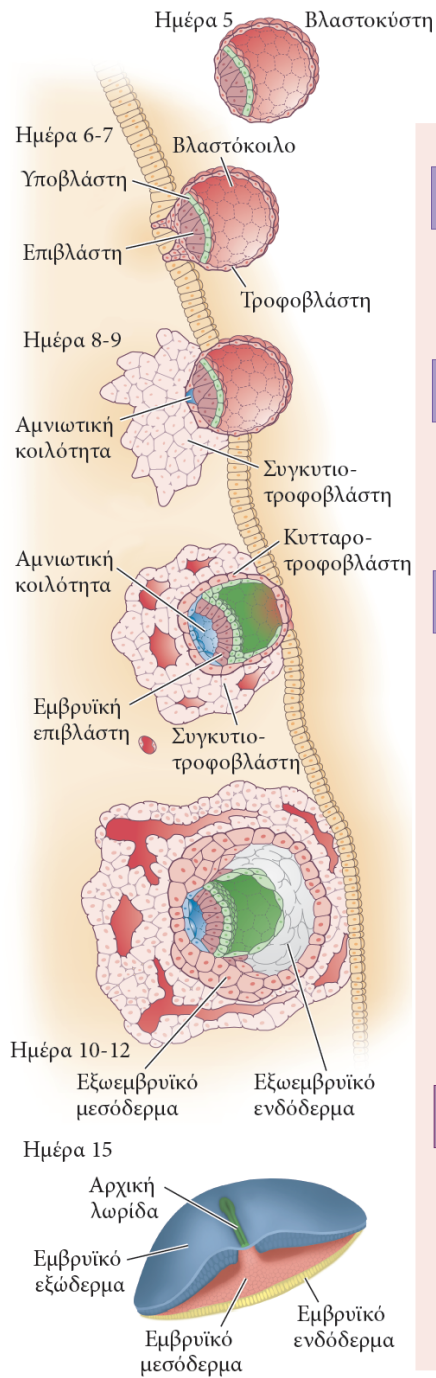
Γονιδιακή έκφραση κατά την πρώιμη ανάπτυξη

(Καθορισμός επιβλάστης και πρωτογενούς ενδοδέρματος)

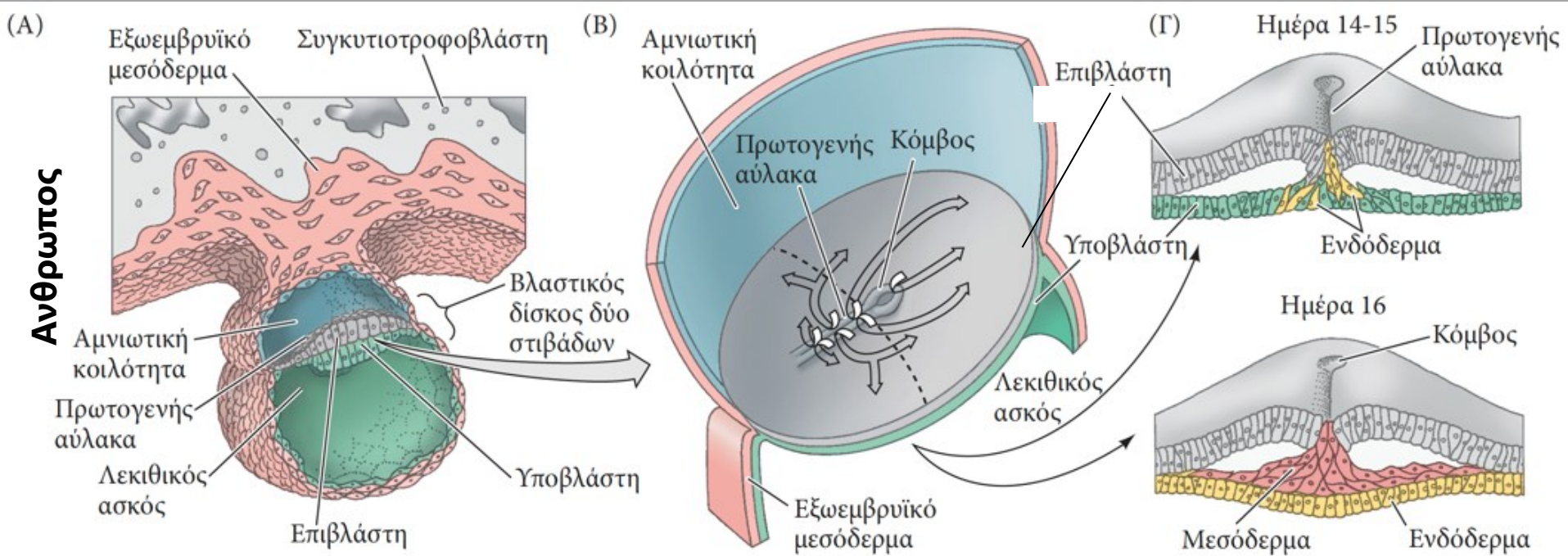


- Τυχαία ενεργοποίηση του **Nanog** (μπλε) και του **GATA6** (κόκκινο) στην εσωτερική κυτταρική μάζα την E 3.5.
- Σηματοδότηση FGF (υψηλότερη = πρωτογενές ενδόδερμα/υποβλάστη)
- **Nanog** = επιβλάστη
- **GATA6** = πρωτογενές ενδόδερμα/υποβλάστη
- Στην E 4.5 οι δυο πληθυσμοί θα διαχωριστούν και το σπλαχνικό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

Άνθρωπος

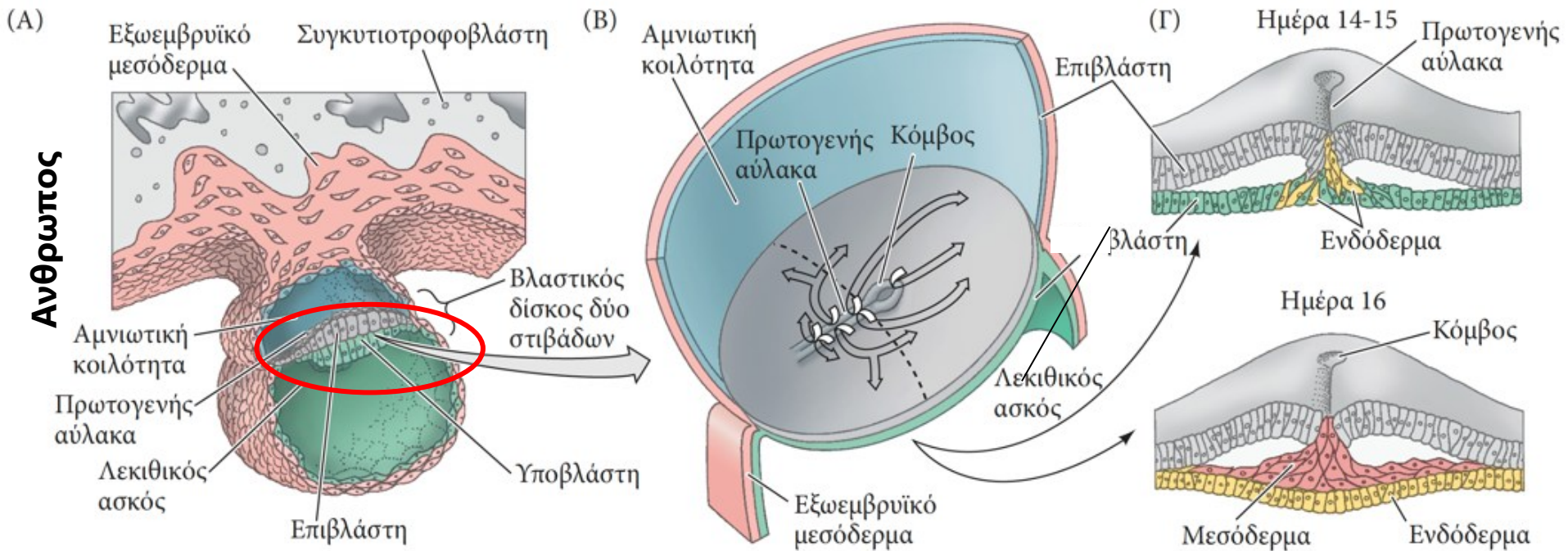


Γαστριδίωση: Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων



- **Δημιουργία αρχικής (πρωτογενούς) γραμμής** στα κύτταρα της επιβλάστης (οπίσθια) η οποία μετατρέπεται σε αύλακα.
- Στο εμπρόσθιο τμήμα της αρχικής γραμμής σχηματίζεται ο **κόμβος**.
- Τα κύτταρα της επιβλάστης υφίστανται επιθηλιομεσεγχυματική μετάπτωση και ως μεμονωμένα κύτταρα διέρχονται από την αρχική γραμμή.
- Αρχικά εκτοπίζουν τα κύτταρα της υποβλάστης – **σχηματισμός ενδοδέρματος**.
- Ακολουθεί το **μεσόδερμα** (αρχική γραμμή).

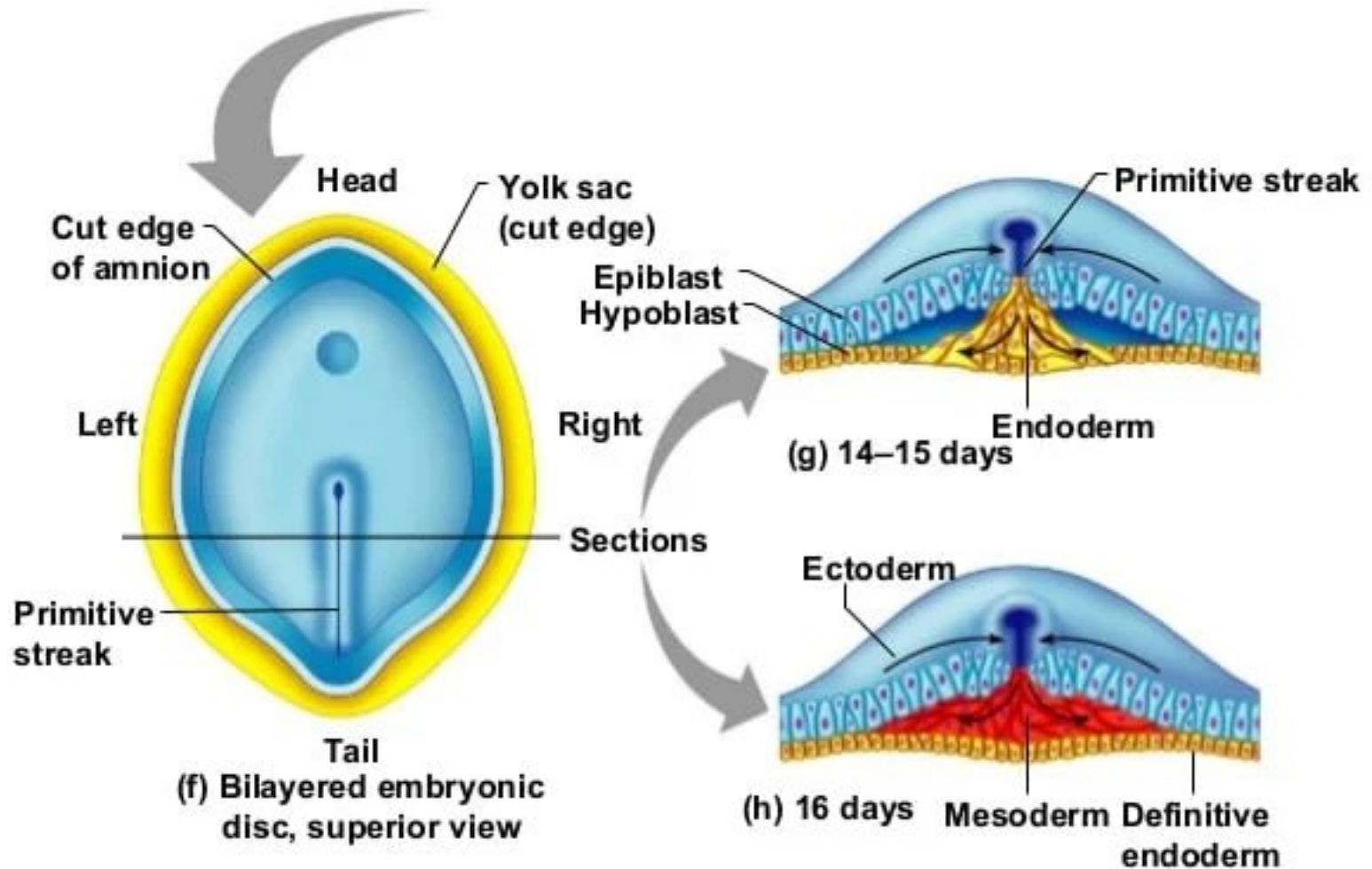
Γαστριδίωση: Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων



- Η νωτοχορδή αναπτύσσεται από τον κόμβο - κύτταρα από την οροφή του πρωτογενούς πεπτικού σωλήνα συγκλίνουν στη μέση γραμμή προς το ραχιαίο τμήμα του εμβρύου.
- Τα κύτταρα του μελλοντικού εξωδέρματος εντοπίζονται μπροστα από το ακραία εμπροσθιο τμήμα της αρχικής γραμμής.
- Στον ποντικό στο στάδιο αυτό δεν έχουν ακόμα ξεχωρίσει οι τρεις κυτταρικές γενεαλογίες ένα κύτταρο μπορεί ακόμα να δώσει απογόνους που ανήκουν σε παραπάνω του ενός βλαστικά δερματα!!

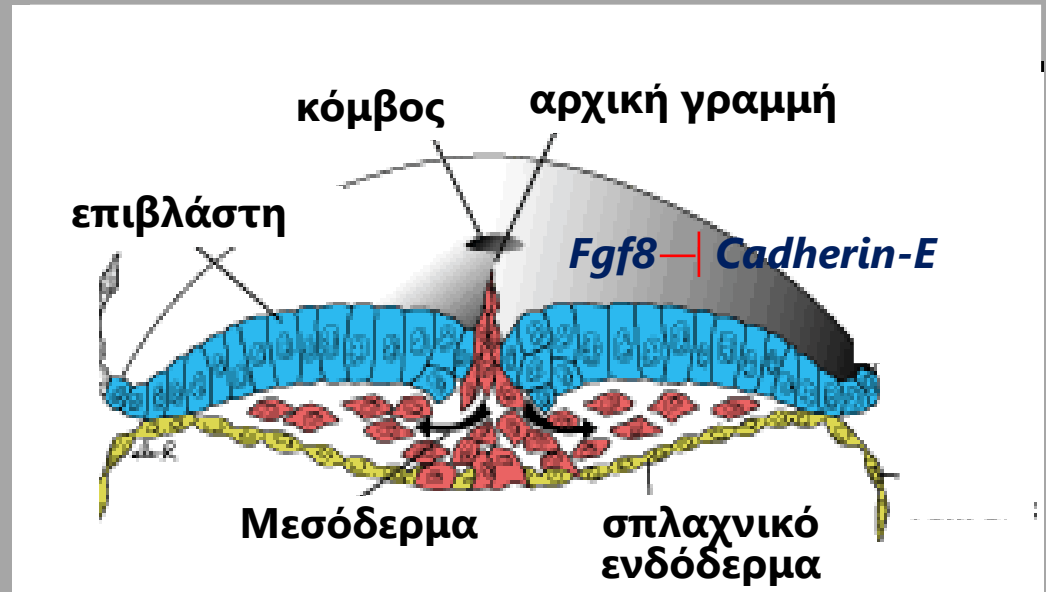
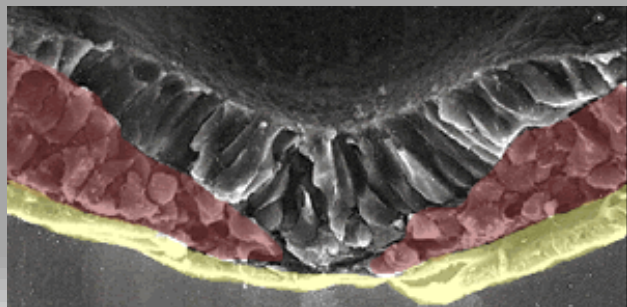
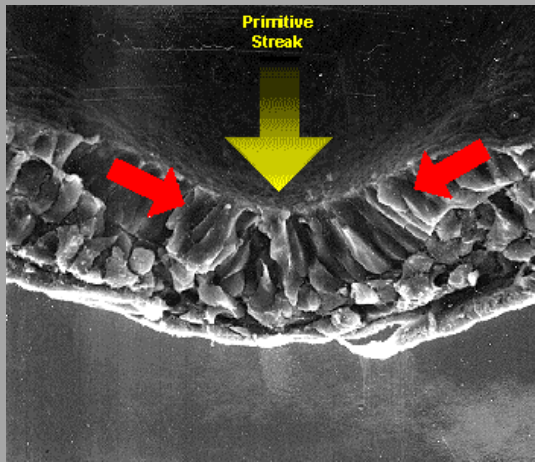
Σχηματισμός τριών βλαστικών δερμάτων

Formation of the three primary germ layers



Γαστριδίωση : Σχηματισμός αρχικής γραμμής

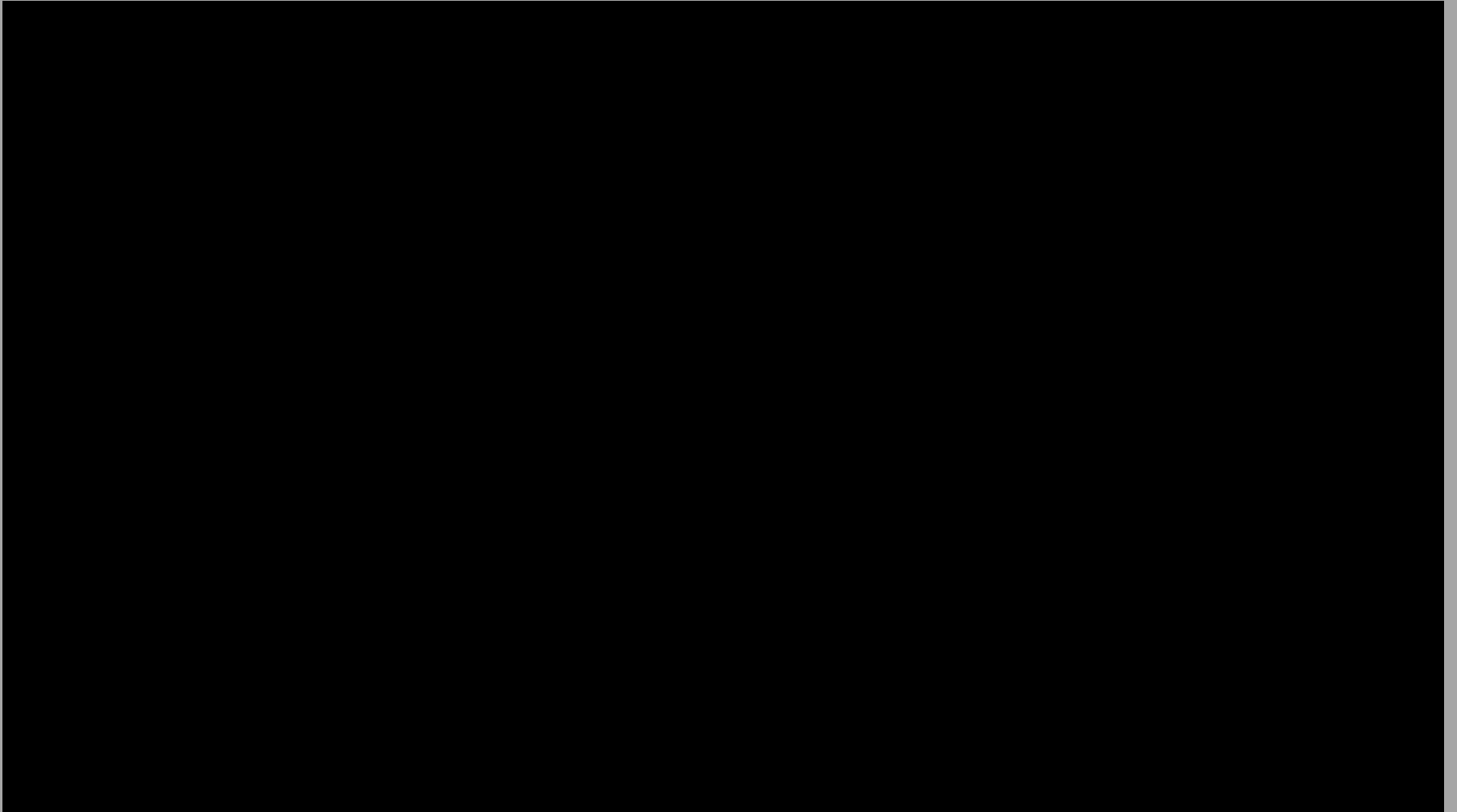
- Η **αρχική γραμμή (primitive streak)** προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό και τη συγκέντρωση κυττάρων της επιβλάστης στο οπίσθιο τμήμα του εμβρύου.
- Τα κύτταρα αυτά (επιβλάστης) εκφράζουν *Fgf8*, το σήμα του οποίου οδηγεί σε απώλεια της καδερίνης E. Στη συνέχεια αποκολλώνται από το εξώδερμα και γλιστρούν κάτω από αυτό.
- Το κεφαλικό άκρο είναι ο κόμβος (node).
- Η αρχική γραμμή χαρακτηρίζει το οπίσθιο τμήμα του εμβρύου.

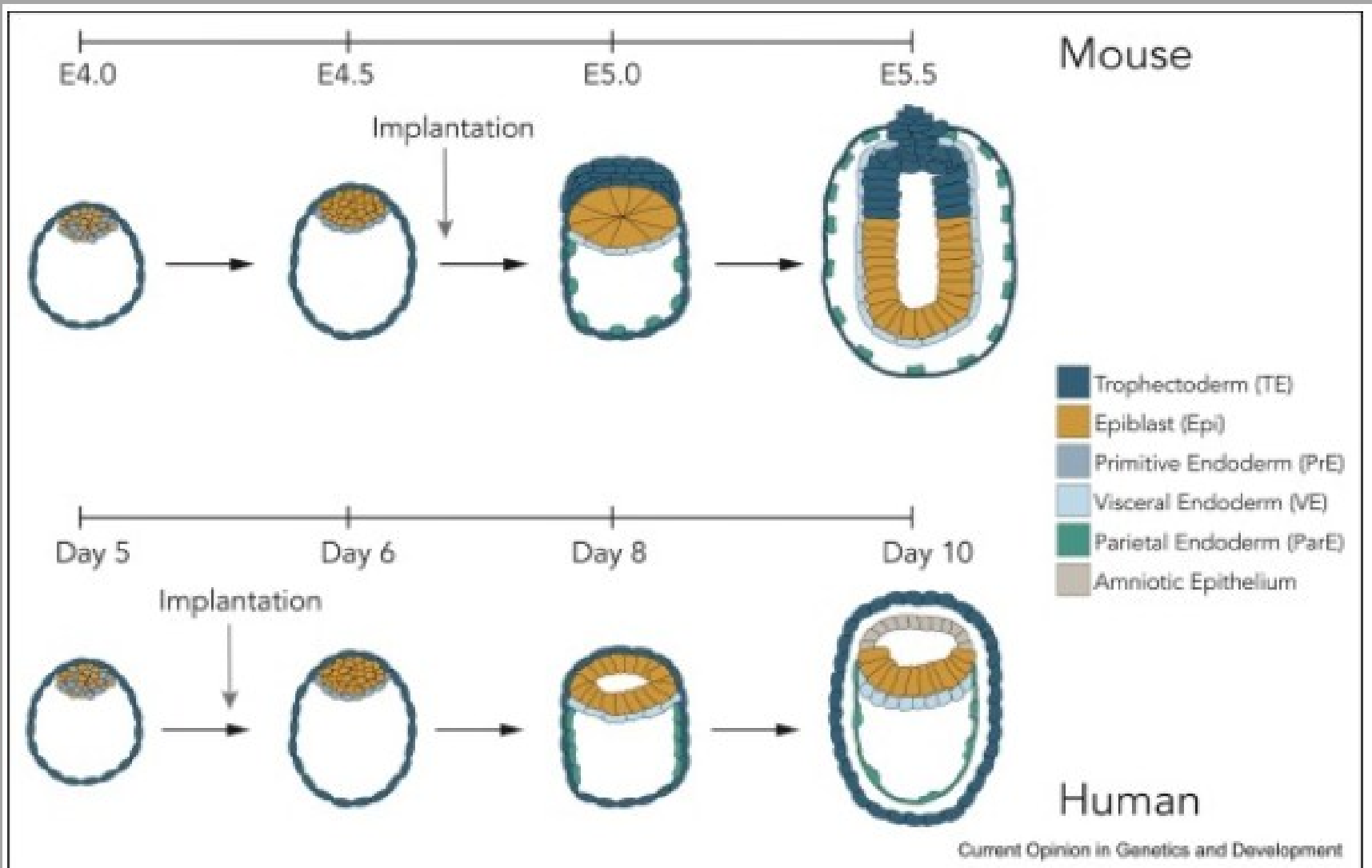


Απουσία *Fgf8* → δεν γίνεται η μετάπτωση και δεν ενεργοποιείται μια σειρά γονιδίων που χρειάζονται για τη μετανάστευση και την εξειδίκευση των κυττάρων.

Επομένως: μεσόδερμα και ενδόδερμα δεν σχηματίζονται.

Γαστρίδιωξη



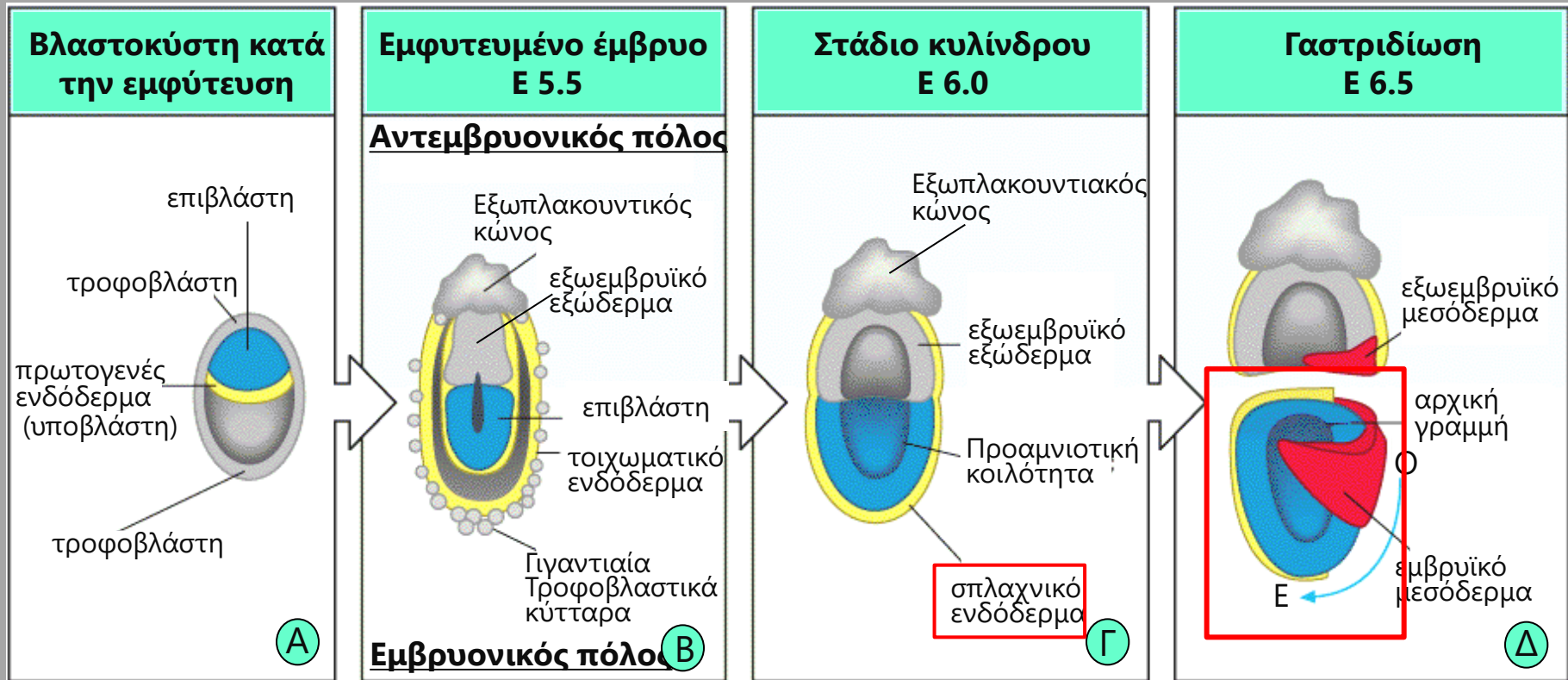


Στο ποντίκι το έμβρυο θυμίζει κύλινδρο (cup shaped) ο οποίος περιβάλλεται απο το πρωτογενές ενδόδεσμα.

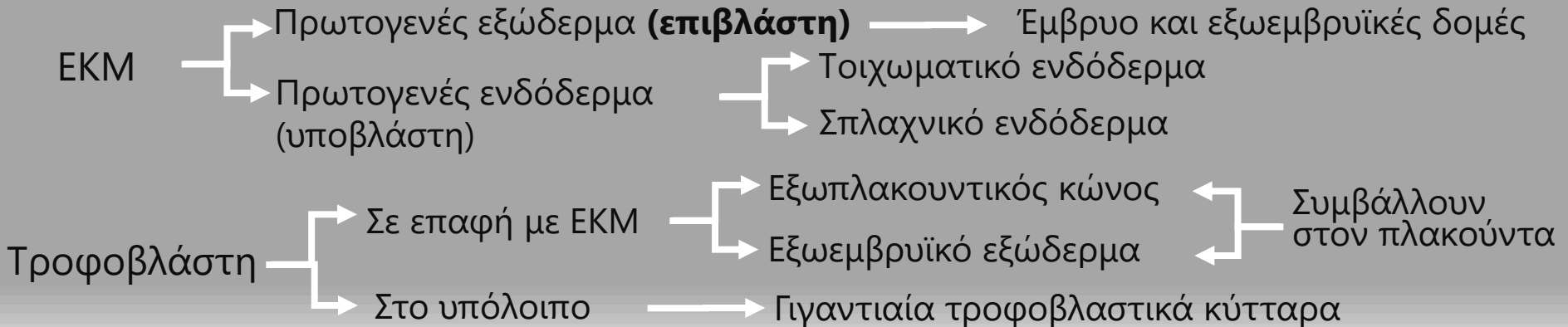
Στον άνθρωπο είναι δίσκος (όπως και στο κοτόπουλο).



Γαστριδίωση I

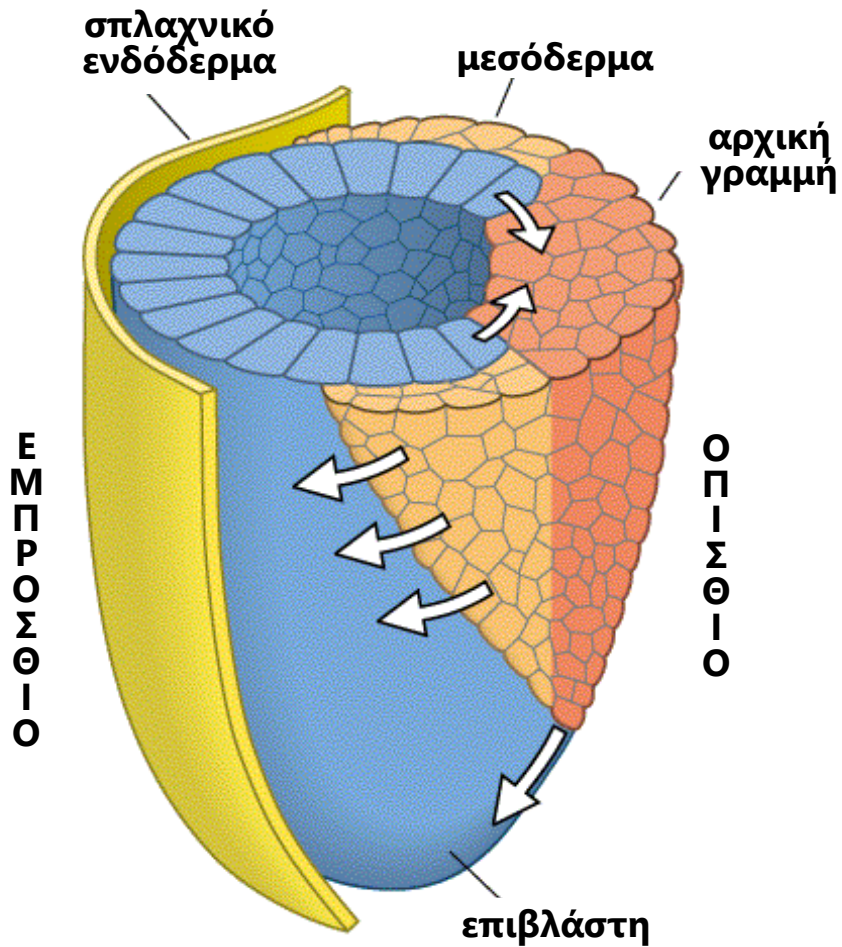


Στα Γ και Δ δεν απεικονίζεται το τοιχωματικό ενδόδερμα ούτε τα γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα

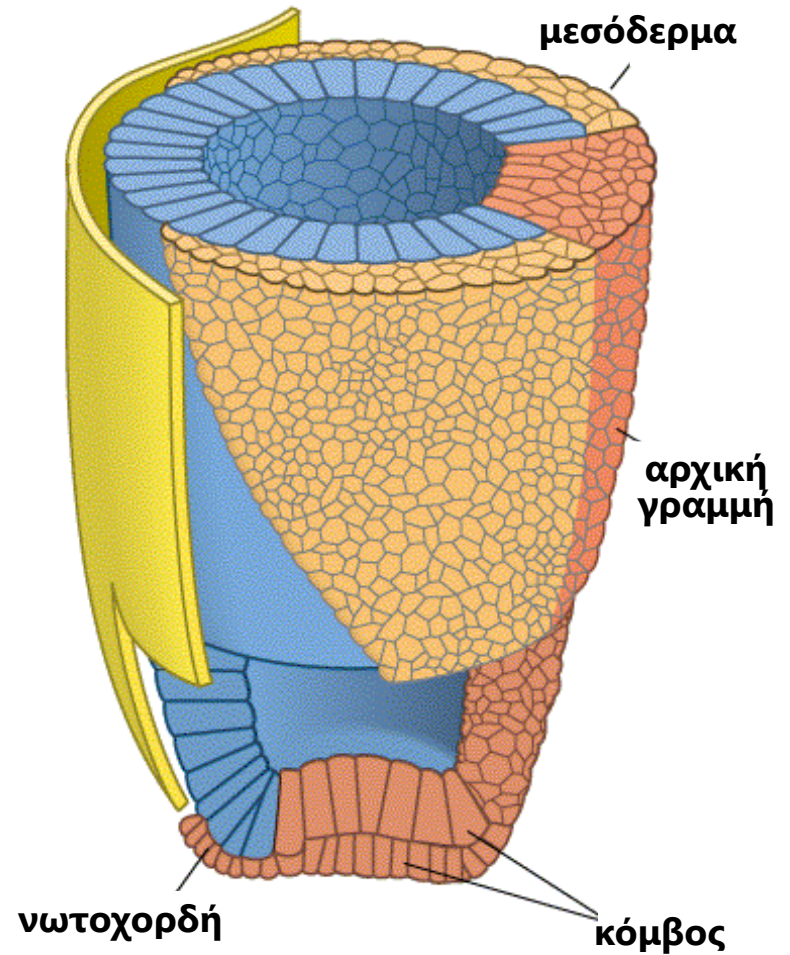


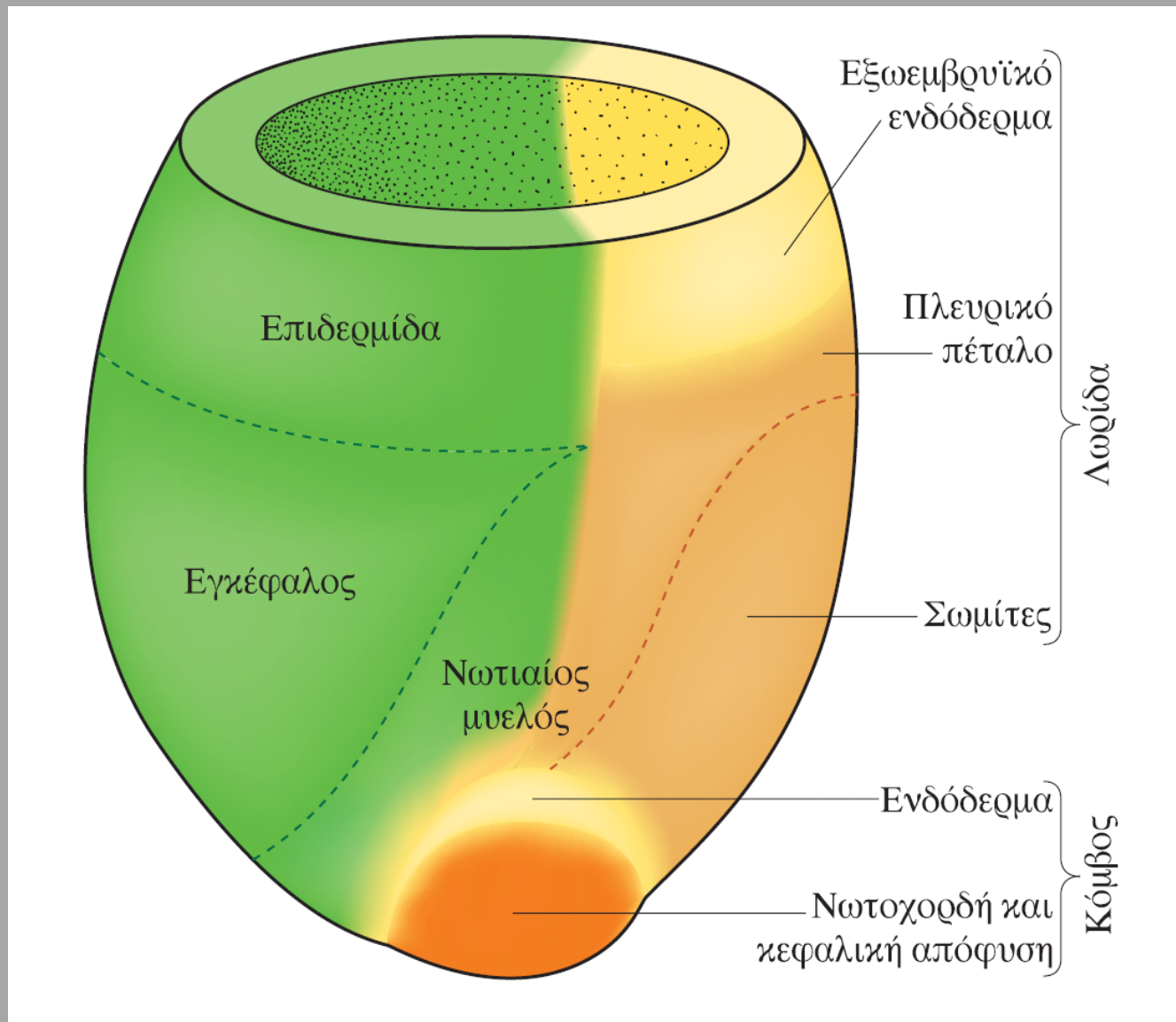
Γαστριδίωση II

Ε 6.5 : Σχηματισμός αρχικής γραμμής



Ε 7.5 : Πρώιμη κεφαλική καταβολή

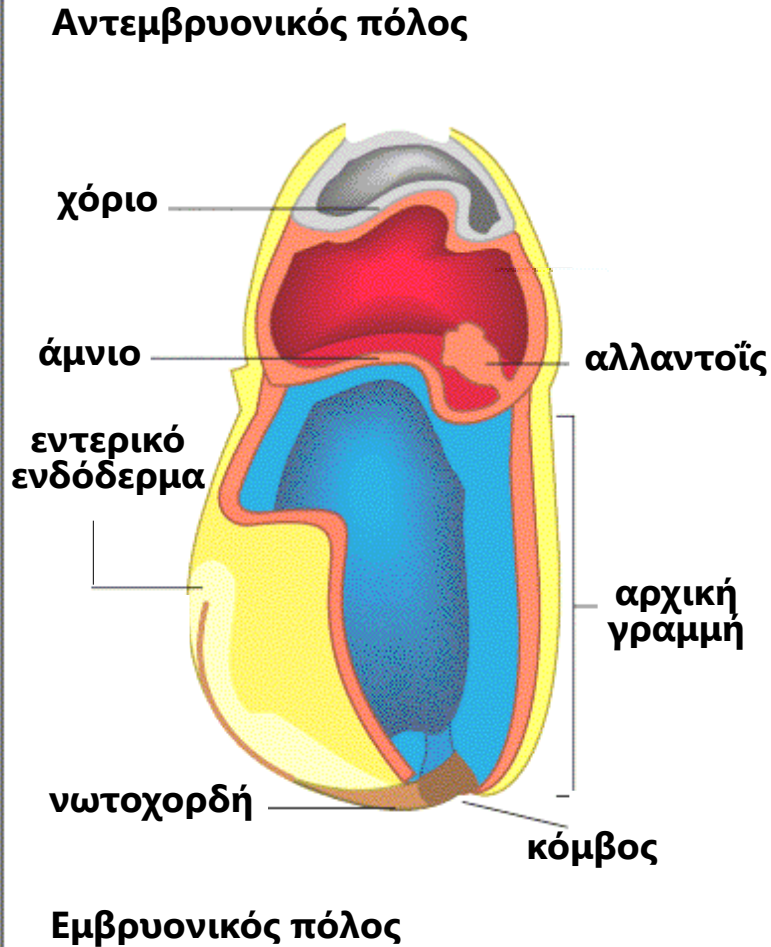




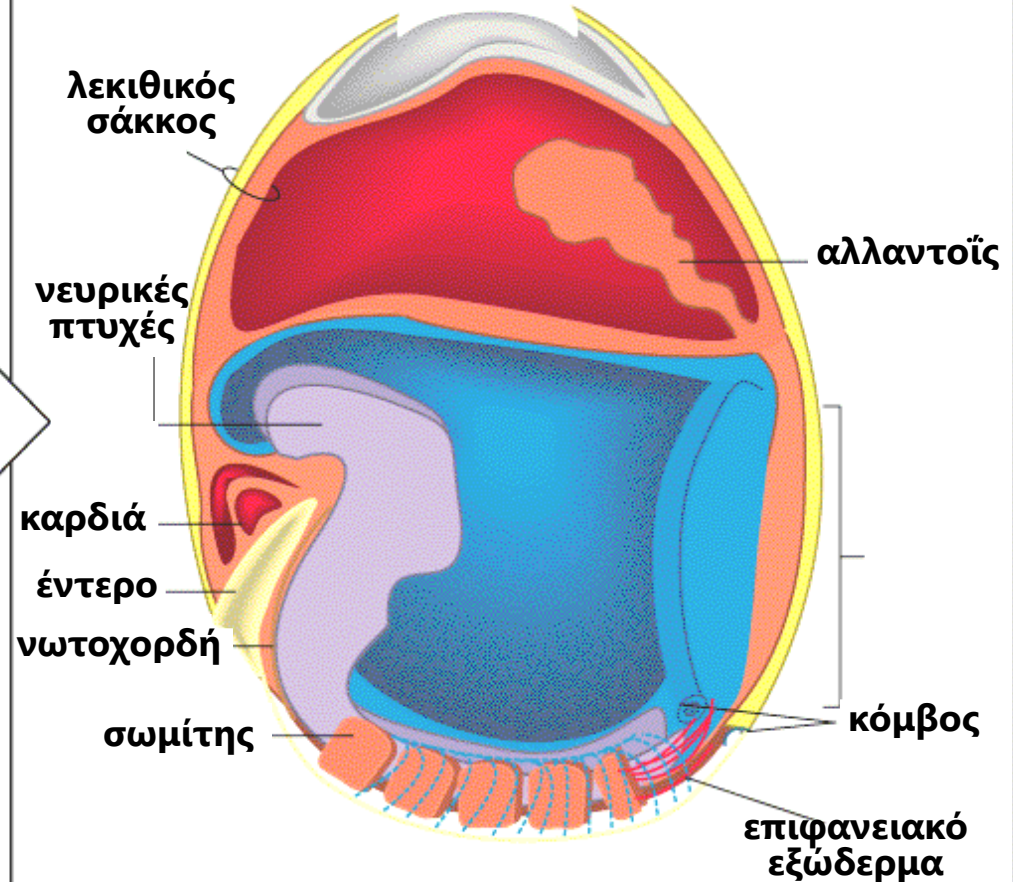
Χάρτης πεπρωμένου του σταδίου της όψιμης αρχικής λωρίδας. Στην πραγματικότητα τα όρια είναι πιο ασαφή λόγω της ανάμειξης μεταξύ των κυττάρων.

Γαστριδίωση - Έναρξη Νευριδίωσης

Ε 7.5 : Αρχική γραμμή σε πλήρη ανάπτυξη



Ε 8.5 : Σχηματισμός νευρικών πτυχών



Τέλος γαστριδίωσης- Στροφή

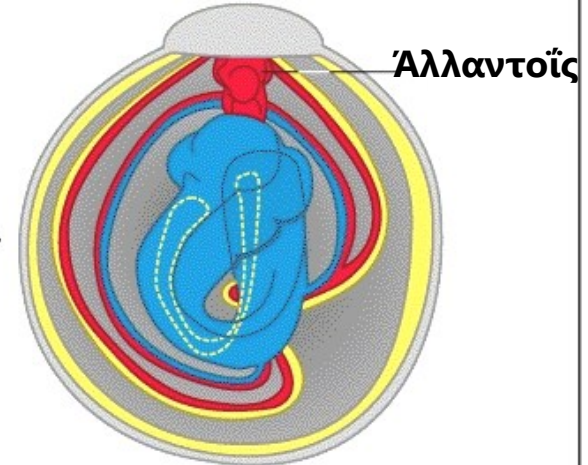
**E 8.5 : Σχηματισμός
νευρικών πτυχών**



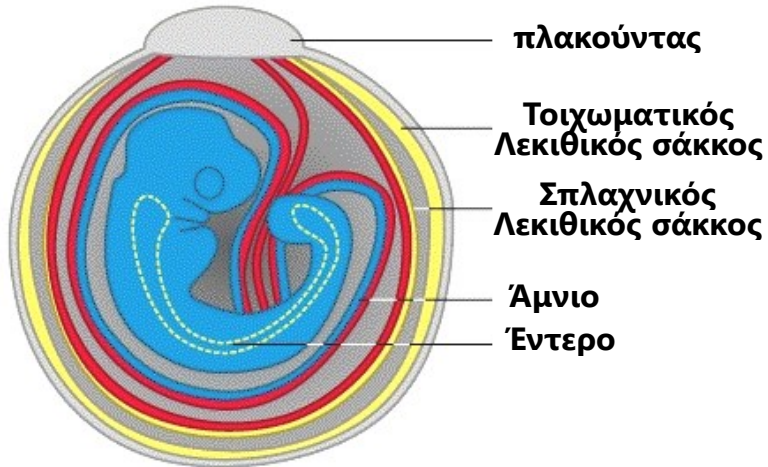
3-4 ώρες μετά



E 9.0



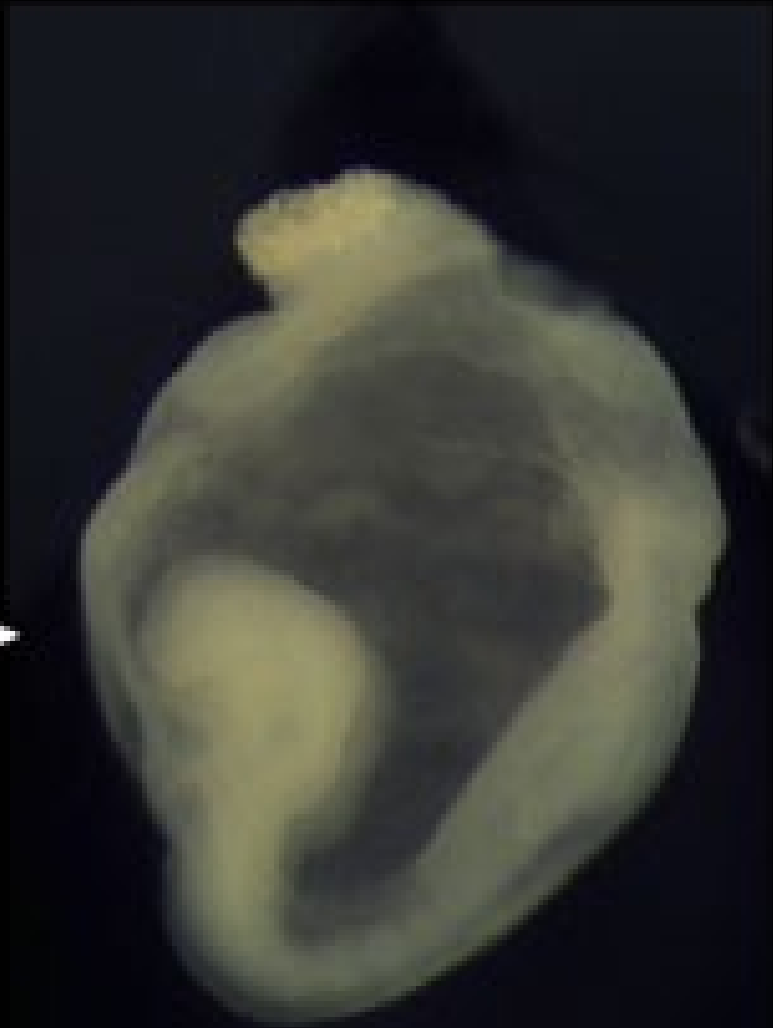
E 9.5 : Τέλος γαστριδίωσης



Ανάμεσα στην E8.5 και την E9.5 το έμβρυο στρέφεται και τελικά περικλείεται στον αμνιακό σάκκο (άμνιο) που περιέχει το αμνιακό υγρό που προφυλάσσει το έμβρυο από τους κραδασμούς. Ο σπλαχνικός λεκιθικός σάκκος βοηθά στη θρέψη και η αλλαντοίς συνδέει το έμβρυο με τον πλακούντα.



e7.5



e8.5

Γαστριδίωση: Οι όροι

Γαστριδύση: *Gastrulation*

Πρωτογενές ενδόδερμα: *Primitive endoderm*

Τοιχωματικό ενδόδερμα: *Parietal endoderm*

Γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα: *Trophoblast giant cells*

Εξωεμβρυϊκό εξώδερμα: *Extra-embryonic mesoderm*

Προαμνιακή κοιλότητα: *Proamniotic cavity*

Σπλαχνικό ενδόδερμα: *Visceral endoderm*

Επιβλάστη: *Epiblast*

Εμπρόσθιο: *Anterior*

Οπίσθιο: *Posterior*

Αρχική γραμμή: *Primitive streak*

Κόμβος: *Node*

Νωτοχορδή: *Notochord*

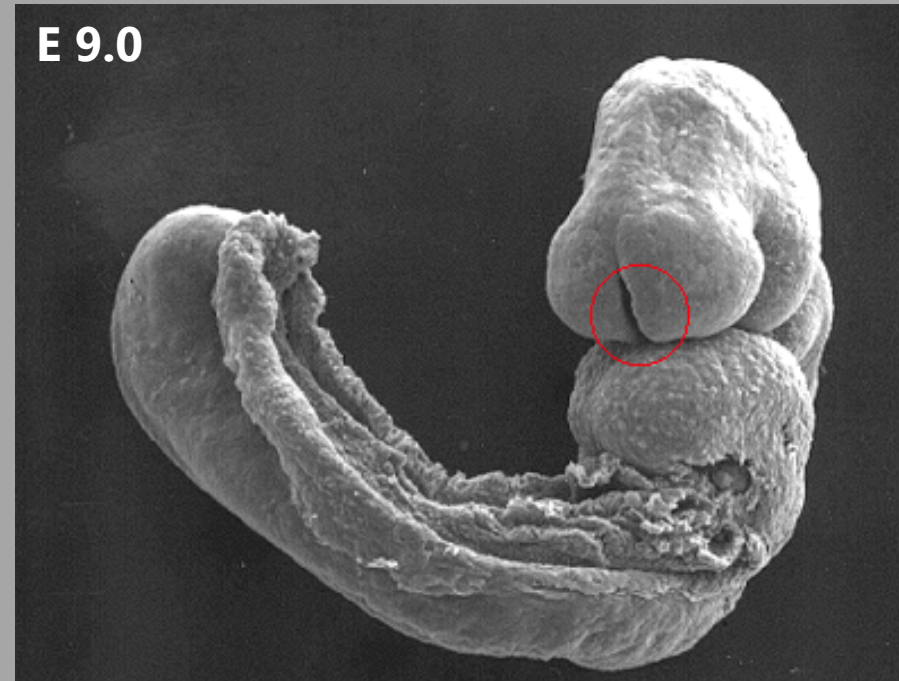
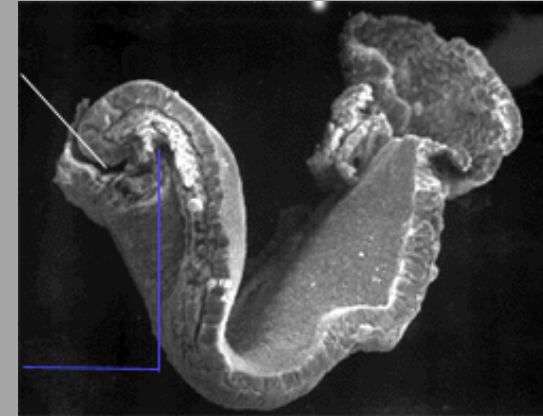
Αλλαντοΐς: *Allantois*

Νευρικές πτυχές: *Neural folds*

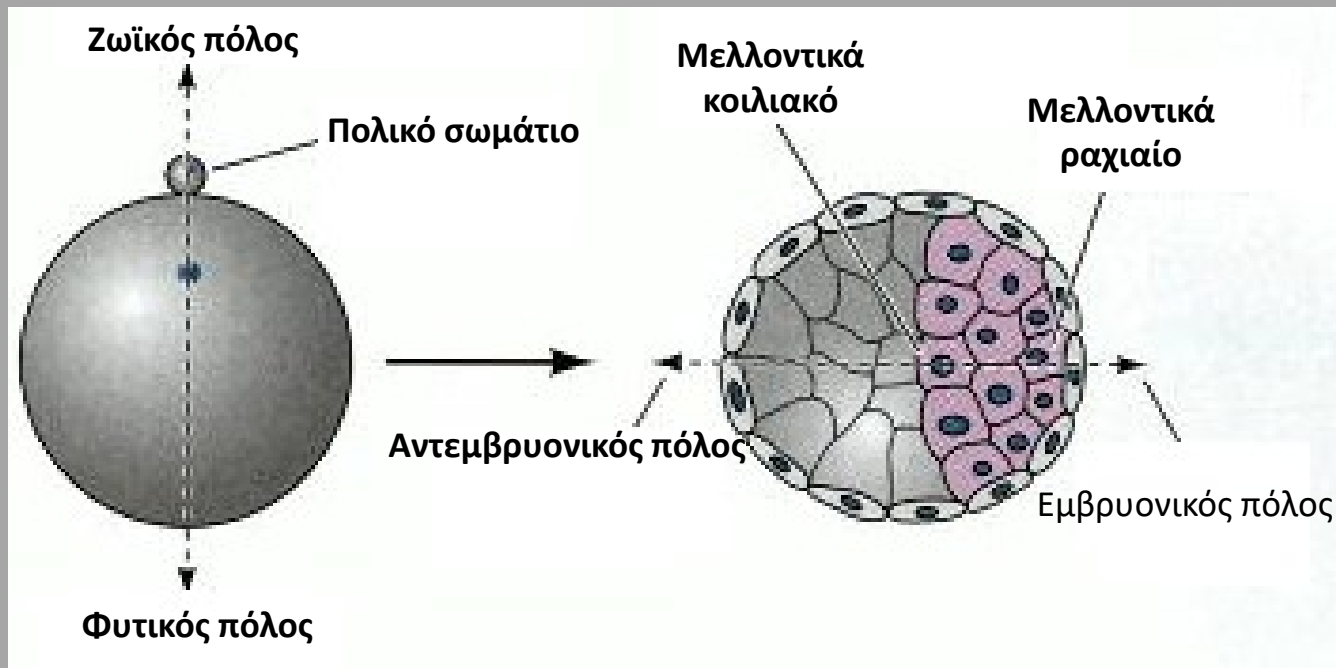
Σωμίτης: *Somite*

Επιφανειακό εξώδερμα: *surface ectoderm*

Εξωπλακουντικός κώνος: *ectoplacental cone*

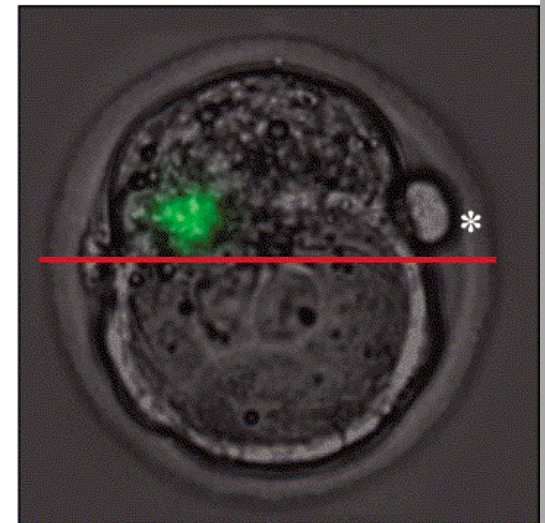
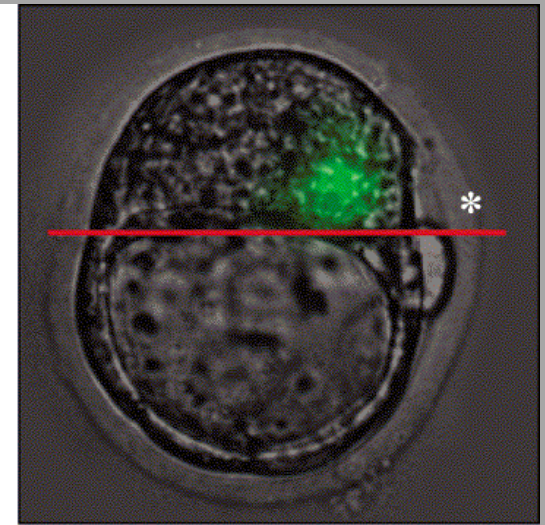
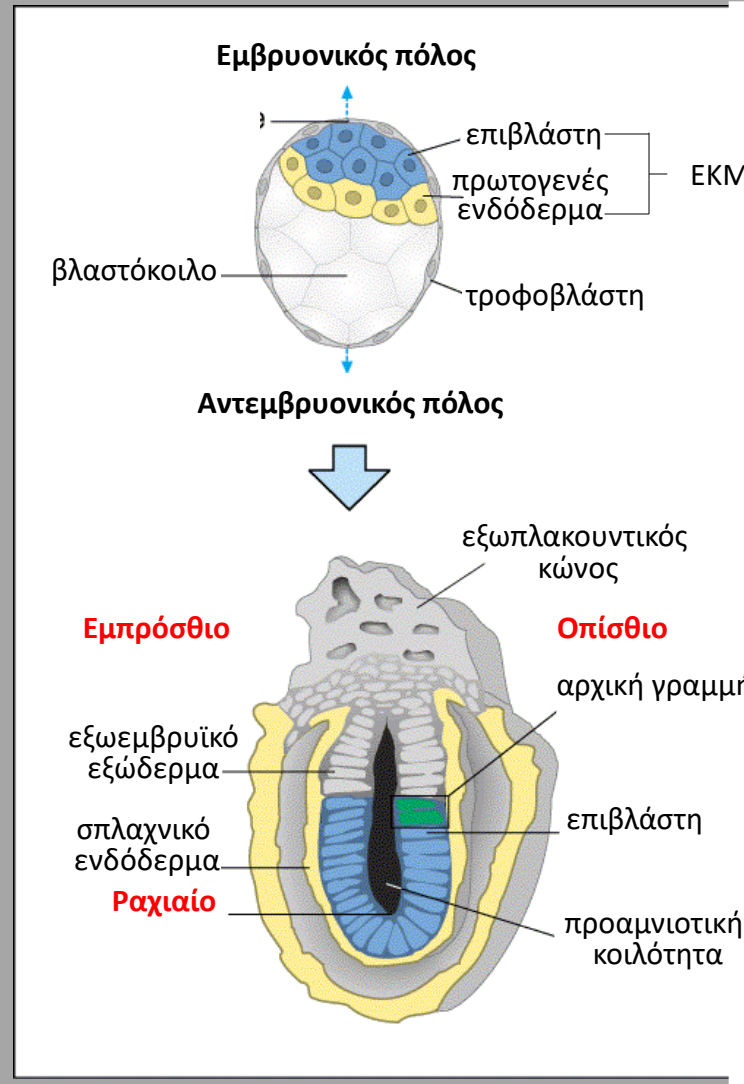


Καθορισμός αξόνων: Ο ραχιαίος - κοιλιακός άξονας

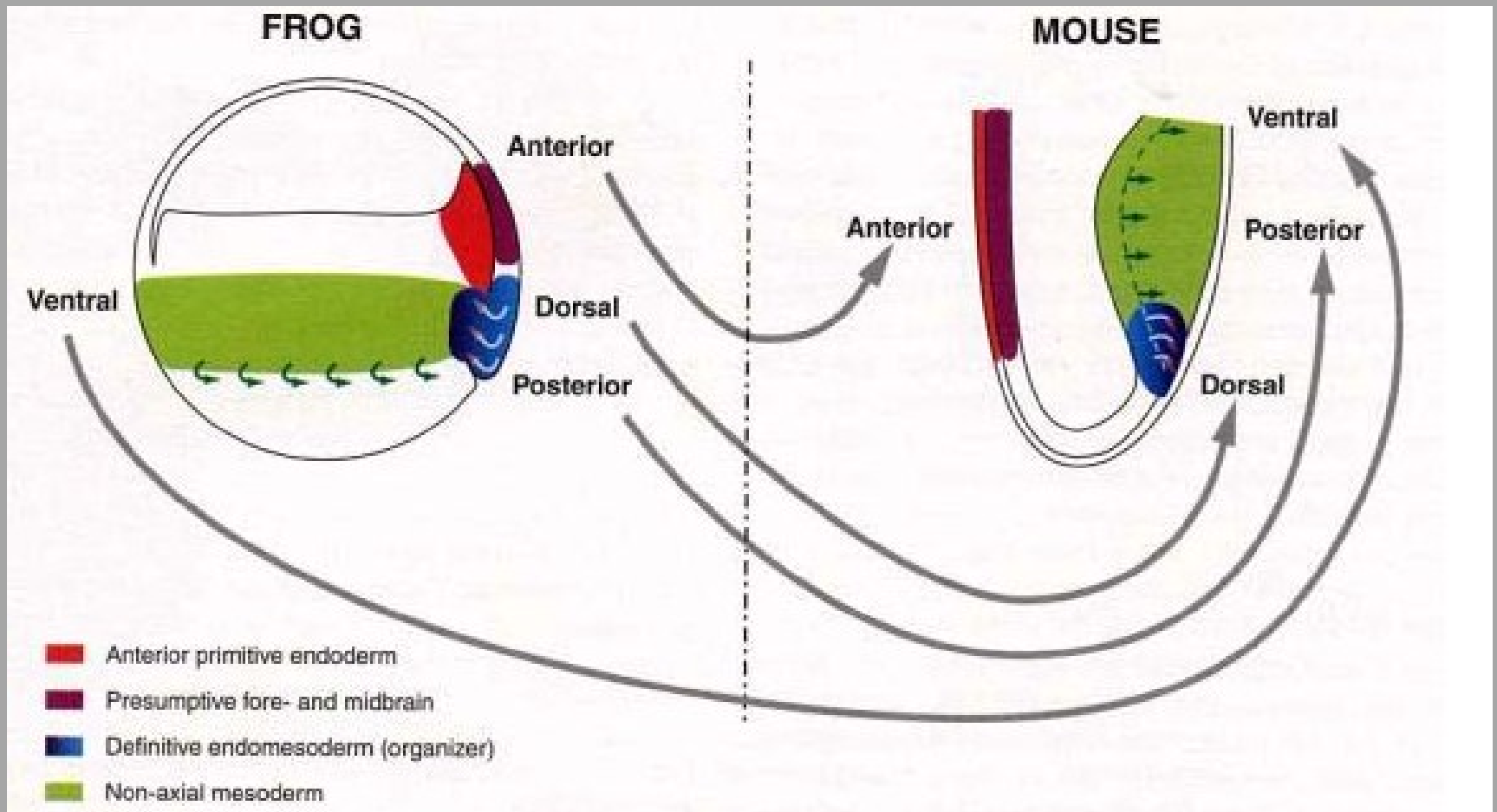


- Στη βλαστοκύστη η ΕΚΜ καθορίζει τον εμβρυονικό-αντεμβρυονικό άξονα, που γεωμετρικά σχετίζεται με τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα. Ο άξονας αυτός είναι κάθετος στον άξονα ζωϊκού- φυτικού πόλου.

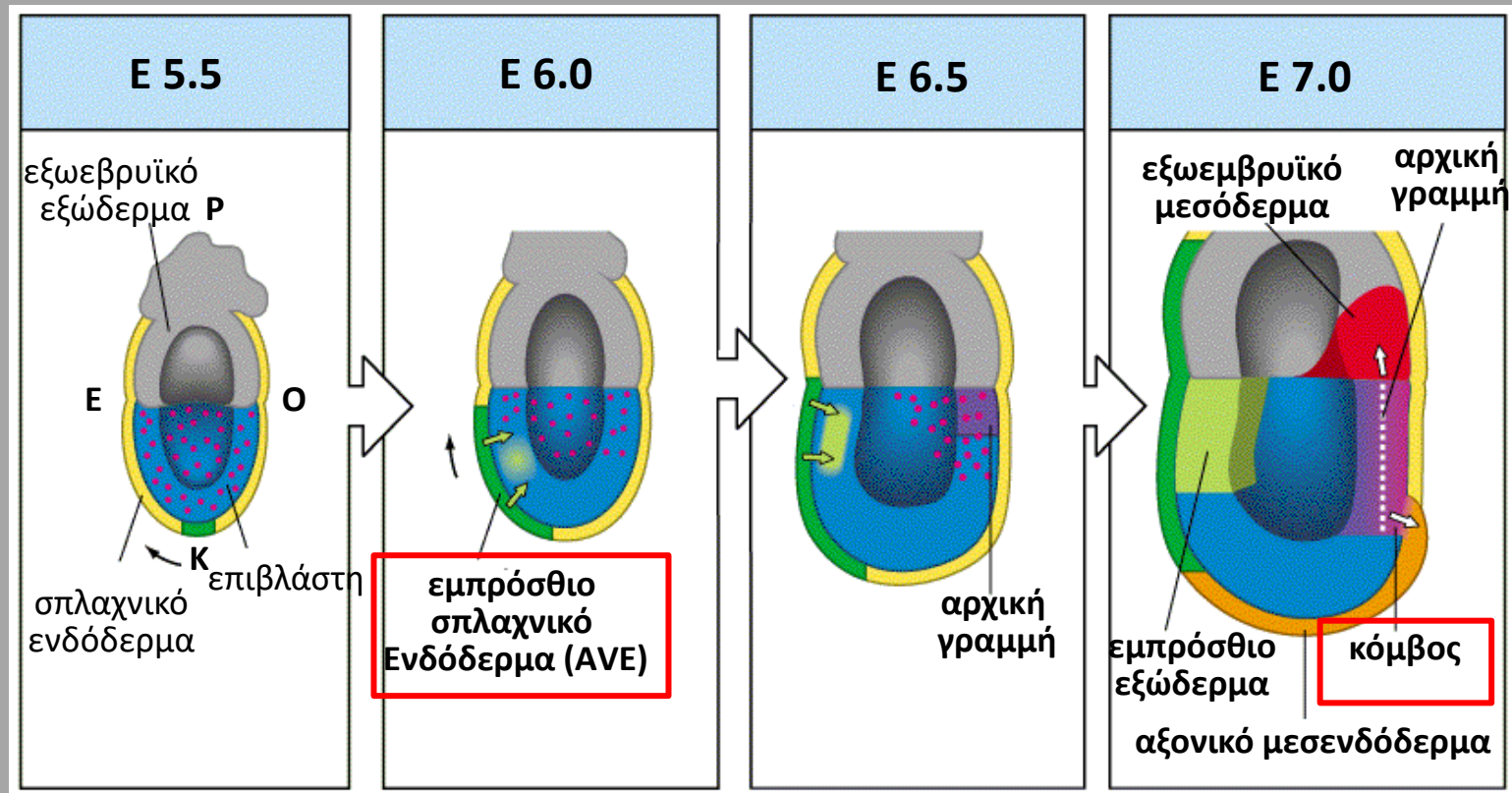
Καθορισμός αξόνων: Ο ραχιαίος - κοιλιακός άξονας



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



Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

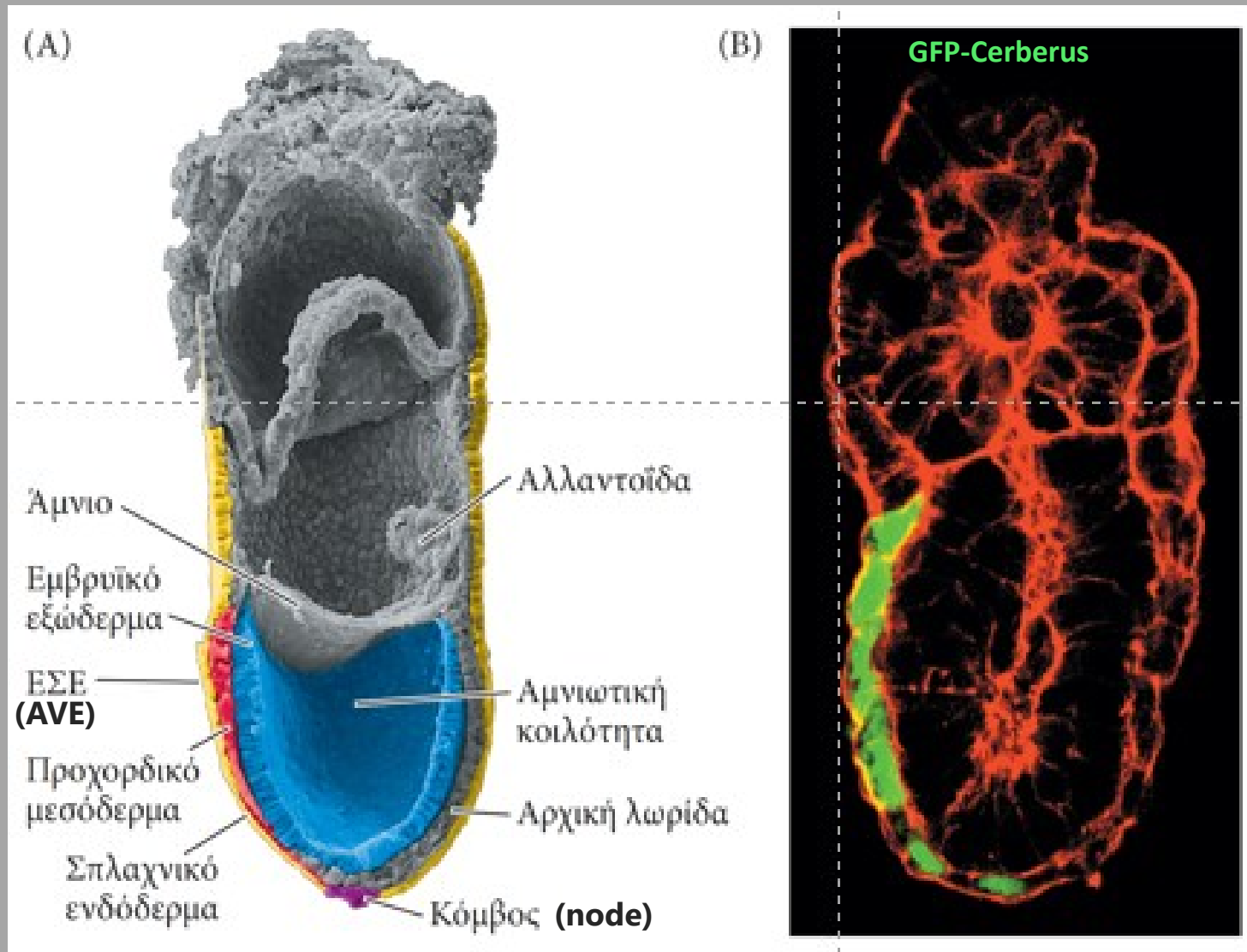


Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο «κέντρα ελέγχου» :

1. **Κόμβος (node)** - υπεύθυνος για το σχηματισμό του κορμού και
 2. **Εμπρόσθιο Σπλαχνικό Ενδόδερμα (ΕΣΕ) (Anterior Visceral Endoderm - AVE)**.
- Συνεργάζονται μεταξύ τους για το σχηματισμό του εμπρόσθιου τμήματος.

Οι δύο αυτές περιοχές εκφράζουν ομόλογα γονιδίων τα οποία εκφράζονται στον οργανωτή (organizer) του *Xenopus* και του εμβρύου της όρνιθας.

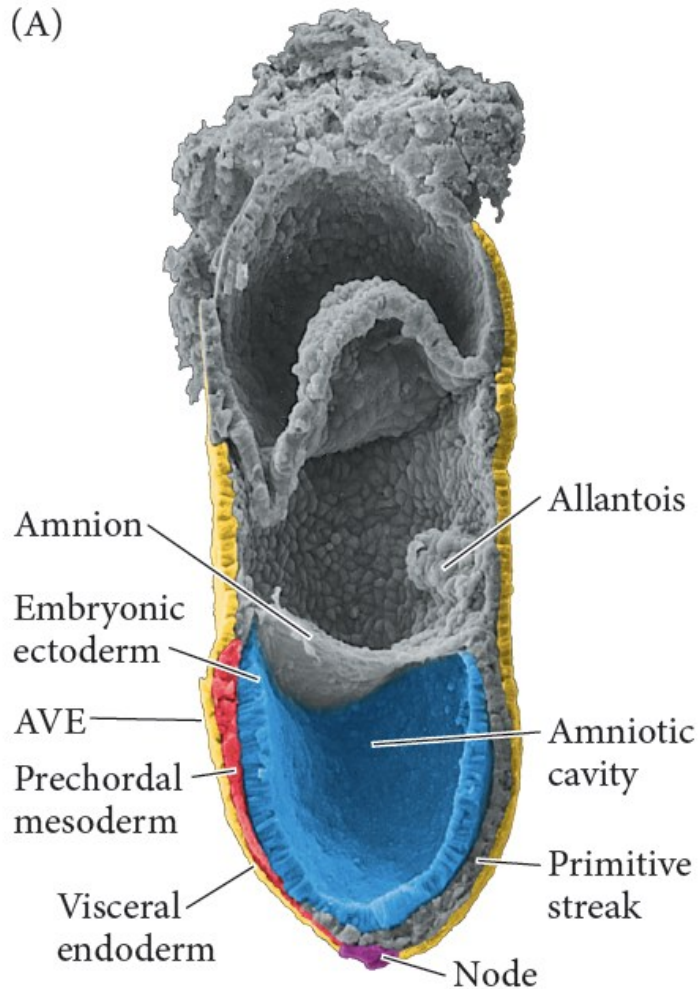
Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας



Στα έμβρυα των θηλαστικών υπάρχουν δύο κέντρα ελέγχου: ο κόμβος (node) και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (ΕΣΕ ή AVE- Anterior Visceral Endoderm).

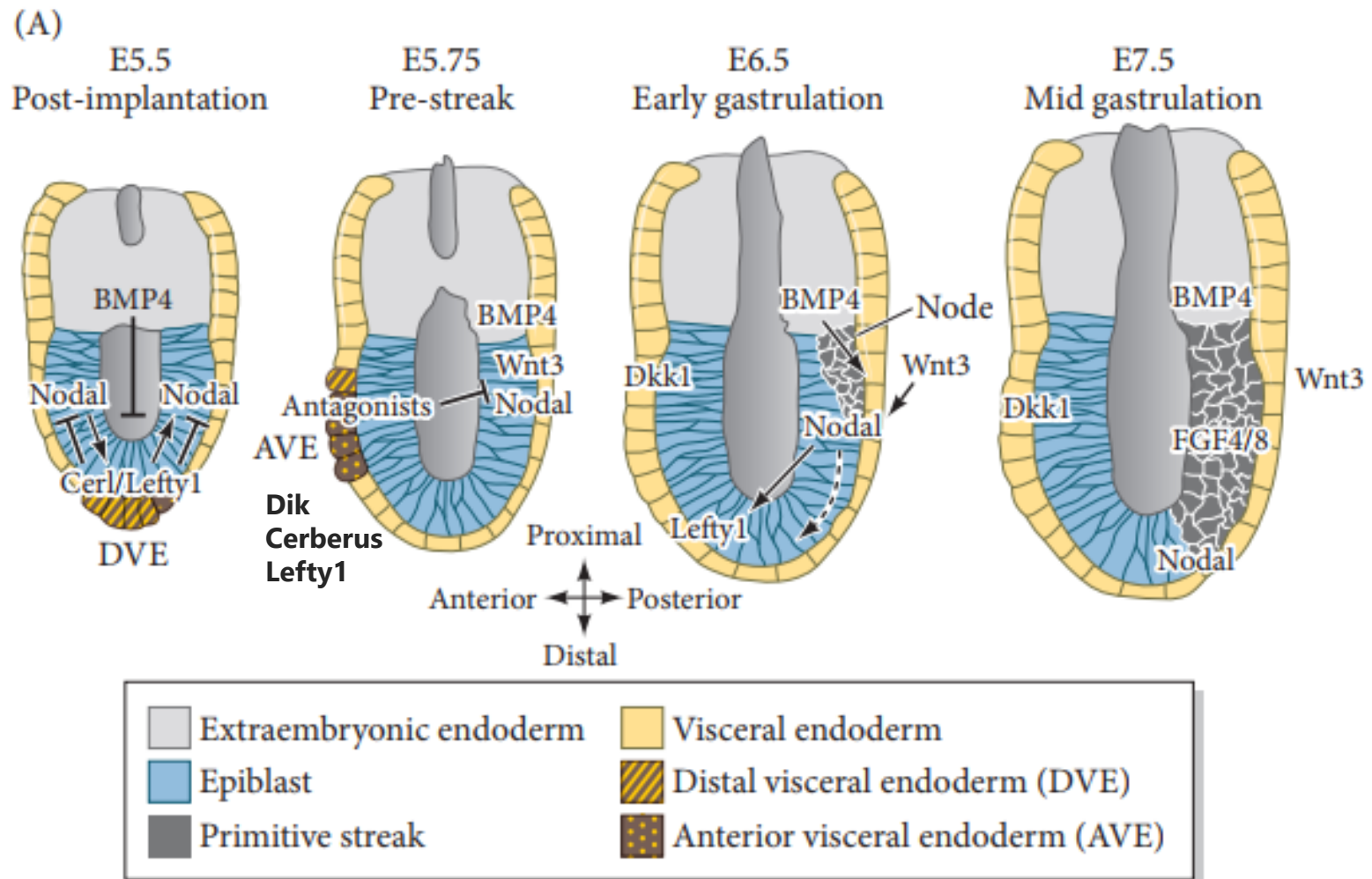
Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

(A)



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

Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και γονιδιακή έκφραση

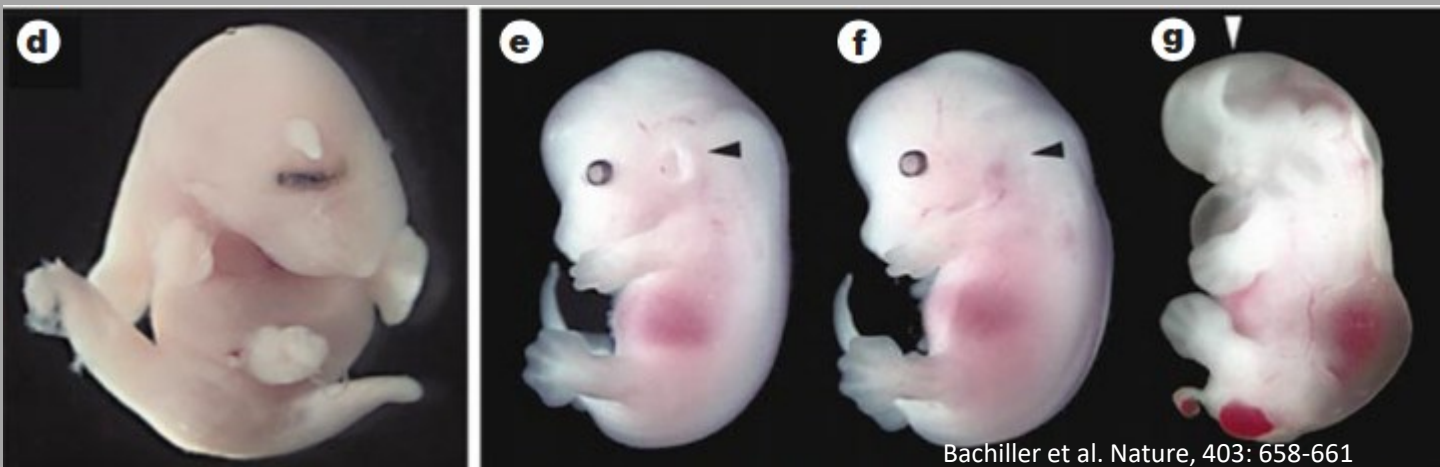


Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και ο κόμβος



α. Έκφραση του **chordin** κατά τη γαστριδίωση σε αρχική λωρίδα και κόμβο

β. Έκφραση του **noggin** στη νευρική πλάκα



d. *Chd^{-/-};Nog^{-/-}*

e. *wt*

f. *Chd^{-/-};Nog^{+/+}*

g. *Chd^{-/-};Nog^{-/-}*

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

Καθορισμός αξόνων: ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα

- Το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (ΕΣΕ ή AVE) σχηματίζεται στο εμπρόσθιο πάντα άκρο πριν από τον κόμβο, και η αρχική γραμμή δημιουργείται ακριβώς απέναντί του.
- Το εμπρόσθιο σπλαχνικό ενδόδερμα (ΕΣΕ ή AVE) εκφράζει μια σειρά γονιδίων που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό της κεφαλής (*Lim-1*, *Otx-2*, *Hesx-1*, *Cerberus*).

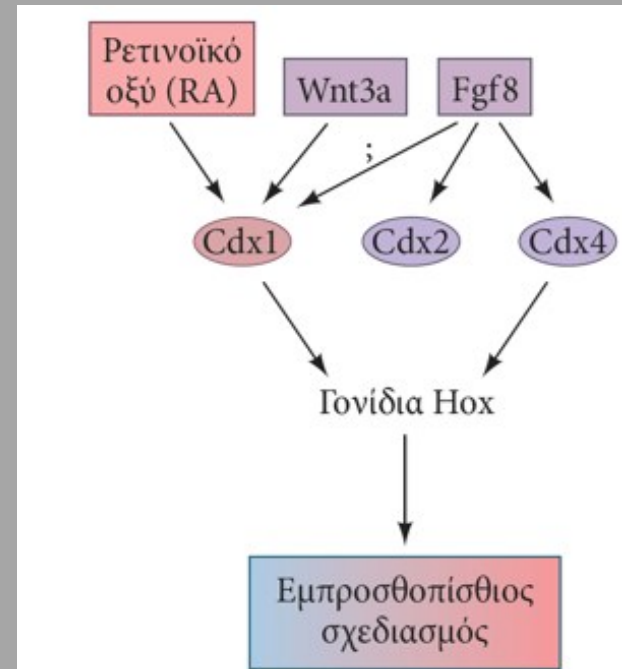
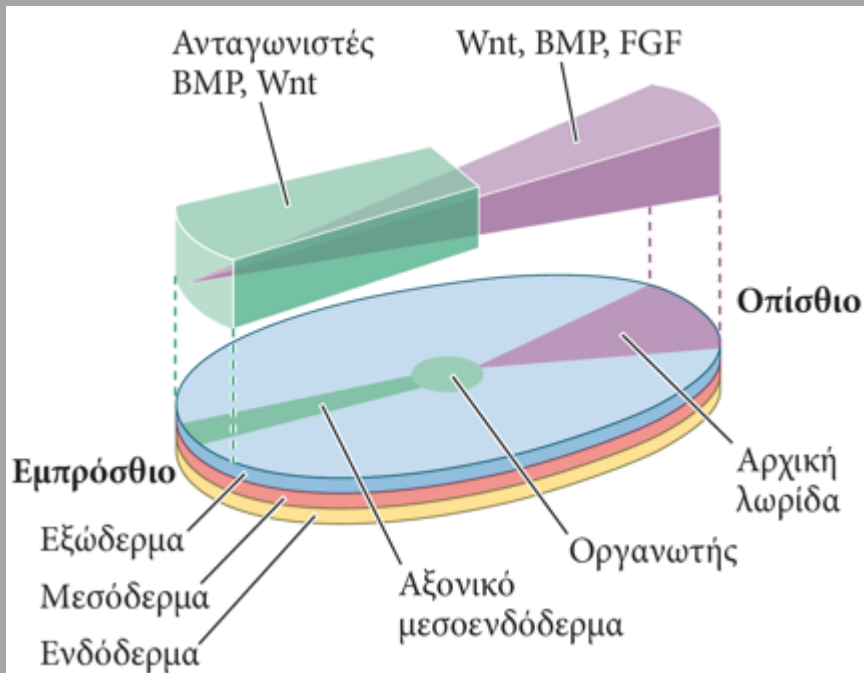
Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά οδηγούν σε ανωμαλίες στο σχηματισμό της κεφαλής ή του εγκεφάλου.



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

Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας

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



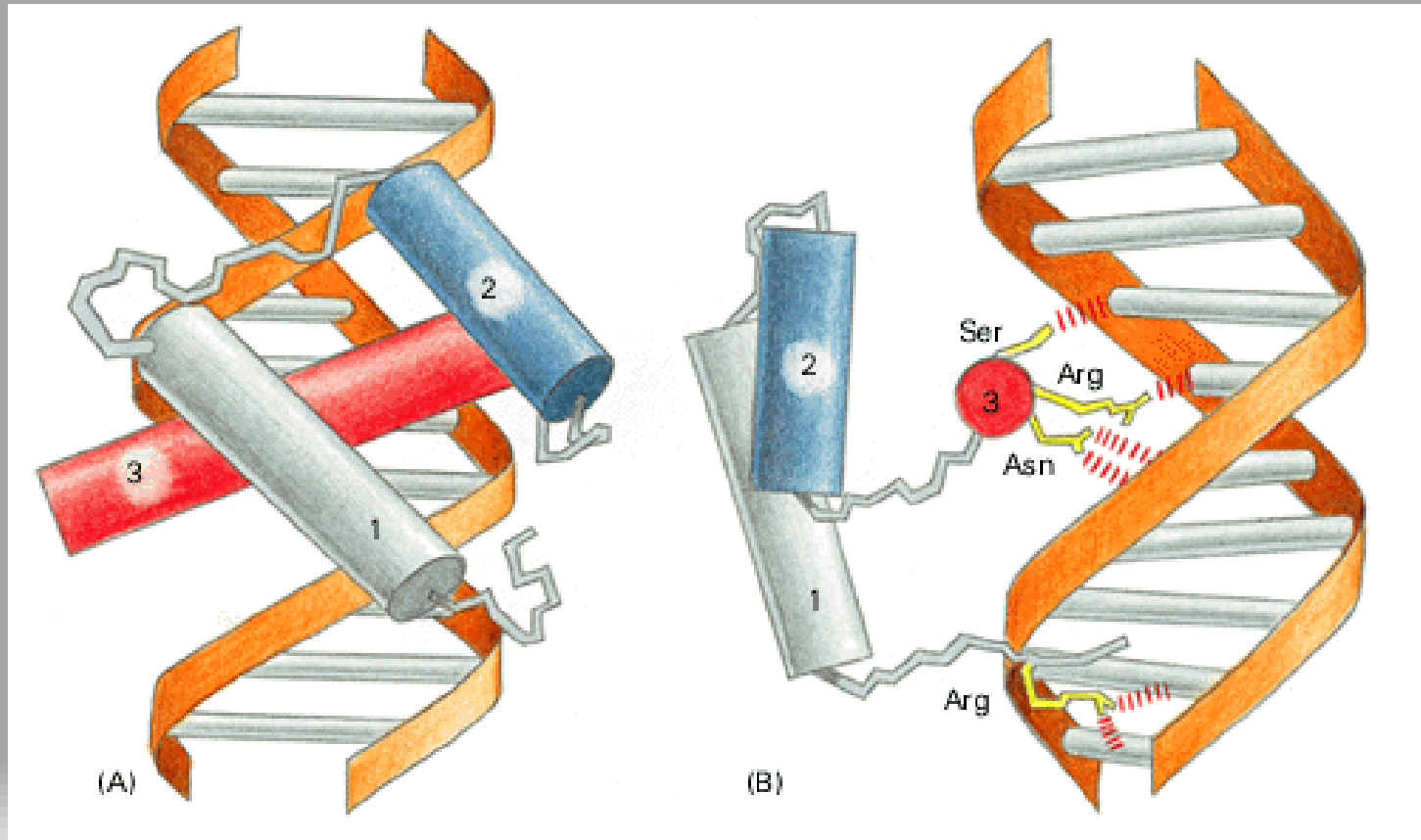
Καθορισμός αξόνων : ο εμπροσθοπίσθιος άξονας και τα γονίδια *Hox*

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

Evo-Devo: εξέλιξη και ανάπτυξη

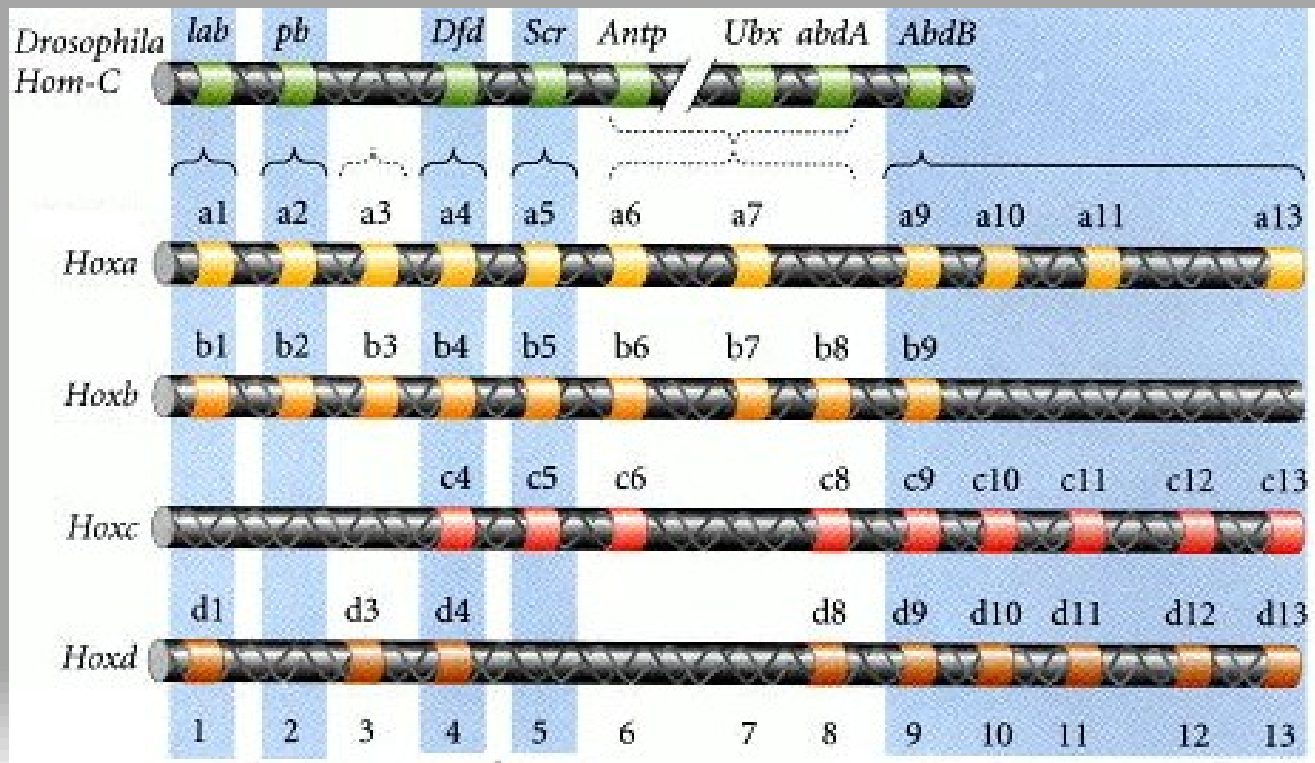
Τα γονίδια *Hox*

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



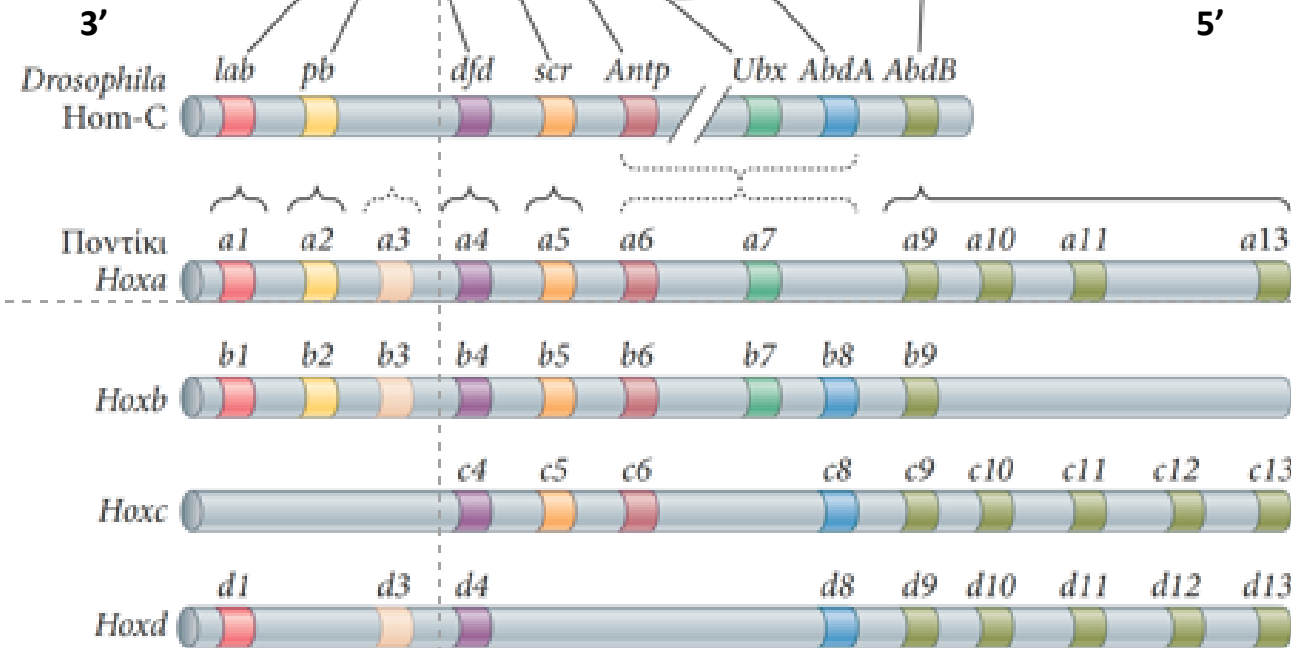
Τα γονίδια *Hox*

- Τα γονίδια *Hox* των σπονδυλοζώων είναι ομόλογα με αυτά του συμπλέγματος *Antennapedia* της *Drosophila*.
- Στον ποντικό (και στον άνθρωπο) υπάρχουν τέσσερα μη συνδεδεμένα συμπλέγματα που ονομάζονται *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* και *Hoxd* και εδράζονται στα χρωμοσώματα 6, 11, 15 και 2 αντίστοιχα.
- Τα συμπλέγματα αυτά έχουν προκύψει από διαδοχικούς διπλασιασμούς ενός αρχέγονου συμπλέγματος (απλά χορδωτά [αμφίοξος] έχουν ένα μόνο σύμπλεγμα *Hox*).

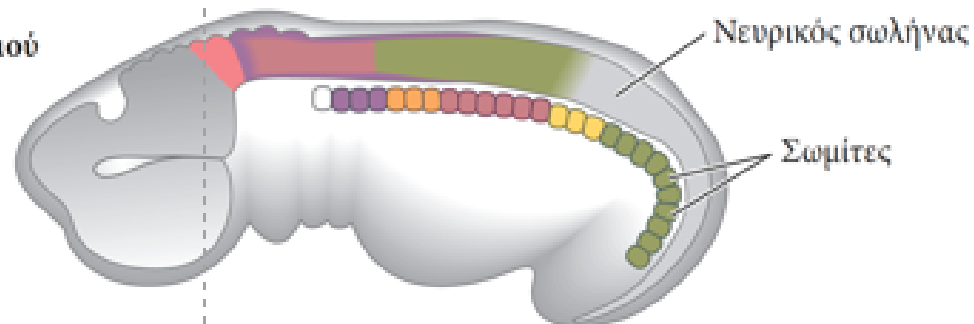


Τα γονίδια Hox

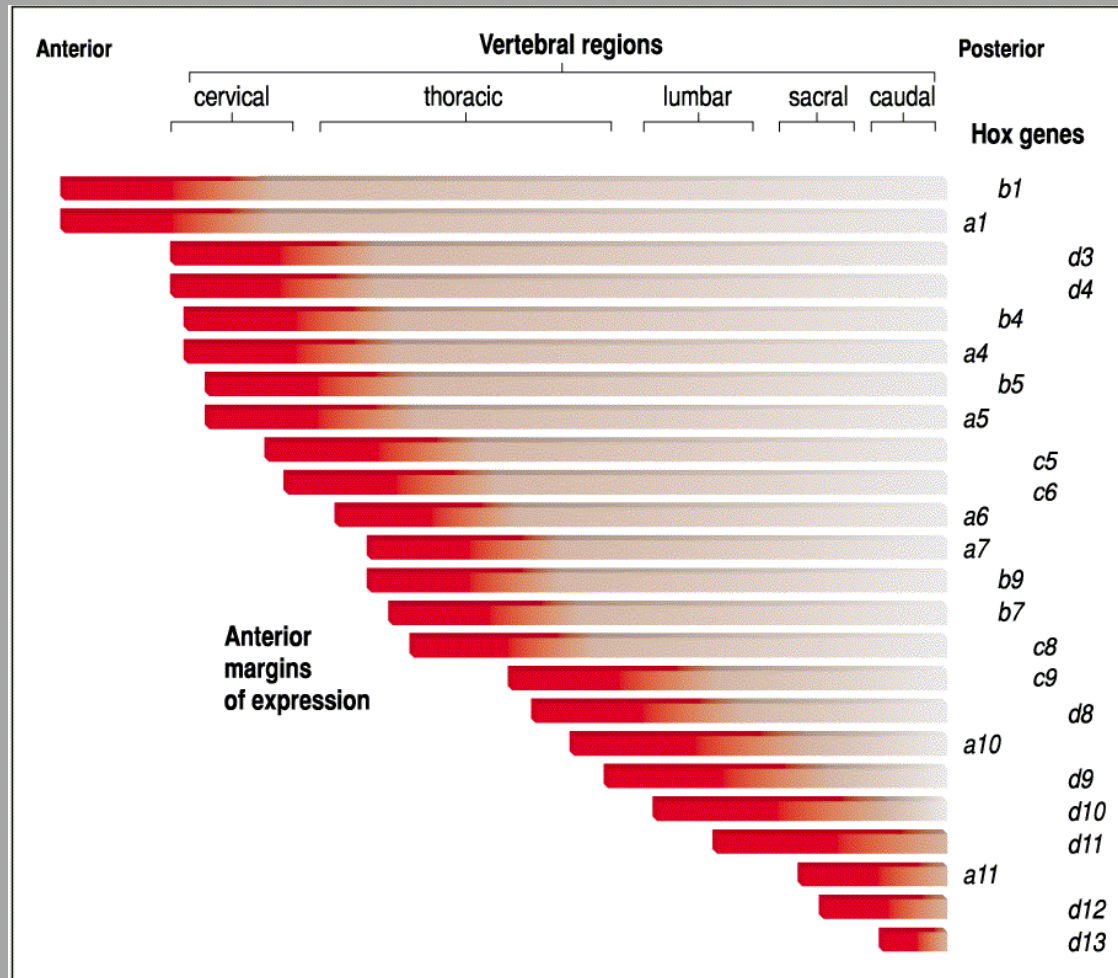
Έμβryo *Drosophila*
(10 ωρών)



Έμβryo ποντικίου
(12 ημερών)



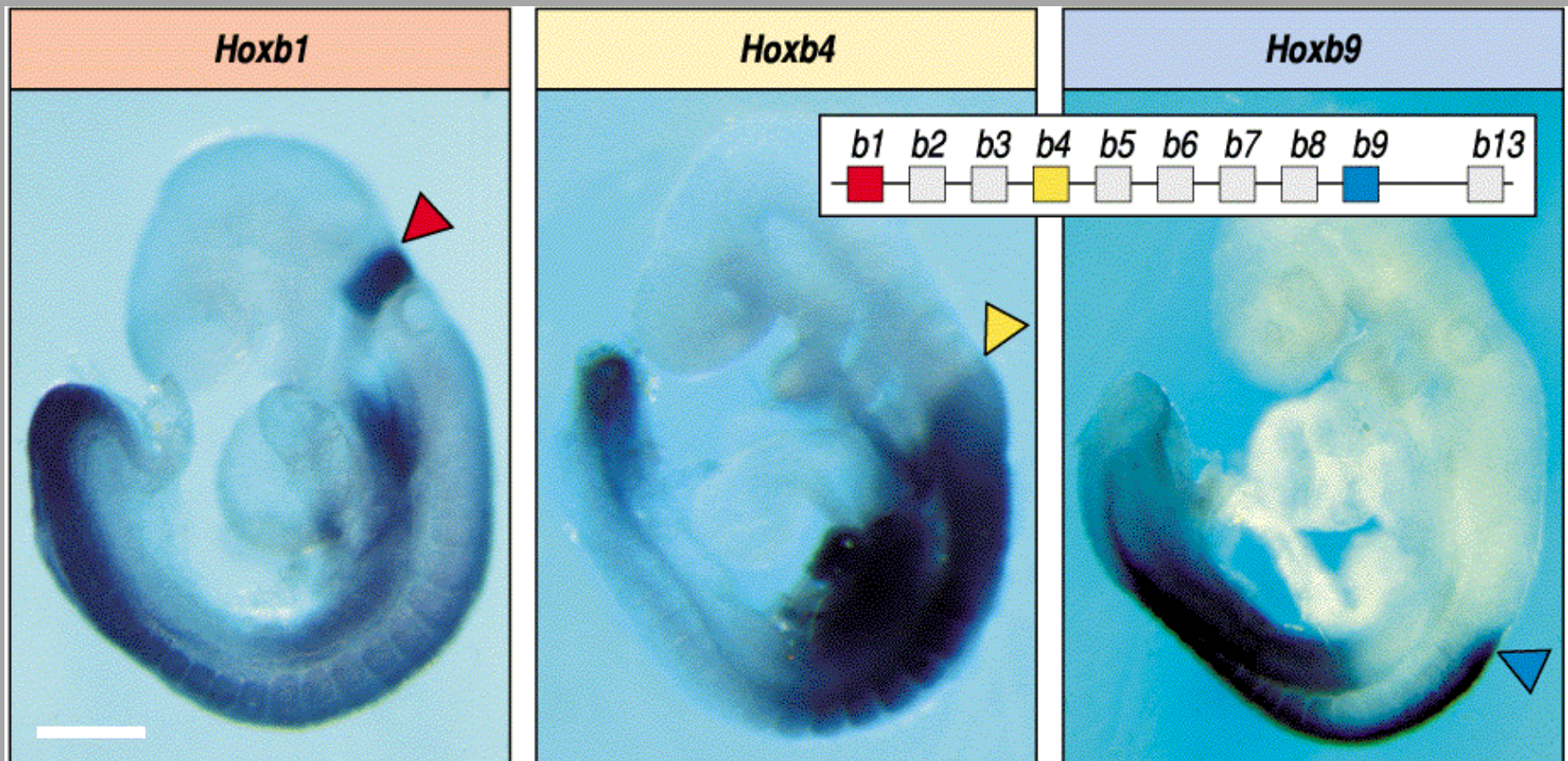
Τα γονίδια *Hox* και τα πρότυπα έκφρασής τους



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

Τα γονίδια *Hox*

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

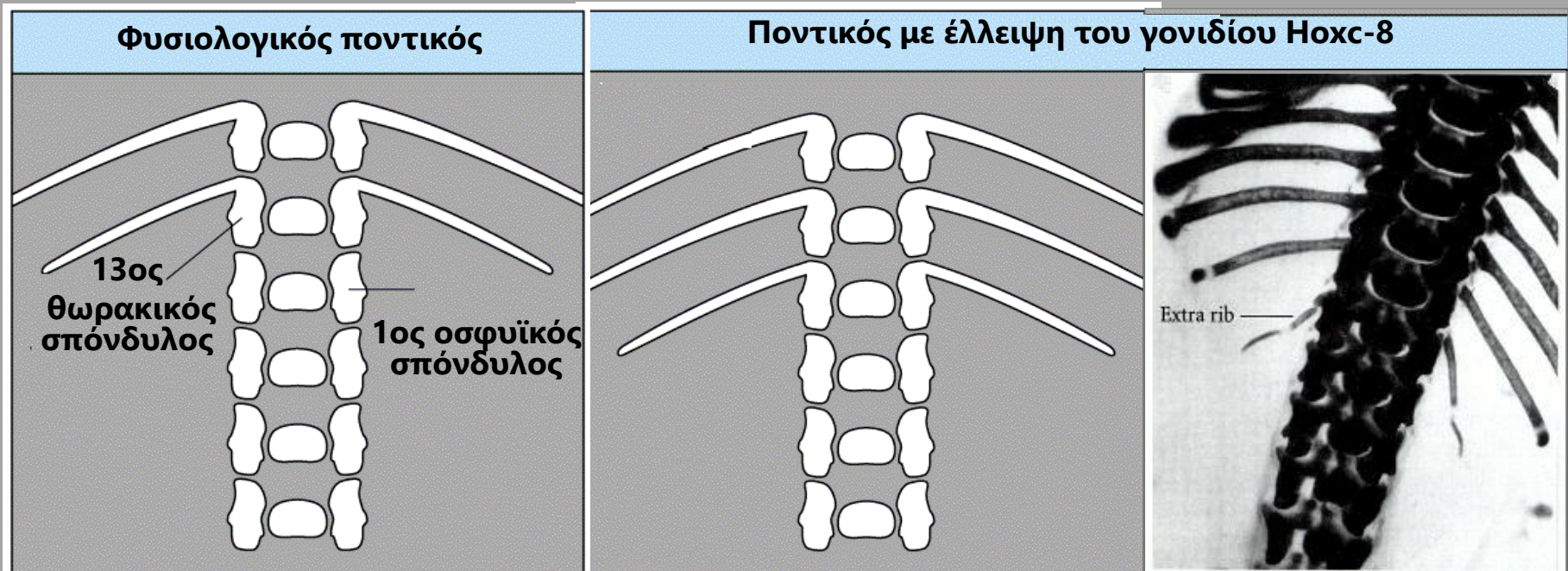


Έκφραση των *Hoxb1*, *Hoxb4* και *Hoxb9* σε έμβρυο ποντικού.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

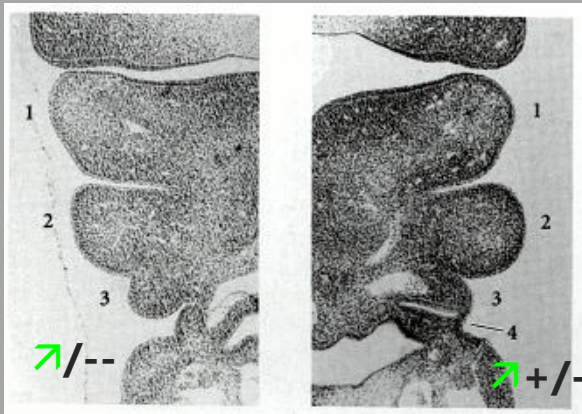
Μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της ενεργότητας των γονιδίων *Hox* οδηγούν πολλές φορές σε ομοιωτικό μετασχηματισμό. Οι μεταλλάξεις αυτές ονομάζονται ομοιωτικές. Ο φαινότυπος εμφανίζεται στο εμπρόσθιο όριο της έκφρασής του γονιδίου και όργανα ή δομές μετασχηματίζονται σε αντίστοιχα όργανα ή δομές που χαρακτηρίζουν τμήματα του σώματος που βρίσκονται πιο μπροστά.

Για παράδειγμα έλλειψη του γονιδίου *Hoxc-8* μετετρέπει τον πρώτο οσφυϊκό σπόνδυλο σε θωρακικό, όπως συμβαίνει και με τα γονίδια του *Antp* στη *Drosophila*.



Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*

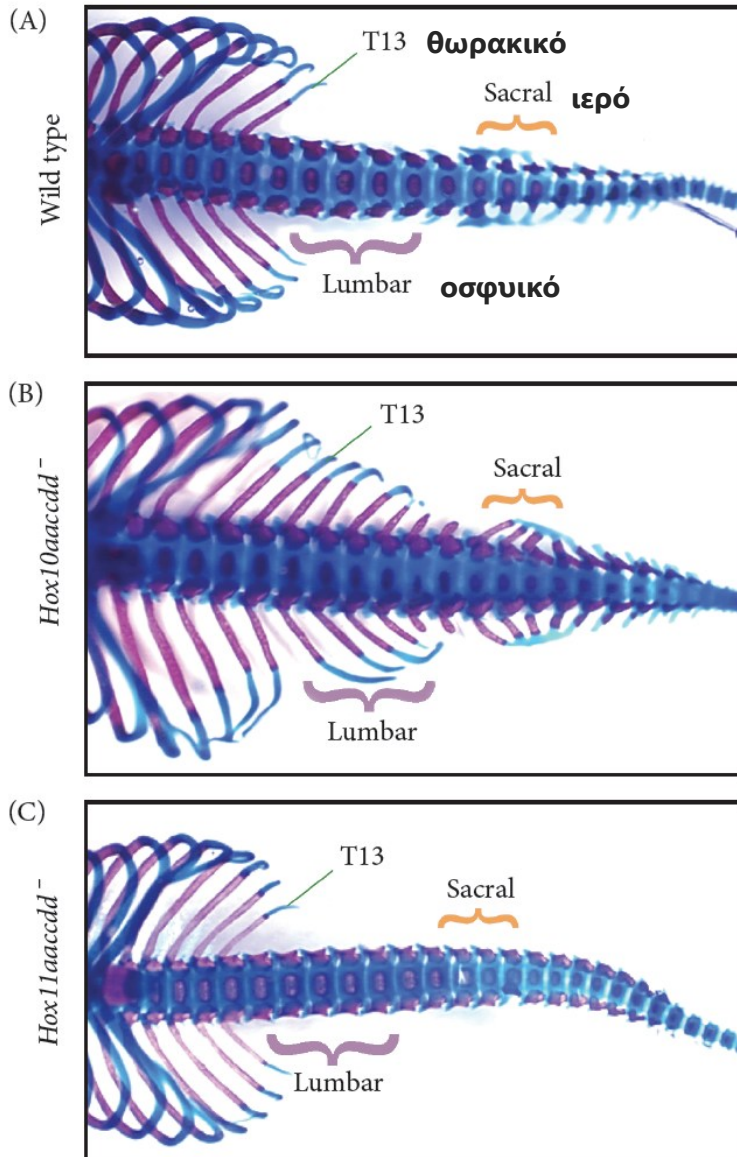
- Διαφορετικά γονίδια *Hox* είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό δομών και οργάνων κατά μήκος του Ε-Ο άξονα.



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

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

Μεταλλάξεις στα γονίδια *Hox*



Axial skeletons of mice in gene knockout experiments. Each photograph is of an 18.5 day embryo, looking upward at the ventral region from the middle of the thorax toward the tail.

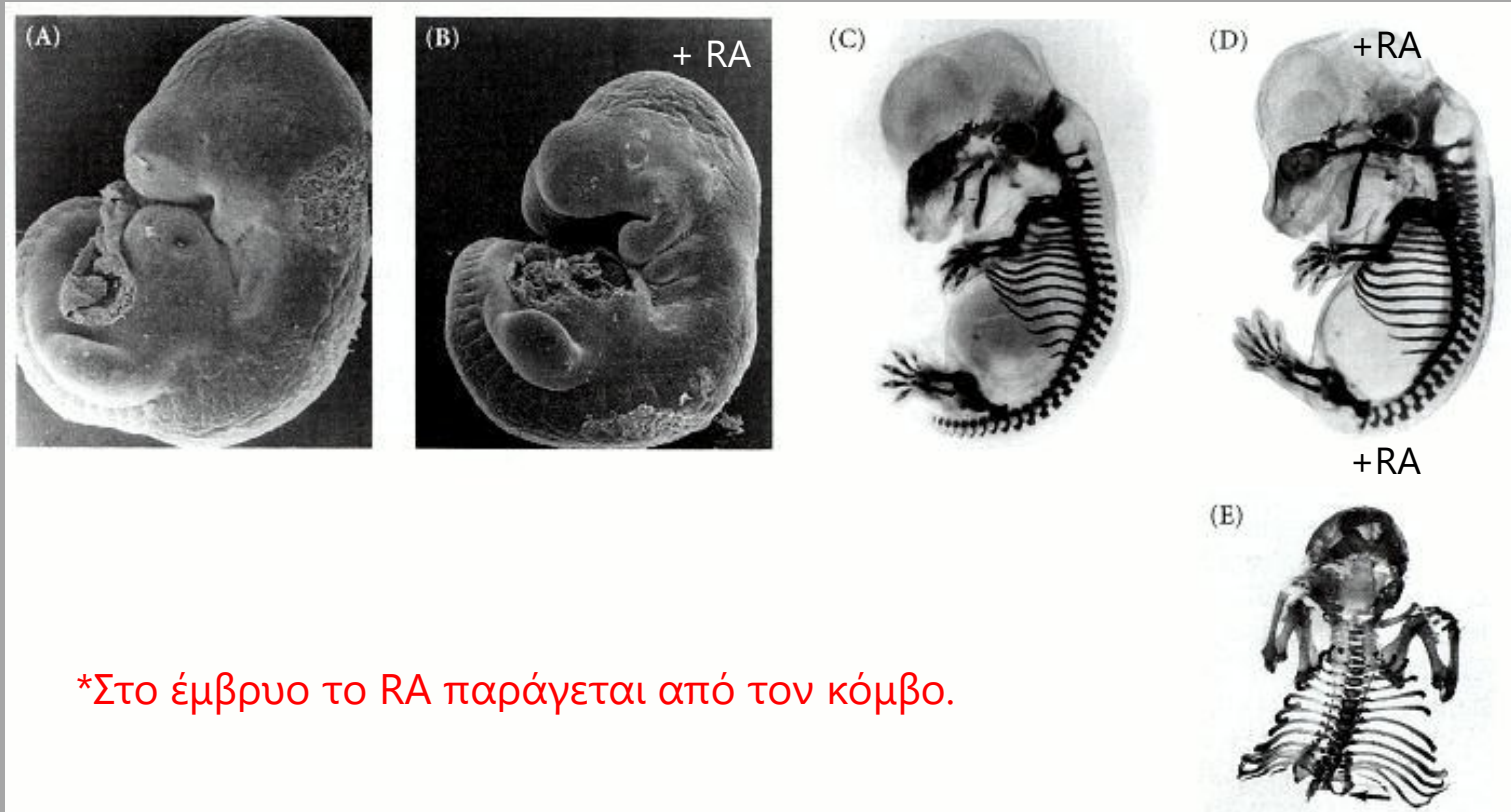
(A) Wild-type mouse.

(B) **Complete knockout of *Hox10*** paralogues (*Hox10aaccdd*) converts lumbar vertebrae (after the thirteenth thoracic vertebrae) into ribbed thoracic vertebrae.

(C) **Complete knockout of *Hox11*** paralogues (*Hox11aaccdd*) transforms the sacral vertebrae into copies of lumbar vertebrae. (Wellik and Capecchi 2003).

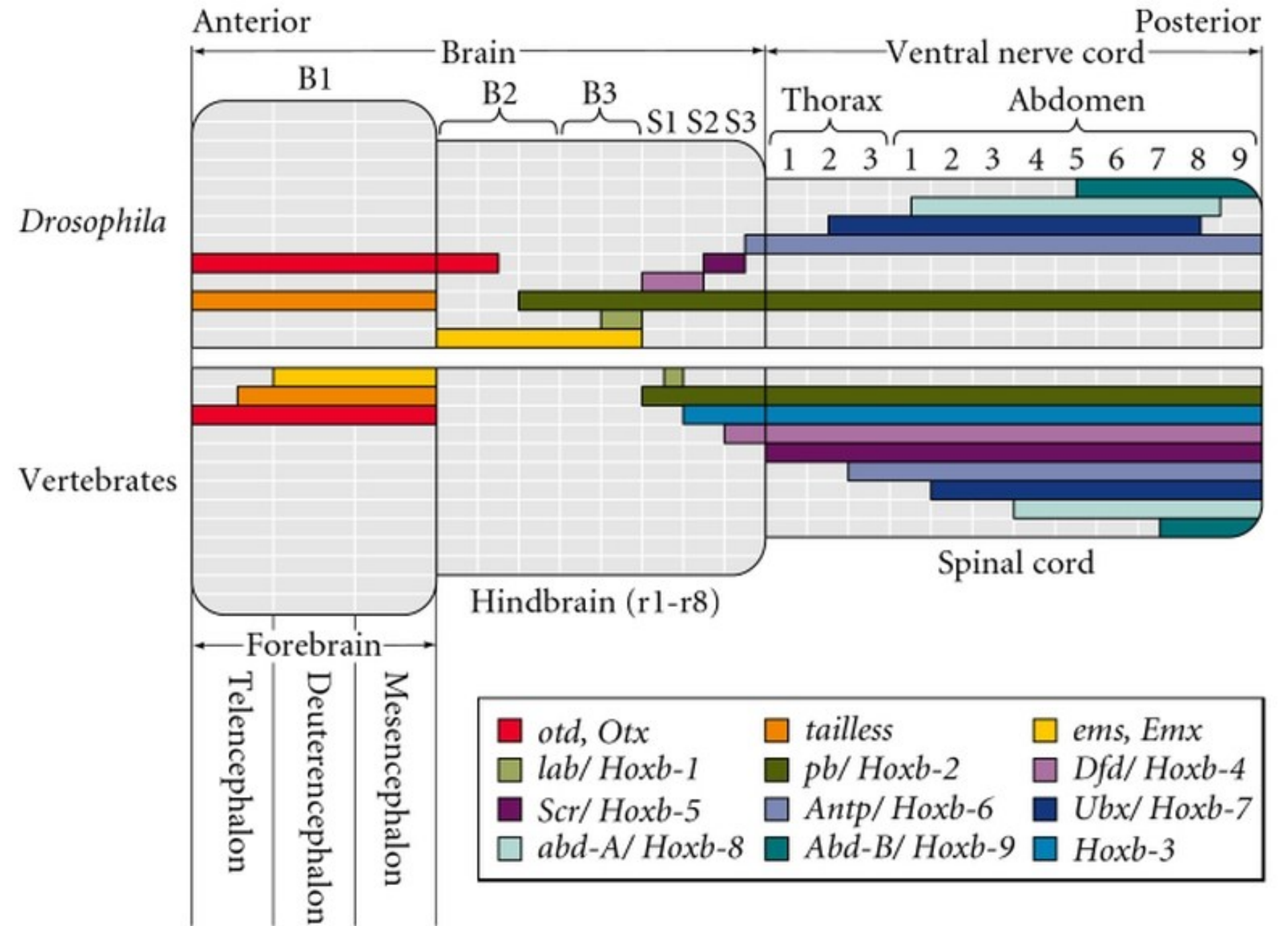
Τι θα συμβεί αν επέμβουμε στην έκφραση των *Hox*;

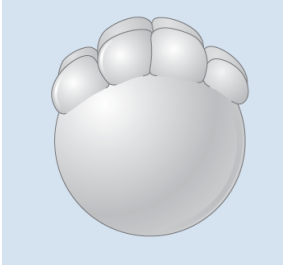
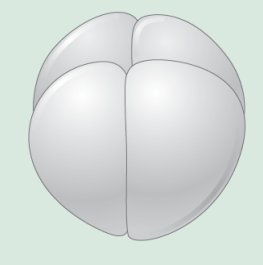
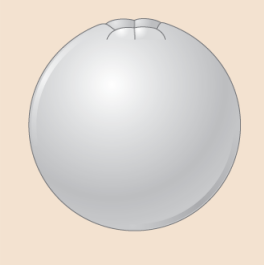
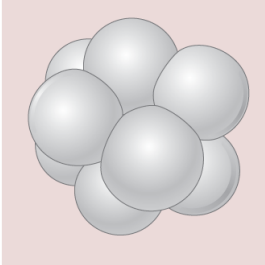
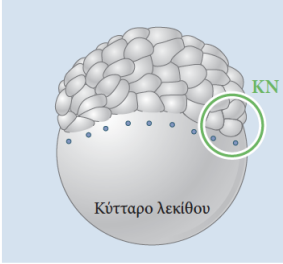
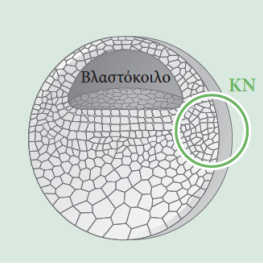
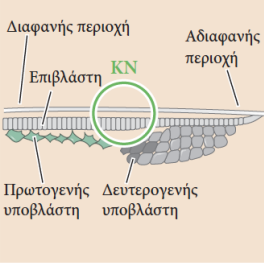
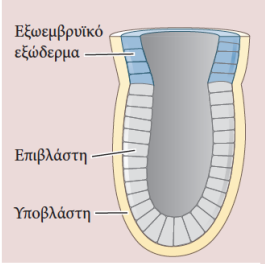
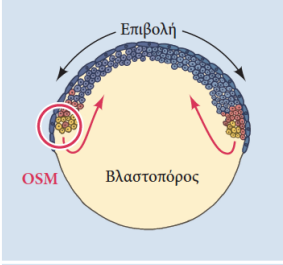
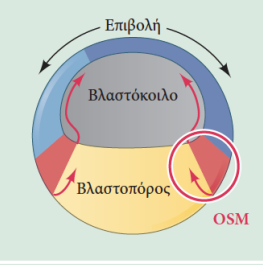
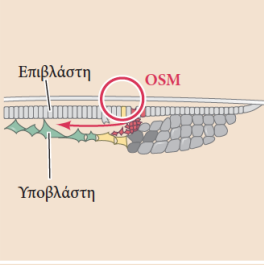
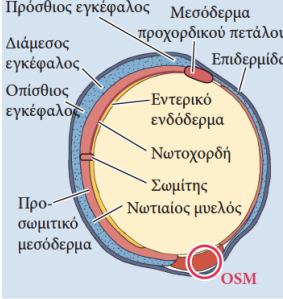
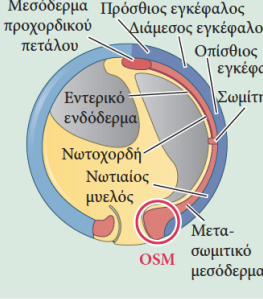
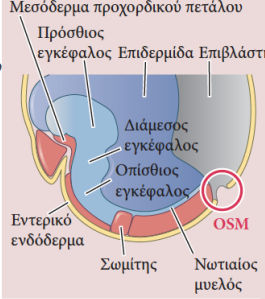
- Οι υποκινητές πολλών γονιδίων *Hox* περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία και ανταποκρίνονται στο ρετινοϊκό οξύ (RA)*.



*Στο έμβρυο το RA παράγεται από τον κόμβο.

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



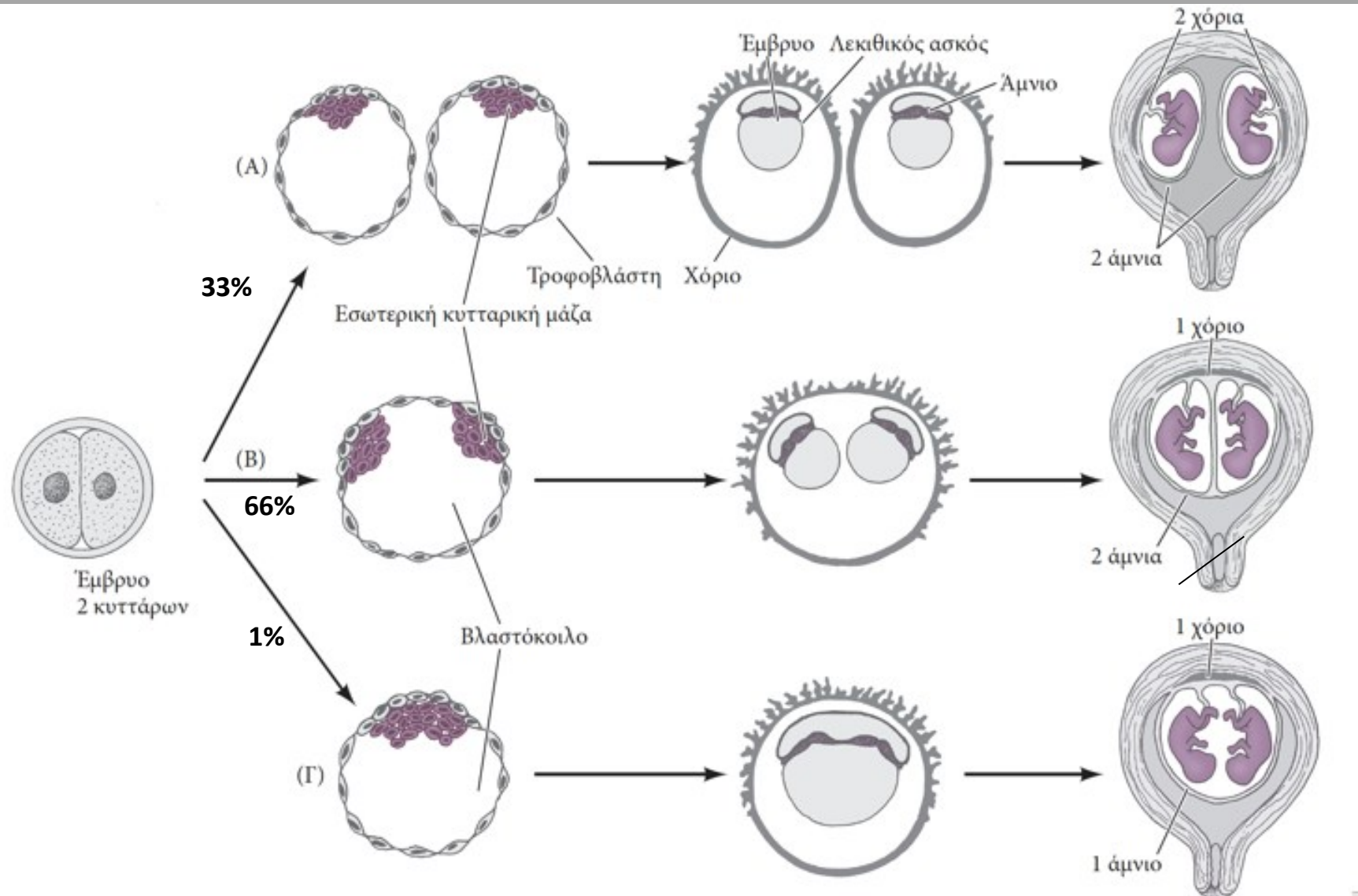
ΣΤΑΔΙΟ	Ψάρι-ζέβρα <i>Danio rerio</i>	Βάτραχος <i>Xenopus laevis</i>	Όρνιθα <i>Gallus gallus</i>	Ποντίκι <i>Mus musculus</i>
Πρώμη αυλάκωση				
Όψιμη αυλάκωση				
Πρώιμο γαστρίδιο				
Όψιμο γαστρίδιο				
Φαρυγγίδιο				

Κέντρο Nieuwkoop

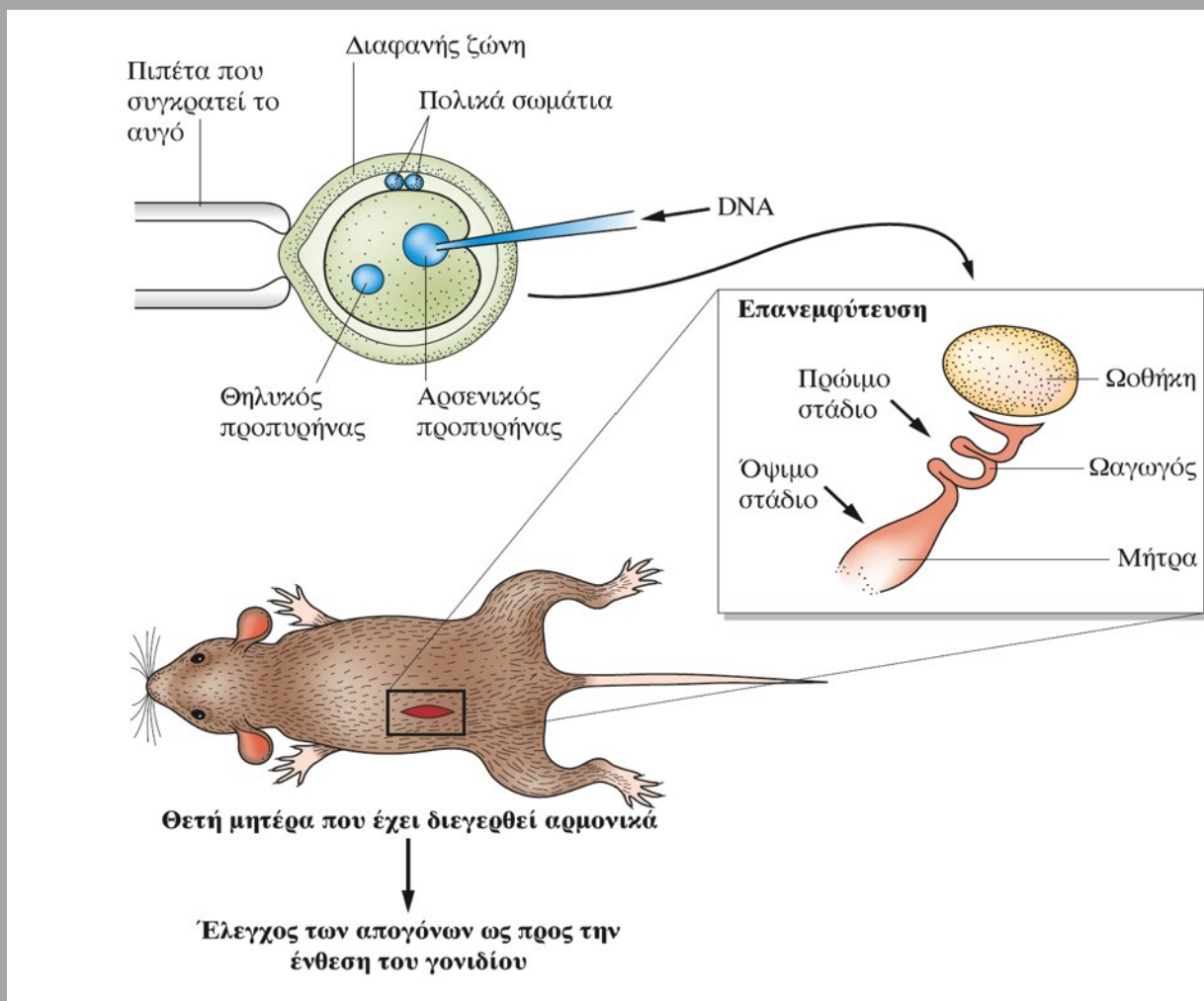
οργανωτής

οργανωτής

Σχηματισμός μονοζυγωτικών διδύμων (άνθρωπος)

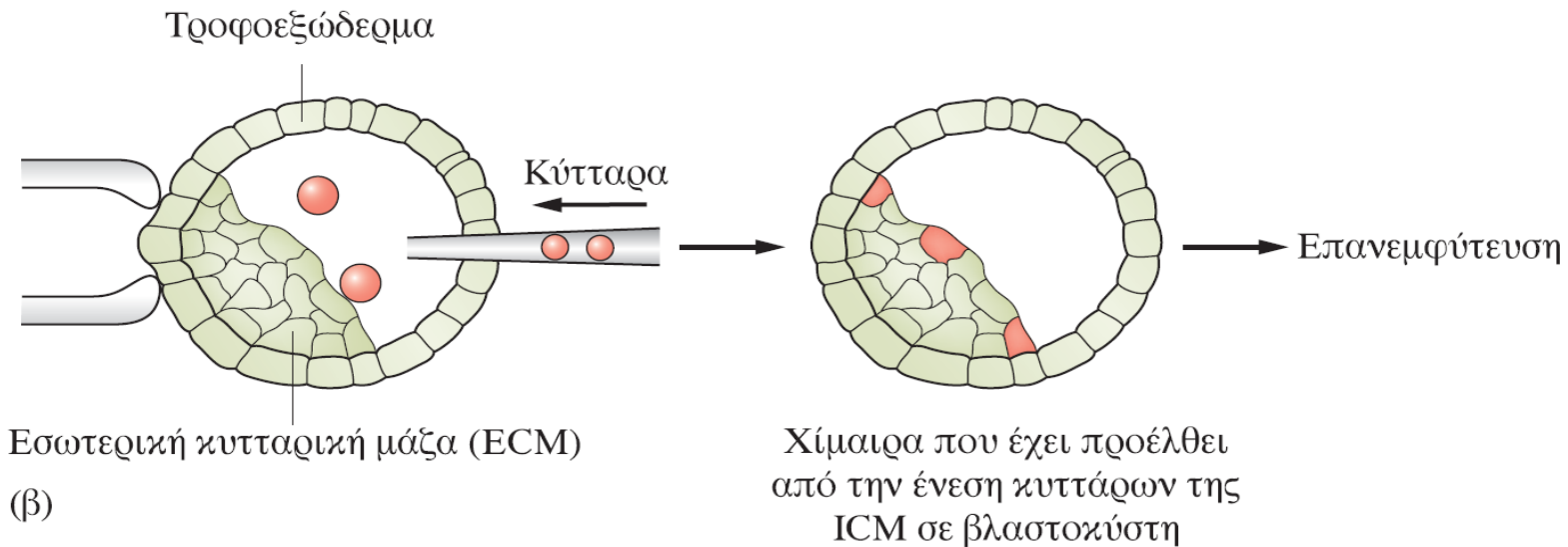
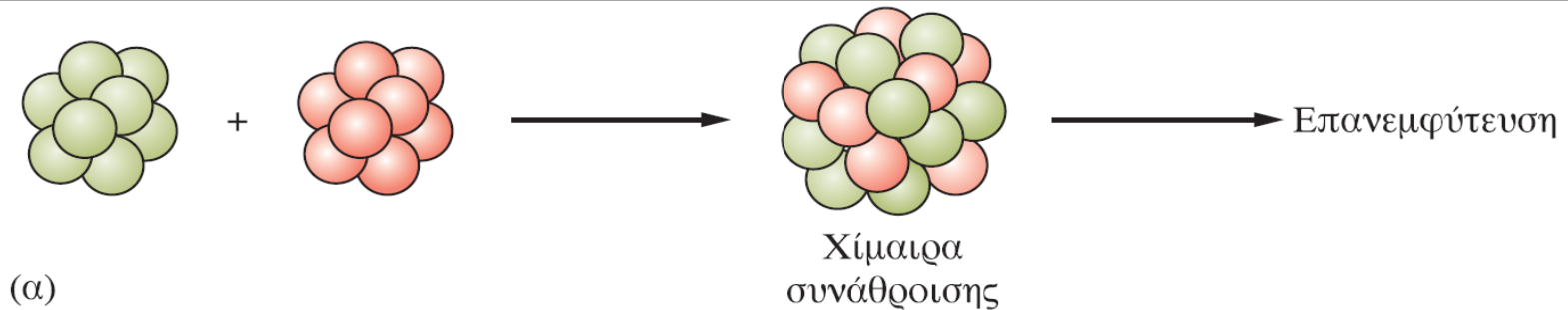


Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



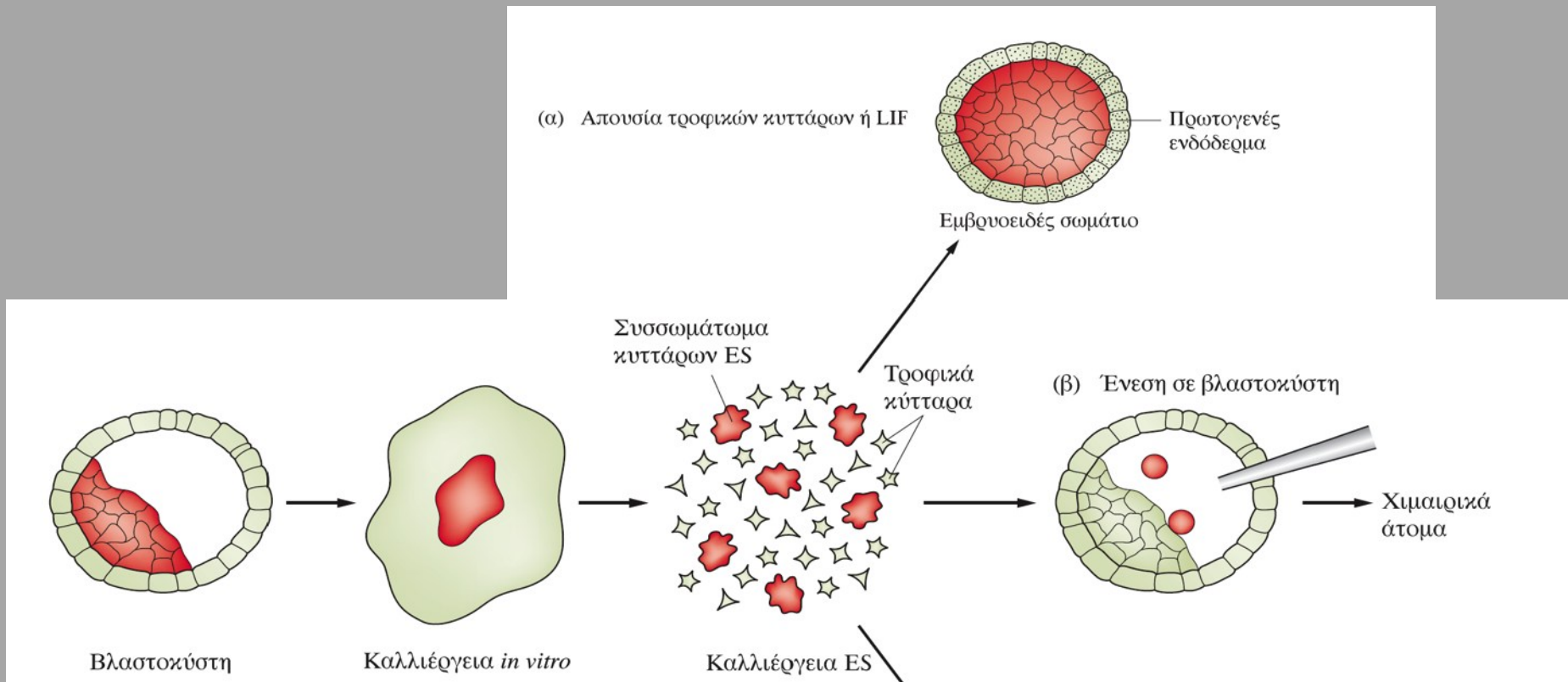
Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών ποντικών με ένεση DNA στον προπυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



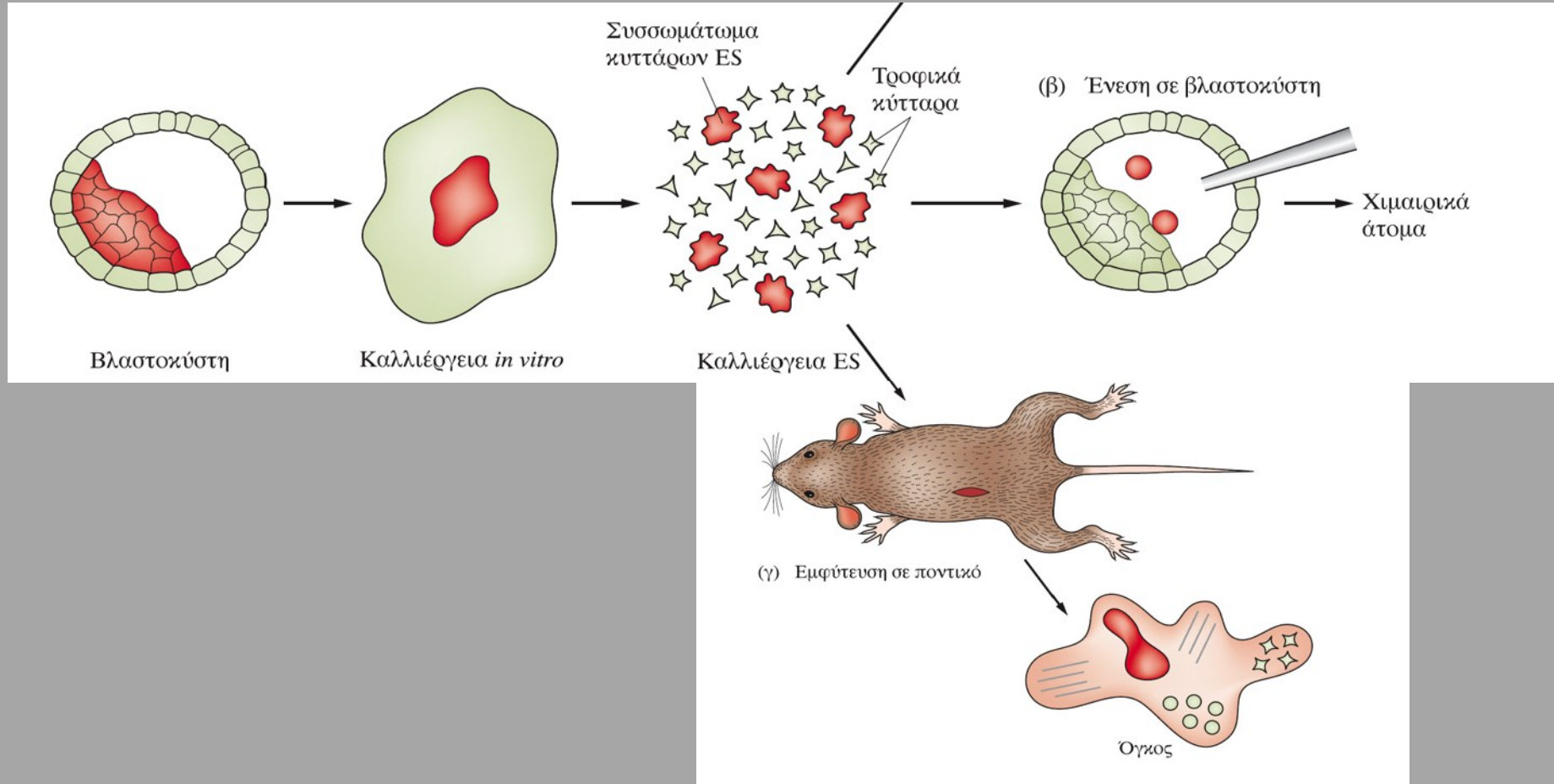
Δημιουργία χιμαιρικών ατόμων: (α) με συνάθροιση, (β) με ένεση κυττάρων στη βλαστοκύστη.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



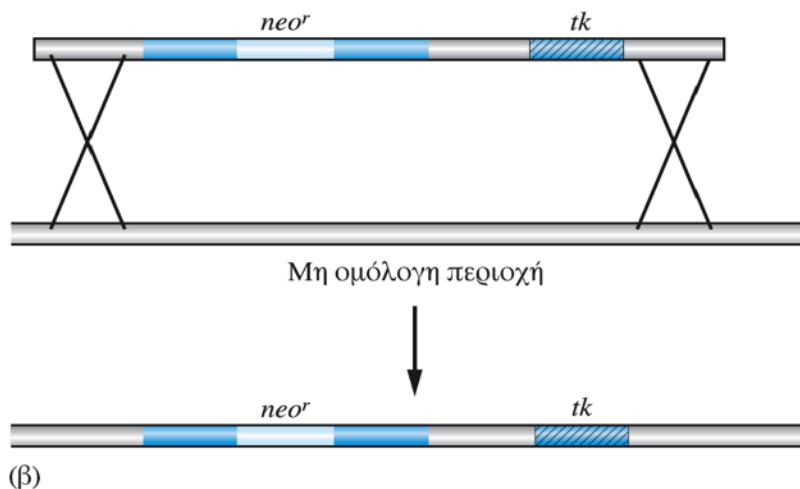
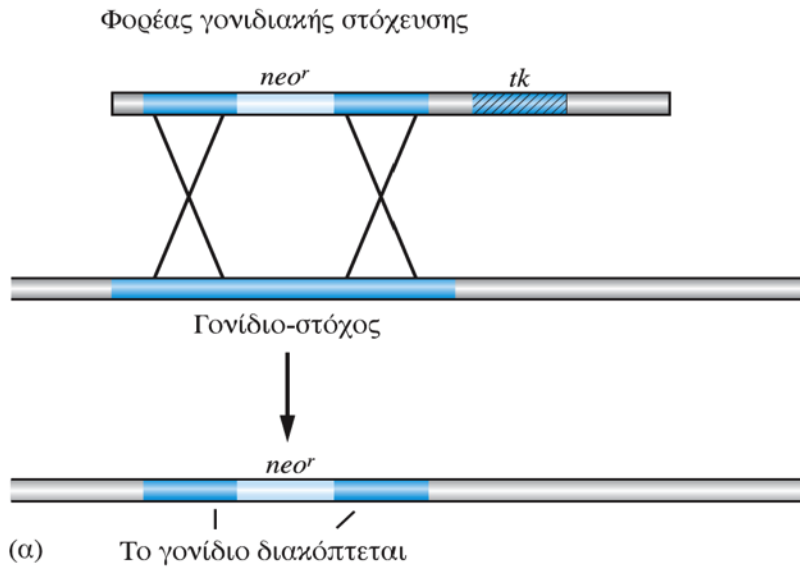
Κύτταρα ES. (α) Η αφαίρεση των τροφικών κυττάρων προκαλεί διαφοροποίηση *in vitro* των κυττάρων ES σε εμβρυοειδή σωματίδια.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



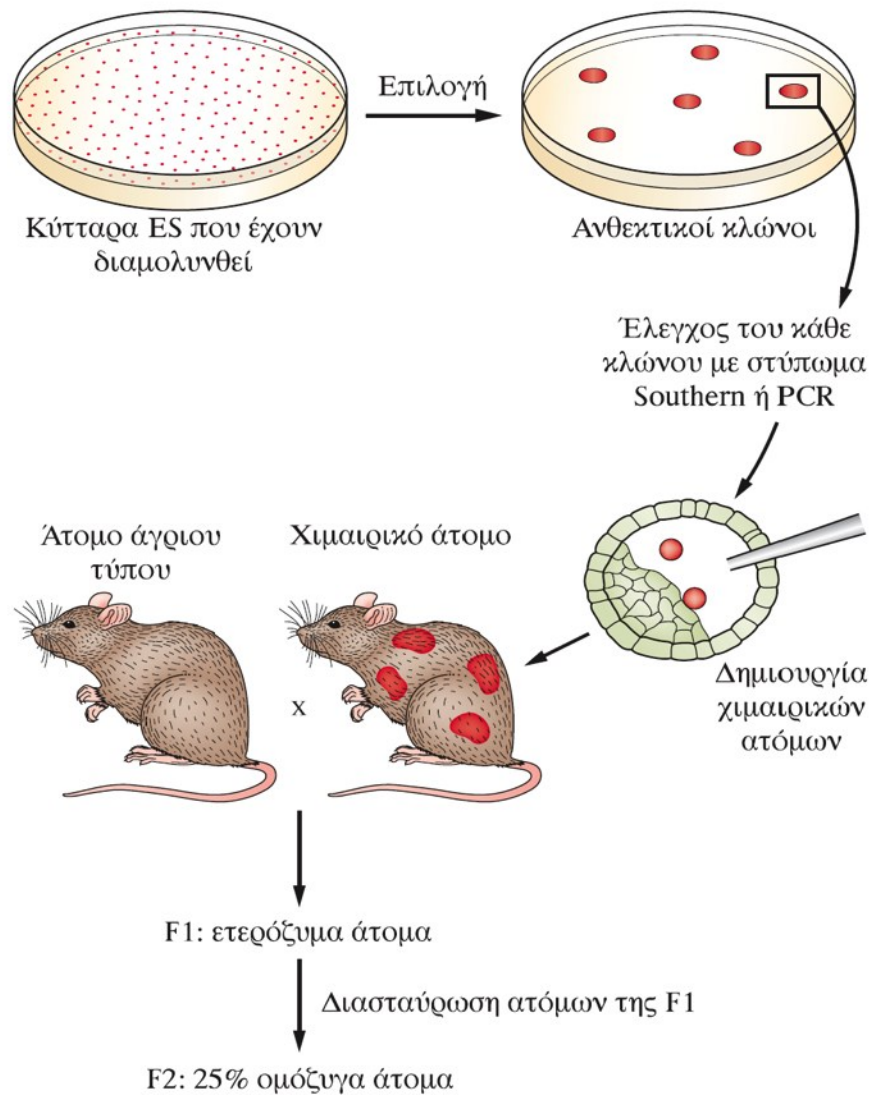
Κύτταρα ES. (β) Όταν κύτταρα ES ενίενται σε βλαστοκύστες, τότε είναι δυνατόν να αναπτυχθούν χιμαιρικά άτομα. (γ) Όταν κύτταρα ES εμφυτεύονται κάτω από τη νεφρική κάψα, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί τερατοκαρκίνωμα.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



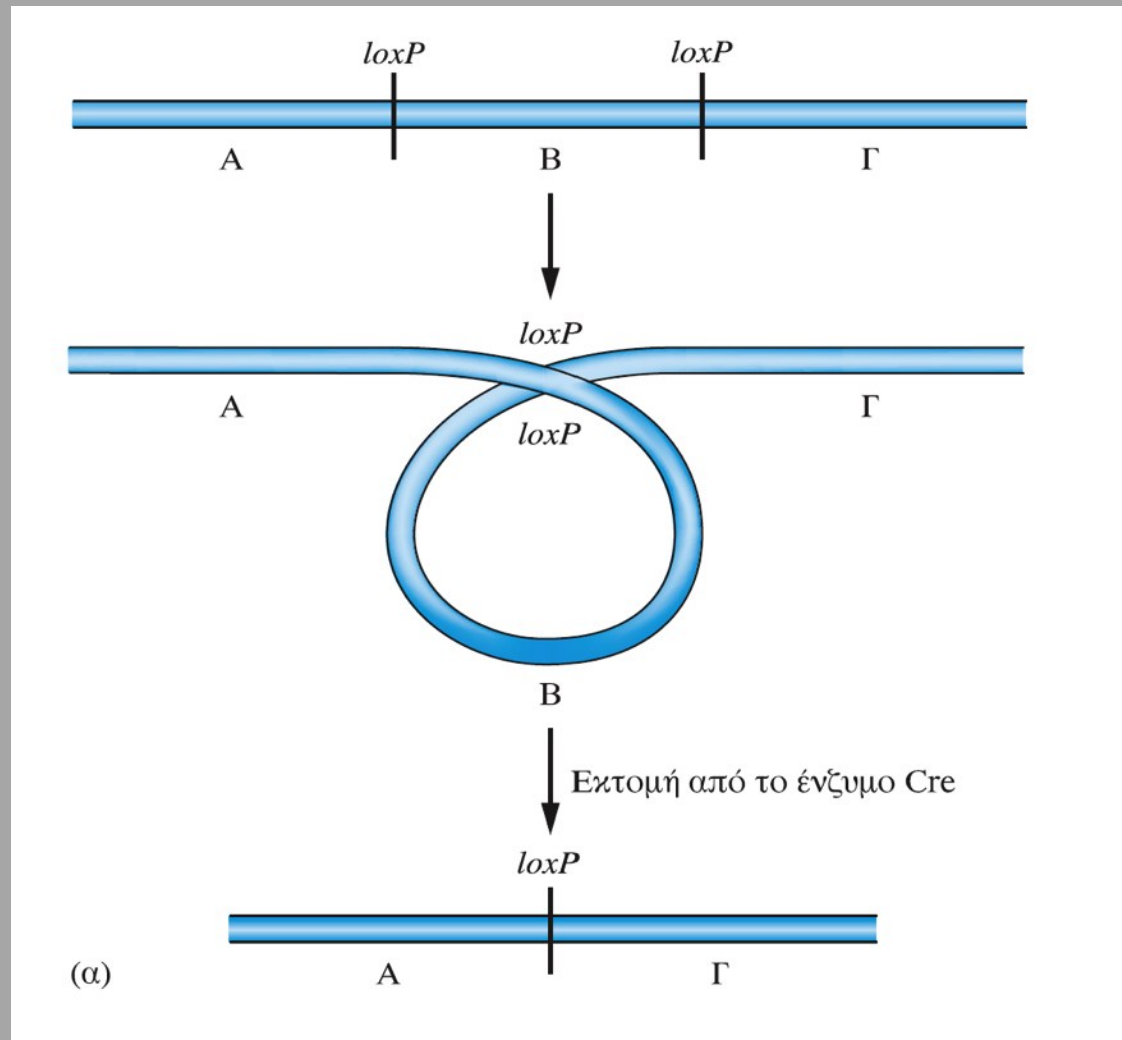
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων. (α) Ο ομόλογος ανασυνδυασμός διαταράσσει το γονίδιο-δέκτη και προκαλεί ένθεση του *neor* αλλά όχι του *tk*. (β) Η απλή ένθεση έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή του *neor* και του *tk* στο γονιδίωμα.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



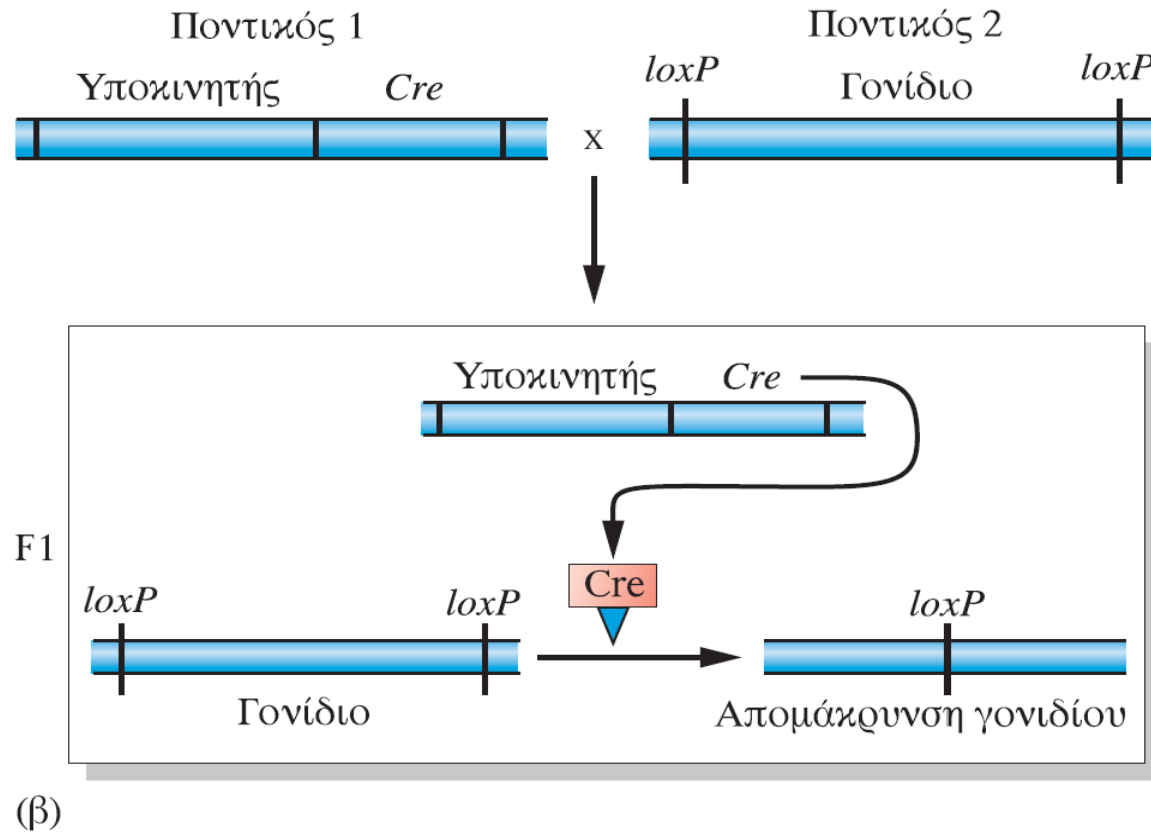
Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε κύτταρα ES.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



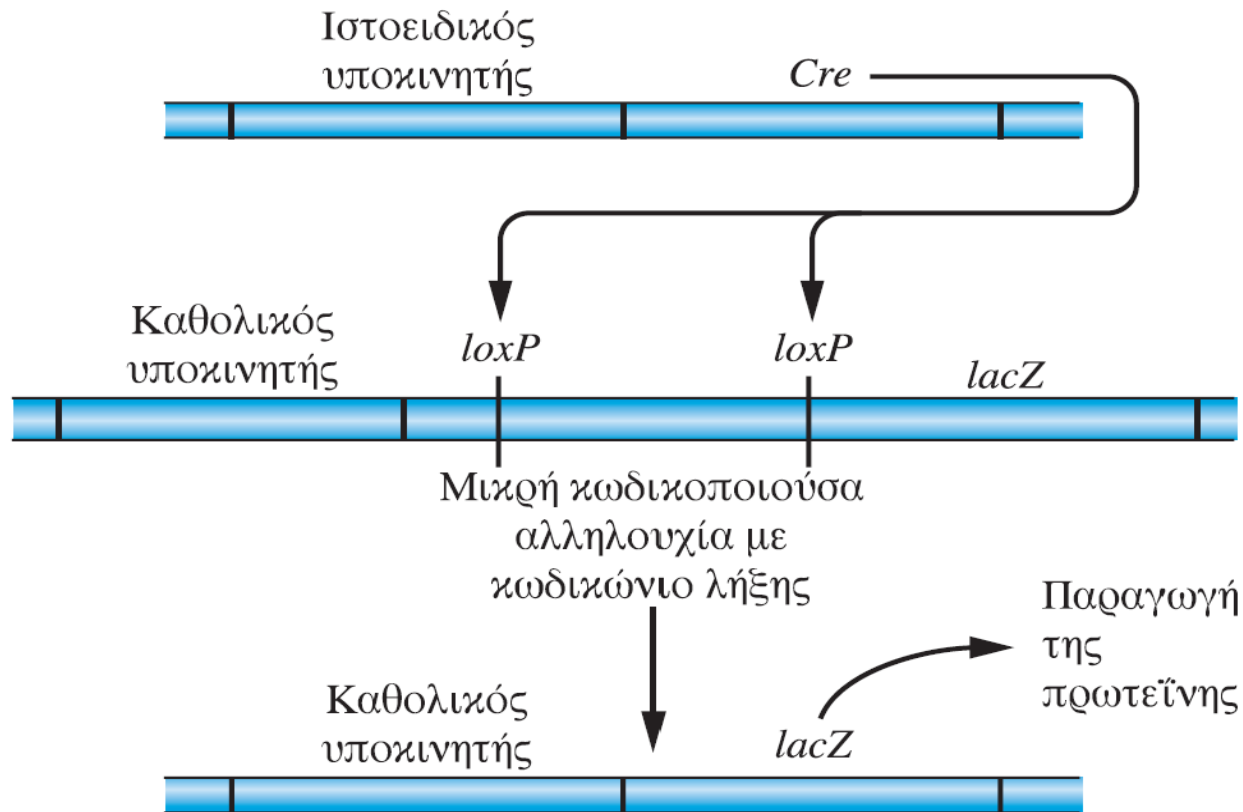
Σύστημα *cre-lox*. (α) Το ένζυμο ανασυνδυασμού Cre αποκόπτει το DNA που εντοπίζεται ανάμεσα σε δύο θέσεις *loxP*.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



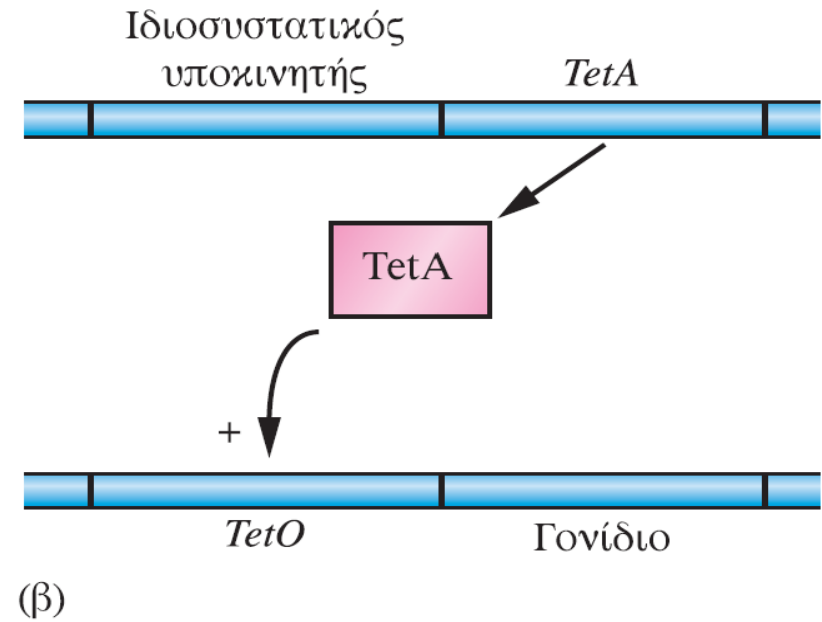
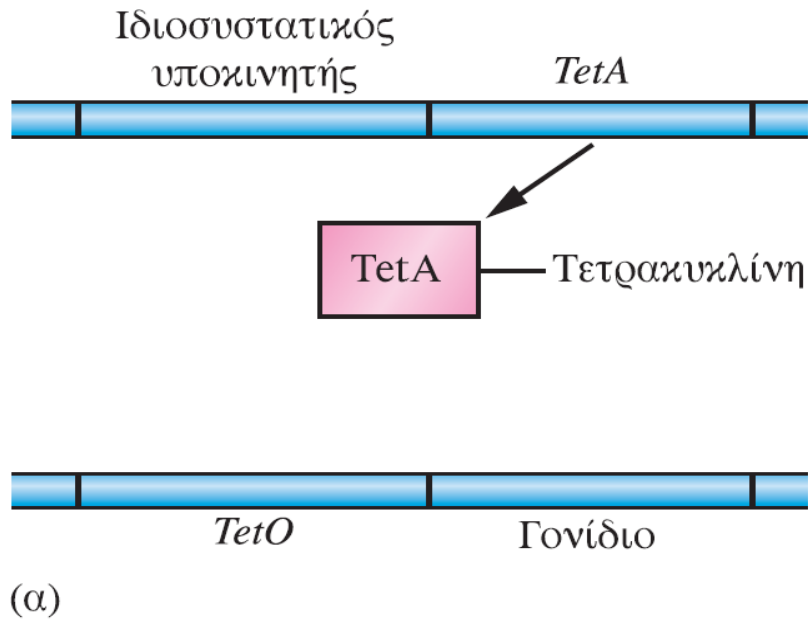
Σύστημα *cre-lox*. (β) Όταν διασταυρώνονται τα στελέχη 1 και 2, το *cre* μεταγράφεται από τον ιστοειδικό υποκινητή που το εντοπίζεται αναοδικά από αυτό με αποτέλεσμα την εκτομή του γονιδίου που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις θέσεις *loxP*.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



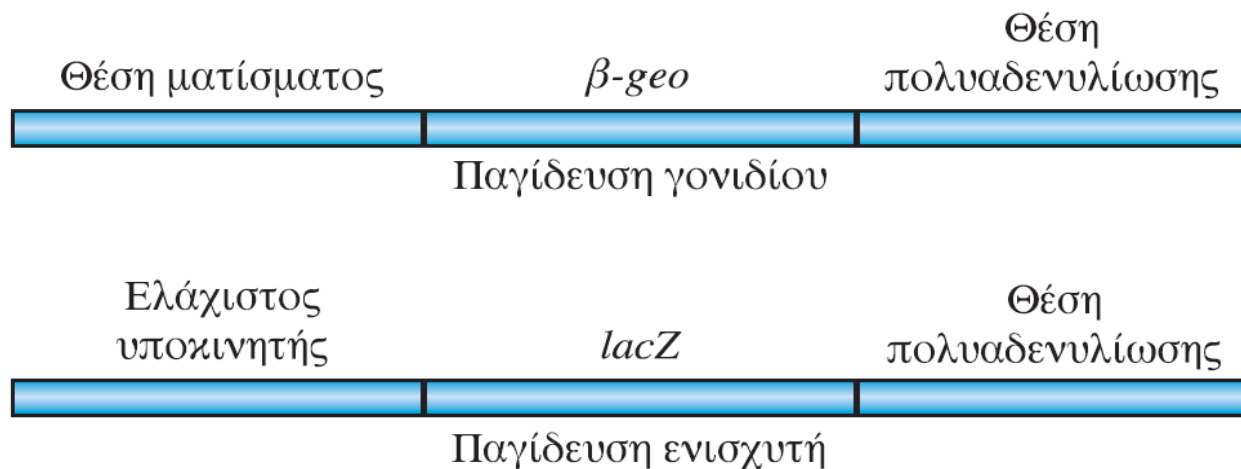
Το σύστημα *cre-lox* είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τη μόνιμη σήμανση ενός κυτταρικού πληθυσμού στον οποίο ένας ιστοειδικός υποκινητής είναι παροδικά ενεργός.

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



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

Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ανάπτυξης του ποντικού



Παγίδευση γονιδίου και παγίδευση ενισχυτή.